

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

2012

VITAMINA D E ENDOCRINOPATIAS AUTOIMUNES

Artigo de Revisão

Autoria: Ana Margarida Flores Ferreira Novo

Sob orientação científica de:

Prof^ª. Doutora Leonor Gomes

Prof^ª. Doutora Manuela Carvalheiro

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÓNIMOS	ii
ABSTRACT	v
RESUMO	vii
INTRODUÇÃO	1
1. METABOLISMO DA VITAMINA D	3
2. NECESSIDADES DE VITAMINA D	5
3. PAPEL IMUNOMODULADOR DA VITAMINA D: EVIDÊNCIAS <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i>	11
3.1 - Potenciação das respostas imunitárias inatas	11
3.2 - Modulação das respostas imunitárias adaptativas	16
3.2.1 - Células dendríticas indutoras de tolerância imunológica	17
3.2.2 - Indução de células T reguladoras	20
3.2.3 - Modulação da função de linfócitos T	21
3.2.4 - Modulação da função de linfócitos B	25
4. ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS DO GENE VDR E DIABETES TIPO 1	27
5. ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS DO GENE VDR E TIROIDITES AUTOIMUNES	33
6. VITAMINA D E DIABETES TIPO 1	35
6.1 - Vitamina D e as células β pancreáticas	35
6.2 - Estudos em modelos animais	37
6.3 - Níveis séricos de vitamina D em doentes com Diabetes tipo 1	38
6.4 - Relação entre o consumo de vitamina D e o risco de Diabetes tipo 1	40
6.5 - Intervenção clínica: suplementação com vitamina D na Diabetes tipo 1	43
7. VITAMINA D E TIROIDITES AUTOIMUNES	48
CONCLUSÃO	53
AGRADECIMENTOS	55
REFERÊNCIAS	56
ANEXO (Norma editorial – <i>Endocrine Reviews</i>)	64

LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÓNIMOS

A1C – Hemoglobina glicada

ADN – Ácido desoxirribonucleico

CAAs – Células apresentadoras de antígenos

CCL - Quimiocina

CCR – Recetor das quimiocinas

CD – *Cluster of differentiation*

CpG – Citosina-Guanina

CTLA-4 – Antígeno 4 associado às células T citotóxicas

DBP – *Vitamin D binding protein*

DG – Doença de Graves

DM1 – Diabetes mellitus tipo 1

EUA – Estados Unidos da América

Foxp3 – *Forkhead box protein 3*

GAD65 – Descarboxilase do ácido glutâmico 65

GM-CSF - Fator estimulante de colónias de granulócitos e macrófagos

HLA – Antígenos leucocitários humanos

IA - Autoimunidade contra as células β pancreáticas

ICAM-1 – *Intercellular Adhesion Molecule 1*

IFIH1 – Interferão induzido com o domínio 1 da helicase C

IL – Interleucina

IL2RA – Recetor α da interleucina-2

ILT3 – *Immunoglobulin-like transcript 3*

INF γ – Interferão gama

iNOS – Sintetase do óxido nítrico induzível

IP-10 – Proteína 10 induzida pelo interferão γ

JAK-STAT – *Janus Kinase/Signal Transducers and Activators of Transcription*

LADA – *Latent Autoimmune Diabetes in Adults*

LFA-3 – *Lymphocyte function-associated antigen-3*

MAP – *Mitogen-Activated Protein*

MHC – Complexo Major de Histocompatibilidade

mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro

NF-AT – Fator nuclear de células T ativadas

NF- κ B – Fator nuclear-kappa B

NOD – *Non-obese diabetic*

NOR – *Non-obese resistant*

PAMPs – Padrões moleculares associados aos patógenos

poli(A) – Sequência de nucleótidos adenina na extremidade 3' do mRNA

PRR – Recetores de reconhecimento de patógenos

PTH – Hormona paratiroideia

PTPN22 – Proteína tirosina fosfatase, não recetor do tipo 22

RNA – Ácido ribonucleico

RXR – Recetores retinoides X

SINE – *Small Interchangeable Nuclear Element*

SNPs – Polimorfismos de nucleótido único

TAI – Tiroidites autoimunes

TCR – Recetor de células T

Tg – Tiroglobulina

TGF β – *Transforming growth factor β*

Th – *T helper*

TH – Tiroidite de Hashimoto

TLRs – Recetores Toll-like

TNF α – Fator de necrose tumoral α

TPO – Tiroide peroxidase

TRAbs - Anticorpos estimuladores dos recetores da TSH

Treg – T reguladoras

TSH – *Thyroid-stimulating hormone* ou tirotropina

UTR – *Untranslated region*

UV – Ultravioleta

VDR – Recetor da vitamina D

VDREs – Elementos de resposta à vitamina D

ABSTRACT

Introduction: Vitamin D is a secosteroid hormone which is involved in the autocrine and paracrine regulation of both innate and adaptive immune responses, through its binding to the vitamin D receptor (VDR) in several cells of the immune system, such as macrophages, dendritic cells and T and B lymphocytes.

Objectives: This review article aims to summarize the most relevant data on the vitamin D role in innate and adaptive immunity; to analyze the interaction between vitamin D and the autoimmune endocrine diseases Type 1 diabetes (DM1) and autoimmune thyroiditis (TAI) and to explore the challenge of translating all these new knowledge to the clinical practice in a safe and effective manner.

Material and Methods: The information for this review was compiled by searching the Pubmed (Medline) database with the following search equations: “*Vitamin D and (immunomodulation OR immunoregulation OR immune system OR human immunity)*” and “*Vitamin D and (Type 1 diabetes OR autoimmune thyroiditis)*”. A more restrictive search was also conducted adding the terms *VDR polymorphisms* and *supplementation* to the last equation. Only articles in English and Spanish published since 1997 until nowadays (June 2012) were considered. Papers were prioritized by relevant content and some were excluded due to the similarity with more recent articles.

Results: Several epidemiological studies, but not all, show a significant association between vitamin D deficiency and increased DM1 incidence. Only a few studies examined the association between vitamin D deficiency and risk of TAI and those that did had yielded conflicting results. How vitamin D interferes with the pathogenesis of these autoimmune endocrine diseases is still not fully elucidated, though some possible protective mechanisms

have been suggested in DM1. Vitamin D has been reported to protect islet β cells from apoptosis, increase insulin secretion and decrease insulin resistance. Association studies of VDR polymorphisms and risk of DM1 and TAI have produced conflicting results in different ethnic and geographically located population, which may be related to the interpopulation heterogeneity of the genetic and environmental determinants of these diseases.

Conclusion: Despite the multitude of studies that demonstrate a reduction in DM1 risk in individuals who receive vitamin D supplementation, the therapeutic effects of vitamin D when the disease is established seem to be inexistent. Although there are sufficient data to support the hope that in the future vitamin D may be used as an immunomodulator agent in clinical practice, supplementation with that purpose is not presently recommended.

KEY WORDS: Vitamin D; Immunomodulation; Type 1 diabetes; Autoimmune thyroiditis; Supplementation.

RESUMO

Introdução: A vitamina D é uma hormona secosteroide que participa na regulação autocrínica e paracrínica das respostas imunitárias inatas e adaptativas, através da ligação ao seu recetor VDR expresso em várias células do sistema imunitário, como macrófagos, células dendríticas e linfócitos T e B.

Objetivos: Este artigo de revisão pretende sumarizar os dados mais relevantes sobre o papel da vitamina D na imunidade inata e na adquirida; analisar a relação entre a vitamina D e as endocrinopatias autoimunes Diabetes mellitus tipo 1 (DM1) e tiroidites autoimunes (TAI) e explorar o desafio atual que consiste em aplicar de forma segura e eficaz todos estes novos conhecimentos na prática clínica.

Material e Métodos: O tema foi revisto utilizando a interface de pesquisa PubMed da Medline, através das seguintes equações de pesquisa: “*Vitamin D and (immunomodulation OR immunoregulation OR immune system OR human immunity)*” e “*Vitamin D and (Type 1 diabetes OR autoimmune thyroiditis)*”. Ainda foram realizadas pesquisas mais especializadas, juntando à última equação os termos *VDR polymorphisms* e *supplementation*. A pesquisa foi restringida a artigos em inglês e espanhol, publicados desde o ano 1997 até à atualidade (Junho de 2012). Os artigos foram selecionados pela relevância do seu conteúdo, sendo que alguns foram excluídos pelo facto de existirem artigos semelhantes mais recentes.

Resultados: Vários estudos epidemiológicos, mas não todos, demonstram uma associação significativa entre a deficiência de vitamina D e o aumento da incidência de DM1. A literatura existente sobre a relação entre a deficiência de vitamina D e as TAI é escassa e os resultados dos poucos estudos existentes são contraditórios. A participação da vitamina D na patogénese

destas endocrinopatias não está totalmente compreendida, embora sejam propostos vários mecanismos para a sua hipotética ação protetora na DM1, entre eles a inibição da apoptose e o aumento da secreção de insulina pelas células β pancreáticas e a diminuição da insulinoresistência periférica. Os resultados dos estudos de associação entre os principais polimorfismos do gene VDR e o risco de DM1 e TAI revelam-se discordantes em diferentes populações, podendo refletir, pelo menos em parte, a heterogeneidade interpopulacional dos determinantes genéticos e ambientais destas doenças.

Conclusão: Apesar de vários estudos demonstrarem uma diminuição do risco de DM1 em indivíduos suplementados com vitamina D, os seus efeitos terapêuticos quando a doença está estabelecida parecem ser inexistentes. Portanto, embora haja dados suficientes para acreditar que a vitamina D pode no futuro vir a ser utilizada como um agente imunomodulador na prática clínica, a suplementação com esse fim não é atualmente recomendada.

PALAVRAS-CHAVE: Vitamina D; Imunomodulação; Diabetes mellitus tipo 1; Tiroidites autoimunes; Suplementação.

INTRODUÇÃO

A vitamina D é um secosteroide que se caracteriza pela quebra de uma ligação nos anéis esteroides e atua nas células alvo como uma hormona reguladora da transcrição génica através da ligação específica a um recetor nuclear, o VDR (Hewison, 2012).

É bem conhecido o papel da vitamina D no metabolismo fosfocálcico, mas são as suas ações não clássicas que a têm colocado no centro da atenção da comunidade científica. As ações não clássicas foram identificadas pela primeira vez há cerca de trinta anos, quando foi demonstrado que a ligação da forma ativa da vitamina D, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, ao seu recetor VDR em células neoplásicas promovia a diferenciação e inibia a proliferação celular (Hewison, 2010).

A evidência de que a síntese aumentada de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ em doentes com sarcoidose envolvia a atividade da 1α -hidroxilase em macrófagos contribuiu para que o espectro de ações não clássicas da vitamina D se estendesse também ao seu papel no sistema imunitário (Hewison, 2010). Embora com a descoberta de que várias células do sistema imunitário expressavam o VDR e eram capazes de respostas autocrínicas e paracrínicas a esta vitamina, a natureza da interação entre a vitamina D e o sistema imunitário permaneceu pouco conhecida durante muitos anos (Hewison, 2010).

A questão central permanecia: teria ou não a vitamina D capacidade moduladora das respostas imunitárias normais em humanos? Nos últimos sete anos um crescente número de estudos tem tentado dar resposta a esta questão e atualmente é aceite que a vitamina D desempenha um papel imunomodulador ativo não apenas em condições fisiológicas mas também em diversas doenças crónicas como as doenças autoimunes.

Neste contexto de entusiasmo e de grande quantidade de nova informação, este artigo de revisão pretende analisar a relação entre a vitamina D e as endocrinopatias autoimunes

Diabetes mellitus tipo 1 (DM1) e tiroidites autoimunes (TAI) sob várias perspectivas: estudos que investigam a relação entre determinados polimorfismos do gene VDR e o risco destas endocrinopatias; estudos *in vitro* e em modelos animais que tentam evidenciar o papel da vitamina D na sua etiopatogenia e estudos epidemiológicos que analisam a relação entre os níveis baixos de vitamina D em algumas populações e o risco destas patologias.

Partindo da evidência de que uma larga percentagem da população mundial tem deficiência de vitamina D, são apresentadas as recomendações atuais dos peritos sobre as necessidades desta vitamina e a suplementação em indivíduos saudáveis.

Mas atualmente vai-se mais longe e discute-se o potencial papel benéfico da suplementação com vitamina D na prevenção e tratamento de doenças autoimunes. Os resultados de estudos experimentais realizados em humanos na prevenção e tratamento da DM1 são também apresentados e discutidos.

1. METABOLISMO DA VITAMINA D

A vitamina D é produzida *in vivo* principalmente através da radiação solar ultravioleta B, sendo que a alimentação apenas supre cerca de 20% das necessidades do organismo (Holick, 2009). A vitamina D obtida a partir da alimentação corresponde à vitamina D₃ (colecalfiferol) e à vitamina D₂ vegetal (ergocalciferol) (Hewison, 2012). Contudo, nos países com boa exposição solar, 90 a 95% da vitamina D pode ser obtida através da radiação solar (Zhang e Wu, 2010).

Na pele, as moléculas de 7-deidrocolesterol (pré-vitamina D) sofrem uma reação de fotólise por ação da radiação ultravioleta, transformando-se em vitamina D₃. A vitamina D₃ assim produzida e a derivada da alimentação sofrem posteriormente hidroxilação do carbono 25 a nível hepático por ação da 25-hidroxilase, dando origem a 25(OH)D₃ (Holick, 2009; Zhang e Wu, 2010). A 25(OH)D₃ constitui a sua principal forma circulante, mas em concentrações fisiológicas parece não exercer funções como molécula sinalizadora (Hewison, 2012). A forma ativa da vitamina, 1,25(OH)₂D₃, é produzida a partir da hidroxilação da 25(OH)D₃, numa reação catalisada pela 1 α -hidroxilase (CYP27B1) que ocorre maioritariamente a nível renal (Zhang e Wu, 2010). Contudo, a segunda hidroxilação também ocorre na pele, osso, cartilagem, macrófagos, monócitos e células dendríticas (Borges MC et al, 2011). O metabolismo da vitamina D encontra-se esquematizado na Figura 1.

A vitamina D e os seus metabolitos são transportados na circulação ligados a uma proteína, a DBP (*vitamin D binding protein*) (Takiishi et al, 2010).

A 1,25(OH)₂D₃ estimula a absorção intestinal de cálcio e a sua reabsorção a nível renal. Sem a ação da vitamina D, apenas 10 % a 15% do cálcio e 60% do fósforo da alimentação seriam absorvidos (Holick et al, 2011). A 1,25(OH)₂D₃ interage com o VDR nos osteoblastos, estimulando a expressão do ligando do recetor ativador do NF-Kb (fator

nuclear-kappa B). A interação ligando-recetor induz a maturação de monócitos em osteoclastos maduros que dissolvem a matriz óssea, mobilizando o cálcio do esqueleto (Holick et al, 2011).

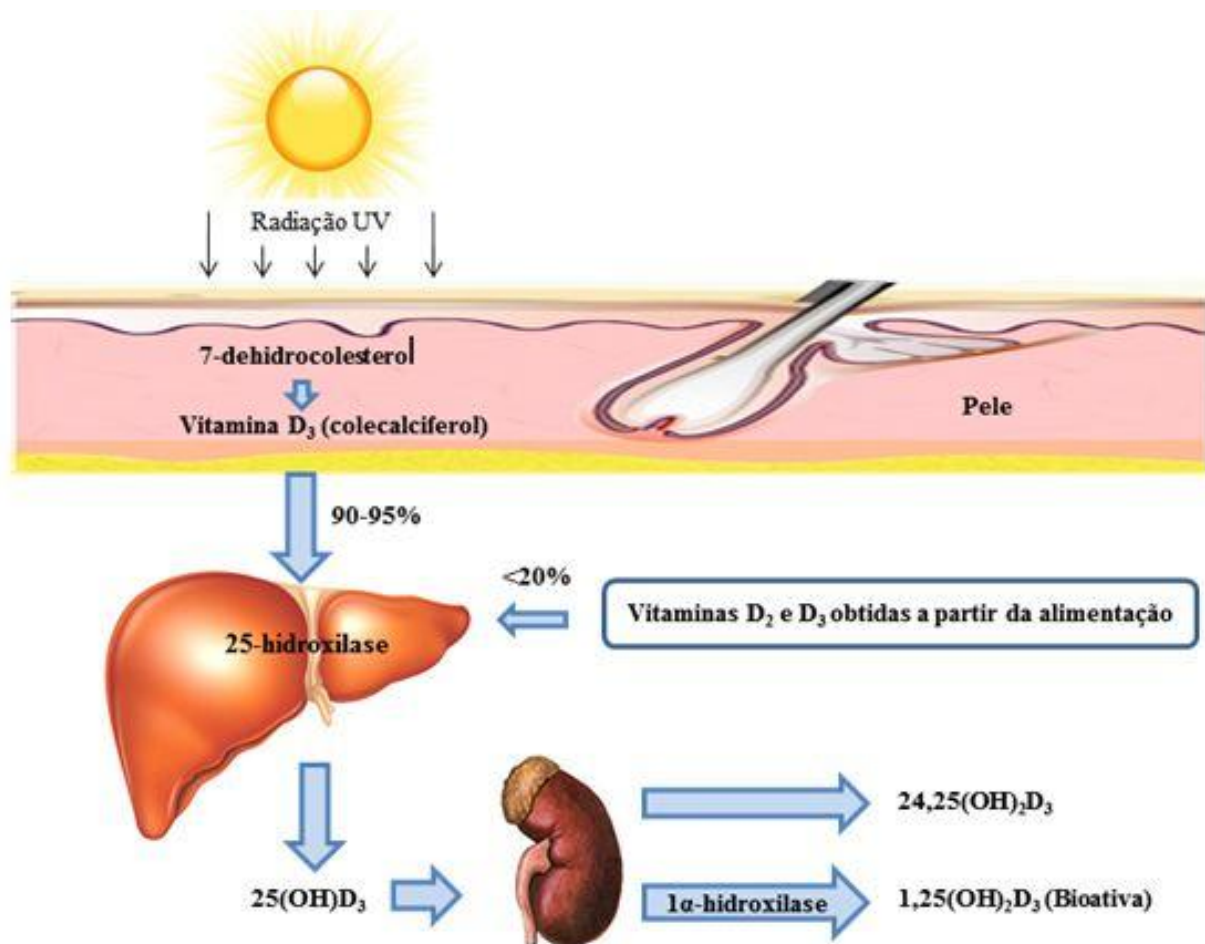


Figura 1 (adaptada de Zhang e Wu, 2010)

Metabolismo da vitamina D

2. NECESSIDADES DE VITAMINA D

A avaliação das reservas de vitamina D no organismo baseia-se nos níveis séricos de $25(\text{OH})\text{D}_3$, que tem uma semivida de aproximadamente 2 a 3 semanas e constitui a principal forma circulante. Embora a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ seja a forma biologicamente ativa, os seus níveis não refletem as reservas de vitamina D, uma vez que a sua semivida é de apenas 4 a 6 horas e os níveis circulantes são cerca de mil vezes inferiores aos da $25(\text{OH})\text{D}_3$ (Holick, 2009). Por outro lado, os níveis séricos de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ são frequentemente normais ou mesmo elevados em indivíduos com deficiência de vitamina D devido ao hiperparatiroidismo secundário (Holick et al, 2011).

