



FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA – TRABALHO FINAL

ANDRÉ ROSAS PEREIRA

VITAMINA D: MECANISMOS PLEIOTRÓPICOS NA HOMEOSTASE

ARTIGO DE REVISÃO

ÁREA CIENTÍFICA DE FISIOPATOLOGIA

Trabalho realizado sob a orientação de:
PROFESSORA DOUTORA ANABELA MOTA PINTO
PROFESSORA DOUTORA ANA TODO BOM

ABRIL/2018

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA – TRABALHO FINAL

***VITAMINA D: MECANISMOS PLEIOTRÓPICOS NA
HOMEOSTASE***

ANDRÉ ROSAS PEREIRA¹

PROFESSORA DOUTORA ANABELA MOTA PINTO²

PROFESSORA DOUTORA ANA TODO BOM³

^{1,2,3}Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal

¹androsaspereira@hotmail.com

²apinto@uc.pt

³atodobom@fmed.uc.pt

ABRIL/2018

Sumário

Resumo	3
Palavras-chave:	4
Abstract	5
Keywords:	6
Introdução	7
Materiais e Métodos	9
Vitamina D	10
i) Mecanismos de ação	12
Regulação e homeostasia fosfo-cálcica	17
i) Absorção intestinal de cálcio mediada pela 1,25(OH) ₂ D	21
ii) Absorção intestinal de fosfato mediada pela 1,25(OH) ₂ D	22
iii) Reabsorção renal de cálcio mediada pela 1,25(OH) ₂ D	23
iv) Reabsorção renal de fosfato mediada pela 1,25(OH) ₂ D.....	25
Metabolismo ósseo	25
Vitamina D e o Sistema Imunitário	30
i) 1,25(OH) ₂ D na Imunidade Inata	33
ii) 1,25(OH) ₃ D na Imunidade Adaptativa.....	36
Discussão e Conclusão	43
Agradecimentos	47
Referências bibliográficas	48

Resumo

Introdução: A importante função que a vitamina D tem na regulação da homeostasia do cálcio e fosfato, está bem identificada e é considerada essencial para o metabolismo do osso, estabelecendo um equilíbrio entre a sua formação e reabsorção. No entanto, os efeitos da forma ativa desta hormona, 1,25-dihidroxitamina D ou calcitriol (1,25(OH)₂D), não se prendem exclusivamente com a homeostasia do cálcio e fosfato. A sua participação em mecanismos como angiogénese, proliferação e diferenciação celular, apoptose, regulação do sistema imunitário e inflamação levaram ao estudo da sua associação a patologias como cancro, doenças cardiovasculares, metabólicas e autoimunes. Este trabalho tem como objetivos rever e analisar com base na literatura o metabolismo, vias de sinalização e os efeitos pleiotrópicos da vitamina D, focando na homeostasia do cálcio e fosfato e na sua ação imunomoduladora.

Desenvolvimento: A vitamina D é uma pró-hormona, podendo ser obtida através da alimentação, mas sobretudo pela produção endógena, após irradiação da pele pela radiação solar. É convertida na sua forma ativa, 1,25-dihidroxitamina D (1,25(OH)₂D), ao nível do rim, atuando de forma endócrina na manutenção da homeostasia do cálcio e fosfato e ainda no metabolismo ósseo. No entanto inúmeras células, incluindo células do sistema imunitário, expressam a maquinaria enzimática necessária para a síntese local desta hormona, onde atua de forma autócrina e/ou parácrina. A 1,25(OH)₂D atua sobretudo através de um mecanismo genómico, contudo um mecanismo não-genómico e complexo já foi identificado, contribuindo para a variabilidade e pleiotropismo desta hormona. A sua ação no sistema imunitário é caracterizada por uma ação anti-inflamatória e imunossupressora. Estimula a imunidade inata, promovendo a libertação de peptídeos antimicrobianos. Ao nível da imunidade adaptativa, modula a atividade de várias células, sendo responsável por um desvio do fenótipo dos linfócitos T-helper (Th) favorecendo uma resposta mediada pelos linfócitos Th2, com

importantes implicações em modelos patológicos de doenças inflamatórias como Doença Inflamatória Intestinal, Artrite Reumatóide e outras.

Conclusões: Apesar dos vários estudos epidemiológicos, *in vitro* e *in vivo* que permitem reconhecer um papel imunomodulador e pleiotrópico da vitamina D, dúvidas ainda persistem. Muitos estudos clínicos evidenciam efeitos benéficos no controlo de patologias inflamatórias como Doença de Crohn, Esclerose Múltipla e outras. No entanto, os resultados nem sempre são concordantes, possivelmente devido à má definição de *outcomes* e conceitos não uniformizados, nomeadamente em relação ao doseamento da vitamina D e os níveis séricos considerados fisiológicos. É necessária uma melhor compreensão dos mecanismos de controlo e da interligação entre os dois tipos de resposta imunitária, e dos mecanismos fisiológicos em que a 1,25(OH)₂D participa.

Palavras-chave: vitamina D; calcitriol; recetores, calcitriol; elemento responsivo da vitamina D; sistema imunitário.

Abstract

Introduction: The important function that vitamin D has in calcium and phosphate homeostasis is well identified and is considered essential concerning bone metabolism, maintaining an equilibrium between bone formation and its reabsorption. However, the role of vitamin D's active form, 1,25-dihydroxyvitamin D or calcitriol (1,25(OH)₂D), is not exclusive of calcium and phosphate homeostasis. Its participation in mechanisms such as angiogenesis, cell proliferation and differentiation, apoptosis, immune system regulation and inflammation led to the study of its role in cancer, cardiovascular, metabolic and autoimmune diseases. However, despite the evidence that proves an association between vitamin D and important health benefits, its role in the different mechanisms in which it participates still raises questions, being a subject of current controversy. This work aims to review and analyze the literature concerning vitamin D's metabolism, signalling pathways and pleiotropic effects, focusing on calcium and phosphate homeostasis and its immunomodulating role.

Development: Vitamin D is a prohormone that can be obtained through diet but mostly through endogenous production, after ultraviolet irradiation of the skin. It is converted in its active form, 1,25(OH)₂D, in the kidney, later performing endocrinally in the maintenance of calcium and phosphate metabolism as well as bone metabolism. However, numerous cells, including immune cells, express the necessary enzymatic machinery for local production of this hormone, acting as an autocrine and/or paracrine factor. 1,25(OH)₂D acts mostly through a genomic mechanism, although a non-genomic and very complex mechanism has already been identified, contributing to the variability and pleiotropism of this hormone. In the immune system is characterized by an anti-inflammatory and immunosuppressive effect. It stimulates innate immunity promoting the release of antimicrobial peptides. In adaptive immunity, it modulates the activity of several cells, altering T-helper lymphocyte's phenotype, favoring Th2

lymphocyte's activity. This has important implications in pathological models of inflammatory diseases such as Inflammatory Bowel Disease, Rheumatoid Arthritis and others.

Conclusions: Despite the several epidemiological, in vitro and in vivo studies that allow to recognize vitamin D's immunomodulating and pleiotropic effects, doubts still persist. Several clinical trials showed benefits in controlling inflammatory diseases like Crohn's disease and Multiple Sclerosis. However, the results are not always consistent, possibly due to the lack of appropriate outcomes and poor defined or non-standardized concepts, such as vitamin D's status assessment and serum levels considered physiological. A better understanding of the controlling mechanisms and interaction between the two types of immune responses is necessary, as well as a better understanding of the physiological pathways in which 1,25(OH)₂D participates.

