

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**EFEITO DE DOSE ÚNICA DE VITAMINA D NAS
CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE CITOCINAS EM
MULHERES IDOSAS NA PÓS-MENOPAUSA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Márcia Regina Rosa Scalcon

**Santa Maria, RS, Brasil
2014**

**EFEITO DE DOSE ÚNICA DE VITAMINA D NAS
CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE CITOCINAS EM
MULHERES IDOSAS NA PÓS-MENOPAUSA**

por

Márcia Regina Rosa Scalcon

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Farmacologia

ORIENTADORA: Prof^ª. Dr^ª. Melissa Orlandin Premaor
COORIENTADOR: Prof. Dr. Rafael Noal Moresco

Santa Maria, RS, Brasil
2014

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Scalcon, Márcia Regina Rosa
Efeito de dose única de vitamina D nas concentrações
séricas de citocinas em mulheres idosas na pós-menopausa
/ Márcia Regina Rosa Scalcon.-2014.
92 p.; 30cm

Orientador: Melissa Orlandin Premaor
Coorientador: Rafael Noal Moresco
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia, RS, 2014

1. Vitamina D 2. Imunologia 3. Idosos I. Premaor, Melissa
Orlandin II. Moresco, Rafael Noal III. Título.

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**EFEITO DE DOSE ÚNICA DE VITAMINA D NAS CONCENTRAÇÕES
SÉRICAS DE CITOCINAS EM MULHERES IDOSAS NA PÓS-
MENOPAUSA**

elaborada por
Márcia Regina Rosa Scalcon

como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Farmacologia

COMISSÃO EXAMINADORA

Melissa Orlandin Premaor, Dr^a. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)

Charles Lubianca Kohem, Dr. (UFRGS)

Roselei Fachinetto, Dr^a. (UFSM)

Santa Maria, 07 de março de 2014.

Dedico este trabalho:

Aos meus pais, irmã, sogra, sogro (in memoriam) e, sobretudo, ao meu querido esposo pelo incentivo, afeto e compreensão destinados a mim durante todo o período de elaboração desta dissertação de mestrado.

AGRADECIMENTOS

À minha querida orientadora, professora Melissa Orlandin Premaor pela dedicação, carinho, paciência e seriedade em transmitir seus conhecimentos sobre vitamina D e pesquisa clínica.

Ao professor Rafael Noal Moresco pela sua disponibilidade, dedicação e organização durante as coletas bioquímicas e pelas dicas valiosas na elaboração desta dissertação.

À professora Marta Maria Medeiros Frescura Duarte pela sua participação fundamental na realização das dosagens das citocinas e da vitamina D.

Ao professor Fábio Vasconcellos Comim pela sua participação durante as visitas de coletas e pelas dicas importantes durante a pesquisa.

À equipe do Labclin, Naiara dos Santos Guarda e José Antonio Mainardi de Carvalho pelo auxílio nas coletas de sangue e no processamento das amostras e, sobretudo, a Manuela Borges Sangoi pelo seu trabalho, dedicação e carinho tanto na execução do trabalho bioquímico, quanto acadêmico.

Aos alunos do curso de medicina, Pietra Zorzo, Lucas Venturini Zottele, Karen Koff da Costa, Priscila Obregon Borges, Luciana Leiria de Almeida, Aline Rubin Cocco, Antonio Aurelio da Silveira Codevilla, Giovani Ricardo Ruviano Sartori e Felipe Welter Langer pelo auxílio imprescindível no recrutamento e seleção dos pacientes, aplicação dos questionários, coletas de sangue e organização do banco de dados.

Ao padre Zalmiro Francisco Dubal (padre Chico) pelo seu acolhimento e por ceder sua paróquia para a realização do nosso estudo.

Ao colega Marcelo Salame por ceder a lista de contatos do seu estudo, facilitando nosso recrutamento de pacientes.

A todas as senhoras voluntárias que se dispuseram a acordar cedo e a encarar todo o processo da pesquisa, meu eterno agradecimento.

À professora Roseane Cardoso Marchiori pela amizade e pelo incentivo pela formação acadêmica.

À professora Cátia Margarete Domingues Góti pela sua escuta especializada nos momentos difíceis.

Aos professores de reumatologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, em especial ao professor Sebastião César Radominski pelos ensinamentos sobre

vitamina D e ao professor Eduardo dos Santos Paiva pelos ensinamentos em reumatologia e imunologia.

Aos meus familiares e amigos por suportarem minha ausência e pelo carinho incondicional.

Ao meu esposo, Gustavo Müller, que foi meu grande companheiro em todas as fases importantes da minha vida, pelo seu amor, sua compreensão e sua ajuda fundamentais nos momentos alegres e difíceis da elaboração desta dissertação, meu muito obrigada.

*“A água faz maravilhas,
o ar pode fazer coisas ainda maiores,
mas a luz é milagrosa.”*

Arnold Rikli

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia
Universidade Federal de Santa Maria

EFEITO DE DOSE ÚNICA DE VITAMINA D NAS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE CITOCINAS EM MULHERES IDOSAS NA PÓS-MENOPAUSA

AUTORA: MÁRCIA REGINA ROSA SCALCON
ORIENTADORA: PROF^a. DR^a. MELISSA ORLANDIN PREMAOR
COORIENTADOR: PROF. DR. RAFAEL NOAL MORESCO

Local e Data da Defesa: Santa Maria, 07 de março de 2014.

A vitamina D é um importante imunomodulador. Estudos epidemiológicos têm demonstrado que a deficiência de vitamina D prejudica as funções imunológicas e participa na patogênese de doenças infecciosas e autoimunes. A suplementação de vitamina D tem demonstrado significativas alterações nas concentrações circulantes de marcadores inflamatórios em diferentes condições clínicas. No entanto, o efeito de dose única e elevada de vitamina D₃ no sistema imune de pessoas idosas, permanece obscuro. Nós realizamos um ensaio clínico, randomizado, duplo-cego, controlado por placebo para avaliar o possível efeito benéfico de uma dose oral única de 300.000 UI de vitamina D₃ em marcadores inflamatórios em mulheres idosas na pós-menopausa. Um total de 40 mulheres com idade superior a 60 anos foram selecionados para receber 300.000 UI de colecalciferol (n = 20) ou placebo (n = 20) no início do estudo. As dosagens de 25-hidroxivitamina D séricas [25(OH)D] foram semelhantes em ambos os grupos no início do estudo [16,4 ng/ml (\pm 3,8) no grupo vitamina D e 15 ng/ml (\pm 3,7) no grupo placebo, $p = 0,23$]. Os níveis séricos de IL-6, TNF- α e IL-10 foram medidos por ELISA no início do estudo e 30, 60 e 90 dias após a intervenção. No grupo da vitamina D, verificou-se uma diminuição significativa na percentagem média dos níveis de IL-6 (30.8 %, $p = 0.006$) e TNF- α (48.6 %, $p < 0.0001$), associada com um aumento percentual médio significativo nos níveis de IL-10 (68.4 %, $p < 0.0001$) após 90 dias. Concluimos que uma dose oral única de 300.000 UI de colecalciferol, em um curto espaço de tempo, é capaz de melhorar o perfil das citocinas em mulheres idosas com deficiência de vitamina D.

Palavras-chave: Colecalciferol; Citocinas; Deficiência de vitamin D; Idosos.

ABSTRACT

Master Dissertation
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia
Universidade Federal de Santa Maria

EFFECT OF A SINGLE ORAL DOSE OF VITAMIN D ON SERUM CYTOKINES CONCENTRATIONS IN ELDERLY POST-MENOPAUSAL WOMEN

AUTHOR: MÁRCIA REGINA ROSA SCALCON
ADVISOR: PROF^a. DR^a. MELISSA ORLANDIN PREMAOR
CO-ADVISOR: PROF. DR. RAFAEL NOAL MORESCO

Place and Date: Santa Maria, March 07, 2014.

Vitamin D is an important immunomodulator. Epidemiological studies have shown that vitamin D deficiency impairs the immune functions and participates in the pathogenesis of infectious and autoimmune diseases. Vitamin D supplementation has shown significant changes on circulating concentrations of inflammatory markers in different clinical conditions. However, the effect of single large-dose of vitamin D₃ in immune system in elderly people remains unclear. We carried out a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial to evaluate the possible benefic effect of single oral dose of 300.000 IU of vitamin D₃ on inflammatory markers in elderly post-menopausal women. A total of 40 women aged over 60 years were selected to receive 300.000 IU of cholecalciferol (n = 20) or placebo (n = 20) at baseline. Serum 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D] were similar in both group at baseline [16.4 ng/ml (\pm 3.8) in vitamin D group and 15 ng/ml (\pm 3.7) in placebo groups, $p = 0.23$]. Serum levels of IL-6, TNF- α and IL-10 were measured by ELISA at baseline, and 30, 60 and 90 days after intervention. In the vitamin D group, we found a significant median percent decline in levels of IL-6 (30.8%, $p = 0.006$) and TNF- α (48.6%, $p < 0.0001$), associated with a significant median percent increase in levels of IL-10 (68.4%, $p < 0.0001$) after 90 days. We concluded that a single oral dose of 300.000 IU of cholecalciferol, in the short time, is able to improve the cytokines profile in elderly women with vitamin D deficiency.

Keywords: Cholecalciferol; Cytokines; Vitamin D deficiency; Elderly.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Exemplos de fontes naturais de vitamina D em unidades internacionais (UI)...	19
Tabela 2-	<i>Status</i> de vitamina D em relação aos valores séricos de 25(OH)D.....	28
Tabela 3-	Estudos clínicos com avaliação de IL-6, TNF- α e/ou IL-10 séricas após o uso de vitamina D.....	39

ARTIGO

Tabela 1-	Baseline characteristics of subjects treated with single dose of vitamin D ₃ or placebo.....	70
-----------	---	----

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	Síntese de vitamina D.....	20
Figura 2-	Mecanismo da ação genômica da vitamina D.....	22
Figura 3-	Fisiologia da vitamina D.....	24
Figura 4-	Ação da vitamina D em monócitos / macrófagos.....	30
Figura 5-	Ação da vitamina D nas DCs.....	31
Figura 6-	Mecanismos de ação da vitamina D nos linfócitos T.....	33
Figura 7-	Efeitos da 1,25(OH) ₂ D nas células T e suas citocinas.....	37
Figura 8-	Efeitos da 1,25(OH) ₂ D nas citocinas produzidas por monócitos, macrófagos e DCs.....	38
Quadro 1-	Principais causas de hipovitaminose D.....	25
Quadro 2-	Condições clínicas que necessitam triagem de 25(OH)D.....	28
Quadro 3-	Sinais e sintomas da intoxicação por vitamina D.....	47

ARTIGO

Figura 1-	Flow-chart of the study.....	71
Figura 2-	Comparison of the effect of single oral dose of vitamin D and placebo, on serum cytokines levels, from baseline to day 90.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1,25(OH)₂D: 1,25 - dihidroxivitamina D

25(OH)D: 25 - hidroxivitamina D

Ac: anticorpo

Ag: antígeno

APC: *antigen-presenting cell* (célula apresentadora de antígeno)

AR: artrite reumatóide

BRAZOS: *The Brazilian Osteoporosis Study*

CD: *cluster of differentiation*

CTLs: *cytotoxic T lymphocyte* (linfócitos T citotóxicos)

DBP: *vitamin D binding protein* (proteínas ligadoras de vitamina D)

DC: *dendritic cell* (célula dendrítica)

DEFB4: *defensin beta 4* (beta defensina 4)

DM1: *diabetes mellitus* do tipo 1

DRI: *dietary reference intake*

EM: esclerose múltipla

IL: interleucina

IMC: índice de massa corporal

INF-1: interferon do tipo 1

INF- γ : interferon do tipo gama

IOM: *Institute of Medicine* (Instituto de Medicina)

LES: lupus eritematoso sistêmico

LPS: lipopolissacarídeo

MIP3- α : *macrophage inflammatory protein-3 alpha*

MHC II: *major histocompatibility complex II* (complexo principal de histocompatibilidade II)

NF- κ B: *nuclear factor kappa B* (fator nuclear kappa B)

NGAL: *neutrophil gelatinase-associated lipocalin*

P1NP: *procollagen type 1 amino-terminal propeptide* (propeptídeo procolágeno tipo 1 amino-terminal)

PAMPs: *pathogen-associated molecular patterns* (padrões moleculares associados a patógenos)

RANK: *receptor activator of nuclear factor- κ B* (receptor ativador do NF- κ B)

RANKL: *receptor activator of nuclear factor- κ B ligand* (ligante do receptor ativador do NF- κ B)

RDA: *recommended dietary allowance*

RxR: *retinoic acid X receptor* (receptor de ácido retinóide do tipo X)

SPADE: *São Paulo Vitamin D Evaluation Study*

TFH: *T follicular helper cells* (células T *helper* foliculares)

Th: *T helper cells* (células T auxiliares)

TLR: *Toll like receptors* (receptores semelhantes a Toll)

TNF- α : tumor necrosis factor alpha (fator de necrose tumoral alfa)

Treg: células T reguladoras

UI: unidades internacionais

UL: *tolerable upper intake level* (nível máximo de ingestão tolerável)

UVB: radiação ultravioleta B

VDR: *vitamin D receptor* (receptor de vitamina D)

VDRE: *vitamin D-responsive element* (elementos de resposta à vitamina D)

LISTA DE ANEXOS

Anexo A-	Carta de aprovação do protocolo de pesquisa	87
Anexo B-	Comprovante de submissão do artigo científico	89
Anexo C-	Termo de consentimento livre e esclarecido.....	91
Anexo D-	Termo de confidencialidade.....	92

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Vitamina D – considerações gerais	18
1.2 Síntese, metabolismo e fontes de vitamina D	18
1.3 Receptores de vitamina D	21
1.4 Fisiologia da vitamina D	23
1.5 Causas de hipovitaminose D	24
1.6 Funções clássica e não-clássicas da vitamina D	26
1.7 Definição do <i>status</i> de vitamina D	27
1.8 Vitamina D e o sistema imunológico	29
1.8.1 Vitamina D e o sistema imunológico inato	29
1.8.2 Vitamina D e o sistema imunológico adaptativo	32
1.8.3 Vitamina D e os estados patológicos imunomediados	34
1.8.4 Vitamina D e as citocinas	36
1.9 Recomendações quanto à ingestão e à suplementação de vitamina D.....	43
1.10 Dose única de colecalciferol	44
1.11 Toxicidade da vitamina D	45
1.12 Hipovitaminose D em idosos no Brasil	48
1.13 Importância para o meio.....	49
2 OBJETIVOS	51
3 ARTIGO CIENTÍFICO	52
4 CONCLUSÕES	73
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
6 ANEXOS	87

APRESENTAÇÃO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo, o qual se encontra no item **ARTIGO CIENTÍFICO**. As seções Materiais e Métodos, Resultados e Discussão encontram-se no próprio artigo e representam a íntegra deste estudo. O item **CONCLUSÕES**, encontrado no final desta dissertação, apresenta interpretações e comentários gerais sobre o artigo científico contido neste trabalho. As **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** referem-se somente às citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO** e **CONCLUSÕES** desta dissertação, uma vez que as referências utilizadas para a elaboração do artigo estão mencionadas no próprio artigo.

1 INTRODUÇÃO

A vitamina D é um hormônio secosteróide que apresenta importante ação imunomoduladora (HOLICK, 2005; VAN ETTEN E MATHIEU, 2005; BIKLE, 2009; VERSTUYF et al., 2010; HEWISON, 2010; BAEKE et al., 2010; WOLDEN-KIRK et al., 2012; WACKER e HOLICK, 2013). Esta ação é sugerida pela presença de receptores de vitamina D em quase todas as células do sistema imunológico e, também, pela capacidade destas células de produzir localmente a forma ativa da vitamina D, que exerce funções autócrinas e parácrinas, que influenciam inclusive a produção e a liberação de diferentes citocinas (BIKLE, 2009; HEWISON, 2010; BAEKE et al., 2010; WOLDEN-KIRK et al., 2012). Além destas constatações, diversos estudos epidemiológicos vêm demonstrando que pacientes com deficiência de vitamina D são mais suscetíveis a condições autoimunes como esclerose múltipla (EM) (CANTORNA, 2006; ANTICO, 2012), *diabetes mellitus* do tipo I (DM2) (POZZILI et al., 2005; LITTORIN et al., 2006; MOHR et al., 2008; ANTICO et al., 2012), artrite reumatóide (AR) (GATENBY et al., 2013) e doença de Crohn (CANTORNA, 2006), além de serem mais vulneráveis a certos tipos de infecções como a tuberculose (CHAN, 2000; LIU et al., 2007; NNOAHAM e CLARKE, 2008).

A deficiência de vitamina D é uma condição comum na população geriátrica (WEBB et al., 1990; DAWSON- HUGHES et al., 1997; PREMAOR et al., 2008; BACON et al., 2009), o que pode contribuir para o desequilíbrio das funções imunológicas nesta faixa etária, e conseqüentemente, desencadear condições patológicas. Um dos grandes obstáculos no tratamento da hipovitaminose D em idosos é a baixa aderência à suplementação de doses diárias de vitamina D (PREMAOR et al., 2008). Por isso, doses elevadas e intermitentes deste hormônio vêm sendo pesquisadas recentemente, como uma alternativa segura e eficaz em diversas condições clínicas (KHAW et al., 1994; TRIVEDI et al., 2003; PREMAOR et al., 2008). Entretanto, até o presente momento, não é conhecido o efeito de doses elevadas de vitamina D em marcadores inflamatórios em idosos.

Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar se uma dose única de 300.000 UI de colecalciferol (vitamina D₃) é capaz de alterar a produção das citocinas inflamatórias tais como interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), e da citocina anti-inflamatória interleucina-10 (IL-10), em uma população de mulheres idosas na pós-menopausa, comparando-a com um grupo placebo.

1.1 Vitamina D – considerações gerais

As vitaminas são compostos orgânicos provenientes de fontes exógenas, sobretudo da alimentação, e que participam como cofator enzimático em diversas funções celulares (HUOTARI e HERZIG, 2008). A vitamina D compreende um conjunto de compostos lipossolúveis, tanto de origem vegetal (vitamina D₂ ou ergocalciferol) quanto animal (vitamina D₃ ou colecalciferol), que produz metabólitos ativos com funções biológicas equivalentes (DELUCA, 2004; HUOTARI e HERZIG, 2008).

A vitamina D, no entanto, apresenta algumas peculiaridades que a diferem das demais vitaminas (CESARI et al., 2011). Primeiro, apesar de ser encontrada em alguns tipos de alimentos, a sua principal fonte é proveniente da síntese cutânea em resposta à exposição solar (CESARI et al., 2011; WACKER e HOLICK, 2013). Segundo, a vitamina D apresenta semelhança estrutural e funcional com os esteróides, porém com a ligação desfeita entre os carbonos C9 e C10 no anel B de natureza aromática, sendo portanto, considerada um hormônio secosteróide (WOLF, 2004).

O reconhecimento da presença de receptores de vitamina D (*vitamin D receptor* - VDR) em diferentes células (VAN DRIEL et al., 2006; HEWISON, 2007, 2010), assim como da produção extra-renal de vitamina D (VAN DRIEL et al., 2006; HEWISON, 2007, 2010) têm despertado grande interesse nas pesquisas atuais, com a intenção de compreender melhor os efeitos pleiotrópicos desempenhados por este hormônio, além de averiguar possíveis aplicações terapêuticas e preventivas em diversas condições clínicas em que a hipovitaminose D está associada.

1.2 Síntese, metabolismo e fontes de vitamina D

Até o presente momento sabe-se que a vitamina D pode ser adquirida naturalmente pelos seres humanos através da exposição solar ou da ingestão alimentar, conforme apresentado na Tabela 1 (CESARI et al., 2011; WACKER e HOLICK, 2013). No entanto, sabe-se que a vitamina D proveniente destas fontes necessita passar por dois processos de

hidroxilação para, então, se tornar biologicamente ativa (BROMMAGE e DELUCA, 1985; DELUCA 2008).

Tabela 1 – Exemplos de fontes naturais de vitamina D em unidades internacionais (UI)

Exposição solar de braços e pernas por 5 a 10 minutos ao meio-dia durante os meses de verão	• 3000
1 colher de sopa de óleo de fígado de bacalhau (13.6g)	• 1360
100 g de salmão cozido	• 451
100 g de atum enlatado em óleo	• 269
100 g de sardinha enlatada em óleo	• 193
1 copo de leite intergral com adição de vitamina D (244 g)	• 124
100 g de bacalhau cozido	• 46
1 ovo cru inteiro (44 g)	• 22
100 g de queijo <i>mozzarella</i> feito com leite intergral	• 16
1 copo de leite intergral sem adição de vitamina D (244 g)	• 5

Fonte: Adaptado de Cesari et al., 2011.

A exposição da pele aos raios ultravioletas B (UVB) corresponde a mais de 95% da fonte de vitamina D (CESARI et al., 2011). Os raios solares transformam de forma não enzimática o derivado do colesterol presente na derme, chamado 7-dehidrocolesterol (pró-vitamina D), em pré-vitamina D₃. Esta é isomerizada pelo calor e logo é transformada em vitamina D₃ (colecalfiferol) (HOLICK, 2006, 2007; WACKER e HOLICK, 2013).

Após esta etapa, a vitamina D é ejetada da célula epitelial para o espaço extracelular e, por meio de difusão, entra na corrente sanguínea para se ligar às proteínas ligadoras de vitamina D (*vitamin D binding protein* - DBP) e, em menor proporção, à albumina (JONES et al., 1998). Assim, a vitamina D é então transportada até o fígado, onde sofre a ação da enzima 25 hidroxilase (CYP2R1) que catalisa a hidroxilação do carbono 25 (C-25) da vitamina D, convertendo-a em 25-hidroxivitamina D [25(OH)D] ou calcidiol (ZHU e DELUCA, 2012). Esta é uma forma biologicamente inerte, porém a mais abundante e estável no organismo e, portanto, utilizada para medir o *status* nutricional de vitamina D (DELUCA, 2004; HOLICK, 2007). A 25(OH)D também se liga a proteínas carreadoras e através da corrente sanguínea chega até os túbulos contorcidos proximais dos rins para, então, sofrer a ação da 1 α -

hidroxilase (CYP27B1) ou da 24-hidroxilase (CYP24A1). Os produtos finais são, respectivamente, a 1,25-dihidroxitamina D [1,25(OH)₂D] ou calcitriol, que é a forma ativa da vitamina D, e a 24,25-dihidroxitamina D [24,25(OH)₂D] ou ácido calcitróico, que é um metabólito inativo hidrossolúvel que é excretado na bile (HENRY e NORMAN, 1974; DELUCA, 2008). Os processos associados à síntese da vitamina D podem ser visualizados na Figura 1.