As reservas de vitamina D variam significativamente entre as populações, sendo influenciadas por fatores geográficos, sociais e económicos (Hewison, 2012). Contudo, a principal causa de deficiência de vitamina D em todo o mundo é a inadequada exposição solar (Cantorna e Mahon, 2004).

A semivida plasmática da vitamina D produzida na pele pode corresponder ao dobro da semivida da vitamina D ingerida (Holick et al, 2011). Vários fatores diminuem a produção cutânea de vitamina D_3 , incluindo o uso de protetor solar, a maior pigmentação cutânea e o próprio envelhecimento. Um protetor solar com índice de proteção 30 diminui a síntese de vitamina D na pele em mais de 95% e em pessoas com tom de pele mais escuro, calcula-se que a exposição solar tenha de ser 3 a 5 vezes mais longa para produzir quantidades de vitamina D equivalentes às produzidas numa pessoa de pele clara (Holick et al, 2011).

Outra causa importante da deficiência de vitamina D é a escassez de alimentos naturalmente ricos nesta vitamina. Enquanto nos Estados Unidos da América (EUA) e Canadá, o leite e alguns queijos, cereais, iogurtes e sumos são enriquecidos com vitamina D, na Europa, a maioria dos países não dispõe de alimentos enriquecidos, devido à intoxicação

por vitamina D que ocorreu na década de 50 do século passado. No entanto, a Suécia e a Finlândia já enriquecem o leite com vitamina D e outros países adicionam-na a cereais, pão e margarina (Holick et al, 2011).

Outras causas têm sido apontadas para a deficiência de vitamina D, entre elas a obesidade, as síndromes de má-absorção, a síndrome nefrótica, os linfomas, o hiperparatiroidismo primário e o uso de fármacos que aumentam o catabolismo da 25(OH)D₃ como anti-convulsivantes e anti-retrovíricos (Holick et al, 2011). A latitude, a estação do ano e a altura do dia influenciam dramaticamente a produção cutânea de vitamina D₃. Acima e abaixo dos 33° de latitude, a síntese de vitamina D₃ é muito baixa ou praticamente nula durante grande parte do Inverno (Holick e Chen, 2008).

Na ausência de exposição solar é difícil, senão mesmo impossível, obter as quantidades de vitamina D adequadas. Portanto, a suplementação com vitamina D₂ ou D₃ é recomendada para a prevenção e tratamento desta deficiência vitamínica. A ingestão de 100UI/dia de vitamina D aumenta a concentração sérica de 25(OH)D₃ em menos de 1ng/mL, aproximadamente (Holick et al, 2011).

No entanto, não existe consenso absoluto sobre o intervalo ótimo de concentrações da 25(OH)D₃.

Durante muitos anos, o conceito de deficiência de vitamina D baseou-se simplesmente na presença de raquitismo na criança ou osteomalácia no adulto, problemas clínicos relativamente raros no século XXI. Sob esta perspectiva, níveis séricos de 25(OH)D₃ inferiores a 8ng/mL (20nM) eram considerados um marcador aproximado da deficiência de vitamina D (Hewison, 2012). Contudo, estudos realizados ao longo dos últimos dez anos têm sugerido que níveis sub-ótimos de vitamina D podem ocorrer na ausência de raquitismo ou de osteomalácia. Esta nova perspectiva partiu da evidência que os níveis de 25(OH)D₃ se correlacionam inversamente com os de hormona paratiroideia (PTH) até à concentração de

30ng/mL (75nM) (Holick, 2005). Heaney e colaboradores (2003) mediram a eficiência da absorção de cálcio em mulheres com uma concentração de 25(OH)D₃ de, em média, 20ng/mL e depois de terem sido suplementadas com 25(OH)D₃ de forma a aumentar os níveis para 32ng/mL. Foi reportado um aumento de 45% a 65% na eficiência do transporte intestinal de cálcio quando a concentração de 25(OH)D₃ era superior a 32ng/mL.

Partindo destas observações, a maioria dos peritos concorda atualmente que a deficiência de vitamina D corresponde a uma concentração de 25(OH)D₃ inferior a 20ng/mL e que a insuficiência se refere a valores entre 21 e 29ng/mL, já que o equilíbrio ótimo parece ocorrer para concentrações superiores a 30ng/mL (Holick et al, 2011).

Os novos parâmetros estabelecidos levam a que uma porção significativa da população mundial, anteriormente considerada dentro do normal intervalo de concentrações de 25(OH)D₃, passe a cair na categoria de insuficiência de vitamina D (Hewison, 2012). Atualmente já se considera que 30% a 50% da população europeia e norte-americana tenha deficiência ou insuficiência de vitamina D (Holick, 2009). Estimativas mais recentes apontam mesmo para que 20% a 100% das mulheres e homens idosos destas mesmas populações possam ter deficiência de vitamina D (Holick et al, 2011).

O valor máximo recomendado de 25(OH)D₃ também tem sido questionado. Um limite superior de 55ng/mL parece inadequado já que em indivíduos expostos a grande quantidade de radiação solar (por exemplo, nadadores-salvadores), têm sido encontrados valores de 100 a 125ng/mL (Cantorna e Mahon, 2004). Embora nunca tenham sido descritos casos de intoxicação por vitamina D devido à exposição solar, o risco de cancro da pele e de envelhecimento prematuro frenam o entusiasmo dos profissionais de saúde para a recomendação desta abordagem (Cantorna e Mahon, 2004). A intoxicação por vitamina D, caracterizada por hipercalcemia, hipercalcúria e frequentemente hiperfosfatemia, parece não ocorrer até os níveis séricos serem superiores a 150-200ng/mL (Koutkia et al, 2001). Em

adultos saudáveis, a administração de 10.000UI/dia de vitamina D durante 5 meses não causou hipercalcemia nem hipercalcúria (Holick et al, 2011). No respeitante às crianças, Hypponen e colaboradores (2001) reportaram que durante o primeiro ano de vida, a suplementação com 2.000UI diárias de vitamina D não causou efeitos adversos. Neste contexto, parece razoável admitir 2.000UI/dia como o valor máximo recomendado de vitamina D no primeiro ano de vida (Holick et al, 2011).

No final de 2010, os governos do Canadá e dos EUA pediram ao Instituto de Medicina, um comité formado por um conjunto de peritos que, com base nos dados existentes, definisse os níveis ótimos de vitamina D e cálcio para a saúde humana (Ross et al, 2011). O comité realizou uma revisão exaustiva da literatura, analisando mais de 1000 estudos, incluindo estudos referentes ao potencial envolvimento da vitamina D no cancro, doenças cardiovasculares e hipertensão, diabetes e síndrome metabólica, resposta imunitária, função neurofisiológica, desempenho físico, função reprodutiva e pré-eclâmpsia. O Instituto de Medicina propôs que um nível de 25(OH)D₃ de 20ng/mL (50nM) seria suficiente para otimizar a densidade mineral óssea para a maioria da população dos EUA e Canadá, embora reconhecesse que estes valores eram mais difíceis de atingir nas pessoas com pele mais escura, nas quais a produção de vitamina D na pele é menos eficiente, e naquelas que vivem em maiores latitudes. Para atingir o valor alvo de 20ng/mL de 25(OH)D₃, o comité recomendou um aumento modesto da suplementação de vitamina D para 600UI diárias. Também foi reportada a ausência de efeitos adversos até doses de suplementação de 10.000UI/dia, mas foi proposto que uma dose limite superior de 4.000UI/dia seria mais segura.

Contudo, estas recomendações foram recebidas de forma hostil por alguns investigadores que consideraram que não foram tidas em conta as ações não clássicas da vitamina D e as consequências para a saúde dos indivíduos com níveis sub-ótimos desta

vitamina. Também foram consideradas inadequadas para doentes em risco de deficiência de vitamina D, por doença ou toma de fármacos (Grant, 2011).

Assim, a Sociedade Americana de Endocrinologia continuou a considerar prioritária a necessidade de estabelecer recomendações práticas para o tratamento e prevenção da deficiência de vitamina D e em Julho de 2011, um novo conjunto de recomendações foi publicado.

Antes de mais, estabeleceu-se que a determinação dos níveis de 25(OH)D₃ só deveria ser realizada em doentes em risco de deficiência de vitamina D e não de uma forma generalizada (Holick et al, 2011). Segundo estas recomendações mais recentes, as crianças até um ano de idade devem ser suplementadas com pelo menos 400UI/dia e a partir dessa idade com, no mínimo, 600UI diárias, de forma a maximizar a saúde óssea. Contudo, para elevar o nível de 25(OH)D₃ acima de 30ng/mL seriam necessárias, no mínimo 1.000UI/dia. Para adultos entre os 19 e os 70 anos, é recomendada a suplementação com, no mínimo, 600UI diárias e a partir dos 70 anos, devido à diminuição das atividades no exterior e à agressiva proteção do sol, são necessárias, pelo menos, 800UI/dia, para potenciar as funções óssea e muscular. Contudo, para obter níveis de 25(OH)D₃ superiores a 30ng/mL seriam necessárias, no mínimo, 1.500UI a 2.000UI diárias. O envelhecimento não parece alterar a capacidade de absorção das doses farmacológicas ou fisiológicas de vitamina D. Em relação à deficiência de vitamina D em adultos, foi sugerido que deve ser corrigida com a administração de 50.000UI de vitamina D₂ ou vitamina D₃ uma vez por semana durante 8 semanas ou, alternativamente, com uma dose diária de 6.000UI de vitamina D₂ ou vitamina D₃ até os níveis plasmáticos de 25(OH)D₃ serem superiores a 30ng/mL, seguido de uma terapêutica de manutenção com 1.500 a 2.000UI diárias.

No entanto, também este comité considerou que, face ao pequeno número de estudos aleatorizados controlados que providenciem evidências de nível I sobre os efeitos benéficos

da vitamina D nas funções não clássicas, a suplementação para além dos níveis recomendados, não deve ser realizada para este fim. Contudo, o comité salvaguardou a necessidade de revisão destas recomendações num futuro próximo, à medida que as evidências científicas se vão acumulando neste campo.

Atualmente, portanto, o nível ótimo de 25(OH)D₃ para todos os sistemas orgânicos permanece desconhecido, até porque para diferentes funções biológicas o nível alvo pode variar consideravelmente (Hewison, 2012).

3. PAPEL IMUNOMODULADOR DA VITAMINA D: EVIDÊNCIAS *IN VITRO* E *IN VIVO*

3.1 - Potenciação das respostas imunitárias inatas

O sistema imunitário inato constitui a primeira linha de defesa do organismo contra os agentes patogénicos e atua de forma imediata e não-específica. A resposta inata à infeção envolve o sistema do complemento, as respostas antibacterianas pelos neutrófilos e macrófagos e também a interação com o sistema imunitário adaptativo através da apresentação de antígenos aos linfócitos T (Lagishetty et al, 2011).

Vários estudos indicam que a vitamina D está envolvida na regulação de múltiplos componentes do sistema imunitário inato (Figura 2). Monócitos e macrófagos são elementos fundamentais do sistema imunitário inato, sendo capazes de fagocitar patógenos e de reconhecer padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) através de recetores de reconhecimento de patógenos (PRR) como os recetores Toll-like (TLRs). Até à data, foram identificados 10 TLRs funcionais em humanos e 12 em ratos, cada um com a capacidade de responder a PAMPs específicos presentes em bactérias, vírus, parasitas e fungos. Embora os TLRs estejam intimamente associados às respostas inatas, também foram detetados em células dendríticas e linfócitos (Kawai e Akira, 2010).

A vitamina D e os seus análogos exercem os seus efeitos através do VDR, que integra a superfamília dos recetores das hormonas esteroides. O VDR pode ser detetado em mais de trinta tipos diferentes de células, incluindo monócitos, linfócitos, células β pancreáticas (Pani et al, 2000; Arnson et al, 2007), mas apresentando concentrações mais elevadas nos enterócitos (Takiishi et al, 2010). Este recetor é composto por um domínio altamente conservado de ligação ao ADN e por outro domínio em hélice α , através do qual ocorre a interação com o ligando. Na presença de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, o VDR sofre um processo de

heterodimerização com os recetores retinoides X (RXR), que são necessários para o reconhecimento dos elementos de resposta à vitamina D (VDREs), localizados nas regiões reguladoras dos genes alvo (White, 2012). A ligação dos heterodímeros VDR/RXR ao ADN provoca o recrutamento sequencial de complexos de proteínas co-reguladoras que estimulam modificações nas histonas, a remodelação da cromatina e a ligação da polimerase do RNA II, necessárias ao início da transcrição génica (White, 2012). Contudo, os heterodímeros VDR-RXR também podem reprimir a expressão dos genes de algumas citocinas, deslocando o NF-AT (fator nuclear de células T ativadas) do ADN (White, 2012).

A $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ parece ser um elemento chave entre a ativação dos TLRs e as respostas antibacterianas do sistema imunitário inato através da indução de catelicidinas (Liu et al, 2006), um grupo de peptídeos antimicrobianos codificados por um gene responsivo à vitamina D e cuja transcrição é marcadamente aumentada nos macrófagos e neutrófilos por ação do complexo VDR- $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Wang et al, 2004). O gene contém um elemento de resposta à vitamina D que se encontra numa sequência SINE (*small interchangeable nuclear element*), que só parece estar presente nos primatas superiores. Esta descoberta sugere que a regulação desta faceta da imunidade inata pela vitamina D constitui um desenvolvimento recente do ponto de vista evolutivo, que presumivelmente se terá tornado vantajoso quando os primatas (incluindo o Homo Sapiens) foram expostos a abundante radiação solar (Gombart et al, 2005).

Análises funcionais mostraram que na tuberculose, a ligação do Mycobacterium tuberculosis ao TLR 2/1 aumentou os níveis de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ e $25(\text{OH})\text{D}_3$, induzindo a expressão de catelicidinas, o que coincidiu com o aumento da destruição das micobactérias (Liu et al, 2006). De forma notável, a expressão dos peptídeos antimicrobianos foi diretamente influenciada pelos níveis de $25(\text{OH})\text{D}_3$ do dador de soro usado para a cultura de monócitos (Liu et al, 2006). Tal facto sugere que indivíduos com baixas concentrações séricas

de 25(OH)D₃ estejam mais suscetíveis à infecção, pela menor capacidade de induzirem a atividade antibacteriana de monócitos. Mais recentemente, num estudo de Adams e colaboradores (2009), a suplementação de indivíduos com vitamina D também aumentou a expressão de catelicidinas induzida através da ativação do TLR2/1.

Contudo, a ação dos TLRs pode ser entendida como dicotômica: aos efeitos benéficos que desempenham na infecção, opõe-se a capacidade de reconhecerem ácidos nucleicos do próprio organismo, desempenhando um papel importante na autoimunidade. Os TLRs que parecem estar mais envolvidos neste reconhecimento são o TLR7 e o TLR9 (Dickie et al, 2010). Na experiência de Dickie e colaboradores (2010), a incubação de monócitos humanos com 1,25(OH)₂D₃ reduziu a expressão dos TLR2, TLR4, TLR9 e a produção de IL-6 induzida pelo TLR9. A expressão do TLR3 não foi modificada, o que indica que a 1,25(OH)₂D₃ regula diferencialmente a expressão dos TLRs.

Em monócitos, a ligação de patogénios aos PRR induziu a enzima 1 α -hidroxilase (CYP27B1), responsável pela conversão da 25(OH)D₃ à sua forma ativa 1,25(OH)₂D₃ (Lagishetty et al, 2011). A 1 α -hidroxilase presente nas células imunitárias é idêntica à enzima renal mas a regulação da sua expressão e atividade é diferente. Enquanto a enzima renal está sob o controlo da PTH, a 1 α -hidroxilase no sistema imunitário é regulada por estímulos imunitários como o interferão gama (IFN γ) (Arnson et al, 2007). Os neutrófilos expressam o VDR mas, ao contrário dos monócitos, não há evidência clara que expressem a enzima 1 α -hidroxilase funcional, podendo apenas exibir resposta sistémica à 1,25(OH)₂D₃. Contudo, a relativa abundância de neutrófilos sugere que possam constituir as principais fontes de catelicidinas circulantes (Lagishetty et al, 2011).