Keywords: vitamin d; calcitriol; receptors, calcitriol; vitamin d response element; immune system.

Introdução

A importante função que a vitamina D tem na regulação da homeostasia do cálcio e fosfato, está bem identificada e é considerada essencial para o metabolismo do osso, estabelecendo um equilíbrio entre a sua formação e reabsorção. Desta forma, tornou-se essencial a prevenção da deficiência desta vitamina, com o intuito de evitar o aparecimento de raquitismo nas crianças e osteomalácia nos adultos.

No entanto, dada a grande prevalência que a deficiência de vitamina D ainda tem a nível mundial, tem ressurgido o interesse em torno desta hormona, principalmente por se saber que os efeitos da forma ativa desta hormona, 1,25-dihidroxitamina D ou calcitriol (1,25(OH)₂D), não se prendem exclusivamente com a homeostasia do cálcio e fosfato.¹⁻⁸ Estes efeitos extra-ósseos descritos como “não clássicos” foram sugeridos pela primeira vez há cerca de 30 anos, quando se identificaram recetores para 1,25(OH)₂D em células de vários tecidos e sistemas não relacionados com a regulação da homeostasia fosfo-cálcica, incluindo células inflamatórias (linfócitos B e T, macrófagos e monócitos), sistema reprodutor (útero, testículos, próstata, placenta e glândulas mamárias), sistema endócrino (células pancreáticas, hipófise, tiróide e suprarrenal), sistema cardiovascular (células endoteliais, cardiomiócitos), entre outros.^{3,6,8} Desde então, o papel desta hormona tem sido associado a uma plétora de patologias, incluindo cancro (mama, próstata e cólon), doenças cardiovasculares, metabólicas, e algumas patologias autoimunes como Esclerose Múltipla, Doença Inflamatória Intestinal, Doença de Alzheimer, entre outras, tendo em conta sua participação a nível extra-ósseo em mecanismos como angiogénese, proliferação e diferenciação celular, apoptose, regulação do sistema imunitário e inflamação.^{1,2,4,5,7,8} Tornou-se, portanto, fulcral o estudo dos mecanismos e vias de sinalização em que esta hormona participa.

Os efeitos pleiotrópicos desta hormona levaram até alguns autores a designar a deficiência de vitamina D como um fator de risco universal para desenvolvimento de doenças

multifatoriais, como doenças metabólicas, inflamatórias, autoimunes, cardiovasculares e neoplasias.

Contudo, apesar das evidências existentes que associam a Vitamina D a importantes benefícios na saúde, ainda não existe consenso sobre os mecanismos através dos quais esta hormona desempenha funções extra-ósseas.^{1,4}

Este trabalho tem como objetivos rever e analisar, com base na literatura, o metabolismo, vias de sinalização e os efeitos pleiotrópicos da vitamina D, focando-se na ação “clássica” – a homeostasia do cálcio e fosfato – e, nos mecanismos de ação recentemente identificados, nomeadamente a sua ação imunomoduladora.

Materiais e Métodos

Para a revisão do tema “Vitamina D: mecanismos pleiotrópicos na homeostase” realizou-se a pesquisa de artigos na base de dados *PubMed* utilizando os termos *MeSH* “*vitamin d*”, “*calcitriol*”, “*receptors, calcitriol*”, “*vitamin d response element*” e “*immune system*” com filtros para artigos de revisão, revisões sistemáticas e ensaios controlados randomizados, em língua inglesa e/ou portuguesa, publicados entre 2012 e 2018. A pesquisa inicial englobou 136 artigos, tendo-se selecionado 70 artigos com base na pertinência do título e *abstract*. Após leitura integral desses artigos, 36 foram selecionados. Quando pertinente, foram consultadas referências bibliográficas dos artigos resultantes da pesquisa inicial.

Vitamina D

Vitamina D refere-se a um grupo de secoesteróides lipossolúveis derivados do colesterol.^{5,9} Até à data, mais de 50 metabolitos diferentes da Vitamina D com atividade biológica variável foram descritos. As duas formas major são a D3 (colecalfiferol) e D2 (ergocalciferol), distintas entre si pela sua estrutura e origem, no entanto metabolicamente idênticas.⁶ A vitamina D3 é a forma sintetizada pelos humanos, enquanto que a vitamina D2 é utilizada para fortificar alimentos, sendo obtida através das plantas e fungos.^{2,5,6} Ambas podem ser obtidas em pequenas quantidades através da dieta (por exemplo, óleo de fígado de bacalhau, gema de ovo, alguns peixes e cogumelos),^{2,5,6,10} ou em quantidades mais expressivas através de alimentos fortificados (laticínios, por exemplo) ou suplementos vitamínicos.^{5,6} A fonte dietética de vitamina D sofre variação inter e intra-populacional, sendo que em países ocidentais representa cerca de 10-20% da síntese total de vitamina D.⁵ No entanto a fonte predominante, responsável por cerca de 80% das necessidades diárias de vitamina D em humanos,¹¹ é a produção endógena através da exposição da pele à radiação solar (radiação ultravioleta B ou UV-B).^{2,5,6,10} Esta vai ser influenciada pela área de pele exposta,¹¹ duração da exposição e características físicas da pele, como espessura e pigmentação,⁶ visto que a melanina bloqueia a entrada da radiação UV-B na pele (à semelhança do uso de roupa e protetor solar),^{2,6} bem como da própria intensidade da radiação solar que, por sua vez, vai é influenciada pela estação do ano e latitude.^{2,6} Considerando que ambas as formas são metabolicamente equivalentes, doravante todas as alusões à vitamina D, ou aos seus metabolitos, englobarão as duas formas da mesma (D2 e D3).

A Vitamina D é uma pró-hormona, sendo convertida na sua forma hormonal ativa, 1,25(OH)2D,^{1-6,8,12,13} através de uma série de reações complexas que ocorrem em diferentes tecidos.¹ A primeira reação ocorre na pele, ao nível da epiderme, pela absorção da radiação UV-B (num comprimento de onda compreendido entre 280 e 320nm), convertendo 7-

dehidrocolesterol (7-DHC ou pró-vitamina D) em pré-vitamina D3.^{5,6,10,11,13} Por sua vez, a pré-vitamina D3, sofre um rearranjo, sensível à temperatura, em três ligações duplas, convertendo-se em vitamina D3 (coleciferol), um precursor inativo da forma ativa.^{2,5,6,9,10,12,13} De seguida, esta liga-se à proteína transportadora da vitamina D (VDBP – α -globulina que transporta não só a vitamina D como todos os seus metabolitos no soro),^{2,5,6,9} e é transportada até ao fígado.^{1-6,9,10,12} No fígado, sofre ação de uma 25-hidroxilase que transfere um grupo hidroxilo para a posição C-25, convertendo a vitamina D3 em 25-hidroxivitamina D3 (25(OH)D3 ou calcidiol ou calcifediol),^{2,5,6,8,10,12} o precursor imediato da forma ativa da vitamina D (1,25(OH)2D), e a forma circulante predominante com uma semivida prolongada^{2,4,10} – utilizado como um dos biomarcadores mais fidedignos para doseamento dos níveis de vitamina D.²