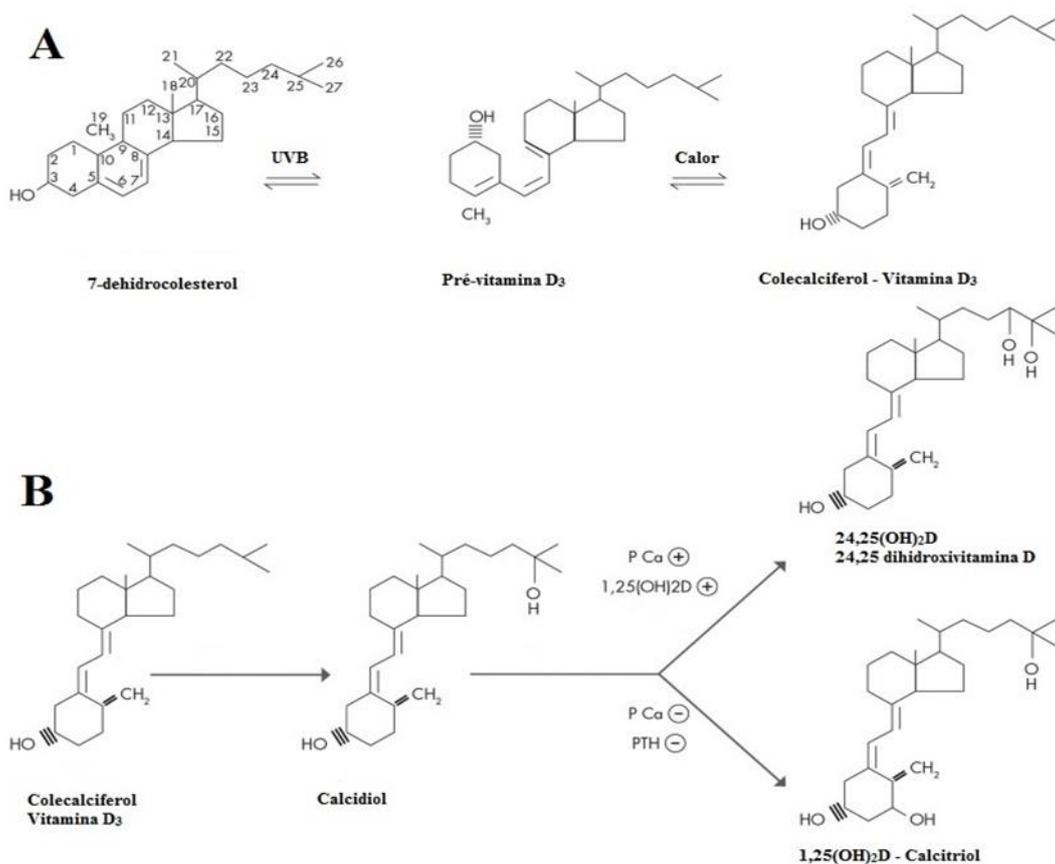


Figura 1 - Síntese de vitamina D.

A: Produção da vitamina D na pele a partir dos raios UVB até a formação do colecalciferol; B: Síntese dos metabólitos da vitamina D [25(OH)D, 24,25(OH)₂D e 1,25(OH)₂D]. Estes processos passam por etapas enzimáticas no fígado e nos rins.

Fonte: Adaptado de Rosen et al., 2012.

Embora de uma forma menos expressiva, a vitamina D pode também ser proveniente da alimentação, nas formas de ergocalciferol (vitamina D₂) e colecalciferol (vitamina D₃). A vitamina D da dieta é emulsificada por sais biliares e incorporada às micelas para então ser absorvida no intestino delgado e ser estocada nos quilomícrons. Os quilomícrons são

absorvidos pelos vasos linfáticos intestinais e através da circulação venosa portal chegam no fígado. A partir daí, a vitamina D sofre as mesmas etapas enzimáticas descritas na via cutânea (HOLICK, 2006).

Os seres humanos ainda podem adquirir a vitamina D através de suplementações orais ou parenterais (LIPS, 2001; HOLICK, 2007). A via parenteral por ser dolorosa e causar equimoses, é pouco utilizada (LIPS, 2001). No Brasil, as formulações orais disponíveis são a base de calcitriol [1,25(OH)₂D] ou de colecalciferol (vitamina D₃). O calcitriol pode causar efeitos calcêmicos exuberantes e, portanto, o seu uso está indicado apenas em condições clínicas específicas como a insuficiência renal crônica (IRC), uma vez que a ação da 1- α hidroxilase renal (CYP27B1) está diminuída nesta doença (FUKAGAWA et al., 2012). Logo, a vitamina D₃ é a suplementação oral mais utilizada no nosso meio.

1.3 Receptores de vitamina D

O metabólito ativo 1,25(OH)₂D exerce suas funções biológicas nos órgãos alvo através da sua ligação aos receptores de vitamina D (VDR) (NORMAN et al., 2001; ROSEN et al., 2012). Há dois tipos diferentes de VDR: o receptor nuclear clássico (responsável por ações genômicas) e o receptor de membrana (responsável por ações não-genômicas) (NORMAN, 2001, 2006).

A 1,25(OH)₂D apresenta uma estrutura molecular flexível que permite uma ampla mobilidade conformacional para se ligar aos seus receptores, às DBPs e aos sítios de ligação enzimática (OKAMURA et al., 1995; NORMAN 2001, 2006). Nas ações genômicas, a 1,25(OH)₂D proveniente da circulação sanguínea atravessa a membrana nuclear e se liga ao VDR e ao fator de transcrição conhecido como receptor X retinóide (RxR) e forma o heterodímero VDR-RxR. Este por sua vez se liga aos elementos de resposta à vitamina D (*vitamin D response elements* - VDRE) e a sequências específicas de DNA que levarão à transcrição de genes através de RNA mensageiro, com consequente formação de proteína (LEMON e FREEDMAN, 1996). Há também moléculas de regulação de transcrição gênica (co-estimuladores e co-repressores) que se ligam a este complexo, estimulando ou inibindo, respectivamente, a ação genômica (OLIVEIRA et al., 2010). Este mecanismo está representado na Figura 2.

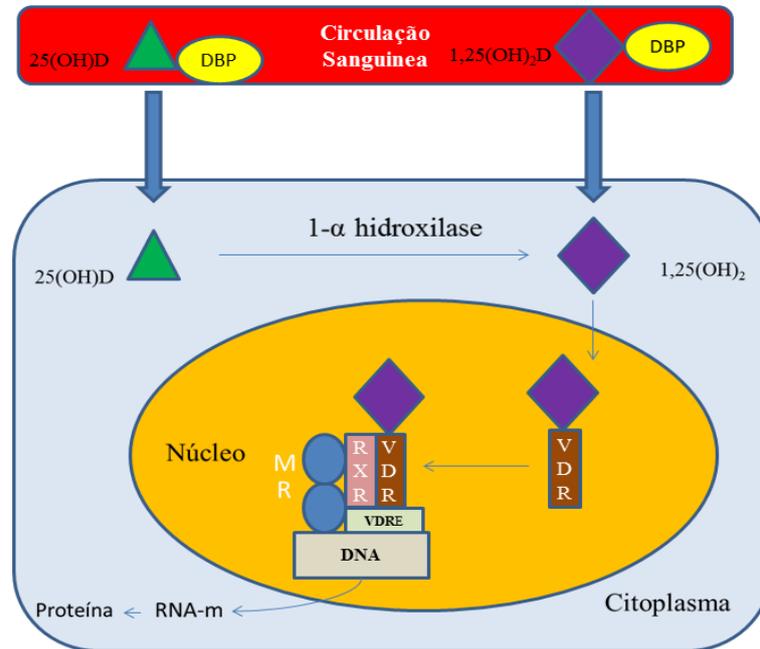


Figura 2 - Mecanismo da ação genômica da vitamina D.

A 25(OH)D e a 1,25(OH)₂D ligadas às DBP na circulação sanguínea penetram na célula alvo. A 25(OH)D pode ser transformada localmente em 1,25(OH)₂D na presença de 1- α hidroxilase. A 1,25(OH)₂D uma vez dentro do núcleo celular se liga ao VDR e ao RxR, formando o heterodímero VDR-RxR. Este se liga aos VDRE e aos sítios de DNA e determinam a transcrição gênica através da formação de RNA-m com consequente produção de proteínas. MR podem ser tanto co-estimuladores quanto co-repressores que se ligam ao heterodímero VDR-RxR, estimulando ou inibindo, respectivamente, a transcrição gênica. Abreviações: DBP (proteína ligadora de vitamina D); VDR (receptor de vitamina D); RxR (receptor X retinóide); VDRE (elementos de resposta à vitamina D); DNA (ácido desoxirribonucléico); MR (moléculas regulatórias da transcrição gênica); RNA-m (ácido ribonucléico mensageiro).

Fonte: Adaptado de Oliveira et al., 2010.

A 1,25(OH)₂D também apresenta respostas rápidas não-genômicas, geradas pela sua ligação com o VDR localizado na membrana celular (NEMERE et al., 2004). A sinalização para esse tipo de resposta biológica acontece por meio da ativação de segundos mensageiros como o AMP cíclico (*cyclic adenosine monophosphate*) ou MAP quinases (*mitogen activated protein kinases*) e pela indução de canais de íons voltagem-dependente como os canais de cálcio e de cloro. (NORMAN et al., 2001).

1.4 Fisiologia da vitamina D

A função biológica principal da vitamina D é manter a homeostase do cálcio e do fósforo, que por sua vez, é garantida graças às interações fisiológicas entre rins, intestino delgado, ossos e glândulas paratireóides (HOLICK, 2006).

Em condições ideais, para garantir a normocalcemia, as glândulas paratireóides são estimuladas a produzir o hormônio da paratireóide (PTH) que, conseqüentemente, irá estimular os rins a sintetizar a enzima 1- α hidroxilase e formar o calcitriol. Este atua no intestino delgado, potencializando a absorção de cálcio e fósforo. Ou seja, o cálcio da dieta que é absorvido somente em 10-15% na ausência de calcitriol, passa a ser 40% na presença deste hormônio. De forma similar, a absorção do fósforo, passa de 60% para 80%, na ausência e na presença de calcitriol, respectivamente. (HOLICK, 2007; WACKER e HOLICK, 2013). A 1,25(OH)₂D também estimula a reabsorção do cálcio nos túbulos contorcidos proximais e distais dos rins, e nos osteoblastos induz a expressão do RANKL (*receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*) que irá se ligar ao RANK (*receptor activator of nuclear factor kappa-B*) presente nos precursores de osteoclastos. Esta interação levará a maturação do osteoclasto, que é uma célula multinucleada capaz de mobilizar cálcio e fósforo dos ossos para a circulação sanguínea. Quando os níveis circulantes de cálcio finalmente atingem a normalidade, o calcitriol inibe a produção do PTH pelas glândulas paratireóides e a sua própria produção subseqüentemente (HOLICK, 2006). A fisiologia da vitamina D está representada na Figura 3.

De forma contrária, nos casos de hipercalcemia, há inibição da produção do PTH, além do aumento da expressão da enzima 24-hidroxilase (24Oase) que cataboliza a 1,25(OH)₂D a ácido calcitróico, que então é excretado pela bile (HOLICK, 2006).

Nota-se, portanto, que a 1,25(OH)₂D apresenta uma autorregulação, além de ser regulada pelas concentrações sanguíneas de cálcio e fósforo e pelos níveis de PTH circulantes (HOLICK, 2006; WACKER e HOLICK, 2013).

Recentemente, vem sendo descrita uma produção extra-renal de 1,25(OH)₂D em diferentes células como as da mama, cólon, próstata, pulmões, células β pancreáticas e células do sistema imunológico (VAN DRIEL et al., 2006; BIKLE, 2009; HEWISON, 2007, 2010). Esta produção diferentemente da produção renal, não é regulada pelo PTH ou pela autorregulação da 1,25(OH)₂D, e sim pelas concentrações do substrato 25(OH)D presentes na

célula em questão e pela ação da 1- α hidroxilase local (VAN DRIEL et al., 2006; HEWISON, 2007, 2010).

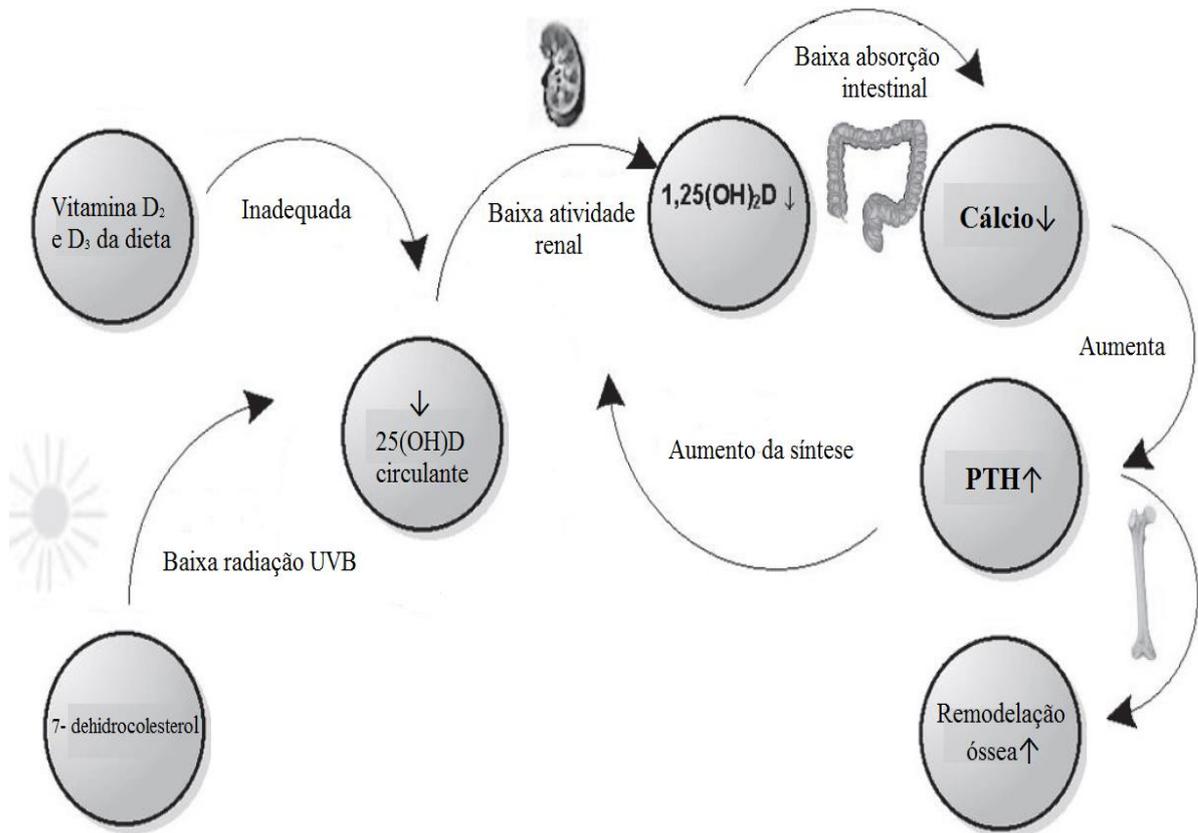


Figura 3 – Fisiologia da vitamina D.

A vitamina D inadequada da dieta ou da baixa exposição solar gera níveis circulantes baixos de 25(OH)D, que por sua vez leva a baixa produção renal de 1,25(OH)₂D e consequente baixa absorção intestinal de cálcio. Os baixos níveis circulantes de cálcio estimulam as paratireóides a produzir o PTH, cuja a ação aumenta a síntese renal de 1,25(OH)₂D e a absorção intestinal de cálcio, bem como aumenta a remodelação óssea, retirando cálcio e fósforo do osso para a circulação sanguínea.

Fonte: Adaptado de Huotari e Herzig, 2008.

1.5 Causas de hipovitaminose D

As causas de hipovitaminose D (deficiência e insuficiência de vitamina D) são várias e são apresentadas no Quadro 1.

<p>Redução da síntese cutânea</p> <ul style="list-style-type: none"> - Uso de bloqueadores solares - Hiperpigmentação cutânea - Envelhecimento - Estações do ano, latitude e horário do dia - Pacientes com enxertos de pele devido a queimaduras
<p>Redução da biodisponibilidade</p> <ul style="list-style-type: none"> - Síndromes de má absorção (fibrose cística, doença celíaca, doença de Whipple, doença de Crohn, desvio cirúrgico do trato digestivo, medicamentos que reduzem a absorção intestinal de colesterol) - Obesidade
<p>Aumento do catabolismo</p> <ul style="list-style-type: none"> - Medicamentos anticonvulsivantes, glicocorticóides, antiretrovirais para o tratamento da AIDS e medicações anti-rejeição de transplantes de órgãos
<p>Amamentação</p> <ul style="list-style-type: none"> - Leite materno é pobre em vitamina D
<p>Diminuição da síntese de 25(OH)D</p> <ul style="list-style-type: none"> - Insuficiência hepática
<p>Aumento da excreção urinária de 25(OH)D</p> <ul style="list-style-type: none"> - Síndrome nefrótica
<p>Diminuição da síntese de 1,25(OH)D</p> <ul style="list-style-type: none"> - Insuficiência renal crônica
<p>Afecções hereditárias (Raquitismo)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Raquitismo dependente de vitamina D tipo 1, 2 e 3 - Raquitismo hipofosfatêmico autossômico dominante - Raquitismo hipofosfatêmico ligado ao X
<p>Afecções adquiridas</p> <ul style="list-style-type: none"> - Osteomalácia induzida por tumores - Hiperparatireoidismo primário - Doenças granulomatosas (sarcoidose, tuberculose e alguns tipos de linfomas) - Hipertireoidismo

Quadro 1 – Principais causas de hipovitaminose D.

Fonte: Modificado de Holick, 2007.

Como percebido, o processo de envelhecimento é uma causa importante de deficiência de vitamina D. Diversos fatores fisiológicos e ambientais estão implicados nas modificações metabólicas da vitamina D nesta faixa etária. Na pele, sabe-se que há uma redução de 7-deidrocolesterol com o avançar da idade, o que provoca, conseqüentemente, uma redução na produção cutânea desse hormônio (HOLICK, 1995). Além disso, pessoas idosas podem

apresentar menor mobilidade, serem institucionalizadas, ou acamadas, dificultando a sua exposição ao sol (LIPS, 2001; BACON et al., 2009). Baixa ingestão alimentar, redução do substrato 25(OH)D, baixa atividade da 1 α -hidroxilase renal e redução de VDRs também são causas possíveis de deficiência de vitamina D na faixa etária geriátrica (GALLAGHER, 2013).

1.6 Funções clássica e não-clássicas da vitamina D

A função clássica da vitamina D no metabolismo ósseo já é bem estabelecida. Em crianças, por exemplo, a deficiência de vitamina D é caracterizada por defeitos na mineralização óssea que leva ao raquitismo, doença cujas características clínicas incluem alargamento das epífises dos ossos longos, rosário raquítico, deformidades ósseas como bossa frontal e *genu varum* e *genu valgum* nos joelhos (HOLICK et al., 2011).

Em adultos a deficiência de vitamina D, leva ao aumento da produção de PTH, que consequentemente estimula a hidroxilação renal de 25(OH)D a 1,25(OH)₂D, e estimula a remodelação óssea. Esta condição clínica é conhecida como hiperparatireoidismo secundário, e bioquimicamente é caracterizada por níveis séricos de cálcio normal ou normal-baixo; 25(OH)D baixo; 1,25(OH)₂D normal; e PTH elevado (HOLICK, 2006). Em estados mais prolongados de deficiência de vitamina D a perda óssea é ainda maior, levando a osteopenia, osteoporose e risco aumentado de fraturas. Além disso, a deficiência de vitamina D promove defeitos na mineralização do osso osteóide que leva a osteomalácia, que clinicamente se apresenta com dor óssea, associada a mialgias e fraqueza muscular (HOLICK et al., 2011).

Nas últimas décadas, pesquisadores têm descrito outras funções ditas não-clássicas da vitamina D, demonstrando o amplo espectro de atividades biológicas deste hormônio (ROSEN et al., 2012; WOLDEN-KIRK et al., 2012). Dentre as principais ações não-clássicas descritas até o momento, destacam-se a regulação do sistema imunológico; o aumento da força muscular; a regulação da função cardiovascular e da pressão arterial; a redução da proliferação de diferentes células cancerosas; a redução de *diabetes mellitus* dos tipos I e II e da síndrome metabólica. Quanto ao sistema imunológico a vitamina D tem participação na resistência a infecções e na prevenção de doenças autoimunes (WOLDEN-KIRK et al., 2012).

1.7 Definição do *status* de vitamina D

A 1,25(OH)₂D apesar de ser 500 a 1000 vezes mais potente que o seu precursor 25(OH)D (CESARI *et al.*, 2011), não costuma ser utilizada para a avaliação da concentração da vitamina D, pois apresenta uma meia-vida curta de 4 a 6 horas, além de apresentar valores circulantes muito baixos. Portanto, o *status* de vitamina D é definido a partir da mensuração da concentração da 25(OH)D sérica, que é a forma circulante mais abundante no organismo, além de apresentar níveis sanguíneos mais estáveis (meia-vida de 2 a 3 semanas) (DELUCA, 2004; HOLICK, 2007, 2009; CESARI *et al.*, 2011).

As definições de deficiência e insuficiência de vitamina D ainda são controversas na literatura. Segundo as recomendações do Instituto de Medicina (*Institute of Medicine – IOM*) de 2010 os níveis séricos de 25(OH)D de 20 ng/ml (50 nmol/l) são suficientes para a manutenção da saúde óssea de 97,5% da população (IOM 2010) e valores acima são inconsistentes para garantir benefícios extra-ósseos (ROSS *et al.*, 2011).