Os mecanismos de sinalização celular pelos quais a ativação dos TLRs induz a expressão do VDR e da 1 α -hidroxilase permanecem pouco clarificados. Um estudo sugere que a regulação da enzima mediada pela ativação do TLR4 envolve as vias JAK-STAT, MAP

cinase e NF- κ B, que por sua vez estabelecem relação sinérgica com a ação do INF γ (Stoffels et al, 2006). Outro estudo sugere que a indução da 1 α -hidroxilase ocorre como uma consequência indireta da produção de IL-15 induzida pela ativação do TLR2/1 (Krutzik et al, 2008).

Outra evidência das propriedades imunoreguladoras da 1,25(OH) $_2$ D $_3$ na imunidade inata consiste na hidroxilação da vitamina D $_3$ induzida pela radiação solar à sua forma ativa pelas células dendríticas locais. A 1,25(OH) $_2$ D $_3$ produzida pelas células dendríticas aumenta a expressão do recetor das quimiocinas epidermotrópico CCR10 nas células T ativadas, permitindo que estas células CCR10+ migrem para a pele em resposta à quimiocina CCL27 produzida pelos queratinócitos (Sigmundsdottir, 2007). Este achado sugere um papel da 1,25(OH) $_2$ D $_3$ na regulação local do epidermotropismo das células T.

A adição de 1,25(OH) $_2$ D $_3$ a macrófagos aumentou a expressão da fosfatase ácida lisossômica e a sua capacidade de gerar um maior stresse oxidativo. A prostaglandina E2 é estimulada pela 1,25(OH) $_2$ D $_3$ enquanto o fator estimulante de colónias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) é inibido (Arnson et al, 2007). A sintetase do óxido nítrico induzível (iNOS) que participa nos processos inflamatórios é inibida pelos agonistas do VDR, levando a menor produção de óxido nítrico (Adorini e Penna, 2008).

O sistema da vitamina D inclui um mecanismo de retrocontrolo negativo através da enzima 24-hidroxilase (CYP24A1) que gera metabolitos 24-hidroxilados menos ativos a partir da 25(OH)D $_3$ ou da 1,25(OH) $_2$ D $_3$. A importância deste facto é demonstrada por estudos recentes que evidenciam que a citocina IL-4 promove a atividade da 24-hidroxilase em monócitos, assim atenuando a produção de catelicidinas pela vitamina D (Edfeldt et al, 2010). Este efeito contrasta com o do INF γ que potencia as respostas intracrineas da vitamina D.

Dado que o INF γ é marcador da subpopulação de células T *helper* 1 (Th1) e a IL-4 é produzida pela subpopulação Th2, os dados sugerem que estes diferentes tipos de populações

de células T da resposta imunitária adaptativa têm efeitos opostos no metabolismo da vitamina D (Edfeldt et al, 2010). Ao utilizar estes mecanismos dependentes de citocinas específicas para a regulação da sua ativação e catabolismo, a vitamina D pode constituir uma interface ainda pouco reconhecida entre o sistema imunitário inato e o adaptativo (Lagishetty et al, 2011).

As células dendríticas expressam 1α -hidroxilase de forma similar aos macrófagos, sendo que a expressão e atividade da enzima aumentam durante a maturação das células dendríticas (Hewison et al, 2003). A inibição da maturação e da apresentação de antígenos pelas células dendríticas por ação da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Canning et al, 2001; Hewison et al, 2003; Dong et al, 2005; Adorini e Penna, 2009), sublinha o seu potencial papel como intermediário entre o sistema imunitário inato e o adaptativo (Lagishetty et al, 2011).

As propriedades antibacterianas da vitamina D e o seu potencial papel na proteção contra infecções têm de ser balanceados com os efeitos moduladores mas predominantemente inibitórios sobre as respostas imunitárias adaptativas.

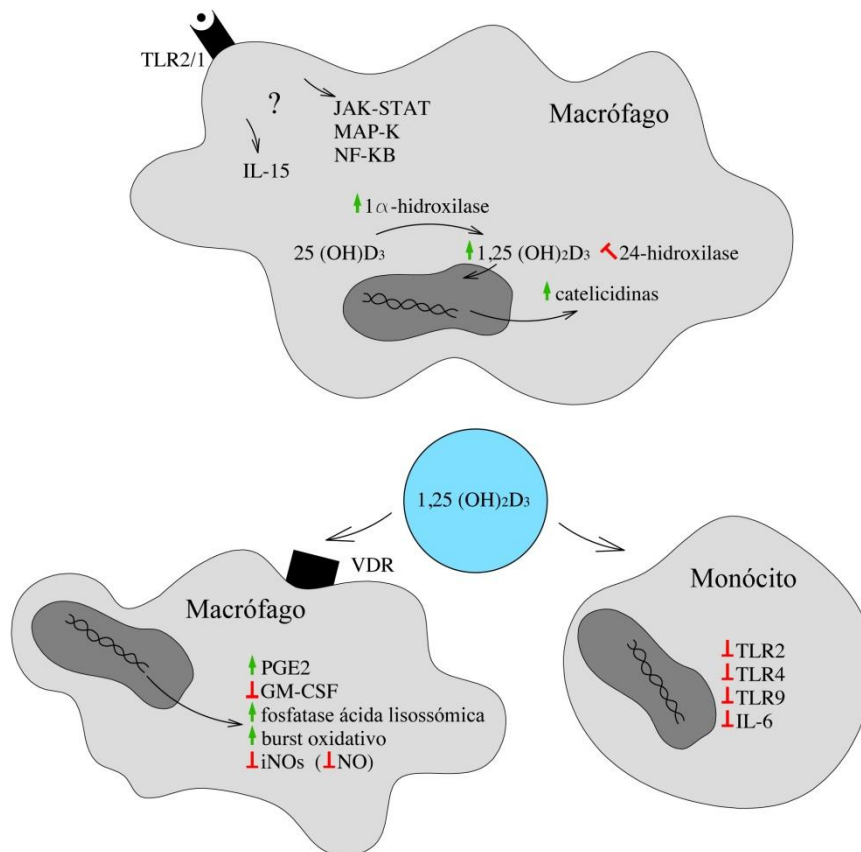


Figura 2: Papel da vitamina D na modulação da imunidade inata

⬇ representa inibição/diminuição; ⬆ representa estimulação/aumento. O desconhecimento das vias exatas pelas quais a ativação do TLR 2/1 induz a expressão da 1α -hidroxilase é representado pelo símbolo ? entre as vias mais prováveis.

3.2 - Modulação das respostas imunitárias adaptativas

A imunidade adaptativa é capaz de reconhecer e eliminar seletivamente microrganismos e moléculas estranhas específicas. Apresenta quatro atributos característicos: especificidade antigénica, diversidade, memória imunológica e reconhecimento do próprio/não próprio (Goldsby et al, 2002).

3.2.1 - Células dendríticas indutoras de tolerância imunológica

As células dendríticas são células apresentadoras de antígenos (CAAs) altamente especializadas, com um papel primordial no início das respostas mediadas por células T CD4+ (Etten et al, 2004; Adorini e Penna, 2009). Foram identificadas duas subpopulações de células dendríticas, de acordo com diferentes funções e fenótipos de superfície – as mielóides e as plasmacitóides. As mielóides são as CAAs mais eficientes e podem desempenhar, em diferentes condições, um papel imunogênico ou indutor de tolerância imunológica, ao estimular o desenvolvimento de células T reguladoras (Treg). As plasmacitóides têm intrinsecamente a capacidade de manutenção da tolerância imunológica periférica, pois induzem a diferenciação de células Treg CD4+CD25+ e a produção de IL-10 pelas células T (Adorini e Penna, 2008; Adorini e Penna, 2009).

As células dendríticas, tal como outras CAAs, expressam o VDR e constituem alvos importantes da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ *in vitro* e *in vivo* (Griffin et al, 2000; Canning et al, 2001; Etten et al, 2004). Vários estudos têm demonstrado que a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ e os seus análogos modulam o fenótipo e a função das células dendríticas – inibem a sua diferenciação e maturação (Canning et al, 2001; Hewison et al, 2003; Dong et al, 2005; Adorini e Penna, 2009), diminuem a expressão de moléculas co-estimuladoras, aumentam a produção de IL-10 e diminuem a de IL-12 e IL-23 e reduzem a sua capacidade de ativação das células T (Griffin et al, 2000; Canning et al, 2001; Etten et al, 2004; Adorini e Penna, 2009).

Contudo, os agonistas do VDR apenas modulam seletivamente as propriedades de indução de tolerância imunológica das células dendríticas mielóides (Figura 3). Embora as células dendríticas plasmacitóides expressem níveis semelhantes de VDR e respondam igualmente bem à ligação de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, o seu potencial intrínseco indutor de tolerância não parece ser modificado pelos agonistas do VDR (Adorini e Penna, 2009).

Após interação com as células dendríticas mielóides, as células T CD4⁺ aumentam a expressão de moléculas inibitórias como o CD152 (CTLA-4), o que constitui uma modificação a favor da aquisição de um fenótipo imunorregulador (Adorini e Penna, 2009).

A adição de 1,25(OH)₂D₃ a culturas de células dendríticas de murino resultou na diminuição da expressão de moléculas do complexo major de histocompatibilidade de classe II (MHC II) e das moléculas co-estimuladoras CD40, CD80 e CD86, sem afetar o número de células dendríticas geradas. Um análogo não hipercalcemiante da vitamina D₃ exerceu efeitos idênticos em concentrações cem vezes inferiores. Os efeitos não foram observados em ratos *knockout* para o VDR, indicando que os efeitos imunomoduladores da 1,25(OH)₂D₃ são exercidos através de vias dependentes deste recetor (Griffin et al, 2000).

No estudo de Etten e colaboradores (2004), a exposição a 1,25(OH)₂D₃ diminuiu a expressão de MHC II, CD86 e CD54 em células dendríticas derivadas de medula óssea em ratos NOR (*non-obese resistant*), enquanto em ratos NOD (*non-obese diabetic*) apenas foi observada a inibição da expressão de moléculas de MHC II e CD86, sugerindo maior resistência das células dendríticas derivadas de ratos NOD à ação da 1,25(OH)₂D₃. Neste estudo, ao contrário de outras evidências obtidas em estudos *in vitro* e *in vivo*, não foi observada diminuição da expressão de CD40 após tratamento com 1,25(OH)₂D₃. Tem sido demonstrado que a via CD40/CD154 é importante na indução de células Treg que suprimem as células T CD8⁺ auto-reativas, podendo contribuir para os efeitos protetores da 1,25(OH)₂D₃ contra a diabetes em ratos NOD.

Para além disso, a co-cultura de células dendríticas tratadas com 1,25(OH)₂D₃ e células T auto-reativas isoladas de doentes com DM1 levou à inibição da proliferação de células T e à apoptose seletiva das células T auto-reativas (Takiishi et al, 2010).

A 1,25(OH)₂D₃ altera a diferenciação de monócitos em células dendríticas originando células dendríticas imaturas com fenótipo diferente e com menor capacidade de induzirem a

proliferação de células T. As células expostas à $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ apresentaram diminuição significativa da expressão dos antígenos CD1a, CD40 e CD80 mas, em contraste com outros estudos, a expressão de CD86 foi aumentada (Canning et al, 2001). A $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ potenciou a diferenciação dos monócitos em macrófagos maduros, sugerindo um favorecimento da resposta imunitária inata sobre a resposta imunitária antígeno-específica. Noutro estudo, a síntese ativa de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ inibiu a diferenciação de precursores de monócitos em células dendríticas imaturas e a capacidade subsequente de estas completarem a sua diferenciação em resposta a estímulos de maturação (Hewison et al, 2003). A produção local de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ em células dendríticas durante processos inflamatórios regula negativamente, de forma paracrínica, a expressão do componente RelB do NF- κ B, que é essencial à diferenciação e maturação das células dendríticas (Dong et al, 2005). A inibição deste componente constitui um dos mecanismos inibitórios da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sobre a maturação das células dendríticas e sobre a produção de mediadores pró-inflamatórios.

As células dendríticas indutoras de tolerância imunológica obtidas após tratamento com agonistas do VDR promovem o desenvolvimento de células Treg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, uma subpopulação de células T *helper* anérgicas, sem capacidade de proliferação e secreção de citocinas em resposta a estímulos policlonais e antígeno-específicos e que inibem a ativação de células T, tendo portanto um papel central no controlo das respostas autoimunes (Adorini e Penna, 2009). As células Treg estabelecem interações físicas com as células dendríticas, mantendo o seu estado indutor de tolerância imunológica.

Outro mecanismo pelo qual os agonistas do VDR podem contribuir para a capacidade indutora de tolerância imunológica das células dendríticas é o aumento da expressão de recetores inibitórios nestas células. A incubação de células dendríticas derivadas de monócitos imaturas ou em processo de maturação, com $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ provocou um aumento seletivo da expressão de ILT3, um recetor estrutural e funcionalmente relacionado com os recetores

inibitórios das células T citotóxicas (Adorini e Penna, 2009). Contudo, a expressão de ILT3 parece não ser imprescindível para a indução de células Treg pelas células dendríticas, uma vez que o tratamento com $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ leva à formação de células T $\text{CD}^+\text{Foxp}3^+$ com atividade supressora mesmo na presença de anticorpos monoclonais anti-ILT3 (Penna et al, 2005).

3.2.2 - Indução de células T reguladoras

As células dendríticas podem não ser sempre necessárias para a geração de células Treg pelos agonistas do VDR. Uma combinação de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ e dexametasona conseguiu provocar a diferenciação de células T $\text{CD}4^+$ *naive* humanas e de rato em células Treg *in vitro*, na ausência de CAAs (O' Garra e Barrat, 2003). O análogo da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, Ro 26-2198, em doses não hipercalcemiantes, induziu em ratos NOD o desenvolvimento de células Treg $\text{CD}4^+\text{CD}25^+$, capazes de inibir a resposta de células T ao antígeno pancreático IA-2, uma proteína com domínios que apresentam grande homologia com proteínas tirosina fosfatase, embora não possua atividade enzimática. Este tratamento diminuiu a produção de IL-12, bloqueou a insulinite e a progressão da infiltração de células Th1 nos ilhéus pancreáticos, atrasando o desenvolvimento de DM1 após a transferência de células T patogênicas $\text{CD}4^+\text{CD}25^-$ (Gregori et al, 2002). Também num estudo diferente em que foi aplicado o análogo tópico calcipotriol antes da imunização com ovalbumina se observou uma indução direta de células Treg que preveniram a proliferação de células T $\text{CD}8$ e a produção de INF γ (Takiishi et al, 2010).

Os agonistas do VDR não só favorecem a indução das células Treg $\text{CD}4^+\text{CD}25^+$ e o aumento da sua atividade supressora, como também o seu recrutamento para os locais de

inflamação. A $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ aumenta a expressão de CCL17 e CCL22, quimiocinas cuja atividade é potenciada através da ligação ao CD40. A quimiocina CCL22, agonista do CCR4, favorece o recrutamento seletivo de células $\text{TregCD4}^+\text{CD25}^+\text{Foxp3}^+$ para os locais de inflamação (Adorini e Penna, 2008).

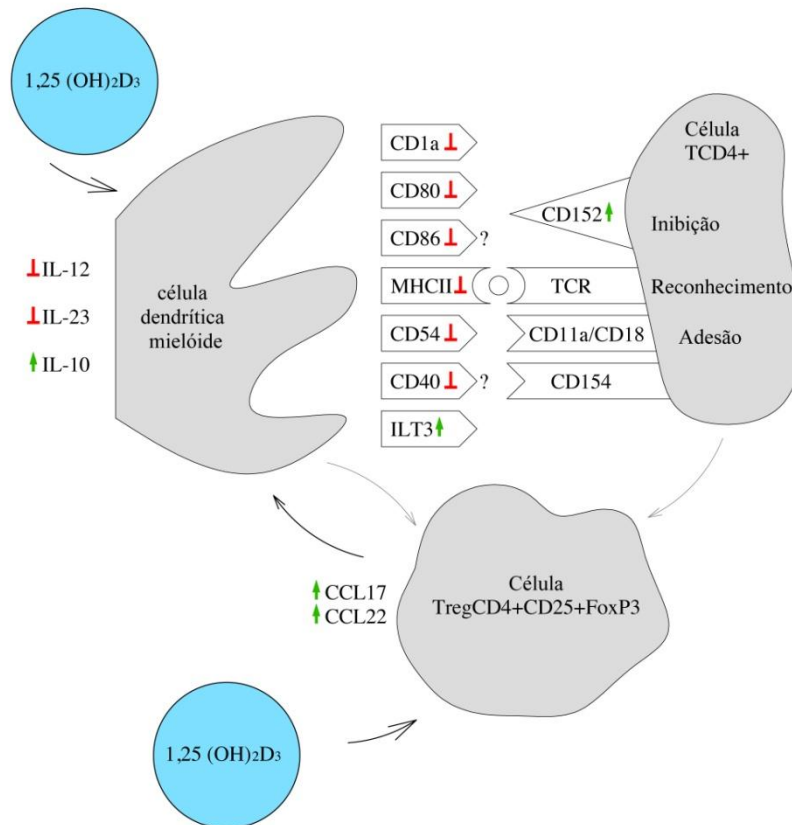


Figura 3 (adaptada de Adorini e Penna, 2009)

Indução de células dendríticas mielóides com propriedades indutoras de tolerância imunológica pelos agonistas do VDR, promovendo o desenvolvimento de células $\text{TregCD4}^+\text{CD25}^+\text{FoxP3}^+$. Inibição das moléculas coestimuladoras CD80, CD54 e MHCII e das citocinas IL-12 e IL-23. Aumento da expressão da molécula inibitória CD152 nas células TCD4^+ .

