



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



Facultat de Medicina  
Departament de Pediatria, Obstetrícia i Ginecologia,  
i Medicina Preventiva

**NIVELLS DE VITAMINA D EN GESTANTS DEL NOSTRE  
MEDI: PRINCIPALS FACTORS DETERMINANTS I  
RESULTATS PERINATALS**

Tesi doctoral presentada per  
ÀGUEDA RODRÍGUEZ VICENTE  
Per optar al grau de Doctor en Medicina

Director de la Tesi:  
Dr. Antoni Payà Panades

Co-directora de la Tesi:  
Dra. Eva Morales Bartolomé

Sabadell 2016



*La nueva vida prende,  
prende tanto que no deja ni un pequeño rincón oscuro.  
La nueva vida llega y se queda.  
Se unen las llamas, el fuego crece,  
y la nueva vida inunda de luz los pequeños rincones oscuros.*

*German Rodríguez  
"Más vida"*



## **AGRAÏMENTS**

En primer lloc vull agrair al Dr. Payà la seva empenta, compressió i paciència a l'hora de dirigir aquesta tesi doctoral. També el meu sincer agraïment a la Dra. Morales, co-directora de la tesi, per la seva gran ajuda en tot el procés. Sense cap dels dos, no m'hagués estat possible enllestir aquesta llarga tasca.

Al Dr. Foradada i la Dra. Canet, per confiar-me la coordinació de l'estudi INMA a l'Hospital Parc Taulí quan tot just acabava la residència.

Al Dr. Sunyer, ànima del projecte INMA, per facilitar-me tot el que vaig necessitar abans i durant l'elaboració de la tesi.

A la Sílvia Fochs, Anna Boixader i Núria Pey, pel seu treball de camp realitzat de forma excepcional i pels moments compartits.

A tots els professionals del CAP Sant Fèlix i de l'Hospital Parc Taulí (obstetres, llevadores, infermeres, auxiliars d'infermeria, lliterers) que van participar de forma desinteressada en tasques essencials per dur a terme l'estudi.

A tots els co-autors dels articles que formen part d'aquesta tesi, per la seva imprescindible col.laboració.

A totes les dones que han participat a l'estudi i que, juntament amb els seus fills i les seves parelles, formen part de la gran família d'INMA.

Vull agrair de forma molt especial a tots i cadascun del meus companys del Servei de Ginecologia i Obstetrícia, per haver-me ensenyat, cuidat, acompanyat. Per riure i plorar plegats. Per tenir cura de les dones i els infants d'una manera respectuosa i professional. Per ajudar-me a estimar la meua professió.

Als meus pares, impulsors de la meua carrera, mestres de la vida i persones excepcionals.

Gràcies a Susana, a la meua tia Pili i a la *abuela* Caridad. Tres dones a les que estimo i m'han transmès la seva valentia davant de les adversitats.

A Carlos, el meu amor, per l'ajuda incondicional i per tots anys compartits.

A les meves princeses Sàmia i Nora, que són el millor regal que la vida m'ha donat.

Al meu àngel Victor.

Gràcies.

**NIVELLS DE VITAMINA D EN GESTANTS DEL NOSTRE  
MEDI: PRINCIPALS FACTORS DETERMINANTS I  
RESULTATS PERINATALS**





# ÍNDEX

1. INTRODUCCIÓ GENERAL.....	11
1.1. INTRODUCCIÓ.....	13
1.2. FONTS DE VITAMINA D.....	14
1.3. METABOLISME DE LA VITAMINA D.....	16
1.3.1. Metabolisme ossi.....	18
1.3.2. Funcions no esquelètiques.....	18
1.4. REQUERIMENTS DE VITAMINA D.....	21
1.5. CONCENTRACIÓ ÒPTIMA DE VITAMINA D.....	22
1.6. EXCÈS DE VITAMINA D.....	23
1.7. DEFICIÈNCIA DE VITAMINA D.....	24
1.7.1. Epidemiologia.....	24
1.7.2. Implicacions clíniques.....	24
1.7.3. Grups de risc.....	29
1.8. VITAMINA D I GESTACIÓ.....	30
1.8.1. Metabolisme de la vitamina D durant la gestació.....	30
1.8.2. Deficiència de la vitamina D en la gestació.....	31
1.8.3. Suplements de vitamina D durant la gestació.....	36
1.9. JUSTIFICACIÓ I ESTRUCTURA DE LA TESI DOCTORAL.....	38
2. HIPÒTESI DE TREBALL I OBJECTIUS.....	39
3. METODOLOGIA.....	43
3.1. DISSENY I POBLACIÓ D'ESTUDI.....	45

3.2.	DETERMINACIÓ DE 25-HIDROXIVITAMINA D.....	46
3.3.	RECOLLIDA DE DADES.....	47
3.3.1.	Resultats perinatals.....	47
3.3.2.	Factors determinants.....	49
3.4.	ANÀLISI ESTADÍSTICA.....	51
3.5.	ASPECTES ÈTICS.....	53
3.6.	FINANÇAMENT.....	53
4.	RESULTATS.....	55
4.1.	FACTORS DETERMINANTS DELS NIVELLS DE VITAMINA D.....	57
4.2.	VITAMINA D I RESULTATS PERINATALS.....	61
5.	DISCUSSIÓ.....	67
5.1.	FACTORS DETERMINANTS DELS NIVELLS DE VITAMINA D.....	69
5.2.	VITAMINA D I RESULTATS PERINATALS.....	73
5.3.	PUNTS FORTS I LIMITACIONS DE L'ESTUDI.....	75
6.	CONCLUSIONS FINALS.....	77
7.	PRIMER ARTICLE: Vitamin D Status in Pregnancy and Determinants in a Southern European Cohort Study.....	81
8.	SEGON ARTICLE: Associations of maternal circulating 25-hydroxyvitamin D3 concentration with pregnancy and birth outcomes.....	95
9.	ANNEXES.....	107
10.	BIBLIOGRAFIA.....	113

## **1. INTRODUCCIÓ GENERAL**



## 1.1. INTRODUCCIÓ

La deficiència de vitamina D és un problema de salut pública a nivell mundial amb importants conseqüències clíniques. Tot i això, la majoria de països encara no disposen de dades a nivell poblacional, sobretot de gestants, infants i adolescents. S'ha estimat que a prop de mil milions de persones presenten nivells de vitamina D en sang inadequats i que la deficiència es pot trobar en tots els grups ètnics i a totes les edats<sup>1</sup>.

La vitamina D és essencial pel manteniment de l'homeòstasi del calci, però també és important per a la salut i benestar en general. La deficiència de Vitamina D s'ha relacionat de forma més clàssica amb l'aparició de problemes en el desenvolupament del sistema ossi com el Raquitisme. En l'actualitat i en països desenvolupats, el raquitisme ha estat pràcticament eradicat gràcies a la complementació de vitamina D (afegida a la llet, al nostre medi), però altres conseqüències per a la salut materno-infantil del dèficit d'aquesta vitamina han adquirit importància en els últims temps. En aquest sentit, s'ha relacionat el dèficit de vitamina D en dones embarassades amb problemes de salut que inclouen major risc de diabetis gestacional, estats hipertensius de l'embaràs, part preterme i cesària<sup>2</sup>.

Durant la infància, la deficiència de vitamina D pot ser causa de retard de creixement, deformitats esquelètiques i pot incrementar el risc de fractures<sup>2,3</sup>.

En adults, s'ha relacionat amb l'inici o exacerbació de l'osteopènia i osteoporosi, osteomalàcia i debilitat muscular<sup>4,5</sup>.

El descobriment de receptors per a la vitamina D en múltiples teixits i grups cel·lulars, així com el coneixement més específic del seu metabolisme, ha permès una millor comprensió sobre les funcions d'aquesta vitamina. En aquest sentit, s'ha relacionat la importància que podria tenir la vitamina D en relació amb el risc d'aparició de vàries malalties de tipus crònic, incloent diabetis, neoplàsies, malalties autoimmunes, neurològiques, o cardiovasculars<sup>6,7,8</sup>.

## 1.2. FONTS DE VITAMINA D

L'aport de vitamina D procedeix de l'exposició solar, de la dieta o de suplementos farmacològics (**Taula 1**). Al mateix temps, existeixen una sèrie de factors que poden afectar la seva síntesi, com ara són: el sexe, l'ètnia, la pigmentació de la pell, la concentració de melanina, la composició corporal, factors genètics, així com la latitud, el clima i l'estació de l'any<sup>9</sup>.

Molt pocs aliments contenen vitamina D de forma natural, de manera que la principal font és la síntesi dèrmica, ja que origina el 90% del total de vitamina D. És per això que existeixen aliments com la llet, cereals o pa fortificats amb vitamina D<sub>2</sub> (ergocalciferol, trobat a plantes i plàncton) o vitamina D<sub>3</sub> (colecalciferol). L'enriquiment dels aliments amb vitamina D varia depenent del país. Així, a Estats Units d'Amèrica la llet de vaca i de fórmula, els cereals i altres aliments es fortifiquen amb vitamina D<sub>2</sub>; en canvi, en altres zones del món, els cereals i el pa són enriquits freqüentment amb vitamina D<sub>3</sub>.

**Taula 1.** Fonts de vitamina D<sub>2</sub> i D<sub>3</sub>

<b>FONTES</b>	<b>CONTINGUT VITAMINA D (aprox)</b>
<b>Fonts naturals</b>	
Salmó (100gr)	
Fresc, salvatge	600-1000 UI vitamina D <sub>3</sub>
Fresc, criat	100-250 UI vitamina D <sub>3</sub> o D <sub>2</sub>
Enllaunat	300-600 UI vitamina D <sub>3</sub>
Sardina, enllaunada (100gr)	300 UI vitamina D <sub>3</sub>
Verat, enllaunat (100gr)	250 UI vitamina D <sub>3</sub>
Tonyina, enllaunada (100gr)	230 UI vitamina D <sub>3</sub>
Oli de fetge de bacallà (5ml)	400-1000 UI vitamina D <sub>3</sub>
Rovell ou	20 UI vitamina D <sub>3</sub> o D <sub>2</sub>
Exposició solar, radiació ultraviolada B (5-10 minuts d'exposició directa de braços i cames)	3000 UI vitamina D <sub>3</sub> o D <sub>2</sub>
<b>Aliments enriquits (100gr)</b>	
Llet	50 UI vitamina D <sub>3</sub>
Suc taronja	50 UI vitamina D <sub>3</sub>
Fórmules infantils	50 UI vitamina D <sub>3</sub>
logurt	50 UI vitamina D <sub>3</sub>
Mantega	50 UI vitamina D <sub>3</sub>
Margarina	430 UI vitamina D <sub>3</sub>
Formatge	100 UI vitamina D <sub>3</sub>
<b>Suplements<sup>1</sup></b>	
Vitamina D <sub>3</sub>	2000 UI/ml
Vitamina D <sub>2</sub>	8000 UI/ml
Multivitamínics	400 UI/ml

<sup>1</sup>Comercialitzats a Espanya



### 1.3. METABOLISME DE LA VITAMINA D

La vitamina D existeix en dues formes: vitamina D<sub>2</sub> o ergocalciferol i D<sub>3</sub> o colecalciferol. Durant l'exposició solar a la radiació ultraviolada B (longitud d'ona: 290-315nm), el 7-dehidroxicolesterol de la pell és convertit en pre-vitamina D, que a la seva vegada es transforma en vitamina D<sub>3</sub> mitjançant un procés depenent d'energia calòrica (**Figura 1**). Al mateix temps, les vitamines D<sub>2</sub> i D<sub>3</sub> procedents de la dieta, són incorporades als quilomicrons (lipoproteïnes que es sintetitzen a les cèl·lules epitelials intestinals) i transportades a través del sistema limfàtic fins a la circulació venosa<sup>10</sup>. La vitamina D (D<sub>2</sub> i D<sub>3</sub>) procedent d'ambdues vies pot ser emmagatzemada i posteriorment alliberada a nivell de les cèl·lules adiposes.

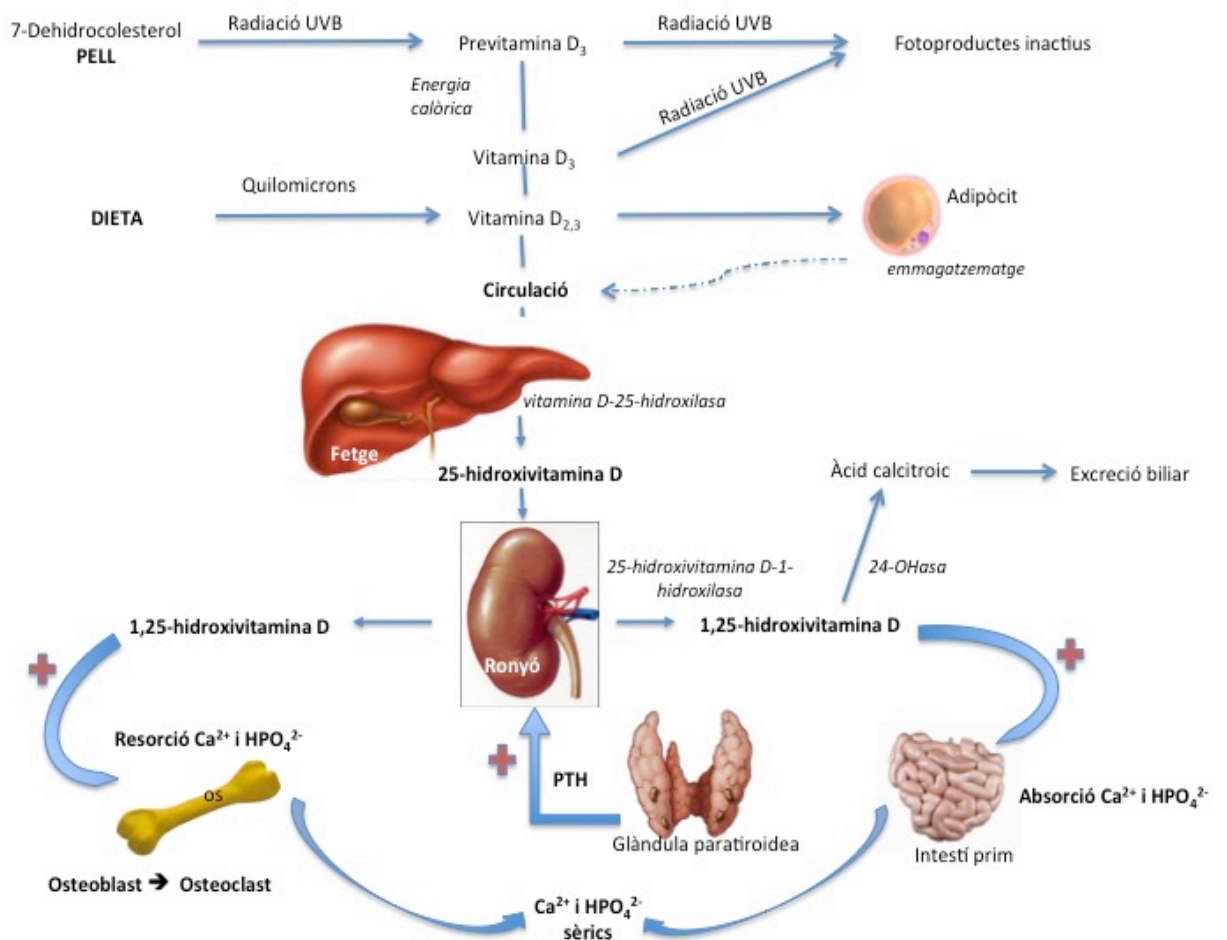
A nivell sanguini s'uneix a la Proteïna Transportadora de la vitamina D, que la transporta fins al fetge, a on és metabolitzada a 25-hidroxivitamina D o calcidiol. Aquesta última molècula és la utilitzada per a determinar l'estat de deficiència o no deficiència de vitamina D<sup>11</sup>.

La conversió a la forma activa, la 1,25-hidroxivitamina D o calcitriol, es produeix mitjançant la 1- $\alpha$ -hidroxilasa principalment a nivell renal, però també al tracte gastrointestinal, pell, vasos sanguinis, teixit mamari, osteoblasts i osteoclasts<sup>12</sup>. Aquest procés es troba regulat, entre d'altres, pel calci, fòsfor i hormona paratiroïdeia. La 1,25-hidroxivitamina D disminueix la seva pròpia síntesi i la de l'hormona paratiroïdal mitjançant un *feedback* negatiu.

La 1,25-hidroxitamina D s'uneix al seu receptor a nivell tissular (present a diferents òrgans, incloent placenta), la transcripció del qual es relaciona amb múltiples funcions: creixement i diferenciació cel·lular, metabolisme dels glúcids i funció muscular i immunitària, entre d'altres<sup>13</sup>.

Finalment, la 1,25-hidroxitamina D és catabolitzada a àcid calcitroic, que s'excreta a nivell biliar<sup>2,14</sup>.

**Figura 1.** Metabolisme de la vitamina D



Holick. Lancet, 2007<sup>2</sup> (modificada)

### **1.3.1. Metabolisme ossi**

La 1,25-hidroxivitamina D incrementa l'absorció del calci a nivell de l'intestí prim interaccionant amb el Complexe Receptor de la vitamina D-Receptor X de l'àcid retinoic (VDR-RXR). D'aquesta forma, augmenta l'expressió del Canal epitelial del calci i de la Calbindina, una proteïna que fixa el calci<sup>2</sup>.

Al mateix temps, la 1,25-hidroxivitamina D és reconeguda pel seu receptor a nivell dels osteoblasts, causant un increment en l'expressió del Receptor activador del Factor lligant nuclear  $\kappa$ B (RANKL). El RANKL indueix la maduració de preosteoclasts a osteoclasts, que extreuen calci i fòsfor de la matriu òssia per tal de mantenir els seus nivells plasmàtics estables<sup>15</sup>.

Com és conegut, l'hormona paratiroïdal també participa en aquest procés, incrementant l'absorció de calci i estimulant la producció renal de 1,25-hidroxivitamina D. També activa els osteoblasts, que estimulen la transformació de preosteoclasts a osteoclasts<sup>16</sup>.

### **1.3.2. Funcions no esquelètiques**

A part del seu paper sobre l'homeòstasi del calci i l'os, la vitamina D regula altres funcions cel·lulars. El receptor de la vitamina D (VDR) es troba gaire bé de forma universal a totes les cèl·lules nucleades i, d'altra banda, fins a 10 teixits extra-renals expressen la 1- $\alpha$ -hidroxilasa, l'enzim responsable de la conversió de la vitamina D a la seva forma activa<sup>12</sup>. Per tant, l'espectre d'acció de la vitamina D és potencialment molt ampli.<sup>2</sup>

### Funció muscular

Existeix certa evidència que suggereix una relació entre la vitamina D i la funció muscular<sup>17</sup>. Estudis en ratolins sense VDR van mostrar un nombre inferior de fibres musculars i anormalitats en gens i proteïnes musculars<sup>18</sup>, però el múscul esquelètic adult no sembla que expressi la proteïna del VDR quan aquesta es mesura amb anticossos específics<sup>19</sup>.

D'altra banda, infants amb dèficit hereditari d' 1- $\alpha$ -hidroxilasa presenten debilitat muscular greu, que millora quan es suplementa amb vitamina D<sup>14</sup>. Per contra, diverses revisions sistemàtiques d'estudis randomitzats que comparen suplementació en població adulta amb vitamina D (amb o sense Calci) amb placebo o calci sol, mostren resultats variables<sup>20,21,22</sup>.

Per tant, en aquest sentit caldrien més estudis que valoressin el mecanisme d'acció de la vitamina D sobre el teixit muscular així com l'efecte clínic de la seva suplementació<sup>21,22</sup>.

### Proliferació cel·lular

Estudis *in vitro* han mostrat que la forma activa de la vitamina D (1,25-hidroxivitamina D) pot inhibir la proliferació d'una gran varietat de tipus cel·lulars<sup>23</sup>. S'ha suggerit que el teixit pancreàtic, mamari i de colon, entre d'altres, expressen 1- $\alpha$ -hidroxilasa, produint de manera local 1,25-hidroxivitamina D. Aquesta actuaria controlant els gens que regulen la proliferació i diferenciació cel·lular, així com induint l'apoptosi i prevenint l'angiogènesi en processos malignes o premalignes<sup>24</sup>.

### Sistema immunitari

Les cèl·lules dendrítiques, els macròfags i els limfòcits T i B expressen VDR. La 1,25-hidroxivitamina D inhibeix la maduració de les cèl·lules dendrítiques i funciona com immunomodulador, reduint l'activació del sistema immune adquirit<sup>2</sup>. A partir d'aquí, s'ha postulat que la deficiència de vitamina D incrementaria el risc de desenvolupar malalties autoimmunes, fet descrit en models animals<sup>25</sup>. Existeixen en aquest sentit estudis observacionals en humans que suggereixen una associació entre el dèficit de vitamina D i l'aparició d'esclerosi múltiple, malaltia inflamatòria intestinal, asma i Diabetis Mellitus tipus 1.

Per contra, la vitamina D activa el sistema immunitari innat, particularment monòcits i macròfags, que incrementen l'expressió del VDR i 1- $\alpha$ -hidroxilasa en presència de bacteries<sup>26</sup>.

### Sistema cardiovascular

La 1,25-hidroxivitamina D també actua com a inhibidor del sistema renina-angiotensina-aldosterona, podent tenir un paper important en el control de la tensió arterial<sup>27</sup>.

### Funció neuropsiquiàtrica

Tant el VDR com la 1- $\alpha$ -hidroxilasa es troben expressats a nivell cerebral<sup>28</sup>. La seva funció a nivell del desenvolupament cerebral es basaria en els seus efectes sobre la proliferació neuronal, la diferenciació, la migració i l'apoptosi<sup>29</sup>. Els estudis en humans que valoren els efectes de la concentració de la 25-hidroxivitamina D en el desenvolupament cerebral i la funció cognitiva són

limitats i no concloents, sobretot els realitzats a nivell d'adults<sup>30</sup>. A nivell prenatal, existeixen treballs que relacionen els nivells de vitamina D amb la funció cognitiva i el desenvolupament psicomotor durant la infància<sup>31,32,33</sup>.

### Metabolisme dels glúcids

Dins l'espectre d'acció de la vitamina D trobem també la funció sobre la secreció d'Insulina a nivell pancreàtic, especialment a nivell de les cèl·lules beta. La 1,25-hidroxivitamina D activa de forma directa la transcripció del gen del receptor d'insulina estimulando la seva expressió, millorant la unió del receptor a la insulina i augmentant la sensibilitat de la insulina sobre les cèl·lules diana de fetge, múscul esquelètic i greix.<sup>34</sup>

## **1.4 REQUERIMENTS DE VITAMINA D**

L'any 2010, l'Institute of Medicine (IOM) va publicar unes recomanacions sobre els requeriments de vitamina D i Calci a la dieta<sup>35</sup>. El consum diari recomanat de vitamina D dels nens d'1 any fins els adults de 70 anys és de 600 UI (15mcg). A partir d'aquesta edat s'incrementa fins les 800 UI (20mcg). Per a les dones gestants i les que fan alletament matern, la recomanació també és de 600 UI diàries.

El consum diari recomanat estimat per als nadons de fins a l'any de vida és de 400 UI (10mcg). Existeixen societats pediàtriques que consideren que, donat que el contingut de vitamina D a la llet materna és relativament baix, s'hauria de recomanar la suplementació amb vitamina D en aquells lactants amb

alletament matern exclusiu i en aquells que ingereixen menys d'1 litre diari de llet de fórmula<sup>36</sup>.

Els requeriments diaris de vitamina D varien en funció de l'exposició solar, i aquesta dependrà de la localització geogràfica, l'estació de l'any i la pigmentació de la pell<sup>2</sup>. La IOM assumeix una exposició solar mínima quan estableix les seves recomanacions, ja que una exposició casual seria suficient per prevenir raquitisme.

## 1.5 CONCENTRACIÓ ÒPTIMA DE 25-HIDROXIVITAMINA D

La concentració sèrica de 25-hidroxitamina D és considerada com el millor indicador dels nivells de vitamina D<sup>37</sup>, però no existeix un clar consens a l'hora de definir els seus nivells òptims per a una correcta salut, tant esquelètica com extraesquelètica.

La classificació més acceptada és la que defineix el grau de deficiència quan els nivells es troben per sota de 20ng/l (50nmol/l), insuficiència amb nivells entre 20-30 ng/ml (50-75nmol/l) i nivells òptims a partir de 30ng/ml<sup>2,38,39,40</sup>.

En canvi, la revisió realitzada pel IOM al 2011 conclou que el risc important de dèficit ossi (i, per tant, deficiència de vitamina D) es donaria amb uns nivells de 25-hidroxitaminaD inferiors a 12ng/ml (30nmol / litre), es parlaria d'insuficiència amb nivells de 12 a 20ng/ml i de nivells suficients a partir de 20ng/ml.

Aquests nivells s'han establert per assegurar una correcta salut òssia. Per contra, els nivells òptims en relació a altres potencials efectes clínics encara no s'han consensuat.

## **1.6 EXCÈS DE VITAMINA D**

El nivell de consum de vitamina D considerat com a tòxic no està del tot definit. L'IOM defineix el "nivell màxim de consum tolerable" a partir de 100 micrograms (4000 UI) al dia en adults sans, nens de 9 a 18 anys, gestants i dones en període de lactància<sup>35</sup>. Aquest nivell és menor en nens de fins a 9 anys (25-75 micrograms).

La intoxicació per vitamina D generalment és deguda a un ús inadequat de suplementes i ha estat documentada amb dosis de més de 60.000 UI al dia<sup>41</sup>. S'han descrit casos d'hipervitaminosi per errors en la fabricació, formulació o recepta dels preparats amb vitamina D, incloent llet de fórmula o dietes d'aprimament.

L'exposició solar excessiva no produeix nivells tòxics de vitamina D<sub>3</sub> degut a la fotoconversió a metabòlits inactius. Una exposició perllongada donaria lloc a nivells sèrics de 25-hidroxitamina D inferiors a 80ng/ml (200 nmol/l)<sup>42</sup>.

Els símptomes de la intoxicació aguda per vitamina D venen donats per la hipercalcèmia secundària i inclourien confusió, poliúria, polidípsia, anorèxia, vòmits i debilitat muscular. La intoxicació crònica pot causar nefrocalcinosi, desmineralització òssia i dolor.



## **1.7 DEFICIÈNCIA DE VITAMINA D**

### **1.7.1 Epidemiologia**

Existeix una creixent preocupació per l'elevada prevalença de dèficit de vitamina D, tant a nivell de la població general, com entre les dones gestants<sup>43,44</sup>. Es calcula que fins a mil milions de persones en tot el món tindrien dèficit o insuficiència de vitamina D<sup>1</sup>. D'acord amb nombrosos estudis publicats al respecte<sup>3,45,46</sup>, entre el 30 i 50% de la població d'Estats Units presentarien deficiència de vitamina D, existint diferències depenent de l'àrea d'estudi, edat, sexe i raça. Dades similars trobaríem a nivell de països europeus<sup>12,47,48</sup>, no tan sols en àrees de més latitud si no també en països més propers a l'equador com ara Espanya, a on s'han descrit taxes d'insuficiència del 47-56% i de dèficit del 27-37% en població general<sup>49,50</sup>.

### **1.7.2 Implicacions clíniques**

#### Raquitisme i osteomalàcia

Davant una deficiència de vitamina D severa (25-hidroxitaminaD generalment inferior a 10 ng/mL), l'absorció de calci i fòsfor a nivell intestinal es redueix i es produeix hipocalcèmia. Secundàriament es produeix hiperparatiroidisme, que donarà lloc a fosfatúria, desmineralització òssia i, a llarg termini, osteomalàcia en adults i raquitisme en nens.

Els símptomes clínics que podem trobar associats inclouen: dolor ossi, debilitat muscular, fractures i dificultat al caminar.

## Càncer

En les dècades de 1930 i 1940 es va objectivar que les poblacions d'àrees de latitud més alta presentaven un risc més elevat de presentar alguns tipus de càncer (limfoma Hodgkin, colon, pàncrees, ovari i mama entre d'altres)<sup>51</sup>. Donat que l'exposició a radiació ultraviolada B està en relació amb la latitud, aquesta observació va donar lloc a hipotetitzar sobre la possible relació entre el càncer i els nivells de vitamina D<sup>52</sup>.

Estudis *in vitro* han mostrat que la forma activa de la vitamina D (1,25-hidroxivitamina D) pot inhibir la proliferació d'una gran varietat de tipus cel·lulars<sup>23</sup>. S'ha suggerit que el teixit pancreàtic, mamari i de colon, entre d'altres, expressen 1- $\alpha$ -hidroxilasa, produint de manera local 1,25-hidroxivitamina D. Aquesta actuaria controlant els gens que regulen la proliferació i diferenciació cel·lular, així com induint l'apoptosi i prevenint l'angiogènesi en processos malignes o premalignes<sup>53</sup>. Per altra banda, s'ha descrit en models animals que la deficiència de VDR predisposaria a desenvolupar lesions precanceroses de mama o intestí<sup>54</sup>.

La relació entre els nivells de vitamina D i el risc de desenvolupar càncer també s'ha descrit en estudis observacionals<sup>55</sup>. De fet, l'Organització Mundial de la Salut (OMS), a partir de diversos meta-anàlisis, va identificar el càncer de colon com el tipus de càncer de major risc associat a la manca de vitamina D<sup>56</sup>.

Pel que fa al càncer de mama o de pròstata, els resultats dels diferents estudis publicats són més inconsistents<sup>57,58</sup>, així com els resultats dels diferents assajos amb suplementació de vitamina D<sup>59,60</sup>.

Podríem concloure en aquest sentit que, tot i que existeixen estudis que suggereixen una possible associació entre la deficiència de Vitamina D i el càncer, no hi ha evidència suficient com per a recomanar una suplementació de vitamina D per prevenir o tractar els processos neoplàstics.