Apesar de muitas enzimas do citocromo P450 serem consideradas como possíveis responsáveis pela conversão da vitamina D3 em 25(OH)D3, nomeadamente CYP2R1, CYP27A1 e CYP2D25,^{2,5,6,12} crê-se que a CYP2R1 é a 25-hidroxilase chave neste processo,^{2,6,10,12} no entanto esta reação não é exclusivamente dependente desta enzima, existindo evidências que sugerem a presença de outras 25-hidroxilases, ainda não identificadas,^{2,6} cuja atividade pode influenciar os níveis locais de 25(OH)D3 em determinados tecidos ou mesmo os seus níveis circulantes.⁶

Após conversão hepática da vitamina D3 em 25(OH)D, esta é transportada (85% ligada à VDBP e 15% ligada à albumina)⁴ no sangue até ao rim, onde é filtrada pelo glomérulo.² Ao nível das células do túbulo contornado proximal, a VDBP interage com dois recetores transmembranares, a megalina e a cubulina,² que ao interagirem com a VDBP promovem o transporte da 25(OH)D para as células tubulares epiteliais, onde é convertida na sua forma ativa, 1,25(OH)2D, num processo dependente da ação da CYP27B1, uma 1α -hidroxilase.^{1,2,4-10,12} Esta forma funcional, hormonalmente ativa, é responsável pela maioria, ou mesmo pela totalidade dos efeitos atribuídos à vitamina D,² destacando-se o seu papel na homeostasia do cálcio e

fosfato (estimulando a sua absorção intestinal e reabsorção renal), *turnover* ósseo, proliferação e diferenciação celular e regulação da resposta imunitária.^{9,10}

Para além do rim, a placenta é também um local major de conversão de 25(OH)D em 1,25(OH)2D, particularmente relevante pelo seu papel imunomodulador.^{2,14}

Embora o rim seja a fonte principal de 1,25(OH)2D circulante,^{2,6} tem vindo a demonstrar-se que a 25(OH)D pode ainda ser convertida na sua forma ativa, localmente, ao nível de variados tecidos e células, como osso, placenta, próstata, pâncreas, queratinócitos, macrófagos, linfócitos T, células epiteliais do cólon, e algumas células cancerígenas (incluindo pulmão, próstata, pele, medula da suprarrenal e córtex cerebelar e cerebral), entre outros,^{2,5,6} visto que muitas destas células expressam a maquinaria enzimática necessária, nomeadamente a 1 α -hidroxilase CYP27B1, atuando nestas células de forma autócrina e/ou parácrina,^{1,2,5-7,12} não contribuindo significativamente para os níveis de 1,25(OH)2D circulante.⁵ Nestes locais os mecanismos de regulação ocorrem de forma distinta da que ocorre a nível renal, sendo específica de cada tipo de célula e/ou tecido, particularmente nas células do sistema imunitário. A grande variabilidade de locais em que a 1,25(OH)2D pode ser sintetizada e em que atua, juntamente com os mecanismos de regulação específicos desse mesmo local, explica em parte a grande variabilidade de efeitos a que a vitamina D tem sido associada. No entanto, o impacto funcional da atividade da CYP27B1 em locais além do rim e placenta, em condições fisiológicas, permanece ainda uma questão sobre debate.²

i) Mecanismos de ação

A 1,25(OH)2D atua essencialmente através de dois mecanismos: genómico e não-genómico, sendo que o predominante e mais bem descrito é o genómico.^{2,7,9} Este é mediado pelo VDR, um fator de transcrição,^{2,6,10} pertencente à família de recetores nucleares das hormonas esteróides, com grande afinidade e especificidade para a 1,25(OH)2D.^{2,6,10} A 1,25(OH)2D circulante (ligada à VDBP), entra na célula e liga-se ao VDR, induzindo uma

alteração conformacional que, após deslocação para o núcleo, permite o VDR heterodimerizar com o recetor retinóico-X (RXR) e interagir com moléculas co-reguladoras.^{2,6-8,10} Este heterodímero, agora ativado pela 1,25(OH)2D3, vai ligar-se com grande afinidade a sequências de DNA específicas de cada célula e gene, designadas de elementos responsivos à vitamina D (VDRE), cuja localização é muito variável, podendo localizar-se virtualmente em qualquer local do genoma, muitas vezes perto do promotor do gene a ser regulado, mas podendo também estar muitas kilobases afastado.^{2,6-8,10} Esta ligação induz a formação de um grande complexo transcricional que incorpora várias moléculas co-reguladoras, permitindo assim a transcrição ou inibição transcricional de genes.^{2,6-8,10} Para transcrição génica, pode recrutar co-ativadores dos recetores esteróides (SRC-1, 2 e 3), proteínas interativas do recetor da vitamina D (NCoA62 e MED1), histona acetiltransferases e RNA polimerase II, necessária para a transcrição.^{6,7} Para inibição transcricional, recruta co-repressores (NCOR) e histona desacetilases, inibindo a transcrição de determinados genes, como é o caso do gene da hormona paratiroideia (PTH) (**Figura 1**).^{2,6,7} A diversidade de proteínas co-reguladoras e VDREs que podem participar neste processo, nos mais variados tecidos e células, bem como a complexidade e especificidade destes mecanismos, permitem uma grande variedade de efeitos biológicos por parte desta hormona,^{2,6,7,10} dificultando também a sua total compreensão.