↓ representa inibição/diminuição; ↑ representa estimulação/aumento; ? representa resultados contraditórios em diferentes estudos.

3.2.3 - Modulação da função de linfócitos T

Para além dos efeitos indiretos sobre a ativação e desenvolvimento dos linfócitos T exercidos através da modulação da função das células dendríticas, a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ também possui efeitos diretos sobre estas células (Adorini e Penna, 2008) (Figura 4).

As células T não ativadas expressam níveis quase indetetáveis do VDR, mas os níveis aumentam cinco vezes durante a proliferação celular que se segue à ativação antigénica, permitindo a regulação de pelo menos 102 genes sensíveis à $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Kamen et al, 2010). Por consequência, os estudos iniciais sobre os efeitos da vitamina D nas células T basearam-se na sua capacidade de suprimir a proliferação desta população celular (Hewison, 2010). Contudo, o reconhecimento de que as células T efectoras CD4^+ eram capazes de considerável plasticidade fenotípica, levantou a possibilidade de a vitamina D poder também influenciar o fenótipo celular (Hewison, 2010; Bansal et al, 2011).

As células T *helper* CD4^+ podem ser divididas funcionalmente nas subpopulações Th1, Th2, Treg, Th17 e Th9. As células Th1, intimamente associadas à imunidade celular, atuam contra infeções intracelulares e secretam particularmente IL-1, $\text{INF}\gamma$ e $\text{TNF}\alpha$. As células Th2, ligadas à imunidade humoral, têm um papel importante na eliminação de infeções helmínticas e no desencadeamento de doenças alérgicas e produzem sobretudo IL-4, IL-5 e IL-13 (Annunziato et al, 2009). As subpopulações Th1 e Th2 são mutuamente inibitórias e reguladas pelas células Treg, que por sua vez são caracterizadas pela produção de $\text{TGF}\beta$ e IL-10 e pela presença do fator de transcrição Foxp3 (*forkhead box protein 3*) (Bansal et al, 2011). A subpopulação Th17, recentemente identificada, é caracterizada pela produção de IL-17, IL-17F, IL-21 e IL-22. Funcionalmente, estas células estão envolvidas na eliminação de organismos extracelulares, particularmente bactérias e fungos, através da ativação e recrutamento de neutrófilos (Louten et al, 2009). Contudo, a expressão de citocinas pró-inflamatórias pelas células Th17 está também associada a dano tecidular (Hewison, 2010)

e tem sido encontrada em várias doenças autoimunes (Bansal et al, 2011). As células Th17 derivam de células T CD4+ *naive* na presença de TGFβ, IL-6 e IL-23 (Chang et al, 2010). Sem IL-6, torna-se provável que estas células desenvolvam um fenótipo Treg. A interação exata entre as células Th17 e as Treg é ainda pouco conhecida mas algumas evidências sugerem que as células Treg sejam importantes para regular o excesso de atividade das células Th17 (Bansal et al, 2011). A subpopulação Th9 secreta IL-9 e parece desempenhar funções do tipo Th2, tendo relevância em processos de autoimunidade e alergia (Li H et al, 2010). O desenvolvimento destas células depende de IL-4 e TGFβ1 e é potenciado na presença de IL-25 (Palmer et al, 2011).

Vários estudos demonstram que a 1,25(OH)₂D₃ diminui a secreção de IL-2, INFγ e IL-12, inibindo seletivamente a resposta Th1 (Overbergh et al, 2000; Arnson et al, 2007; Palmer et al, 2011; Hewison, 2012). Em estudos *in vitro*, a adição de 1,25(OH)₂D₃ a células T humanas aumentou a secreção de IL-5 e IL-10, favorecendo a dominância Th2 (Overbergh et al, 2000; Boonstra et al, 2001). No entanto, estas observações têm vindo a ser recentemente colocadas em causa por estudos usando células T de rato, em que a 1,25(OH)₂D₃ mostra diminuir não apenas o INFγ, marcador da resposta Th1, mas também a IL-4, associada à resposta Th2 (Staeva-Vieira et al, 2002). O estudo de O’Kelly e colaboradores (2002) veio acentuar esta discordância pois demonstrou que células imunitárias de ratos *knockout* para o gene VDR tinham, ao contrário do que seria expectável, um nível reduzido de células Th1.

Enquanto, *in vitro*, a vitamina D parece favorecer a polarização do fenótipo Th1 para o Th2, *in vivo* as suas ações parecem ser bem mais complexas.

Num estudo recente de Palmer e colaboradores (2011), a 1,25(OH)₂D₃ mostrou reduzir a atividade das células Th17, das células Th9 e das células T que produzem IL-22. De forma interessante, neste estudo a população Th1 foi apenas inibida de forma modesta. O uso de células deficientes em IL-10 ou de anticorpos bloqueadores da IL-10 aboliu o efeito inibitório

da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sobre as células Th9 mas não sobre as células Th17, sugerindo que a indução desta citocina não é necessária à supressão da população Th17 pela vitamina D.

A $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ inibe a expressão da IL-6, necessária à gênese de células Th17, da IL-12p70, da IL-23p19 e da IL-17 (Kamen et al, 2010). A inibição da produção de IL-17 está relacionada com a supressão direta da transcrição do seu gene pela $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Joshi et al, 2011). Em ratos com encefalomielite experimental autoimune, um modelo animal de esclerose múltipla, a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ diminuiu a diferenciação das células Th17 e a produção de CCR6, cuja expressão parece ser fundamental no início da doença ao permitir a entrada das células Th17 no sistema nervoso central (Chang et al, 2010). Em condições favoráveis à polarização Th17, a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ contribuiu para o aumento de células T produtoras de IL-10 mas de forma surpreendente mostrou diminuir também a diferenciação de células Treg, o que foi atribuído, neste estudo, à sua capacidade de suprimir a produção de IL-2 (Chang et al, 2010). Acredita-se que a função das células Treg implique a sinalização via IL-2, o que requer a presença de ambas as cadeias α e β do seu recetor. Num estudo, ratos *knockout* para a IL-2 não produziram células Treg CD4+CD25+ (Cantorna e Mahon, 2004). Noutro estudo realizado em modelos animais de doença inflamatória intestinal, o tratamento com $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ reduziu a expressão de IL-17 enquanto que a ablação do gene da 1α -hidroxilase levou à expressão de níveis aumentados desta citocina (Liu et al, 2008).

No que toca à ação da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ na população de células Treg, a potenciação da produção de IL-10 e da expressão do TLR9, que reconhece o ADN viral e as sequências dinucleotídicas CpG (Bansal et al, 2011), sugere uma nova ponte entre a imunidade inata e a adquirida (Hewison, 2010).

Em contraste com o abundante número de estudos sobre os efeitos da vitamina D nas células T CD4+ efectoras, a compreensão da sua atividade nas células T CD8+ supressoras permanece limitada. Estudos mais antigos demonstram que a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ regula ativamente

a secreção de citocinas pelas células CD8+ e pode controlar a sua proliferação em resposta a estímulos imunitários específicos (Willheim et al, 1999). Contudo, estudos mais recentes mostram que, embora as células T CD8+ expressem um elevado número de VDRs, sugerindo que constituem alvos da 1,25(OH)₂D₃, revelam fraca resposta antiproliferativa à ação da hormona (Bansal et al, 2011). Por outro lado, o impacto da 1,25(OH)₂D₃ sobre as doenças autoimunes não parece depender dos efeitos exercidos sobre as células T CD8+, como é mostrado num estudo da encefalomielite autoimune em ratos (Meehan et al, 2002).

Embora tenha sido aqui colocado especial ênfase nas ações da vitamina D sobre a proliferação e o fenótipo das células T, é importante reconhecer que outras vertentes da função linfocítica possam ser moduladas por esta hormona. Em particular, estudos recentes mostram que a vitamina D exerce efeitos potentes sobre o recrutamento de células T para tecidos específicos (Hewison, 2010).

3.2.4 - Modulação da função de linfócitos B

Tal como as células T, apenas as células B ativas expressam um número significativo de VDRs (Hewison, 2010). Enquanto alguns estudos no passado sugeriam que os efeitos da 1,25(OH)₂D₃ sobre as células B eram efeitos indiretos que resultavam da ação primária sobre as células T *helper*, estudos mais recentes indicam que a 1,25(OH)₂D₃ exerce efeitos diretos na homeostasia das células B (Chen S et al, 2007) (Figura 4). A 1,25(OH)₂D₃ induz apoptose de linfócitos B, diminui a produção de imunoglobulinas, suprime a proliferação dos linfócitos B e a diferenciação de plasmócitos e de linfócitos B de memória (Chen S et al, 2007). Quando há exposição *in vitro* a 1,25(OH)₂D₃ a diferenciação de linfócitos B é interrompida (Kamen et al, 2010). De forma notável, a expressão da enzima 1 α -hidroxilase também foi detectada em

células B, indicando que estas células também podem ser capazes de respostas autocrônicas e intracelulares à vitamina D (Hewison, 2010).

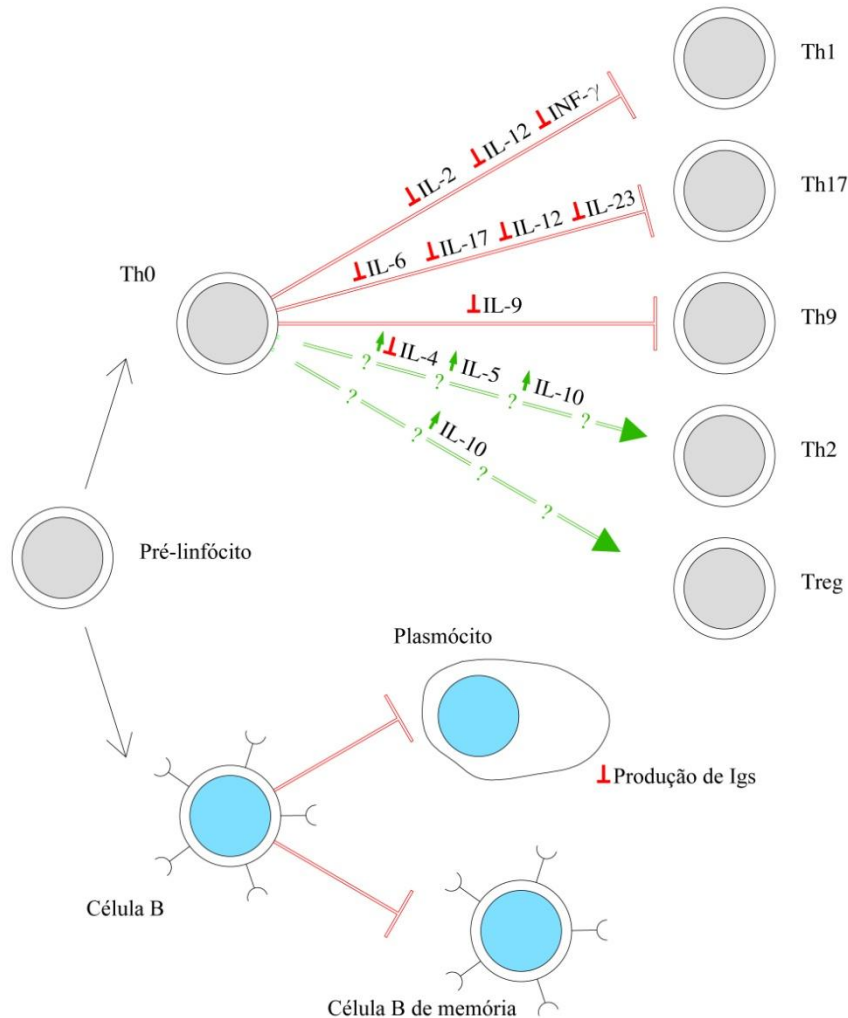


Figura 4 (adaptada de Arnson et al, 2007)

Efeitos imunomoduladores da vitamina D nas células B e em várias subpopulações de células TCD4+. Efeitos predominantemente inibitórios sobre as populações Th1, Th17 e Th9. O favorecimento da resposta Th2 e a indução direta de células Treg não são consensuais entre os estudos (representado através de $\rightarrow ? \rightarrow$).

Efeitos inibitórios da vitamina D na diferenciação de plasmócitos e de células B de memória e na produção de imunoglobulinas (Igs). \downarrow e \dashv representam inibição/diminuição.

4. ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS DO GENE VDR E DIABETES TIPO 1

A DM1 é uma doença autoimune que resulta da destruição das células β pancreáticas produtoras de insulina, sendo precedida de um estado de insulinite, em que ocorre infiltração dos ilhéus pancreáticos por linfócitos T (Turpeinen et al, 2003). O processo autoimune inicia-se frequentemente na infância e progride durante um período variável de meses a anos antes da ocorrência de hiperglicemia. Pela altura do diagnóstico, apenas 10% a 30% da massa de células β persiste funcional (Takihi et al, 2010).

A DM1 tem uma etiopatogenia multifatorial e ainda só parcialmente conhecida, parecendo resultar de uma interação complexa entre vários fatores ambientais e genéticos (Garcia et al, 2007).

Existem claras diferenças na predisposição imunogenética para a DM1 entre os diferentes países e a incidência da doença parece variar de acordo com estas diferenças (Takiishi et al, 2010). Os genes codificadores dos antígenos HLA (antígenos leucocitários humanos) de classe II foram identificados como os fatores genéticos mais importantes na determinação do risco de DM1, mas outros *loci* genéticos têm sido estudados, incluindo a região promotora do gene da insulina, o gene do CTLA-4 (gene codificador do antígeno 4 associado às células T citotóxicas, localizado no cromossoma 2q33 e envolvido na regulação das respostas imunitárias), o gene PTPN22 (proteína tirosina fosfatase, não recetor do tipo 22), o gene IL2RA (recetor α da interleucina-2) e a região IFIH1 (interferão induzido com o domínio 1 da helicase C) (Boraska et al, 2008). Tendo em conta as evidências recentes sobre o papel imunomodulador da vitamina D, os genes da 1α -hidroxilase e particularmente, o do VDR também têm sido propostos como genes de suscetibilidade à DM1.

O gene VDR está localizado no cromossoma 12q12-q14, tem pelo menos cinco regiões promotoras (Guo et al, 2006) e inclui oito exões codificadores de proteínas (exões 2 a

9) e seis exões não transcritos (exões 1a-1f), que são processados alternativamente (Lemos et al, 2008). Os polimorfismos FokI F>f (rs10735810); BsmI B>b (rs1544410); ApaI A>a (rs7975232) e TaqI T>t (rs731236) são os SNPs (polimorfismos de nucleótido único) mais extensivamente estudados (Guo et al, 2006).

O alelo F do SNP FokI cria um codão de iniciação alternativo no exão 2, gerando uma proteína com três aminoácidos adicionais (Lemos et al, 2008). Estudos *in vitro* demonstraram uma taxa de transcrição mais elevada do gene VDR em células com o genótipo FF (Pani et al, 2000). Ambos os SNPs BsmI e ApaI estão localizados no intrão 8 e não afetam a estrutura da proteína VDR. Contudo, o SNP BsmI está fortemente ligado a uma sequência de repetição de microssatélites poli(A) na região 3', que pode por sua vez influenciar a estabilidade do mRNA do VDR (Panierakis et al, 2009). O polimorfismo TaqI é um SNP silencioso localizado no exão 9, não sendo por isso expectável que altere a função do VDR (Pani et al, 2000).

O primeiro estudo onde foi reportada uma associação entre os polimorfismos do VDR e a DM1 foi realizado por McDermott e colaboradores em 1997. Neste estudo concluiu-se que o alelo b do polimorfismo BsmI se associava a maior risco de DM1 numa população indiana.

Desde esta data inúmeros estudos têm sido realizados em diferentes populações, mas os resultados têm-se mostrado contraditórios. Em estudos epidemiológicos, associações positivas entre os polimorfismos do VDR e o risco de DM1 foram encontradas em populações de origem grega (Panierakis et al, 2009), alemã (Ramos-Lopez et al, 2006), japonesa (Motohashi et al, 2003; Shimada et al, 2008), chilena (Garcia et al, 2007), espanhola (Marti et al, 2004), croata (Boraska et al, 2008) e tailandesa (Chang et al, 2000). Contudo, essas associações não foram encontradas nas populações portuguesa (Lemos et al, 2008), brasileira (Mory et al, 2009), finlandesa (Turpeinen et al, 2003), norueguesa, romena, britânica e norte-americana (Nejentsev et al, 2004).

Numa meta-análise, em que foram analisados 19 estudos, não foi encontrada evidência de associação entre qualquer dos SNPs mais estudados e o risco de DM1, quer em estudos caso-controlo quer em estudos de transmissão familiar (Guo et al, 2006). Este resultado apoia as conclusões do estudo de Nejentsev e colaboradores (2004) onde foram analisadas 3.763 famílias com DM1, não sendo encontrada associação entre a doença e qualquer um dos 98 SNPs do gene VDR estudados.

Em relação ao SNP BsmI, a frequência de portadores do genótipo BB na população japonesa mostrou-se significativamente aumentada nos doentes com DM1 em relação aos controlos (Shimada et al, 2008). Mesmo localizado numa sequência intrónica, é possível que o SNP BsmI influencie a expressão proteica, embora tenha sido descrito que este polimorfismo não altera os níveis de mRNA do VDR em células mononucleadas do sangue periférico (Pani et al, 2000). No estudo de Shimada e colaboradores (2008), o genótipo BB mostrou-se associado a maior risco de DM1 tanto de início lento como de início agudo, embora a associação tivesse sido mais forte na DM1 de início agudo. Considerou-se início agudo quando, satisfeitos os restantes critérios de DM1, desde o início da doença até ao tratamento com insulina decorriam menos de seis meses e de início lento quando até à insulinoaterapia decorriam mais de 12 meses. Já noutro estudo japonês (Motohashi et al, 2003), a maior frequência do genótipo BB na população com DM1 só foi estatisticamente significativa em relação aos controlos na DM1 de início agudo, sugerindo o papel do polimorfismo BsmI no padrão de início da doença. No estudo de Shimada e colaboradores, é sugerido que a frequência mais baixa do genótipo BB na população japonesa (cerca de 1%) em relação à caucasiana (cerca de 10% a 20%) poderá ser um dos fatores que contribui para a mais baixa prevalência da DM1 na população japonesa.