Em 2011, resultados de uma força-tarefa comandada pelo *The Endocrine Society's Clinical Guidelines Subcommittee* e *Clinical Affairs Core Committee* foram publicados com a intenção de guiar médicos quanto à avaliação, tratamento e prevenção de deficiência de vitamina D, sobretudo nas populações de maior risco (HOLICK *et al.*, 2011). Segundo estes comitês, somente os pacientes com alto risco de apresentar deficiência de vitamina D devem fazer triagem (Quadro 2), não sendo rotina, portanto, solicitar dosagem de 25(OH)D para a população em geral. Neste guia também foram definidos como valores suficientes os níveis séricos de 25(OH)D acima 30 ng/ml (75 nmol/l); como insuficientes os valores entre 21–29 ng/ml (52,5–72,5 nmol/l) e como deficientes os valores inferiores a 20 ng/ml (50 nmol/l). Níveis séricos acima de 150 ng/ml (375 nmol/l) foram considerados como tóxicos (Tabela 2). Do ponto de vista do *Endocrine Practice Guidelines Committee* estes valores de referência para deficiência e insuficiência de vitamina D são mais adequados, uma vez que diversos estudos têm demonstrado que valores de 25(OH)D acima de 30 ng/ml, estão associados com uma redução e estabilização do PTH sérico (CHAPUY *et al.*, 1996; THOMAS *et al.*, 1998; HOLICK *et al.*, 2005a), maior prevenção de fraturas de quadril e de fraturas não-vertebrais (BISCHOFF-FERRARI *et al.*, 2006) e maior eficiência na absorção intestinal de cálcio (HEANEY *et al.*, 2003). Não foram ainda estabelecidas, até o momento, as concentrações séricas ideais de 25(OH)D para garantir benefícios extra-ósseos (WACKER e HOLICK, 2013).

Raquitismo
Osteomalácia
Osteoporose
Doença Renal Crônica
Falência hepática
Síndromes de má absorção: Fibrose Cística
Doença Inflamatória Intestinal
Doença de Crohn
Cirurgia bariátrica
Enterite por radiação
Hiperparatireoidismo
Medicações: Anticonvulsivantes
Glicocorticóides
Medicamentos para AIDS
Antifúngicos (ex. Cetoconazol)
Colestiramina
Crianças e adultos afro-americanos e hispânicos
Gestantes e Lactantes
Idosos com história de queda
Idosos com história de fraturas não traumáticas
Crianças e adultos obesos com IMC > 30 Kg/m ²
Doenças granulomatosas: Sarcoidose
Tuberculose
Histoplasmose
Coccidioidomicose
Beriliose
Alguns linfomas

Quadro 2 - Condições clínicas que necessitam triagem de 25(OH)D.
 Fonte: Adaptado de Holick et al., 2011.

Tabela 2 - *Status* de vitamina D em relação aos valores séricos de 25(OH)D

<i>Status</i> de vitamina D	Valores séricos de 25(OH)D*
Deficiência	< 20 ng/ ml (50 nmol/l)
Insuficiência	21 – 29 ng/ ml (52,5–72,5 nmol/l)
Normal	30 – 100 ng/ ml (75 – 250 nmol/l)
Intoxicação	>150 ng/ ml (375 nmol/l)

* 1 ng/ ml equivale a 2,5 nmol/l.

Fonte: Adaptado de Holick et al., 2011.

1.8 Vitamina D e o sistema imunológico

O entendimento que a vitamina D tem na regulação do sistema imunológico vem da descoberta de VDRs na maioria das células do sistema imune inato e adaptativo, incluindo as células apresentadoras de antígenos (*antigen-presenting cell* - APCs) tais como monócitos/macrófagos e células dendríticas (*dendritic cells* - DCs); neutrófilos; linfócitos T e linfócitos B (MATHIEU e ADORINI, 2002; VAN ETTEN e MATHIEU, 2005; BAEKE et al., 2010; WOLDEN-KIRK et al., 2012). Além disso, células inflamatórias possuem a habilidade de produzir localmente a $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, que por sua vez, apresenta ações intrácrinas e parácrinas no sistema imunológico (ADAMS e HEWISON, 2012), que levam a alterações de citocinas que potencializam as respostas da imunidade inata, ao mesmo tempo que inibem as respostas da imunidade adaptativa (BAEKE et al., 2010).

1.8.1 Vitamina D e o sistema imunológico inato

O sistema inato representa a primeira linha de defesa do organismo contra agentes patógenos invasivos ou antígenos (Ag) (ABBAS et al., 2008, p. 4). A atuação da vitamina D no sistema inato foi reconhecida inicialmente, a partir da observação da habilidade da $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ em estimular a diferenciação de monócitos em células mais maduras, os macrófagos-like (ABE et al., 1981); e também da detecção da produção de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ por macrófagos presentes em granulomas pulmonares de pacientes com sarcoidose (ADAMS et al., 1983; ADAMS E GACAD, 1985). Além disso, é reconhecido que a vitamina D aumenta a capacidade fagocítica e quimiotática dos macrófagos e estimula a síntese de peptídeos antimicrobianos em células do sistema inato (BIKLE, 2009).

Sabe-se que monócitos e macrófagos exercem suas funções fagocíticas através da ligação de seus receptores transmembrana, os chamados *Toll-like receptors* (TLR), às estruturas dos microorganismos denominadas padrões moleculares associados a patógenos (*pathogen-associated molecular patterns* - PAMPs) (MEDZHITOV, 2007). Em um experimento utilizando cultura de monócitos humanos infectados por *Mycobacterium tuberculosis*, Liu et al, demonstraram que as PAMPs da micobactéria se ligam ao complexo TLR2/1 (formado pelo heterodímero TLR2 e TLR1) e aumentam a expressão de VDRs e de

1- α -hidroxilase (LIU et al., 2006). A 1,25(OH)₂D formada a partir da conversão de 25OHD pela ação da 1- α hidroxilase, atravessa a membrana nuclear e se liga aos VDRs e aos VDREs e induzem a transcrição gênica da catelicidina (hCAP) (LIU et al., 2006), um polipeptídeo antimicrobiano que destrói as membranas celulares do *Mycobacterium tuberculosis* através da formação de autolisossomos e autofagossomos (NIZET e GALLO, 2003; LEVINE E DERETIC, 2007; YUK et al., 2009; BAEKE et al., 2010). É importante salientar que outras células do sistema inato são capazes de produzir catelicidina tais como as células da epiderme e das mucosas gastrointestinal, urogenital, respiratória e gengival e, portanto, a vitamina D pode, possivelmente, proteger estas células de agentes invasores (BIKLE et al., 2009). Além da hCAP, outra proteína antimicrobiana conhecida como β -defensina 4 (DEFB4) também apresenta VDRE, porém sua indução requer co-estimulação do NF- κ B (*nuclear factor kappa B*) que envolve a presença de interleucina -1 (IL-1) (HEWISON, 2010). A ação antimicrobiana da vitamina D em monócitos e macrófagos pode ser visualizada na Figura 4.

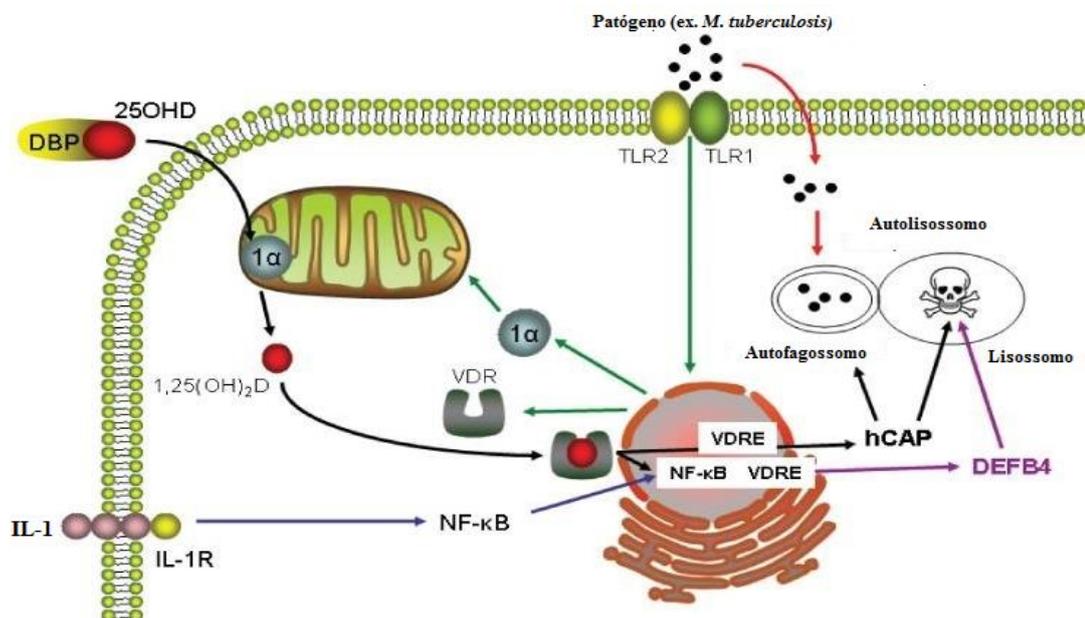


Figura 4 - Ação antimicrobiana da vitamina D em monócitos / macrófagos.

Patógenos, como o *M. tuberculosis* se ligam aos TLR2/1 e estimulam a expressão de VDR e de 1- α -hidroxilase (1 α). A 25(OH)D no interior de monócitos / macrófagos é convertida a 1,25(OH)₂D nas mitocôndrias. A 1,25(OH)₂D é, então, capaz de se ligar ao VDR e ao VDRE e induzir a transcrição de genes como o da catelicidina (hCAP). A indução de hCAP facilita a geração de autofagossomos e autolisossomos levando a morte bacteriana. A proteína β -defensina 4 (DEFB4) apresenta também um gene VDRE que requer a co-estimulação de fatores como o NF- κ B, na presença de IL-1 para gerar a formação de lisossomos e promover a destruição bacteriana.

Fonte: Adaptado de Hewison, 2010.

A expressão do gene CYP27B1 em monócitos e macrófagos também é influenciada por lipopolissacarídeos (LPS) que se ligam a TLR4 (ADAMS et al., 2009), sugerindo que tanto bactérias *gram* positivas quanto *gram* negativas podem desencadear a produção local de 1,25(OH)₂D, porém o mecanismo ainda não foi totalmente compreendido. Sabe-se, porém, que há possível envolvimento das vias JAK-STAT, p38 MAP kinase e NF-κB (STOFFELS et al., 2006; HEWISON, 2010).

Ainda no sistema inato, as ACP também sofrem regulação pela 1,25(OH)₂D. As células dendríticas (DCs) são as principais ACPs e são responsáveis por capturar e processar os antígenos e apresentá-los aos linfócitos T (LAGISHETTY et al., 2011). As ACPs são, portanto, um elo de ligação entre a imunidade inata e a imunidade adquirida (neste caso a imunidade celular) (LAGISHETTY et al., 2011).

Foi demonstrado que a vitamina D potencializa as propriedades tolerogênicas das ACPs. Isto ocorre devido à 1,25(OH)₂D ter a capacidade de inibir a diferenciação e a maturação destas células (GRIFFIN et al., 2000), além de suprimir a expressão de moléculas MHC classe II (*major histocompatibility complex II*) e de moléculas co-estimuladoras como as *Cluster of Differentiation* (CD) - CD40, CD80 e CD86 na superfície das DCs. Estas alterações consequentemente levam à inibição da apresentação de Ag das DCs para os linfócitos T (ARANOW, 2011; VAN ETTEN, 2005). A ação da vitamina D nas DCs está representada na Figura 5.

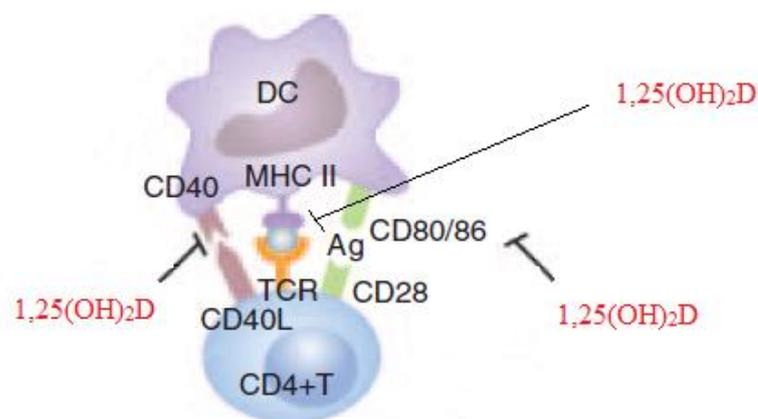


Figura 5 – Ação da vitamina D nas DCs.

Inibição das moléculas MHC classe II e das moléculas co-estimuladoras CD40, CD80 e CD86, impedindo a apresentação de Ag para os linfócitos T.

Fonte: Adaptado de Verstuyf et al., 2010.

1.8.2 Vitamina D e o sistema imunológico adaptativo

A imunidade adaptativa é estimulada por exposições subseqüentes do hospedeiro a um determinado microorganismo e desencadeia uma resposta imunológica de grande intensidade para combater o agente invasor de forma mais eficiente. Os principais componentes da imunidade adquirida são os linfócitos T, responsáveis pela imunidade celular, e os linfócitos B, responsáveis pela imunidade humoral (ABBAS et al., 2008, p. 4-6).

Os linfócitos T (ou células T efectoras) podem ser diferenciadas em células T auxiliares CD4⁺ (linfócitos T *helper*) ou em células T citotóxicas CD8⁺ (*cytotoxic T lymphocyte* - CTLs). As células T CD4⁺ podem ter funções efectoras distintas dependendo das citocinas que produzem. Estes subconjuntos de células T CD4⁺ são as células Th1 e as células Th2 (ABBAS et al., 2008, p. 305).

As células da imunidade adaptativa também são alvo de atuação da 1,25(OH)₂D. As células T *naïve* (ou virgens) apresentam níveis indetectáveis de VDRs, porém, quando ativadas, a expressão destes receptores pode aumentar em até cinco vezes (DI ROSA et al., 2011). Nos linfócitos T *helper* 1 (linfócitos Th1) a 1,25(OH)₂D inibe a produção de citocinas como o interferon-gama (IFN- γ) e a interleucina-2 (IL-2). O IFN- γ é o maior sinalizador para as ACPs e, portanto, a sua inibição diminuirá a apresentação de Ag e o recrutamento de linfócitos T (CIPPITELLI e SANTONI, 1998; HEWISON, 2012). Já a inibição da IL-2, que é um fator de crescimento autócrino para os linfócitos T, levará à diminuição da ativação e proliferação destas células (TAKEUCHI et al., 1998; HEWISON, 2012).

Existem quatro mecanismos possíveis da 1,25(OH)₂D influenciar as funções das células T, mecanismos estes não mutuamente excludentes: a) efeitos diretos nas células T pela 1,25(OH)₂D sistêmica; b) efeitos indiretos da produção intrácrina de 1,25(OH)₂D pelas ACPs que impedirá a apresentação de Ag destas células para os linfócitos T; c) efeito direto da 1,25(OH)₂D produzida pelas ACPs de forma parácrina; d) conversão intrácrina da 25(OH)D em 1,25(OH)₂D nas próprias células T (HEWISON, 2012) (Figura 6).

A sobrevivência e a morte de linfócitos T também podem ser afetadas pela vitamina D, através da inibição do sistema Fas/FasL, que é a principal via de indução de morte celular mediada pelos linfócitos T (CIPPITELLI et al., 2002).

A vitamina D também tem atuação sobre outros grupos de linfócitos T. Exemplos disso, são a inibição das células Th17 e a estimulação de células T reguladoras (Tregs). As células Th17 produzem interleucina-17 (IL-17) e interleucina-23 (IL-23), que possuem

atividade inflamatória em diferentes condições clínicas autoimunes (JOSHI et al., 2011). Já as células Tregs, desempenham uma ação supressoras das respostas imunes de outras células T, contribuindo com a tolerância imunogênica (ADORINI e PENNA, 2009). A vitamina D estimula as células Tregs a produzir interleucina-10 (IL-10), que é uma citocina anti-inflamatória que inibe o desenvolvimento de células Th1 (BIKLE, 2009).

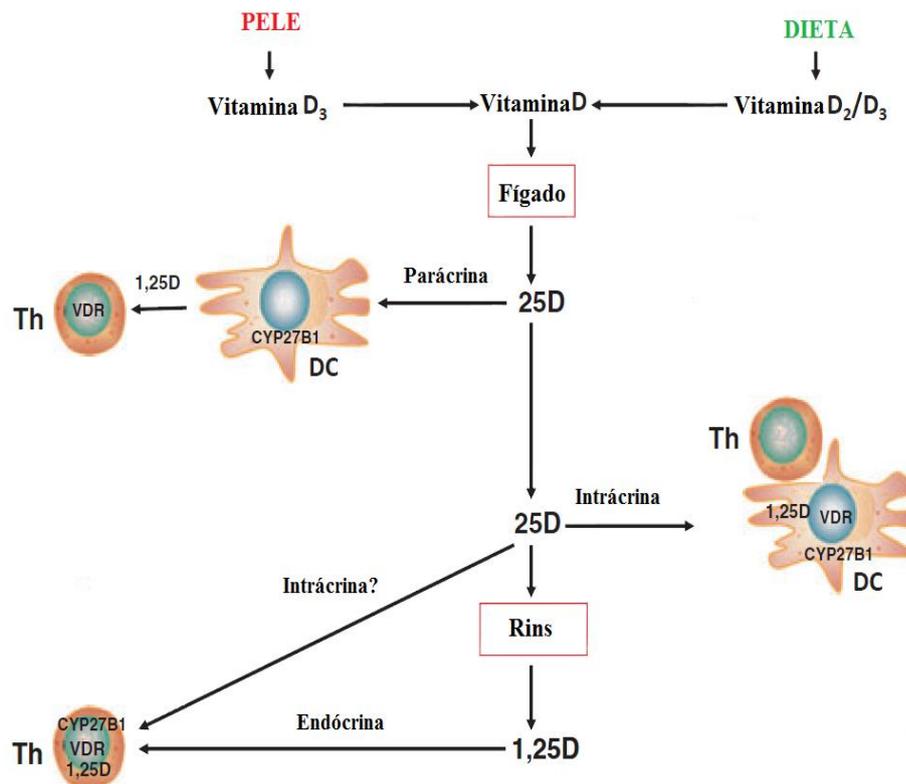


Figura 6 - Mecanismos de ação da vitamina D nos linfócitos T. A vitamina D proveniente da síntese cutânea ou da dieta é metabolizada no fígado a 25(OH)D. Células dendríticas (DCs) expressam a enzima CYP27B1 e VDRs. Estas células produzem de forma parácrina a 1,25(OH)₂D a partir do precursor 25(OH)D e modulam as funções das células T *helper*. As DCs também são capazes de produzir de forma intrácrina a 1,25(OH)₂D que é capaz de inibir a maturação das próprias DCs, e conseqüentemente inibir a apresentação de Ag para as células T. Células T também respondem de forma endócrina e, provavelmente intrácrina, à vitamina D.

Fonte: Adaptada de Hewison, 2012.

Apesar do conhecimento dos efeitos da 1,25(OH)₂D nas células B serem escassos, sabe-se que a vitamina D está envolvida na supressão de proliferação de células plasmocitárias e, conseqüentemente, na redução da produção de imunoglobulinas. A vitamina

D também parece reduzir as células B de memória e induzir a apoptose de células B (DI ROSA et al., 2011; HEWISON, 2012).

1.8.3 Vitamina D e os estados patológicos imunomediados:

Diversos estados patológicos envolvendo as imunidades inata e adaptativa são influenciados pela vitamina D.

O uso da vitamina D no tratamento da tuberculose, por exemplo, já é observado desde o século XIX. Nesta época, pacientes acometidos pelo *M. tuberculosis* eram tratados em sanatórios para “respirar ar fresco e pegar luz solar” (FELDMAN et al., 2011, p. 1818). Neste mesmo período o uso de óleo de fígado de bacalhau também era utilizado para a “cura” da doença (RALPH et al., 2013).

Rook et al. em 1986, através da cultura de monócitos humanos com metabólitos da vitamina D associado a IFN- γ e, subsequente inoculação do *M. tuberculosis*, conseguiram observar a inibição do crescimento da micobactéria (ROOK et al., 1986). Porém, o mecanismo pelo qual esta inibição ocorre foi descoberto somente duas décadas mais tarde por Liu et al. quando descobriram a produção de catelicidina dependente de vitamina D (LIU et al., 2006; BIKLE, 2009).

Estudos *in vitro* e *in vivo* têm mostrado que variações na 25(OH)D sérica têm correlação com a indução da expressão de catelicidina em monócitos. Ou seja, baixos níveis de 25(OH)D induzem menos monócitos a produzir catelicidina e, portanto, indivíduos com deficiência de vitamina D apresentam maior risco de infecção (LIU et al., 2006; HEWISON, 2012). Do contrário, pacientes com *status* de vitamina D adequado, apresentam maior produção de catelicidina e, conseqüentemente, possuem maior proteção contra infecção por *M. tuberculosis* (ADAMS et al., 2009; DIXON et al., 2012; HEWISON, 2012).

O impacto da vitamina D no desfecho clínico da tuberculose, no entanto, ainda é controverso. Nursyam et al. compararam o uso da vitamina D e do placebo em pacientes com tuberculose pulmonar em uso de antibioticoterapia padrão para a tuberculose independente do *status* de vitamina D. O grupo que recebeu a vitamina D recebeu a dose de 0,25 mg/ dia (equivalente a 10.000 UI/dia) que foi administrada nas seis semanas iniciais do tratamento com drogas anti-tuberculose. Neste estudo os autores evidenciaram uma redução no tempo

para a negatificação do escarro e uma melhora radiográfica no grupo da vitamina D (NURSYAM et al., 2006). Todavia, dois estudos controlados, randomizados e duplo-cegos não obtiveram estes mesmos resultados (WEJSE et al., 2009; MARTINEAU et al., 2011). Wejse et al., por exemplo, administraram doses de 100.000 UI de vitamina D₃ ou placebo (nos meses 0, 5 e 8) em pacientes com tuberculose pulmonar e avaliaram o escore de gravidade clínica da tuberculose e a mortalidade por um período de doze meses. Os desfechos clínicos não foram diferentes entre os dois grupos (WEJSE et al., 2009). Uma das razões possíveis para estes achados foi o não aumento dos níveis séricos de 25(OH)D nos indivíduos que receberam colecalciferol (WEJSE et al., 2009). No outro estudo conduzido por Martineau et al., o regime posológico utilizado foi de quatro doses equivalentes a 100.000 UI de vitamina D₃ ou placebo (nos dias 0, 14, 28 e 42). Apesar dos indivíduos tratados com vitamina D apresentarem um aumento dos níveis séricos de 25(OH)D, não houve diferença no tempo necessário para a negatificação do escarro entre os grupos vitamina D e placebo (MARTINEAU et al., 2011).