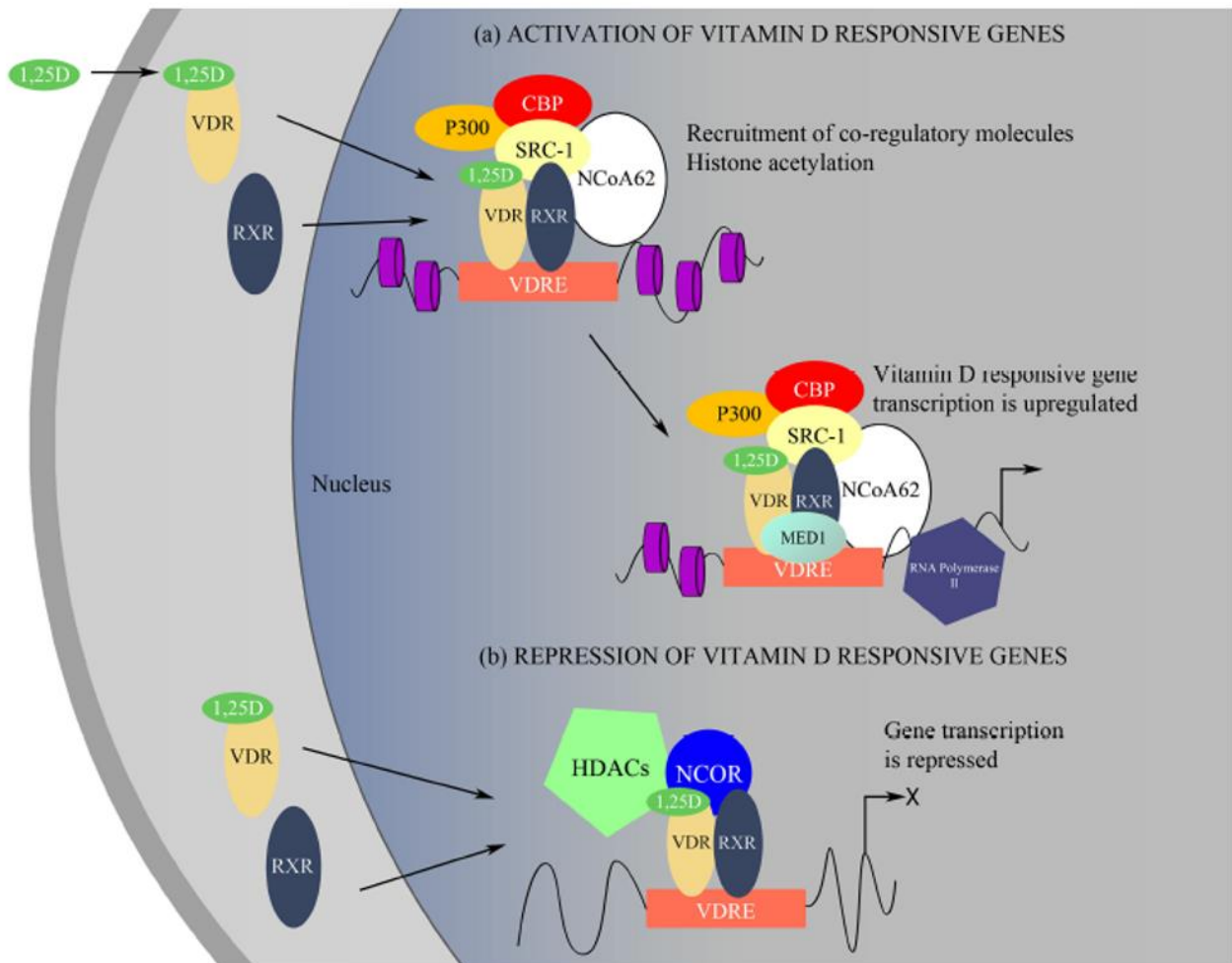


Figura 1 - Modelo ilustrativo do mecanismo genômico mediado pelo VDR. 1,25D: 1,25 dihidroxivitamina D; VDR: recetor da vitamina D; RXR: recetor retinóico-X; VDRE: elemento responsivo à vitamina D; coativadores: NCoA62, co-ativador-1 dos recetores esteróides (SRC-1), proteína ligante do CREB (CBP) e P300; MED1: *Mediator Complex Subunit 1*; co-repressores: NCOR (*nuclear receptor co-repressor*), HDACs (histona desacetilases). Reproduzido com autorização a partir de: *Jackson W Ryan, et al. "Pleiotropic Activities of Vitamin D Receptor"*.⁷

Enquanto que o mecanismo genômico demora algumas horas até manifestar alterações nos níveis de proteínas, o mecanismo não genômico, por sua vez, caracteriza-se por um mecanismo de ação mais rápido, surtindo efeitos em segundos ou minutos.⁷ Este, manifesta-se principalmente pela ativação de moléculas sinalizadoras como fosfolipase C e A2, fosfatidilinositol-3 quinase (PI3K), p21ras e pela geração rápida de segundos mensageiros

como o cálcio, AMP cíclico (AMPC), entre outros,^{7,9} ao nível do citoplasma, ao contrário do mecanismo genómico que ocorre ao nível do núcleo.⁷ Desta forma, a 1,25(OH)2D é capaz de ativar várias proteínas quinases (proteína quinase A, tirosina-quinase src, MAP quinases, proteína quinase C (PKC)), envolvidas na regulação de uma grande variedade de respostas celulares, desde proliferação, expressão génica, diferenciação a apoptose.⁹ Atualmente, existe algum consenso em relação à existência de um segundo recetor da vitamina D, localizado na membrana celular (VDRm ou proteína MARRS), além do anteriormente descrito que atua ao nível do núcleo (VDRn).^{7,9} Acredita-se que o VDRm seja responsável pela ativação destes mecanismos não-genómicos, no entanto, permanece ainda em debate a hipótese do complexo VDR/RXR também ter algum papel neste tipo de mecanismo, como por exemplo no influxo rápido de cálcio.^{7,9}

Além destes mecanismos, o próprio VDR pode participar noutras vias de sinalização através de interações proteína-proteína, mesmo na ausência da 1,25(OH)2D (**Figura 2**).⁹

A diversidade de proteínas intracelulares sinalizadoras que podem ser ativadas a partir destes mecanismos, varia consoante o tipo de célula em que a 1,25(OH)2D atua, bem como do estadio de diferenciação da mesma.^{7,9} Estas proteínas podem ter como alvos fatores de transcrição que vão modular a expressão de variados genes. Assim, através de um mecanismo não genómico, a 1,25(OH)2D consegue também modular a expressão génica de uma forma indireta.⁹

Dada a grande diversidade e complexidade de vias de sinalização descritas na literatura envolvidas neste processo, apenas alguns destes mecanismos serão descritos posteriormente com maior detalhe, no âmbito da ação imunomoduladora da 1,25(OH)2D.