Outro aspeto interessante que tem sido explorado é a relação entre os polimorfismos do VDR e o nível sérico dos auto-anticorpos. No estudo de Garcia e colaboradores (2007), foi

encontrada uma associação entre os genótipos AabbTT e aabbTT e níveis mais elevados dos anticorpos anti-GAD65 e anti-IA-2, o que está de acordo com os resultados do estudo de Chang e colaboradores na população tailandesa (2000). Contudo, noutra estudo mais recente não foram observadas diferenças significativas no perfil dos anticorpos contra antígenos pancreáticos, de acordo com os diferentes genótipos do VDR (Mory et al, 2009). Também no estudo de Mory e colaboradores (2009) foi demonstrado que os doentes com DM1 com o alelo f do SNP FokI tendiam a apresentar níveis mais baixos de função residual das células β (correspondente a níveis de peptídeo C superiores a 0,6ng/mL) mas as diferenças em relação aos controlos não foram estatisticamente significativas.

Torna-se clara, portanto, a enorme divergência de resultados obtidos, não apenas entre as associações positivas e negativas mas também entre as associações positivas. Enquanto no estudo de McDermott e colaboradores, o alelo b do polimorfismo BsmI foi referido como o alelo de risco numa população indiana, foi atribuído ao mesmo alelo um papel protetor na população alemã (Ramos-Lopez et al, 2006). Mesmo em populações caucasianas os resultados encontrados têm sido diferentes: enquanto num estudo, o genótipo BBAAtt conferiu risco aumentado de DM1, outro estudo concluiu que eram os genótipos BbAaTT e BbAATt os genótipos de risco (Guo et al, 2006).

A divergência de resultados poderá dever-se a diferenças étnicas ou a interações entre os diversos fatores genéticos e ambientais envolvidos na etiopatogenia da DM1. Um dos fatores ambientais proposto que poderá explicar parcialmente as variações nas associações encontradas é a exposição à radiação UV. Uma meta-análise de 16 estudos de 19 regiões diferentes concluiu que os níveis de radiação UV podiam influenciar a associação entre o genótipo VDR e o risco de DM1 (Ponsonby et al, 2008). Em termos evolutivos não é surpreendente que o genótipo VDR possa variar de acordo com as condições ambientais, sendo, portanto, apropriado que os estudos sobre os polimorfismos do VDR avaliem a

exposição à radiação UV e outros determinantes ambientais dos níveis de vitamina D no organismo.

A ausência de controlo da ingestão dietética de vitamina D nos estudos analisados constituiu uma das críticas apontadas na meta-análise de Guo e colaboradores (2006), que consideraram a possibilidade de não ser adequado examinar a relação entre os polimorfismos do gene VDR e a DM1, sem avaliar a biossíntese individual de vitamina D. Alguns polimorfismos podem ser apenas funcionalmente importantes na presença de níveis baixos de vitamina D. Contudo, Nejentsev e colaboradores (2004) analisaram o efeito exercido pelo país de origem e o efeito combinado exercido pelo ano de nascimento e país de origem na associação entre DM1 e oito SNPs do gene VDR em cinco diferentes populações e não encontraram heterogeneidade significativa.

Outra crítica apontada por Guo e colaboradores (2006) foi a ausência de controlo, nos estudos analisados, do fator de confundimento exercido pelo genótipo HLA. Contudo, existem estudos que encontram associações consistentes entre os polimorfismos do gene VDR e o risco de DM1, mesmo após controlo deste fator de confundimento (Motohashi et al, 2003; Shimada et al, 2008). Este parece ser um ponto importante já que, um estudo recente demonstrou que alguns polimorfismos do VDR interagem com o alelo de suscetibilidade HLADRB1 através do elemento de resposta à vitamina D presente na região promotora do alelo DRB10301, o que pode ser importante para a manifestação da DM1, particularmente na infância devido à expressão pobre de DRB10301 no timo (Takiishi et al, 2010).

Uma vez que os SNPs BsmI, ApaI e TaqI não possuem nenhum efeito funcional conhecido, é possível que os polimorfismos do gene VDR não correspondam a *loci* de suscetibilidade à doença mas constituam *loci* marcadores em desequilíbrio de ligação com os verdadeiros *loci* de suscetibilidade, que por sua vez afetariam a expressão do VDR (Lemos et

al, 2008; Panierakis et al, 2009). Assim, os achados divergentes podem dever-se à força variável dos desequilíbrios de ligação nas diferentes populações (Turpeinen et al, 2003).

O polimorfismo FokI desempenha um papel funcional no sistema imunitário. Experiências *in vitro* demonstraram que linfócitos com ausência do polimorfismo FokI proliferavam mais ativamente (Mory et al, 2009) e monócitos e células dendríticas sem este SNP produziam níveis mais elevados de IL-12p70 após estimulação, induzindo assim uma resposta Th1 envolvida na destruição das células β pancreáticas (Panierakis et al, 2009). Também no estudo de Shimada e colaboradores (2008) foi descrito que células mononucleadas do sangue periférico de doentes com DM1 com o genótipo BsmI BB, produziam níveis mais elevados de INF- γ , sugerindo que este polimorfismo contribuísse para a potenciação da resposta Th1.

Finalmente, em todos os estudos é evidenciado um problema já bem documentado dos estudos de associação genética em doenças de etiologia complexa: a falta de replicabilidade. De facto, a análise quantitativa destes estudos revela que a falta de consistência é comum e que o tamanho pequeno das amostras e o grande número de estudos são dois fatores preditivos de discrepância independentes (Guo et al, 2006).

Portanto, embora a contribuição dos polimorfismos do gene VDR para a etiologia da DM1 seja um ponto controverso, está bem estabelecido que a ação da vitamina D se exerce através deste recetor e que alguns polimorfismos do gene VDR, especialmente os da região promotora ou da região 3'-UTR (não traduzida) podem influenciar a eficiência da transcrição e da tradução e a estabilidade do mRNA (Guo et al, 2006). Existem mais de 200 SNPs identificados no gene VDR e mesmo que nenhum deles esteja associado à DM1, é ainda possível que estejam envolvidos na sua patogénese, como *loci* marcadores.

5. ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS DO GENE VDR E TIROIDITES AUTOIMUNES

A etiopatogenia das TAI é multifatorial, envolvendo a interação complexa entre fatores genéticos, fatores ambientais como o tabagismo, o consumo de quantidades excessivas de iodo, alguns fármacos como a amiodarona e o lítio e fatores endógenos como a gravidez (Melo, 2006). Contudo, os fatores genéticos são preponderantes, sendo-lhes atribuído um peso relativo superior a 50% (Melo, 2006). A importância dos fatores genéticos é apoiada pela maior prevalência das TAI entre familiares e pela alta taxa de concordância em gêmeos monozigóticos (20% a 30%) relativamente aos dizigóticos (0% a 7%) (Maalej et al, 2008).

Até à data, foram estudados mais de 20 *loci* candidatos relacionados com as TAI, tendo sido encontradas associações consistentes com os genes do complexo HLA, particularmente com as regiões DR3 e DR5 (Lin et al, 2006). Na raça branca, os alelos mais estudados associados à tiroidite de Hashimoto (TH) e à tiroidite pós-parto são o HLA-DR3, HLA-DR4 e HLA-DR5, embora diferentes associações sejam reportadas em outros grupos étnicos (Pearce et al, 2003). Polimorfismos no gene CTLA-4 também têm sido consistentemente associados a maior risco de Doença de Graves (DG) (Collins et al, 2004). Entre outros potenciais genes de suscetibilidade estudados encontram-se o do recetor da tirotropina (TSH) e recentemente, o do VDR (Lin et al, 2006).

Tal como sucedia com a DT1, também aqui se verifica uma grande discrepância nos resultados das associações entre os vários polimorfismos do gene VDR e o risco de TAI.

Enquanto em estudos na população chinesa (Chen RH et al, 2007) e japonesa (Ban et al, 2000) o genótipo FF e o alelo F do SNP FokI foram associados a maior suscetibilidade à DG, um estudo na população alemã sugere o alelo f como o de maior risco (Maalej et al, 2008). Relativamente ao SNP BsmI, o alelo b foi associado a maior suscetibilidade à DG

numa população polaca (Maalej et al, 2008), mas já numa população japonesa o alelo B e o genótipo Bb foram referidos como os de maior risco (Ban et al, 2000). De forma interessante, neste estudo de Ban e colaboradores (2000), as frequências alélicas e genotípicas apenas diferiram significativamente entre as mulheres com DG e os controlos, o que foi atribuído parcialmente à maior prevalência da doença no sexo feminino. Contudo, num estudo de larga escala, envolvendo 768 doentes britânicos com DG e 864 controlos, e onde foram analisados 10 polimorfismos do gene VDR, não foi encontrada qualquer evidência de associação alélica ou genotípica com a DG (Collins et al, 2004).

Relativamente à TH, um estudo na população japonesa sugere que os portadores do genótipo FF do SNP FokI estão em maior risco de desenvolver a doença (Ban e Taniyama, 2001), o que está de acordo com os dados mais recentes do estudo de Lin e colaboradores (2006) na população chinesa, levando estes autores a proporem o SNP FokI como um marcador de suscetibilidade à TH na população asiática.

A discrepância dos resultados encontrados pode atribuir-se, pelo menos em parte, à heterogeneidade interpopulacional dos determinantes genéticos e ambientais das TAI (Chen RH et al, 2007). Contudo, a não replicabilidade dos resultados também se pode dever à dimensão inadequada das amostras, às diferenças na estratificação das populações e no desenho dos estudos, ao efeito de fatores de confundimento, aos erros na classificação fenotípica e a alguns artefactos estatísticos (Collins et al, 2004; Chen RH et al, 2007).

6. VITAMINA D E DIABETES TIPO 1

Os fatores ambientais como a amamentação, o estilo de vida, a vacinação e as infecções virais têm sido implicados na patogénese da DM1 mas a evidência de um claro gradiente norte-sul na prevalência desta e de outras doenças autoimunes sugeriu o papel de outro potencial fator imunomodulador: a exposição à luz solar (Giulietti et al, 2004). De facto, a incidência de DM1 é maior em países localizados mais a norte sendo, contudo, pouco provável que a latitude seja por si só um fator de risco independente para o início da DM1 já que se observa uma correlação mais significativa entre a doença e a radiação UVB do que entre a doença e a latitude (Takiishi et al, 2010). Para além disso, é bem conhecida a sazonalidade do início da DM1, com um maior número de casos diagnosticados no Outono e Inverno do que no Verão (Ziipitis e Akobeng, 2008). Kahn e colaboradores (2009) reportaram que crianças nascidas na Primavera tinham maior risco de DM1, o que poderia refletir níveis de vitamina D maternos e neonatais insuficientes.

O papel da vitamina D na patogénese da DM1 ainda não está completamente elucidado, embora vários mecanismos possíveis tenham vindo a ser sugeridos (Figura 5).

6.1 - Vitamina D e as células β pancreáticas

O tratamento de células β pancreáticas com $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ parece ter um efeito protetor direto contra a apoptose, o que tem sido atribuído à redução da expressão de moléculas MHC classe I, à indução da expressão da proteína anti-apoptótica A20 e à diminuição da expressão do recetor transmembranar Fas, envolvido na transdução de sinais apoptóticos (Takiishi et al,

2010). Outro mecanismo proposto é o aumento da produção e secreção de insulina nas células β por ação da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, através da regulação do fluxo de cálcio e também de vias independentes do cálcio (Borkar et al, 2010).

A $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ também reduziu a produção das citocinas IL-1 β e IL-15 e da proteína 10 induzida pelo INF γ (IP-10) nas células β , sugerindo que a vitamina D pode reduzir a migração e o recrutamento de células T efetoras e de macrófagos para os ilhéus pancreáticos (Takiishi et al, 2010).

Para além dos efeitos nas células β pancreáticas, a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ também tem sido associada a um aumento da sensibilidade à insulina nos órgãos-alvo: fígado, músculo esquelético e tecido adiposo (Takiishi et al, 2010).

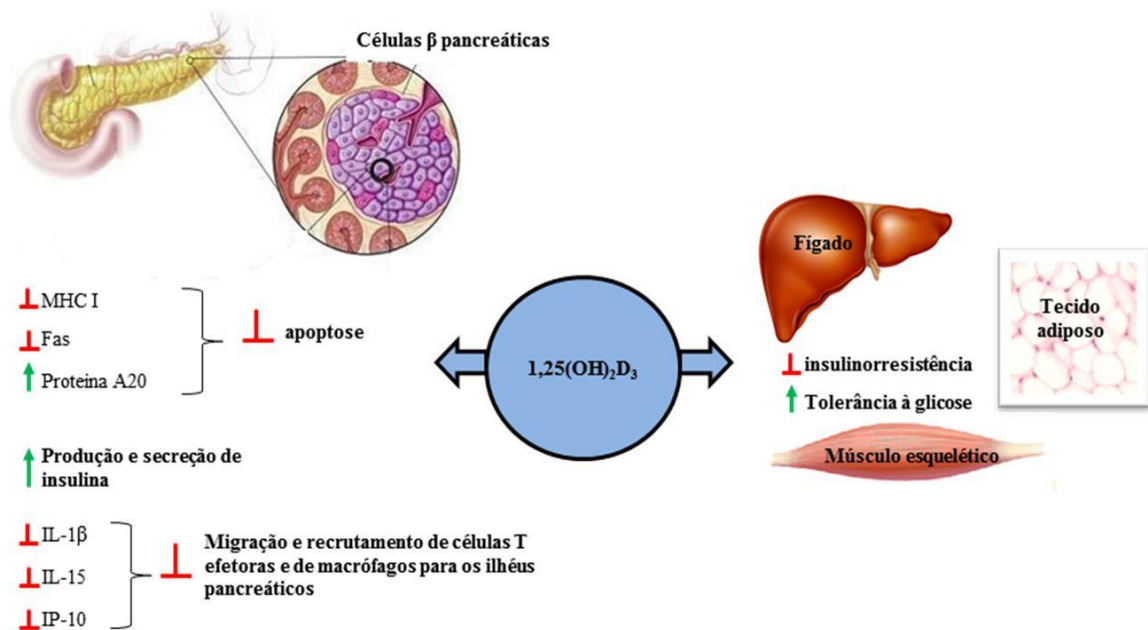


Figura 5 (adaptada de Takiishi et al, 2010)

Mecanismos propostos para a possível ação protetora da vitamina D na DM1.

↓ representa inibição/diminuição; ↑ representa estimulação/aumento.

6.2 - Estudos em modelos animais

Os ratos NOD constituem modelos animais excelentes para o estudo da interação entre fatores ambientais e genéticos na etiopatogenia da DM1, dada a evolução espontânea e a semelhança com a patogênese da doença nos humanos.

A capacidade de inibição da DM1 em ratos NOD pelos agonistas do VDR tem sido extensivamente estudada. De forma interessante, a 1,25(OH)₂D₃ mostrou reduzir a incidência de insulinite e prevenir o desenvolvimento de DM1 apenas em ratos com menos de 3 semanas (antes do aparecimento de insulinite), mas já a combinação do agonista do VDR MC1288 com ciclosporina foi capaz de reduzir a incidência da doença em ratos com 8 semanas (Adorini e Penna, 2008). Outro análogo da vitamina D, BXL-219, diminuiu a produção *in vitro* e *in vivo* de citocinas pró-inflamatórias pelas células β pancreáticas e inibiu o recrutamento de células T auto-reativas (Adorini e Penna, 2008). No estudo de Giulietti e colaboradores (2004) foi observado que a deficiência de vitamina D *in utero* e em ratos NOD muito jovens se associava a uma forma de apresentação mais agressiva da DM1. Neste estudo, foi encontrado um perfil aberrante de citocinas macrofágicas, uma deficiência de células Treg CD4+CD62L+ e uma expressão aumentada de IL-1 nos ilhéus pancreáticos.

Os linfócitos T de ratos NOD tratados com 1,25(OH)₂D₃ não demonstraram capacidade de transferir a DM1 para ratos NOD previamente irradiados (Casteels et al, 1998).

No caso da DM1 já estar instalada, a 1,25(OH)₂D₃ mostra fraca capacidade de reverter a doença, possivelmente porque a massa de células β restante não é suficiente para suprir as necessidades de insulina. Nesta fase, uma das alternativas à insulino-terapia é a transplantação de células β ou de ilhéus pancreáticos (Takiishi et al, 2010). Nos ratos NOD transplantados com ilhéus singênicos e tratados com o análogo KH1060 juntamente com a ciclosporina foi observado um prolongamento significativo da sobrevida do enxerto em comparação com ratos controle e uma diminuição da falência precoce e da rejeição tardia do enxerto (Mathieu et al,

2001). Mais recentemente, a combinação do análogo TX527 com a ciclosporina ou com o INF- β também induziu um atraso significativo na recorrência de diabetes após transplante de ilhéus com um aumento da expressão pancreática de IL-10 (Gysemans et al, 2002).

Contudo, os resultados obtidos a partir de ratos *knockout* para o gene VDR têm sido conflituosos. Enquanto Zeitz e colaboradores (2003) encontraram nos seus modelos glicémias mais elevadas e níveis mais baixos de insulina circulante, Mathieu e colaboradores (2001) não observaram alterações significativas na tolerância à glicose ou na incidência de diabetes nos seus modelos de ratos *knockout* para o VDR.