Além da vitamina D promover a indução do gene da catelicidina na tuberculose, foi observado uma associação direta entre as concentrações séricas de 25(OH)D com esta proteína antimicrobiana em pacientes com septicemia (JENG et al., 2009), e em pacientes com resfriados e quadros gripais (CANELL et al., 2006; ALOIA E LI-NG, 2007), sugerindo que além da ação contra micobactérias, a catelicidina pode ter efeitos antibacterianos e antivirais. Ademais, baixos níveis de 25(OH)D também têm sido associados com maior risco de infecções em geral e maior mortalidade em pacientes com doença renal terminal (GOMBART et al., 2009).

Quanto à autoimunidade, sabe-se que a perda da tolerância imunológica aos Ag próprios (*self*) leva ao aparecimento de doenças autoimunes (ANTICO et al., 2012). Embora se saiba que fatores ambientais, polimorfismos genéticos e fatores de risco epidemiológicos estejam envolvidos no desencadeamento destas doenças, muitos fatores permanecem desconhecidos (ANTICO et al., 2012). A importante descoberta da participação da 1,25(OH)₂D na tolerância imunológica instigou, nos últimos anos, muitos pesquisadores a estudar a possível relação da vitamina D no surgimento das doenças autoimunes. Neste contexto, estudos experimentais em animais demonstraram que o uso de vitamina D preveniu o desenvolvimento de diferentes desordens autoimunes como *diabetes mellitus* do tipo I (ZELLA et al., 2003), doença de Crohn (CANTORNA, 2006), lupus eritematoso sistêmico (LES) (KAMEN E ARANOW, 2008), artrite reumatóide (AR) (ADORINI E PENNA 2008) e esclerose múltipla (EM) (CANTORNA, 2008; RAGHUWANSHI et al., 2008). Em humanos,

estudos epidemiológicos sugerem a participação da vitamina D na prevenção de doenças autoimunes, porém estudos randomizados e controlados para estabelecer a eficácia da suplementação de vitamina D na prevenção e no tratamento de doenças autoimunes ainda são escassos (ANTICO et al., 2012). Também não há informações sobre qual a dose, apresentação e tempo de suplementação de vitamina D para esta finalidade (ANTICO et al., 2012).

1.8.4 Vitamina D e as citocinas

As citocinas são proteínas secretadas por células das imunidades inata e adaptativa e que medeiam muitas das funções destas células (ABBAS et al., 2008, p. 267).

Como já mencionado, os linfócitos T antes de se diferenciarem em células Th1 ou Th2, estão num estado latente e são chamados de linfócitos *naïves* (virgens) ou Th0. Estas células quando estimuladas, sobretudo, pela IL-12 se tornarão Th1 ou quando estimuladas pela interleucina-4 (IL-4) se tornarão Th2 (ABBAS et al., 2008, p. 307).

Os padrões de respostas destes dois grupos diferenciam-se entre si. As células Th1 são fundamentais na destruição de microorganismos intracelulares e são representadas, sobretudo, pelas seguintes citocinas: IL-2, IFN- γ e TNF- α . De forma contrária, as células Th2 são responsáveis pela produção de imunoglobulina E (IgE) e pelas reações imunes mediadas por eosinófilos e mastócitos que atuam contra alérgenos e agentes parasitários helmínticos. Suas principais citocinas são a IL-4, interleucina-5 (IL-5) e interleucina-13 (IL-13). (ABBAS et al., 2008, p. 314; HIRAHARA et al., 2013).

Atualmente tem-se reconhecido outros grupos de células T *helper*, mostrando uma maior diversidade destas células para além do binário Th1/ Th2 (HIRAHARA et al., 2013). Estas novas modalidades são as citocinas Th17, Th9 e Th22; células T *helper* foliculares (TFH) e diferentes tipos de células Tregs (HIRAHARA et al., 2013).

A 1,25(OH) $_2$ D tem-se mostrado atuar em diferentes células do sistema imune e, conseqüentemente, nas suas citocinas (ARANOW, 2011). Nas células T, por exemplo, promove a estimulação do fenótipo Th2 em detrimento do Th1, inibe células Th17 e facilita a indução de células Tregs (Figura 5). Isto leva a uma redução de citocinas inflamatórias como IL-17, IL-23, IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 e TNF α e ao aumento de citocinas imunossupressoras como IL-10 e TGF- β (*transforming growth factor beta* – fator de crescimento transformador-

β) (ARANOW, 2011). A influência da vitamina D nas células T e suas citocinas podem ser visualizadas na Figura 7.

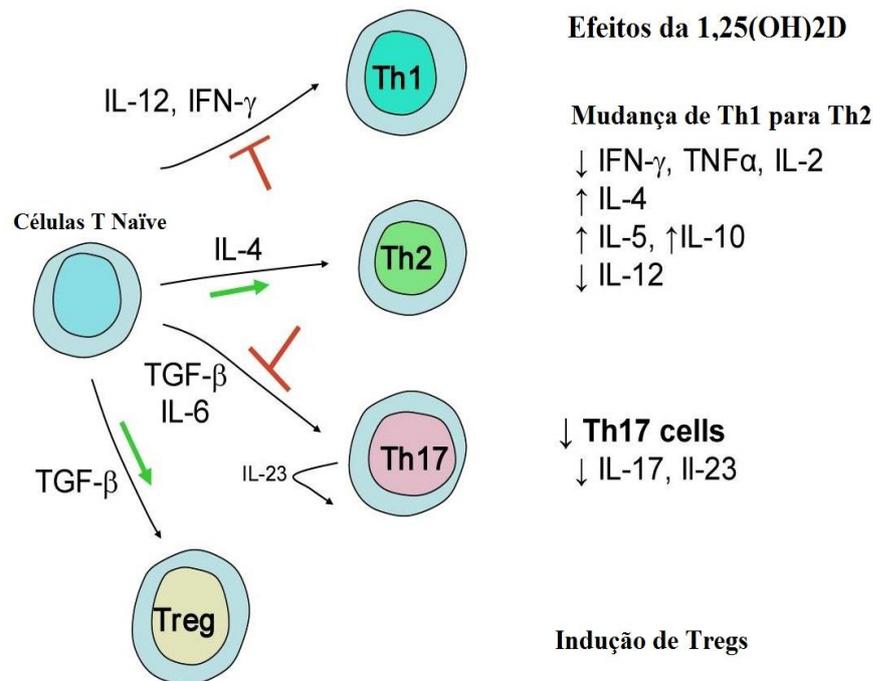


Figura 7 - Efeitos da 1,25(OH)₂D nas células T e suas citocinas. Supressão da proliferação de células T; mudança do fenótipo Th1 para o Th2 e suas respectivas citocinas; inibição das citocinas IL-17 e IL-23 (Th17) e indução de células T reguladoras (Tregs).
 Fonte: Adaptada de Aranow, 2011.

No sistema imune inato a vitamina D também influencia na produção de citocinas. Em monócitos e macrófagos, a 1,25(OH)₂D inibe a produção de citocinas como IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 e TNF- α (BAEKE et al., 2010; ARANOW, 2011) ao passo que nas DCs, a 1,25(OH)₂D reduz a produção das citocinas pró-inflamatórias IL-12 e IL-23, e estimula a produção da citocina anti-inflamatória IL-10 e da quimiocina MIP3- α (*macrophage inflammatory protein-3 alpha*) (ARANOW, 2011). Esta última, é envolvida no recrutamento de células Tregs. Os efeitos da 1,25(OH)₂D nas citocinas de monócitos, macrófagos e DCs podem ser visualizadas na Figura 8.

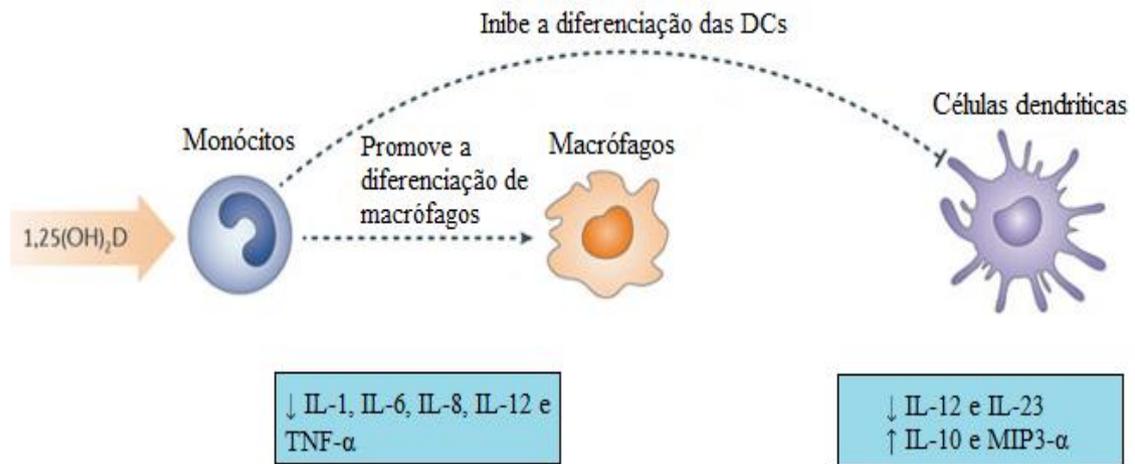


Figura 8 - Efeitos da $1,25(OH)_2D$ nas citocinas produzidas por monócitos, macrófagos e células DCs. Inibição da produção de citocinas inflamatórias por monócitos e inibição da diferenciação e maturação das células dendríticas. Vê-se também aumento da citocina antiinflamatória IL-10. Fonte: Adaptada de Aranow, 2011.

A IL-6 na imunidade inata estimula a síntese de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos (como a proteína C reativa), e também estimula a produção de neutrófilos por progenitores da medula óssea. Na imunidade adquirida a IL-6 estimula o crescimento de linfócitos B que se diferenciam em células plasmocitárias produtoras de Ac. Além disso, a IL-6 também atua como fator de crescimento para plasmócitos neoplásicos (mielomas); estimula a produção de algumas citocinas pró-inflamatórias (como IL-17) e inibe a geração de células Tregs (ABBAS et al., 2008, p. 287-288).

O TNF- α é uma citocina produzida, sobretudo, por macrófagos e, também, por células linfóides, mastócitos, células endoteliais, miócitos, adipócitos, fibroblastos e células neuronais (SINGH e NEWMAN, 2011). É o principal mediador da resposta inflamatória aguda a bactérias *gram* negativas e outros microorganismos infecciosos. Também é responsável por muitas das complicações sistêmicas de infecções graves. A sua principal função é estimular o recrutamento de neutrófilos e monócitos para os locais de infecção e ativar estas células para eliminar os microorganismos invasores (ABBAS et al., 2008, p. 273).

De maneira oposta às duas citocinas citadas anteriormente, a IL-10 é um inibidor de macrófagos e de células dendríticas e está envolvida no controle das reações da imunidade

inata e da imunidade mediada por células. A IL-10 é um inibidor das respostas imunes do hospedeiro e, portanto, exerce ação antiinflamatória (ABBAS et al., 2008, p. 287).

Várias doenças imunomediadas apresentam níveis elevados de citocinas inflamatórias como IL-6 e TNF- α , que estão associados com o surgimento e o agravamento de tais condições. Conhecendo o papel da vitamina D na produção e na liberação de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, torna-se relevante saber se a regulação destas citocinas pelo uso da vitamina D tem aplicabilidade clínica. Estudos clínicos realizados em humanos com a intenção de avaliar a suplementação de vitamina D nas interleucinas IL-6, TNF- α e/ou IL-10 apresentam resultados bastante conflitantes (Tabela 3).

Tabela 3 - Estudos clínicos com avaliação de IL-6, TNF- α e/ou IL-10 séricas após o uso de vitamina D

(continua)

Autor	População (N) Seguimento	Idade	Posologia	Grupo controle	↑da 25(OH) D sérica	Desfecho no grupo vitamina D
Abou-Raya et al., 2013	Adultos com LES (267) 12 meses	V: 38,8 ± 5,7 P: 38,9 ± 3,5	2000 UI de colecalciferol/dia	- Placebo	Sim	↓ IL-6 ↓ TNF- α
Alvarez et al., 2013	Adultos com IRC de início recente (estágios 2 e 3) (46) 12 meses	V; P: 62,5 ± 9,6	50.000 UI de colecalciferol por semana por 12 semanas seguido de 50.000 UI de colecalciferol a cada 2 semanas por 40 semanas	- Placebo	Sim	= IL-6 = TNF- α
Grossmann et al., 2012	Adultos com FC hospitalizados (30) 3 meses	V: 24,9 ± 6,01 P: 28,2 ± 30,89	250.000 UI de colecalciferol dose única	- Placebo	Sim	↓ IL-6 ↓ TNF- α = IL-10
Shab-Bidar et al., 2012	Adultos com DM2 (100) 3 meses	V: 52,6 ± 6,3 P: 52,4 ± 8,4	Iogurte fortificado (contendo cálcio 340 mg + vitamina D 1000 UI/ dia)	- Iogurte não fortificado (contendo apenas cálcio 340 mg/dia)	Sim	↓ IL-6 ↓ TNF- α ↑ IL-10

(continuação)

Autor	População (N) Seguimento	Idade	Posologia	Grupo controle	↑ da 25(OH) D sérica	Desfecho no grupo vitamina D
Carrillo et al., 2012	Adultos com sobrepeso ou obesos - IMC: 25-39,9 Kg/m ² em programa de exercício físico (23) 3 meses	V: 26,2 ± 5,1 P: 26 ± 4,5	Colecalciferol 4000 UI/ dia + cálcio 500 mg/ dia	- Placebo + cálcio 500 mg/ dia	Sim	= IL-6 = TNF-α
Beilfuss et al., 2012	Adultos com sobrepeso ou obesos -IMC: 28-47 Kg/m ² (332) 12 meses	V; P: 50 (23-70)	Colecalciferol 40.000 UI/ semana ou Colecalciferol 20.000 UI/ semana	- Placebo	Sim	↓ IL-6 em ambos os grupos da vitamina D = TNF-α
Neyestani et al., 2012	Adultos com DM2 (90) 3 meses	P + C 300: 50,8 ± 6,7 V + C 300: 51,5 ± 5,4 V + C 500: 49,9 ± 6,2	Iogurte com colecalciferol 1000 UI + cálcio 300 mg/dia ou Iogurte com colecalciferol 1000 UI + cálcio 500 mg/dia	- Iogurte com cálcio 300 mg/dia	Sim	↓ IL-6 em ambos os grupos da vitamina D = TNF-α
Allen et al., 2012	Adultos saudáveis (4) 3 meses e 3 semanas	-	- 5000 UI de colecalciferol/ dia por 15 semanas ou - 5000 UI de colecalciferol/ dia 10 semanas seguidos de 10.000 UI/ dia por 5 semanas	-	Sim	↑ IL-10 em ambos os grupos da vitamina D
Sokol et al., 2012	Adultos com DAC (90) 3 meses	V: 55 ± 9,6 P: 56,96 ± 11,6	50.000 UI de ergocalciferol dose única	- Placebo	Sim	= IL-6
Barnes et al., 2011	Adultos jovens e idosos saudáveis (413) 5 meses e ½	J: 20 – 40 I: ≥ 64	Colecalciferol 5 µg (200 UI)/ dia 10 µg (400 UI)/ dia 15 µg (600 UI)/ dia	- Placebo	Sim	= IL-6 = TNF-α = IL-10 = PCR

(continuação)

Autor	População (N) Seguimento	Idade	Posologia	Grupo controle	↑da 25(OH) D sérica	Desfecho no grupo vitamina D
Hopkins et al., 2011	Adultos com adenoma colorretal (92) 6 meses	P: 58,5 ± 7,9 C: 61,9 ± 8,0 V: 60,2 ± 8,1 C + V: 61,7 ± 7,4	Cálcio 2g ou 800 UI/ dia de colecalciferol ou cálcio 2g + 800 UI de colecalciferol	- Placebo	Sim	= IL-6 = TNF-α = IL-10
Yusupov et al., 2010	Adultos saudáveis (148) 3 meses	V: 59,3 ± 13 P: 58,1 ± 13,4	50 µg/ dia (2000 UI/ dia) de colecalciferol	- Placebo	Sim	= IL-6 = TNF-α = IL-10
Jorde et al., 2010	Adultos com IMC: 28-47 Kg/m ² (324) 12 meses	V e P: 47 (21-70)	40.000 UI de colecalciferol dose única + cálcio 500 mg/dia ou 20.000 UI de colecalciferol + cálcio 500 mg/ dia	- Placebo + cálcio 500 mg/ dia	Sim	= IL-10
Bendix-Struve et al., 2010	Adultos com doença de Crohn (108) 6 meses e ½	V: 37 (28-65) P: 45 (23-65)	1200 UI/ dia de colecalciferol + 1200 mg de cálcio/ dia	- Placebo + 1200 mg de cálcio/ dia	Sim	↑ IL-6 = IL-10
Schleithoff et al., 2006	Adultos com ICC (123) 9 meses	V: 57 (53-63) P: 54 (50-62)	50 µg/ dia (2000 UI/ dia) de colecalciferol + cálcio 500 mg/ dia	- Placebo + cálcio 500 mg/ dia	Sim	= TNF-α ↑ IL-10
Inanir et al., 2004	Idosas com osteoporose pós-menopausa (100) 6 meses	V: 58 ± 5 P: 59 ± 6	0,5 µg/ dia de calcitriol + 1000 mg/ dia de cálcio	- Cálcio 1000 mg/ dia + - Grupo controle	-	↓ TNF-α = IL-6
Lathers et al., 2004	Adultos com câncer de cabeça e pescoço (18) 1 mês e ½	58 (49-65) 58(49-64) 62 (52-71)	Calcifediol 20µg/ dia 40 µg/ dia 60 µg/ dia	-	-	= IL-6 = IL-10

(conclusão)

Autor	População (N) Seguimento	Idade	Posologia	Grupo controle	↑da 25(OH) D sérica	Desfecho no grupo vitamina D
Mahon et al., 2003	Pacientes com EM (39) 6 meses	-	800 UI de colecalciferol + cálcio 100 mg/dia	- Placebo + cálcio 1000 mg/dia	Sim	= TNF- α
Tsukamoto et al., 1996	Adultos com IRC não-dialítica (26) 6 meses	52 \pm 12	0,5 μ g/dia de calcitriol	- Cálcio 2 gramas/dia + - Grupo controle	-	↓ TNF- α

Abreviaturas: LES (lupus eritematoso sistêmico); IRC (insuficiência renal crônica); FC (fibrose cística); DM2 (*diabetes mellitus* do tipo 2); IMC (índice de massa corporal); DAC (doença arterial coronariana); J (jovens); I (idosos) ICC (insuficiência cardíaca congestiva); EM (esclerose múltipla); V (grupo vitamina D); P (grupo placebo); C (cálcio); C300 (cálcio 300 mg); C500 (cálcio 500 mg); UI (unidades internacionais); IL-6 (interleucina-6); TNF- α (fator de necrose tumoral alfa); IL-10 (interleucina-10); \pm (desvio padrão).

Dentre estes estudos, cinco deles avaliaram de forma concomitante os níveis séricos de IL-6, TNF- α e IL-10. O primeiro deles, realizado em 2010, envolveu 148 adultos saudáveis que foram selecionados para receber randomicamente 50 μ g/dia (2000 UI) de colecalciferol ou placebo. No final de 3 meses de estudo não houve diferença significativa nas concentrações séricas de IL-6, TNF- α e IL-10 em ambos os grupos (YUSUPOV et al., 2010). Em 2011, um estudo piloto avaliou os níveis séricos de citocinas em pacientes com adenoma colorretal após 6 meses da utilização de doses diárias de 2 gramas de cálcio (n = 23); 800 UI de vitamina D₃ (n = 23); associação de 2 gramas de cálcio mais 800 UI de vitamina D₃ (n = 23); ou placebo (n = 23). Embora tenha havido uma redução de 13% no TNF- α e de 32% na IL-6 no grupo vitamina D isolada e uma redução de 37% na IL-6 no grupo cálcio isolado, essas alterações não foram estatisticamente significativas. Não houve também efeito ou sinergia entre a vitamina D e o cálcio na dosagem de IL-10 (HOPKINS et al., 2011). Ainda em 2011, outro estudo envolvendo 413 indivíduos, dentre os quais 211 eram adultos jovens e 201 eram idosos saudáveis, avaliou as dosagens de marcadores inflamatórios após 22 semanas de utilização de colecalciferol 5 μ g (200 UI)/dia; 10 μ g (400 UI)/dia; 15 μ g (600 UI)/dia ou placebo. Novamente não houve diferença significativa nas concentrações das interleucinas IL-6, TNF- α e IL-10 nas três dosagens utilizadas (BARNES et al., 2011).

Já em 2012, um estudo conduzido com 30 pacientes adultos com fibrose cística hospitalizados devido a exacerbação pulmonar foram randomizados para receber uma dose única de 250.000 UI de colecalciferol ou placebo. Este estudo diferentemente dos demais, além de ter sido realizado com uma dose elevada e única de vitamina D₃, os resultados evidenciaram uma redução de 64.5% na IL-6 ($p = 0,09$) e de 50.4% no TNF- α ($p < 0,01$) no final de 12 semanas. Não houve, porém, diferenças significativas na IL-10 e nos demais marcadores inflamatórios avaliados (IL-1 β , IL-8, IL-18BP and NGAL (*neutrophil gelatinase-associated lipocalin*)) (GROSSMANN et al., 2012). No mesmo ano, 100 pacientes com DM2 foram acompanhados durante 3 meses após receberem diariamente iogurte fortificado com 1000 UI de vitamina D ou iogurte não-fortificado (sem vitamina D), ambos com adição de cálcio. No final do estudo, aqueles que receberam iogurte fortificado com vitamina D apresentaram uma melhora no perfil inflamatório sistêmico, com redução de IL-6 ($p = 0,002$) e TNF- α ($p = 0,044$), além de aumento na IL-10 ($p = 0,013$) comparado com o placebo (SHAB-BIDAR et al., 2012). Neste estudo houve também redução na proteína C reativa (PCR) ($p < 0,001$) e no amilóide A sérico ($p = 0,022$) no grupo iogurte fortificado.

Os resultados discordantes destes estudos podem ser devido a diversos fatores como a população estudada (doente *versus* saudável); faixa etária (adultos jovens *versus* idosos); doses diferentes de vitamina D utilizadas, dentre outros. Não há, até o momento, estudos que avaliem o efeito de altas doses de vitamina D na resposta inflamatória sistêmica em pacientes idosos.