### Diabetis

Existeixen diverses raons per les quals es pot relacionar la diabetis tipus 1 i tipus 2 amb l'estat de vitamina D<sup>61</sup>. L'efecte de la vitamina D sobre el sistema immunitari estaria relacionat amb l'aparició de diabetis tipus 1. En canvi, la funció de la vitamina D sobre l'activitat de les cèl·lules beta del pàncrees i sobre la insulina tindria relació amb la diabetis tipus 2.

- Diabetis tipus 1: els resultats d'alguns estudis observacionals suggereixen una associació entre el dèficit de vitamina D i la diabetis tipus 1<sup>62</sup>. Per altra banda, diferents estudis (sobretot de cas-control), mostren que la suplementació de vitamina D en la infància redueix el risc de desenvolupar diabetis tipus 1 en aproximadament el 30%<sup>63,64</sup>. Fins el moment, però, no existeixen estudis randomitzats que avalin aquesta associació.
- Diabetis tipus 2: diferents estudis transversals i de cohorts han trobat associació entre nivells subòptims de vitamina D i la diabetis tipus 2<sup>65,66</sup>. En aquest sentit, un meta-anàlisi que inclou 21 estudis prospectius mostra una relació inversa entre els nivells de 25-hidroxivitamina D i l'aparició de

diabetis tipus 2 (risc relatiu (RR) 0.62, 95% CI 0.54-0.70, per pacients amb els nivells més alts respecte els pacients amb nivells més baixos)<sup>67</sup>.

### Malalties infeccioses

Pel seu efecte sobre el sistema immunitari, s'ha intentat relacionar els nivells de vitamina D amb les malalties infeccioses. Una de les més estudiades ha estat la Tuberculosi, donat el clàssic benefici de l'efecte de la radiació ultraviolada abans de la teràpia amb antibiòtics<sup>68</sup>. Diferents estudis amb suplementes de vitamina D han observat una milloria clínica i de la mortalitat en comparació amb placebo<sup>69</sup>, però actualment les dades publicades són encara insuficients per acabar de definir el paper de la vitamina D en la prevenció i tractament de la Tuberculosi.

Pel que fa a les infeccions víriques, s'ha hipotetitzat que la marcada variació estacional de les mateixes podria estar relacionada amb els nivells de vitamina D, però la relació causal encara està per establir. Existeixen diferents estudis que avaluen l'efecte de la suplementació de vitamina D sobre l'aparició i curs d'aquestes infeccions (sobretot a nivell respiratori), amb resultats variables<sup>70,71</sup>.

### Malalties cardiovasculars

Com en altres patologies, estudis observacionals han mostrat una associació entre els nivells baixos de vitamina D i el risc d'hipertensió arterial i altres malalties cardiovasculars com l'infart agut de miocardi<sup>72</sup>. Per altra banda, existeix una variació geogràfica i racial de la tensió arterial, amb un increment del risc d'hipertensió arterial que s'incrementa a latituds més altes<sup>2</sup>.

En canvi, a l'hora d'analitzar els efectes de l'administració de suplementes de vitamina D, molts són els estudis randomitzats que no han trobat cap benefici cardiovascular<sup>73</sup>.

Tanmateix, es desconeix encara quina és la relació causal d'aquesta associació i com varia entre diferents poblacions (malalts renals, diabètics, grups ètnics, etc.).

### Malalties autoimmunes

Diversos estudis han mostrat que viure en latituds altes incrementa el risc d'esclerosi múltiple o malaltia de Crohn<sup>74</sup>. Per exemple, viure per sota la latitud 35° durant els 10 primers anys de la vida redueix el risc d'esclerosi múltiple en aproximadament un 50%. En el mateix sentit, en població blanca el risc d'esclerosi múltiple disminueix un 41% per cada increment de 20ng/ml de 25-hidroxitamina D per sobre dels 24ng/ml (odds ratio (OR) 0.59; 95% CI 0.36-0.97)<sup>75</sup>.

Observacions similars s'han observat en altres patologies com l'artritis reumatoide<sup>76</sup> i l'osteoartritis<sup>77</sup>. Però de moment no existeixen estudis randomitzats que hagin confirmat l'eficàcia dels suplementes de vitamina D per a la prevenció de malalties autoimmunes.

### Asma i al·lèrgies

Existeix certa controvèrsia respecte l'associació entre els nivells de vitamina D i les patologies al·lèrgiques. En alguns estudis, però, s'ha observat una relació entre la deficiència de vitamina D en gestants, nens i adolescents, i l'aparició de malalties al·lèrgiques tals com l'asma o l'eczema<sup>78,79</sup>. De igual forma, els

estudis randomitzats que avaluen l'efecte de la suplementació amb vitamina D sobre l'asma no són concloents, tant els realitzats en població amb aquesta patologia<sup>80,81</sup>, com els duts a terme sobre població gestant<sup>82,83</sup>.

### Malalties neuropsiquiàtriques

El dèficit de vitamina D s'ha relacionat amb una incidència incrementada d'esquizofrènia i depressió<sup>2</sup>. De fet, donat els seus efectes durant el desenvolupament cerebral, s'ha proposat que el dèficit prenatal de vitamina D podria incrementar el risc de patir en l'edat adulta diferents patologies neuropsiquiàtriques, entre elles l'esquizofrènia<sup>84</sup>. Per altra banda, és freqüent trobar nivells baixos de 25-hidroxivitamina D en pacients amb depressió o amb malaltia d'Alzheimer<sup>85,86</sup>.

Però, com en altres casos, existeixen poques dades que avalin l'ús de suplementes de vitamina D com a prevenció o tractament d'aquestes patologies.

#### **1.7.3. Grups de risc**

- Edat: la producció cutània de vitamina D disminueix amb l'edat<sup>87</sup>. És per això que les persones d'edat avançada, sobretot aquelles sense activitat a l'exterior o hospitalitzades, són un grup de risc de deficiència de vitamina D. Altrament, s'ha observat que la ingesta de vitamina D acostuma a ser més baixa en aquest grup d'edat<sup>88</sup>.
- Ètnia: la pigmentació de la pell és un dels factors més importants per a la síntesi de vitamina D. Així, les persones de raça negra necessitarien entre 3 i 4 vegades més exposició solar per assolir els mateixos nivells de vitamina D que les persones de raça blanca<sup>89</sup>. Per altra banda, la superfície corporal

exposada també influeix en la producció de vitamina D. És per això que s'hauria de tenir en compte la major superfície corporal coberta per motius culturals, sobretot en dones (ús de vel, burca, etc.).

- Malalties associades a malabsorció de greixos: malaltia celíaca, malaltia inflamatòria intestinal, insuficiència pancreàtica, fibrosi quística, colèstasi hepàtica.
- Patologies hepàtiques i renals: poden ocasionar una inadequada hidroxilació de la vitamina D i, per tant, una disminució de les seves formes actives<sup>90</sup>.
- Fàrmacs: s'ha relacionat amb nivells baixos de vitamina D l'ús d'antiepilèptics (fenobarbital, fenitoïna), rifampicina, antiretrovirals i corticoides de forma contínua, entre d'altres<sup>91</sup>.
- Obesitat: s'han observat nivells més baixos de vitamina D en les persones amb excés de teixit gras, possiblement perquè es produeix un augment del dipòsit de vitamina D en els adipòcits<sup>35</sup>.

## **1.8. VITAMINA D I GESTACIÓ**

### **1.8.1. Metabolisme de la vitamina D durant la gestació**

La funció principal de la vitamina D durant la gestació és, clàssicament, la participació en la regulació del metabolisme del calci, tant de la mare com del fetus. Durant la gestació es produeixen una sèrie de canvis adaptatius per tal de garantir l'aport de calci necessari pel creixement de la massa òssia fetal, tot

mantenint la de la mare. La primera estratègia adaptativa és l'increment de l'absorció de calci a nivell intestinal, relacionada amb un increment de la concentració d'1,25-hidroxivitamina D<sup>92</sup>.

La majoria de la 1,25-hidroxivitamina D prové de la seva síntesi renal, però una part tindria un origen extrarenal a nivell de la placenta i decídua. I és que ja des de l'inici de l'embaràs, tant la decídua materna com les cèl·lules trofoblàstiques expressen el receptor de la vitamina D i la 1- $\alpha$ -hidroxilasa<sup>93</sup>.

### **1.8.2 Deficiència de la vitamina D en la gestació**

#### Epidemiologia

Existeix una creixent preocupació pel que fa a l'elevada prevalença del dèficit de vitamina D, tant a nivell de població general com en les dones gestants, doncs, com s'ha descrit en apartats anteriors, els seus potencials efectes sobre la salut són nombrosos i importants.

En l'actualitat, són pocs els estudis a nivell de l'estat espanyol que avaluïn els nivells de vitamina D en dones gestants o en edat reproductiva. L'any 2008, González-Solanellas *et al.* va publicar un estudi realitzat sobre una població de dones en edat fèrtil provinents d'una àrea urbana amb alt percentatge d'immigrants i condicions socio-econòmiques desfavorables<sup>94</sup>. El 47.9% presentaven nivells insuficients de vitamina D (10–20ng/ml), i el 37.2% nivells deficients (inferiors a 10ng/ml). Més endavant, Pérez-López *et al.* varen trobar en dones gestants procedents d'Almeria (i per tant, d'una àrea de latitud baixa)



una taxa d'insuficiència de vitamina D del 42.4% i de deficiència del 22.7%<sup>95</sup>.

Pel que fa a països de la resta d'Europa, s'han publicat dades similars. En un estudi belga que incloïa 1311 dones gestants, la prevalença de dèficit de vitamina D va resultar del 44.6%, amb un 12.1% de dèficit sever (<10ng/ml)<sup>96</sup>. McAree *et al.* varen trobar, d'un total de 346 gestants londinenques, unes taxes de 36 i 45% de deficiència i insuficiència, respectivament<sup>97</sup>. Per altra banda, dades procedents de la *Danish National Birth Cohort* mostren un percentatge del 42.3% de gestants amb nivells de vitamina D deficients<sup>98</sup>.

### Factors determinants

Les principals fonts de vitamina D són l'exposició solar, la dieta i els suplementes de vitamina D. Donat que són pocs els aliments que contenen o que estan fortificats amb vitamina D, la síntesi d'aquesta a nivell de la pell induïda per la radiació ultraviolada B, és el principal factor determinant dels nivells de vitamina D en una població<sup>2</sup>.

Altres factors que s'han associat als nivells circulants de vitamina D en gestants són: latitud, estació de l'any en la què es realitza la determinació, pigmentació de la pell, edat, raça, base genètica, paritat, estat socioeconòmic, nivell d'estudis, tabaquisme, alcoholisme, activitat física i obesitat<sup>99,100</sup>.

La latitud i l'estació de l'any lògicament estan relacionats amb l'exposició solar. La pigmentació de la pell pot afectar a la síntesi de vitamina D en el sentit de que la melanina actua com a protector davant la radiació ultraviolada. D'aquesta forma, la insuficiència de vitamina D és més comú en gestants amb la pell més pigmentada, així com en les de raça negra<sup>101</sup>.

Pel que fa a l'edat, els estudis publicats en dones en edat fèrtil i en gestants

mostren resultats discordants, però en general les dones més joves tindrien més tendència a presentar nivells de vitamina D més baixos<sup>98,102,103</sup>. Per altra banda, diversos estudis han trobat una relació inversa entre la paritat i els nivells de vitamina D<sup>98,104</sup>. També s'ha descrit que la deficiència de vitamina D és més comú entre les dones amb un baix nivell d'estudis<sup>105,106</sup>.

L'associació entre el tabaquisme i els nivells baixos de 25-hidroxivitamina D s'ha reportat en diferents estudis<sup>96,107</sup>, però es desconeix el mecanisme pel qual es dona aquesta relació. S'ha suggerit que la baixa concentració de 25-hidroxivitamina D pot ser per un augment de l'alliberament de calci des de l'os associat al tabaquisme o per una baixa ingesta de vitamina D, més freqüent en fumadors<sup>107,108</sup>.

Per altra banda, l'Índex de Massa Corporal (IMC) també s'ha descrit com un potencial determinant de la concentració de 25-hidroxivitamina D<sup>96,100,109</sup>, de tal forma que les pacients amb sobrepès o obesitat presenten més risc d'hipovitaminosi D. En les persones amb excés de teixit gras, es produeix un augment del dipòsit de vitamina D en els adipòcits, així com una elevació dels nivells de vitamina D quan perden pes<sup>35</sup>.

### Resultats perinatals

Els nivells baixos de vitamina D durant l'embaràs s'han associat amb un risc incrementat de desenvolupar diabetis gestacional<sup>110, 111, 112, 113, 114, 115</sup>, preeclàmpsia<sup>116,117,118</sup>, vaginosi bacteriana<sup>119,120</sup>, part preterme<sup>121</sup> i part per cesària<sup>122,123</sup>. És més, un estat deficient de vitamina D podria tenir també conseqüències sobre el desenvolupament i creixement fetal, derivades del risc incrementat de part preterme i de l'associació que s'ha descrit amb el retard de

creixement intrauterí<sup>124,125</sup>.

- **ESTATS HIPERTENSIUS DE L'EMBARÀS:**

Tal i com s'ha descrit en l'adult no gestant, la 1,25-hidroxivitamina D tindria un paper inhibidor sobre l'eix renina-angiotensina-aldosterona també durant l'embaràs. És per aquest motiu que seria raonable pensar que el risc de desenvolupar preeclàmpsia durant la gestació estaria incrementat en aquelles dones amb uns nivells de vitamina D subòptims. Diferents estudis han intentat demostrar aquesta relació, amb resultats contradictoris<sup>117,126</sup>, la majoria amb poc número de casos.

Existeixen quatre revisions sistemàtiques publicades fins el moment que sí han trobat una possible relació entre els nivells de vitamina D i la preeclàmpsia<sup>127,128,129,130</sup>. Però molts dels estudis revisats presenten poc nombre de casos, un anàlisi ajustat per factors de confusió inconsistent i diferències en relació a la raça. Per tant, conclouen que serien necessaris més estudis que aportessin una evidència de més alta qualitat.

- **DIABETIS GESTACIONAL:**

Com s'ha descrit anteriorment, la vitamina D jugaria un paper important en el manteniment de l'homeòstasi dels glúcids, la funció de les cèl·lules beta i la sensibilitat de la insulina. Durant la gestació, en canvi, la funció de la vitamina D sobre el metabolisme de la glucosa i el desenvolupament de diabetis gestacional no és tan clar.

Dos meta-anàlisi recents mostren que les gestants amb diabetis gestacional tendeixen a presentar nivells de vitamina D significativament més

baixos<sup>115,128</sup>. El primer d'ells, que inclou deu estudis, va trobar que els nivells insuficients de 25-hidroxivitamina D estaven associats amb un risc incrementat de desenvolupar diabetis gestacional (OR 1.49, 95% CI, 1.18, 1.89). Cinc dels deu estudis van ajustar per factors de confusió; d'aquests, tres no varen trobar relació entre els nivells baixos de vitamina D i la diabetis gestacional<sup>98,112,131</sup> i dos sí que varen trobar una associació significativa<sup>111,114</sup>. El segon meta-anàlisi, que inclou set estudis observacionals amb un total de 2146 participants, va trobar que la deficiència de vitamina D estava associada amb un risc incrementat de diabetis gestacional. Aquesta associació, però, no es va trobar quan es van analitzar els estudis que ajustaven per estació de l'any<sup>112,132</sup>.

- PART PRETERME:

S'ha publicat que uns nivells òptims de vitamina D podrien reduir el risc de part preterme conseqüent a la colonització placentària per les espècies causants de la vaginosi bacteriana<sup>121,133</sup>. Són pocs els estudis realitzats al respecte i, en general, amb un escàs nombre de casos. Un estudi recent de casos i controls que comparava 40 casos de parts preterme espontanis amb 120 parts a terme, no va trobar diferències en els percentatges de deficiència de vitamina D ni en les mitjanes de la 25-hidroxivitamina D circulant<sup>134</sup>. Per contra, un estudi retrospectiu de cohorts japonès que incloïa 93 gestants, va trobar nivells inferiors de 25-hidroxivitamina D circulant en aquelles gestants que van tenir un part preterme en comparació amb les que van tenir el part a terme<sup>135</sup>.

- PART PER CESÀRIA

Donat els efectes de la vitamina D sobre el teixit muscular, diferents estudis han suggerit que la deficiència de vitamina D durant la gestació podria incrementar el risc de cesària, especialment quan aquesta s'indica per fracàs de la progressió del part. Merewood *et al.* van publicar que aquelles gestants amb nivells de vitamina D inferiors a 37.5 nmol/l presentaven gaire bé quatre vegades més risc de tenir un part per cesària<sup>122</sup>. Posteriorment, un altre estudi va trobar el doble de risc de cesària per part perllongat quan la concentració de vitamina D era inferior a 30 nmol/l, però no de cesària per destret respiratori fetal o per altres causes<sup>123</sup>.

En canvi, altres estudis no han trobat aquesta relació. En un estudi realitzat a Almeria amb 466 participants, els nivells sèrics de vitamina D al primer i tercer trimestre no es van relacionar amb més risc de cesària<sup>136</sup>. En el mateix sentit, un estudi anglès amb 995 gestants no va trobar diferències en la concentració de 25-hidroxivitamina D entre les dones que van tenir un part vaginal i aquelles a les que es va realitzar una cesària<sup>137</sup>.

### **1.8.3. Suplements de vitamina D durant la gestació**

Segons les recomanacions de *l'Institute of Medicine* (IOM, 2010), el consum diari recomanat de vitamina D per a les dones gestants i les que fan alletament matern, és de 600 UI diàries<sup>35</sup>. En l'any 2011, *l'American Congress of Obstetricians and Gynecologists* (ACOG) va recomanar continuar la suplementació amb la dosi estàndard, en espera de dades procedents d'estudis

clínic randomitzats<sup>138</sup>. La majoria de preparats vitamínics utilitzats durant la gestació contenen 400 UI de vitamina D, però podem trobar amb dosis de 200 i fins i tot , de 1200 UI. També cal tenir en compte que alguns contenen vitamina D<sub>2</sub> (ergocalciferol) i altres vitamina D<sub>3</sub> (colecalfiferol). En principi, seria preferible aquesta última, doncs és més fàcilment la conversió a les formes actives de la vitamina D i incrementa de forma més efectiva la 25-hidroxitamina D circulant.

De totes formes, el valor de la suplementació amb vitamina D durant la gestació continua essent un tema controvertit, doncs en l'actualitat no existeix evidència suficient que recolzi el seu benefici pel que fa a la reducció dels resultats perinatal adversos. L'última revisió Cochrane, que inclou set assajos clínics, troba que les gestants que prenen diàriament vitamina D presenten nivells més elevats de 25-hidroxitamina D respecte a les que prenen placebo<sup>139</sup>. Dos dels set estudis van trobar que la suplementació amb vitamina D reduïa el risc de preeclàmpsia, baix pes i part preterme. En canvi, quan la suplementació es combinava amb la de calci, el risc de part preterme augmentava. D'aquesta manera, els autors conclouen que encara no hi ha evidència suficient per recomanar de forma rutinària l'ús de suplement de vitamina D durant l'embaràs.

## **1.9. JUSTIFICACIÓ I ESTRUCTURA DE LA TESI DOCTORAL**

El plantejament de la present tesi ve donat per la importància que ha adquirit en els últims anys la vitamina D sobre la salut en general i sobre l'embaràs en

particular. Ja s'ha esmentat en apartats anteriors que la prevalença de la deficiència de la vitamina D en gestants és elevada, inclús en zones de latituds properes a l'equador. Per altra banda, els nivells baixos de vitamina D s'han relacionat amb diferents patologies pròpies de la gestació i amb el desenvolupament i creixement fetal.

En aquest sentit, i a falta de dades a nivell poblacional, es van establir els objectius principals de la tesi: 1) determinar la prevalença de la deficiència de vitamina D en dones embarassades participants d'una cohort prospectiva al naixement de base poblacional; 2) identificar els principals determinants dels nivells de vitamina D en dones gestants; i 3) analitzar si la deficiència de vitamina D té relació amb resultats perinatals adversos.

La tesi s'ha estructurat en dues fases, amb la consegüent publicació de dos articles originals independents però que parteixen d'una mateixa cohort de gestants. En la primera fase de l'estudi (que correspon al primer article) es van determinar els nivells de vitamina D i es va posar en evidència l'elevada prevalença de deficiència i insuficiència de vitamina D en la població estudiada. Aquest fet ens va dur a analitzar els possibles factors determinants dels nivells de vitamina D en la nostra cohort. En la segona fase (corresponent al segon article) es va realitzar un anàlisi de la possible associació entre els nivells de vitamina D a l'embaràs i l'aparició de diabetis gestacional, part preterme, cesària, retard de creixement intrauterí, fetus petit per edat gestacional i pes al néixer.

## **2. HIPÒTESI DE TREBALL I OBJECTIUS**





## **PRIMERA HIPÒTESI**

Les escasses dades publicades sobre els nivells de vitamina D en gestants de països del sud d'Europa indiquen que els percentatges d'insuficiència i deficiència de vitamina D són elevats. A més, existiria una sèrie de factors associats als nivells de vitamina D que, un cop detectats, podrien ajudar a establir recomanacions o estratègies per tal de detectar o prevenir la hipovitaminosi D durant la gestació.

### **Objectius:**

- Establir les prevalences d'insuficiència i deficiència de vitamina D en les gestants del nostre medi.
- Identificar els principals factors determinants dels nivells de vitamina D en la gestació.

## **SEGONA HIPÒTESI**

La importància de la vitamina D va més enllà que la seva funció sobre el metabolisme ossi, tenint efectes a nivell d'altres òrgans i teixits, incloent la placenta. Per altra banda, s'ha descrit a la literatura la possible relació entre els nivells de vitamina D i diferents esdeveniments perinatals. Per tant, la primera hipòtesi de la tesi doctoral es basa en què el dèficit de vitamina D al primer trimestre en gestants del nostre medi es podria relacionar amb resultats perinatals adversos.

**Objectius:**

- Avaluar si existeix una associació entre els nivells de vitamina D a l'embaràs i l'aparició de diverses patologies materno-fetals (diabetis gestacional, prematuritat, retard de creixement intrauterí, fetus petit per edat gestacional i pes al néixer), així com la seva possible relació amb el tipus de part.
- En el cas de trobar una associació significativa, determinar un punt de tall a partir del qual hi hauria més risc de desenvolupar les patologies estudiades.

### **3. METODOLOGIA**



### 3.1 DISSENY I POBLACIÓ D'ESTUDI

L'estudi està dissenyat com a prospectiu de cohorts i forma part del projecte *Infancia y Medio Ambiente (INMA)*, basat en cohorts de naixement de base poblacional (parelles mare-fill) provinents de diferents àrees geogràfiques de l'estat espanyol ([www.proyectoinma.org](http://www.proyectoinma.org))<sup>140</sup>.

Per a la primera fase de l'estudi, que correspon al primer article, es van incloure un total de 2150 gestants des del Novembre del 2003 fins el Febrer del 2008. Aquestes gestants es van reclutar a la primera visita de control de l'embaràs (entre les 10 i les 13 setmanes de gestació) i procedien de tres àrees geogràfiques diferents: València (latitud 39°N, 855 casos), Sabadell (latitud 41°N, 657 casos), i Guipuzkoa (latitud 42°N, 638 casos). Es va determinar la concentració sèrica de 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> al primer trimestre en 2036 dones (96% del total inicial) i es van obtenir dades completes sobre els factors determinants en 1772 dones (87% del total inicial).

En el cas de la segona fase de l'estudi (segon article) es van incloure les dones procedents de València, Sabadell i Guipuzkoa, afegint 494 gestants procedents d'Astúries (latitud 43°N), el que fan un total de 2644 dones. D'aquestes, la concentració sèrica de vitamina D va ser realitzada en 2510 gestants i es va fer un seguiment fins el naixement en 2401 (per tant, 91% del total inicialment reclutat). Finalment, es van obtenir dades completes (25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> circulant, variables de resultats perinatals i de factors de confusió) en un total de 2358 parelles mare-fill (81% del total inicialment reclutat).

**Criteris d'inclusió:**

- Edat igual o superior a 16 anys.
- Primera visita entre les 10 i 13 setmanes de gestació.
- Intenció de part a l'hospital de referència: Hospital La Fe (València), Hospital Parc Taulí (Sabadell), Hospital San Agustín de Avilés (Astúries), Hospital de Zumàrraga (Guipuzkoa).
- Gestació única.

**Criteris d'exclusió:**

- Dificultats comunicatives.
- Malaltia crònica prèvia a la gestació.
- Gestació mitjançant tècniques de reproducció assistida.

**3.2. DETERMINACIÓ 25-HIDROXIVITAMINA D**

Es va obtenir una única mostra durant l'embaràs (mitjana [DE]: 13.3 [1.5]). Les mostres van ser processades de forma immediata i congelades entre -70°C i -80°C fins al moment de l'anàlisi. La quantificació dels nivells plasmàtics de 25-hidroxitamina D3 es va dur a terme mitjançant el mètode HPLC utilitzant un kit de BioRAD, d'acord amb els protocols del *Clinical and Laboratory Standard Institute (National Comitee for Clinical Laboratory Standards)*<sup>141</sup>. La detecció mínima va ser de 5ng/ml amb un coeficient de variació inter-assaig de 4.5%. L'anàlisi va ser validada pel *German Programme of External Evaluation of Quality (DGKL-RFB-Referenceinstitutuk fur Bionalytik)*, amb un resultat satisfactori en el 100% dels casos.

### 3.3 RECOLLIDA DE DADES

#### 3.3.1. Resultats Perinatal:

Diabetis gestacional: La informació sobre el diagnòstic de diabetis gestacional va ser recollida de la història clínica de la gestant. D'acord amb les recomanacions de la Societat Espanyola de Ginecologia i Obstetrícia, es va realitzar el cribratge de la diabetis gestacional a totes les gestants entre la setmana 24 i la 28 mitjançant el Test d'O'Sullivan (determinació de la glicèmia després d'una hora de la ingesta de 50 grams de glucosa). A les dones que van obtenir una glicèmia igual o superior a 7.8 mmol/l se'ls hi va sotmetre, entre una i dues setmanes després, al Test de tolerància oral a la glucosa amb 100 grams de glucosa. Es va diagnosticar de Diabetis gestacional seguint els criteris de la *National Diabetes Data Group*: dos o més valors superiors a 5.8mmol/l de basal, 10.6mmol/l a l'hora, 9.2mmol/l a les dues hores o 8.1mmol/l a les tres hores<sup>142</sup>.

Part preterme: Els parts esdevinguts abans de la setmana 37 es van definir com a parts preterme. Cal dir en aquest sentit que es va utilitzar la longitud crani-caudal mesurada a l'ecografia del primer trimestre per datar la gestació quan la diferència amb la datació per data d'última menstruació diferia en 7 o més dies (12% dels casos)<sup>143</sup>.



Tipus de part: Es va realitzar la següent classificació sobre el tipus de part:

- Vaginal
- Cesària electiva: quan la cesària es realitzava abans de l'inici del treball de part.
- Cesària urgent: quan la cesària s'indicava després de l'inici del part per risc de pèrdua del benestar fetal.
- Cesària no electiva/no urgent: quan es va indicar per part estacionat, desproporció pèlvico-fetal o inducció fallida.

Mesures antropomètriques: El pes del nadó al néixer (expressat en grams) va ser mesurat per la llevadora o llevador que va atendre el part. En canvi, la talla i la circumferència cefàlica (expressades totes dues en centímetres) varen ser mesurades abans de les 12 hores post-part per part d'infermeria de la planta d'hospitalització.

Alteracions del creixement fetal: D'acord amb les corbes nacionals de creixement<sup>144</sup>, es van considerar els nadons com a petits per edat gestacional quan el pes al naixement va ser inferior al percentil 10. Es va definir el retard de creixement intrauterí quan aquest pes va ser inferior al percentil 5 del pes esperat basat en el potencial de creixement, calculat a partir de l'edat gestacional, sexe, edat materna, alçada i pes pre-concepcional de la mare<sup>145</sup>. També es va dividir el pes en tres categories: inferior a 2500gr, de 2500 a 4000gr i superior a 4000gr.

### 3.3.2. Factors determinants de la vitamina D

Es van recollir dades sobre potencials factors descrits a la literatura amb una possible associació tant amb els nivells materns de vitamina D com amb els resultats perinatals que es volien analitzar. Per aquest motiu es van utilitzar dos qüestionaris: un al primer trimestre i un altre al tercer.

Dels qüestionaris realitzats al primer trimestre es van obtenir dades sobre les següents variables:

- Edat
- Paritat: es van definir dues categories: nul·liparitat i multiparitat.
- País de naixement: es va distingir entre les gestants nascudes a Espanya i les nascudes a país estranger.
- Ètnia: aquesta variable va tenir dues categories: raça blanca i la resta de races (raça no blanca).
- Classe social: definida com a tipus d'ocupació durant la gestació, utilitzant l'adaptació espanyola del sistema de codificació ISCO88<sup>146</sup>: classe alta (tipus I/II: directors i gerents / tècnics i professionals científics i intel·lectuals), classe mitjana (tipus III: tècnics i professionals de suport qualificats), classe baixa (tipus IV/V: treballadors no qualificats, no ocupació).
- Nivell d'estudis: classificats en primaris o inferiors, secundaris, i universitaris.
- Índex de massa corporal (IMC) pregestacional (Kg/m<sup>2</sup>): basat en la talla mesurada en el moment del reclutament i el pes anterior a l'embaràs referit

per la gestant. S'han utilitzat tres categories: baix pes (<18.5), pes normal (18.5–24.99), sobrepès / pes ( $\geq 25$ ).