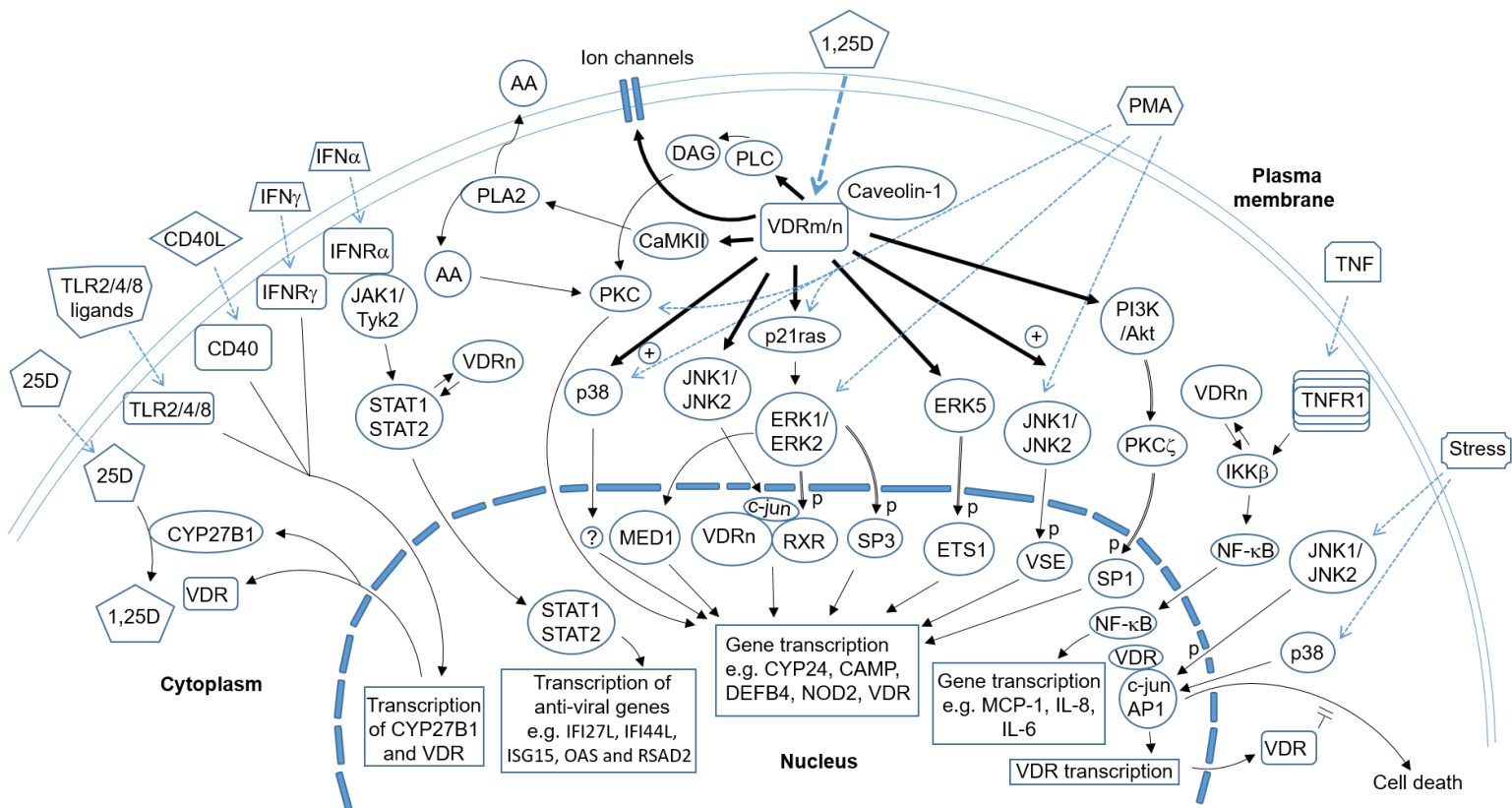


Figura 2 – Modelo ilustrativo dos mecanismos não-genômicos da 1,25D. Setas a negrito simbolizam ação direta pela 1,25D. Setas a tracejado simbolizam ligação recetor-ligando. Setas em ambos os sentidos indicam interação proteína-proteína. Setas duplas indicam relação cinase-substrato. Abreviaturas: 25D: 25-hidroxitamina D; 1,25D: 1,25 dihidroxivitamina D; VDRm/n: receptor membranar e nuclear da vitamina D; PLA2: fosfolipase A2; CaMKII: Calcio/calmodulina proteína cinase II; AA: ácido araquidónico; DAG: diacilglicerol; PLC: fosfolipase C; IFN: interferão; TLR: recetor *toll-like*; PMA: *phorbol 12-myristate 13-acetate*; PKC: proteína cinase C; PI3K: fosfatidilinositol 3-cinase; Akt: proteínas cinase B; IKK: I-κB cinase; MED1; *Mediator Complex Subunit 1*; RXR: recetor retinóico-X ; STAT: *Signal Transducer and Activator of Transcription*; JAK: *Janus kinase*; Tyk: Tirosina cinase; ERK: *Extracellular signal Regulated protein Kinase*; JNK: *c-Jun N-terminal Kinase*; MCP-1: *Monocyte chemoattractant protein 1*; CAMP: gene codificante do peptídeo antimicrobiano catelicidina; IFI27L: *Interferon, Alpha-Inducible Protein 27 like*; IFI44L: *Interferon-Induced Protein 44-Like*; ISG15: *Interferon-Stimulated Protein, 15 KDa*; OAS: *2'-5'- Oligoadenylate Synthetase*; RSAD2: *Radical S-Adenosyl Methionine Domain Containing 2*; “p” simboliza fosforilação; “+” simboliza estimulação. Reproduzido com autorização a partir de: Charles S Hii, “*The Non-Genomic Actions of Vitamin D*”.⁹

Regulação e homeostasia fosfo-cálcica

Os mecanismos de regulação que atuam ao nível da síntese e degradação da 1,25(OH)₂D renal estão intimamente relacionados com os níveis séricos de cálcio e fosfato e, conseqüentemente, com o seu metabolismo. Como sabemos, das ações mais conhecidas e importantes da 1,25(OH)₂D temos a estimulação da absorção intestinal e reabsorção renal de cálcio e fosfato, de forma a favorecer uma mineralização óssea adequada, bem como a estimulação da reabsorção óssea de cálcio, como parte do ciclo de remodelação do esqueleto.¹⁰ A 1,25(OH)₂D adquire, desta forma, um papel significativo e vital na manutenção dos níveis séricos normais destes iões.¹⁰

Sendo o rim o local predominante de síntese da forma ativa da vitamina D, é a este nível que estes mecanismos vão atuar. De uma forma geral, a ação da 1,25(OH)₂D é controlada principalmente ao nível da regulação da expressão da CYP27B1 e CYP24A1.⁷ A CYP27B1, como já foi descrito, está encarregue de converter a 25(OH)D na sua forma ativa - 1,25(OH)₂D. A CYP24A1, por outro lado, é responsável pelo catabolismo da 1,25(OH)₂D, convertendo-a em metabolitos inativos. Trata-se de uma 24 e 23-hidroxilase do citocromo P450,^{2,6,7,12} que regula os níveis circulantes de 1,25(OH)₂D, através da sua hidroxilação no local C-24, convertendo-a em ácido calcitróico (forma hidrossolúvel metabolicamente inerte) que será, posteriormente, excretada através da bÍlis.^{5,6} Além de atuar sobre a 1,25(OH)₂D, pode também exercer a sua ação na forma precursora, 25(OH)D, através da sua conversão em 24,25(OH)₂D, um metabolito inerte, diminuindo, desta forma, a sua biodisponibilidade para hidroxilação em 1,25(OH)₂D.^{2,6,12} Através da hidroxilação no local C-23, a CYP24A1 é ainda capaz de converter a 1,25(OH)₂D e a 25(OH)D em 1,25(OH)₂D-26,23 lactona e 25(OH)D-26,23 lactona, respetivamente.^{2,6,12} Além de regular os níveis circulantes de 1,25(OH)₂D, tendo em conta que a CYP24A1 está presente em todas as células que contém o VDR, esta poderá também modular os níveis desta hormona localmente, dentro da própria célula.² Estudos

recentes apontam para mutações inativadoras da CYP24A1 como provável causa de hipercalcemia infantil idiopática, manifestando-se também na idade adulta por um quadro de hipercalcemia, hipercalciúria e nefrolitíase recorrente, sugerindo que as mutações desta importante enzima devem ser consideradas no diagnóstico de hipercalcemia e hipercalciúria associada a litíase renal prolongada, particularmente em doentes sob suplementação de vitamina D.^{2,6,10}

A regulação que ocorre ao nível destas duas enzimas, CYP27B1 e CYP24A1, é realizada essencialmente pela ação de 3 hormonas: a PTH, o fator-23 de crescimento dos fibroblastos (FGF-23) e a própria 1,25(OH)₂D (**figura 3**).^{2,6,10}