Estes resultados contraditórios poderão dever-se a diferenças nos genótipos ou na homeostasia fosfocálcica entre os ratos mas também podem sugerir a existência de redundância nas vias de sinalização da vitamina D, ou seja, a presença de mecanismos compensatórios que entram em ação quando o VDR não está presente (Zeitz et al, 2003).

6.3 - Níveis séricos de vitamina D em doentes com Diabetes tipo 1

Em vários estudos caso-controlo, mas não em todos, foram encontrados níveis séricos de 25(OH)D₃ e ocasionalmente de 1,25(OH)₂D₃ mais baixos em doentes com DM1 do que em controlos saudáveis (Tabela 1).

No estudo DISS (*Diabetes Incidence Study in Sweden*), os níveis de 25(OH)D₃ eram significativamente mais baixos na DM1 de início recente e também após um período de 8 anos, em relação ao grupo controlo (Littorin et al, 2006). Neste estudo, concluiu-se que não havia diferenças significativas nos níveis de vitamina D durante os meses de Verão e Inverno, excluindo-se assim a possibilidade de variação sazonal. Estes resultados são corroborados por

outros estudos (Greer et al, 2007; Bener et al, 2008) e pelo estudo mais recente de Borkar e colaboradores (2010), que reportaram níveis séricos de 25(OH)D₃ mais baixos em 50 crianças indianas com DM1 comparativamente aos controlos. Contudo, esta associação não é encontrada em todos os estudos. Bierschenk e colaboradores (2009) avaliaram os níveis séricos de 25(OH)D₃ numa população de 415 indivíduos da Flórida e reportaram a presença de níveis semelhantes entre doentes com DM1, seus familiares em primeiro grau e controlos. De forma surpreendente, identificou-se uma grande proporção de indivíduos com insuficiência de vitamina D em todos os grupos estudados, mesmo num ambiente com boa exposição solar.

A discordância dos resultados entre os estudos pode dever-se aos diferentes tamanhos das amostras e portanto, à heterogeneidade no poder estatístico, e também à desvalorização de vários fatores de confundimento (Kriegel et al, 2011). Embora alguns estudos caso-controlo tenham em conta a influência de certos fatores, como a origem étnica e a estação do ano, nos níveis séricos de vitamina D, tornam-se necessários estudos prospetivos mais alargados que controlem fatores adicionais como o tipo de pele, os comportamentos de exposição/evicção solar, a atividade da doença, a creatininémia, a microalbuminúria, a acetoacidose e o uso de certos fármacos como glucocorticoides e hidroxicloroquina (Bierschenk et al, 2009; Kriegel et al, 2011).

Assim, a maior limitação destes estudos caso-controlo é a possibilidade de causalidade reversa, isto é, os níveis baixos de vitamina D serem uma consequência e não uma causa da doença (Kriegel et al, 2011).

6.4 - Relação entre o consumo de vitamina D e o risco de Diabetes tipo 1

Os resultados dos estudos epidemiológicos sobre o potencial papel da suplementação com vitamina D na diminuição do risco de DM1 têm-se revelado contraditórios (Tabela 2).

Em 2001, um estudo de coorte de grande dimensão, que acompanhou mais de 10.000 indivíduos finlandeses desde o nascimento até aos 31 anos, encontrou um efeito protetor potente da suplementação regular com vitamina D no primeiro ano de vida (Hypponen et al, 2001). De forma interessante, na Finlândia, o país com maior taxa de incidência de DM1 no mundo, a cada redução substancial dos valores recomendados de vitamina D na infância (de 4500UI/dia antes de 1964 para 400UI/dia em 1992), correspondeu um aumento da taxa de incidência de DM1 (Mohr et al, 2010).

Também no estudo caso-controlo conduzido por Stene e Joner (2003), em que se questionaram as mães de 545 crianças sobre o uso de suplementos de vitamina D durante a gravidez e o primeiro ano de vida das crianças, foi descrita uma associação significativa entre a toma de suplementos de vitamina D cinco ou mais vezes por semana e a redução do risco de DM1.

Em 2008, uma meta-análise dos resultados de 4 estudos caso-controlo e um estudo de coorte revelou uma redução de 29% do risco de DM1 em crianças suplementadas com vitamina D, em relação às que não recebiam suplementação (Zipitis e Akobeng, 2008). Nesta meta-análise encontraram-se também evidências de um efeito dose-resposta, isto é, o risco de DM1 era menor nas crianças que recebiam doses mais elevadas de vitamina D.

Já num estudo mais recente, não foi encontrada uma diferença significativa nas concentrações séricas de 25(OH)D₃ durante o primeiro trimestre de gravidez entre mães de crianças que vieram a desenvolver DM1 e mães de crianças não diabéticas da mesma idade (Miettinen et al, 2012). Apesar de estes resultados apontarem para a baixa probabilidade da

deficiência relativa de vitamina D durante as fases iniciais da gravidez contribuir para o desenvolvimento de DM1 nos filhos, trata-se de uma conclusão que não pode ser precipitada pois uma grande proporção das mulheres estudadas tinha deficiência ou insuficiência de vitamina D (Miettinen et al, 2012).

Outros estudos têm analisado a associação entre o consumo de vitamina D e o desenvolvimento de autoimunidade contra as células β pancreáticas (IA), isto é, a positividade para pelo menos um dos seguintes auto-anticorpos: anti-GAD65, anti-insulina e anti-IA2. No estudo de coorte realizado por Brekke e Ludvigsson (2007), o consumo de vitamina D durante a gravidez foi avaliado através de um questionário pós-parto preenchido por mais de 16.000 mães. Concluiu-se que a suplementação com vitamina D durante este período se associava a uma redução da IA nas crianças com 1 ano de idade mas não nas crianças com 2,5 anos. Já num estudo de coorte prospetivo de maiores dimensões, realizado na Finlândia, não foi encontrada qualquer associação entre o consumo de vitamina D, também avaliado através de um questionário pós-parto, e o risco de DM1 ou de IA, numa população de crianças de alto risco genético para DM1 conferido pelo genótipo HLA DQB1 (Marjamaki et al, 2010). Outro estudo produziu resultados interessantes, indicando que o consumo de vitamina D através dos alimentos mas não através de suplementos durante o terceiro trimestre de gravidez, avaliado através de questionário pós-parto, se associava a um risco significativamente reduzido de IA num grupo de crianças norte-americanas seguido durante 4 anos (Fronczak et al, 2003).

Todos os estudos prospetivos que avaliam o consumo de vitamina D através de questionários são limitados, antes de mais, por um viés de memória, isto é, pela incapacidade de os indivíduos recordarem com exatidão a frequência de consumo de determinados alimentos (Kriegel et al, 2011). Também se torna muito difícil avaliar de forma adequada o conteúdo de vitamina D de cada alimento (Kriegel et al, 2011), para além de que considerar

apenas o consumo desta vitamina na avaliação dos seus níveis circulantes é fonte de grave erro, pois está a ignorar-se a fonte mais importante: a exposição solar (Simpson et al, 2011).

Para minorar esta última fonte de erro, Simpson e colaboradores (2011), não só avaliaram o consumo de vitamina D longitudinalmente como também os níveis séricos de 25(OH)D₃ numa subpopulação do estudo DAISY (*Diabetes Autoimmunity Study in the Young*), que acompanha um grupo de 2.644 crianças com suscetibilidade genética para DM1. Concluíram que nem o consumo de vitamina D nem os níveis de 25(OH)D₃ se associavam com o risco de desenvolver IA nem com a progressão para DM1 em crianças que já tinham desenvolvido autoimunidade. Este estudo tem a desvantagem de apenas ter sido medida a concentração de 25(OH)D₃ em 128 crianças, um número relativamente pequeno.

A inconsistência dos dados epidemiológicos sobre a suplementação com vitamina D e o risco de DM1 tem gerado algum debate na comunidade científica. A discordância dos resultados pode em parte ser explicada pelo facto de que o consumo de vitamina D em várias populações estudadas é demasiado reduzido para produzir efeitos significativos. As diferenças entre um consumo considerado alto e um baixo variam, em estudos observacionais, em média, apenas 300 a 400UI/dia (Kriegel et al, 2011).

Não existem na atualidade estudos aleatorizados de grandes dimensões que utilizem a suplementação com altas doses de vitamina D como prevenção primária da DM1 na população geral, dificultando a compreensão do papel desta suplementação na espécie humana. Será a suplementação com doses moderadas a altas de vitamina D protetora em relação à autoimunidade em geral e à DM1 em particular? Serão os níveis séricos de vitamina D reduzidos um fator de risco para a doença? Apenas um estudo aleatorizado controlado duplamente cego, de longa duração e com uma amostra significativa poderá responder a estas questões.

6.5 - Intervenção clínica: suplementação com vitamina D na Diabetes tipo 1

As evidências de que a suplementação com a vitamina D na infância precoce poderia diminuir o risco de DM1 e os resultados de vários estudos *in vitro* e *in vivo* apontando para o papel desta vitamina na proteção das células β pancreáticas, levantaram a possibilidade de a incluir nos esquemas terapêuticos da DM1, quando a doença já está instalada (Tabela 3).

No primeiro estudo piloto conduzido por Pitocco e colaboradores (2006), um grupo de 34 doentes com DM1 de início recente recebeu insulino-terapia intensiva juntamente com 0,25 μ g de calcitriol em dias alternados, enquanto ao grupo controlo foi administrada insulino-terapia e nicotinamida (25mg/kg) diariamente. O estudo produziu, contudo, resultados algo inconclusivos, mostrando não haver diferenças significativas na função residual de células β e apenas uma modesta e transitória redução das necessidades de insulina no grupo que recebia calcitriol. Já noutro estudo aleatorizado controlado, os resultados sugeriram que a 1 α (OH)D₃ em conjunto com a insulino-terapia preservava a função das células β pancreáticas em doentes com LADA (*Latent Autoimmune Diabetes in Adults*), uma forma de DM1 com algumas características de DM2 no seu início (Li et al, 2009). Enquanto 70% dos doentes com DM1 tratados com insulina e 1 α (OH)D₃ mantiveram ou aumentaram os níveis de peptídeo C em jejum após um ano de tratamento, somente 22% dos tratados apenas com insulina mantiveram os níveis de peptídeo C estáveis. Contudo, podem ser apontadas limitações deste estudo, nomeadamente a pequena dimensão da amostra estudada (apenas 35 doentes com LADA no total) e o facto de os níveis séricos de 1 α (OH)D₃ e de 1,25(OH)₂D₃ não terem sido obtidos. Para além disso, na LADA a perda da função residual das células β pancreáticas é muito mais lenta que na DM1 com início na infância, oferecendo uma janela de oportunidade mais favorável à intervenção terapêutica (Li et al, 2009). Os doentes com LADA podem mesmo constituir modelos humanos adequados para o estudo da imunoterapêutica na preservação das células β .

Estes resultados são contrariados por estudos mais recentes em que a vitamina D tem demonstrado ser ineficaz na proteção da função de células β em doentes com DM1. No estudo de Walter e colaboradores (2010), a administração de 0,25 μ g/dia de calcitriol ao grupo de 22 doentes com DM1 mostrou ser segura mas não provocou diferenças significativas nos valores de peptídeo C em jejum, nos valores médios de peptídeo C ou no pico de peptídeo C após um teste de tolerância, em relação ao grupo de 18 diabéticos que receberam placebo. Também a hemoglobina glicada (A1C) e as necessidades de insulina se mantiveram semelhantes entre os dois grupos ao longo dos 18 meses de observação.

Igualmente em 2010, o estudo aleatorizado controlado duplamente cego conduzido por Bizarri e colaboradores chegou a resultados semelhantes: no grupo de doentes com DM1 de início recente e níveis basais elevados de peptídeo C ($>0,25$ nmol/L) tratado com 0,25 μ g/dia de calcitriol, os níveis de A1C, as necessidades de insulina e a queda dos níveis de peptídeo C foram semelhantes ao grupo tratado com placebo.

É interessante notar que estes resultados vão de certa forma ao encontro das observações feitas em ratos NOD, em que os benefícios da 1,25(OH) $_2$ D $_3$ eram perdidos se esta fosse administrada tardiamente no decurso da doença (Adorini e Penna, 2008). Mesmo que a suplementação com vitamina D na pequena infância reduza o risco de DM1, é provável que os seus benefícios se resumam à modulação do início do processo autoimune, não tendo benefícios adicionais se administrada após o início da doença (Walter et al, 2010; Bizarri et al, 2010).

Em suma, as evidências atuais não apoiam a utilização da vitamina D para melhorar o tratamento da DM1.

Tabela 1: Níveis séricos de vitamina D em doentes com Diabetes tipo 1 (adaptada de Kriegel et al, 2011)

População	Doentes	Controlos	Hormonas estudadas	Associação	Resultados	Referência
Suécia	459 com DM1 de início recente; 138 oito anos depois	208	25(OH)D ₃	Sim	p<0,0001 para os níveis de vit. D na DM1 recente; p=0,04 para os níveis de vit. D 8 anos depois	Littorin et al, 2006
Índia	50 crianças (uma semana após o diagnóstico de DM1)	50	25(OH)D ₃	Sim	p<0,009	Borkar et al, 2009
Flórida, EUA	156 com DM1	153 controlos 106 familiares em 1º grau	25(OH)D ₃	Não	p=0,87	Bierschenk et al, 2009
Qatar	170 crianças com DM1	170	25(OH)D ₃ ; PTH	Sim	p=0,009 para os níveis médios de vit. D	Bener et al, 2008
Austrália	47 crianças com DM1	94	25(OH)D ₃ e 1,25(OH) ₂ D ₃	Sim	p=0,002	Greer et al, 2007

Tabela 2: Relação entre o consumo de vitamina D e o risco de Diabetes tipo 1 (adaptada de Kriegel et al, 2011)

População	Tipo de estudo	Grupo de estudo	Controlos	Consumo de vitamina D	Duração do estudo (anos)	Resultados	Referência
Finlândia	Coorte	81 doentes com DM1	10.285 controlos saudáveis	Suplementação durante 1º ano de vida	31	¹ RR 0,12 (² IC 0,03-0,51) para a suplementação regular Vs. Sem suplementação	Hypponen, 2001
Noruega	Caso-controlo	545 crianças com DM1	1668 crianças saudáveis	Suplementação durante gravidez e 1º ano de vida	-	³ OR 0,98 (IC 0,73-1,31) para o consumo ≥ 5 vezes/sem Vs. 0 vezes/sem durante a gravidez e OR 0,97 (IC 0,73-1,29) para consumo ≥ 5 vezes/sem durante 1º ano vida	Stene e Joner, 2003
Suécia	Coorte	8694 crianças com 1 ano e 7766 com 2,5 anos	11.081 crianças com 1 ano e 8805 com 2,5 anos	Suplementação durante gravidez	2,5	OR 0,71 (IC 0,52-0,96) para a redução da IA aos 12 meses mas OR 1,25 (IC 0,91-1,73) aos 30 meses	Brekke e Ludvigsson, 2007
Finlândia	Coorte	165 crianças com genótipo de alto risco HLA DQB1	3723 crianças com genótipo de alto risco HLA DQB1	Consumo materno e aos 1 e 3 meses após o parto	4,3	Consumo materno de vitamina D a partir da alimentação com um RR 1,25 (IC 0,8-1,95) e a partir de suplementos RR 1,05 (IC 0,95-1,16) para o risco de IA e DM1 na descendência	Marjamaki et al, 2010
EUA	Coorte	16 crianças com IA	206 crianças sem IA	Consumo e suplementação durante gravidez	4	⁴ HR 0,37 (IC 0,17 a 1,78) para o consumo de vit. D a partir da alimentação e a diminuição do risco de IA	Fronczak et al, 2003
EUA	Coorte	1875 crianças com risco aumentado para DM1 ⁵	769 crianças com risco aumentado para DM1 ⁵	Consumo de vit. D durante a infância	18	O consumo de vit. D não está associado com o risco de IA. HR 1,13 (IC 0,95-1,35)	Simpson et al, 2011
EUA	Coorte	178 crianças com IA	198 crianças com IA	Consumo de vit. D durante a infância	18	O consumo de vit. D não está associado com a progressão para DM1 em crianças com IA. HR 1,30 (IC 0,91-1,86)	Simpson et al, 2011

¹ RR: risco relativo; ² IC: Intervalo de confiança a 95%; ³OR:Odds ratio; ⁴HR:Hazard ratio; ⁵Genótipo HLA de risco ou familiares em 1º grau com DM1

Tabela 3: Suplementação com vitamina D na Diabetes tipo 1 (adaptada de Kriegel et al, 2011)

População	Doentes	Controlos	Análogo da vitamina D	Duração (Meses)	Resultados	Referência
China	17 doentes com LADA	18 doentes com LADA	1 α (OH)D ₃ 0,5 μ g/dia (\pm insulina)	12	70% dos doentes tratados com 1 α (OH)D ₃ mantiveram ou aumentaram os níveis de peptídeo C em jejum Vs. 22% tratados apenas com insulina	Li et al, 2009
Itália	34 doentes com DM1 a receber insulina+calcitriol	33 doentes com DM1 a receber insulina+nicotinamida	Calcitriol 0,25 μ g em dias alternados	12	Redução das necessidades de insulina aos 3 e 6 meses mas não aos 9 e 12 meses	Pitocco et al, 2006
Itália	15 doentes com DM1 e peptídeo C basal >0,25nmol/L a receber calcitriol	12 doentes com DM1 a receber placebo	Calcitriol 0,25 μ g/dia	24	Aos 6, 12 e 24 meses, não houve diferenças significativas nas necessidades de insulina, na A1C e na diminuição do peptídeo C	Bizarri et al, 2010
Alemanha	22 doentes com DM1 a receber calcitriol	18 doentes com DM1 a receber placebo	Calcitriol 0,25 μ g/dia	18	Aos 18 meses, diminuição semelhante (40%) em ambos os grupos dos valores médios, em jejum e do pico de peptídeo C após prova de tolerância. A1C e necessidades de insulina semelhantes	Walter et al, 2010

7. VITAMINA D E TIROIDITES AUTOIMUNES

As TAI constituem um conjunto de patologias da tiroide de alta prevalência, com base fisiopatológica comum mas com manifestações clínicas diferentes (Melo, 2006).