- Activitat física: s'han considerat tres nivells d'activitat física durant el primer trimestre de l'embaràs: inactivitat o poca activitat, activitat moderada i activitat intensa.
- Consum de tabac: definit com a consum durant el primer trimestre o no consum. També s'han considerat el nombre de cigarretes diàries.
- Consum d'alcohol: definit com a consum almenys un cop al mes durant el primer trimestre o no consum.
- Consum de peix es va determinar a partir d'un qüestionari semi-quantitatiu validat de 100 ítems sobre freqüències d'alimentació de la gestant des de la data d'última menstruació fins al tercer mes de gestació, versió adaptada del qüestionari Willett per a gestants de l'àmbit espanyol<sup>147</sup>.
- Consum calòric (Kcal/dia): es va calcular a partir del qüestionari semi-quantitatiu d'alimentació.
- Vitamina D procedent de la dieta: en primer lloc es va obtenir informació sobre el contingut de vitamina D dels diferents aliments a partir de taules espanyoles<sup>148</sup> i també les publicades pel *US Department of Agriculture*<sup>149</sup>.
- Suplements de vitamina D: es va obtenir informació sobre la dosi a partir del la composició del polivitamínic utilitzat, així com sobre la posologia i temps de consum.

Dels qüestionaris realitzats al tercer trimestre es va recollir informació sobre el consum de tabac, alcohol i calories.

El pes matern durant l'embaràs es va obtenir de la història clínica i la variable guany de pes es va classificar com a: recomanat, inferior al recomanat i

superior al recomanat, segons les guies de l'IOM<sup>35</sup>.

### **3.4. ANÀLISI ESTADÍSTICA**

S'ha realitzat un anàlisi bivariant utilitzant el test estadístic  $\chi^2$  per a les variables categòriques i un anàlisi de la variància per a les variables contínues amb distribució normal.

La concentració de 25-dihydroxivitamina D<sub>3</sub> s'ha considerat com a variable contínua i com a variable categòrica dividida en tres categories: superior a 30ng/ml (concentració òptima), 20-30ng/ml (insuficiència) i inferior a 20ng/ml (deficiència)<sup>109</sup>.

#### **Factors determinants**

L'associació entre la deficiència i insuficiència de vitamina D i els potencials factors determinants s'ha analitzat mitjançant regressió logística multinomial, introduint en el model les següents variables com a predictores: àrea d'estudi, estació de l'any en què es realitzà l'extracció, edat gestació en el moment de l'extracció, país d'origen de la mare, ètnia, edat materna, paritat, classe social, nivell d'estudis, índex de massa corporal pre-concepcional, guany de pes durant l'embaràs, consum d'alcohol i tabac, activitat física, consum de vitamina D procedent de la dieta, ús de suplementes de vitamina D i tipus de peix consumit. La mesura d'associació utilitzada ha estat el Risc Relatiu (RR) amb el corresponent 95% CI.

S'ha realitzat una anàlisi de regressió lineal multivariable per tal d'estudiar l'associació entre la concentració de 25-hidroxivitamina D i els mateixos factors

predictors anteriorment citats, mesurada mitjançant coeficients de regressió, amb el corresponent 95% d'interval de confiança (CI).

### **Resultats Perinatal:**

Tenint en compte que la variació temporal observada dels nivells de 25-hidroxitamina D<sub>3</sub> segueix un patró sinusoïdal, s'ha tractat la variable seguint un model cosinor<sup>150</sup>. La predicció de la mitjana anual de 25-hidroxitamina D derivada d'aquest model sinusoïdal (basat en el mes de la recollida de sang de cada dona), es va restar del valor real observat. D'aquesta forma, es va crear la variable "vitamina D ajustada per estacionalitat"<sup>151</sup>.

La relació lineal dosi-resposta entre els nivells de 25-hidroxitamina D<sub>3</sub> materna i els resultats perinatal s'ha avaluat mitjançant models additius generalitzats ajustats mitjançant el test de *likelihood ratio*<sup>152</sup>.

S'ha realitzat una anàlisi de regressió lineal multivariable entre la concentració de 25-hidroxitamina D<sub>3</sub> materna i les variables contínues (pes, alçada i circumferència cefàlica del nadó), mesurant les associacions mitjançant coeficients de regressió amb el seu corresponent 95% (CI).

S'han construït models de regressió binomial i multinomial per tal d'estimar l'associació ajustada per factors de confusió entre els nivells de 25-hidroxitamina D<sub>3</sub> i les variables binàries i el tipus de part, respectivament. La mesura d'associació utilitzada ha estat el Risc Relatiu (RR) amb el 95% d'interval de confiança corresponent.

Tota l'anàlisi estadística s'ha realitzat utilitzant el programa informàtic STATA versió 12.0 (StataCorp, College Station, Texas, USA). El nivell de significació

estadística s'ha establert per a  $p < 0.05$ .

### **3.5. ASPECTES ÈTICS**

Totes les gestants participants van signar un document de consentiment informat després de realitzar l'explicació de l'estudi i els seus objectius. A l' **Annexa 1** s'adjunta el model d'aquest document i a l' **Annexa 2** el full d'informació entregat a la gestant.

Per altra banda, l'estudi va ser aprovat per tots els comitès ètics dels centres participants.

### **3.6. FINANÇAMENT**

L'estudi INMA ha estat finançat per subvencions i beques procedents de:

- Instituto Carlos III i Ministerio de Sanidad de España: FIS 97/0588; 00/0021-2, PI061756; PS0901958; FIS-FEDER 03/1615, 04/1509, 04/112, 04/1931, 05/1079, 05/1052, 06/1213, 07/0314 i 09/02647; FIS-PI041436, FIS-PI081151, FIS-PI06/0867, FIS-PS09/00090, FISS-PI042018, i FISS-PI0902311.
- Universidad de Oviedo.
- Conselleria de Sanitat de la Generalitat Valenciana.
- Generalitat de Catalunya: CIRIT 1999SG 000241.
- Departament de Salut del Govern Basc: 2005111093 i 2009111069.
- Govern Provincial de Guipuzkoa: DFG06/004 i DFG08/001.
- Fundació Roger Torné



## **4. RESULTATS**





## **4.1. FACTORS DETERMINANTS DELS NIVELLS DE VITAMINA D**

### **Característiques de la població d'estudi**

La mitjana d'edat materna va ser de 30.4 (DE:4.3) anys i la mitjana d'edat gestacional en el moment de l'extracció va ser de 13.3 (DE:1.5) setmanes. El 90.6% de les dones eren d'origen espanyol i el 54.8% eren nul·lípare. Del total de gestants, el 26.8% tenien un nivell d'estudis baix (estudis primaris o menys) i el 20.9% provenien de classe social alta. El 25.9% de les dones eren obeses o tenien sobrepès abans de la gestació, i un 18.9% del total de les gestants van presentar un guany de pes durant l'embaràs superior al recomanat. Per altra banda, el 18.5% de les dones va referir realitzar una activitat física intensa durant la gestació.

Pel que fa a hàbits de consum, el 18.5% i el 23.5% de la mostra va referir fumar i consumir alcohol durant l'embaràs, respectivament. El consum de peixos grassos grans i petits més d'un cop per setmana va ser de 7.5% i 10.5%, respectivament; i el 53.6% de les dones va referir consumir peix magre més de tres cops per setmana. Només el 18.2% de les gestants van prendre suplementes de vitamina D.

### **Nivells de vitamina D:**

La mitjana de concentració de 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> va ser de 30.2ng/ml, amb un rang d'inter-quartil de 22.7 a 37.6. El 31% i el 18% de les gestants presentaven insuficiència i deficiència de vitamina D, respectivament.

La concentració de 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> va ser diferent depenent de l'àrea

d'estudi. Així, les dones que provenien de l'àrea més al sud (València) van presentar nivells més elevats de 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub>.

Com era d'esperar, es va trobar una variació estacional dels nivells de vitamina D de forma significativa, amb les concentracions més elevades als mesos d'estiu i les més baixes als mesos d'hivern.

A la **Taula 2** es mostren les concentracions de 25-hidroxivitamina D en funció de les característiques de la població d'estudi.

**Taula 2.** Concentració de 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> segons les característiques de les gestants.

	Total		Categoria 25(OH)D <sub>3</sub> , n(%)			p
	N	% mitjana (DE)	Òptima N=1038	Insuficiència N=631	Deficiència N=367	
<b>Àrea estudi</b>						
Guipuzkoa	612	30.6(12.4)	281(27.1)	218(34.5)	113(30.8)	<0.001
Sabadell	642	29.2(11.6)	310(29.9)	183(29.0)	149(40.6)	
València	782	32.1(11.0)	447(43.1)	230(36.5)	105(28.6)	
<b>Estació de l'any</b>						
Hivern	461	26.6(10.7)	168 (16.2)	158 (25.0)	135 (36.8)	<0.001
Primavera	508	28.9(12.1)	224 (21.5)	158 (25.0)	126 (34.3)	
Estiu	545	36.0(11.1)	383 (36.9)	139 (22.0)	23 (6.3)	
Tardor	522	30.7(10.6)	263 (25.3)	176 (27.9)	83 (22.6)	
<b>Edat gestacional mostra (setm.), mitjana (DE)</b>	2030	13.3 (1.5)	13.2 (1.5)	13.3 (1.3)	12.6 (1.7)	<0.001
<b>País d'origen</b>						
Espanya	1836	30.8(11.4)	946 (91.3)	571 (90.9)	319 (87.9)	0.146
P. Estranger	191	30.3(13.8)	90 (8.7)	57 (9.1)	44 (12.1)	
<b>Ètnia</b>						
Blanca	1948	30.8(11.6)	998 (96.2)	605 (96.3)	345 (94.5)	0.303
No-blanca	82	30.4(14.4)	39 (3.8)	23 (3.7)	20 (5.5)	
<b>Edat (anys), mitjana (DE)</b>	2036	30.4 (4.3)	30.3 (4.3)	30.1 (4.3)	29.7 (4.)	<0.001
<b>Paritat</b>						
0	1100	30.3(11.8)	548 (52.9)	344 (54.8)	218 (60.1)	0.150
1	767	31.1(11.3)	403(38.9)	243 (38.7)	121 (33.3)	
+2	150	32.6(12.6)	85 (8.2)	41 (6.5)	24(6.6)	

<b>Classe social</b>						
Alta	424	32.6(11.9)	237 (22.8)	133 (21.1)	54 (14.8)	0.003
Mitja	549	31.1(11.1)	298 (28.0)	168 (26.7)	91 (24.9)	
Baixa	1058	29.9(11.8)	510 (49.2)	328 (52.2)	220 (60.3)	
<b>Nivell d'estudis</b>						
Primaris o menys	542	29.9(11.5)	270 (26.1)	159 (25.3)	113 (31.1)	0.068
Secundaris	824	30.3(11.4)	405 (39.1)	274 (43.6)	145 (39.9)	
Universitaris	660	32.0(12.1)	360 (34.8)	195 (31.1)	105 (28.9)	
<b>IMC pregestacional(kg/m<sup>2</sup>)</b>						
18.5-24.99	1404	31.2(11.7)	741 (71.5)	423 (67.4)	240 (66.1)	0.203
<18.5	98	30.3(13.0)	44 (4.2)	36 (5.7)	18 (5.0)	
25-29.99	365	29.7(11.4)	168 (16.2)	125 (19.9)	72 (19.8)	
≥30	161	29.9(10.9)	84 (8.1)	44 (7.0)	33 (9.1)	
<b>Guany de pes gestacional</b>						
Recomanat	713	30.7(11.6)	360 (37.9)	232 (40.1)	121 (36.2)	0.653
Inferior al recomanat	443	30.9(12.4)	226 (23.8)	129 (22.3)	88 (26.4)	
Superior al recomanat	706	30.7(11.4)	364 (38.3)	217 (37.5)	125 (37.4)	
<b>Tabac durant gestació</b>						
No	1558	31.1(11.7)	518 (83.4)	483 (82.4)	257 (74.7)	0.001
Si	353	29.1(11.4)	163 (16.6)	103 (17.6)	87 (25.3)	
<b>Consum alcohol</b>						
No	1470	30.6(11.6)	739 (74.6)	470 (79.8)	261 (76.5)	0.060
Si	451	31.4(11.9)	252 (25.4)	119 (20.2)	80 (23.5)	
<b>Activitat física</b>						
Inactiva/poc activa	805	30.0(11.3)	395 (40.8)	254 (43.5)	156 (46.3)	0.407
Moderada	727	31.0(11.9)	379 (39.1)	226 (38.7)	122 (36.2)	
Intensa	358	31.9(11.9)	195 (20.1)	104 (17.8)	58 (17.5)	
<b>Vitamina D de dieta (mcg) (tercils)</b>						
0.10-2.04	673	30.8(10.9)	358 (34.6)	204 (32.9)	111 (30.9)	0.053
2.04-3.20	667	30.8(11.7)	329 (31.8)	228 (36.8)	110 (30.6)	
>3.20	673	30.8(12.4)	347 (33.6)	188 (30.3)	138 (38.4)	
<b>Suplements Vitamina D</b>						
No	1661	29.8(11.7)	780 (75.2)	541 (86.0)	340 (93.1)	<0.001
Si	370	35.1(10.7)	257 (24.8)	88 (14.0)	25 (6.9)	
<b>Consum peix gras petit (cops per setm.)</b>						
0	1006	30.3(11.8)	491 (47.5)	320 (51.6)	195 (54.3)	0.066
0-1	855	31.6(11.6)	464 (44.9)	259 (41.8)	132 (36.8)	
> 1	152	30.3(10.8)	79 (7.6)	41 (6.6)	32 (8.9)	
<b>Consum peix gras gran (cops per setm.)</b>						
0	858	30.5(11.6)	431 (41.7)	276 (44.5)	151 (42.1)	0.493
0-1	949	31.0(11.8)	502 (48.6)	274 (44.2)	173 (48.2)	
> 1	206	31.2(11.6)	101 (9.8)	70 (11.3)	35 (9.7)	
<b>Consum peix magre (cops per setm.)</b>						
0-2	632	30.4(11.2)	318 (30.8)	198 (31.9)	116 (32.3)	0.751
2-3	302	31.4(11.7)	162 (15.7)	94 (15.2)	46 (12.8)	
>3	1079	30.9(12.0)	554 (63.6)	328 (52.9)	197 (54.9)	

### **Factors associats als nivells de vitamina D:**

Mitjançant l'anàlisi multivariable (*Taula 2* de l'article 1), es va observar que la concentració de 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub>, respecte a l'hivern, va ser més elevada a l'estiu, amb un coeficient de 9.46 (95%CI:8.01-10.9); a la tardor, amb un coeficient de 4.37 (95%CI:2.89-5.85); i a la primavera, amb un coeficient de 1.75 (95%CI:0.28-3.22). Els nivells de 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> també es van trobar més elevats amb l'edat materna (coeficient=0.19, 95%CI:0.05-0.33), l'activitat física intensa (coeficient=2.22, 95%CI:0.78-3.65) i l'ús de suplementes de vitamina D (coeficient=4.81, 95%CI:3.21-6.41).

En canvi, la classe social baixa i el consum de tabac durant la gestació es van relacionar amb concentracions més baixes de 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub>, amb uns coeficients de -1.93 (95%CI:-3.62 a -0.25) i -1.43 (95%CI:-2.81 a -0.05).

No es van trobar associacions amb l'àrea d'estudi, l'edat gestacional en el moment de l'extracció, país d'origen i ètnia materna, paritat, nivell d'estudis, índex de massa corporal, guany de pes durant la gestació, consum d'alcohol, ni tipus de peix consumit.

### **Factors de risc d'insuficiència i deficiència de vitamina D:**

L'anàlisi multivariable va mostrar que la latitud, l'estiu i l'ús de vitamina D disminueixen el risc d'insuficiència i deficiència de vitamina D. L'edat materna es trobaria associada a un risc inferior d'insuficiència i, en canvi, el consum de tabac incrementaria el risc de deficiència.

No es va trobar associació entre la deficiència o insuficiència de vitamina D i els següents factors: país d'origen, nivell d'estudis, índex de massa corporal, guany de pes i tipus de peix consumit.

Aquests resultats es mostren a la *Taula 3* de l'article 1.

## **4.2. VITAMINA D I RESULTATS PERINATALS**

### **Característiques de la població d'estudi:**

De les 2358 dones que es van incloure en la segona fase de l'estudi (article 2) només el 4% eren immigrants. La mitjana d'edat en el moment del part va ser de 32.0 (DE: 4.2) anys i el 56% eren nul·lípare. El 25% de les mares tenien un nivell baix d'estudis (estudis primaris o sense estudis) i el 21.1% provenien de classe social alta. El 27% de les dones presentaven sobrepès o obesitat abans de la gestació. Del total de les gestants incloses, el 16% van fumar durant la gestació i el 20% van consumir alcohol.

### **Nivells de vitamina D:**

La mitjana de concentració de 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> en la població estudiada va ser de 29.4ng/ml, amb un rang d'inter-quartil de 21.8 a 37.2. Un total de 31.8% i 19.7% de les gestants presentaven insuficiència o deficiència, respectivament.

La concentració de 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> va ser significativament diferent entre les àrees d'estudi, amb els nivells més elevats en les gestants de València i els més baixos en les gestants d'Astúries.

Els nivells de 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> en funció de les característiques de les gestants es mostren en la **Taula 3**.

**Taula 3:** característiques de les pacients segons la concentració de 25-hidroxivitamina D.

	Quartils de 25(OH)D3 (ng/mL)				p
	<21.8 (n=596)	21.8-29.4 (n=601)	29.4-37.2 (n=591)	≥37.2 (n=594)	
<b>Àrea d'estudi, %</b>					
València (39°N latitud) n=741	22.0	29.5	36.0	37.0	<b>&lt;0.001</b>
Sabadell (41°N latitud) n=604	28.2	22.0	26.7	24.6	
Astúries (43°N latitud) n=453	25.7	21.1	13.9	15.3	
Gipuzkoa (42°N latitud) n=584	24.2	27.5	23.4	23.1	
<b>Estació de l'any, %</b>					
Hivern	36.2	24.5	18.6	15.5	<b>&lt;0.001</b>
Primavera	34.2	26.1	20.6	21.0	
Estiu	8.4	21.6	31.3	42.4	
Tardor	21.1	27.8	29.4	21.0	
<b>Sexe nadó (masculí)</b>	53.9	51.5	51.1	49.8	0.568
<b>Paritat (1 o més vs 0), %</b>	40.2	43.8	46.1	46.0	0.136
<b>Classe social, %</b>					
Alta	16.1	21.3	21.5	26.0	<b>&lt;0.001</b>
Mitjana	24.0	25.0	28.1	28.0	
Baixa	59.9	53.7	50.4	46.0	
<b>Ètnia materna (blanca vs altres), %</b>	95.0	96.5	97.1	96.1	0.257
<b>Nivell d'estudis, %</b>					
Primaris o inferiors	27.6	22.5	24.9	23.4	<b>0.027</b>
Secundaris	42.5	44.7	40.2	37.9	
Universitaris	29.9	32.8	34.9	38.6	
<b>Edat materna (anys), mitjana (DE)</b>	31.7 (4.5)	31.7 (4.3)	32.1 (4.0)	32.5 (4.1)	<b>0.001</b>
<b>Tabac durant gestació (si vs no), %</b>	35.3	30.2	29.0	32.7	0.102
<b>n°cig/dia 12 setm., mitjana (DE)</b>	1.8 (4.4)	1.3 (4.1)	0.9 (2.8)	1.2 (3.6)	<b>0.002</b>
<b>Alcohol 12 setm. (g/dia), mitjana (DE)</b>	0.33 (1.9)	0.21 (1.0)	0.35 (1.2)	0.34 (1.2)	0.445
<b>Alcohol 3<sup>er</sup> tr (g/dia), mitjana (DE)</b>	0.34 (1.7)	0.30 (1.7)	0.33 (0.9)	0.33 (1.0)	0.996

**Taula 3** (continuació)

<b>Calories 12 setm. (Kcal/day), mitjana (DE)</b>	2138 (599)	2113 (556)	2132 (512)	2152 (538)	0.689
<b>Calories 3<sup>er</sup> tr (Kcal/day), mitjana (DE)</b>	2119 (570)	2085 (545)	2095 (543)	2100 (554)	0.772
<b>IMC pregestacional (kg/m<sup>2</sup>), mitjana (DE)</b>	23.9 (4.6)	23.8 (4.5)	23.6 (4.4)	23.2 (3.9)	<b>0.032</b>
<b>IMC pregestacional (kg/m<sup>2</sup>), %</b>					
Baix pes (<18.5)	5.2	4.7	3.7	4.4	0.082
Normal (18.5-24.99)	64.2	67.7	71.4	72.7	
Sobrepès (25-29.99)	21.5	20.6	16.4	15.8	
Obesitat (≥30)	9.1	7.5	8.5	7.1	
<b>Edat gestacional mostra (setm), mitjana (DE)</b>	13.7 (2.4)	13.5 (2.2)	13.3 (1.9)	13.5 (2.1)	<b>0.008</b>

**Diabetis Gestacional:**

Un total de 93 dones (5%) van ser diagnosticades de diabetis gestacional. La mitjana de la concentració de 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> no va ser diferent entre aquestes gestants (28.42ng/ml, 95%CI: 26.31-30.70) i les que no van presentar diabetis gestacional (28.41ng/ml, 95%: 27.93-28.89), amb un valor de p=0.990. Després d'ajustar pels factors de confusió, no es va trobar associació entre els nivells baixos de 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> i el risc de desenvolupar diabetis gestacional (RR=0.92; 95%CI:0.55-1.55).

**Part preterme:**

Es van produir 108 parts preterme (4.6%). La mitjana de la concentració de 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> no va ser diferent entre les dones que van presentar part preterme (28.79ng/ml, 95% CI: 26.78-30.96) i les que van parir a terme (28.22ng/ml, 95% CI: 27.77-28.67), amb un valor de p=0.592. Tampoc en aquest cas es va trobar una associació significativa entre els nivells de 25-



hidroxivitamina D<sub>3</sub> i el risc de part preterme, tal i com es mostra en la *Taula 2* de l'article.

### **Via del part:**

La prevalença de cesàries a la població d'estudi va ser de 17.5%. Del total de cesàries, el 40% van ser electives, el 24.1% urgents i el 35.1% no electives/no urgents. La mitjana de la concentració de 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> no va ser diferent entre el part vaginal (28.27ng/ml, 95% CI: 27.79-28.76) i la cesària (28.04ng/ml, 95% CI: 26.99-29.13).

Després d'estratificar segons el tipus de cesària, es va observar que els nivells de 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> no estaven associats a un risc incrementat de cesària electiva o urgent. En canvi, vàrem trobar que les dones que presentaven uns nivells suficients de 25-hidroxivitamina D tenien un risc inferior de cesària no electiva/no urgent: RR=0.60, 95% CI 0.37-0.97 (*Taula 3* de l'article).

### **Mesures antropomètriques:**

La mitjana (amb desviació estàndard, DE) del pes al néixer, talla i circumferència cefàlica va ser de 3272.3 (477.61) g, 49.68 (2.10) i 34.26 (1.45) cm, respectivament. No es va trobar cap associació entre la concentració de 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> i el pes i alçada, tal i com mostra la *Taula 4* de l'article. En canvi, en els fills de mares amb nivells més elevats de 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> es va observar una tendència a presentar una circumferència cefàlica menor, amb un coeficient (DE) estimat pel doble de la concentració de 25-hidroxivitamina D de -0.10 (0.05) cm, p=0.038.

Un total de 120 nadons (5.1%) presentaven retard de creixement intrauterí i

237 (10.1%) es van classificar com a petits per edat gestacional. Després d'ajustar per factors de confusió, no es va trobar cap associació entre els nivells de 25-hidroxitamina D<sub>3</sub> i aquests defectes de creixement (*Taula 5* de l'article). D'igual forma, tampoc es va trobar relació entre les diferents categories clíniques de pes (inferior a 2500 g, entre 2500 i 4000 g i superior a 4000 g) i els nivells circulants de 25-hidroxitamina D<sub>3</sub>.



## **5. DISCUSSIÓ**



## 5.1. FACTORS DETERMINANTS DELS NIVELLS DE VITAMINA D

En primer lloc, cal destacar l'elevada prevalença de deficiència de vitamina D (18%) i insuficiència (31%) de vitamina D, tot i ser un estudi realitzat en un país europeu de latitud baixa i per tant, amb més hores d'exposició solar. Aquests resultats són similars als d'altres estudis realitzats a Espanya amb anterioritat (44.6-47.9% d'insuficiència i 22.7-37.2% de deficiència en gestants)<sup>94-95</sup>. Per altra banda, si bé els percentatges que hem trobat són lleugerament inferiors als publicats en altres països europeus sobre població gestant (36-45% de deficiència de vitamina D)<sup>96-98</sup>, continuen essent elevats per a un país de la regió sud d'Europa.

D'altra banda, s'ha de tenir en compte també que en aquest estudi s'han exclòs gestants amb malalties cròniques, amb dificultat de comunicació (dones immigrants, per exemple) i procedents de tècniques de reproducció assistida; tots ells potencials grups de risc de deficiència de vitamina D. Per tant, malgrat aquests criteris d'exclusió utilitzats, el percentatge de deficiència i insuficiència és elevat.

### **Estació de l'any i àrea geogràfica:**

Tant en l'article 1 com a l'article 2, els nivells de de 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> durant la gestació van ser inferiors durant els mesos d'hivern, en comparació amb els d'estiu.

Els resultats també mostren diferències entre les tres àrees d'estudi. D'aquesta

forma, la concentració més elevada de 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> i el percentatge més baix de deficiència els trobem entre les gestants procedents de València, l'àrea més al sud de les incloses.

Aquestes diferències respecte l'estació de l'any i la latitud són un reflex de les variacions en l'exposició a les radiació ultraviolada B, peça clau en la síntesi de vitamina D.

L'elevada prevalença de deficiència i insuficiència en la població estudiada, tot i pertànyer a una regió del sud d'Europa, podria ser conseqüència de l'estil de vida, com per exemple la tendència cada cop més freqüent a realitzar menys activitats a l'exterior.

#### **Ètnia:**

És un fet conegut que la pigmentació de la pell pot afectar la síntesi de vitamina D i, en aquest sentit, l'ètnia seria un factor important relacionat amb els nivells de vitamina D<sup>9</sup>. En el present estudi no hem trobat diferències pel que fa al país de naixement de la gestant, si bé en les dones que no són de raça blanca s'observa una tendència no significativa a presentar més deficiència de vitamina D. De totes formes, en la població estudiada tan sols el 9.4% de les gestants procedien d'altres països, amb el 4% de dones de raça no blanca. Aquest fet limitaria el poder estadístic per tal de detectar possibles diferències.

#### **Edat materna:**

Els resultats mostren que les dones més joves presenten nivells més baixos de vitamina D durant la gestació i un risc incrementat d'insuficiència. En aquest sentit, existeixen estudis previs que no han trobat aquesta diferència<sup>98,102</sup> i d'

altres que han trobat que l'edat materna estaria relacionada de forma positiva amb l'ús de suplementos de vitamina D, suggerint una possible explicació a l'associació entre edat i nivells de vitamina D<sup>103</sup>.

#### **Paritat:**

Tot i que s'ha publicat una relació inversa entre la paritat i els nivells de vitamina D<sup>98,104</sup>, els resultats d'aquest estudi mostren només una associació significativa amb el risc de deficiència de vitamina D en l'anàlisi univariable, però que no es confirma després d'ajustar per factors de confusió.

#### **Classe social i nivell d'estudis:**

Les gestants de la població estudiada que pertanyen a una classe social baixa presenten nivells de 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> més baixos i un risc incrementat de deficiència i insuficiència de vitamina D. Diferents estudis han trobat nivells de vitamina D inferiors en dones gestants amb un baix nivell d'estudis<sup>90,91</sup>, fet que s'acostuma a associar a classes socioeconòmiques baixes. En aquest estudi hem trobat una tendència a que les mares amb un nivell d'estudi baix presentin nivells de vitamina D més baixos.

#### **Tabaquisme:**

Els resultats de l'estudi mostren que el consum de tabac durant la gestació es troba associat amb una concentració baixa de 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> i un risc incrementat de deficiència de vitamina D. Aquesta relació ja s'ha publicat amb anterioritat<sup>96,125</sup>, però el mecanisme principal pel qual es produeix l'associació encara es desconeix.



**Activitat física:**

Segons els resultats obtinguts, l'activitat física intensa durant l'embaràs s'ha relacionat amb concentracions més elevades de 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub>. En aquest sentit, altres autors han publicat dades similars, sobretot pel que fa a l'activitat física que es practica a l'exterior i, per tant, amb una possible relació amb l'exposició solar<sup>103</sup>.

**Suplements de vitamina D:**

Tot i que només el 18.2% de les gestants participants van referir l'ús de suplements de vitamina D, l'associació trobada amb els nivells de 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> i el risc de deficiència i insuficiència de vitamina D ha estat significativa de forma important, en concordança amb els resultats d'altres estudis<sup>96,98,102</sup>. A Espanya, els suplements de vitamina D durant la gestació són donats en forma de multivitamínics. El fet de que no tots en contenen i de que no existeix un clar consens per a la seva recomanació pot haver influït en la baixa taxa d'ús.

**Índex de massa corporal i guany de pes:**

En aquest estudi no s'ha trobat associació entre els nivells de vitamina D o el risc de deficiència o insuficiència de vitamina D i l'Índex de massa corporal o l'increment de pes durant la gestació. Aquests factors, però, han estat prèviament descrits com a potencials determinants de la concentració de 25-hidroxivitamina D<sup>96,100,109</sup>. La falta de poder estadístic de l'estudi i el fet de que el pes pre-gestacional sigui referit per la pacient, podrien explicar aquesta discrepància amb estudis anteriors.

## 5.2. VITAMINA D I RESULTATS PERINATALS

En aquesta segona fase de l'estudi, que correspon l'article 2, hem trobat una prevalença d'insuficiència i deficiència del 31.8% i 19.6%, respectivament. Aquests percentatges són similars als publicats en anteriors estudis, que mostraven que els nivells subòptims de vitamina D són freqüents en les dones gestants<sup>80,82</sup>.