Sendo a 1,25(OH)₂D responsável pela absorção intestinal e reabsorção renal de cálcio e fosfato, flutuações dos níveis destes iões vão resultar na ativação dos mecanismos estimuladores ou inibidores da síntese de 1,25(OH)₂D. Assim, perante baixos níveis séricos de cálcio (hipocalcemia), vamos ter um aumento dos níveis de PTH circulante que, por sua vez, vai induzir a transcrição da CYP27B1, estimulando a síntese renal de 1,25(OH)₂D e promovendo, desta forma, a absorção intestinal e reabsorção renal de cálcio.^{2,6,10,15} Neste mecanismo de indução da CYP27B1, crê-se estar envolvida a indução de um recetor nuclear denominado de *nuclear orphan receptor 4A2* (NR4A2), localizado no rim.² Além disto, a PTH vai ainda impedir o catabolismo da 1,25(OH)₂D ao inibir CYP24A1. A 1,25(OH)₂D, por sua vez, vai inibir a produção de PTH nas glândulas paratiróides de duas formas distintas: diretamente, inibindo a transcrição do gene que codifica a PTH e, indiretamente, através do aumento dos níveis séricos de cálcio e estimulação da transcrição do recetor *calcium-sensing* (CaSR) que, por sua vez, vai inibir a síntese de PTH.^{2,10} Da mesma forma, a 1,25(OH)₂D vai regular a sua própria síntese inibindo a transcrição da CYP27B1, através de um mecanismo complexo envolvendo o VDR e um recetor inibitório da vitamina D (VDIR) que recruta histona-desacetilases e DNA-metiltransferases, que atuam no promotor do gene codificante da

CYP27B1,⁶ e induzindo a transcrição da CYP24A1.^{2,6,10} Contudo, embora já se tenha identificado a existência de VDRE no gene da PTH, os mecanismos por detrás da supressão quer da PTH como da CYP27B1 permanecem ainda por esclarecer.^{2,10}

Além disto, temos ainda a FGF-23, uma hormona sintetizada a nível dos osteócitos da linhagem osteoblástica, com ação endócrina que, perante altos níveis de fosfato circulantes, é libertada mediante estimulação da 1,25(OH)2D e, de forma independente, pelo próprio fosfato.^{2,10,15} Por sua vez, a FGF-23, através do recetor FGFR3/4, suprime a expressão da CYP27B1 e estimula a expressão da CYP24A1, inibindo a síntese e estimulando a degradação da 1,25(OH)2D, respetivamente.^{2,6,10,15} À semelhança da PTH, é ainda responsável pela inibição da reabsorção renal de fosfato, promovendo a sua excreção, ao atuar ao nível do túbulo contornado proximal, através da supressão da Npt2a (induzida diretamente pela 1,25(OH)2D aquando da reabsorção renal de fosfato), neste caso ligando-se ao FGFR1.^{2,10,15} Embora se saiba que a FGF-23 atua apenas na presença de α -klotho, uma proteína transmembranar, e que, através de mecanismos de sinalização, ativa a cascata da MAPK, o mecanismo preciso através do qual a FGF-23 inibe a transcrição da CYP27B1 e estimula a expressão da CYP24A1 permanece incerto.^{2,6} Sabe-se, no entanto, que a 1,25(OH)2D também é responsável pela presença de α -klotho, através de um processo de indução de mRNA, tendo já sido identificado a presença de um VDRE no gene humano *Klotho* (KL).¹⁰ Curiosamente, a FGF-23 encontra-se elevada na doença renal crónica (DRC) e acredita-se que seja a elevação desta hormona, e não a insuficiência de 1,25(OH)2D devido à perda de tecido renal funcional, que constitui o evento despoletante do hiperparatiroidismo secundário.² A elevação desta hormona resultaria na supressão da 1,25(OH)2D e, conseqüentemente no aumento da PTH, observado na DRC. A determinação dos níveis de FGF-23 poderia servir como biomarcador inicial para a DRC.²

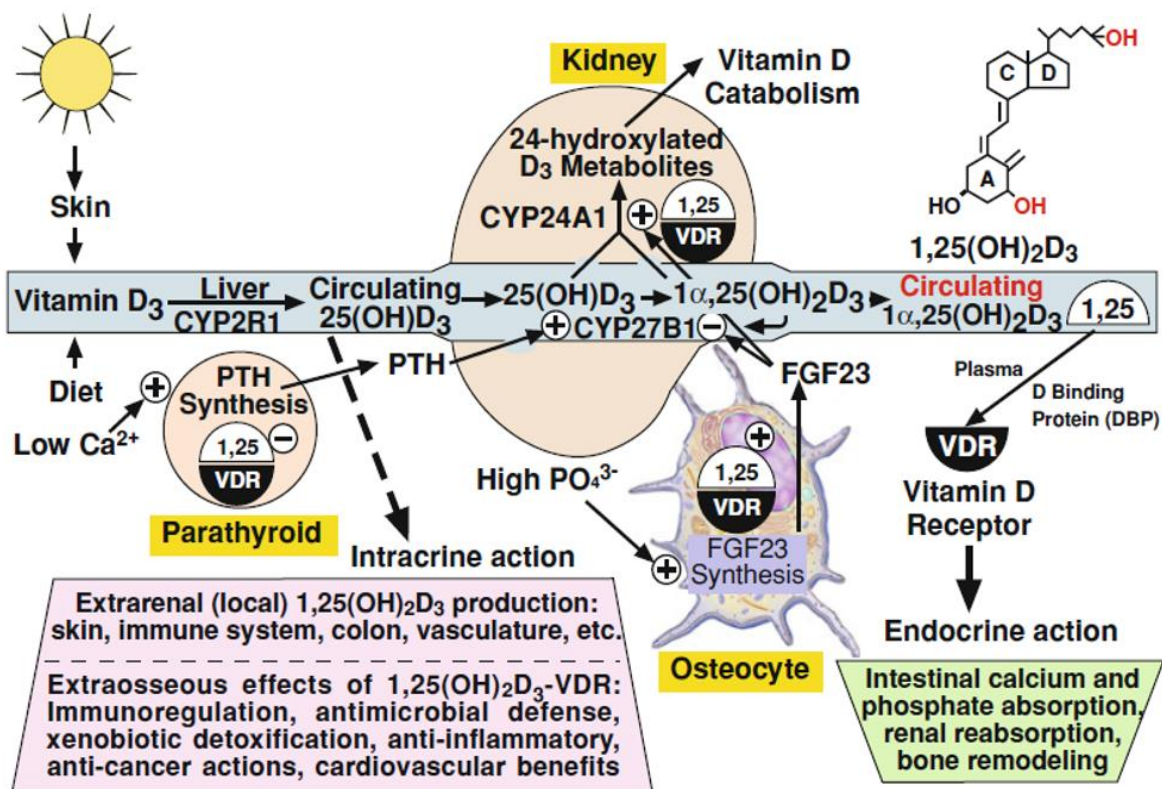


Figura 3- Metabolismo da vitamina D e regulação da síntese e catabolismo. Reproduzido com autorização a partir de: *Mark R. Haussler, et al. "Molecular Mechanisms of Vitamin D Action"*.¹⁰

Existem ainda evidências de que a calcitonina e a prolactina também possam estimular a CYP27B1 a nível renal, em situações de normocalcemia. Visto que estas duas hormonas se encontram elevadas durante a lactação, à semelhança da 1,25(OH)2D, sugere um potencial papel modulador no ciclo de homeostasia do cálcio regulada pela vitamina D, durante a lactação, quando existe uma necessidade adicional de cálcio para o recém-nascido.²