Nos EUA, estima-se que 10% da população possua anticorpos contra antigénios tiroideus – a prevalência na raça branca é superior, atingindo cerca de 14%, enquanto na raça negra se situa em torno de 5% (Pearce et al, 2003). A prevalência no sexo feminino é 8 a 9 vezes superior à do sexo masculino e a prevalência aumenta com a idade, sendo que 25% das mulheres com mais de 60 anos possuem anticorpos anti-tiroideus (Melo, 2006). Mesmo que a maioria das pessoas com anticorpos anti-tiroideus detetáveis tenha uma função glandular normal (Pearce et al, 2003), as TAI, incluindo a TH, a DG e a tiroidite pós-parto, constituem talvez as doenças autoimunes mais prevalentes, com uma prevalência estimada em cerca de 5% da população em geral (Kivity et al, 2011).

No que toca à etiopatogenia, sabe-se que os sinais inflamatórios resultantes do dano ou necrose das células tiroideias, que por sua vez poderão resultar de infeções bacterianas ou virusais, do excesso de iodo ou de alterações do microambiente local, provocam um aumento do número de CAAs *profissionais* na tiroide (Melo, 2006). Estas células promovem a ativação de células T *helper* específicas para antigénios tiroideus, levando a uma alteração dos normais mecanismos de tolerância imunológica (Melo, 2006).

Os próprios tirócitos assumem um papel fulcral na progressão do processo autoimune, passando a expressar várias moléculas como HLA classe I e II que lhes permitem apresentar diretamente antigénios aos linfócitos T CD8 citotóxicos e também ICAM-1, LFA-3, TNF, IL-1 e CD40 que promovem a estimulação e citotoxicidade linfocitária (Melo, 2006). Um exemplo do papel dos tirócitos está patente na interação do recetor Fas1 nestas células com o Fas nos linfócitos T que pode levar à apoptose das células T, mecanismo de grande

importância na DG e que poderá explicar a escassez de linfócitos na tiroide destes doentes (Pearce et al, 2003).

O mecanismo para a destruição autoimune da tiroide provavelmente envolve ambas as imunidades celular e humoral, daí que a infiltração da glândula por um número semelhante de linfócitos B e T seja uma característica histológica frequente em vários tipos de tiroidites autoimunes (Pearce et al, 2003). Contudo, na TH, também designada tiroidite linfocítica crónica ou autoimune crónica, há um predomínio da polarização Th1, enquanto na DG predominam as respostas Th2 (Melo, 2006).

Na TH o predomínio Th1 leva à dominância dos mecanismos de imunidade celular, com grande infiltração linfocitária da tiroide e citotoxicidade mediada por linfócitos T CD8 citotóxicos e pelo complemento (Melo, 2006). A apoptose, sobretudo através de vias dependentes do recetor Fas ou CD95 constitui outro mecanismo importante na destruição autoimune da glândula - na TH, 20% a 30% das células epiteliais da tiroide apresentam alterações apoptóticas, enquanto na tiroide normal, estas só se verificam em cerca de 1% das células (Melo, 2006).

Já na DG, a polarização Th2 é dominante, levando ao predomínio dos mecanismos de imunidade humoral, com produção de anticorpos estimuladores dos recetores da TSH (TRAbs) e escassa infiltração linfocitária (Melo, 2006).

A TH é a causa mais frequente de bócio e hipotiroidismo nas regiões onde o aporte de iodo é suficiente. Cerca de 95% dos casos ocorrem no sexo feminino, sendo o pico de incidência da doença entre os 30 e os 50 anos (Devdhar et al, 2007). Histologicamente, observa-se um padrão de infiltração linfocítica difusa constituída por células B e T, que se podem agregar e formar folículos linfoides com centros germinativos e nas fases mais avançadas pode estar presente fibrose de extensão variável (Melo, 2006). A maioria dos doentes tem positividade para anticorpos contra vários componentes da tiroide: tiroide

peroxidase (TPO), tiroglobulina (Tg) e anticorpos bloqueadores do recetor da TSH (Devdhar et al, 2007). Os anticorpos anti-TPO são fortemente positivos em cerca de 90% dos casos, constituindo o marcador da doença. São os anticorpos que mais se relacionam com a disfunção clínica da tiroide, estando associados à inflamação linfocítica e à lesão glandular (Pearce et al, 2003). Fixam e ativam o complemento, levando à libertação de citocinas, prostaglandinas e espécies reativas de oxigénio que promovem a lesão sub-letal das células (Melo, 2006), embora haja poucas evidências de que este efeito tóxico constitua um mecanismo destrutivo primário (Pearce et al, 2003). Os anticorpos anti-Tg estão presentes em 20% a 50% dos doentes e o seu papel é menos claro (Pearce et al, 2003).

A DG é a causa mais frequente de hipertiroidismo, sendo responsável por 60 a 80% dos casos. É 5 a 10 vezes mais prevalente no sexo feminino e com incidência máxima entre os 20 e os 40 anos (Chen RH et al, 2007). Os TRAbs ligam-se a uma sequência de aminoácidos na região terminal-NH₂ da porção extracelular do recetor (Melo, 2006) e não só deslocam a TSH como também possuem atividade estimulante da tiroide, uma vez que ativam a adenil ciclase, iniciando uma cadeia de reações que levam ao crescimento anormal da glândula e à hipersecreção de hormonas tiroideias (Chen RH et al, 2007).

Embora a literatura existente sobre a relação da vitamina D com as TAI seja bastante mais escassa do que a que existe sobre a vitamina D com a DM1, dois estudos em modelos animais apontam para o papel desta vitamina na etiopatogenia das TAI. No estudo de Chen e colaboradores (2002), a suplementação com vitamina D em conjunto com a ciclosporina, preveniu eficazmente a indução de tiroidite autoimune experimental. Já noutro estudo, a deficiência de vitamina D em ratos BALB/c levou ao desenvolvimento de hipertiroidismo persistente (Misharin et al, 2009).

Até hoje, muito poucos estudos analisaram o impacto da deficiência da vitamina D na incidência das TAI em humanos e os estudos existentes obtiveram resultados discordantes. A

presença de uma alta prevalência de TAI na população indiana (a prevalência nas crianças situa-se entre os 9% e os 13%) e também de alta prevalência de hipovitaminose D ofereceu uma boa oportunidade para o estudo da associação entre estes dois fatores (Goswami et al, 2009). Neste estudo, 85% dos 642 participantes apresentavam concentrações séricas de 25(OH)D₃ inferiores ou iguais a 25nmol/L e os autores reportaram a inexistência de alterações nos níveis de expressão do VDR, apontando assim para a ausência desta via de adaptação nos humanos face à deficiência/insuficiência de vitamina D. Embora Goswami e colaboradores tenham encontrado uma associação inversa significativa entre os níveis séricos de 25(OH)D₃ e os níveis de anticorpos anti-TPO, esta associação revelou-se fraca, pois apenas 0,6% da variação dos títulos de anticorpos podia ser atribuída aos níveis de 25(OH)D₃. No entanto, os autores admitiram que a hipovitaminose na população estudada poderia ter constituído uma limitação, impedindo que fosse determinado um hipotético papel protetor de níveis mais elevados de 25(OH)D₃ nas TAI.

Já num estudo mais recente que avaliou os níveis séricos de 25(OH)D₃ em 50 doentes com TAI, 42 doentes com patologia tiroideia não autoimune e 98 indivíduos saudáveis, a prevalência de deficiência de vitamina D (definida neste estudo como níveis abaixo de 10ng/mL) era significativamente maior nos doentes com TAI relativamente aos indivíduos saudáveis (72% versus 30,6%) e também nos doentes com TH em relação aos doentes com patologia não autoimune (79% versus 52%) (Kivity et al, 2011). Esta diferença não foi significativa entre os doentes com DG e os doentes com patologia não autoimune (64% versus 52%). Neste estudo, a deficiência de vitamina D também se correlacionou com a presença de anticorpos anti-tiroideus e com a disfunção tiroideia. Nos doentes com TAI, a disfunção tiroideia foi documentada em 53% dos doentes com baixos níveis de vitamina D, sendo de apenas 22% naqueles que apresentavam níveis de 25(OH)D₃ acima de 10ng/mL. Também os níveis de TSH tenderam a apresentar uma relação direta com os níveis de vitamina D mas

apenas nos doentes com TAI, não se verificando esta relação no grupo de doentes com patologias não autoimunes. Já os níveis das hormonas tiroideias T3 e T4 não mostraram qualquer associação com os níveis de vitamina D em qualquer dos grupos estudados.

É possível, contudo, apontar algumas limitações deste estudo, nomeadamente a sua amostra reduzida, a heterogeneidade da população estudada e a ausência de informação sobre doenças concomitantes, comportamentos nutricionais e sociais, como por exemplo o tempo dispendido no exterior (Kivity et al, 2011).

Tal como outras teorias de causalidade reversa propostas para explicar os baixos níveis de vitamina D noutras doenças autoimunes – a malabsorção na doença inflamatória intestinal e na esclerose sistémica; a evicção solar devido ao envolvimento cutâneo ou fotossensibilidade no lúpus eritematoso sistémico ou na dermatomiosite; a redução das atividades no exterior devido à incapacidade provocada pela artrite reumatoide ou pela esclerose múltipla; o tratamento com corticosteroides – também nas tiroidites autoimunes, onde nenhum destes mecanismos é muito comum, é possível pensar que o metabolismo ósseo acelerado nos doentes com hipertiroidismo leva à elevação da calcémia, com consequente retrocontrolo negativo nos níveis de PTH e na síntese de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Kivity et al, 2011).

No entanto, o estudo de Kivity e colaboradores (2011) demonstrou uma ausência de associação entre o hipertiroidismo e os baixos níveis de vitamina D, deixando em aberto a possibilidade de a deficiência vitamina D desempenhar um papel primário na patogénese das TAI.

CONCLUSÃO

Apesar do grande número de estudos *in vitro* e em modelos animais que comprovam o papel imunomodulador da vitamina D e a sua participação em processos autoimunes, não existem evidências suficientes em humanos que permitam estabelecer com firmeza que o consumo desta vitamina esteja associado a uma diminuição do risco de DM1 e TAI.

Embora inúmeros estudos epidemiológicos demonstrem níveis mais baixos de vitamina D em doentes com estas endocrinopatias, tal não é suficiente para estabelecer uma relação de causalidade, tendo de ser considerada a hipótese de se tratar de um fenómeno de causalidade reversa.

São necessários, portanto, estudos aleatorizados controlados duplamente cegos, com longos períodos de seguimento e amostras significativas, que investiguem a relação de causalidade e, caso esta seja encontrada, a formulação, doses, duração e períodos de suplementação mais adequados.

A determinação da formulação e das doses ideais poderá constituir um dos maiores desafios, dado que os níveis ótimos de 25(OH)D₃ para todos os sistemas orgânicos permanecem desconhecidos e poderão variar consoante as diferentes funções biológicas. Por outro lado, o risco de hipercalcémia não pode ser esquecido, tornando necessário o desenvolvimento de análogos não hipercalcemiantes que preservem as ações imunomoduladoras da vitamina D mas que possam ser utilizados com segurança na espécie humana.

Quando se adaptam terapêuticas de sucesso dos modelos animais para os humanos, é importante ter em conta vários fatores de confundimento, como o sexo, a idade, o estilo de vida e até o genótipo. Os efeitos da suplementação com vitamina D podem ser afetados pelos polimorfismos do gene VDR e desta forma o seu conhecimento permitiria selecionar

indivíduos nos quais a suplementação pudesse ser usada com mais eficácia na prevenção destas doenças.

Neste contexto, e tendo em conta os resultados desanimadores da administração da vitamina D na terapêutica da DM1, a suplementação tendo em vista as suas ações não-clássicas não é atualmente recomendada.

Todas estas observações sugerem que, apesar dos grandes avanços científicos que nos últimos anos permitiram inaugurar uma nova era da vitamina D, a nossa compreensão das suas ações não clássicas está longe de estar completa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Prof.^a Doutora Leonor Gomes, por toda a ajuda que deu na elaboração deste trabalho e pela sua constante simpatia e disponibilidade.

Agradeço à Prof.^a Doutora Manuela Carvalheiro por ter aceitado com prontidão a minha proposta para a realização da tese na área de Endocrinologia e por me ter ajudado a encontrar este tema, que vai ao encontro de uma das minhas áreas de interesse, a Imunologia.

Dirijo também um agradecimento à Secretária D. Paula que sempre me recebeu com simpatia no Serviço e que tratou eficazmente de todos os aspetos “burocráticos” relacionados com a tese.

Agradeço ao Prof. Doutor António Segorbe Luís pelo esclarecimento de pequenas dúvidas relacionadas com Imunologia.

Agradeço também ao Serviço da Biblioteca dos Hospitais da Universidade de Coimbra, em especial à Dra. Helena Donato pela ajuda prestada na elaboração da secção Materiais e Métodos.

Deixo um profundo agradecimento à minha família, em especial à minha irmã Inês pela sua amizade e alegria inspiradoras e ao meu primo Pedro que me ajudou a “materializar” as figuras que idealizei e que graças a ele podem estar presentes neste trabalho.

Por fim, agradeço aos meus amigos, em especial à Tânia e ao David, meus frequentes portos de abrigo.

REFERÊNCIAS

- Adams JS, Ren S, Liu PT (2009) Vitamin d-directed rheostatic regulation of monocyte antibacterial responses. *J Immunol* 182:4289.
- Adorini L, Penna G (2008) Control of autoimmune diseases by the vitamin D endocrine system. *Nat Clin Pract Rheumatol* 4(8):404-412.
- Adorini L, Penna G (2009) Dendritic cell tolerogenicity: a key mechanism in immunomodulation by vitamin D receptor agonists. *Hum Immunol* 70:345-352.
- Annunziato F, Romagnani S (2009) Heterogeneity of human effector CD4+ T cells. *Arthr Res Ther.* 11(6):257.
- Arnson Y, Amital H, Shoenfeld Y (2007) Vitamin D and autoimmunity: new aetiological and therapeutic considerations. *Ann Rheum Dis* 66:1137-1142.
- Ban Y, Taniyama M, Ban Y (2000) Vitamin D receptor gene polymorphism is associated with Graves' disease in the Japanese population. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 4639–4643.
- Ban Y, Taniyama M. (2001) Vitamin D receptor gene polymorphisms in Hashimoto's thyroiditis. *Thyroid* 11:607–608.
- Bansal AS, Henriquez F, Sumar N, et al. (2011) T helper cell subsets in arthritis and the benefits of immunomodulation by 1,25(OH)₂vitamin D. *Rheumatol Int* 11:2076-2077.
- Bener A, Alsaied A, Al-Ali M, et al. (2008) Impact of lifestyle and dietary habits on hypovitaminosis D in type 1 diabetes mellitus and healthy children from Qatar, a sun-rich country. *Ann Nutr Metab* 53(3-4):215-22.
- Bierschenk L, Alexander J, Wasserfall C (2009) Vitamin D Levels in Subjects With and Without Type 1 Diabetes Residing in a Solar Rich Environment. *Diabetes Care* 32:1977–1979.
- Bizarri C, Pitocco D, Napoli N, et al. (2010) No Protective Effect of Calcitriol on β -Cell Function in Recent-Onset Type 1 Diabetes. *Diabetes Care* 33:1962–1963.
- Boonstra A, Barrat FJ, Crain C, et al. (2001) 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ has a direct effect on naïve CD4(+) T cells to enhance the development of Th2 cells. *J Immunol* 167:4974.
- Boraska V, Veselin E, Zeggini E, et al. (2008) Family-based analysis of vitamin D receptor gene polymorphisms and type 1 diabetes in the population of South Croatia. *J Hum Genet* 53:210–214.
- Borges MC, Martini L, Rogero M (2011) Current perspectives on vitamin D, immune system, and chronic diseases. *Nutrition* 27:399-404.
- Borkar VV, Devidayal, Verma S, et al. (2010) Low levels of vitamin D in North Indian children with newly diagnosed type 1 diabetes. *Pediatr Diabetes*: 11: 345–350.