1.9 Recomendações quanto à ingestão e à suplementação de vitamina D

Em 2010, uma comissão de peritos organizada pelo Instituto de Medicina (IOM), após uma extensa revisão da literatura médica, foi responsável por atualizar os valores de referência da ingestão diária de cálcio e vitamina D. Quanto à vitamina D, as recomendações foram baseadas em estudos que avaliaram os benefícios ósseos, pois os estudos que avaliaram os efeitos extra-ósseos foram considerados inconclusivos ou não confiáveis (IOM, 2010). A ingestão dietética recomendada (*Recommended Dietary Allowance* – RDA) da vitamina D, segundo o IOM, para as idades entre 1 a 18 anos, adultos até a idade de 70 anos, e mulheres gestantes é de 600 UI por dia, ao passo que para idosos acima de 70 anos, o RDA é de 800 UI por dia (IOM, 2010).

No que diz respeito à suplementação, o *Endocrine Practice Guidelines Committee* segue as mesmas recomendações do IOM quanto às RDAs, ou seja, os valores de suplementação são iguais aos valores de recomendação de ingestão diária de vitamina D. No entanto, o *Endocrine Practice Guidelines Committee* sugere suplementação de doses mais altas de 1500 a 2000 UI por dia caso o objetivo de atingir níveis séricos de 25(OH) de 30 ng/ml não sejam alcançados com as doses habituais (HOLICK et al., 2011). É também sugerido que todos os adultos com deficiência de vitamina D sejam tratados com 50.000 UI de vitamina D₂ ou vitamina D₃ uma vez por semana durante 8 semanas ou uma dose diária de 6.000 UI por dia até atingir os níveis séricos iguais a 30 ng/ml seguido de dose de manutenção de 1500 a 2000 UI por dia (HOLICK et al., 2011).

1.10 Dose única de colecalciferol

Nos últimos anos vem crescendo o interesse de pesquisadores em estudar o efeito de doses intermitentes de colecalciferol com o intuito de proporcionar uma maior comodidade posológica, além de aumentar a aderência dos pacientes à medicação a longo prazo (ILAHY et al., 2008; PREMAOR et al., 2008). Esta estratégia tem relevância sobretudo na população idosa, que habitualmente é polimedicada.

Khaw et al., por exemplo, utilizaram uma dose única de 100.000 UI de vitamina D₃ na população idosa (homens e mulheres) e demonstraram um aumento de 60% na concentração de 25(OH)D e uma redução de 12% concentração de PTH após 5 meses de seguimento, independente da ingestão de cálcio (KHAW et al., 1994). Trivedi et al. também utilizaram doses intermitentes de 100.000 UI de colecalciferol a cada quatro meses durante 5 anos (15 doses no total) e demonstraram uma redução nas fraturas osteoporóticas em mulheres e homens idosos (TRIVEDI et al., 2003). Em um estudo realizado no sul do Brasil, conduzido por Premaor et al., foi comparado o efeito de dose única de 300.000 UI de colecalciferol com a dose diária de 800 UI (ambos com associação a cálcio elementar 500 mg por dia) quanto aos níveis de 25(OH)D e a reversão do hiperparatireoidismo secundário em mulheres idosas institucionalizadas, durante um período de 9 meses (PREMAOR et al., 2008). Embora não tenha havido uma redução dos níveis de PTH, a dose de 300.000 UI foi mais efetiva em aumentar os níveis séricos de 25(OH)D ($p < 0,001$).

Em 2010, Sanders et al., conduziram um estudo com 2256 mulheres com idade maior ou igual a 70 anos, consideradas com alto risco para fraturas que utilizaram uma dose única de 500.000 UI de colecalciferol comparada com o placebo, com seguimento de 3 a 5 anos. Os resultados deste estudo foram surpreendentes, revelando mais quedas (15%) e fraturas (26%) no grupo vitamina D do que no grupo placebo (SANDERS et al., 2010).

Doses ainda maiores de 600.000 UI de vitamina D₃ foram utilizadas por Cipriani et al. em pacientes jovens com baixo *status* de vitamina D sérico, demonstrando um rápido aumento dos níveis séricos de 25(OH)D, variando de $15,8 \pm 6,5$ ng/ml no *baseline* para $77,2 \pm 30,5$ ng/ml no dia 3 ($p < 0,001$) e de $62,4 \pm 26,1$ ng/ml no dia 30 ($p < 0,001$). Além disso, este estudo também evidenciou uma redução concomitante nos níveis séricos do PTH, de $53,0 \pm 20,1$ pg/ml no *baseline* para $38,6 \pm 17,2$ pg/ml no dia 3 e para $43,4 \pm 14,0$ pg/ml no dia 30 (ambos $p < 0,001$) (CIPRIANI et al., 2010). Outro estudo publicado em 2009, randomizado, duplo-cego utilizando três regimes de doses elevadas de colecalciferol, avaliou os valores de 25(OH)D ótimos para alterar o PTH e o protocólágeno tipo I pró-peptídeo amino-terminal (P1NP) em pacientes idosos (BACON et al., 2008). As doses utilizadas foram de 500.000 UI dose única (grupo 1) seguida de dose mensal de placebo; 500.000 UI dose única seguida de 50.000 UI por mês (grupo 2) e somente 50.000 UI mensais (grupo 3) pelo período de 9 meses. Este estudo demonstrou segurança e eficácia nos 3 regimes utilizados. Aqueles que receberam a dose inicial de 500.000 UI (grupo 1 e 2) obtiveram aumento significativo na 25(OH)D sérica em um mês (média de elevação de 58 nmol/l), diferentemente daqueles que utilizaram somente as dose mensais de 50.000 UI (grupo 3) que demoraram de 3 a 5 meses para atingir um *status* satisfatório de 25(OH)D. Neste estudo, os autores concluíram, também, que o PTH e o P1NP são suprimidos pelo tratamento com vitamina D, quando os níveis de 25(OH)D séricos iniciais são < 50 e < 30 nmol/l, respectivamente (BACON et al., 2009).

Com base nestes estudos, podemos inferir que doses de colecalciferol até 300.000 UI parecem ser seguras, porém ainda se aguarda estudos com tempo mais prolongado de uso de doses elevadas, incluindo estudos com curvas de dose-efeito.

1.11 Toxicidade da vitamina D

A dose de vitamina D que determina toxicidade ainda não é conhecida, uma vez que não há estudos sistemáticos para avaliar a toxicidade em seres humanos (JONES, 2008).

Entretanto, há vários relatos de casos de intoxicação devido ao uso acidental de formulações orais (KOUTKIA et al., 2001, KLONTZ e ACHESON, 2007) ou parenterais (CHIRICONE et al., 2003) contendo quantidades elevadas de vitamina D₂ ou D₃.

Sabe-se que a exposição da pele aos raios solares UV não causam intoxicação por vitamina D, pois há um mecanismo que contrabalança a produção e a degradação de vitamina D na pele (VIETH, 1999). Em brancos, este equilíbrio é atingido após uma exposição solar de aproximadamente 20 minutos, enquanto que em peles pigmentadas isso ocorre após uma exposição 3 a 6 vezes maior (VIETH, 1999). A exposição corporal total aos raios solares é capaz de produzir o equivalente à dose de 250 µg/ dia (10.000 UI/ dia) de vitamina D, sugerindo que este valor possa ser um limite fisiológico da vitamina D (VIETH, 1999).

Alimentos que contêm vitamina D também raramente causam intoxicação uma vez que possuem níveis muito baixos para causar toxicidade. Portanto, a causa mais frequente de intoxicação por vitamina D é devido ao uso inadvertido ou impróprio de formulações farmacêuticas contendo ergocalciferol ou colecalciferol (FELDMAN et al., 2011, p. 1381).

O limite formal de segurança para a ingestão de qualquer nutriente, incluindo a vitamina D, é dada pelo nível de tolerância máxima (do inglês *tolerable upper intake level* – UL), que significa o nível mais alto de ingestão diária sem causar efeitos adversos a quase todos os indivíduos de uma população (YATES et al., 1998). São indicadores para a determinação do UL da vitamina D: hipercalcemia, hipercalcúria, calcificação vascular e de partes moles e evidência de curva-U relacionada com todas as causas de mortalidade, doença cardiovascular, determinados tipos de neoplasias, quedas e fraturas (ROSS et al., 2011). Segundo orientações do IOM (*Institute of Medicine*) em 2010 este limite ficou estabelecido em 100µg/ dia (4000 UI/ dia) para indivíduos com idade ≥ 9 anos e valores mais baixos para crianças menores (IOM, 2010).

Entretanto, Hathcock et al., com base em dois ensaios clínicos randomizados (BARGER-LUX et al., 1998; HEANEY et al., 2003) determinou que a dose de vitamina D sem efeito adverso observado (*no observed adverse effect level* - NOAEL) era de 250 µg/ dia (10.000 UI/ dia) (HATHCOCK et al., 2007). Em ambos os estudos a população estudada foi de homens saudáveis elegíveis para receber diferentes doses de vitamina D₃ nos meses de inverno por 8 semanas e 20 semanas, respectivamente. Em uma avaliação conjunta da população que recebeu 250 µg/ dia (10.000 UI/ dia) (n=26), não houve efeitos adversos, configurando a segurança desta dose. Em ambos os estudos houve aumento da 25(OH)D dose-dependente, sendo que os valores médios foram de 213 nmol/l (n=10) (BARGER-LUX et al., 1998) e 220 nmol/l (n=16) (HEANEY et al., 2003), respectivamente (HATHCOCK et

al., 2007). Em uma revisão realizada por Cranney et al. em 2008, 167 ensaios clínicos foram avaliados quanto à eficácia e segurança da vitamina D (CRANNEY et al., 2008). Destes, vinte e dois estudos forneceram informações sobre os efeitos adversos da vitamina D. Em dezenove ensaios as doses utilizadas de colecalciferol variaram de 400 a 4000 UI por dia e em dois ensaios as doses foram de 5000 a 10.000 UI por dia. A maioria destes estudos foi realizada em pacientes idosos. Independentemente das doses utilizadas, houve um aumento não significativo no risco de hipercalcemia e hipercalcúria com vitamina D em relação ao placebo. Nefrolitíase foi o único evento adverso significativamente observado em um dos estudos, em que mulheres de 50 a 79 anos de idade fizeram o uso 400 UI de vitamina D₃ associados a 1000 mg de cálcio diário, correspondendo a 5,7 eventos por 10.000 pessoas-ano de exposição (CRANNEY et al., 2008).

A concentração sérica de 25(OH)D que determina toxicidade, até o presente momento, também não foi estabelecida (VIETH, 2007). No entanto, tem-se assumido que valores > 150 ng/ml (375 nmol/l) sejam tóxicos (FELDMAN et al., 2011, p. 1391). Os níveis séricos de 1,25(OH)₂D nestes casos costumam ser levemente alterados (FELDMAN et al., 2011, p. 1393). Os sinais e sintomas iniciais da hipervitaminose D podem ser semelhantes a outros estados de hipercalcemia e incluem fraqueza e fadiga (FELDMAN et al., 2011, p. 1392). Demais sintomas relacionados a hipervitaminose D estão listados na Quadro 3.

O tratamento da intoxicação por vitamina D depende do grau de hipercalcemia e consiste na suspensão da ingestão de vitamina D, seguir uma dieta pobre em cálcio e fósforo, hidratação endovenosa, uso de diuréticos de alça, glicocorticóides, calcitonina, bisfosfonato oral ou endovenoso, ou ainda hemodiálise nos casos graves (OZKAN et al., 2012).

(continua)

Sistema Gastrointestinal	- Náusea e vômito, anorexia, dor abdominal - Diminuição da motilidade intestinal, constipação - Pancreatite, úlcera péptica
Sistema Renal	- Polidipsia, poliúria, desidratação e febre - Hematúria, hipernatremia, hipomagnesemia, hipocalcemia - Nefrolitíase, nefrocalcinose, acidose tubular renal distal - <i>Diabetes insipidus</i> nefrogênico, nefrite intersticial crônica - Insuficiência renal aguda e crônica
Sistema Nervoso Central (SNC)	- Hipotonia, parestesias, diminuição dos reflexos tendíneos profundos - Cefaléia, confusão mental, convulsões, vasoespasmos cerebrais - Esclerose temporal mesial, apatia, letargia, estupor, coma - Desordens psiquiátricas (ansiedade, psicose, alucinação, depressão)

(conclusão)

Sistema Cardiovascular	- Arritmias, bradicardia (intervalo QT encurtado, QRS e PR aumentado, elevação de ST, ondas T e U alargadas) - Depósito de cálcio em valvas cardíacas, coronárias e fibras miocárdicas - Hipertensão - Miocardiopatia - Parada cardíaca
Sistema Musculo-Esquelético	- Fraqueza muscular - Dor óssea - Osteopenia/ osteoporose - Calcificação metastática de ossos longos - Osteopetrose
Olhos	- Ceratopatia em banda - Calcificação conjuntival
Pele	- Calcificações metastáticas - Prurido

Quadro 3 - Sinais e sintomas da intoxicação por vitamina D.

Fonte: Adaptada de Ozkan et al., 2012.

1.12 Hipovitaminose D em idosos no Brasil

A hipovitaminose D é um problema de saúde pública em todo o mundo, inclusive no Brasil (MAEDA et al., 2013). Estudos populacionais brasileiros são escassos, porém pesquisadores nacionais vêm demonstrando que a ingestão de vitamina D dos brasileiros está aquém das doses recomendadas atualmente, e que os estados de deficiência e insuficiência deste hormônio são alarmantes, sobretudo na população idosa.

Em 2009, o estudo BRAZOS (*The Brazilian Osteoporosis Study*) avaliou a ingestão de nutrientes relacionados à saúde óssea e suas associações com fraturas osteoporóticas em uma amostra de 2344 indivíduos com idades maior ou igual a 40 anos em cinco regiões brasileiras. Quanto à vitamina D, este estudo revelou que a ingestão diária foi de aproximadamente um quarto das doses recomendadas pelo *Dietary Reference Intakes* (DRI) do Instituto de Medicina (IOM) de acordo com o gênero e idade que varia de 5 a 15 µg (200 a 600 UI) por dia (PINHEIRO et al., 2009).

Estudos de prevalência de hipovitaminose D também vêm alertando a comunidade médica para este problema. Em um estudo realizado na cidade de São Paulo (23.3°S) que

avaliou 177 idosos institucionalizados e 243 idosos ambulatoriais, identificou valores de 25(OH)D inferiores a 50 nmol/l em 71,2% no grupo de pacientes institucionalizados e 55,8% no grupo de pacientes ambulatoriais, sendo que em ambos os grupos, as mulheres apresentaram valores inferiores aos dos homens ($p < 0,001$) (SARAIVA et al., 2007).

Em outro estudo de prevalência realizado na cidade de Belo Horizonte (19°S), 180 pacientes avaliados no ambulatório de endocrinologia com média de idade de 58,87 anos apresentaram 42,4% de insuficiência de vitamina D (ponto de corte utilizado de 25(OH)D de 32 ng/ml) (SILVA et al., 2008).

Maeda et al., através do estudo SPADES (São Paulo *Vitamin D Evaluation Study*) que incluiu um total de 591 pessoas entre idosos institucionalizados, idosos moradores da comunidade e jovens, demonstraram que os níveis de 25(OH)D foram mais baixos durante todo o ano entre os idosos. Estes níveis variaram de $36,1 \pm 21,2$ (idosos institucionalizados) e $44,1 \pm 24$ nmol/l (idosos moradores da comunidade) nos meses de inverno e primavera; e de $42,1 \pm 25,9$ e $59,1 \pm 29,6$ nmol/l nos meses de verão e outono, nos mesmos grupos respectivamente. Neste estudo também foi verificada pouca variação nas medidas de 25(OH)D no grupo de idosos institucionalizados, mostrando que a exposição solar nestes indivíduos foi insuficiente nos meses de maior insolação (MAEDA et al., 2013).

Em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, devido à alta latitude (33°05'S), pacientes apresentam maior percentagem de hipovitaminose D (24,5%) quando comparada a demais capitais brasileiras conforme resultado do estudo *Arzoxifene Generations Trial* (ARANTES et al., 2013).

1.13 Importância para o meio

A partir da constatação de que pacientes idosos são mais vulneráveis a estados de hipovitaminose D e que a vitamina D é um importante imunomodulador, podemos pensar que se pudermos atuar neste fator ambiental modificável, conseqüentemente poderemos melhorar o desequilíbrio imunológico nesta população específica.

Como já mencionado, a má aderência da população idosa ao uso diário de suplementos a base de vitamina D é um fator preocupante e, portanto, doses elevadas de colecalciferol parecem ser uma alternativa segura e eficaz. Assim, torna-se necessário saber se uma dose

única, como 300.000 UI de vitamina D₃, é capaz de alterar o perfil imunológico de pacientes idosos.

Neste contexto, este trabalho poderá contribuir para o melhor entendimento da resposta inflamatória com o uso de uma dose elevada de colecalciferol e, possivelmente, contribuir com estudos futuros quanto a possíveis indicações do uso da vitamina D no tratamento ou na prevenção de doenças imunomediadas, comuns na população geriátrica.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial benefício da utilização de uma dose única de colecalciferol na regulação do sistema imunológico numa população de mulheres idosas, na cidade de Santa Maria – RS.

3.2 Objetivo Específico

Identificar se uma dose única de 300.000 UI de colecalciferol é capaz de modificar os níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias como a IL-6 e o TNF- α , e da citocina anti-inflamatória IL-10, em diferentes intervalos de tempo, em mulheres idosas na pós-menopausa.

3 ARTIGO CIENTÍFICO

As seções “Métodos”, “Resultados” e “Discussão” estão apresentadas no próprio manuscrito, o qual foi submetido para publicação no periódico *JAMA*.

Effect of a Single Oral Dose of 300.000 IU of Cholecalciferol on Serum Cytokines in Elderly Post-Menopausal Women: A Randomized Trial

Authors: Márcia Regina Rosa Scalcon^a, Manuela Borges Sangoi^b, Pietra Zorzo^c, Lucas Venturini Zottele^d, Karen Koff da Costa^c, Priscila Obregon Borges^d, Naiara dos Santos Guarda^b, José Antonio Mainardi de Carvalho^b, Marta Maria Medeiros Frescura Duarte^e, Rafael Noal Moresco^b, Melissa Orlandin Premaor^{a,c*}

Affiliations:

^a Pós-Graduação em Farmacologia, Federal University of Santa Maria, Santa Maria - Brazil.

^b Laboratório de Pesquisa em Bioquímica Clínica, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Federal University of Santa Maria, Santa Maria - Brazil.

^c Departamento de Clínica Médica, Federal University of Santa Maria, Santa Maria - Brazil.

^d Hospital Universitário de Santa Maria, Federal University of Santa Maria, Santa Maria - Brazil.

^e Centro de Ciências da Saúde, Universidade Luterana do Brasil (ULBRA – Santa Maria), Santa Maria – Brazil.

✉ CORRESPONDING AUTHOR:

Melissa Orlandin Premaor, MD PhD

Grupo de Pesquisa em Doenças Endócrino-Metabólicas Prevalentes

Departamento de Clínica Médica, Centro de Ciências da Saúde (CCS)

Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

Sala 1337, Prédio 26 – CCS/ Avenida Roraima 1000, Campus UFSM – Santa Maria/ RS, Brazil.

Phone.: 00 55 55 32208508; Fax: 00 55 55 32208018

E-mail: premaor@ufsm.br

Disclosure Page

Funding

This study was funded by Federal University of Santa Maria (edital ARD/CCS 2012 and edital PROIC-HUSM 2013)

The funding sources had no role in the design, conduct, or analysis of our study or in the decision to submit this manuscript for publication.

Ethics approval

Approval for this study was obtained from the **Comitê de Ética em Pesquisa da UFSM** (CEP – UFSM). CAAE 04320312.2.0000.5346

It was also registered at <http://www.ensaiosclinicos.gov.br>

UTN U1111-1138-9581

Competing interests

All authors state that they have no conflict of interest regarding this manuscript.

This article presents independent research partially supported by the Federal University of Santa Maria. Pietra Zorzo and Lucas Zottele received partial funding by Federal University of Santa Maria (grant for a research scholarship at the Departamento de Clínica Médica, Federal University of Santa Maria – edital ARD/CCS 2012 and grant for a research scholarship at the Hospital Universitário de Santa Maria, Federal University of Santa Maria – edital PROIC-HUSM 2013); no financial relationships with any organizations that might have an interest in the submitted work in the previous 5 years; no other relationships or activities that could appear to have influenced the submitted work.

Contributorship statement

All authors were involved in drafting the article or revising it critically for important intellectual content, and all authors approved the final version to be published. Adjunct Professor Melissa Premaor had full access to all of the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

ABSTRACT

Importance Vitamin D is a potent immunomodulator. Its deficiency affects various immune functions and may predispose to the development of autoimmune diseases as well as infectious diseases. Vitamin D supplementation has shown significant changes on circulating concentrations of inflammatory markers in different clinical conditions. However, the effect of single large dose of vitamin D₃ in the immune system in elderly people remains unclear.

Objective To investigate whether high single oral dose of cholecalciferol modifies the serum proinflammatory and anti-inflammatory cytokines levels in elderly post-menopausal women.

Design, setting, and patients A double-blind randomized, parallel, placebo-controlled, clinical trial including 40 women aged over 60 years was carried out at Santa Maria, South Brazil. They were followed for three months, ending November 2012.

Intervention Participants were randomized to receive a single oral dose of 300.000 IU of cholecalciferol (n = 20) or placebo (n = 20).

Main Outcome Measures Serum cytokines levels [interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and interleukin-10 (IL-10)] were measured at baseline, 30, 60 and 90 days after intervention.

Results Ninety-five percent of the subjects completed the study. Mean serum 25(OH)D levels were similar in both groups [16.4 ng/ ml (\pm 3.8) in vitamin D group and 15 ng/ ml (\pm 3.7) in placebo group; $p = 0.23$] at baseline. After 12 weeks of follow-up, there was a 30.8% reduction in serum IL-6 levels (from a mean 78.9 to 54.6 pg/ ml, $p = 0.006$), a 48.6% reduction in serum TNF- α levels (from a mean 109.4 to 56.2 pg/ml, $p < 0.001$) and a 68,4%

increase in serum IL-10 levels (from mean 117.6 to 198.1 pg/ ml, $p < 0.001$) in vitamin D group compared with placebo.

Conclusion and Relevance A single high oral dose of vitamin D₃ was able to decrease serum proinflammatory cytokines levels, whereas it increases serum anti-inflammatory cytokines levels in a short period of time in elderly women, when compared with placebo.