### **Diabetis Gestacional:**

A diferència d'altres publicacions<sup>1100,111,112,114,115,128</sup>, el nostre estudi no mostra un risc incrementat de Diabetis Gestacional en embarassades amb insuficiència o deficiència de vitamina D. Aquesta discrepància podria ser conseqüència de varis factors: les diferències en l'edat gestacional en el moment de l'extracció, el nombre inferior de casos, i la utilització de criteris diagnòstics diferents. A Espanya, al contrari que en altres països, no s'han adoptat els criteris de l'*American Diabetes Association* (ADA). Si els criteris de l'ADA s'implementessin a la població d'Espanya, això podria incrementar fins el 30% la prevalença de Diabetis Gestacional sense augmentar de forma substancial el diagnòstic de resultats perinatals adversos<sup>153</sup>.

### **Part preterme:**

En el nostre estudi, el 4.6% de les gestants han presentat un part preterme, però aquest fet no s'ha associat amb els nivells de 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub>. La relació del part preterme amb els nivells de vitamina D ha estat publicada amb anterioritat<sup>134,135</sup>, però altres estudis com el nostre no han trobat associació<sup>136,154</sup>.

**Via del part:**

En el present estudi hem trobat una associació significativa entre la concentració de 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> materna i el risc de cesària indicada per part estacionat, inducció fallida o desproporció pèlvico-fetal, però no per cesària electiva o urgent. Aquests resultats, similars a altres estudis publicats amb anterioritat<sup>122,123</sup>, suggereixen que l'efecte de la vitamina D sobre el rendiment del múscul llis esquelètic i la força muscular podria ser beneficiós per a un correcte progrés del part<sup>137</sup>. Per tant, altres estudis serien necessaris per tal d'aclarir aquest aspecte.

**Mesures antropomètriques:**

A diferència d'altres estudis<sup>128</sup>, no hem trobat una associació significativa entre els nivells de 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> materns i el pes al néixer (ni tractat com a variable contínua ni com a variable categòrica), alçada, risc de retard de creixement intrauterí ni risc de petit per edat gestacional. Els nostres resultats suggereixen que, si bé la concentració de 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> no estaria relacionada amb fetus amb defectes de creixement, existiria una tendència a presentar perímetres cefàlics més petits amb nivells més elevats de 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub>. No obstant, la reducció en la circumferència cefàlica és massa petita per poder concloure que existeix una associació clínica significativa.

### 5.3. PUNTS FORTS I LIMITACIONS DE L'ESTUDI

Un dels principals punts forts d'aquest estudi és el seu disseny prospectiu, amb una cohort de naixement que inclou un important nombre de gestants que procedeixen de diverses zones geogràfiques d'Espanya. Per altra banda, s'ha analitzat la concentració de 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub>, considerada la millor mesura dels nivells de vitamina D en humans. A nivell de la primera fase de l'estudi, s'han avaluat un nombre important de potencials factors determinats a l'hora de realitzar els models multivariables.

D'igual forma, en la segona fase de l'estudi, la utilització d'una mitjana anual estimada de 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> tenint en compte la variació estacional de la mateixa i el fet de realitzar un anàlisi multivariable ajustat per múltiples factors de confusió, es podrien considerar punts de fortlesa

Però l'estudi presenta també algunes limitacions. En primer lloc, no s'han pogut mesurar la concentració de 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> en totes les participants elegibles, el que pot ocasionar un possible biaix de selecció. També cal tenir en compte el fet que només s'hagi realitzat una única determinació de 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> per gestant, el que podria no reflectir els nivells durant tota la gestació. No s'ha determinat la 25-hidroxivitamina D<sub>2</sub>, però de forma general el 90% de la 25-hidroxivitamina D circulant és en forma de D<sub>3</sub>. Finalment, la utilització de qüestionaris podrien haver donat lloc a un biaix d'informació.

Per altra banda, el fet que els resultats perinatals estudiats presentin una prevalença baixa ha pogut limitar el poder estadístic per tal de detectar possibles diferències significatives.

Una altra limitació considerable és el fet de no haver pogut avaluar la possible

associació entre els nivells de vitamina D i el risc de preeclàmpsia, una important patologia obstètrica que diferents publicacions han relacionat amb la deficiència de vitamina D<sup>116-118,136,155</sup>.

## **6. CONCLUSIONS FINALS**



1. Només una de cada dues dones de la població presenta nivells òptims de 25-hidroxivitamina D durant l'embaràs (superiors a 30ng/ml). Les prevalences de deficiència i insuficiència de vitamina D trobades són elevades (18% i 31%, respectivament), tot i pertànyer a una àrea geogràfica de latitud baixa i tractar-se d'una població de gestants de baix risc.
2. En relació amb els nivells de vitamina D de les gestants de la nostra població, aquests s'han relacionat amb l'estació de l'any en què s'ha realitzat la determinació, la latitud de l'àrea geogràfica a la que pertanyen, l'edat de l'embarassada, el nivell socio-econòmic, el nivell d'estudis, el consum de tabac, l'activitat física intensa durant la gestació i l'ús de suplementes de vitamina D.
3. Les gestants amb nivells òptims de vitamina D (25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> igual o superior a 30ng/ml) van presentar de forma significativa una disminució del risc de cesària per obstrucció en la progressió del part; és a dir, per part estacionat, desproporció pèlvico-fetal o inducció fallida.
4. Els nivells de 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> de les gestants de la població estudiada no s'han associat amb l'aparició de Diabetis gestacional ni amb el part preterme.
5. Respecte a les mesures antropomètriques dels nadons, hem observat



una tendència a presentar perímetres cefàlics més petits en els fills de mares amb nivells més elevats de 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub>, sense trobar cap relació entre els nivells materns de vitamina D i la resta de mesures. La reducció en la circumferència cefàlica és massa petita per poder concloure que existeix una associació clínica significativa.

6. No s'ha trobat associació entre la concentració de 25-hidroxivitamina D durant la gestació i alteracions fetals de creixement (retard de creixement intrauterí o fetus petits per edat gestacional).
  
7. Segons els resultats obtinguts, es podrien suggerir una sèrie de recomanacions en dones gestants per tal d'intentar augmentar els nivells de vitamina D durant l'embaràs i reduir els potencials efectes adversos derivats del seu dèficit sobre la salut, tant materna com fetal. Aquests consells sobre hàbits saludables podrien ser: una adequada exposició solar, activitat física a l'exterior, no consumir tabac, promoció de la dieta rica en vitamina D i, probablement, l'ús de suplementes de vitamina D.

## **7. PRIMER ARTICLE:**

*Vitamin D Status in Pregnancy and Determinants in a Southern*

*European Cohort Study*





## Vitamin D Status in Pregnancy and Determinants in a Southern European Cohort Study

Agueda Rodriguez,<sup>a,b</sup> Loreto Santa Marina,<sup>c,d,e</sup> Ana María Jimenez,<sup>d,e</sup> Ana Esplugues,<sup>c,f,g</sup>  
Ferran Ballester,<sup>c,f,g</sup> Mercedes Espada,<sup>h</sup> Jordi Sunyer,<sup>c,i,j,k</sup> Eva Morales<sup>c,l</sup>

<sup>a</sup>Hospital de Sabadell, Corporació Sanitària Parc Taulí, Institut Universitari ParcTaulí-UAB, Sabadell

<sup>b</sup>Universitat Autònoma de Barcelona, Campus d'Excel·lència Internacional, Bellaterra

<sup>c</sup>CIBER Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Barcelona

<sup>d</sup>Public Health Division of Gipuzkoa, Basque Government, Gipuzkoa

<sup>e</sup>BIODONOSTIA Health Research Institute, San Sebastian

<sup>f</sup>University of Valencia, Valencia

<sup>g</sup>Centre for Public Health Research (CSISP-FISABIO), Valencia

<sup>h</sup>Clinical Chemistry Unit, Public Health Laboratory of Bilbao, Euskadi

<sup>i</sup>Centre for Research in Environmental Epidemiology (CREAL), Barcelona

<sup>j</sup>Hospital del Mar Medical Research Institute (IMIM), Barcelona

<sup>k</sup>Universitat Pompeu Fabra (UPF), Barcelona

<sup>l</sup>IMIB-Arrixaca Biomedical Research Institute, Virgen de la Arrixaca University Hospital, Murcia, Spain

### Abstract

**Background:** Population-based data on vitamin D status in pregnancy in southern European countries are scarce. We assessed the prevalence and determinants of vitamin D insufficiency and deficiency in pregnancy in Spain.

**Methods:** Plasma 25-hydroxyvitamin D3 (25(OH)D3) concentration was measured at the first trimester of gestation in 2,036 pregnant women from several geographical areas of Spain (latitude 39–42°N). Uni- and multivariable regression models were conducted to identify predictors of circulating 25(OH)D3 concentration and vitamin D insufficiency (20–30 ng/mL) and deficiency (<20 ng/mL).

**Results:** Thirty-one per cent and 18% of women were vitamin D insufficient and deficient, respectively. Season at blood collection, latitude, age, social class, tobacco smoking, physical activity and use of vitamin D supplements were identified as independent determinants of 25(OH)D3 concentration. Lower risk of vitamin D insufficiency and deficiency was associated with summer season at blood collection (RR for insufficiency = 0.34, confidence intervals (CI) 0.25, 0.48; and RR for deficiency = 0.07, 95% CI 0.04, 0.12), southern latitude (RR for insufficiency = 0.71, 95% CI 0.50, 1.02; RR for deficiency = 0.60, 95% CI 0.38, 0.94); use of vitamin D supplements (RR for insufficiency = 0.50, 95% CI 0.35, 0.71; RR for deficiency = 0.24, 95% CI 0.14, 0.41); and strong physical activity (RR for insufficiency = 0.80, 95% CI 0.58, 1.09; and RR for deficiency = 0.67, 95% CI 0.46, 1.03). Higher risk of vitamin D deficiency was related to lower social class (RR = 1.94, 95% CI 1.19, 3.16) and smoking (RR = 1.76, 95% CI 1.23, 2.54).

**Conclusions:** Vitamin D insufficiency and deficiency are highly prevalent in pregnancy. Recommendations and policies to detect and prevent hypovitaminosis D during pregnancy should be developed taking into account the associated factors.

**Keywords:** deficiency, determinants, insufficiency, pregnancy, vitamin D.

The discovery that most human tissues, including placenta, express vitamin D receptors has provided new insights into the functions of this vitamin beyond the

classic action on calcium and bone homeostasis.<sup>1,2</sup> Adequate vitamin D status is associated with lower risk of cancer, cardiovascular and autoimmune diseases, neurological disorders and diabetes.<sup>3</sup> In addition, studies have shown that vitamin D deficiency during pregnancy is associated with multiple adverse health outcomes in mothers and offspring including

#### Correspondence:

Eva Morales, IMIB-Arrixaca Biomedical Research Institute, Virgen de la Arrixaca University Hospital, Murcia, Spain.  
E-mail: embarto@hotmail.com

gestational diabetes, pre-eclampsia, and higher risk of caesarean, premature birth, low birth weight, fetal growth restriction, low respiratory tract infections and impaired neuropsychological development.<sup>4-7</sup>

There is a growing concern about the magnitude of the high prevalence of vitamin D deficiency worldwide among the general population, including pregnant women.<sup>8,9</sup> Results from previous surveys suggest that both vitamin D insufficiency and deficiency among pregnant women is common in Europe, not only in countries located at a high latitude<sup>9-12</sup> but also in regions with high level of sunshine.<sup>13</sup> To this regard, studies conducted in Spain have reported high prevalence of suboptimal levels of vitamin D among women of childbearing age and pregnant women.<sup>14,15</sup>

Exposure to sunlight, diet and dietary supplements are main sources of vitamin D for humans. As few food items contain or are fortified with vitamin D, the skin synthesis of vitamin D induced by ultraviolet B radiation (UVB) is the main determinant of vitamin D status in the population.<sup>1</sup> Factors that have been associated with circulating levels of vitamin D include latitude, season at blood collection, skin tone, age, ethnicity, parity, genetic background, socioeconomic position, smoking and alcohol habits, and obesity.<sup>16,17</sup>

There is little population-based data available to quantify the degree of vitamin D insufficiency and deficiency in pregnant women in Spain, a region with high level of sunshine. Moreover, understanding the determinants of vitamin D status in pregnancy is necessary in an effort to guide future public health policies and vitamin D intakes during pregnancy. This warrants an examination of the impact of the individual factors influencing vitamin D status. The aims of the present study were to quantify the prevalence of vitamin D insufficiency and deficiency and to identify determinants of vitamin D status in pregnant women of a population-based cohort study conducted in several geographical areas of Spain (latitude 39–42°N).

## Methods

### Study population

We used data from the INMA-INfancia y Medio Ambiente-(Environment and Childhood) Project, a prospective population-based birth cohort study conducted in several geographical areas of Spain ([www.proyectoinma.org](http://www.proyectoinma.org)).<sup>18</sup> In brief, between November 2003 and February 2008 a total of 2150 women

who fulfilled the inclusion criteria ( $\geq 16$  years of age, intention to deliver at the reference hospital, no problems of communication, singleton pregnancy, and no assisted conception) were recruited during the first prenatal visit in three areas of study: Valencia (39°N latitude,  $n = 855$ ), Sabadell (41°N latitude,  $n = 657$ ), and Gipuzkoa (42°N latitude,  $n = 638$ ). A common characteristic of these areas is that the vast majority of the population attends the public health sector. From 54% to 68% of the eligible pregnant women agreed to participate (54% in Valencia, 60% in Sabadell, and 68% in Gipuzkoa). Circulating 25(OH)D<sub>3</sub> concentration was determined in 2,036 pregnant women (95% of those eligible) that were eligible for the present study (Figure 1). There were no significant differences between included participants and initially recruited with respect to age, education, social class, prepregnancy body mass index, tobacco smoking, vitamin D intake from diet, and use of vitamin D supplements, except that the included subjects tended to drink less alcohol and reported less physical activity in pregnancy (data not shown). The Ethical Committees of the centres involved in the project approved the study and written informed consent was obtained from all the participants.

### Assessment of circulating 25(OH)D<sub>3</sub> concentration

A single maternal blood specimen was drawn during pregnancy (mean (SD) 13.3 (1.5) weeks of gestation). Samples were processed immediately and stored from  $-70^{\circ}\text{C}$  to  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis. Quantification of maternal plasmatic levels of 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> was performed by HPLC method by using a BioRAD kit according to 'Clinical and Laboratory Standard

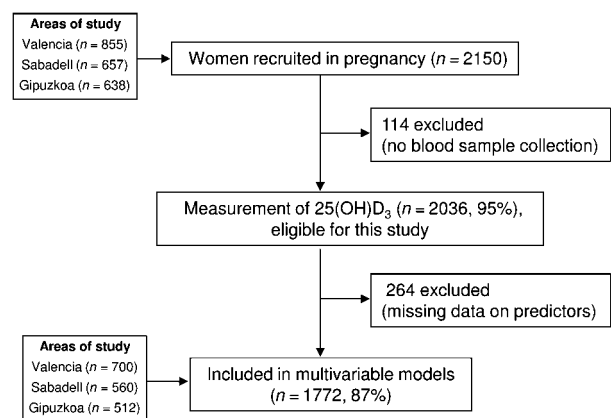


Figure 1. Flow chart of the study population.

Institute' (NCCLS) protocols.<sup>19</sup> Detection limit was 5 ng/mL and inter-assay coefficient of variation was 4.5%. The assay was validated by 'German Programmes of External Evaluation of Quality' (DGKL-RFB-Referenzinstitut für Bionalytik), and results were satisfactory in 100% of the cases.

### **Determinants of circulating 25(OH)D3 concentration**

We considered latitude, month and season at blood sampling, gestational age at blood sampling, country of birth, ethnicity, age, parity, social class, education level, prepregnancy body mass index (BMI), gestational weight gain, physical activity, tobacco smoking and alcohol consumption in pregnancy, use of vitamin D supplements, dietary intake of vitamin D, and fish intake to be potentially important determinants of 25(OH)D3 based on previous literature.

Gestational age at blood sampling was calculated from the date of the last menstrual period reported at recruitment and was confirmed using ultrasound examination in week 12 of gestation. Questionnaires during the first trimester of pregnancy obtained information about parity (0, 1 or more), age, country of birth (Spanish vs. foreign), ethnicity (white vs. non-white), social class (occupation during pregnancy based on the highest social class by using a widely used Spanish adaptation of the international ISCO88 coding system) (high, I–II, managers/technicians; medium, III, skilled; low, IV–V, semiskilled/unskilled), education level (primary or less, secondary, university degree), prepregnancy body mass index (BMI) based on measured height at recruitment and prepregnancy self-reported weight (kg/m<sup>2</sup>) (underweight (<18.5), normal weight (18.5–24.99), overweight/obese (≥25)), self-reported physical activity during first trimester of pregnancy (inactive/low active, intermediate active and strong active), tobacco smoking during first trimester of pregnancy (no vs. yes), and alcohol consumption during first trimester of pregnancy (no vs. yes, defined as consumption of alcohol beverages at least 1 time/month). Maternal weight throughout pregnancy was extracted from prenatal visit records and gestational weight gain was classified as recommended, less than recommended and more than recommended following the US Institute of Medicine (IoM) guidelines.<sup>20</sup> Dietary fish and vitamin D intake were determined using a validated 100-item semiquantitative food frequency

questionnaire (FFQ) interview-administered to pregnant women at 10–13 weeks, which included intakes from the last menstrual period until the third month of pregnancy. The FFQ was an adapted version of the Willett questionnaire and validated for Spanish pregnant women in Valencia.<sup>21</sup> Vitamin D content of the food items was primarily obtained from food composition tables from the US Department of Agriculture,<sup>22</sup> and other tables published for Spanish foods.<sup>23</sup> Information on vitamin D supplement use during the first trimester of pregnancy was collected using a structured questionnaire. Vitamin D was estimated based on supplement brand name and composition, daily dose and timing of consumption.

### **Statistical analysis**

Differences in baseline characteristics of participants across quartiles of maternal vitamin D levels were compared using  $\chi^2$  tests for categorical variables and analysis of variance for continuous variables with normal distribution. Maternal circulating 25(OH)D3 concentration was treated as continuous and as categorical variable divided into clinically defined cut-off points: >30 ng/mL (optimal concentration, reference group), 20–30 ng/mL (insufficiency), and <20 ng/mL (deficiency).<sup>24,25</sup>

Uni- and multivariable associations of 25(OH)D3 insufficiency and deficiency with examined potential determinants were estimated through multinomial logistic regression (comparing optimal levels with insufficiency and deficiency) while entering the following variables as predictors in the basic model: area of study, season at blood extraction, gestational age at blood sampling, country of origin, ethnicity, age, parity, social class, educational level, prepregnancy BMI, gestational weight gain, tobacco smoking, alcohol consumption, physical activity, vitamin D intake from diet, use of vitamin D supplements, and type of fish consumption. The measure of association was the relative risk (RR) and their corresponding 95% confidence intervals (CI). Multivariable linear regression was fitted to estimate the association between maternal circulating 25(OH)D3 and the same predictors. The associations were measured with the regression coefficients and their corresponding 95% CI.

Analyses were conducted using STATA software, version 12.0 (Stata Corp, College Station, TX, USA). Statistical tests of hypotheses were two-tailed with significance set at  $P < 0.05$ .

## Results

The characteristics of study population are shown in Table 1. 90.6% of women were of Spanish origin. Maternal mean (SD) age at childbirth was 30.4 (4.3) years and mean (SD) gestational age at blood sampling was 13.3 (1.5) weeks. Of the total women, 54.8% were nulliparous, 26.8% of mothers had a low educational level (primary or less), and 20.9% were from high social class. A per cent of women (25.9%) were overweight/obese before pregnancy, 37.9% won weight more than recommended, and 18.9% reported to perform strong activity; 18.5% of women reported tobacco smoking and 23.5% alcohol consumption during pregnancy. The intake of large and small fatty fish was more than once a week in 7.5% and 10.5% of the mothers, respectively and 53.6% of the women consumed lean fish more than three times per week. Only 18.2% of women reported use of vitamin D supplement.

The median (interquartile range) of circulating 25(OH)D3 concentration in pregnant women was 30.2 ng/mL (22.7-37.6). A total of 31% and 18% of women were vitamin D insufficient (25(OH)D3 20–30 ng/mL) and deficient (25(OH)D3 < 20 ng/mL), respectively. Concentration of circulating 25(OH)D3 in pregnant women differed accordingly to the latitude of the area of study, with the southern area (Valencia) showing the highest concentrations (Table 1). We found a significant seasonal variation in plasma 25(OH)D3 concentrations in pregnancy (Figure 2). The highest concentrations were found in summer months (July–September) and the lowest concentrations in winter months (December–February).

Associations between determinants and circulating 25(OH)D3 concentration in multivariate linear models are shown in Table 2. We found that circulating 25(OH)D3 concentration was higher in summer season (beta = 9.46, 95% CI 8.01, 10.9), fall (beta = 4.37, 95% CI 2.89, 5.85) and spring (beta = 1.75, 95% CI 0.28, 3.22) in comparison with winter season at blood collection. In addition, 25(OH)D3 concentration increased with age of women (beta = 0.19, 95% CI 0.05, 0.33), strong physical activity (beta = 2.22, 95% CI 0.78, 3.65), and use of vitamin D supplements (beta = 4.81, 95% CI 3.21, 6.41). In contrast, lower social class and tobacco smoking during pregnancy were associated with lower 25(OH)D3 concentration (beta = -1.93, 95% CI -3.62, -0.25, and -1.43, 95% CI -2.81, -0.05 respectively). No significant associations

were found for area of study, gestational age at blood sampling, country of origin and ethnicity, parity, education level, prepregnancy BMI, gestational weight gain, alcohol consumption, vitamin D intake from diet, and type of fish consumption.

Table 3 shows uni- and multivariable associations of examined risk factors of vitamin D insufficiency and deficiency. In the univariable analyses latitude of the area of study, summer season at blood sampling, gestational age at blood sampling, age, social class, alcohol consumption, and use vitamin D supplements were associated with risk of vitamin D deficiency and insufficiency. In addition to these factors parity, educational level and tobacco smoking were associated with vitamin D deficiency (Table 3). After adjusting for all the other factors, latitude, summer season and vitamin D supplement use remained associated with risk of both vitamin D insufficiency and deficiency. In addition, younger age was associated with vitamin D insufficiency, and lower social class and tobacco smoking were associated with higher risk of vitamin D deficiency (Table 3). We did not find evidence of an association of vitamin D deficiency or insufficiency in pregnant women with country of origin, educational level, prepregnancy BMI, gestational weight gain, vitamin D intake from diet, and type of fish consumption (Table 3).

## Comments

This study is one of the few population-based studies conducted in several geographical regions of Spain evaluating vitamin D status in pregnant women and determinants. We evaluated vitamin D status in pregnant women by measuring plasma concentration of 25(OH)D3 and a large number of potential determinants were investigated using data of a large population-based cohort study. The study confirms a high prevalence of vitamin D deficiency (18%) and insufficiency (31%) among pregnant women in Spain, a country with high levels of sunshine. Plasma vitamin D levels are lowest during the winter months and among women living at southern latitudes. Younger women, smokers and those of low socio-economic position have lower vitamin D levels in pregnancy. Physical activity and the use of vitamin D supplements during pregnancy are associated with higher vitamin D levels.

Our results on the prevalence of vitamin D deficiency and insufficiency strengthen the findings of



**Table 1.** Characteristics of study population.

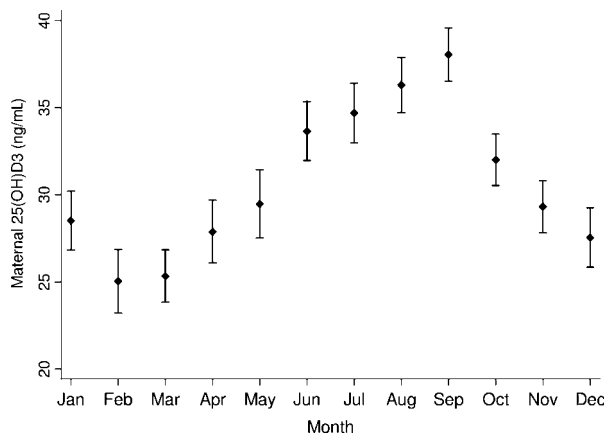
	All	25(OH)D3 categories, <i>n</i> (%)			<i>P</i> -value <sup>a</sup>	
		Mean (SD)	Optimal ≥30 ng/mL <i>n</i> = 1038	Insufficiency 20–30 ng/mL <i>n</i> = 631		Deficiency <20 ng/mL <i>n</i> = 367
<i>N</i>						
<b>Area of study</b>						
Gipuzkoa (42°N latitude)	612	30.6 (12.4)	281 (27.1)	218 (34.5)	113 (30.8)	<0.001
Sabadell (41°N latitude)	642	29.2 (11.6)	310 (29.9)	183 (29.0)	149 (40.6)	
Valencia (39°N latitude)	782	32.1 (11.0)	447 (43.1)	230 (36.5)	105 (28.6)	
<b>Season at blood extraction</b>						
Winter	461	26.6 (10.7)	168 (16.2)	158 (25.0)	135 (36.8)	<0.001
Spring	508	28.9 (12.1)	224 (21.5)	158 (25.0)	126 (34.3)	
Summer	545	36.0 (11.1)	383 (36.9)	139 (22.0)	23 (6.3)	
Fall	522	30.7 (10.6)	263 (25.3)	176 (27.9)	83 (22.6)	
Gestational age at blood sampling (weeks), mean, (SD)	2030	13.3 (1.5)	13.2 (1.5)	13.3 (1.3)	13.5 (1.7)	<0.001
<b>Country of origin</b>						
Spain	1836	30.8 (11.4)	946 (91.3)	571 (90.9)	319 (87.9)	0.146
Foreign	191	30.3 (13.8)	90 (8.7)	57 (9.1)	44 (12.1)	
<b>Ethnicity</b>						
White	1948	30.8 (11.6)	998 (96.2)	605 (96.3)	345 (94.5)	0.303
Non-white	82	30.4 (14.4)	39 (3.8)	23 (3.7)	20 (5.5)	
Age (years), mean (SD)	2036	30.4 (4.3)	30.7 (4.3)	30.1 (4.3)	29.7 (4.5)	<0.001
<b>Parity</b>						
0	1100	30.3 (11.8)	548 (52.9)	344 (54.8)	218 (60.1)	0.150
1	767	31.1 (11.3)	403 (38.9)	243 (38.7)	121 (33.3)	
+2	150	32.6 (12.6)	85 (8.2)	41 (6.5)	24 (6.6)	
<b>Social class</b>						
High I+II	424	32.6 (11.9)	237 (22.8)	133 (21.1)	54 (14.8)	0.003
Medium III	549	31.1 (11.1)	290 (28.0)	168 (26.7)	91 (24.9)	
Low IV+V	1058	29.9 (11.8)	510 (49.2)	328 (52.2)	220 (60.3)	
<b>Education level</b>						
Primary or less	542	29.9 (11.5)	270 (26.1)	159 (25.3)	113 (31.1)	0.068
Secondary	824	30.3 (11.4)	405 (39.1)	274 (43.6)	145 (39.9)	
University	660	32.0 (12.1)	360 (34.8)	195 (31.1)	105 (28.9)	
<b>Prepregnancy BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>						
18.5–24.99	1404	31.2 (11.7)	741 (71.5)	423 (67.4)	240 (66.1)	0.203
<18.5	98	30.3 (13.0)	44 (4.2)	36 (5.7)	18 (5.0)	
25–29.99	365	29.7 (11.4)	168 (16.2)	125 (19.9)	72 (19.8)	
≥30	161	29.9 (10.9)	84 (8.1)	44 (7.0)	33 (9.1)	
<b>Gestational weight gain</b>						
Recommended	713	30.7 (11.6)	360 (37.9)	232 (40.1)	121 (36.2)	0.653
Less than recommended	443	30.9 (12.4)	226 (23.8)	129 (22.3)	88 (26.4)	
More than recommended	706	30.7 (11.4)	364 (38.3)	217 (37.5)	125 (37.4)	
<b>Smoking during 1st trimester</b>						
No	1558	31.1 (11.7)	818 (83.4)	483 (82.4)	257 (74.7)	0.001
Yes	353	29.1 (11.4)	163 (16.6)	103 (17.6)	87 (25.3)	
<b>Alcohol consumption during 1st trimester</b>						
No	1470	30.6 (11.6)	739 (74.6)	470 (79.8)	261 (76.5)	0.060
Yes	451	31.4 (11.9)	252 (25.4)	119 (20.2)	80 (23.5)	
<b>Physical activity during 1st trimester</b>						
Inactive/low active	805	30.0 (11.3)	395 (40.8)	254 (43.5)	156 (46.3)	0.407
Moderate active	727	31.0 (11.9)	379 (39.1)	226 (38.7)	122 (36.2)	
Strong active	358	31.9 (11.9)	195 (20.1)	104 (17.8)	59 (17.5)	



Table 1. Continued

	All	25(OH)D3 categories, n (%)			P-value <sup>a</sup>	
		Mean (SD)	Optimal $\geq 30$ ng/mL n = 1038	Insufficiency 20–30 ng/mL n = 631		Deficiency <20 ng/mL n = 367
Vitamin D intake from diet during 1st trimester ( $\mu\text{g}$ ) (tertiles)						
0.10–2.04	673	30.8 (10.9)	358 (34.6)	204 (32.9)	111 (30.9)	0.053
2.04–3.20	667	30.8 (11.7)	329 (31.8)	228 (36.8)	110 (30.6)	
>3.20	673	30.8 (12.4)	347 (33.6)	188 (30.3)	138 (38.4)	
Vitamin D supplement use during 1st trimester						
No	1661	29.8 (11.7)	780 (75.2)	541 (86.0)	340 (93.1)	<0.001
Yes	370	35.1 (10.7)	257 (24.8)	88 (14.0)	25 (6.9)	
Large fatty fish intake during 1st trimester (Sv/wk)						
0 times/week	1006	30.3 (11.8)	491 (47.5)	320 (51.6)	195 (54.3)	0.066
0–1 times/week	855	31.6 (11.6)	464 (44.9)	259 (41.8)	132 (36.8)	
>1 times/week	152	30.3 (10.8)	79 (7.6)	41 (6.6)	32 (8.9)	
Small fatty fish (Sv/wk) during 1st trimester						
0 times/week	858	30.5 (11.6)	431 (41.7)	276 (44.5)	151 (42.1)	0.493
0–1 times/week	949	31.0 (11.8)	502 (48.6)	274 (44.2)	173 (48.2)	
>1 times/week	206	31.2 (11.6)	101 (9.8)	70 (11.3)	35 (9.7)	
Lean fish (Sv/week) during 1st trimester						
0–2 times/week	632	30.4 (11.2)	318 (30.8)	198 (31.9)	116 (32.3)	0.751
2–3 times/week	302	31.5 (11.7)	162 (15.7)	94 (15.2)	46 (12.8)	
>3 times/week	1079	30.9 (12.0)	554 (63.6)	328 (52.9)	197 (54.9)	

<sup>a</sup>P value determined by  $\chi^2$  test for categorical variables and analysis of variance for continuous variables with normal distribution.