A nível local, extra-renal, tendo em conta a ação autócrina e/ou parácrina da 1,25(OH)2D, como já foi referido, os mecanismos de regulação são diferentes dos que se processam a nível renal, sendo específicos de cada célula e/ou tecido.^{2,7,10}

i) Absorção intestinal de cálcio mediada pela 1,25(OH)2D

Uma importante função da 1,25(OH)2D é a estimulação da absorção intestinal do cálcio. Este pode ser transportado do lúmen intestinal através de dois processos: transporte transcelular e paracelular.^{2,10}

O modelo de difusão facilitada é o mais bem estudado e o que melhor explica o mecanismo através do qual a vitamina D regula a absorção intestinal do cálcio². Este modelo explica a existência de um transporte transcelular, saturável, de cálcio, composto por 3 passos, regulados pela 1,25(OH)2D.² Inicialmente ocorre a entrada de cálcio através do canal de cálcio TRPV6, na membrana apical das células que revestem o intestino. De seguida, o cálcio liga-se à proteína calbindin-D9k, sendo, posteriormente, libertada através da membrana basolateral pela PMCA1b, uma Ca-ATPase, codificada pelo gene ATP2B1 (**Figura 4**).^{2,7,10}

Destes elementos, a 1,25(OH)2D atua principalmente ao nível da TRPV6 e calbindin-D9k, através de um processo de indução mediado pelo VDR.¹⁰ À semelhança do VDR, estas proteínas expressam-se em todos os segmentos do intestino, correlacionando-se fortemente com a eficácia da absorção transcelular de cálcio.² Na ausência simultânea da TRPV6 e calbindin-D9k, regista-se uma diminuição de cerca de 60% da absorção intestinal de cálcio regulada pela 1,25(OH)2D, demonstrando um papel major destes dois elementos.^{2,10} No entanto, estudos sugerem ainda a existência de outros canais e proteínas ligantes de cálcio que também participam neste mecanismo, mas que permanecem por identificar.²

Embora este mecanismo tenha sido mais estudado ao nível do duodeno (segmento intestinal onde este processo de absorção ocorre mais rapidamente), sabe-se que apenas 8-10% da absorção de cálcio ocorre neste local,² tendo sido também reportado transporte intestinal de cálcio, regulado pela 1,25(OH)2D ao nível do íleo, cego e cólon.² Outros estudos também mostram que a expressão de TRPV6 é mais elevada no intestino distal e que a absorção de cálcio aumenta significativamente em ratos e humanos quando o cólon é preservado após

resseção extensa do intestino delgado.² Pouco se sabe acerca dos mecanismos de ação da 1,25(OH)₂D em outras porções do intestino, além do duodeno, ainda assim sugere-se a importância destas regiões na absorção intestinal de cálcio e mineralização óssea apropriada.²

O transporte paracelular de cálcio ocorre entre duas células epiteliais e, não sendo mediado por um receptor, trata-se de um processo não-saturável.² Este mecanismo parece prevalecer em relação ao transcelular, na presença de uma dieta rica em cálcio, contudo apesar das evidências que sugerem um papel da 1,25(OH)₂D neste mecanismo, este ainda não se encontra bem descrito, constituindo um tema atual de debate científico.² Estudos recentes mostram que a 1,25(OH)₂D promove a permeabilidade paracelular e que a expressão das proteínas associadas à absorção paracelular do cálcio, nomeadamente claudin-2 e claudin-12 (componentes transmembranares das *tight junctions*), caderina-17 (proteína de adesão celular) e aquaporina 8 (*tight junction channel*), podem ser reguladas pela 1,25(OH)₂D ao nível do intestino,^{2,10} sugerindo que este processo de absorção de cálcio também é regulado pela 1,25(OH)₂D, à semelhança da via transcelular.² No entanto, mais estudos são necessários para esclarecer o papel da vitamina D neste processo e o seu impacto funcional e fisiológico neste mecanismo de transporte.² Finalmente, alguns autores sugerem ainda um provável componente da absorção intestinal de cálcio mediado por mecanismos não genómicos da vitamina D.¹⁰

ii) Absorção intestinal de fosfato mediada pela 1,25(OH)₂D

O fosfato constitui um componente biológico fundamental de biomoléculas essenciais como fosfolípidos, fosfoproteínas, ATP, e até mesmo de DNA e RNA, não esquecendo também o seu papel ao nível da mineralização óssea.¹⁰ Está presente em grande abundância na dieta, pelo que o mecanismo de transporte paracelular prevalece, questionando-se ainda a relevância fisiológica da 1,25(OH)₂D sobre a sua absorção intestinal (**Figura 4**).^{10,16}

Contudo, estudos em enterócitos intestinais de ratos mostram que a $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ promove ativamente a absorção intestinal de fosfato através da indução da Npt2b.^{10,16,17} Este mecanismo releva-se particularmente significativo perante uma dieta pobre ou limitada em fosfato.¹⁰ No entanto, este tema permanece ainda em estudo.²

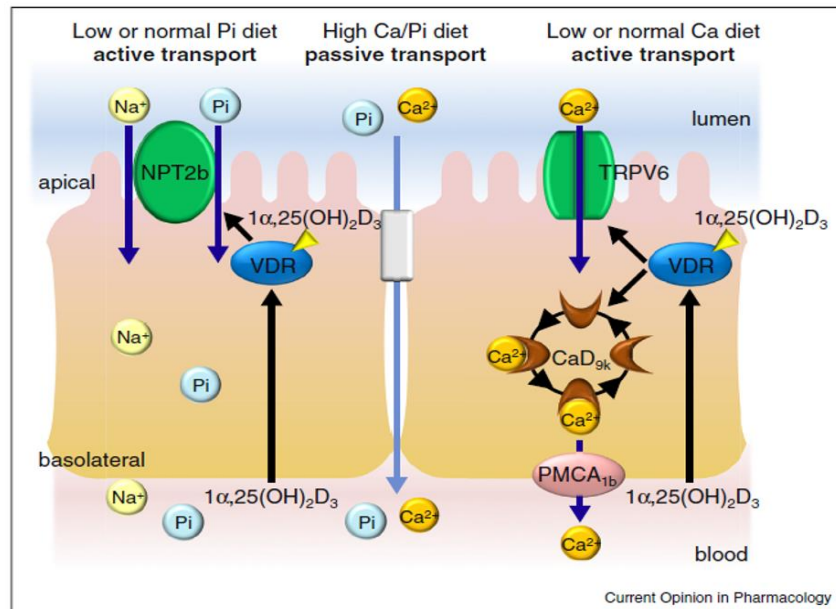


Figura 4 – Mecanismo de transporte intestinal de cálcio e fosfato. Reproduzido com autorização a partir de: Tatsuo Suda, et al. “Physiological functions of vitamin D: what we have learned from global and conditional VDR knockout mouse studies”.¹⁶

iii) Reabsorção renal de cálcio mediada pela $1,25(\text{OH})_2\text{D}$

Apenas cerca de 1-2% do cálcio que é filtrado no glomérulo renal vai ser excretado pela urina, sendo na sua maioria reabsorvido ao nível do túbulo contornado proximal (65%), de forma passiva de acordo com o gradiente de concentração, por um processo independente da $1,25(\text{OH})_2\text{D}$.² Desta forma, é ao nível do túbulo contornado distal que a reabsorção de cálcio vai ser regulada pela $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ e pela PTH, através de um mecanismo de transporte ativo, transcelular, semelhante ao que ocorre ao nível dos enterócitos.^{2,10} Assim, perante baixos níveis séricos de cálcio, a $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ e a PTH estimulam a reabsorção renal de cálcio, induzindo a expressão e ativando o canal de cálcio TRPV5, ao nível do túbulo contornado distal.^{2,10} O