Trial Registration UTN U1111-1138-9581

INTRODUCTION

Vitamin D is a steroid hormone that exerts antiinflammatory and immunoregulatory actions on different cells of the immune system (1-7). Many studies show that low vitamin D levels promote important implications in immune regulation, and that vitamin D deficiency is associated with a higher risk of infectious diseases such as tuberculosis (8-9) and autoimmune disorders (10) including multiple sclerosis (MS) (11, 12), type 1 diabetes (T1D) (12-15), inflammatory bowel disease (IBD) (11), and rheumatoid arthritis (RA) (16). Furthermore, vitamin D deficiency is associated with significantly higher circulating concentrations of the inflammatory markers such as IL-6 and TNF- α (17, 18), whereas vitamin D supplementation reduces serum levels of those cytokines in subjects with osteoporosis (19), diabetes mellitus (20, 21) and systemic lupus erythematosus (22). Vitamin D supplementation has also been associated with increase in serum anti-inflammatory cytokines levels, such as IL-10 in healthy adults (23), subjects with congestive heart failure (24), and diabetes mellitus (20).

A single high dose of cholecalciferol has been proposed in medical literature with favorable results for different clinical outcomes (25-27) and it represents an attractive and comfortable option, particularly for elderly people, who are highly susceptible to hypovitaminosis D (28).

To the best of our knowledge, there aren't studies evaluating the effect of single oral dose of cholecalciferol on circulating concentrations of inflammatory and antiinflammatory cytokines, in free living elderly post-menopausal women.

Thus, considering the vitamin D deficiency as a modifiable environmental factor to immune deregulation and assuming that a high dose of vitamin D₃ may improve the immunological functions in elderly people, we proposed this study, whose objective was to evaluate if a single oral dose of 300.000 IU of cholecalciferol might reduce the secretion of proinflammatory cytokines, such as IL-6 and TNF- α , while increasing the liberation of antiinflammatory cytokines, such as IL-10, in different times, in free living elderly post-menopausal women.

METHODS

Overview

We carried out a single-center, double-blind, parallel, randomized, placebo-controlled, clinical trial in Santa Maria, 29° South, Brazil. The study included 40 elderly post-menopausal women who were randomly to receive 300.000 IU of either cholecalciferol or placebo. The study was approved by the Ethics Committee of the University of Santa Maria [CAAE 04320312.2.0000.5346; UTN U1111-1138-9581]. Its protocol was in accordance with the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki. All individuals provided an informed consent term. Data were collected from September to November 2012.

Sample

Women were recruited from the address list of members of the Catholic Parish from July to August 2012. Those at 60 years-old and over were invited to participate. Subjects with

hipercalcemia, history of nephrolithiasis, acute illness, inflammatory rheumatic diseases, bowel diseases, chronic liver disease, chronic kidney disease (G4 and G5), thyroid diseases, neurodegenerative diseases, chronic obstructive pulmonary disease, cancer, infectious diseases, using vitamin D supplements over 1000 IU daily, using glucocorticoids or nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs) including acetylsalicylic acid, and with body mass index (BMI) under 18.49 kg/m^2 were excluded. The sample size of 19 individuals per group was calculated to detect an 8.3 pg/mL difference in serum interleukin 6 (IL6) levels between the placebo (P) group and the cholecalciferol (VitD) group at the end of the study. The confidence level and power were established at 95% and 80%, respectively.

Randomization

The subjects were randomized 1:1, all at the same. The random allocation sequence was generated by a random number table and the medication was dispensed in a plain numbered white container.

Women randomized to the VitD group received 300.000 IU of cholecalciferol (Oravil® – 100.000 UI/2 mL, TRB Pharma S.A./Buenos Aires – Argentina) while women randomized to P group received placebo with the same flavor and appearance. All medication was taken under the research team supervision. The individuals participating in the study, as well as the research team, did not know to which groups they belonged, except for one team member who managed the medications and did not participate in the assessments.

Measurements

A standardized questionnaire including age, medications, hormone replacement therapy, and tobacco and alcohol use was obtained during recruitment. Weight was measured at the baseline visit in light clothing without shoes using a balance-beam scale certified by the *Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia* (Immetro – Brazil). Height was measured visit with participants barefoot (or in thin socks) by a wall-mounted Tonelli

stadiometer (*Tonelli Equipamentos Médicos Ltd.*, Criciúma/SC, Brazil) after a held full-inspiration in the Frankfort horizontal plane. BMI was calculated by the formula weight in kilograms divided by the square of height in meters.

Laboratory analyses

Blood samples were collected by venous puncture between 7 and 8 AM, after 8 hours fasting. Tubes (wrapped in aluminum foil to protect from light) were used to protect 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D] from light. The specimens were centrifuged at 2500 x g for 15 min at 4°C. All of the samples were frozen at -80° C and analyzed at the same time. Serum levels of 25(OH)D were measured by chemiluminescence (ADVIA Centaur® - Siemens Healthcare Diagnostics Inc, San Diego, CA, USA) at baseline. The cytokines quantification was assessed by ELISA using commercial kits for human, serum interleukin-6 (IL-6), interleukin-10 (IL-10) and tumor necrosis factor alpha (TNF- α), (eBIOSCIENCE, San Diego, USA) according to manufacturer's instructions. Briefly, 96 well microplates were sensitized with the primary antibody at room temperature (RT) for 30 min, and then the sample was added and incubated (37 °C temperature, for 30 min). After washing, the secondary antibody conjugated with peroxidase was added and incubated. The presence and concentration of the cytokines were determined by the intensity of the color measured by spectrometry in a micro ELISA reader. They were measured before (baseline) and on days 30, 60 and 90 after intervention. We provided intra-assay and inter-assay coefficients of variation, as follows: IL-6 (5.2% and 5.6%); IL-10 (4.3% and 5.1%), TNF- α (5.1% and 5.6%). Serum albumin, total calcium, phosphorus, creatinine and alkaline phosphatase levels were measured at baseline and 30, 60 and 90 days after treatment, by use of standard methods on Cobas MIRA® (Roche Diagnostic, Basel, Switzerland) automated analyzer.

Adverse events

The following adverse effects were assessed monthly in the study: hypercalcemia, clinical nephrolithiasis and gastrointestinal intolerance.

Statistical analysis

The baseline characteristics of the population were compared using Student *t* tests, Fisher's Exact test and X^2 with Yates correction. The serum 25(OH)D, IL-6, IL-10 and TNF- α were tested for normality and transformed logarithmically when necessary. Generalized Linear Models were used to evaluate the differences between and within the two groups. The Bonferroni test was used to adjust multiple comparisons. Only the data from individuals completing the allocated treatment were analyzed. Differences were considered significant when the two-tail *p* value was less than 0.05. Data were calculated using the IBM-SPSS® statistics package for Windows® version 18.0 (Sao Paulo/SP – Brazil).

RESULTS

A total of 86 individuals were initially assessed for eligibility of participation, but 46 were excluded during interview due to not meeting inclusion criteria or meeting one or more exclusion criteria (*n* = 25) or due to decline to participate (*n* = 21). Forty subjects were randomized to receive the intervention and were followed from August to November 2012. Nineteen subjects in VitD group and twenty subjects in P group concluded the study (Figure 1). Only one participant in VitD group withdrew consent after the intervention. Adherence to treatment was 100% in both groups. Mean serum 25(OH)D levels were similar in both groups at baseline [16.4 ng/ml (\pm 3.8) in VitD group and 15 ng/ml (\pm 3.7) in P group, *p* = 0.23]. Mean serum calcium, alkaline phosphatase, albumin, creatinine, phosphorus and fasting glycaemia were also similar in both groups at baseline. The subjects' characteristics at baseline are reported in Table 1.

After 12 weeks of follow-up, in the subjects receiving single oral dose of 300.000 IU vitamin D₃, there was a 30.8% reduction in serum IL-6 levels (from a mean 78.9 to 54.6 pg/ ml, $p = 0.006$) associated with a 48.6% reduction in serum TNF- α levels (from a mean 109.4 to 56.2 pg/ml, $p < 0.001$) and a 68.4% increase in serum IL-10 levels (from a mean 117.6 to 198.1 pg/ml, $p < 0.001$) compared with those receiving placebo. Comparison of the mean concentrations of systemic inflammatory biomarkers in both groups is summarized in Figure 2. No individual in either groups presented serious adverse events during follow-up.

DISCUSSION

This study has shown that a high single oral dose of cholecalciferol was able to induce significant changes in circulating inflammatory biomarkers in different times in elderly post-menopausal women. After intervention, the group which received 300.000 UI of cholecalciferol presented more expressive decline in both IL-6 and TNF- α proinflammatory cytokines levels accompanied by increase in the anti-inflammatory cytokine IL-10 during 30, 60 and 90 days of follow-up when compared with placebo.

One possible explanation for our findings is that both vitamin D receptor (VDR) and extrarenal 1- α hydroxylase are preserved in inflammatory cells of elderly people. In addition, our study suggests that supraphysiological doses of cholecalciferol are necessary to improve the immunological functions.

Some studies have evaluated the effects of cholecalciferol in inflammatory biomarkers in different populations, but results were conflicting. An Iranian study including 100 subjects with type 2 diabetes (T2D) compared the daily intake of yoghurt drink fortified with 1000 UI vitamin D₃ with placebo (unfortified yoghurt drink) during 12 weeks. This study has shown a significant reduction in IL-6 ($p < 0.002$) and TNF- α ($p = 0.044$) in addition with an

increase in IL-10 levels ($p = 0.013$) (20). Other double-blinded, placebo-controlled, randomized clinical trial reported that a single dose of 250,000 IU of cholecalciferol reduced IL-6 in 64.5% ($p = 0.09$) and TNF- α in 50.4% ($p < 0.01$) within 12 weeks in adults inpatients with cystic fibrosis when compared with placebo. Nevertheless, this study showed no difference in serum IL-10 levels between the vitamin D group and the placebo group (29-30). On the other hand, others researchers report no effect of vitamin D supplementation on serum cytokines levels (18, 31, 32). Yusupov *et al*, in a 3-months double-blind, placebo-controlled, randomized trial revealed no changes in circulating cytokines (IL-2, 4, 5, 6, 8, 10, 13, GM-CSF, IFN- γ , TNF- α) levels after vitamin D supplementation (2000 IU/d) among healthy adults, when compared with placebo (31). Barnes *et al*, has also evaluated the effect of doses of 5, 10 and 15 $\mu\text{g/d}$ cholecalciferol on cytokines in 211 healthy young adults and 202 older ones during 22 weeks. This study did not find significant effect on inflammatory markers IL-6, TNF- α , IL-10, high sensitivity C-reactive protein, soluble CD40 ligand, TGF β , and fibrinogen (18). In other study, inflammatory status was evaluated in 92 colorectal adenoma patients randomized to receive 2 g/d calcium and/or 800 IU/d vitamin D₃ supplementation versus placebo. After 6 months of treatment, there were no changes in inflammatory markers [IL-6, TNF- α , IL-10, C-reactive protein (CRP), IL-1 β , and IL-8]. Moreover, there was no evidence of synergy between vitamin D₃ and calcium or effects on IL-10 (32). Comparing our study with others aforementioned, we perceive that some factors may have contributed to our positive outcomes. Firstly, we used a higher dose of cholecalciferol in healthy elderly subjects. Secondly, our subjects were older, except in the group of old person in Barnes' study (18). Thirdly, the baseline mean serum 25(OH)D levels was lower in our patients [16.4 ng/ ml (± 3.8) vitamin D group and 15 ng/ ml (± 3.7) placebo group].

Strengths of this study include the randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial design; the use of a high single dose of cholecalciferol; the assessment of cytokines levels in

different times points; the supervised intervention that allowed an adherence of 100% in our patients; the low dropout (2.5%) and the choice of free living elderly women.

This study has also some limitations, we have included only older women, therefore we do not know the effect of a high dose cholecalciferol in immune system in other populations such as of older men and young women. Another limitation was the absence of a group on daily use of cholecalciferol to compare with high single dose. Finally, serum cytokines levels were not measured after 3 months, so it is not possible to define how long this dose is beneficial.

In conclusion, our results show that a high oral single dose of vitamin D is more effective than placebo in improving serum cytokines profile in elderly post-menopausal women within 90 days of treatment. Although serum cytokine changes have reached the maximum effect at 90 days in this study, the beneficial effect of a single dose of cholecalciferol was noted as soon as within 30 days. Furthermore, additional researches are required to determine if a high dose of cholecalciferol is effective in other age groups and, if this dose of vitamin D supplementation is possible to delay or even reverse autoimmune diseases and infectious diseases.

Acknowledgements

This study was partially supported by Federal University of Santa Maria (UFSM) under its Programme Grants ARD-CCS 2012 and PROIC-HUSM 2013. Pietra Zorzo and Lucas Zottele received partial funding by Federal University of Santa Maria (grant for a research scholarship at the UFSM). All authors state that they have no conflict of interest regarding this manuscript.

Authors' roles: Study design: MRS, RM and MP. Study conduct: MRS, MBS, PZ, LZ, KC, PB, NG, JM, MD and MP. Data collection: MRS, MBS, PZ, LZ, KC, PB, JM, MD and NG.

Data analysis: MRS, PZ, LZ and MP. Data interpretation: MRS, MBS, PZ, LZ, KC, MD, RM and MP. Drafting manuscript: MRS, RM and MP. Revising manuscript content: MRS, MBS, PZ, LZ, KC, PB, NG, JM, MD, RM and MP. Approving final version of manuscript: MRS, MBS, PZ, LZ, KC, PB, NG, JM, MD, RM and MP. MP takes responsibility for the integrity of the data analysis.

REFERENCES

1. van Etten E, Mathieu C. Immunoregulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3: basic concepts. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2005; 97(1-2):93-101.
2. Verstuyf A, Carmeliet G, Bouillon R, Mathieu C. Vitamin D: a pleiotropic hormone. *Kidney Int.* 2010; 78(2):140-145.
3. Hewison M. Vitamin D and the immune system: new perspectives on an old theme. *Rheum Dis Clin North Am.* 2012; 38(1):125-139.
4. Baeke F, Takiishi T, Korf H, Gysemans C, Mathieu C. Vitamin D: modulator of the immune system. *Curr Opin Pharmacol.* 2010; 10(4):482-496.
5. Di Rosa M, Malaguarnera M, Nicoletti F, Malaguarnera L. Vitamin D3: a helpful immunomodulator. *Immunology.* 2011; 134(2):123-139.
6. Wolden-Kirk H, Gysemans C, Verstuyf A, Mathieu C. Extraskeletal effects of vitamin D. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2012; 41(3):571-594.
7. Wacker M, Holick MF. Vitamin D - effects on skeletal and extraskeletal health and the need for supplementation. *Nutrients.* 2013; 5(1):111-148.

8. Chan TY. Vitamin D deficiency and susceptibility to tuberculosis. *Calcif Tissue Int.* 2000; 66(6):476-478.
9. Liu PT, Stenger S, Li H, et al. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science.* 2006; 311(5768):1770-1773.
10. Holick MF. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr.* 2004; 80(6 Suppl):1678S-1688S.
11. Cantorna MT. Vitamin D, multiple sclerosis and inflammatory bowel disease. *Prog Biophys Mol Biol.* 2006; 92(1):60-64.
12. Antico A, Tampoia M, Tozzoli R, Bizzaro N. Can supplementation with vitamin D reduce the risk or modify the course of autoimmune diseases? A systematic review of the literature. *Autoimmun Rev.* 2012;12(2):127-136.
13. Pozzilli P, Manfrini 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;37(11):680-683.
14. Littorin B, Blom P, Schölin A, et al. Lower levels of plasma 25-hydroxyvitamin D among young adults at diagnosis of autoimmune type 1 diabetes compared with control subjects: results from the nationwide Diabetes Incidence Study in Sweden (DISS). *Diabetologia.* 2006;49(12):2847-2852.
15. Mohr SB, Garland CF, Gorham ED, Garland FC. The association between ultraviolet B irradiance, vitamin D status and incidence rates of type 1 diabetes in 51 regions worldwide. *Diabetologia.* 2008;51(8):1391-1398.

16. Gatenby P, Lucas R, Swaminathan A. Vitamin D deficiency and risk for rheumatic diseases: an update. *Curr Opin Rheumatol*. 2013;25(2):184-191.
17. Peterson CA, Heffernan ME. Serum tumor necrosis factor-alpha concentrations are negatively correlated with serum 25(OH)D concentrations in healthy women. *J Inflamm (Lond)*. 2008;5:10.
18. Barnes MS, Horigan G, Cashman KD, et al. Maintenance of wintertime vitamin D status with cholecalciferol supplementation is not associated with alterations in serum cytokine concentrations among apparently healthy younger or older adults. *J Nutr*. 2011;141(3):476-481.
19. Inanir A, Ozoran K, Tutkak H, Mermerci B. The effects of calcitriol therapy on serum interleukin-1, interleukin-6 and tumour necrosis factor-alpha concentrations in post-menopausal patients with osteoporosis. *J Int Med Res*. 2004;32(6):570-582.
20. Shab-Bidar S, Neyestani TR, Djazayeri A, et al. Improvement of vitamin D status resulted in amelioration of biomarkers of systemic inflammation in the subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*. 2012;28(5):424-430.
21. Neyestani TR, Nikooyeh B, Alavi-Majd H, et al. Improvement of vitamin D status via daily intake of fortified yogurt drink either with or without extra calcium ameliorates systemic inflammatory biomarkers, including adipokines, in the subjects with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97(6):2005-2011.
22. Abou-Raya A, Abou-Raya S, Helmii M. The effect of vitamin D supplementation on inflammatory and hemostatic markers and disease activity in patients with systemic lupus erythematosus: a randomized placebo-controlled trial. *J Rheumatol*. 2013;40(3):265-272.

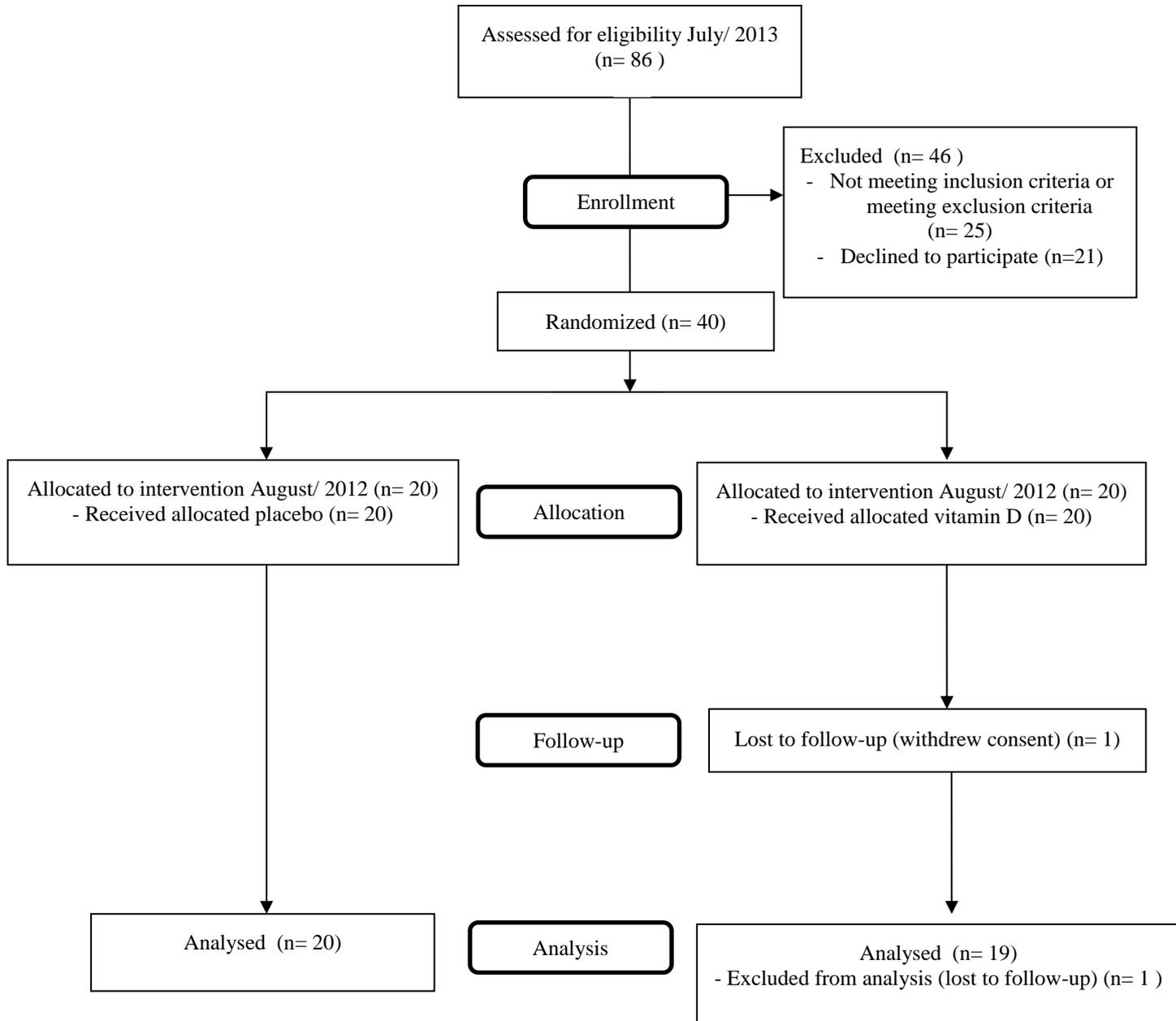
23. Allen AC, Kelly S, Basdeo SA, et al. A pilot study of the immunological effects of high-dose vitamin D in healthy volunteers. *Mult Scler*. 2012;18(12):1797-1800.
24. Schleithoff SS, Zittermann A, Tenderich G, Berthold HK, Stehle P, Koerfer R. Vitamin D supplementation improves cytokine profiles in patients with congestive heart failure: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Am J Clin Nutr*. 2006;83(4):754-759.
25. Khaw KT, Scragg R, Murphy S. Single-dose cholecalciferol suppresses the winter increase in parathyroid hormone concentrations in healthy older men and women: a randomized trial. *Am J Clin Nutr*. 1994;59(5):1040-1044.
26. Trivedi DP, Doll R, Khaw KT. Effect of four monthly oral vitamin D3 (cholecalciferol) supplementation on fractures and mortality in men and women living in the community: randomised double blind controlled trial. *BMJ*. 2003;326(7387):469.
27. Premaor MO, Scalco R, da Silva MJ, Froehlich PE, Furlanetto TW. The effect of a single dose versus a daily dose of cholecalciferol on the serum 25-hydroxycholecalciferol and parathyroid hormone levels in the elderly with secondary hyperparathyroidism living in a low-income housing unit. *J Bone Miner Metab*. 2008;26(6):603-608.
28. Bacon CJ, Gamble GD, Horne AM, Scott MA, Reid IR. High-dose oral vitamin D3 supplementation in the elderly. *Osteoporos Int*. 2009;20(8):1407-1415.
29. Grossmann RE, Zughaier SM, Liu S, Lyles RH, Tangpricha V. Impact of vitamin D supplementation on markers of inflammation in adults with cystic fibrosis hospitalized for a pulmonary exacerbation. *Eur J Clin Nutr*. 2012;66(9):1072-1074.
30. Grossmann RE, Zughaier SM, Kumari M, et al. Pilot study of vitamin D supplementation in adults with cystic fibrosis pulmonary exacerbation: A randomized, controlled trial. *Dermatoendocrinol*. 2012;4(2):191-197.