**Figure 2.** Monthly mean and 95% CI values for 25(OH)D3 concentration among pregnant women in the INMA Project ( $n = 2036$ ).

previous small studies conducted in Spain among women of childbearing age and pregnant women. A study conducted in a socially deprived population of women of reproductive age with a high percentage of immigrants and urban factors including hardly any sunlight reported that 47.9% had insufficient vitamin D (10–20 ng/mL), and 37.2% were deficient (pound

10 mg/mL).<sup>14</sup> In addition, Pérez-López *et al.*<sup>15</sup> found that a 42.4% of pregnant women from a southern Spanish region had vitamin D insufficiency and 22.7% had vitamin D deficiency. In accordance, previous studies have revealed that vitamin D deficiency and insufficiency are highly prevalent among pregnant women of northern European countries. A national survey in Belgium that enrolled 1311 pregnant women found that 44.6% of them were vitamin D deficient and 12.1% were severely vitamin D deficient (<10 ng/dL).<sup>11</sup> In multiethnic population of 346 pregnant women living in London reported that 36% and 45% of women had vitamin D deficiency and insufficiency respectively.<sup>26</sup> In addition, the Danish National Birth Cohort has showed that 42.3% of the pregnant women had deficient circulating levels of vitamin D.<sup>12</sup> Our rates of vitamin D insufficiency and deficiency in pregnant women are slightly lower in comparison with those found at higher latitudes, but still high for a southern region of Europe.

Compared with summer months 25(OH)D3 levels were lower during winter months. We also found differences between the areas of study, with higher plasma 25(OH)D3 concentration and lower rate of

**Table 2.** Determinants of circulating 25(OH)D3 concentration (ng/mL) in pregnancy: results from multivariable linear regression (*n* = 1772)

	Coefficient	(95% CI)
Area of study		
Gipuzkoa (42°N latitude)	Reference	
Sabadell (41°N latitude)	-0.50	(-1.88, 0.87)
Valencia(39°N latitude)	0.88	(-0.76, 2.52)
Season at blood extraction		
Winter	Reference	
Spring	1.75	(0.28, 3.22)
Summer	9.46	(8.01, 10.9)
Fall	4.37	(2.89, 5.85)
Gestational age at blood sampling, change per week	-0.23	(-0.63, 0.17)
Country of origin (foreign)	-0.12	(-2.40, 2.15)
Ethnicity (non-white)	0.83	(-2.54, 4.20)
Age, change per year	0.19	(0.05, 0.33)
Parity		
0	Reference	
1	0.19	(-0.96, 1.35)
+2	1.61	(-0.54, 3.77)
Social class		
High I+II	Reference	
Medium III	-0.89	(-2.47, 0.69)
Low IV+V	-1.93	(-3.62, -0.25)
Education level		
Primary or less	Reference	
Secondary	-0.26	(-1.60, 1.09)
University	0.62	(-1.12, 2.37)
Pre-pregnancy BMI (kg/m <sup>2</sup> )		
18.5–24.99	Reference	
<18.5	0.06	(-2.44, 2.56)
≥25	-0.76	(-2.00, 0.49)
Gestational weight gain		
Recommended	Reference	
Less than recommended	0.39	(-0.94, 1.72)
More than recommended	0.33	(-0.91, 1.58)
Smoking during 1st trimester (yes)	-1.43	(-2.81, -0.05)
Alcohol consumption during first trimester (yes)	0.84	(-0.40, 2.07)
Physical activity during 1st trimester		
Inactive/low active	Reference	
Moderate active	0.85	(-0.30, 2.00)
Strong active	2.22	(0.78, 3.65)
Vitamin D intake from diet (mcg) (tertiles) during 1st trimester		
0.10–2.04	Reference	
2.04–3.20	-0.13	(-1.39, 1.13)
>3.20	-0.54	(-1.86, 0.77)
Vitamin D supplement use (yes)	4.81	(3.21, 6.41)
Large fatty fish (Sv/wk) during 1st trimester		
0 times/week	Reference	
0–1 times/week	-0.06	(-1.18, 1.05)
>1 times/week	-1.15	(-3.22, 0.91)

Table 2. *Continued*

	Coefficient	(95% CI)
Small fatty fish (Sv/wk) during 1st trimester		
0 times/week	Reference	
0–1 times/week	0.46	(-0.65, 1.56)
>1 times/week	0.83	(-1.01, 2.67)
Lean fish (Sv/week) during 1st trimester		
0–2 times/week	Reference	
2–3 times/week	1.34	(-0.26, 2.95)
>3 times/week	1.06	(-0.13, 2.26)

The multivariate model has a combined coefficient of determination of 0.16.

vitamin D deficiency among pregnant women of Valencia, the southern area of study. Results on the variations of 25(OH)D3 concentration with seasons and latitude of the study area reflect the changes in UVB exposure and highlight the importance of sun light exposure as main determinant of circulating 25(OH)D3 concentrations. The high prevalence of vitamin D deficiency and insufficiency in our study that was conducted in a southern region of Europe likely reflect consequences of adopting Western life styles that includes a shift from outdoor activities to more time spent indoor and the tendency to exhibit more and more sun-avoidance behaviours, with subsequent less solar UVB exposure and production of vitamin D.

It is well known that skin pigmentation can affect the synthesis of vitamin D, and ethnicity is reported as an important determinant of vitamin D levels.<sup>27,28</sup> We did not find differences regarding country of origin, although women of a non-white origin tended to have vitamin D deficiency without reaching statistical significance. In our study population only 9.4% of women proceed of foreign countries and 4% are non-white ethnicity, which may limit the statistical power to detect differences.

Younger age was associated with lower vitamin D levels in pregnancy and an increased risk of vitamin D insufficiency. To this regard, previous studies have reported lower levels of circulating vitamin D among women of childbearing age; however, other studies have failed to show this relation.<sup>12,29</sup> Nevertheless, in other studies, maternal age was also found to be positively associated with vitamin D intake and the use of supplements, suggesting that younger individuals may be less conscious about health matters.<sup>30</sup>

Although it has been reported an inversely association between parity and levels of vitamin D,<sup>12,31</sup> we

**Table 3.** Uni- and multivariable associations of examined determinants with vitamin D insufficiency (25OHD3 20–30 ng/mL) and deficiency (25OHD3 < 20 ng/mL) in pregnancy.

	Vitamin D insufficiency		Vitamin D deficiency	
	Univariable RRR (95% CI)	Multivariable RRR (95% CI)	Univariable RRR (95% CI)	Multivariable RRR (95% CI)
Area of study				
Gipuzkoa	1.00 (Reference)	1.00 (Reference)	1.00 (Reference)	1.00 (Reference)
Sabadell	0.76 (0.59, 0.98)	0.64 (0.47, 0.86)	1.19 (0.89, 1.60)	0.95 (0.66, 1.37)
Valencia	0.66 (0.52, 0.84)	0.71 (0.50, 1.02)	0.58 (0.43, 0.79)	0.60 (0.38, 0.94)
Season at blood extraction				
Winter	1.00 (Reference)	1.00 (Reference)	1.00 (Reference)	1.00 (Reference)
Spring	0.75 (0.56, 1.01)	0.84 (0.60, 1.16)	0.70 (0.51, 0.96)	0.83 (0.58, 1.19)
Summer	0.39 (0.29, 0.52)	0.34 (0.25, 0.48)	0.07 (0.05, 0.12)	0.07 (0.04, 0.12)
Fall	0.71 (0.53, 0.95)	0.61 (0.44, 0.84)	0.39 (0.28, 0.55)	0.32 (0.22, 0.48)
Gestational age at blood sampling (wks)	1.07 (0.99, 1.15)	1.05 (0.96, 1.15)	1.16 (1.07, 1.25)	1.10 (0.99, 1.21)
Country of origin (foreign)	1.05 (0.74, 1.49)	0.99 (0.66, 1.49)	1.45 (0.98, 2.12)	1.36 (0.84, 2.23)
Ethnicity (non-white)	0.97 (0.57, 1.64)		1.48 (0.85, 2.58)	
Age (years)	0.97 (0.95, 0.99)	0.96 (0.94, 0.99)	0.95 (0.92, 0.97)	0.96 (0.93, 1.00)
Parity				
0	1.00 (Reference)	1.00 (Reference)	1.00 (Reference)	1.00 (Reference)
1	0.96 (0.78, 1.18)	1.05 (0.96, 1.15)	0.75 (0.58, 0.97)	0.79 (0.57, 1.09)
+2	0.77 (0.52, 1.14)	0.89 (0.56, 1.43)	0.71 (0.44, 1.15)	0.60 (0.32, 1.12)
Social class				
High I+II	1.00 (Reference)	1.00 (Reference)	1.00 (Reference)	1.00 (Reference)
Medium III	1.03 (0.78, 1.37)	1.01 (0.72, 1.42)	1.38 (0.94, 2.01)	1.41 (0.89, 2.24)
Low IV+V	1.15 (0.89, 1.48)	1.06 (0.73, 1.52)	1.89 (1.35, 2.65)	1.94 (1.19, 3.16)
Education level				
Primary or less	1.00 (Reference)	1.00 (Reference)	1.00 (Reference)	1.00 (Reference)
Secondary	1.15 (0.89, 1.47)	1.31 (0.97, 1.76)	0.86 (0.64, 1.14)	1.03 (0.71, 1.48)
University	0.92 (0.71, 1.19)	0.91 (0.62, 1.33)	0.70 (0.51, 0.95)	1.03 (0.64, 1.67)
Prepregnancy BMI (kg/m <sup>2</sup> )				
18.5–24.99	1.00 (Reference)	1.00 (Reference)	1.00 (Reference)	1.00 (Reference)
<18.5	1.43 (0.91, 2.26)	1.36 (0.80, 2.33)	1.26 (0.72, 2.23)	0.88 (0.44, 1.77)
25–29.99	1.30 (1.00, 1.69)	1.20 (0.88, 1.63)	1.32 (0.97, 1.81)	1.27 (0.86, 1.88)
≥30	0.92 (0.62, 1.35)	0.92 (0.60, 1.42)	1.22 (0.79, 1.86)	1.20 (0.71, 2.03)
Gestational weight gain				
Recommended	1.00 (Reference)	1.00 (Reference)	1.00 (Reference)	1.00 (Reference)
Less than recommended	0.88 (0.67, 1.16)	0.86 (0.64, 1.16)	1.16 (0.84, 1.60)	1.13 (0.78, 1.63)
More than recommended	0.92 (0.73, 1.17)	0.90 (0.69, 1.18)	1.02 (0.76, 1.36)	0.93 (0.66, 1.32)
Smoking during 1st trimester (yes)	1.07 (0.82, 1.40)	1.07 (0.79, 1.45)	1.70 (1.26, 2.28)	1.76 (1.23, 2.54)
Alcohol consumption during 1st trimester (yes)	0.74 (0.58, 0.95)	0.76 (0.58, 1.00)	0.90 (0.67, 1.20)	0.85 (0.60, 1.19)
Physical activity during 1st trimester				
Inactive/low active	1.00 (Reference)	1.00 (Reference)	1.00 (Reference)	1.00 (Reference)
Moderate active	0.93 (0.74, 1.16)	0.88 (0.68, 1.13)	0.81 (0.62, 1.07)	0.78 (0.57, 1.07)
Strong active	0.83 (0.62, 1.10)	0.80 (0.58, 1.09)	0.77 (0.54, 1.08)	0.67 (0.46, 1.03)
Vitamin D intake from diet (mcg) (tertiles) during 1st trimester				
0.10–2.04	1.00 (Reference)	1.00 (Reference)	1.00 (Reference)	1.00 (Reference)
2.04–3.20	1.22 (0.96, 1.55)	1.20 (0.91, 1.57)	1.08 (0.77, 1.46)	1.17 (0.82, 1.68)
>3.20	0.95 (0.74, 1.22)	0.97 (0.72, 1.29)	1.28 (0.95, 1.71)	1.30 (0.91, 1.86)
Vitamin D supplement use (yes) during 1st trimester	0.49 (0.38, 0.64)	0.50 (0.35, 0.71)	0.22 (0.14, 0.34)	0.24 (0.14, 0.41)

Table 3. Continued

	Vitamin D insufficiency		Vitamin D deficiency	
	Univariable RRR (95% CI)	Multivariable RRR (95% CI)	Univariable RRR (95% CI)	Multivariable RRR (95% CI)
Large fatty fish (Sv/wk) during 1st trimester				
0 times/week	1.00 (Reference)	1.00 (Reference)	1.00 (Reference)	1.00 (Reference)
0–1 times/week	0.86 (0.70, 1.05)	0.88 (0.69, 1.12)	0.72 (0.56, 0.92)	0.95 (0.69, 1.30)
>1 times/week	0.80 (0.53, 1.19)	0.81 (0.51, 1.30)	1.02 (0.65, 1.59)	1.41 (0.82, 2.44)
Small fatty fish (Sv/wk) during 1st trimester				
0 times/week	1.00 (Reference)	1.00 (Reference)	1.00 (Reference)	1.00 (Reference)
0–1 times/week	0.85 (0.69, 1.05)	0.89 (0.70, 1.13)	0.98 (0.76, 1.27)	1.03 (0.75, 1.40)
>1 times/week	1.08 (0.77, 1.52)	1.25 (0.85, 1.86)	0.99 (0.64, 1.51)	0.93 (0.55, 1.58)
Lean fish (Sv/week) during 1st trimester				
0–2 times/week	1.00 (Reference)	1.00 (Reference)	1.00 (Reference)	1.00 (Reference)
2–3 times/week	0.93 (0.68, 1.27)	0.86 (0.61, 1.22)	0.78 (0.53, 1.15)	0.74 (0.47, 1.17)
>3 times/week	0.95 (0.76, 1.19)	0.86 (0.66, 1.12)	0.97 (0.74, 1.27)	0.81 (0.58, 1.13)

only found a statistical association with risk of vitamin D deficiency in univariable analysis, but not after adjustment.

We found that pregnant women with lower social class showed lower circulating 25(OH)D3 concentration and had an increased risk of vitamin D insufficient and deficiency. Furthermore, it has been found that lower 25(OH)D3 levels were more common in pregnant women with a low educational level,<sup>32,33</sup> which is usually associated with low socio-economic status. To this regard we found social class but not educational level to be associated with vitamin D status in pregnancy. Lower social position may make some groups more susceptible to have lower levels of vitamin D because of factors related to their disadvantage.

Important life-style factors investigated in relation to vitamin D status include tobacco smoking, alcohol consumption, diet intake, use of vitamin supplements, and physical activity. We found tobacco smoking in pregnancy to be associated with lower circulating 25(OH)D3 concentration and increased risk of vitamin D deficiency. That association has been reported in other recent studies,<sup>11,33</sup> but the mechanism for this remains unclear. However, it has been suggested that low 25(OH)D3 concentration was the consequence of an increased calcium release from reabsorbed bone in smokers or a lower dietary vitamin D intake.<sup>34,35</sup> In contrast with our data, it has been described an association between alcohol consumption and low levels of vitamin D.<sup>32</sup> Although fish consumption can be a

major dietary source of vitamin D,<sup>1</sup> in the present study we did not find evidence of an association with vitamin D status of pregnant women. Moreover, in our study the strong physical activity during pregnancy was correlated with higher 25(OH)D3 concentration. To this regard, Jensen *et al.* reported similar findings, but only outdoor physical activity predicted 25(OH) status, suggesting that the pathway by which physical activity leads to increased skin synthesis of vitamin D is most likely through time spent outdoors and subsequent solar UVB exposure and dermal synthesis of vitamin D.<sup>30</sup> Although only 18.2% of women reported the use of vitamin D supplements during pregnancy, we found a strong association with circulating 25(OH)D3 concentration and risk of vitamin D deficiency and insufficiency, which is in accordance with previous studies.<sup>11,12,29</sup> In Spain, the use of vitamin D supplements in pregnancy is due in form of multivitamins with some of them containing vitamin D. Although there is no consensus about recommendation and adequate amount of vitamin D supplementation in pregnant women, given the magnitude of vitamin D insufficiency and deficiency found in the present study the use of specific vitamin D supplements seems to be recommendable in Spain in order to improve vitamin D status of pregnant women.<sup>36</sup>

We did not find evidence of an association between levels of vitamin D or risk of vitamin D deficiency and gestational weight gain or BMI, even these factors have been previously described like potential determinants of 25(OH)D3 concentration.<sup>11,17,24</sup> This could

have been due to self-reported prepregnancy weight, lack of statistical power, and because gestational weight gain and prepregnancy BMI may reflect another points in time compared with the blood sample.

The main strengths of this study include the use of a large population-based birth cohort set up in three different geographical areas in Spain and the prospective design. We examined the association with plasma measurements of 25(OH)D3 concentration, the best measure of vitamin D status in humans. Additionally, in multivariate models we evaluated a large number of potential determinants of vitamin D status in pregnant women. However, the study has some limitations. One important limitation is that it only has a single 25(OH)D3 measurement per subject which could not reflect maternal long-term status during the entire pregnancy. We did not measure circulating 25(OH)D2 concentrations, but, normally majority (90%) of the 25(OH)D is in D3 form. In addition, we could not obtain vitamin D data from all eligible participants, who made selection bias possible; however, there were no significant differences between included participants and those initially recruited with respect to main characteristics. Finally, the dietary reports are likely to be influenced by reporting bias.

## Conclusion

Our results add to the few reporting vitamin D status in pregnant women in Spain, highlighting a high prevalence of vitamin D insufficiency (31%) and deficiency (18%) in a country of high levels of sunshine. Vitamin D status in our population was related to season at blood sampling, latitude, age, tobacco smoking, use of vitamin D supplements, and physical activity during pregnancy. We suggest therefore, lifestyle recommendations to improve vitamin D status in pregnancy that may include regular mild sunshine exposure, outdoor physical activity, quitting smoking habits, reducing the prevalence of obesity in childbearing age women, and promoting a vitamin D-rich diet and probably the use of vitamin D supplementation. Both health professionals and the public need educating with regard to this phenomenon and to the benefits of vitamin D. Specific recommendations and policies should be developed in Spain to detect and prevent hypovitaminosis D during pregnancy and its adverse outcomes in

maternal and neonatal health taken into account the associated factors.

## Acknowledgements

The authors would particularly like to thank all the participants for their generous collaboration. A full roster of the INMA Project Investigators can be found at [http://www.proyectoinma.org/presentacion-inma/listado-investigadores/en\\_listado-investigadores.html](http://www.proyectoinma.org/presentacion-inma/listado-investigadores/en_listado-investigadores.html). This study was funded by grants from Instituto de Salud Carlos III and Spanish Ministry of Health (Red INMA G03/176; CB06/02/0041; FIS 97/0588; 00/0021-2, PI061756; PS0901958; FIS-FEDER 03/1615, 04/1509, 04/1112, 04/1931, 05/1079, 05/1052, 06/1213, 07/0314 and 09/02647; FIS-PI041436, FIS-PI081151, FIS-PI06/0867 and FIS-PS09/00090), Conselleria de Sanitat Generalitat Valenciana, Generalitat de Catalunya-CIRIT 1999SGR 00241, Fundación Roger Torné, Basque Government (110093/005), the Provincial Government of Gipuzkoa (DFG05/004 and DFG06/004), and Councils of Azpeita, Azkoita, Beasain, Zumarraga, Legazpia and Urretxu (Spain). EM is supported by a Miguel Servet Research Grant (CP14/00046) from Instituto de Salud Carlos III, Madrid (Spain).

**Conflict of interest:** The authors report no conflict of interest.

## Authors contribution

AR, LSM, FB, JS, EM designed the study. LSM, AMJ, AE, ME, FB, JS collected the data. ME conducted laboratory procedures. EM analysed the data. AR and EM drafted the manuscript. All authors reviewed the manuscript and approved the manuscript for submission.

## References

- 1 Holick MF, Vitamin D. Deficiency. *New England Journal of Medicine* 2007; 357:266–281.
- 2 Whang Y, Zhu J, DeLuca HF. Where is the vitamin D receptor? *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2012; 523:123–133.
- 3 Holick MF. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. *American Journal of Clinical Nutrition* 2004; 80:1678–1688.
- 4 Thorne-Lyman A, Fawzi WW. Vitamin D during pregnancy and maternal, neonatal and infant health outcomes: a



- systematic review and meta-analysis. *Paediatric and Perinatal Epidemiology* 2012; 26:75–90.
- 5 Aghajafari F, Nagulesapillai T, Ronksley PE, Tough SC, O'Beirne M, Rabi DM. Association between maternal serum 25-hydroxyvitamin D level and pregnancy and neonatal outcomes: systematic review and meta-analysis of observational studies. *British Medical Journal* 2013; 13:346: f1169.
  - 6 Morales E, Guxens M, Llop S, Rodríguez-Bernal CL, Tardón A, Riano I, *et al.* Circulating 25-hydroxyvitamin D3 in pregnancy and infant neuropsychological development. *Pediatrics* 2012; 130:e913–e920.
  - 7 Morales E, Romieu I, Guerra S, Ballester F, Rebagliato M, Vioque J, *et al.* Maternal vitamin D status in pregnancy and risk of lower respiratory tract infections, wheezing, and asthma in offspring. *Epidemiology* 2012; 23:64–71.
  - 8 Bodnar LM, Simhan HN, Powers RW, Frank MP, Cooperstein E, Roberts JM. High prevalence of vitamin D insufficiency in black and white pregnant women residing in the northern United States and their neonates. *Journal of Nutrition* 2007; 137:447–452.
  - 9 van der Meer IM, Karamali NS, Boeke AJ, Lips P, Middelkoop BJ, Verhoeven I, *et al.* High prevalence of vitamin D deficiency in pregnant non-Western women in The Hague, Netherlands. *American Journal of Clinical Nutrition* 2006; 84:350–353.
  - 10 Milman N, Hvas AM, Bergholt T. Vitamin D status during normal pregnancy and postpartum. A longitudinal study in 141 Danish women. *Journal of Perinatal Medicine* 2011; 40:57–61.
  - 11 Vandevijvere S, Amsalkhir S, Van Oyen H, Moreno-Reyes R. High prevalence of vitamin D deficiency in pregnant women: a national cross-sectional survey. *PLoS ONE* 2012; 7: e43868.
  - 12 Bjørn Jensen C, Thorne-Lyman AL, Vadgård Hansen L, Strøm M, Odgaard Nielsen N, Cohen A, *et al.* Development and validation of a vitamin D status prediction model in Danish pregnant women: a study of the Danish National Birth Cohort. *PLoS ONE* 2013; 8:e53059.
  - 13 Karras SN, Angnostis P, Annweiler C, Naughton DP, Pretoczi A, Bili E, *et al.* Maternal vitamin D status during pregnancy: the Mediterranean reality. *European Journal of Clinical Nutrition* 2014; 68:864–869.
  - 14 González Solanellas M, Romagosa Pérez-Portabella A, Zabaleta del Olmo E, Gudiña Escudero N, Pozo Díaz C, Moreno Feliu R, *et al.* [Vitamin D deficiency in women of reproductive age]. *Atención Primaria* 2008; 40:393–399.
  - 15 Pérez-López FR, Fernández-Alonso AM, Ferrando-Marco P, González-Salmeron MD, Dionis-Sánchez EC, Fijol-Ruiz G, *et al.* First-trimester serum 25-hydroxyvitamin D status and factors related to lower levels in gravid living in the Spanish Mediterranean coast. *Reproductive Sciences* 2011; 18:730–736.
  - 16 Wang TJ, Zhang F, Richards JB, Kestenbaum B, van Meurs JB, Berry D, *et al.* Common genetic determinants of vitamin D insufficiency: a genome-wide association study. *Lancet* 2010; 376:180–188.
  - 17 Andersen L, Abrahamsen B, Dalgård C, Kyhl H, Beck-Nielsen S, Frost-Nielsen M, *et al.* Parity and tanned white skin as novel predictors of vitamin D status in early pregnancy: a population-based cohort study. *Clinical Endocrinology (Oxford)* 2013; 79:333–341.
  - 18 Guxens M, Ballester F, Espada M, Fernández MF, Grimalt JO, Ibarluzea J, *et al.* Cohort Profile: the INMA–Infancia y Medio Ambiente–(Environment and Childhood) Project. *International Journal of Epidemiology* 2012; 41:930–940.
  - 19 *Instruction manual BIO-RAD. 25(OH)-vitamin D3 by HPLC.* Munchen, Germany: Laboratories GmbH, 2003.
  - 20 Institute of Medicine (US) and National Research Council (US) Committee to Reexamine IOM Pregnancy Weight Guidelines; Rasmussen KM, Yaktine AL, editors. *Weight Gain during Pregnancy: reexamining the Guidelines.* Washington, DC: National Academies Press, 2009.
  - 21 Vioque J, Navarrete-Muñoz EM, Gimenez-Monzó D, García-de-la-Hera M, Granado F, Young IS, *et al.* Reproducibility and validity of a food frequency questionnaire among pregnant women in a Mediterranean area. *Nutrition Journal* 2013; 12:26.
  - 22 U.S. Department of Agriculture. Agricultural Research Service. (USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 25). [http://www.ars.usda.gov/Main/site\\_main.htm?modecode=12-35-45-00](http://www.ars.usda.gov/Main/site_main.htm?modecode=12-35-45-00) [last accessed February 2013].
  - 23 Palma I, Farran P, Cervera P. *Tablas de composición de Alimentos por medidas caseras de consumo habitual en España.* Mc Graw Hill Interamericana, CESNID: Madrid, 2008.
  - 24 Holick MF. Vitamin D status: measurement, interpretation, and clinical application. *Annals of Epidemiology* 2009; 19:73–78.
  - 25 Nassar N, Halligan GH, Roberts CL, Morris JM, Ashton AW. Systematic review of first-trimester vitamin D normative levels and outcomes of pregnancy. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 2011; 205:208. e1–7
  - 26 McAree T, Jacobs B, Manickavasagar T, Sivalokanathan S, Brennan L, Bassett P, *et al.* Vitamin D deficiency in pregnancy - still a public health issue. *Maternal and Child Nutrition* 2013; 9:23–30.
  - 27 Webb AR. Who, what, where and when – influences on cutaneous vitamin D synthesis. *Progress in Biophysics & Molecular Biology* 2006; 92:17–25.
  - 28 Holmes V, Barnes MS, Alexander HD, McFaul P, Wallace JMW. Vitamin D deficiency and insufficiency in pregnant women: a longitudinal study. *British Journal of Nutrition* 2009; 102:876–881.
  - 29 Zhao G, Ford ES, Tsai J, Li C, Croft JB. Factors Associated with Vitamin D Deficiency and Inadequacy among Women of Childbearing Age in the United States. *ISRN Obstetrics and Gynecology* 2012; 2012:691486.
  - 30 Jensen CB, Petersen SB, Granström C, Maslova E, Mølgaard C, Olsen SF. Sources and determinants of vitamin D intake in Danish pregnant women. *Nutrients* 2012; 4:259–272.
  - 31 Morabia A, Berstein MS, Antonini S. Smoking, dietary calcium and vitamin D deficiency in women: a population-based study. *European Journal of Clinical Nutrition* 2000; 54:684–689.
  - 32 Johnson DD, Wagner CL, Hlsey TC, McNeil RB, Ebeling M, Hollis BW. Vitamin D deficiency and insufficiency is common during pregnancy. *American Journal of Perinatology* 2011; 28:7–12.

- 33 van den Berg G, van Eijsden M, Vrijkotte TG, Gemke RJ. Suboptimal maternal vitamin D status and low education level as determinants of small-for-gestational-age birth weight. *European Journal of Nutrition* 2013; 52:273–279.
- 34 Brot C, Jørgensen NR, Sørensen OH. The influence of smoking on vitamin D status and calcium metabolism. *European Journal of Clinical Nutrition* 1999; 53:920–926.
- 35 Hollis BW, Wagner CL. Assessment of dietary vitamin D requirements during pregnancy and lactation. *American Journal of Clinical Nutrition* 2004; 79: 717–726.
- 36 De-Regil LM, Palacios C, Ansary A, Kulier R, Peña-Rosas JP. Vitamin D supplementation during pregnancy. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2012; 2:CD008873.