- Brekke HK, Ludvigsson J (2007) Vitamin D supplementation and diabetes-related autoimmunity in the ABIS study. *Pediatr Diabetes* 8(1):11-4.
- Canning MO, Grotenhuis K, Wit H, et al. (2001) 1- α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ (1,25(OH)₂D₃) hampers the maturation of fully active immature dendritic cells from monocytes. *Eur J Endocrinol* 145:351-357.
- Cantorna MT, Mahon BD (2004) Mounting Evidence for Vitamin D as an Environmental Factor Affecting Autoimmune Disease Prevalence. *Exp Biol Med* 229:1136-1142.
- Casteels K, Waer M, Bouillon R, et al. (1998) 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ restores sensitivity to cyclophosphamide-induced apoptosis in non-obese diabetic (NOD) mice and protects against diabetes. *Clin Exp Immunol* 112(2):181-7.
- Chang JH, Cha HR, Lee DS, et al. (2010) 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ Inhibits the Differentiation and Migration of TH17 Cells to Protect against Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *PLoS ONE* 5(9): e12925.
- Chang TJ, Lei HH, Yeh JI, et al. (2000) Vitamin D receptor gene polymorphism influences susceptibility to type 1 diabetes mellitus in the Taiwanese population. *Clin Endocrinol* 52:575-580.
- Chen RH, Chang CT, Chen HY et al. (2007) Association Between Vitamin-D Receptor Gene FokI Polymorphism and Graves' Disease Among Taiwanese Chinese. *J Clin Lab Anal* 21:173–177.
- Chen S, Sims GP, Chen XX, et al. (2007) Modulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on human B cell differentiation. *J Immunol* 179:1634.
- Chen W, Lin H, Wang M. (2002) Immune intervention effects on the induction of experimental autoimmune thyroiditis. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 22: 343-345,354.
- Collins JE, Heward JM, Nithiyananthan R et al. (2004) Lack of association of the vitamin D receptor gene with Graves' disease in UK Caucasians. *Clin Endocrinol* 60: 618-624.
- Devdhar M, Ousman YH, Burman KD (2007) Hypothyroidism. *Endocrinol Metab Clin N Am* 36: 595–615.
- Dickie LJ, Church LD, Coulthard LR, et al. (2010) Vitamin D₃ down-regulates intracellular Toll-like receptor 9 expression and Toll-like receptor 9-induced IL-6 production in human monocytes. *Rheumatol Int* 49:1466-1471.
- Dong X, Lutz W, Schroeder TM, et al. (2005) Regulation of relB in dendritic cells by means of modulated association of vitamin D receptor and histone deacetylase 3 with the promoter. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:16007-16012.
- Edfeldt K, Liu PT, Chun R, et al. (2010) T-cell cytokines differentially control human monocyte antimicrobial responses by regulating vitamin D metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107: 22593–22598.

- Etten EV, Dardenne O, Gysemans LO, et al. (2004) 1,25-Dihydroxyvitamin D3 alters the profile of bone marrow-derived dendritic cells of NOD mice. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1037:186-192.
- Fronczak CM, Baron AE, Chase HP, et al. (2003) In utero dietary exposures and risk of islet autoimmunity in children. *Diabetes Care* 26(12):3237-42.
- Garcia D, Angel B, Carrasco E, et al. (2007) VDR polymorphisms influence the immune response in type 1 diabetic children from Santiago, Chile. *Diabetes Res Clin Pract* 77:134.
- Giulietti A, Gysemans C, Stoffels K, et al. (2004) Vitamin D deficiency in early life accelerates Type 1 diabetes in non-obese diabetic mice. *Diabetologia* 47:451-462.
- Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA (2002) *Kuby Immunology*. 4thed. USA: WH Freeman and Company, pp 10-11.
- Gombart AF, Borregaard N, Koeffler HP (2005) 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 J* 19:1067.
- Goswami R, Marwaha RK, Gupta N, et al. (2009) Prevalence of vitamin D deficiency and its relationship with autoimmunity in Asian Indians: a community-based survey. *Br J Nutr* 102:382-386.
- Grant WB (2011) Is the Institute of Medicine report on calcium and vitamin D good science? *Biol Res Nurs* 13: 117-119.
- Greer RM, Rogers MA, Bowling FG, et al. (2007) Australian children and adolescents with type 1 diabetes have low vitamin D levels. *Med J Aust* 187(1):59-60.
- Gregori S, Giarratana N, Smiroldo S, et al. (2002) 1,25 Dihydroxyvitamin D3 Analog Enhances Regulatory T-Cells and Arrests Autoimmune Diabetes in NOD Mice. *Diabetes* 51:1367-1374.
- Griffin M, Lutz WH, Phan VA, et al. (2000) Potent inhibition of dendritic cell differentiation and maturation by vitamin D analogs. *Biochem Biophys Res Commun* 270:701-708.
- Guo SW, Magnuson VL, Schiller JJ, et al. (2006) Meta-analysis of vitamin D receptor polymorphisms and type 1 diabetes: a HuGE review of genetic association studies. *Am J Epidemiol* 164:711.
- Gysemans C, Van Etten E, Overbergh L, et al. (2002) Treatment of autoimmune diabetes recurrence in non-obese diabetic mice by mouse interferon-beta in combination with an analogue of 1alpha,25dihydroxyvitamin-D3. *Clin Exp Immunol* 128(2):213-220.
- Heaney RP, Dowell MS, Hale CA, et al. (2003) Calcium absorption varies within the reference range for serum 25-hydroxyvitamin D. *J Am Coll Nutr* 22:142-146.

- Hewison M (2010) Vitamin D and the immune system: new perspectives on an old theme. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 39(2): 365–379.
- Hewison M (2012) An update on vitamin D and human immunity. *Clin Endocrinol* 76:315-325.
- Hewison M, Freeman L, Hughes S, et al. (2003) Differential Regulation of Vitamin D Receptor and Its Ligand in Human Monocyte-Derived Dendritic Cells. *J Immunol* 170:5382-5390.
- Holick MF (2005) Variations in 25-hydroxyvitamin D assay results (letter). *J Clin Endocrinol Metab* 90:210.
- Holick MF, Binkley NC, Heike A, et al. (2011) Evaluation, Treatment, and Prevention of Vitamin D Deficiency: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 96(7): 1911–1930.
- Holick MF, Chen TC (2008) Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. *Am J Clin Nutr* 87:1080S–1086S.
- Holick, MF (2009) Vitamin D Status: Measurement, Interpretation, and Clinical Application. *Ann Epidemiol* 19:73–78.
- Hyponen E, Laara E, Reunanen A, et al. (2001) Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes: a birth-cohort study. *Lancet* 358(9292):1500-1503.
- Joshi S, Pantalena LC, Liu XK, et al. (2011) 1,25-dihydroxyvitamin D(3) ameliorates Th17 autoimmunity via transcriptional modulation of interleukin-17A. *Mol Cell Biol* 31: 3653-3669.
- Kahn HS, Morgan TM, Case LD, et al. (2009) Association of type 1 diabetes with month of birth among U.S. youth: the SEARCH for Diabetes in Youth Study. *Diabetes Care* 32(11):2010-5.
- Kamen DL, Tangpric V (2010) Vitamin D and molecular actions on the immune system: modulation of innate and autoimmunity. *J Mol Med* 88:441–450.
- Kawai T, Akira S (2010) The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol* 11: 373–384.
- Kivity S, Agmon-Levin N, Zisappi M et al (2011) Vitamin D and autoimmune thyroid diseases. *Cell Mol Immunol* 8: 243-247.
- Koutkia P, Chen TC, Holick MF (2001) Vitamin D intoxication associated with an over-the-counter supplement. *N Engl J Med* 345:66-67.
- Krieger MA, Manson JE, Costenbader KH (2011) Does Vitamin D Affect Risk of Developing Autoimmune Disease?: A Systematic Review. *Semin Arthritis Rheum* 40:512-531
- Krutzik SR, Hewison M, Liu PT, et al. (2008) IL-15 links TLR2/1-induced macrophage differentiation to the vitamin D-dependent antimicrobial pathway. *J Immunol* 181:7115.

- Lagishetty V, Liu N, Hewison M (2011) Vitamin D metabolism and innate immunity. *Mol Cell Endocrinol* 347:97-105.
- Lemos MC, Fagulha A, Coutinho E, et al. (2008) Lack of association of vitamin D receptor gene polymorphisms with susceptibility to type 1 diabetes mellitus in the Portuguese population. *Hum Immunol* 69:134–138.
- Li H, Rostami A (2010) IL-9 Basic biology, signaling pathways in CD4+ T cells and implications for autoimmunity. *J Neuroimmune Pharmacol* 5(2):198-209.
- Li X, Liao L, Yan X, et al. (2009) Protective effects of 1- α -hydroxyvitamin D3 on residual β -cell function in patients with adult-onset latent autoimmune diabetes (LADA). *Diabetes Metab Res Rev* 25: 411–416.
- Lin WY, Wan L, Tsai CH et al. (2006) Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms Are Associated With Risk Of Hashimoto’s Thyroiditis in Chinese Patients in Taiwan. *J Clin Lab Anal* 20:109–112.
- Littorin B, Blom P, Schölin A, et al. (2006) 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* 49:2847–2852.
- Liu N, Nguyen L, Chun R, et al. (2008) Altered endocrine and autocrine metabolism of vitamin D in a mouse model of gastrointestinal inflammation. *Endocrinology* 149:4799.
- Liu PT, Stenger S, Li H, et al. (2006) Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science* 311: 1770–1773.
- Louten J, Boniface K, Malefyt R (2009) Development and function of Th17 cells in health and disease. *J Allergy Clin Immunol* 123(5):1004-1011.
- Maalej A, Petit-Teixeira E, Chabchoub G (2008) Lack of Association of VDR Gene Polymorphisms with Thyroid Autoimmune Disorders: Familial and Case/Control Studies. *Clin Immunol* 28:21–25.
- Marjamaki L, Niinisto S, Kenward MG, et al. (2010) Maternal intake of vitamin D during pregnancy and risk of advanced beta cell autoimmunity and type 1 diabetes in offspring. *Diabetologia* 53: 1599-1607.
- Martí G, Audí L, Esteban C, et al. (2004) Asociación de los polimorfismos del gen del receptor de la vitamina D con la diabetes mellitus tipo 1 en dos poblaciones españolas. *Med Clin (Barc)* 123(8):286-90.
- Mathieu C, Van Etten E, Gysemans C, et al. (2001) In vitro and in vivo analyses of the immune system of vitamin D receptor knockout mice. *J Bone Miner Res* 16(11):2057-65.
- McDermott MF, Ramachandran A, Ogunkolade BW, et al. (1997) Allelic variation in the vitamin D receptor influences susceptibility to IDDM in Indian Asians. *Diabetologia* 40:971.

- Meehan TF, DeLuca HF (2002) CD8(+) T cells are not necessary for 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D(3) to suppress experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:5557.
- Melo, M (2006) Tiroidites autoimunes. *Acta Med Port* 19:387-394.
- Miettinen ME, Reinert L, Kinnunen L (2012) Serum 25-hydroxyvitamin D level during early pregnancy and type 1 diabetes risk in the offspring. *Diabetologia* 55:1291–12943.
- Misharin A, Hewison M, Chen C, et al. (2009) Vitamin D deficiency modulates Graves' hyperthyroidism induced in BALB/c mice by thyrotropin receptor immunization. *Endocrinology* 150: 1051-1060.
- Mohr SB, Garland FC, Garland CF, et al. (2010) Is There a Role of Vitamin D Deficiency in Type 1 Diabetes of Children? *Am J Prev Med* 39(2):189-190.
- Mory DB, Rocco ER, Miranda WL, et al. (2009) Prevalence of vitamin D receptor gene polymorphisms FokI and BsmI in Brazilian individuals with type 1 diabetes and their relation to β -cell autoimmunity and to remaining β -cell function. *Hum Immunol* 70:447-451.
- Motohashi Y, Yamada S, Yanagawa T, et al. (2003) Vitamin D receptor gene polymorphism affects onset pattern of type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 88:3137.
- Nejentsev S, Cooper JD, Godfrey L, et al. (2004) Analysis of the vitamin D receptor gene sequence variants in type 1 diabetes. *Diabetes* 53:2709.
- O'Garra A, Barrat FJ (2003) In vitro generation of IL-10-producing regulatory CD4+ T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by Th1- and Th2-inducing cytokines. *Immunol Lett* 85:135.
- O'Kelly J, Hisatake J, Hisatake Y, et al. (2002) Normal myelopoiesis but abnormal T lymphocyte responses in vitamin D receptor knockout mice. *J Clin Invest* 109:1091.
- Overbergh L, Decallonne B, Waer M, et al. (2000) 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 induces an autoantigen-specific T-helper 1/T-helper 2 immune shift in NOD mice immunized with GAD65. *Diabetes* 49:1301.
- Palmer MT, Lee YK, Maynard CL, et al. (2011) Lineage-specific effects of 1,25(OH)2D3 on the development of effector CD4 T cells. *J Biol Chem* 286(2):997-1004.
- Pani MA, Knapp M, Donner H, et al. (2000) Vitamin D receptor allele combinations influence genetic susceptibility to type 1 diabetes in Germans. *Diabetes* 49:504.
- Panierakis C, Goulielmos G, Mamoulakis D, et al. (2009) Vitamin D receptor gene polymorphisms and susceptibility to type 1 diabetes in Crete, Greece. *Clin Immunol* 133: 276–281
- Pearce EN, Farwell AP, Braverman LE (2003) Thyroiditis. *N Engl J Med* 348(26):2646-55.

- Penna G, Roncari A, Amuchastegui S, et al. (2005) Expression of the inhibitory receptor ILT3 on dendritic cells is dispensable for induction of CD4⁺Foxp3⁺regulatory T cells by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Blood* 106: 3490-3497.
- Pitocco D, Crin`o A, Di Stasio E, et al. (2006) IMDIAB Group. The effects of calcitriol and nicotinamide on residual pancreatic β -cell function in patients with recent-onset type 1 diabetes (IMDIAB XI). *Diabet Med* 23(8): 920–923.
- Ponsonby A-L, Pezic A, Morley R (2008) Variation in Associations between Allelic Variants of the Vitamin D Receptor Gene and Onset of Type 1 Diabetes Mellitus by Ambient Winter Ultraviolet Radiation Levels: A Meta-Regression Analysis. *Am J Epidemiol* 168:358–365.
- Ramos-Lopez E, Jansen T, Ivaskevicius V, et al. (2006) Protection from type 1 diabetes by vitamin D receptor haplotypes. *Ann NY Acad Sci* 1079:327.
- Ross AC, Manson JE, Abrams SA, et al. (2011) The 2011 report on dietary reference intakes for calcium and vitamin D from the Institute of Medicine: what clinicians need to know. *J Clin Endocrinol Metab* 96: 53-58.
- Shimada A, Kanazawa Y, Motohashi Y, et al. (2008) Japanese Study Group on Type 1 Diabetes Genetics, Evidence for association between vitamin D receptor BsmI polymorphism and type 1 diabetes in Japanese. *J Autoimmun* 30: 207–211.
- Sigmundsdottir H (2007) DCs metabolize sunlight-induced vitamin D₃ to ‘program’ T cell attraction to the epidermal chemokine CCL27. *Nat Immunol* 8:285-293.
- Simpson M, Brady H, Yin X, et al (2011) No association of vitamin D intake or 25-hydroxyvitamin D levels in childhood with risk of islet autoimmunity and type 1 diabetes: the Diabetes Autoimmunity Study in the Young (DAISY). *Diabetologia* 54(11):2779–2788.
- Staeva-Vieira TP, Freedman LP (2002) 1,25-dihydroxyvitamin D₃ inhibits IFN- γ and IL-4 levels during in vitro polarization of primary murine CD4⁺ T cells. *J Immunol* 168:1181-1189.
- Stene LC, Joner G (2003) Use of cod liver oil during the first year of life is associated with lower risk of childhood-onset type 1 diabetes: a large, population-based, case-control study. *Am J Clin Nutr* 78(6):1128-34.
- Stoffels K, Overbergh L, Giuliatti A, et al. (2006) Immune regulation of 25-hydroxyvitamin-d(3)-1 α phahydroxylase in human monocytes. *J Bone Miner Res* 21:37.
- Takiishi T, Gysemans C, Bouillon R et al. (2010) Vitamin D and Diabetes. *Endocrinol Metab Clin N Am* 39:419-446.
- Turpeinen H, Hermann R, Vaara S, et al. (2003) Vitamin D receptor polymorphisms: no association with type 1 diabetes in the Finnish population. *Eur J Endocrinol* 149:591.

- Walter M, Kaupper T, Adler K, et al. (2010) No Effect of the 1,25-Dihydroxyvitamin D3 on β -Cell Residual Function and Insulin Requirement in Adults With New-Onset Type 1 Diabetes. *Diabetes Care* 33:1443–1448.
- Wang T, Nestel F, Bourdeau V, et al. (2004) Cutting Edge: 1,25-Dihydroxyvitamin D3 is a Direct Inducer of Antimicrobial Peptide Gene Expression. *J Immunol* 173: 2909-2912.
- White J (2012) Vitamin D metabolism and signaling in the immune system. *Rev Endocr Metab Disord* 13:21–29.
- Willheim M, Thien R, Schratlbauer K, et al. (1999) Regulatory effects of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 on the cytokine production of human peripheral blood lymphocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 84:3739.
- Zeitz U, Weber K, Soegiarto DW, et al. (2003) Impaired insulin secretor capacity in mice lacking a functional vitamin D receptor. *FASEB J* 17(3):509-11.
- Zhang HL, Wu J (2010) Role of vitamin D in immune responses and autoimmune diseases, with emphasis on its role in multiple sclerosis. *Neurosci Bull* 26(6):445-454.
- Zipitis CS, Akobeng AK (2008) Vitamin D supplementation in early childhood and risk of type 1 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Arch Dis Child* 93:512-517.

ANEXO (NORMA EDITORIAL – *ENDOCRINE REVIEWS*)

Instructions to Authors for *ENDOCRINE REVIEWS*

- **General Format**
- **Title Page**
- **Abstract:** Briefly describe in complete sentences the purpose of the investigation, the methods used, the results obtained, and the principal conclusions. Do not refer to the text or references. Write the abstract with a general audience in mind.
- **Outline**
- **Introduction:** The article should begin with a brief introductory statement that places the work to follow in historical perspective and explains its intent and significance.
- **Body of Manuscript:** The organization of this privileged section of the review is left to the authors. However, the organization should be logical and readily comprehended by the reader. As indicated above, an outline that indicates this organization is desirable. Authors should include a brief section describing the search strategies used to obtain information for the review.
- **Acknowledgments**
- **References**
- **Tables**
- **Figures and Legends**
- **Supplemental Data**
- **Units of Measure**
- **Standard Abbreviations**

Informação acedida através do site <http://edrv.endojournals.org/site/author/itoa.xhtml>