31. Yusupov E, Li-Ng M, Pollack S, Yeh JK, Mikhail M, Aloia JF. Vitamin d and serum cytokines in a randomized clinical trial. *Int J Endocrinol*. 2010;2010. pii: 305054.
32. Hopkins MH, Owen J, Ahearn T, et al. Effects of supplemental vitamin D and calcium on biomarkers of inflammation in colorectal adenoma patients: a randomized, controlled clinical trial. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2011;4(10):1645-1654.

Table 1. Baseline characteristics of subjects treated with single dose of vitamin D₃ or placebo

	Vitamin D	Placebo	P Value
Age (years)	67.5 [4.7]	66.6 [6.2]	0.63
BWI (kg/m ²)	27.9 [4.0]	27.8 [4.8]	0.92
Tobacco use (%)	5	0	1.0
Alcohol use (%)	5	15	0.6
Use of medications (%)	85	90	1.0
Hormone replacement therapy (%)	30	55	0.53
25- hydroxyvitamin D (ng/ml)	16.4 [3.8]	15 [3.7]	0.23
Calcium (mg/dl)	7.3 [1.4]	7.3 [1.3]	0.96
Alkaline Phosphatase (U/l)	73.1 [21]	63.5 [16]	0.12
IL-6	78.9 [19.4]	87.4 [21.5]	0.20
IL-10	117.6 [22.5]	126 [22.1]	0.24
TNF- α	109.4 [16.5]	115.6 [12.1]	0.19
Albumin (g/dl)	3.7 [0.5]	3.7 [0.3]	0.94
Creatinine (mg/dl)	1.0 [0.09]	1.0 [0.09]	0.81
Phosphorus (mg/dl)	5.0 [0.6]	5.2 [0.7]	0.23
Fasting glycaemia (mg/dl)	84.4 [17]	83.5 [14.5]	0.85

Data are shown as mean [SD].

Figure 1. Flow-chart of the study

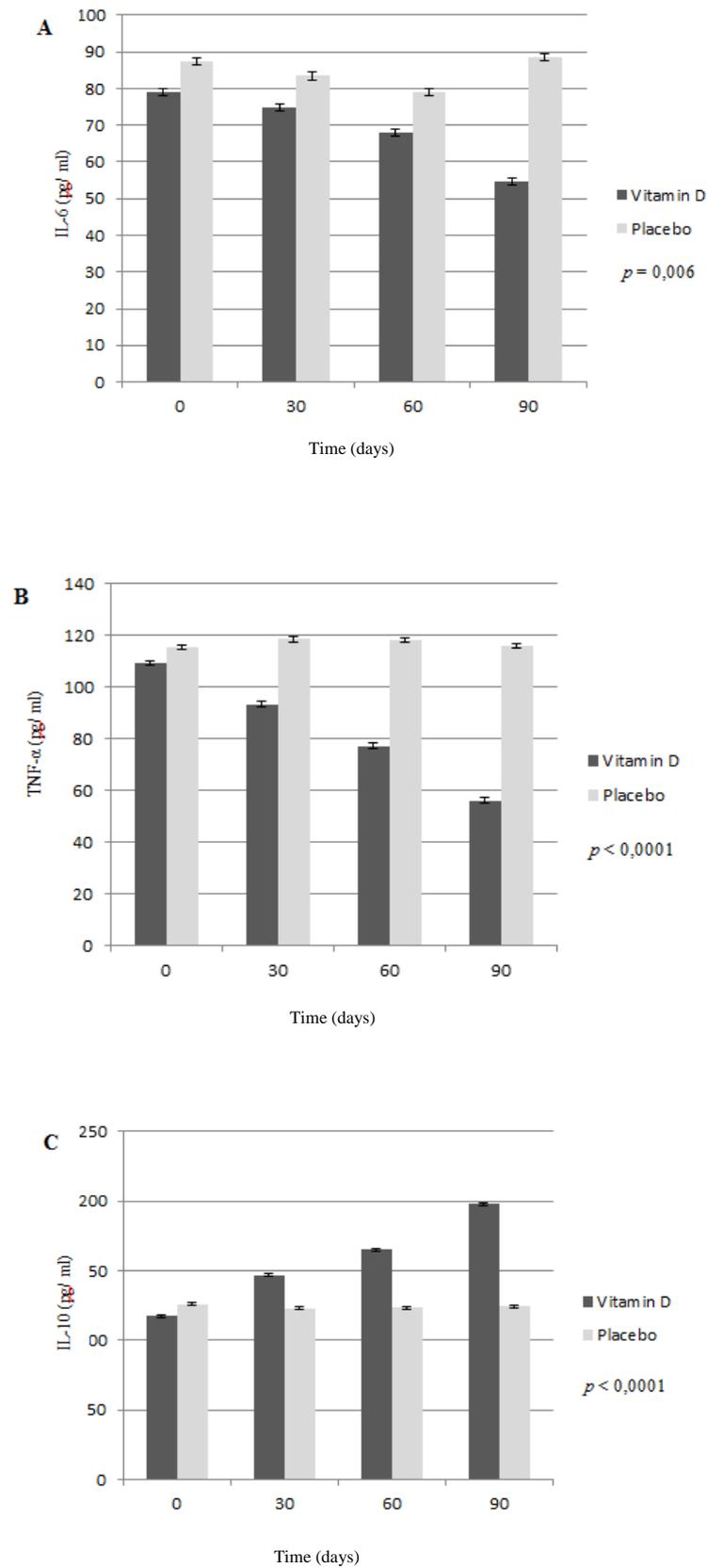


Figure 2. Comparison of the effect of single oral dose of vitamin D and placebo, on serum cytokines levels from baseline to day 90. (A) IL-6; (B) TNF- α and (C) IL-10. Data are shown as mean [SD].

4 CONCLUSÕES

- O uso de uma dose elevada e única de colecalciferol foi capaz de melhorar o perfil imunológico de mulheres idosas na pós-meopausa, em 90 dias de seguimento. Isto foi possível, provavelmente, devido aos receptores de vitamina D (VDRs) e à enzima 1 α -hidroxilase (CYP27B1) estarem normalmente funcionantes nesta faixa etária. Além disso, o uso de 300.000 UI de colecalciferol corrobora com os achados de que a dose de vitamina D para ter ação no sistema imunológico necessita ser supra-fisiológica (BAEKE et al., 2010), ou seja, muito acima da recomendação diária atual para atingir os benefícios ósseos.

- Observamos também, que tanto a supressão das citocinas pró-inflamatórias, IL-6 e TNF- α , quanto a elevação da citocina anti-inflamatória, IL-10, tiveram seus efeitos mais pronunciados em 90 dias, na nossa avaliação. Porém, estas alterações foram percebidas logo nos primeiros 30 dias com progressão em 60 e 90 dias. No entanto, infelizmente, não sabemos até quando esses efeitos permaneceram e qual o tempo cujos valores máximos foram atingidos.

- O melhor conhecimento do papel da vitamina D no sistema imunológico é importante para futuros estudos, sobretudo na população idosa, uma vez que a prevalência de hipovitaminose D na faixa etária geriátrica é elevada (HOLICK, 1995; LIPS, 2001; PREMAOR et al., 2008; BACON et al., 2009; GALLAGHER et al., 2013). Idosos também são mais suscetíveis a infecções crônicas e ao desenvolvimento de doenças auto-imunes e, portanto, se pudermos modificar o *status* de vitamina D nestes pacientes, possivelmente poderemos prevenir ou auxiliar no tratamento destas enfermidades.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE E. et al. Differentiation of mouse myeloid leukemia cells induced by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 78, n. 8, p. 4990-4994, Aug. 1981.

ABBAS A.K.; LICHTMAN A.H.; SHIV P. *Imunologia Celular e Molecular*. Tradução de Claudia Reali e outros. 6ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

ABOU-RAYA A.; ABOU-RAYA S.; HELMII M. The effect of vitamin D supplementation on inflammatory and hemostatic markers and disease activity in patients with systemic lupus erythematosus: a randomized placebo-controlled trial. **The Journal of Rheumatology**, v. 40, n. 3, p. 265-272, Mar. 2013.

ADAMS J.S. et al. Metabolism of 25-hydroxyvitamin D3 by cultured pulmonary alveolar macrophages in sarcoidosis. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 72, n. 5, p. 1856-1860, Nov. 1983.

ADAMS J.S.; GACAD M.A. Characterization of 1 alpha-hydroxylation of vitamin D3 sterols by cultured alveolar macrophages from patients with sarcoidosis. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 161, n. 4, p. 755-765, Apr. 1985.

ADAMS J.S.; HEWISON M. Extrarenal expression of the 25-hydroxyvitamin D-1-hydroxylase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 523, n. 1, p. 95-102, July 2012.

ADAMS J.S. et al. Vitamin d-directed rheostatic regulation of monocyte antibacterial responses. **Journal of Immunology**, v. 182, n. 7, p. 4289-4295, Apr. 2009.

ADORINI L.; PENNA G. Control of autoimmune diseases by the vitamin D endocrine system. **Nature Clinical Practice Rheumatology**, v. 4, n. 8, p. 404-412, Aug. 2008.

ADORINI L.; PENNA G. Dendritic cell tolerogenicity: a key mechanism in immunomodulation by vitamin D receptor agonists. **Human Immunology**, v. 70, n. 5, p. 345-352, May 2009.

ALLEN A.C. et al. A pilot study of the immunological effects of high-dose vitamin D in healthy volunteers. **Multiple Sclerosis**, v. 18, n. 12, p. 1797-1800, Dec. 2012.

ALOIA JF, LI-NG M. Re: epidemic influenza and vitamin D. **Epidemiology and Infection**, v. 135, n. 7, p. 1095-1096, Oct. 2007.

ALVAREZ J.A. et al. Effects of high-dose cholecalciferol on serum markers of inflammation and immunity in patients with early chronic kidney disease. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 67, n. 3, p. 264-269, Mar. 2013.

ANTICO A. et al. Can supplementation with vitamin D reduce the risk or modify the course of autoimmune diseases? A systematic review of the literature. **Autoimmunity Reviews**, v. 12, n. 2, p. 127-136, Dec. 2012.

ARANOW C. Vitamin D and the immune system. **Journal of Investigative Medicine**, v. 59, n. 6, p. 881-886, Aug. 2011.

ARANTES H.P. et al. Correlation between 25-hydroxyvitamin D levels and latitude in Brazilian postmenopausal women: from the Arzoxifene Generations Trial. **Osteoporosis International**, v. 24, n. 10, p. 2707-2712, Oct. 2013.

BACON C.J. et al. High-dose oral vitamin D3 supplementation in the elderly. **Osteoporosis International**, v. 20, n. 8, p. 1407-1415, Aug. 2009.

BAEKE F. et al. Vitamin D: modulator of the immune system. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 10, n. 4, p. 482-496, Aug. 2010.

BARGER-LUX M.J. et al. Vitamin D and its major metabolites: serum levels after graded oral dosing in healthy men. **Osteoporosis International**, v. 8, n. 3, p. 222-230, 1998.

BARNES M.S. et al. Maintenance of wintertime vitamin D status with cholecalciferol supplementation is not associated with alterations in serum cytokine concentrations among apparently healthy younger or older adults. **The Journal of Nutrition**, v. 141, n. 3, p. 476-481, Mar. 2011.

BEILFUSS J. et al. Effects of a 1-year supplementation with cholecalciferol on interleukin-6, tumor necrosis factor-alpha and insulin resistance in overweight and obese subjects. **Cytokine**, v. 60, n. 3, p. 870-874, Dec. 2012.

BENDIX-STRUVE M. et al. Vitamin D3 treatment of Crohn's disease patients increases stimulated T cell IL-6 production and proliferation. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 32, n. 11/12, p. 1364-1372, Dec. 2010.

BIKLE D. Nonclassic actions of vitamin D. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 94, n. 1, p. 26-34, Jan. 2009.

BISCHOFF-FERRARI H.A. et al. Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 84, n. 1, p. 18-28, July 2006.

BROMMAGE R.; DELUCA H.F. Evidence that 1,25-dihydroxyvitamin D₃ is the physiologically active metabolite of vitamin D₃. **Endocrine Reviews**, v. 6, n. 4, p. 491-511, Fall 1985.

CANNELL J.J. et al. Epidemic influenza and vitamin D. **Epidemiology and Infection**, v. 134, n. 6, p. 1129-1140, Dec. 2006.

CANTORNA M.T. Vitamin D and its role in immunology: multiple sclerosis, and inflammatory bowel disease. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 92, n. 1, p. 60-64, Sept. 2006.

CANTORNA M.T. Vitamin D and multiple sclerosis: an update. **Nutrition Reviews**, v. 66, n. 10 Suppl. 2, p. S135-S138, Oct. 2008.

CARRILLO A.E. et al. Vitamin D supplementation during exercise training does not alter inflammatory biomarkers in overweight and obese subjects. **European Journal of Applied Physiology**, v. 112, n. 8, p. 3045-3052, Aug. 2012.

CESARI M. et al. Vitamin D hormone: A multitude of actions potentially influencing the physical function decline in older persons. **Geriatrics & Gerontology International**, v. 11, n. 2, p. 133-142, Apr. 2011.

CHAPUY M.C. et al. Healthy elderly French women living at home have secondary hyperparathyroidism and high bone turnover in winter. EPIDOS Study Group. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 81, n. 3, p. 1129-1133, Mar. 1996.

CHIRICONE D.; DE SANTO N.G.; CIRILLO M. Unusual cases of chronic intoxication by vitamin D. **Journal of Nephrology**, v. 16, n. 6, p. 917-921, Nov./Dec. 2003.

CIPPITELLI M. et al. Negative regulation of CD95 ligand gene expression by vitamin D₃ in T lymphocytes. **The Journal of Immunology**, v. 168, n. 3, p. 1154-1166, Feb. 2002.

CIPPITELLI M.; SANTONI A. Vitamin D3: a transcriptional modulator of the interferon-gamma gene. **European Journal of Immunology**, v. 28, n. 10, p. 3017-3030, Oct. 1998.

CIPRIANI C. et al. Effect of a single oral dose of 600,000 IU of cholecalciferol on serum calciotropic hormones in young subjects with vitamin D deficiency: a prospective intervention study. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 95, n. 10, p. 4771-4777, Oct. 2010.

CRANNEY A. et al. Summary of evidence-based review on vitamin D efficacy and safety in relation to bone health. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 88, n. 2, p. 513S-519S, Aug. 2008.

DAWSON-HUGHES B.; HARRIS S.S.; DALLAL G.E. Plasma calcidiol, season, and serum parathyroid hormone concentrations in healthy elderly men and women. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 65, n. 1, p. 67-71, Jan. 1997.

DELUCA H.F. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 80, n. 6 Suppl., p. 1689S-1696S, Dec. 2004.

DELUCA H.F. Evolution of our understanding of vitamin D. **Nutrition Reviews**, v. 66, n. 10 Suppl. 2, p. 73-87, Oct. 2008.

DI ROSA M. et al. Vitamin D3: a helpful immuno-modulator. **Immunology**, v. 134, n. 2, p. 123-139, Oct. 2011.

DIXON B.M. et al. Positive correlation between circulating cathelicidin antimicrobial peptide (hCAP18/LL-37) and 25-hydroxyvitamin D levels in healthy adults. **BMC Research Notes**, v.5, p. 575, Oct. 2012.

FELDMAN D.; PIKE J.W.; ADAMS J.S. Vitamin D, 3th ed. London: Academic Press, 2011.

FUKAGAWA M.; KOMABA H.; HAMANO T. Vitamin D supplementation in renal disease: is calcitriol all that is needed? **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, v. 243, p.120123, Apr. 2012.

GALLAGHER J.C. Vitamin D and aging. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 42, n. 2, p. 319-332, June 2013.

GATENBY P.; LUCAS R.; SWAMINATHAN A. Vitamin D deficiency and risk for rheumatic diseases: an update. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 25, n. 2, p. 184-191, Mar. 2013.

GOMBART A.F.; BORREGAARD N.; KOEFFLER H.P. Human cathelicidin antimicrobial peptide (CAMP) gene is a direct target of the vitamin D receptor and is strongly up-regulated in myeloid cells by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *FASEB Journal*, v.19, n. 9, p. 1067-1077, July 2005.

GOMBART A.F. et al. Low plasma level of cathelicidin antimicrobial peptide (hCAP18) predicts increased infectious disease mortality in patients undergoing hemodialysis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, n. 4, p. 418-424, Feb. 2009.

GRIFFIN M.D. et al. Potent inhibition of dendritic cell differentiation and maturation by vitamin D analogs. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 270, n. 3, p. 701-708, Apr. 2000.

GROSSMANN R.E. et al. Impact of vitamin D supplementation on markers of inflammation in adults with cystic fibrosis hospitalized for a pulmonary exacerbation. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 66, n. 9, p. 1072-1074, Sept. 2012.

HATHCOCK J.N. et al. Risk assessment for vitamin D. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 85, n. 1, p. 6-18, Jan. 2007.

HEANEY R.P. et al. Calcium absorption varies within the reference range for serum 25-hydroxyvitamin D. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 22, n. 2, p. 142-146, Apr. 2003.

HENRY H.L.; NORMAN A.W. STUDIES ON CALCIFEROL METABOLISM. IX. Renal 25-hydroxy-vitamin D₃-1 hydroxylase. Involvement of cytochrome P-450 and other properties. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 249, n. 23, p. 7529-7535, Dec. 1974.

HEWISON M. et al. Extra-renal 25-hydroxyvitamin D₃-1 α -hydroxylase in human health and disease. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 103, n. 3/5, p. 316-321, Mar. 2007.

HEWISON M. Vitamin D and the intracrinology of innate immunity. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 321, n. 2, p. 103-111, June 2010.

HEWISON M. An update on vitamin D and human immunity. **Clinical Endocrinology**, v. 76, n. 3, p. 315-325, Mar. 2012.

HIRAHARA K. et al. Mechanisms underlying helper T-cell plasticity: implications for immune-mediated disease. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 131, n. 5, p. 1276-1287, May 2013.

HOLICK M.F. et al. Endocrine Society. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 96, n. 7, p. 1911-1930, July 2011.

HOLICK M.F. et al. Prevalence of Vitamin D inadequacy among postmenopausal North American women receiving osteoporosis therapy. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 90, n. 6, p. 3215-3224, June 2005a.

HOLICK M.F. Resurrection of vitamin D deficiency and rickets. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 8, p. 2062-2072, Aug. 2006.

HOLICK M.F. Vitamin D deficiency. **New England Journal of Medicine**, v. 357, n. 3, p. 266-281, July 2007.

HOLICK M.F. Vitamin D status: measurement, interpretation and clinical application. **Annals of Epidemiology**, v. 19, n. 2, p. 73-78, Feb. 2009.

HOLICK M.F. Vitamin D: important for prevention of osteoporosis, cardiovascular heart disease, type 1 diabetes, autoimmune diseases, and some cancers. **Southern Medical Journal**, v. 98, n. 10, p. 1024-1027, Oct. 2005.

HOLICK M.F. Environmental factors that influence the cutaneous production of vitamin D. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 61, n. 3 Suppl., p. 638S-645S, Mar. 1995.

HOPKINS M.H. et al. Effects of supplemental vitamin D and calcium on biomarkers of inflammation in colorectal adenoma patients: a randomized, controlled clinical trial. **Cancer Prevention Research**, v. 4, n. 10, p. 1645-1654, Oct. 2011.

HUOTARI A., HERZIG K.H. Vitamin D and living in northern latitudes--an endemic risk area for vitamin D deficiency. **International Journal of Circumpolar Health**, v. 67, n. 2/3, p. 164-178, June 2008.

ILAHY M.; ARMAS L.A.; HEANEY R.P. Pharmacokinetics of a single, large dose of cholecalciferol. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 87, n. 3, p. 688-691, Mar. 2008.

INANIR A. et al. The effects of calcitriol therapy on serum interleukin-1, interleukin-6 and tumour necrosis factor-alpha concentrations in post-menopausal patients with osteoporosis. **The Journal of International Medical Research**, v. 32, n. 6, p. 570-582, Nov./Dec. 2004.

INSTITUTE OF MEDICINE. **Report at a Glance, Report Brief: Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D**. Disponível em: <<http://iom.edu/Reports/2010/Dietary-Reference-Intakes-fo-Calcium-and-Vitamin-D/Report-Brief.aspx>> Acesso em: 13 jun. 2013.

JENG L. et al. Alterations in vitamin D status and anti-microbial peptide levels in patients in the intensive care unit with sepsis. **Journal of Translational Medicine**, v. 7, p. 28, Apr. 2009.

JONES G. Pharmacokinetics of vitamin D toxicity. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 88, n. 2, p. 582S-586S, Aug. 2008.

JONES G.; STRUGNELL S.A.; DELUCA H.F. Current understanding of the molecular actions of vitamin D. **Physiological Reviews**, v. 78, n. 4, p. 1193-1231, Oct. 1998.

JORDE R. et al. No effect of supplementation with cholecalciferol on cytokines and markers of inflammation in overweight and obese subjects. **Cytokine**, v. 50, n. 5, p. 175-180, May 2010.

JOSHI S. et al. 1,25-dihydroxyvitamin D(3) ameliorates Th17 autoimmunity via transcriptional modulation of interleukin-17A. **Molecular and Cellular Biology**, v. 31, n. 17, p. 3653-3669, Sept. 2011.

KAMEN D.; ARANOW C. Vitamin D in systemic lupus erythematosus. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 20, n. 5, p. 532-537, Sept. 2008.

KHAW K.T.; SCRAGG R.; MURPHY S. Single-dose cholecalciferol suppresses the winter increase in parathyroid hormone concentrations in healthy older men and women: a randomized trial. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 59, n. 5, p. 1040-1044, May 1994.

KLONTZ K.C.; ACHESON D.W. Dietary supplement-induced vitamin D intoxication. **New England Journal of Medicine**, v. 357, n. 3, p. 308-309, July 2007.

KOUTKIA P.; CHEN T.C.; HOLICK M.F. Vitamin D intoxication associated with an over-the-counter supplement. **New England Journal of Medicine**, v. 345, n. 1, p. 66-67, July 2001.