## **8. SEGON ARTICLE:**

*Associations of maternal circulating 25-hydroxyvitamin D3 concentration  
with pregnancy and birth outcomes*





# Associations of maternal circulating 25-hydroxyvitamin D3 concentration with pregnancy and birth outcomes

A Rodríguez,<sup>a,b</sup> R García-Esteban,<sup>c,d,e,f</sup> M Basterretxea,<sup>e,g,h</sup> A Lertxundi,<sup>h,i</sup> C Rodríguez-Bernal,<sup>e,j</sup> C Iñiguez,<sup>e,j,k</sup> C Rodríguez-Dehli,<sup>l</sup> A Tardón,<sup>e,m</sup> M Espada,<sup>n</sup> J Sunyer,<sup>c,d,e,f</sup> E Morales<sup>c,d,e,f</sup>

<sup>a</sup> Hospital de Sabadell, Corporació Sanitària Parc Taulí, Institut Universitari ParcTaulí-UAB, Sabadell, Catalonia, Spain <sup>b</sup> Universitat Autònoma de Barcelona, Campus d'Excel·lència Internacional Bellaterra, Catalonia, Spain <sup>c</sup> Centre for Research in Environmental Epidemiology (CREAL), Barcelona, Catalonia, Spain <sup>d</sup> Hospital del Mar Medical Research Institute (IMIM), Barcelona, Catalonia, Spain <sup>e</sup> CIBER Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Madrid, Spain <sup>f</sup> Universitat Pompeu Fabra (UPF), Barcelona, Catalonia, Spain <sup>g</sup> Department of Health of the Basque Government, Subdirecció de Salut Pública de Gipuzkoa, San Sebastian, Spain <sup>h</sup> BIODONOSTIA Health Research Institute, San Sebastian, Spain <sup>i</sup> Universidad del País Vasco, EHU-UPV, País Vasco, Spain <sup>j</sup> Center for Public Health Research (CSISP-FISABIO), Valencia, Spain <sup>k</sup> University of Valencia, Valencia, Spain <sup>l</sup> Hospital San Agustín, Avilés, Spain <sup>m</sup> Universidad de Oviedo, Oviedo, Spain <sup>n</sup> Clinical Chemistry Unit, Public Health Laboratory of Bilbao, Euskadi, Spain  
*Correspondence:* E Morales, MD, PhD, MPH, Centre for Research in Environmental Epidemiology (CREAL), Barcelona Biomedical Research Park, Dr. Aiguader, 88, 08003 Barcelona, Spain. Email emorales1@creal.cat

Accepted 18 July 2014. Published Online 11 September 2014.

**Objective** To investigate the association of maternal circulating 25-hydroxyvitamin D3 [25(OH)D3] concentration with pregnancy and birth outcomes.

**Design** Prospective cohort study.

**Setting** Four geographical areas of Spain, 2003–2008.

**Population** Of 2382 mother–child pairs participating in the INfancia y Medio Ambiente (INMA) Project.

**Methods** Maternal circulating 25(OH)D3 concentration was measured in pregnancy (mean [SD] 13.5 [2.2] weeks of gestation). We tested associations of maternal 25(OH)D3 concentration with pregnancy and birth outcomes.

**Main outcome measures** Gestational diabetes mellitus (GDM), preterm delivery, caesarean section, fetal growth restriction (FGR) and small-for-gestational age (SGA), anthropometric birth outcomes including weight, length and head circumference (HC).

**Results** Overall, 31.8% and 19.7% of women had vitamin D insufficiency [25(OH)D3 20–29.99 ng/ml] and deficiency [25(OH)

D3 < 20 ng/ml], respectively. After adjustment, there was no association between maternal 25(OH)D3 concentration and risk of GDM or preterm delivery. Women with sufficient vitamin D [25(OH)D3 ≥ 30 ng/ml] had a decreased risk of caesarean section by obstructed labour compared with women with vitamin D deficiency [relative risk (RR) = 0.60, 95% CI 0.37, 0.97]. Offspring of mothers with higher circulating 25(OH)D3 concentration tended to have smaller HC [coefficient (SE) per doubling concentration of 25(OH)D3, −0.10 (0.05), *P* = 0.038]. No significant associations were found for other birth outcomes.

**Conclusion** This study did not find any evidence of an association between vitamin D status in pregnancy and GDM, preterm delivery, FGR, SGA and anthropometric birth outcomes. Results suggest that sufficient circulating vitamin D concentration [25(OH)D3 ≥ 30 ng/ml] in pregnancy may reduce the risk of caesarean section by obstructed labour.

**Keywords** Birthweight, caesarean section, gestational diabetes, pregnancy, preterm delivery, vitamin D.

*Please cite this paper as:* Rodríguez A, García-Esteban R, Basterretxea M, Lertxundi A, Rodríguez-Bernal C, Iñiguez C, Rodríguez-Dehli C, Tardón A, Espada M, Sunyer J, Morales E. Associations of maternal circulating 25-hydroxyvitamin D3 concentration with pregnancy and birth outcomes. BJOG 2014; DOI: 10.1111/1471-0528.13074.

## Introduction

Deficiency of vitamin D in pregnancy is becoming a public health concern because of its potential effects on the

maternal obstetric outcomes and offspring development. There is therefore an increasing interest in studying the impact of maternal vitamin D status on diverse pregnancy and birth outcomes.<sup>1–3</sup>

Poor vitamin D status during pregnancy has been associated with increased risk of adverse obstetric outcomes including insulin resistance<sup>4</sup>, gestational diabetes mellitus,<sup>5–10</sup> preeclampsia,<sup>11–13</sup> bacterial vaginosis,<sup>14,15</sup> preterm delivery,<sup>16</sup> and caesarean section.<sup>17,18</sup> Moreover, deficient vitamin D status during pregnancy may have adverse consequences for fetal development and growth. Adverse newborn outcomes related with low levels of maternal vitamin D in pregnancy include increase risk of preterm birth and fetal growth restriction resulting in low birthweight and small-for-gestational-age neonates.<sup>19,20</sup>

We aim to assess the association of maternal circulating 25-hydroxyvitamin D3 [25(OH)D3] concentration – the best measure of vitamin D status in humans<sup>21</sup> – with pregnancy outcomes (gestational diabetes mellitus, premature delivery and caesarean section) and birth outcomes (small for gestational age, fetal growth restriction, birthweight, birth length, and head circumference at birth) in a population-based birth cohort study.

## Methods

We used data from the INMA – Infancia y Medio Ambiente (Environment and Childhood) Project, a prospective population-based birth cohort study conducted in several geographical areas of Spain ([www.proyectoinma.org](http://www.proyectoinma.org)).<sup>22</sup> During the first prenatal visit (10–13 weeks of gestation) 2644 women were recruited during 2003–2008 in the main public hospital or health centre in four areas: Valencia (39°N latitude,  $n = 855$ ), Sabadell (41°N latitude,  $n = 657$ ), Asturias (43°N latitude,  $n = 494$ ) and Gipuzkoa (42°N latitude,  $n = 638$ ). Inclusion criteria were:  $\geq 16$  years of age, intention to deliver at the reference hospital, no communication problems, singleton pregnancy, and no assisted conception. Circulating 25(OH)D3 concentrations in pregnancy were determined in 2510 women, and 2401 (91% of initially recruited) were followed until the child's birth. In all, 2358 mother–child pairs (89% of initially recruited) with complete data on circulating 25(OH)D3 concentration in pregnancy, outcomes and confounders were included in the present study. The Ethical Committees of the centres involved in the project approved the study and written informed consent was obtained from the parents of all children.

A single maternal fasting blood specimen was taken in pregnancy (mean [SD] 13.5 [2.2] weeks of gestation). Samples were processed immediately and stored from  $-70$  to  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis. Quantification of maternal plasmatic levels of 25-hydroxyvitamin D3 was performed by HPLC using a BioRad kit according to 'Clinical and Laboratory Standard Institute' (National Committee for Clinical Laboratory Standards, NCCLS) protocols.<sup>23</sup> Detection limit was 5 ng/ml and inter-assay coefficient of variation was 4.5%.

The assay was validated by 'German Programmes of External Evaluation of Quality' (DGKL-RFB-Referenzinstitut für Bionalytik), and results were satisfactory in 100% of the cases.

Information about diagnosis of gestational diabetes mellitus (GDM) onset in pregnant women was obtained from medical records. According to the Spanish Society of Obstetrics and Gynaecology recommendations, pregnant women were screened at 24–28 weeks of gestation using a 50-g, 1-h oral glucose test. The women who failed this screening test (glucose  $\geq 7.8$  mmol/l) were tested within 1–2 weeks with a 100-g, 3-h oral glucose tolerance test (OGTT). Women were diagnosed with GDM if two or more of the OGTT glucose levels exceeded the National Diabetes Data Group criteria: fasting  $>5.8$  mmol/l, 1-hour  $>10.6$  mmol/l, 2-hour  $>9.2$  mmol/l, 3-hour  $>8.1$  mmol/l.<sup>24</sup> The mode of delivery was classified as vaginal, elective caesarean section, emergency caesarean section, and non-elective non-emergency caesarean section according to information obtained from clinical records. Elective caesarean section included all cases in which delivery was undertaken before the onset of labour (i.e. previous caesarean section, malpresentation or maternal indications). Emergency caesarean section was performed after the onset of labour when fetal distress existed. Non-elective non-emergency caesarean section included all cases of failure to progress in labour, failed induction or cephalopelvic disproportion.

An early ultrasound of the crown–rump length was also available and was used for gestational dating when the difference with the last menstrual period was  $\geq 7$  days (12% of newborns). Deliveries before 37 weeks of gestation were defined as preterm births.<sup>25</sup>

The offspring anthropometric outcomes at birth were weight in grams and birth length and head circumference (HC), both in centimetres. Birthweight was measured by the midwife attending the birth, whereas birth length and HC were measured by a nurse when the newborn arrived at the hospital ward within the first 12 hour of life. Birthweights at  $<10$ th percentile for gestational age and sex according to national growth curves<sup>26</sup> were defined as small-for-gestational age (SGA). Fetal growth restriction (FGR) was defined as birthweight at  $<5$ th percentile of the expected weight based on constitutional growth potential based on the expected birthweight taking into account gestational age, sex, birth rank, maternal age, and height and pre-gravid weight.<sup>27</sup> Birthweight was categorised into clinically relevant categories:  $<2500$  g, 2500–4000 g and  $>4000$  g.

Based on previous knowledge, the following were considered *a priori* potential confounder factors because of their possible associations with maternal circulating 25(OH)D3 concentration and assessed outcomes: child's sex, gestational age, month at blood sampling, parity, maternal

age, ethnic background, maternal social class and education level, maternal pre-pregnancy body mass index, maternal smoking and alcohol consumption during pregnancy, and maternal energy intake during pregnancy. Questionnaires during the first trimester of pregnancy were used to obtain information about parity (0 versus 1 or more), maternal age, parental ethnic (White versus other), maternal social class (I–II Managers/technicians, III Skilled, IV–V Semi-skilled/unskilled), maternal education level (primary or less, secondary, university degree), and maternal pre-pregnancy body mass index ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ) (underweight [ $<18.5 \text{ kg}/\text{m}^2$ ], normal weight [ $18.5\text{--}24.99 \text{ kg}/\text{m}^2$ ], overweight [ $25\text{--}29.99 \text{ kg}/\text{m}^2$ ], obese [ $\geq 30 \text{ kg}/\text{m}^2$ ]). Information on maternal smoking (no versus yes), alcohol (no versus yes, defined as consumption of alcohol beverages at least 1 time/month), and caloric consumption during pregnancy was collected using two questionnaires (at first and third trimester). Month and season at blood collection (winter, December–February; spring, March–May; summer, June–August; and fall, September–November) and area of study were also considered.

Differences in baseline characteristics of participants across quartiles of maternal vitamin D levels were compared using chi-square tests for categorical variables and analysis of variance for continuous variables. The distribution of mean 25(OH)D3 levels was plotted by calendar month. To account for systematic temporal variation in 25(OH)D3 and on the basis of observed data and published reports that 25(OH)D3 levels follow a sinusoidal pattern, we fitted a cosinor model to the data.<sup>28</sup> In the cosinor model, the dependent variable [25(OH)D3] was modelled as a sine wave characterized by phase shift (location of peak and trough levels on the time axis), height (vertical shift of the sine wave), and amplitude (maximum variation of the sine wave from its mean height).<sup>29</sup> The predicted annual mean of 25(OH)D3 concentrations based on month at blood collection for each subject, derived from the sinusoidal model, was then subtracted from the actual observed value. Subsequently, the overall mean was added and the resulting deseasonalised 25(OH)D3 concentrations were analysed.<sup>30</sup> The circulating concentration of 25(OH)D3 in pregnant women was evaluated as continuous (effect as per a doubling of the concentration in ng/ml) and as clinically relevant categories:  $<20 \text{ ng}/\text{ml}$  (deficiency, reference group),  $20\text{--}29.99 \text{ ng}/\text{ml}$  (insufficiency), and  $>30 \text{ ng}/\text{ml}$  (sufficient).<sup>31,32</sup>

The linear dose response relationship of maternal 25(OH)D3 concentrations with pregnancy and birth outcomes was assessed by adjusted generalised additive models using graphical examination and likelihood ratio test.<sup>33</sup> Multivariable linear regression analysis was performed between maternal circulating 25(OH)D3 concentration and continuous birth outcomes (i.e. weight, height and head

circumference) and associations were measured with the regression coefficients and their corresponding 95% confidence intervals (CI). Log-binomial and multinomial regression models were fitted to estimate the adjusted association between maternal circulating 25(OH)D3 with binary outcomes and type of delivery, respectively. The measure of association was the relative risk (RR) and its corresponding 95% confidence interval. Confounder variables were included in the final regression model if their association with both the outcome and the exposure [maternal 25(OH)D3 concentration in pregnancy] had a *P*-value of  $<0.2$ , and only retained if they modified the coefficient of maternal 25(OH)D3 by  $\geq 10\%$ . Analyses were conducted using STATA software, version 12.0 (StataCorp, College Station, TX, USA). Statistical tests of hypotheses were two-tailed with significance set at  $P < 0.05$ .

## Results

Most of the women (96%) were of Spanish origin and mean (SD) age at child birth was 32.0 (4.2) years. Twenty-five percent of mothers had a low educational level (primary or less), and 21.2% were from the high social class. Twenty-seven percent of women were overweight/obese before pregnancy. Overall, 31.8% of women reported tobacco smoking and 20% alcohol consumption during pregnancy. Offspring were 51.6% male and 56% firstborn. The median circulating 25(OH)D3 concentration in pregnancy was 29.4 ng/ml (interquartile range, 21.8–37.2). A total of 31.8 and 19.7% of women had insufficient [25(OH)D3 20–29.99 ng/ml] or deficient [25(OH)D3  $<20 \text{ ng}/\text{ml}$ ] vitamin D concentrations, respectively. The characteristics of participants according to quartiles of circulating 25(OH)D3 levels during pregnancy are shown in Table 1. The concentration of circulating 25(OH)D3 in pregnancy differed between the areas of study, with the Valencia area showing the highest levels and Asturias the lowest levels. Increasing trends across the quartiles of 25(OH)D3 were observed for parity and maternal age, and decreasing trends were found for lower parental social class and lower education level, as well as among smokers and overweight mothers.

A total of 93 (5%) women were diagnosed with GDM onset in pregnancy. Mean maternal circulating 25(OH)D3 concentration in pregnancy did not differ between women with GDM diagnosis (geometric mean [95% CI]: 28.42 [26.31, 30.70] ng/ml) and controls (28.41 [27.93, 28.89]) (*P*-value = 0.990). After adjustment, a sufficient 25(OH)D3 concentration in pregnancy was not associated with a risk of GDM onset in pregnancy (RR = 0.92; 95% CI: 0.55, 1.55) (Table 2).

There were 108 (4.6%) preterm births. The mean circulating 25(OH)D3 in pregnancy did not differ between

**Table 1.** Characteristics of participants according to quartiles of maternal circulating 25(OH)D3 concentration in pregnancy

	Quartiles of 25(OH)D3				P-value
	≤21.8 (n = 596)	21.8–29.4 (n = 601)	29.4–37.2 (n = 591)	>37.2 (n = 594)	
<b>Area of study</b>					
Valencia (39°N latitude) (n = 741)	22.0	29.5	36.0	37.0	<b>&lt;0.001</b>
Sabadell (41°N latitude) (n = 604)	28.2	22.0	26.7	24.6	
Asturias (43°N latitude) (n = 453)	25.7	21.1	13.9	15.3	
Gipuzkoa (42°N latitude) (n = 584)	24.2	27.5	23.4	23.1	
<b>Season at blood extraction</b>					
Winter	36.2	24.5	18.6	15.5	<b>&lt;0.001</b>
Spring	34.2	26.1	20.6	21.0	
Summer	8.4	21.6	31.3	42.4	
Fall	21.1	27.8	29.4	21.0	
<b>Child sex (male)</b>	53.9	51.5	51.1	49.8	0.568
<b>Parity (1 or more versus 0)</b>	40.2	43.8	46.1	46.0	0.136
<b>Maternal social class</b>					
III Managers/technicians	16.1	21.3	21.5	26.0	<b>&lt;0.001</b>
III Skilled manual/non-manual	24.0	25.0	28.1	28.0	
IV/V Semi-skilled/unskilled	59.9	53.7	50.4	46.0	
<b>Mother ethnic group (white versus other)</b>	95.0	96.5	97.1	96.1	0.257
<b>Maternal education level</b>					
Primary or less	27.6	22.5	24.9	23.4	<b>0.027</b>
Secondary	42.5	44.7	40.2	37.9	
University degree	29.9	32.8	34.9	38.6	
<b>Maternal age at child's birth (years)</b>	31.7 (4.5)	31.7 (4.3)	32.1 (4.0)	32.5 (4.1)	<b>0.001</b>
<b>Smoking during pregnancy (yes versus no)</b>	35.3	30.2	29.0	32.7	0.102
<b>Smoking at 12 weeks (no. cigarettes per day)</b>	1.8 (4.4)	1.3 (4.1)	0.9 (2.8)	1.2 (3.6)	<b>0.002</b>
<b>Alcohol at 12 weeks (g/day)</b>	0.3 (1.9)	0.2 (1.0)	0.3 (1.2)	0.3 (1.2)	0.445
<b>Alcohol at 3<sup>rd</sup> trimester (g/day)</b>	0.3 (1.7)	0.3 (1.7)	0.3 (0.9)	0.3 (1.0)	0.986
<b>Calories at 12 weeks (kcal/day)</b>	2138 (599)	2113 (556)	2132 (512)	2152 (538)	0.689
<b>Calories at 3<sup>rd</sup> trimester (kcal/day)</b>	2119 (570)	2085 (545)	2095 (543)	2100 (554)	0.772
<b>Maternal pre-pregnancy BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>	23.9 (4.6)	23.8 (4.5)	23.6 (4.4)	23.2 (3.9)	<b>0.032</b>
<b>Paternal BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>	26.0 (3.7)	26.1 (3.5)	25.9 (3.4)	25.8 (3.2)	0.431
<b>Maternal pre-pregnancy BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>					
Underweight (<18.5)	5.2	4.7	3.7	4.4	<b>0.082</b>
Normal weight (18.5–24.99)	64.2	67.2	71.4	72.7	
Overweight (25–29.99)	21.5	20.6	16.4	15.8	
Obese (≥30)	9.1	7.5	8.5	7.1	
<b>Gestational age at blood extraction (weeks)</b>	13.7 (2.4)	13.5 (2.2)	13.3 (1.9)	13.5 (2.1)	<b>0.008</b>

Bold values indicate  $P < 0.1$ .

BMI, body mass index.

Values are percentages for categorical variables and mean (SD) for continuous variables.

preterm (geometric mean [95% CI]: 28.79 [26.78, 30.96] ng/ml) and at-term deliveries (28.22 [27.77, 28.67] ng/ml) ( $P$ -value = 0.592). After adjustment, we did not find a significant association between 25(OH)D3 concentration in pregnancy and risk of preterm birth (all  $P$ -values >0.4) (Table 2).

The prevalence of any type of caesarean section was 17.5%. Overall, 40.8% of total caesarean sections were classified as elective, 24.1% as emergency, and 35.1% as

non-elective non-emergency. The median maternal circulating 25(OH)D3 concentration did not differ between any type of caesarean section (geometric mean [95% CI]: 28.04 ng/ml [26.99, 29.13]) and vaginal delivery [28.27 ng/ml (27.79, 28.76)] ( $P$ -value = 0.695). After stratifying by type of caesarean section, circulating 25(OH)D3 concentration in pregnancy was not associated with a risk of elective or emergency caesarean section (all  $P$ -values >0.05); however, we found that women with sufficient vitamin

**Table 2.** Adjusted associations of maternal 25(OH)D3 concentration\* (ng/ml) in pregnancy with gestational diabetes and preterm delivery

25(OH)D3 (ng/ml)	Gestational diabetes**			Preterm delivery***		
	n**** (%)	RR (95% CI)	P	n**** (%)	RR (95% CI)	P
<b>As continuous*****</b>	93 (5.0)	1.08 (0.73, 1.61)	0.687	108 (4.6)	1.12 (0.75, 1.67)	0.573
<b>Quartiles</b>						
Q1: ≤22	25 (5.8)	1.00		22 (3.9)	1.00	
Q2: 22–29	16 (3.3)	0.68 (0.36, 1.28)	0.228	31 (5.3)	1.60 (0.85, 3.00)	0.146
Q3: 29–37	29 (5.5)	0.98 (0.57, 1.68)	0.935	27 (4.2)	1.22 (0.63, 2.35)	0.554
Q4: >37	23 (5.3)	1.09 (0.62, 1.94)	0.762	28 (4.9)	1.28 (0.65, 2.50)	0.478
<b>Clinical cut-offs</b>						
<20	20 (6.6)	1.00		20 (5.0)	1.00	
20–29	23 (3.3)	0.53 (0.29, 0.97)	0.040	35 (4.1)	0.98 (0.52, 1.85)	0.950
≥30	50 (5.7)	0.92 (0.55, 1.55)	0.761	53 (4.8)	1.08 (0.75, 1.67)	0.573

CI, confidence interval; RR, relative risk.

\*Deseasonalised maternal 25(OH)D3 concentration based on month of blood collection for each subject derived from the sinusoidal model.

\*\*All models adjusted for child's sex, gestational age, parity, and maternal social class, education, age at delivery, smoking at any time during pregnancy, overweight, alcohol consumption during pregnancy, and area of study.

\*\*\*All models adjusted for child's sex, parity, maternal social class, education, age at delivery, smoking at any time during pregnancy, overweight, alcohol consumption during pregnancy, and area of study.

\*\*\*\*Number of cases.

\*\*\*\*\*Estimates as per a doubling of the concentration of 25(OH)D3.

**Table 3.** Adjusted associations of maternal 25(OH)D3 concentration\* in pregnancy (ng/ml) with type of caesarean section

25(OH)D3 (ng/ml)	Elective caesarean			Emergency caesarean			Non-elective non-emergency caesarean		
	n**	RRR (95% CI)	P-value	n**	RRR (95% CI)	P-value	n**	RRR (95% CI)	P-value
<b>As continuous***</b>	164	1.03 (0.75, 1.43)	0.845	97	0.97 (0.64, 1.48)	0.904	141	0.76 (0.55, 1.05)	0.100
<b>Quartiles</b>									
Q1: ≤22	36	1.00		21	1.00		43	1.00	
Q2: 22–29	42	1.15 (0.70, 1.89)	0.569	30	1.35 (0.70, 2.61)	0.368	37	0.89 (0.55, 1.44)	0.633
Q3: 29–37	41	0.80 (0.48, 1.32)	0.375	26	1.16 (0.61, 2.22)	0.647	29	0.61 (0.37, 1.02)	0.060
Q4: >37	45	0.95 (0.58, 1.59)	0.859	20	0.94 (0.46, 1.90)	0.859	32	0.69 (0.41, 1.17)	0.168
<b>Clinical cut-offs</b>									
<20	23	1.00		17	1.00		33	1.00	
20–29	58	1.23 (0.72, 2.10)	0.442	39	1.21 (0.62, 2.38)	0.582	54	0.81 (0.50, 1.30)	0.377
≥30	83	1.04 (0.62, 1.74)	0.895	41	0.98 (0.50, 1.92)	0.964	54	0.60 (0.37, 0.97)	0.038

Base outcome category: vaginal.

\*Deseasonalised maternal 25(OH)D3 concentration based on month of blood collection for each subject derived from the sinusoidal model.

\*\*Number of cases.

\*\*\*Estimates as per a doubling of the concentration of 25(OH)D3.

All models adjusted for child's sex, gestational age, parity, and maternal social class, education, age at delivery, smoking at any time during pregnancy, overweight, alcohol consumption during pregnancy, and area of study.

D in pregnancy had a decreased risk of non-elective non-emergency caesarean section compared with women with vitamin D deficiency, even after adjustment for confounding factors (relative risk [RR] = 0.60, 95% CI 0.37, 0.97) (Table 3).

Mean (SD) birthweight, birth length and head circumference were 3272.3 (477.61) g, 49.68 (2.10) and 34.26 (1.45) cm, respectively. We did not find an association of maternal circulating 25(OH)D3 concentration with offspring birthweight and birth length (all *P*-values >0.3) (Table 4).

**Table 4.** Adjusted associations of maternal 25(OH)D3 concentration\* in pregnancy (ng/ml) with offspring anthropometric outcomes at birth

25(OH)D3 (ng/ml)	Change in weight (g)		Change in height (cm)		Change in head circumference (cm)	
	Coef. (SE)	P-value	Coef. (SE)	P-value	Coef. (SE)	P-value
<b>As continuous***</b>	7.42 (15.27)	0.627	-0.06 (0.07)	0.426	-0.10 (0.05)	0.038
<b>Quartiles</b>						
Q1: ≤22	Ref.		Ref.		Ref.	
Q2: 22–29	-0.96 (23.78)	0.968	0.10 (0.11)	0.376	0.08 (0.08)	0.309
Q3: 29–37	17.08 (23.36)	0.465	0.07 (0.11)	0.494	-0.01 (0.08)	0.906
Q4: >37	22.22 (24.26)	0.360	-0.03 (0.11)	0.786	-0.11 (0.08)	0.175
<b>Clinical cut-offs</b>						
<20	Ref.		Ref.		Ref.	
20–29	-16.68 (24.32)	0.493	-0.02 (0.11)	0.878	-0.08 (0.08)	0.284
≥30	12.43 (23.72)	0.600	0.00 (0.11)	0.979	-0.12 (0.08)	0.119

\*Deseasonalised maternal 25(OH)D3 concentration based on month of blood collection for each subject derived from the sinusoidal model.

\*\*Estimates as per a doubling of the concentration of 25(OH)D3.

Models were adjusted for child's sex, gestational age, parity, and maternal social class, education, age at delivery, smoking at any time during pregnancy, overweight, alcohol consumption during pregnancy, and area of study.

**Table 5.** Adjusted associations of maternal 25(OH)D3 concentration\* in pregnancy (ng/ml) with fetal growth restriction (FGR) and small-for-gestational age (SGA).

25(OH)D3 (ng/ml)	FGR			SGA		
	n** (%)	RR (95% CI)	P-value	n** (%)	RR (95% CI)	P-value
<b>As continuous***</b>	120 (5.1)	1.14 (0.81, 1.60)	0.458	237 (10.1)	1.03 (0.82, 1.29)	0.799
<b>Quartiles</b>						
Q1: ≤22	27 (4.9)	1.00		53 (9.6)	1.00	
Q2: 22–29	24 (4.1)	0.79 (0.45, 1.41)	0.429	64 (11.1)	1.09 (0.77, 1.56)	0.620
Q3: 29–37	38 (6.0)	1.26 (0.77, 2.08)	0.356	61 (9.6)	0.96 (0.67, 1.38)	0.837
Q4: >37	31 (5.4)	1.16 (0.68, 1.98)	0.584	59 (10.3)	1.05 (0.73, 1.52)	0.795
<b>Clinical cut-offs</b>						
<20	20 (5.0)	1.00		40 (10.0)	1.00	
20–29	39 (4.6)	0.90 (0.52, 1.56)	0.712	89 (10.6)	1.05 (0.73, 1.51)	0.801
≥30	61 (5.6)	1.15 (0.68, 1.92)	0.603	108 (9.8)	0.99 (0.69, 1.42)	0.965

\*Deseasonalised maternal 25(OH)D3 concentration based on month of blood collection for each subject derived from the sinusoidal model.

\*\*Number of cases.

\*\*\*Estimates as per a doubling of the concentration of 25(OH)D3.

All models were adjusted for maternal social class, education, age at delivery, smoking at any time during pregnancy, overweight, alcohol consumption during pregnancy, and area of study.

Moreover, maternal circulating 25(OH)D3 concentration was not associated with clinical categories of birthweight (i.e. <2500 g, 2500–4000 g and >4000 g) (data not shown). Nevertheless, we found that newborns of mothers with higher circulating 25(OH)D3 concentrations tended to have smaller head circumference [coefficient (se) per doubling maternal 25(OH)D3 concentration: -0.10 (0.05) cm,  $P = 0.038$ ] (Table 4). A total of 120 (5.1%) newborns were classified as FGR and 237 (10.1%) as SGA. After

adjustment, maternal circulating 25(OH)D3 concentration was not associated with risk of SGA or FGR (all  $P$ -values >0.4) (Table 5).

## Discussion

### Main findings

We found that a sufficient circulating vitamin D concentration [25(OH)D3 ≥ 30 ng/ml] in pregnancy was associated



with a decreased risk of non-elective non-emergency caesarean section. However, we did not find any association between maternal circulating 25(OH)D3 concentration in pregnancy with GDM and preterm delivery. Furthermore, offspring of mothers with higher circulating 25(OH)D3 in pregnancy showed smaller head circumference at birth; however, no significant associations were found for other birth outcomes such as weight and length, or risk of SGA and FGR newborns.

### Strengths and limitations

The main strengths of this study include the use of a large population-based birth cohort study set up in several geographical areas of Spain and the prospective design; examination of the association of pregnancy and birth outcomes with maternal circulating 25(OH)D3 concentration, the best measure of vitamin D status in humans; the use of estimated mean annual circulating 25(OH)D3 concentration from a single measurement to account for seasonal variation and reduce misclassification of the exposure; and multivariate analyses adjusted for a wide range of potential confounders. However, the study has some limitations. We could not obtain circulating 25(OH)D3 concentrations from all eligible participants, which made selection bias possible. We did not measure circulating 25(OH)D2 concentrations; however, the majority (90%) of 25(OH)D is normally in D3 form. Moreover, the small rate of some adverse pregnancy outcomes may limit the statistical power to detect significant differences. Unfortunately, it was not possible to evaluate the association between circulating 25(OH)D3 concentration and preeclampsia, an important obstetric outcome related to vitamin D deficiency.<sup>1–3,11–13</sup>

### Interpretation

The prevalence of vitamin D insufficiency and deficiency in our study was 31.8% and 19.6%, respectively. Those rates are similar to those reported in previous studies that have shown deficiency and insufficiency as common in pregnant women.<sup>34,35</sup> In accordance with previous studies,<sup>34,35</sup> the main factors associated with circulating 25(OH)D3 concentration were latitude, season and gestational age at blood extraction, maternal age, parity, maternal social class and education level, tobacco smoking and pre-pregnancy body mass index.

Evidence suggests that vitamin D may play an important role in maintaining normal glucose homeostasis,  $\beta$ -cell function and insulin sensitivity;<sup>4</sup> however, the role of vitamin D in glucose homeostasis during pregnancy and the development of GDM remains inconclusive. Two recent meta-analyses have shown that pregnant women with GDM tended to have significantly lower circulating vitamin D levels.<sup>3,10</sup> In a first meta-analysis including seven observational studies and 2146 participants, vitamin D deficiency

[serum 25(OH)D < 20 ng/ml] was associated with an increased risk of GDM. Only three studies were adjusted for potential confounders including maternal age, body mass index and ethnicity.<sup>5–7</sup> When the analysis was restricted to these studies, the association between vitamin D levels and risk of GDM remained statistically significant. However, studies that adjusted for season did not find a difference in serum 25(OH)D concentration between women with and without GDM.<sup>7,36</sup> A second meta-analysis including ten studies found insufficient serum 25(OH)D concentration to be associated with risk of GDM [pooled OR = 1.49, 95% CI, 1.18, 1.89]. Five of ten studies were adjusted for potential confounders: three did not find an association of low vitamin D with a risk of GDM,<sup>7,35,37</sup> whereas two found a significant association.<sup>6,9</sup> Our study did not show a higher risk of GDM in pregnant women with vitamin D deficiency or insufficiency. The discrepancy with previous studies may be the consequence of lower statistical power (i.e. the small number of cases included in the present study), the differences in gestational age at blood sampling, and the use of different diagnostic criteria. In Spain, in contrast to other countries, adoption of American Diabetes Association (ADA) criteria has not been recommended. If the ADA criteria were used in the Spanish population this would increase the prevalence of GDM about 30% but the contribution of additional diagnosed cases to adverse outcomes would not be substantial.<sup>38</sup>

An adequate vitamin D status during pregnancy could reduce preterm delivery risk due to decreasing placental colonisation by bacterial vaginosis species.<sup>16,39</sup> In a recent case-control study of 40 cases of spontaneous preterm births matched by ethnicity with 120 at-term births, no differences were found in the prevalence of first-trimester maternal vitamin D deficiency [25(OH)D < 50 nmol/l] or in the median circulating 25(OH)D concentration between groups.<sup>40</sup> Moreover, a Japanese retrospective cohort study that included 93 pregnant women found lower circulating 25(OH)D concentration in women with threatened premature delivery than women with at-term delivery.<sup>41</sup> In our study, 4.6% of the pregnant women had a preterm delivery, but this outcome was not associated with maternal circulating 25(OH)D3 concentration in early pregnancy.

Vitamin D deficiency in pregnancy may increase the risk of caesarean section, especially when it has been performed because of a failure to progress in labour. Merewood et al. reported that women with circulating vitamin D concentrations <37.5 ng/ml had a nearly four times higher risk of having a caesarean section.<sup>17</sup> Moreover, a recent study showed a two-fold increased risk of caesarean section due to prolonged labour when vitamin D concentration was <30 nmol/l, but no increased risk of fetal distress or other causes of caesarean section were reported.<sup>18</sup> However, other authors have found no increased risk of caesarean section



in pregnant women in relation to low circulating 25(OH)D concentrations. In one study conducted in Spain in 466 pregnant women, serum vitamin D in the first and third trimesters of pregnancy was not associated with a risk of caesarean section.<sup>2</sup> In addition, a UK study among 995 women found no difference in maternal serum 25(OH)D concentrations between women with caesarean section and those with a vaginal delivery.<sup>42</sup> We found a significant association between circulating 25(OH)D3 concentrations in pregnancy and risk of caesarean section due to failure to progress in labour, failed induction or cephalopelvic disproportion, but no association was found for other types of caesarean sections. These results suggest that the effects of vitamin D on skeletal smooth muscle performance and strength could be beneficial for a correct progress of labour.<sup>43</sup> Studies are warranted to elucidate this critical area in obstetric research.

Vitamin D is involved in bone metabolism, human chorionic gonadotropin expression and placental sex steroid production,<sup>44</sup> and therefore might have an important role in fetal growth, development and newborn outcomes. A recent meta-analysis reported an association between insufficient circulating 25(OH)D concentration and risk of SGA newborns and low birthweight.<sup>3</sup> The association remained significant after stratified analysis and adjustment for confounders. Moreover, infants of mothers with a 25(OH)D concentration <37.5 nmol/l had a lower birthweight (−130.92 [95% CI, −130.9 to −75.1 g]). Birth length and head circumference were not associated with maternal 25(OH)D concentration.<sup>3</sup> We did not find an association of maternal circulating 25(OH)D concentration with birthweight (treated as continuous or using clinically relevant categories), birth length, or risk of FGR or SGA; however, offspring of mothers with higher circulating 25(OH)D3 concentrations tended to have a smaller head circumference. Our results suggest that maternal circulating 25(OH)D3 concentration is not related to risk of micro- or macrosomic fetuses, but may be related to head circumference dimensions within the range of normal birthweight. Nevertheless, the reduction of HC is too small to conclude that a clinically significant association exists.

## Conclusion

We found that a sufficient circulating vitamin D concentration [25(OH)D3 ≥ 30 ng/ml] in pregnancy was associated with a decreased risk of caesarean section because of obstructed labour. We did not find any evidence of an association of maternal circulating 25(OH)D3 concentration in pregnancy with GDM and preterm delivery. We also found that offspring of mothers with higher circulating 25(OH)D3 concentrations in pregnancy tend to have a smaller head circumference, although other offspring

outcomes at birth were not associated with the maternal circulating 25(OH)D3 concentration. No association was found between maternal circulating 25(OH)D3 concentration in pregnancy with SGA and FGR. However, our results suggest that higher circulating vitamin D concentration in pregnancy may be associated with lower risk of caesarean delivery due to obstructed labour (failure to progress in labour, failed induction or cephalopelvic disproportion). Future large and well-designed studies are needed to determine the impact of vitamin D on pregnancy and birth outcomes and assess normative levels of vitamin D in early pregnancy to prevent adverse pregnancy and offspring outcomes at birth.

## Disclosure of interests

The authors report no conflict of interest.

## Contribution to authorship

AR, JS, and EM conceived and designed the study. ME performed the experiments. RGE analysed the data. AR and EM wrote the paper. AR, RGE, MB, AL, CRB, CI, CRD, AT, ME, JS and EM contributed to the interpretation of the results and assisted with critical comments and revisions of the article.

## Details of ethics approval

The Ethical Committees of the centres involved in the project approved the study and written informed consent was obtained from the parents of all children.

## Funding

This study was funded by grants from Instituto de Salud Carlos III and Spanish Ministry of Health (Red INMA G03/176; CB06/02/0041; FIS 97/0588; 00/0021-2, PI061756; PS0901958; FIS-FEDER 03/1615, 04/1509, 04/1112, 04/1931, 05/1079, 05/1052, 06/1213, 07/0314 and 09/02647; FIS-PI041436, FIS- PI081151, FIS-PI06/0867, FIS-PS09/00090, FISS-PI042018, and FISS-PI0902311), Universidad de Oviedo, Conselleria de Sanitat Generalitat Valenciana, Generalitat de Catalunya-CIRIT 1999SGR 00241, Department of Health of the Basque Government (2005111093 and 2009111069), the Provincial Government of Gipuzkoa (DFG06/004 and DFG08/001), and Fundación Roger Torné. The funding organisations and sponsors had no role in the design and conduct of the study, in the collection, management, analysis or interpretation of the data; in the preparation, review or approval of the manuscript, or in the decision to submit the manuscript for publication.

## Acknowledgements

The authors would particularly like to thank all the participants for their generous collaboration. A full roster of the

INMA Project Investigators can be found at [http://www.proyectoINMA.org/presentacion-inma/listado-investigadores/en\\_listado-investigadores.html](http://www.proyectoINMA.org/presentacion-inma/listado-investigadores/en_listado-investigadores.html). ■

## References

- Nassar N, Halligan GH, Roberts CL, Morris JM, Ashton AW. Systematic review of first-trimester vitamin D normative levels and outcomes of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2011;205:208.e1-7.
- Fernández-Alonso AM, Dionis-Sánchez EC, Chedraui P, González-Salmerón MD, Pérez-López FR; Spanish Vitamin D and Women's Health Research Group. First-trimester maternal serum 25-hydroxyvitamin D3 status and pregnancy outcome. *Int J Gynaecol Obstet* 2012;116:6-9.
- Aghajafari F, Nagulesapillai T, Ronksley PE, Tough SC, O'Beirne M, Rabi DM. Association between maternal serum 25-hydroxyvitamin D level and pregnancy and neonatal outcomes: systematic review and meta-analysis of observational studies. *BMJ* 2013;346:f1169.
- Maghbooli Z, Hossein-Nezhad A, Karimi F, Shafaei AR, Larjani B. Correlation between vitamin D3 deficiency and insulin resistance in pregnancy. *Diabetes Metab Res Rev* 2008;24:27-32.
- Clifton-Bligh RJ, McElduff P, McElduff A. Maternal vitamin D deficiency, ethnicity and gestational diabetes. *Diabet Med* 2008;25:678-84.
- Zhang C, Qiu C, Hu FB, David RM, van Dam RM, Bralley A, et al. Maternal plasma 25-hydroxyvitamin D concentrations and the risk for gestational diabetes mellitus. *PLoS One* 2008;3: e3753.
- Farrant HJ, Krishnaveni GV, Hill JC, Boucher BJ, Fisher DJ, Noonan K, et al. Vitamin D insufficiency is common in Indian mothers but is not associated with gestational diabetes or variation in newborn size. *Eur J Clin Nutr* 2009;63:646-52.
- Makgoba M, Nelson SM, Savvidou M, Messow CM, Nicolaidis K, Sattar N. First-trimester circulating 25-hydroxyvitamin D levels and development of gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2011;34:1091-3.
- Parlea L, Bromberg IL, Feig DS, Vieth R, Merman E, Lipscombe LL. Association between serum 25-hydroxyvitamin D in early pregnancy and risk of gestational diabetes mellitus. *Diabet Med* 2012;29:e25-32.
- Poel YHM, Hummel P, Lips P, Stam F, Van der Ploeg T, Simsek S. Vitamin D and gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Intern Med* 2012;23:465-9.
- Halhali A, Tovar AR, Torres N, Bourges H, Garabedian M, Larrea F. Preeclampsia is associated with low circulating levels of insulin-like growth factor I and 1,25-dihydroxyvitamin D in maternal and umbilical cord compartments. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:1828-33.
- Bodnar LM. Maternal vitamin D deficiency increases the risk of preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:3517-22.
- Robinson CJ, Wagner CL, Hollis BW, Baatz JE, Johnson DD. Maternal vitamin D and fetal growth in early-onset severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2011;204:556.e1-4.
- Bodnar LM, Krohn MA, Simhan HN. Maternal vitamin D deficiency is associated with bacterial vaginosis in the first trimester of pregnancy. *J Nutr* 2009;139:1157-61.
- Hensel KJ, Randis TM, Gelber SE, Ratner AJ. Pregnancy-specific association of vitamin D deficiency and bacterial vaginosis. *Am J Obstet Gynecol* 2011;204:41.e1-9.
- Grant WB. Adequate vitamin D during pregnancy reduces the risk of premature birth by reducing placental colonization by bacterial vaginosis species. *MBio* 2011;2:e00022-11.
- Merewood A, Mehta SD, Chen TC, Bauchner H, Holick MF. Association between vitamin D deficiency and primary cesarean section. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:940-5.
- Scholl TO, Chen X, Stein P. Maternal vitamin D status and delivery by cesarean. *Nutrients* 2011;4:319-30.
- Leffelaar ER, Vrijkotte TG, van EijsDen M. Maternal early pregnancy vitamin D status in relation to fetal and neonatal growth: results of the multi-ethnic Amsterdam Born Children and their Development cohort. *Br J Nutr* 2010;104:108-17.
- van den Berg G, van EijsDen M, Vrijkotte TG, Gemke RJ. Suboptimal maternal vitamin D status and low education level as determinants of small-for-gestational-age birth weight. *Eur J Nutr* 2013;52:273-9.
- Holick MF. Vitamin D: importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis. *Am J Clin Nutr* 2004;79:362-71.
- Guxens M, Ballester F, Espada M, Fernández MF, Grimalt JO, Ibarluzea J, et al. Cohort Profile: the INMA – Infancia y MedioAmbiente (Environment and Childhood) – Project. *Int J Epidemiol* 2012;41:930-40.
- Instruction manual BIO-RAD. *25(OH)-vitamin D3 by HPLC*. Munich: Laboratories GmbH; 2003.
- National Diabetes Data Group. Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. *Diabetes* 1979;28:1039-57.
- Westerway SC, Davison A, Cowell S. Ultrasonic fetal measurements: new Australian standards for the new millennium. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2000;40:297-302.
- Carrascosa A, Yeste D, Copil A, Almar J, Salcedo S, Gussinyé M. Anthropometric growth patterns of preterm and full-term newborns (24-42 weeks' gestational age) at the Hospital Materno-InfantilValld'Hebron (Barcelona) (1997-2002). *An Pediatr (Barc)* 2004;60:406-16.
- Mamelle N, Cochet V, Claris O. Definition of fetal growth restriction according to constitutional growth potential. *Biol Neonate* 2001;80:277-85.
- Barnett AG, Dobson AJ. *Analysing Seasonal Health Data*. Berlin: Springer; 2010.
- Mikulich SK, Zerbe GO, Jones RH, Crowley TJ. Comparing linear and nonlinear mixed model approaches to cosinor analysis. *Stat Med* 2003;22:3195-211.
- Morales E, Gascon M, Martinez D, Casas M, Ballester F, Rodríguez-Bernal CL, et al. Associations between blood persistent organic pollutants and 25-hydroxyvitamin D3 in pregnancy. *Environ Int* 2013;57-58:34-41.
- Holick MF. Vitamin D status: measurement, interpretation, and clinical application. *Ann Epidemiol* 2009;19:73-8.
- Institute of Medicine. *Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D*. Washington, DC: The National Academy of Sciences Press; 2011.
- Hastie T, Tibshirani R. *Generalized Additive Models*. New York: Chapman & Hall; 1990.
- Vandevijvere S, Amsalkhir S, Van Oyen H, Moreno-Reyes R. High prevalence of vitamin D deficiency in pregnant women: a national cross-sectional survey. *PLoS One* 2012;7:e43868.
- Bjørn Jensen C, Thorne-Lyman AL, Vadgård Hansen L, Strøm M, Odgaard Nielsen N, Cohen A, et al. Development and validation of a vitamin D status prediction model in Danish pregnant women: a study of the Danish National Birth Cohort. *PLoS One* 2013;8: e53059.

- 36 Baker AM, Haeri S, Camargo CA, Stuebe AM, Boggess KA. First-trimester maternal vitamin D status and risk for gestational diabetes (GDM): a nested case-control study. *Diabetes Metab Res Rev* 2012;28:164–8.
- 37 Savvidou MD, Akolekar R, Samaha RB, Masconi AP, Nicolaides KH. Maternal serum 25-hydroxyvitamin D levels at 11<sup>+0</sup>–13<sup>+6</sup> weeks in pregnant women with diabetes mellitus and in those with macrosomic neonates. *BJOG* 2011;118:951–5.
- 38 Ricart W, López J, Mozas J, Pericot A, Sancho MA, Gonzalez N, et al. Potential impact of American Diabetes Association criteria for diagnosis of gestational diabetes mellitus in Spain. *Diabetologia* 2005;48:1135–41.
- 39 Fichorova RN, Onderdonk AB, Yamamoto H, Delaney ML, DuBois AM, Allred E, et al. Maternal microbe-specific modulation of inflammatory response in extremely low-gestational-age newborns. *MBio* 2011;2:e00280-10.
- 40 Baker AM, Haeri S, Camargo CA, Stuebe AM, Boggess KA. A nested case-control study of first-trimester maternal vitamin D status and risk for spontaneous preterm birth. *Am J Perinatol* 2011;28:667–72.
- 41 Shibata M, Suzuki A, Sekiya T, Sekiguchi S, Asano S, Udagawa Y, et al. High prevalence of hypovitaminosis D in pregnant Japanese women with threatened premature delivery. *J Bone Miner Metab* 2011;29:615–20.
- 42 Savvidou MD, Makgoba M, Castro PT, Akolekar R, Nicolaides KH. First-trimester maternal serum vitamin D and mode of delivery. *Br J Nutr* 2012;108:1972–5.
- 43 Papandreou L, Chasiotis G, Seferiadis K, Thanasoulis NC, Dousias V, Tsanadis G, et al. Calcium levels during the initiation of labor. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004;115:17–22.
- 44 Shin JS, Choi MY, Longtine MS, Nelson M. Vitamin D effects on pregnancy and the placenta. *Placenta* 2010;31:1027–34.

## **9. ANNEXES**



## ANNEXA 1: Document de consentiment informat

**Fulla de Consentiment Informat**  
(Còpia Pares)

Jo, ..... (nom i cognoms),  
en qualitat de..... (relació amb el nen/a)  
del nen/a..... (nom i cognoms),

- He llegit la fulla d'informació que se us ha donat
- He pogut fer preguntes sobre l'estudi
- He rebut informació suficient sobre l'estudi
- He parlat amb ..... qui ens ha aclarit els dubtes
- Entenc que la nostra participació és voluntària
- Entenc que podem retirar-nos de l'estudi
  - Quan vulguem
  - Sense haver de donar explicacions
  - Sense que això reperculeixi en l'atenció mèdica del nen
- Entenc que l'estudi està dissenyat per incrementar els coneixements mèdics
- Entenc que tots els resultats són confidencials i que només nosaltres, si els demanem, i els responsables de l'estudi els coneixerem
  
- Dono la meva conformitat per participar en l'estudi INMA.

Signatura del pare, mare o tutor

DNI: .....

Data i lloc: ....., a ..... de ..... de 200....

Signatura del responsable

Nom i cognoms.....



## ANNEXA 2: Document informatiu per a la participant



Benvolguts pares,

Volem agrair-los de nou la seva participació en aquesta nova part del projecte "INMA (Infància i Mediambient): Exposicions prenatales i postnatal a contaminants ambientals, dieta, creixement i desenvolupament neuro-immuno-endocrinològic".

El projecte INMA és un estudi de recerca epidemiològica finançat pel Ministeri de Sanitat i de Consum\*. La xarxa de grups INMA està formada per 10 centres (universitats i centres públics de recerca) de 7 comunitats autònomes diferents on hi participaran un total de 4.400 parelles mares-nen. L'estudi de Sabadell pretén arribar a les 800 parelles mare-nen.

Els integrants del grup INMA-Sabadell són: el Programa Sanitari d'Atenció a la dona (PSAD-ASSIR) del Servei d'Atenció Primària de Sabadell i la Corporació Sanitària Parc Taulí, coordinats pel Dr. Jordi Sunyer de l'Institut Municipal d'Investigació Mèdica (IMIM) de Barcelona.

Els estudis epidemiològics necessiten la participació voluntària de persones per tal de poder tirar endavant els seus objectius i elaborar conclusions a nivell poblacional. La participació en aquest tipus d'estudis ajuda a millorar el coneixement de les variables que afecten la salut i poder així establir mesures preventives. Per poder continuar amb aquesta tasca i, en concret, conèixer amb més profunditat l'impacte dels contaminants ambientals sobre la salut dels nostres nens, volem demanar-li de nou la seva participació en l'estudi a través de la participació del seu fill.

A continuació es detallen els procediments i qüestionaris corresponents a la visita dels 14 mesos.

En nom de tot l'equip volem donar-los de nou les gràcies.

Entitats participants:



\* Projecte finançat per l'Institut de Salut Carlos III - FIS 04/1436 i el Ministeri de Sanitat i Consum - G03/176

<p>La visita dels 14 mesos es realitzarà en dos temps el més propers possibles:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• A la primera visita només hauran de venir les mares per respondre una sèrie de preguntes.</li> <li>• A la segona visita es demanarà que vingui el nen acompanyat de la mare o del pare i se li farà tota l'avaluació neurològica i de creixement.</li> </ul>	
Primera visita	Segona visita
<p><b>CAP Sant Fèlix</b>  <b>Participant: Mare</b>  <b>Personal INMA: Entrevistadores</b></p> <p><b>QÜESTIONARIS</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Qüestionari d'exposició a contaminants</b> Informació sobre la possible exposició del vostre fill a contaminació atmosfèrica, de l'aigua o d'altres fonts.</li> <li>• <b>Qüestionari de dieta</b> Informació sobre la dieta del nen, el tipus de lactància i la introducció d'aliments</li> <li>• <b>Qüestionari d'infeccions</b> Informació sobre els quadres respiratoris i ingressos hospitalaris del vostre fill. Aquest qüestionari també inclou informació sobre medicació del nen.</li> </ul> <p><b>MOSTRES BIOLÒGIQUES</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Al final de la visita es donarà a la mare un parell de pots, un per <b>recollir orina</b> i un altre per <b>recollir saliva del nen</b>. Les infermeres us donaran les instruccions de com recollir i conservar les mostres. En la orina volem mesurar l'estrès oxidatiu i els nivells de iode, i en la saliva el cortisol del vostre fill.</li> </ul>	<p><b>CAP Sant Fèlix</b>  <b>Participant: Pares i nen*</b>  <b>Personal INMA: Neuropsicòleg i infermeres</b>  <b>*Caldrà dur els pots amb la saliva i l'orina i la cartilla de salut del nen</b></p> <p><b>VISITA DEL NEN</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Desenvolupament neuropsicològic</b> Avaluació del desenvolupament neurològic del nen utilitzant el test de Bayley. El test avalua el desenvolupament motor, mental i social del nen. L'avaluació la realitzarà un neuropsicòleg i s'enviaran als pares els resultats de l'exploració.</li> <li>• <b>Exploració física</b> Es realitzarà una exploració física del nen destinada a mesurar el seu pes i talla.</li> <li>• <b>Qüestionari d'afectivitat i de salut mental</b> Informació sobre la relació dels pares amb el fill</li> </ul>
<b>Aïtres</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• En una submostra de dones seleccionada a l'atzar es realitzarà una visita al domicili per tal de mesurar l'exposició a partícules fines durant 24 hores. Les partícules fines indiquen l'exposició a contaminants atmosfèrics derivats del tràfic.</li> </ul>	

### PREGUNTES FREQUENTS

<p><b>REBRÉ ALGUN BENEFICI PER PARTICIPAR EN L'ESTUDI?</b></p> <p>Els pares participants en l'estudi rebreu la informació dels resultats de l'exploració neuropsicològica del vostre fill. A més. La informació que s'obtingui del resultat d'aquest estudi servirà per millorar la qualitat de vida de les futures generacions.</p> <p><b>ES MANTINDRÀ CONFIDENCIAL?</b></p> <p>Les dades estaran protegides d'acord amb la "Ley 15/99 de Protección de datos". L'ús que es faci de la informació obtinguda serà confidencial. Per tant, la identitat del nen i dels pares quedarà sempre preservada. Les dades obtingudes només es podran publicar de forma anònima i mai de forma individual.</p> <p><b>QUINS SÓN ELS COSTOS?</b></p> <p>La seva participació en aquest estudi no representarà cap cost per vosaltres. No rebran cap remuneració per participar en l'estudi.</p> <p><b>QUINS SÓN ELS NOSTRES DRETS COM A PARTICIPANTS?</b></p> <p>La participació en l'estudi és voluntària. Podem escollir no participar-hi o poden abandonar l'estudi en qualsevol moment. Retirar-se de l'estudi no representarà cap penalització per vosaltres o el vostre fill.</p> <p><b>A QUI HE DE TRUCAR SI TINC ALGUNA PREGUNTA O PROBLEMA?</b></p> <p>Pos's en contacte amb les infermeres de l'estudi INMA al telèfon 896444581 o directament amb nosaltres a l'IMIM (Mar Álvarez 93 221 1009).</p>
--





## **10. BIBLIOGRAFIA**



- 
- <sup>1</sup> Holick MF, Chen TC. Vitamin D deficiency: A worldwide problem with health consequences. *Am J Clin Nutr*. 2008 Apr;87(4):1080S-6S.
- <sup>2</sup> Holick MF. Vitamin D Deficiency. *N Engl J Med* 2007; 357:266-81.
- <sup>3</sup> Pettifor JM. Vitamin D deficiency and nutritional rickets in children in vitamin D. *Elsevier Academic Press*, 2005: 1065-84.
- <sup>4</sup> Jackson RD. Calcium plus vitamin D supplementation and the risk of fractures. *N Engl J Med*, 2006; 354:669-83.
- <sup>5</sup> Plotnikoff GA. Prevalence of severe hypovitaminosis D in patients with persistent, nonspecific musculoskeletal pain. *Mayo Clin Proc*, 2003;78:1443-70.
- <sup>6</sup> Holick MF. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr*, 2004;80:1678-88.
- <sup>7</sup> Munger KL. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *JAMA*, 2006;296:2832-8.
- <sup>8</sup> Pittas AG. Vitamin D and calcium intake in relation to type 2 diabetes in women. *Diabetes Care*, 2006;29:650-6.
- <sup>9</sup> Webb AR. Who, what, where and when – influences on cutaneous vitamin D synthesis. *Prog Biophys Mol Biol*, 2006;92:17-25.
- <sup>10</sup> Christakos S, Ajibade DV, Dhawan P, Fechner AJ, Mady LJ. Vitamin D: metabolism. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 2010;39(2):243.
- <sup>11</sup> Brown AJ. Regulation of vitamin D action. *Nephrol Dial Transplant*. 1999;14(1):11.
- <sup>12</sup> Hewison M, Burke F, Evans KN, Lammas DA, Sansom DM, Liu P, Modlin RL, Adams JS. Extra-renal 25-hydroxyvitamin D3-1-alpha-hydroxylase in human health and disease. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2007; 103(3-5):316.
- <sup>13</sup> Urrutia RP. Vitamin D in pregnancy: current concepts. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2012;24:57-64.
- <sup>14</sup> Marcus R. *Fundamentals of Osteoporosis*. Elsevier Inc, 2010.
- <sup>15</sup> Holick MF, Garabedian M. Vitamin D: photobiology, metabolism, mechanism of action and clinical applications. In: Favus MJ, ed. *Primer on metabolic bone diseases and disorders of*

---

mineral metabolism. Washington, DC: *American Society for Bone and Mineral Research*, 2006:129-37.

<sup>16</sup>DeLuca HF. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *Am J Clin Nutr*, 2004;80:Suppl:1689S-1696S.

<sup>17</sup>Girgis CM, Clifton-Bligh RJ, Hamrick MW, Holick MF, Gunton JE. The roles of vitamin D in skeletal muscle: form, function, and metabolism. *Endocr Rev*,2013;34(1):33.

<sup>18</sup>Bouillon R, Carmeliet G, Verlinden L, van Etten E, Verstuyf A, Luderer HF, Lieben L, Mathieu C, Demay M. Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. *Endocr Rev*. 2008;29(6):726.

<sup>19</sup>Wang Y, DeLuca HF. Is the vitamin d receptor found in muscle?. *Endocrinology*. 2011 Feb;152(2):354-63.

<sup>20</sup> Muir SW, Montero-Odasso M. Effect of vitamin D supplementation on muscle strength, gait and balance in older adults: a systematic review and meta-analysis. *J Am Geriatr Soc*. 2011 Dec;59(12):2291-300.

<sup>21</sup> Stockton KA, Mengersen K, Paratz JD, Kandiah D, Bennell KL.Effect of vitamin D supplementation on muscle strength: a systematic review and meta-analysis. *Osteoporos Int*. 2011 Mar;22(3):859-71.

<sup>22</sup> Beaudart C, Buckinx F, Rabenda V, Gillain S, Cavalier E, Slomian J, Petermans J, Reginster JY, Bruyère. The effects of vitamin D on skeletal muscle strength, muscle mass, and muscle power: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(11):4336.

<sup>23</sup> Bouillon R, Eelen G, Verlinden L, Mathieu C, Carmeliet G, Verstuyf A. Vitamin D and cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2006;102(1-5):156.

<sup>24</sup> Nagpal S, Na S, Rathnachalam R. Noncalcemic actions of vitamin D receptors ligands. *Endocr Rev* 2005;36:662-87.

<sup>25</sup> Ponsonby AL, McMichael A, van der Mei I. Ultraviolet radiation and autoimmune disease: insights from epidemiological research. *Toxicology*. 2002;181-182:71.

<sup>26</sup> Bouillon R. Vitamin D: from photosynthesis, metabolism and action to clinical applications. *Endocrinology*, 6th ed. Saunders Elsevier, Philadelphia 2010. Vol 1, p.1089.

<sup>27</sup> David Feldman. Vitamin D: Biology, Action, and Clinical Implications. Vitamin D, 3rd ed. Elsevier, 2011: 279-344.

<sup>28</sup> Eyles DW, Smith S, Kinobe R, Hewison M, McGrath JJ. Distribution of the vitamin D receptor and 1 alpha-hydroxylase in human brain. *J Chem Neuroanat*. 2005;29(1):21.