LAGISHETTY V.; LIU N.Q.; HEWISON M. Vitamin D metabolism and innate immunity. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 347, n. 1/2, p. 97-105, Dec. 2011.

LATHERS D.M. et al. Phase 1B study to improve immune responses in head and neck cancer patients using escalating doses of 25-hydroxyvitamin D3. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 53, n. 5, p. 422-430, May 2004.

LEMON B.D.; FREEDMAN L.P. Selective effects of ligands on vitamin D3 receptor- and retinoid X receptor-mediated gene activation in vivo. **Molecular and Cellular Biology**, v. 16, n. 3, p. 1006-1016, Mar. 1996.

LEVINE B.; DERETIC V. Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 10, p. 767-777, Oct. 2007.

LIPS P. Vitamin D physiology. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 92, n. 1, p. 4-8, Sept. 2006.

LIPS P. Vitamin D deficiency and secondary hyperparathyroidism in the elderly: consequences for bone loss and fractures and therapeutic implications. **Endocrine Reviews**, v. 22, n. 4, p. 477-501, Aug. 2001.

LITTORIN B. et al. Lower levels of plasma 25-hydroxyvitamin D among young adults at diagnosis of autoimmune type 1 diabetes compared with control subjects: results from the nationwide Diabetes Incidence Study in Sweden (DISS). **Diabetologia**, v. 49, n. 12, p. 2847-2852, Dec. 2006.

LIU P.T. et al. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. **Science**, v. 311, p. 1770-1773, 2006.

LIU P.T. et al. Cutting edge: vitamin D-mediated human antimicrobial activity against *Mycobacterium tuberculosis* is dependent on the induction of cathelicidin. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 4, p. 2060-2063, Aug. 2007.

MAEDA S.S. et al. Factors affecting vitamin D status in different populations in the city of Sao Paulo, Brazil: the Sao Paulo vitamin D Evaluation Study (SPADES). **BMC Endocrine Disorders**, v. 13, n. 1, p. 14, Apr. 2013.

MAHON B.D. et al. Cytokine profile in patients with multiple sclerosis following vitamin D supplementation. **Journal of Neuroimmunology**, v. 34, n. 1/2, p. 128-132, Jan. 2003.

MARTINEAU A.R. et al. High-dose vitamin D(3) during intensive-phase antimicrobial treatment of pulmonary tuberculosis: a double-blind randomised controlled trial. **The Lancet**, v. 377, n. 9761, p. 242-250, Jan. 2011.

MATHIEU C.; ADORINI L. The coming of age of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) analogs as immunomodulatory agents. **Trends in Molecular Medicine**, v. 8, n. 4, p. 174-179, Apr. 2002.

MEDZHITOV R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. **Nature**, v. 449, n. 7164, p. 819-826, Oct. 2007.

MOHR S.B. et al. The association between ultraviolet B irradiance, vitamin D status and incidence rates of type 1 diabetes in 51 regions worldwide. **Diabetologia**, v. 51, n. 8, p. 1391-1398, Aug. 2008.

NEMERE I. et al. Identification and characterization of 1,25D3-membrane-associated rapid response, steroid (1,25D3-MARRS) binding protein. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 89-90, n. 1/5, p. 281-285, May 2004.

NEYESTANI T.R. et al. Improvement of vitamin D status via daily intake of fortified yogurt drink either with or without extra calcium ameliorates systemic inflammatory biomarkers, including adipokines, in the subjects with type 2 diabetes. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 97, n. 6, p. 2005-2011, June 2012.

NIZET V.; GALLO R.L. Cathelicidins and innate defense against invasive bacterial infection. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 35, n. 9, p. 670-676, 2003.

NNOAHAM K.E.; CLARKE A. Low serum vitamin D levels and tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. **International Journal of Epidemiology**, v. 37, n. 1, p. 113-119, Feb. 2008.

NORMAN A.W. et al. Different shapes of the steroid hormone 1 α ,25(OH)(2)-vitamin D(3) act as agonists for two different receptors in the vitamin D endocrine system to mediate genomic and rapid responses. **Steroids**, v. 66, n. 3/5, p. 147-158, Mar./May 2001.

NORMAN A.W. Minireview: vitamin D receptor: new assignments for an already busy receptor. **Endocrinology**, v. 147, n. 12, p. 5542-5548, Dec. 2006.

NURSYAM E.W.; AMIN Z.; RUMENDE C.M. The effect of vitamin D as supplementary treatment in patients with moderately advanced pulmonary tuberculous lesion. **Acta Medica Indonesiana**, v. 38, n. 1, p. 3-5, Jan./Mar. 2006.

OLIVEIRA N.M.P.; LEMOS M.C. Papel da vitamina D na susceptibilidade para a Diabetes Mellitus tipo 1. 2010. 22 f. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina) – Universidade da Beira Interior, Covilha – Portugal, 2010.

OKAMURA W.H. et al. Chemistry and conformation of vitamin D molecules. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 53, n. 1/6, p. 603-613, June 1995.

OZKAN B.; HATUN S.; BERKET A. Vitamin D intoxication. **The Turkish Journal of Pediatrics**, v. 54, n. 2, p. 93-98, Mar./Apr. 2012.

PENNA G.; ADORINI L. 1 Alpha,25-dihydroxyvitamin D₃ inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 5, p. 2405-2411, Mar. 2000.

PINHEIRO M.M. et al. Nutrient intakes related to osteoporotic fractures in men and women--the Brazilian Osteoporosis Study (BRAZOS). **Nutrition Journal**, v. 8, p. 6, Jan. 2009.

POZZILLI P. et al. IMDIAB GROUP. Low levels of 25-hydroxyvitamin D₃ and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in patients with newly diagnosed type 1 diabetes. **Hormone and Metabolic Research**, v. 37, n. 11, p. 680-683, Nov. 2005.

PREMAOR M.O. et al. The effect of a single dose versus a daily dose of cholecalciferol on the serum 25-hydroxycholecalciferol and parathyroid hormone levels in the elderly with secondary hyperparathyroidism living in a low-income housing unit. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 26, n. 6, p. 603-608, 2008.

RAGHUWANSHI A.; JOSHI S.S.; CHRISTAKOS S. Vitamin D and multiple sclerosis. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 105, n. 2, p. 338-343, Oct. 2008.

RALPH A.P.; LUCAS R.M.; NORVAL M. Vitamin D and solar ultraviolet radiation in the risk and treatment of tuberculosis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 13, n. 1, p. 77-88, Jan. 2013.

ROOK G.A. et al. Vitamin D₃, gamma interferon, and control of proliferation of Mycobacterium tuberculosis by human monocytes. **Immunology**, v. 57, n. 1, p. 159-163, Jan. 1986.

ROSEN C.J. et al. The nonskeletal effects of vitamin D: an Endocrine Society scientific statement. **Endocrine Reviews**, v. 33, n. 3, p. 456-492, June 2012.

ROSS A.C. et al. The 2011 report on dietary reference intakes for calcium and vitamin D from the Institute of Medicine: what clinicians need to know. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 96, n. 1, p. 53-58, Jan. 2011.

SANDERS K.M. et al. Annual high-dose oral vitamin D and falls and fractures in older women: a randomized controlled trial. **JAMA**, v. 303, n. 18, p. 1815-1822, May 2010.

SARAIVA G.L. et al. Prevalência da deficiência, insuficiência de vitamina D e hiperparatireoidismo secundário em idosos institucionalizados e moradores na comunidade da cidade de São Paulo, Brasil. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 51, n. 3, p. 437-442, abr. 2007.

SCHLEITHOFF S.S. et al. Vitamin D supplementation improves cytokine profiles in patients with congestive heart failure: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 83, n. 4, p. 754-759, Apr. 2006.

SHAB-BIDAR S. et al. Improvement of vitamin D status resulted in amelioration of biomarkers of systemic inflammation in the subjects with type 2 diabetes. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v. 28, n. 5, p. 424-430, July 2012.

SINGH T.; NEWMAN A.B. Inflammatory markers in population studies of aging. **Ageing Research Reviews**, v. 10, n. 3, p. 319-329, July 2011.

SILVA B.C. et al. Prevalência de deficiência e insuficiência de vitamina D e sua correlação com PTH, marcadores de remodelação óssea e densidade mineral óssea, em pacientes ambulatoriais. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 52, n. 3, p. 482-488, Apr. 2008.

SOKOL S.I. et al. The effects of vitamin D repletion on endothelial function and inflammation in patients with coronary artery disease. **Vascular Medicine**, v. 17, n. 6, p. 394-404, Dec. 2012.

STOFFELS K. et al. Immune regulation of 25-hydroxyvitamin-D3-1alpha-hydroxylase in human monocytes. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 21, n. 1, p. 37-47, Jan. 2006.

TAKEUCHI A. et al. Nuclear factor of activated T cells (NFAT) as a molecular target for 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3-mediated effects. **The Journal of Immunology**, v. 160, n. 1, p. 209-218, Jan. 1998.

THOMAS M.K. et al. Hypovitaminosis D in medical inpatients. **New England Journal of Medicine**, v. 338, n. 12, p. 777-783, Mar. 1998.

TRIVEDI D.P.; DOLL R.; KHAW K.T. Effect of four monthly oral vitamin D3 (cholecalciferol) supplementation on fractures and mortality in men and women living in the community: randomised double blind controlled trial. **BMJ**, v. 326, n. 7387, p.469, Mar. 2003.

TSUKAMOTO Y. et al. Comparison of effects of calcitriol and calcium carbonate on secretion of interleukin-1 beta and tumour necrosis factor-alpha by uraemic peripheral blood mononuclear cells. **Nephrology, Dialysis, Transplantation**, v. 11, Suppl. 3, p. 15-21, 1996.

VAN DRIEL M. et al. Evidence for auto/paracrine actions of vitamin D in bone: 1alpha-hydroxylase expression and activity in human bone cells. **FASEB Journal**, v. 20, n. 13, p. 2417-2419, Nov. 2006.

VAN ETTEN E.; MATHIEU C. Immunoregulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3: basic concepts. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 97, n. 1/2, p. 93-101, Oct. 2005.

VERSTUYF A. et al. Vitamin D: a pleiotropic hormone. **Kidney International**, v. 78, n. 2, p. 140-145, July 2010.

VIETH R. Vitamin D supplementation, 25-hydroxyvitamin D concentrations, and safety. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 69, n. 5, p. 842-856, May 1999.

VIETH R. Vitamin D toxicity, policy, and science. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 22, Suppl. 2, p. V64-V68, Dec. 2007.

WACKER M.; HOLICK M.F. Vitamin D - effects on skeletal and extraskeletal health and the need for supplementation. **Nutrients**, v.10, n. 1, p. 111-148, Jan. 2013.

WEBB A.R. et al. An evaluation of the relative contributions of exposure to sunlight and of diet to the circulating concentrations of 25-hydroxyvitamin D in an elderly nursing home population in Boston. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 51, n. 6, p. 1075-1081, June 1990.

WEJSE C. et al. Vitamin D as supplementary treatment for tuberculosis: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 179, n. 9, p. 843-850, May 2009.

WOLDEN-KIRK H. et al. Extraskeletal effects of vitamin D. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 41, n. 3, p. 571-594, Sept. 2012.

WOLFF A.E.; JONES A.N.; HANSEN K.E. Vitamin D and musculoskeletal health. **Nature Clinical Practice Rheumatology**, v. 4, n. 11, p. 580-588, Nov. 2008.

WOLF G. The discovery of vitamin D: the contribution of Adolf Windaus. **The Journal of Nutrition**, v. 134, n. 6, p. 1299-1302, June 2004.

YATES A.A.; SCHLICKER S.A.; SUITOR C.W. Dietary Reference Intakes: the new basis for recommendations for calcium and related nutrients, B vitamins, and choline. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 98, n. 6, p. 699-706, June 1998.

YUK J.M. et al. Vitamin D₃ induces autophagy in human monocytes/macrophages via cathelicidin. **Cell Host & Microbe**, v. 6, n. 3, p. 231-243, Sept. 2009.

YUSUPOV E. et al. Vitamin d and serum cytokines in a randomized clinical trial. **International Journal of Endocrinology**, v. 2010, pii: 305054, 2010.

ZELLA J.B.; MCCARY L.C.; DELUCA H.F. Oral administration of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ completely protects NOD mice from insulin-dependent diabetes mellitus. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 417, n. 1, p. 77-80, Sept. 2003.

ZHU J.; DELUCA H.F. Vitamin D 25-hydroxylase - Four decades of searching, are we there yet? **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 523, n. 1, p. 30-36, July 2012.

6 ANEXOS

Anexo A – Carta de aprovação do protocolo de pesquisa

Plataforma Brasil - Ministério da Saúde

Universidade Federal de Santa Maria/ Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa

PROJETO DE PESQUISA

Título: EFEITO DE DOSE ÚNICA DE VITAMINA D NA FORÇA MUSCULAR E NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA SISTÊMICA EM PACIENTES IDOSAS

Área Temática: Área 3. Fármacos, medicamentos, vacinas e testes diagnósticos novos (fases I, II e III) ou não registrados no país (ainda que fase IV), ou quando a pesquisa for referente a seu uso com modalidades, indicações, doses ou vias de administração diferentes daquelas estabelecidas, incluindo seu emprego em combinações.

Pesquisador: Melissa Orlandin Premaor

Versão: 2

Instituição: Universidade Federal de Santa Maria/ Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa

CAAE: 04320312.2.0000.5346

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 59317

Data da Relatoria: 20/07/2012

Apresentação do Projeto:

A hipovitaminose D é uma desordem comum, sobretudo na população idosa. Nas últimas décadas vem crescendo o número de estudos que evidenciam o papel da vitamina D no músculo esquelético e sistema imunológico. Até o momento não existem estudos que avaliem administração de dose única de vitamina D na resposta inflamatória sistêmica e força muscular. Para isso foi desenhado um estudo randomizado, duplo-cego, controlado com placebo que incluirá 40 pacientes femininas com idade superior a 60 anos da população de Santa Maria e RS. Vinte pacientes receberão dose única de vitamina D e vinte pacientes receberão placebo. Serão realizadas dosagens de IL-6, IL-10 e proteína C reativa e avaliação de força muscular através de prensão palmar e Short Physical Performance Battery.

Objetivo da Pesquisa:

Este trabalho visa definir se dose única de 300.000 UI via oral de colecalciferol influencia nos valores de citocinas inflamatórias e se estes estão associados com melhora na performance física numa população de idosas. Nossos objetivos secundários são: avaliar o impacto do tratamento com vitamina D sobre biomarcadores inflamatórios e oxidativos e avaliar o risco de quedas com a administração de dose única de vitamina D.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Prevê o risco da punção venosa, sendo esse um risco mínimo e também prevê o desconforto ao preencher o questionário. Benefício será conhecer o efeito da vitamina D em dose única.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trabalho de pós graduação da farmacologia.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresenta termo do DEPE, TCLE, termo de confidencialidade e do Sie. Termo de confidencialidade adequado

Recomendações:

sem novas recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

aprovar

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SANTA MARIA, 22 de Julho de 2012

Assinado por:
Félix Alexandre Antunes Soares

Anexo B – Comprovante de submissão do artigo científico

JAMA14-0938

29/01/14 21:40

The JAMA Network

JAMA The Journal of the
American Medical Association

[HOME](#) [AUTHOR INSTRUCTIONS](#) [REVIEWER INSTRUCTIONS](#) [HELP](#) [TIPS](#) [LOGOUT](#) [JOURNAL HOME](#)

Detailed Status Information

Manuscript #	JAMA14-0938
Current Revision #	0
Submission Date	2014-01-29 18:39:37
Current Stage	In Quality Control
Title	Effect of a Single Oral Dose of 300.000 IU of Cholecalciferol on Serum Cytokines in Elderly Post-Menopausal Women: A Randomized Trial
Manuscript Type	Original Investigation
Theme Issue	N/A
Corresponding Author	Melissa Premaor (Federal University of Santa Maria)
Coauthors	Márcia Scalcon , Manuela Sangoi , Pietra Zorzo , Lucas Zottele , Karen da Costa , Priscila Borges , Naiara Guarda , José de Carvalho , Marta Duarte , Rafael Moresco , Melissa Premaor (corr_auth)
Abstract	<p>Importance Vitamin D is a potent immunomodulator. Its deficiency affects various immune functions and may predispose to the development of autoimmune diseases as well as infectious diseases. Vitamin D supplementation has shown significant changes on circulating concentrations of inflammatory markers in different clinical conditions. However, the effect of single large dose of vitamin D3 in the immune system in elderly people remains unclear. Objective To investigate whether high single oral dose of cholecalciferol modifies the serum proinflammatory and anti-inflammatory cytokines levels in elderly post-menopausal women. Design, setting, and patients A double-blind, parallel, randomized, placebo-controlled, clinical trial including 40 women aged over 60 years was carried out at Santa Maria, South Brazil. They were followed for three months, ending November 2012. Intervention Participants were randomized to receive a single oral dose of 300.000 IU of cholecalciferol (n=20) or placebo (n=20). Main Outcome Measures Serum cytokines levels [interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor alpha (TNF-α) and interleukin-10 (IL-10)] were measured at baseline, 30, 60, and 90 days after intervention. Results Ninety-five percent of the subjects completed the study. Mean serum 25(OH)D levels were similar in both groups [16.4 ng/ml (\pm 3.8) in vitamin D group and 15 ng/ml (\pm 3.7) in placebo group; p = 0.23] at baseline. After 12 weeks of follow-up, there was a 30.8% reduction in serum IL-6 levels (from a mean 78.9 to 54.6 pg/ml, p = 0.006), a 48.6% reduction in serum TNF-α levels (from a mean 109.4 to 56.2 pg/ml, p < 0.001) and a 68,4% increase in serum IL-10 levels (from mean 117.6 to 198.1 pg/ml, p < 0.001) in vitamin D group compared with placebo.</p>

	Conclusion and Relevance A single high oral dose of vitamin D3, was able to decrease serum proinflammatory cytokines levels, whereas it increases serum anti-inflammatory cytokines levels in a short period of time in elderly women, when compared with placebo.
JAMA Network Referral	Yes, JAMA Internal Medicine
Reviewing Editor	Not Assigned
Conflicts of Interest	All authors' potential conflicts of interest
Funding Organizations	Funding Summary

Stage	Start Date
In Quality Control	2014-01-29 18:39:37
Submission Pending	2014-01-29 17:37:23

[MANUSCRIPT HOME](#) | [AUTHOR INSTRUCTIONS](#) | [REVIEWER INSTRUCTIONS](#) | [HELP](#) | [TIPS](#) | [LOGOUT](#) | [JOURNAL HOME](#)
[TERMS OF SERVICE](#) | [PRIVACY POLICY](#)

EJPress Software by eJournalPress Licensed under Patent #US 7,620,555B1
 © 2014 American Medical Association. All Rights Reserved.

Anexo C - Termo de consentimento livre e esclarecido

A Sra está sendo convidada a participar, como voluntária do projeto de pesquisa intitulado “**Efeito de dose única de vitamina D na força muscular e na resposta inflamatória sistêmica em pacientes idosas**” sob responsabilidade das pesquisadoras Melissa Orlandin Premaor e Márcia Regina Rosa Scalcon, ambas residentes no município de Santa Maria.

Esta pesquisa busca investigar se uma dose única de vitamina D é capaz de melhorar concomitantemente força muscular e inflamação.

Para tanto, será necessário que a senhora responda a um questionário a respeito do seu estado de saúde e informações pessoais como idade, medicações em uso e presença de doenças. Nenhuma pergunta deve lhe causar constrangimento, caso isso venha acontecer, deve ser comunicado. A senhora também deverá coletar exames de sangue e de urina e realizar alguns testes para avaliar seus músculos. Receberá também uma única dose de vitamina D ou de placebo (substância sem princípio ativo) conforme sorteado pela equipe de pesquisa e responderá no final do estudo um questionário sobre quedas.

Como benefício, esta pesquisa trará maior conhecimento sobre a utilização da vitamina D nos músculos e na inflamação, além de saber seu estado geral de saúde. Os riscos possíveis são relacionados a punção venosa, que são mínimos, como manchas no local e muito raramente inflamação da veia. O uso de dose única de vitamina D é segura e caso a senhora venha sentir qualquer efeito adverso deverá comunicar imediatamente o responsável da pesquisa, o qual será responsável por oferecer tratamento para tentar aliviar e/ou minimizar este efeito.

Todas as informações pessoais fornecidas pela senhora serão anônimas, e os resultados serão confidenciais e só serão utilizados para divulgação em trabalhos científicos, sem a utilização de qualquer dado que permita a sua identificação. Não haverá nenhum custo pessoal para participar da pesquisa, tampouco ressarcimentos ou retribuição financeira.

Caso a senhora decida retirar seu consentimento em relação a sua participação neste estudo, poderá fazê-lo em qualquer momento, sem prejuízo ou penalizações.

Ao concordar em responder as questões formuladas, a senhora estará declarando que foi devidamente esclarecida e que concordou espontaneamente em participar desta pesquisa. Para maiores esclarecimentos, a senhora poderá contatar o pesquisador responsável a qualquer momento do estudo.

Santa Maria-RS, de de

Pesquisador

Telefones para contato:
Márcia Regina Rosa Scalcon
UFSM: 3220-9378
Celular: 91455245
E-mail: marciascalcon@terra.com.br

Qualquer dúvida entrar em contato com o CEP-UFSM:
Avenida Roraima, 1000 - Prédio da Reitoria - 7º andar - Sala 702
Cidade Universitária - Bairro Camobi
97105-900 - Santa Maria - RS
Tel.: (55)32209362 - e-mail: comiteeticapesquisa@mail.ufsm.br

Anexo D - Termo de confidencialidade

Título do projeto: “Efeito de dose única de vitamina D na força muscular e na resposta inflamatória sistêmica em pacientes idosas”

Pesquisador responsável: Márcia Regina Rosa Scalcon

Instituição/Departamento: UFSM/CCS/Departamento de Farmacologia

Telefone para contato: (55) 91455245

Os pesquisadores do presente projeto se comprometem a preservar a privacidade dos participantes desta pesquisa. Concordam, igualmente, que estas informações serão utilizadas única e exclusivamente para execução do presente projeto. As informações somente poderão ser divulgadas de forma anônima e serão mantidas em um banco de dados sob a responsabilidade da Prof^a. Melissa Orlandin Premaor. Os dados serão divulgados através de trabalhos científicos que serão apresentados em eventos da área e/ou publicados em periódicos científicos especializados. Este projeto de pesquisa foi revisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFSM em 22/07/2012, com o número do CAAE 04320312.0000.5346.

Santa Maria, 22 de julho de 2012.