- 
- <sup>29</sup> Eyles DW, Feron F, Cui X, Kesby JP, Harms LH, Ko P, McGrath JJ, Burne TH. Developmental vitamin D deficiency causes abnormal brain development. *Psychoneuroendocrinology*. 2009;34 Suppl 1:S247.
- <sup>30</sup> Tuohimaa P, Keisala T, Minasyan A, Cachat J, Kalueff A. Vitamin D, nervous system and aging. *Psychoneuroendocrinology*. 2009;34 Suppl 1:S278.
- <sup>31</sup> Whitehouse AJ, Holt BJ, Serralha M, Holt PG, Kusel MM, Hart PH. Maternal serum vitamin D levels during pregnancy and offspring neurocognitive development. *Pediatrics*. 2012;129(3):485–493
- <sup>32</sup> Morales E, Guxens M, Llop S, Rodríguez-Bernal CL, Tardón A, Riaño I, Ibarluzea J, Lertxundi N, Espada M, Rodriguez A, Sunyer J; INMA Project. Circulating 25-hydroxyvitamin D3 in pregnancy and infant neuropsychological development. *Pediatrics*. 2012 Oct;130(4):e913-20.
- <sup>33</sup> Morales E, Julvez J, Torrent M, Ballester F, Rodríguez-Bernal CL, Andiarena A, Vegas O, Castilla AM, Rodriguez-Dehli C, Tardón A, Sunyer J. Vitamin D in Pregnancy and Attention Deficit Hyperactivity Disorder-like Symptoms in Childhood. *Epidemiology*. 2015 Jul;26(4):458-65]
- <sup>34</sup> Gysemans C. Vitamin D and Diabetes. *Vitamin D*, 3rd ed. Elsevier, 2011: 1825-1842.
- <sup>35</sup> IOM (2011). Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D. Washington, DC: *National Academy of Sciences Press*.
- <sup>36</sup> Misra M, Pacaud D, Petryk A, Collett-Solberg PF, Kappy M, Drug and Therapeutics Committee of the Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society. Vitamin D deficiency in children and its management: review of current knowledge and recommendations. *Pediatrics*. 2008;122(2):398.
- <sup>37</sup> Food and Nutrition Board of the Institute of Medicine. Vitamin D. In: Dietary reference intakes for calcium, phosphorus, magnesium, vitamin D, fluoride, *National Academies Press*, Washington, DC 1997. p.250.
- <sup>38</sup> Malabanan A. Redefining vitamin D insufficiency. *Lancet*, 1998;351:805-6.
- <sup>39</sup> Thomas KK. Hypovitaminosis D in medical inpatients. *N Engl J Med*, 1998;338:777-83.
- <sup>40</sup> Bischoff-Ferrari HA. Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes. *Am J Clin Nutr*, 2006;84:18-28.
- <sup>41</sup> Morgan SL, Weinsier RL. Fundamentals of clinical nutrition. *Mosby*, St. Louis 1998. p.3.
- <sup>42</sup> Nair-Shalliker V, Clements M, Fenech M, Armstrong BK. Personal sun exposure and serum

---

25-hydroxy vitamin D concentrations. *Photochem Photobiol.* 2013 Jan;89(1):208-14.

<sup>43</sup> Bodnar LM, Simhan HN, Powers RW, Frank MP, Cooperstein E, Roberts JM. High prevalence of vitamin D insufficiency in black and white pregnant women residing in the northern United States and their neonates. *Journal of Nutrition* 2007; 137:447–452.

<sup>44</sup> van der Meer IM, Karamali NS, Boeke AJ, Lips P, Middelkoop BJ, Verhoeven I, et al. High prevalence of vitamin D deficiency in pregnant non-Western women in The Hague, Netherlands. *American Journal of Clinical Nutrition* 2006; 84:350–353.

<sup>45</sup> Holick MF. High prevalence of vitamin D inadequacy and implications for health. *Mayo Clin Proc*, 2006;81:353-73.

<sup>46</sup> El-Haajj Fuleihan G. Hypovitaminosis D in healthy schoolchildren. *Pediatrics*, 2001;107.

<sup>47</sup> Holick MF. Resurrection of vitamin D deficiency and rickets. *J Clin Invest*, 2006;116:2062-72.

<sup>48</sup> Gannage-Yared MH. L'hypovitaminosi D, probleme mondial majeur de santé publique. *Presse Méd*, 2001;30:653-8.

<sup>49</sup> Calatayud M. Prevalencia de concentraciones deficientes e insuficientes de vitamina D en una población joven y sana. *Endocrinol Nutr*, 2009;4:164-9.

<sup>50</sup> Gonzalez M. Deficiencia de vitamina D en mujeres en edad fértil. *Aten Primaria*, 2008;40:393-9.

<sup>51</sup> Apperly FL. The relation of solar radiation to cancer mortality in North America. *Cancer Res.* 1941;1:1991.

<sup>52</sup> Garland CF, Comstock GW, Garland FC, Helsing KJ, Shaw EK, Gorham ED. Serum 25-hydroxyvitamin D and colon cancer: eight-year prospective study. *Lancet.* 1989;2(8673):1176.

<sup>53</sup> Nagpal S, Na S, Rathnachalam R. Noncalcemic actions of vitamin D receptors ligands. *Endocr Rev* 2005;36:662-87.

<sup>54</sup> Welsh J. Vitamin D and breast cancer: insights from animal models. *Am J Clin Nutr.* 2004;80(6 Suppl):1721S.

<sup>55</sup> Giovannucci E. The epidemiology of vitamin D and cancer incidence and mortality: a review (United States). *Cancer Causes Control.* 2005;16(2):83.

- 
- <sup>56</sup> IARC. Vitamin D and Cancer. IARC Working Group Reports Vol.5, International Agency for research on Cancer, Lyon. November 2008.
- <sup>57</sup> Bauer SR, Hankinson SE, Bertone-Johnson ER, Ding EL. Plasma vitamin D levels, menopause, and risk of breastcancer: dose-response meta-analysis of prospectivestudies. *Medicine (Baltimore)*. 2013;92(3):123.
- <sup>58</sup> Bouillon R, Van Schoor NM, Gielen E, Boonen S, Mathieu C, Vanderschueren D, Lips P. Optimalvitamin D status: a critical analysis on the basis of evidence-based medicine. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(8):E1283.
- <sup>59</sup> Bjelakovic G, Gluud LL, Nikolova D, Whitfield K, Krstic G, Wetterslev J, Gluud C. Vitamin D supplementation for prevention of cancer in adults. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014;6:CD007469.
- <sup>60</sup> Chung M, Lee J, Terasawa T, Lau J, Trikalinos TA. Vitamin D with or without calcium supplementation for prevention of cancer and fractures: an updated meta-analysis for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med*. 2011;155(12):827.
- <sup>61</sup> Takiishi T, Gysemans C, Bouillon R, Mathieu C. Vitamin D and diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2010;39(2):419.
- <sup>62</sup> Pozzilli P, Manfredi S, Crinò A, Picardi A, Leomanni C, Cherubini V, Valente L, Khazrai M, Visalli N, IMDIAB group. Low levels of 25-hydroxyvitamin D3 and 1,25-dihydroxyvitamin D3 in patients with newly diagnosed type 1 diabetes. *Horm Metab Res*. 2005 Nov;37(11):680-3.
- <sup>63</sup> Mathieu C, Gysemans C, Giulietti A, Bouillon R. Vitamin D and diabetes. *Diabetologia*. 2005;48(7):1247.
- <sup>64</sup> Dong JY, Zhang WG, Chen JJ, Zhang ZL, Han SF, Qin LQ. Vitamin D intake and risk of type 1 diabetes: a meta-analysis of observational studies. *Nutrients*. 2013;5(9):3551.
- <sup>65</sup> Knekt P, Laaksonen M, Mattila C, Härkänen T, Marniemi J, Heliövaara M, Rissanen H, Montonen J, Reunanen A. Serum vitamin D and subsequent occurrence of type 2 diabetes. *Epidemiology*. 2008;19(5):666.
- <sup>66</sup> Liu E, Meigs JB, Pittas AG, Economos CD, McKeown NM, Booth SL, Jacques PF. Predicted 25-hydroxyvitamin D score and incident type 2 diabetes in the Framingham Offspring Study. *Am J Clin Nutr*. 2010;91(6):1627.
- <sup>67</sup> Song Y, Wang L, Pittas AG, Del Gobbo LC, Zhang C, Manson JE, Hu FB. Blood 25-hydroxy vitamin D levels and incident type 2 diabetes: a meta-analysis of prospective studies. *Diabetes Care*. 2013;36(5):1422.
- <sup>68</sup> Nnoaham KE, Clarke A. Low serum vitamin D levels and tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Int J Epidemiol*. 2008;37(1):113.



- 
- <sup>69</sup> Martineau AR, Timms PM, Bothamley GH, Hanifa Y, Islam K, Claxton AP, Packe GE, Moore-Gillon JC, Darmalingam M, Davidson RN, Milburn HJ, Baker LV, Barker RD, Woodward NJ, Venton TR, Barnes KE, Mullett CJ, Coussens AK, Rutterford CM, Mein CA, Davies GR, Wilkinson RJ, Nikolayevskyy V, Drobniowski FA, Eldridge SM, Griffiths CJ. High-dose vitamin D(3) during intensive-phase antimicrobial treatment of pulmonary tuberculosis: a double-blind randomised controlled trial. *Lancet*. 2011;377(9761):242.
- <sup>70</sup> Ginde AA, Mansbach JM, Camargo CA Jr. Association between serum 25-hydroxyvitamin D level and upper respiratory tract infection in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Arch Intern Med*. 2009;169(4):384.
- <sup>71</sup> Rees JR, Hendricks K, Barry EL, Peacock JL, Mott LA, Sandler RS, Bresalier RS, Goodman M, Bostick RM, Baron JA. Vitamin D3 supplementation and upper respiratory tract infections in a randomized, controlled trial. *Clin Infect Dis*. 2013;57(10):1384.
- <sup>72</sup> Theodoratou E, Tzoulaki I, Zgaga L, Ioannidis JP. Vitamin D and multiple health outcomes: umbrella review of systematic reviews and meta-analyses of observational studies and randomised trials. *BMJ*. 2014;348:g2035.
- <sup>73</sup> Beveridge LA, Struthers AD, Khan F, Jorde R, Scragg R, Macdonald HM, Alvarez JA, Boxer RS, Dalbeni A, Gepner AD, Isbel NM, Larsen T, Nagpal J, Petchey WG, Stricker H, Strobel F, Tangpricha V, Toxqui L, Vaquero MP, Wamberg L, Zittermann A, Witham MD, D-PRESSURE Collaboration. Effect of Vitamin D Supplementation on Blood Pressure: A Systematic Review and Meta-analysis incorporating individual patient data. *JAMA Intern Med*. 2015 May;175(5):745-54.
- <sup>74</sup> Ponsonby AL, McMichael A, van der Mei I. Ultraviolet radiation and autoimmune disease: insights from epidemiological research. *Toxicology*, 2002;181-182:71-78.
- <sup>75</sup> Munger KL, Levin LI, Hollis BW, Howard NS, Ascherio A. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *JAMA*, 2006;296:2832-2838.
- <sup>76</sup> Merlino LA, Curtis J, Mikuls TR, Cerhan JR, Criswell LA, Saag KG. Vitamin D intake is inversely associated with rheumatoid arthritis: results from the Iowa Women's Health Study. *Arthritis Rheum*, 2004;50:72-77.
- <sup>77</sup> McAlindon TE, Felson DT, Zhang Y, et al. Relation of dietary intake and serum levels of vitamin D to progression of osteoarthritis of the knee among participants in Framingham Study. *Ann Intern Med*, 1996;125:353-359.
- <sup>78</sup> Lange NE, Litonjua A, Hawrylowicz CM, Weiss S. Vitamin D, the immune system and asthma. *Expert Rev Clin Immunol*. 2009;5(6):693.
- <sup>79</sup> Gale CR, Robinson SM, Harvey NC, Javaid MK, Jiang B, Martyn CN, Godfrey KM, Cooper C, Princess Anne Hospital Study Group. Maternal vitamin D status during pregnancy and child outcomes. *Eur J Clin Nutr*. 2008;62(1):68.

- 
- <sup>80</sup> Castro M, King TS, Kunselman SJ, Cabana MD, et al., National Heart, Lung, and Blood Institute's AsthmaNet. Effect of vitamin D3 on asthma treatment failures in adults with symptomatic asthma and lower vitamin D levels: the VIDA randomized clinical trial. *JAMA*. 2014 May;311(20):2083-91.
- <sup>81</sup> Arshi S, Fallahpour M, Nabavi M, Bemanian MH, Javad-Mousavi SA, Nojomi M, Esmaeilzadeh H, Molatefi R, Rekabi M, Jalali F, Akbarpour N. The effects of vitamin D supplementation on airway functions in mild to moderate persistent asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2014 Oct;113(4):404-9.
- <sup>82</sup> Chawes BL, Bønnelykke K, Stokholm J, et al. Effect of Vitamin D3 Supplementation During Pregnancy on Risk of Persistent Wheeze in the Offspring: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2016 Jan;315(4):353-61.
- <sup>83</sup> Litonjua AA, Carey VJ, Laranjo N, et al. Effect of Prenatal Supplementation With Vitamin D on Asthma or Recurrent Wheezing in Offspring by Age 3 Years: The VDAART Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2016 Jan;315(4):362-70.
- <sup>84</sup> McGrath J. Does 'imprinting' with low prenatal vitamin D contribute to the risk of various adult disorders?. *Med Hypotheses*. 2001;56(3):367.
- <sup>85</sup> Lee DM, Tajar A, O'Neill TW, O'Connor DB, Bartfai G, Boonen S, Bouillon R, Casanueva FF, Finn JD, Forti G, Giwercman A, Han TS, Huhtaniemi IT, Kula K, Lean ME, Punab M, Silman AJ, Vanderschueren D, Wu FC, Pendleton N, EMAS study group. Lower vitamin D levels are associated with depression among community-dwelling European men. *J Psychopharmacol*. 2011;25(10):1320.
- <sup>86</sup> Balion C, Griffith LE, Striffler L, Henderson M, Patterson C, Heckman G, Llewellyn DJ, Raina P. Vitamin D, cognition, and dementia: a systematic review and meta-analysis. *Neurology*. 2012;79(13):1397.
- <sup>87</sup> MacLaughlin J, Holick MF. Aging decreases the capacity of human skin to produce vitamin D3. *J Clin Invest*. 1985;76(4):1536.
- <sup>88</sup> Czernichow S, Fan T, Nocea G, Sen SS. Calcium and vitamin D intake by postmenopausal women with osteoporosis in France. *Curr Med Res Opin*. 2010 Jul;26(7):1667-74.
- <sup>89</sup> Yetley EA. Assessing the vitamin D status of the US population. *Am J Clin Nutr*. 2008;88(2):558S.
- <sup>90</sup> Joshi D, Center JR, Eisman JA. Vitamin D deficiency in adults. *Australian Prescriber*. 2010;33(4):103-6.
- <sup>91</sup> Rosen CJ. Vitamin D Insufficiency. *N Engl J Med*. 2011;364:248-54.

- 
- <sup>92</sup> Thiex NW, Kalkwarf HJ, Specker BL. Vitamin D Metabolism in Pregnancy and Lactation. Vitamin D, 3rd ed. Elsevier, 2011: 279-344.
- <sup>93</sup> Tamblyn JA, Hewinaon M, Wagner CL, Bulmer JN, Kilby MD. Immunological role of vitamin D at the maternal-fetal interface. *J Epidemiol*, 2015 Mar;224(3):R107-21. doi: 10.1530/JOE-14-0642.
- <sup>94</sup> González Solanellas M, Romagosa Pérez-Portabella A, Zabaleta del Olmo E, Gudiña Escudero N, Pozo Díaz C, Moreno Feliu R, et al. Deficiencia de vitamina D en mujeres en edad. *Atención Primaria*, 2008;40:393–399.
- <sup>95</sup> Pérez-López FR, Fernández-Alonso AM, Ferrando-Marco P, González-Salmeron MD, Dionis-Sánchez EC, Fijol-Ruiz G, et al. First-trimester serum 25-hydroxyvitamin D status and factors related to lower levels in gravid living in the Spanish Mediterranean coast. *Reproductive Sciences* 2011; 18:730–736.
- <sup>96</sup> Vandevijvere S, Amsalkhir S, Van Oyen H, Moreno-Reyes R. High prevalence of vitamin D deficiency in pregnant women: a national cross-sectional survey. *PLoS ONE* 2012; 7:e43868.
- <sup>97</sup> McAree T, Jacobs B, Manickavasagar T, Sivalokanathan S, Brennan L, Bassett P, et al. Vitamin D deficiency in pregnancy - still a public health issue. *Maternal and Child Nutrition* 2013; 9:23–30.
- <sup>98</sup> Bjørn Jensen C, Thorne-Lyman AL, Vadgaard Hansen L, Strøm M, Odgaard Nielsen N, Cohen A, et al. Development and validation of a vitamin D status prediction model in Danish pregnant women: a study of the Danish National Birth Cohort. *PLoS ONE* 2013;8:e53059.
- <sup>99</sup> Wang TJ, Zhang F, Richards JB, Kestenbaum B, van Meurs JB, Berry D, et al. Common genetic determinants of vitamin D insufficiency: a genome-wide association study. *Lancet* 2010; 376:180–188.
- <sup>100</sup> Andersen L, Abrahamsen B, Dalgard C, Kyhl H, Beck-Nielsen S, Frost-Nielsen M, et al. Parity and tanned white skin as novel predictors of vitamin D status in early pregnancy: a population-based cohort study. *Clinical Endocrinology (Oxford)* 2013; 79:333–341.
- <sup>101</sup> Holmes V, Barnes MS, Alexander HD, McFaul P, Wallace JMW. Vitamin D deficiency and insufficiency in pregnant women: a longitudinal study. *British Journal of Nutrition* 2009; 102:876–881.
- <sup>102</sup> Zhao G, Ford ES, Tsai J, Li C, Croft JB. Factors Associated with Vitamin D Deficiency and Inadequacy among Women of Childbearing Age in the United States. *ISRN Obstetrics and Gynecology* 2012; 2012:691486.
- <sup>103</sup> Jensen CB, Petersen SB, Granstrøm C, Maslova E, Mølgaard C, Olsen SF. Sources and determinants of vitamin D intake in Danish pregnant women. *Nutrients* 2012; 4:259–272.
- <sup>104</sup> Morabia A, Berstein MS, Antonini S. Smoking, dietary calcium and vitamin D deficiency in

---

women: a population-based study. *European Journal of Clinical Nutrition* 2000;54:684–689.

<sup>105</sup> Johnson DD, Wagner CL, Hlsey TC, McNeil RB, Ebeling M, Hollis BW. Vitamin D deficiency and insufficiency is common during pregnancy. *American Journal of Perinatology* 2011; 28:7–12.

<sup>106</sup> van den Berg G, van Eijdsden M, Vrijkotte TG, Gemke RJ. Suboptimal maternal vitamin D status and low education level as determinants of small-for-gestational-age birth weight. *European Journal of Nutrition* 2013; 52:273–279.

<sup>107</sup> Brot C, Jogensen NR, Sorensen OH. The influence of smoking on vitamin D status and calcium metabolism. *European Journal of Clinical Nutrition* 1999; 53:920–926.

<sup>108</sup> Hollis BW, Wagner CL. Assessment of dietary vitamin D requirements during pregnancy and lactation. *American Journal of Clinical Nutrition* 2004; 79:717–726.

<sup>109</sup> Holick MF. Vitamin D status: measurement, interpretation, and clinical application. *Annals of Epidemiology* 2009;19:73–78.

<sup>110</sup> Clifton-Bligh RJ, McElduff P, McElduff A. Maternal vitamin D deficiency, ethnicity and gestational diabetes. *Diabet Med* 2008;25:678–84.

<sup>111</sup> Zhang C, Qiu C, Hu FB, David RM, van Dam RM, Bralley A, et al. Maternal plasma 25-hydroxyvitamin D concentrations and the risk for gestational diabetes mellitus. *PLoS One* 2008;3:e3753.

<sup>112</sup> Farrant HJ, Krishnaveni GV, Hill JC, Boucher BJ, Fisher DJ, Noonan K, et al. Vitamin D insufficiency is common in Indian mothers but is not associated with gestational diabetes or variation in newborn size. *Eur J Clin Nutr* 2009;63:646–52.

<sup>113</sup> Makgoba M, Nelson SM, Savvidou M, Messow CM, Nicolaides K, Sattar N. First-trimester circulating 25-hydroxyvitamin D levels and development of gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2011;34:1091–3.

<sup>114</sup> Parlea L, Bromberg IL, Feig DS, Vieth R, Merman E, Lipscombe LL. Association between serum 25-hydroxyvitamin D in early pregnancy and risk of gestational diabetes mellitus. *Diabet Med* 2012;29:e25-32.

<sup>115</sup> Poel YHM, Hummel P, Lips P, Stam F, Van der Ploeg T, Simsek S. Vitamin D and gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Intern Med* 2012;23:465–9.

<sup>116</sup> Halhali A, Tovar AR, Torres N, Bourges H, Garabedian M, Larrea F. Preeclampsia is associated with low circulating levels of insulin-like growth factor I and 1,25-dihydroxyvitamin D in maternal and umbilical cord compartments. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:1828–33.

<sup>117</sup> Bodnar LM. Maternal vitamin D deficiency increases the risk of preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:3517–22.

- 
- <sup>118</sup> Robinson CJ, Wagner CL, Hollis BW, Baatz JE, Johnson DD. Maternal vitamin D and fetal growth in early-onset severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2011;204:556.e1–4.
- <sup>119</sup> Bodnar LM, Krohn MA, Simhan HN. Maternal vitamin D deficiency is associated with bacterial vaginosis in the first trimester of pregnancy. *J Nutr* 2009;139:1157–61.
- <sup>120</sup> Hensel KJ, Randis TM, Gelber SE, Ratner AJ. Pregnancy-specific association of vitamin D deficiency and bacterial vaginosis. *Am J Obstet Gynecol* 2011;204:41.e1-9.
- <sup>121</sup> Grant WB. Adequate vitamin D during pregnancy reduces the risk of premature birth by reducing placental colonization by bacterial vaginosis species. *MBio* 2011;2:e00022-11.
- <sup>122</sup> Merewood A, Mehta SD, Chen TC, Bauchner H, Holick MF. Association between vitamin D deficiency and primary cesarean section. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:940–5.
- <sup>123</sup> Scholl TO, Chen X, Stein P. Maternal vitamin D status and delivery by cesarean. *Nutrients* 2011;4:319–30.
- <sup>124</sup> Leffelaar ER, Vrijkotte TG, van Eijsden M. Maternal early pregnancy vitamin D status in relation to fetal and neonatal growth: results of the multi-ethnic Amsterdam Born Children and their Development cohort. *Br J Nutr* 2010;104:108–17.
- <sup>125</sup> van den Berg G, van Eijsden M, Vrijkotte TG, Gemke RJ. Suboptimal maternal vitamin D status and low education level as determinants of small-for-gestational-age birth weight. *Eur J Nutr* 2013;52:273–9.
- <sup>126</sup> TePoel MR. Association of seasonality with hypertension in pregnancy: a systematic review. *J Reprod Immunol*, 2011;89:140-152.
- <sup>127</sup> Christesen, H.T., Falkenberg, T., Lamont, R.F., Jorgensen, J.S. The impact of vitamin D on pregnancy: a systematic review. *Acta Obs. Gynecol. Scand.* 2012;91 (12), 1357–1367.
- <sup>128</sup> Aghajafari F, Nagulesapillai T, Ronksley PE, Tough SC, O’Beirne M, Rabi DM. Association between maternal serum 25-hydroxyvitamin D level and pregnancy and neonatal outcomes: systematic review and meta-analysis of observational studies. *BMJ* 2013;346:f1169.
- <sup>129</sup> Wei, S.Q., Qi, H.P., Luo, Z.C., Fraser, W.D. Maternal vitamin D status and adverse pregnancy outcomes: a systematic review and meta-analysis. *J. Matern. Fetal Neonatal Med.* 2013;26 (9), 889–899.
- <sup>130</sup> Harvey N.C, Holroyd C, Ntani G., et al. Vitamin D supplementation in pregnancy: a systematic review. *Health Technol. Assess.* 2014;18 (45), 1–190.
- <sup>131</sup> Savvidou MD, Akolekar R, Samaha RB, Masconi AP, Nicolaidis KH. Maternal serum 25-hydroxyvitamin D levels at 11+0 –13+6 weeks in pregnant women with diabetes mellitus and in those with macrosomic neonates. *BJOG* 2011;118:951–5.

- 
- <sup>132</sup> Baker AM, Haeri S, Camargo CA, Stuebe AM, Boggess KA. First-trimester maternal vitamin D status and risk for gestational diabetes (GDM): a nested case-control study. *Diabetes Metab Res Rev* 2012;28:164–8.
- <sup>133</sup> Fichorova RN, Onderdonk AB, Yamamoto H, Delaney ML, DuBois AM, Allred E, et al. Maternal microbe-specific modulation of inflammatory response in extremely low-gestational-age newborns. *MBio* 2011;2:e00280-10.
- <sup>134</sup> Baker AM, Haeri S, Camargo CA, Stuebe AM, Boggess KA. A nested case-control study of first-trimester maternal vitamin D status and risk for spontaneous preterm birth. *Am J Perinatol* 2011;28:667–72.
- <sup>135</sup> Shibata M, Suzuki A, Sekiya T, Sekiguchi S, Asano S, Udagawa Y, et al. High prevalence of hypovitaminosis D in pregnant Japanese women with threatened premature delivery. *J Bone Miner Metab* 2011;29:615–20.
- <sup>136</sup> Fernández-Alonso AM, Dionis-Sánchez EC, Chedraui P, González-Salmerón MD, Pérez-López FR; Spanish Vitamin D and Women's Health Research Group. First-trimester maternal serum 25-hydroxyvitamin D3 status and pregnancy outcome. *Int J Gynaecol Obstet* 2012;116:6–9.
- <sup>137</sup> Papandreou L, Chasiotis G, Seferiadis K, Thanasoulis NC, Dousias V, Tsanadis G, et al. Calcium levels during the initiation of labor. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004;115:17–22.
- <sup>138</sup> ACOG Committee on Obstetric Practice. ACOG Committee Opinion No. 495: Vitamin D: Screening and supplementation during pregnancy. *Obstet Gynecol.* 2011;118(1):197.
- <sup>139</sup> De-Regil LM, Palacios C, Lombardo LK, Peña-Rosas JP. Vitamin D supplementation for women during pregnancy. *Cochrane Database Syst Rev.* 2016.
- <sup>140</sup> Guxens M, Ballester F, Espada M, Fernández MF, Grimalt JO, Ibarluzea J, et al. Cohort Profile: the INMA – Infancia y MedioAmbiente (Environment and Childhood) – Project. *Int J Epidemiol* 2012;41:930–40.
- <sup>141</sup> Instruction manual BIO-RAD. 25(OH)-vitamin D3 by HPLC. Munchen, Germany: Laboratories GmbH, 2003.
- <sup>142</sup> National Diabetes Data Group. Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. *Diabetes* 1979;28:1039–57.
- <sup>143</sup> Westerway SC, Davison A, Cowell S. Ultrasonic fetal measurements: new Australian standards for the new millennium. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2000;40:297–302.
- <sup>144</sup> Carrascosa A, Yeste D, Copil A, Almar J, Salcedo S, Gussinye M. Anthropometric growth patterns of preterm and full-term newborns (24–42 weeks' gestational age) at the Hospital Materno Infantil Valld'Hebron (Barcelona) (1997–2002). *An Pediatr (Barc)* 2004;60:406–16.

- 
- <sup>145</sup> Mamelle N, Cochet V, Claris O. Definition of fetal growth restriction according to constitutional growth potential. *Biol Neonate* 2001;80:277–85.
- <sup>146</sup> Clasificación Nacional de Ocupaciones 1994. Instituto Nacional de Estadística. Disponible a: <http://www.ine.es/clasifi/ficno.htm>
- <sup>147</sup> Vioque J, Navarrete-Muñoz EM, Gimenez-Monzón D, García-de-la-Hera M, Granado F, Young IS, et al. Reproducibility and validity of a food frequency questionnaire among pregnant women in a Mediterranean area. *Nutrition Journal* 2013; 12:26.
- <sup>148</sup> Palma I, Farran P, Cervera P. Tablas de composición de Alimentos por medidas caseras de consumo habitual en España. Mc Graw Hill Interamericana, CESNID: Madrid, 2008.
- <sup>149</sup> U.S. Department of Agriculture. Agricultural Research Service. (USDA National Nutrient Database for Standard Reference. Disponible a [http://www.ars.usda.gov/Main/site\\_main](http://www.ars.usda.gov/Main/site_main)
- <sup>150</sup> Mikulich SK, Zerbe GO, Jones RH, Crowley TJ. Comparing linear and nonlinear mixed model approaches to cosinor analysis. *Stat Med* 2003;22:3195–211.
- <sup>151</sup> Morales E, Gascon M, Martinez D, Casas M, Ballester F, Rodríguez-Bernal CL, et al. Associations between blood persistent organic pollutants and 25-hydroxyvitamin D3 in pregnancy. *Environ Int* 2013;57–58:34–41.
- <sup>152</sup> Hastie T, Tibshirani R. Generalized Additive Models. New York: Chapman & Hall; 1990.
- <sup>153</sup> Ricart W, López J, Mozas J, Pericot A, Sancho MA, Gonzalez N, et al. Potential impact of American Diabetes Association criteria for diagnosis of gestational diabetes mellitus in Spain. *Diabetologia* 2005;48:1135–41.
- <sup>154</sup> Thorp JM, Camargo CA, McGee PL, Harper M, Klebanoff MA, Sorokin Y, Varner MW, Wapner RJ, Caritis SN, Iams JD et al. Vitamin D status and recurrent preterm birth: a nested case-control study in high-risk women. *BJOG* 2012;119:1617–1623.
- <sup>155</sup> Nassar N, Halligan GH, Roberts CL, Morris JM, Ashton AW. Systematic review of first-trimester vitamin D normative levels and outcomes of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2011;205:208.e1-7.