TRPV5, por sua vez, é responsável pela captação do cálcio luminal, transferindo-o para o citoplasma das células tubulares.¹⁰ No citoplasma das células tubulares, o cálcio vai ligar-se à calbindin-D9k e calbindin-D28k (também induzida pela 1,25(OH)2D).^{2,10} A passagem do cálcio de volta à corrente sanguínea é mediada pelo trocador de sódio/cálcio NCX1 e o canal de cálcio membranar 1b (PMCA1b), também à semelhança do que ocorre ao nível dos enterócitos (**Figura 5**).^{2,10}

Evidências sugerem também que a α -Klotho e a FGF23 têm um papel regulador ao nível da expressão da TRPV5, assegurando a sua presença ao nível da membrana apical das células tubulares.²

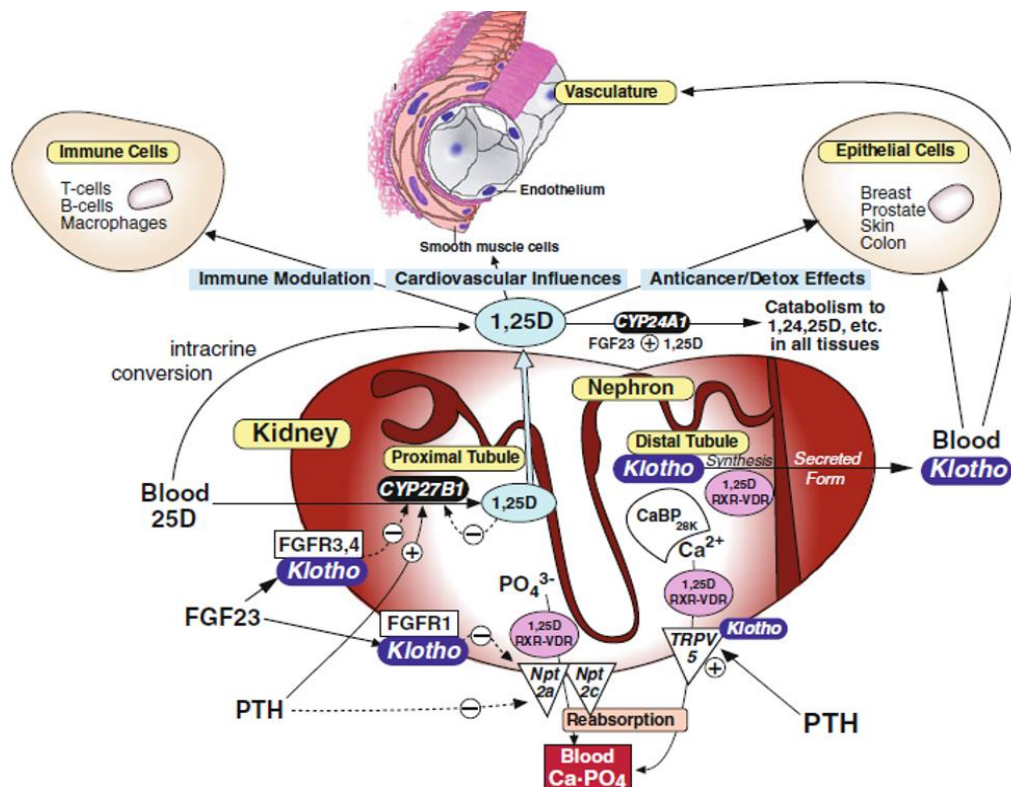


Figura 5- Regulação da reabsorção renal de cálcio e fosfato. Reproduzido com autorização a partir de:

Mark R. Haussler, et al. "Molecular Mechanisms of Vitamin D Action".¹⁰

iv) Reabsorção renal de fosfato mediada pela 1,25(OH)2D

Devido à complexidade das interações entre PTH, 1,25(OH)2D e FGF23 na regulação da reabsorção renal de fosfato, este mecanismo não se encontra tão bem descrito e esclarecido na literatura.¹⁶ Estudos mostram que o fosfato é reabsorvido, na sua grande maioria (80%), ao nível do túbulo contornado proximal, num processo mediado pelos cotransportadores de sódio e fosfato NPT2a e NPT2c.^{2,10,16} Embora a identificação de VDREs nos genes codificantes dos transportadores NPT2a e NPT2c sugira um efeito direto da 1,25(OH)2D na indução da reabsorção renal de fosfato, os mecanismos moleculares e as implicações clínicas desta ação direta encontram-se por definir.¹⁶ Ainda assim, como já foi brevemente descrito, sabemos que este processo é ainda regulado por mais duas hormonas: FGF23 e PTH, ambas responsáveis pela promoção da excreção renal de fosfato.² A PTH estimula a degradação lisossómica dos transportadores NPT2a e NPT2c, enquanto que a FGF23 diminui a sua expressão através de mecanismos não esclarecidos na sua totalidade.^{2,10} Embora se teorize um efeito direto da 1,25(OH)2D na reabsorção renal de fosfato, sabe-se que indiretamente promove a sua excreção renal, ao induzir a libertação de FGF23 nos osteócitos, e a expressão de α -Klotho nos túbulos distais (**Figura 5**).²

Metabolismo ósseo

Sendo que o cálcio é um dos principais constituintes do osso e, este, a maior reserva de cálcio no corpo humano, o metabolismo ósseo e a homeostasia do fosfato e cálcio estão intimamente interligados. A oferta suficiente de cálcio e fosfato ao osso permite a manutenção da sua integridade estrutural. Consequentemente, dependerá indiretamente da absorção intestinal e reabsorção renal destes iões, sobretudo de cálcio.² No entanto, a correção dos níveis de cálcio sérico, especialmente quando estes se encontram diminuídos, prevalece sobre a integridade estrutural e mineralização óssea. Desta forma, o cálcio também pode ser removido

do osso e reabsorvido para a circulação sistêmica, num processo dependente da atividade osteoclástica, com o intuito da correção dos seus níveis séricos.^{2,18} No adulto, o osso encontra-se em constante remodelação e a manutenção da massa óssea depende do equilíbrio existente entre reabsorção e formação óssea e, portanto, da atividade osteoclástica e osteoblástica, respetivamente.² A ação da 1,25(OH)₂D torna-se assim fulcral para a manutenção deste equilíbrio. Sabe-se que células da linhagem osteoblástica são capazes de converter localmente a 25(OH)D em 1,25(OH)₂D e que esta, atuando de forma endócrina na regulação fosfo-cálcica ou autócrina e/ou parácrina diretamente no metabolismo ósseo, através do VDR, regula a expressão de vários genes ao nível das células ósseas.^{10,19,20} Estes genes codificam proteínas efetoras que podem estar envolvidas quer em processos catabólicos como anabólicos, e ainda hormonas envolvidas na regulação da vitamina D, mineralização óssea e noutros sistemas endócrinos.¹⁰

A ação da 1,25(OH)₂D no metabolismo ósseo varia consoante o balanço de cálcio existente.² Na presença de níveis baixos de cálcio sérico, esta hormona, à semelhança da PTH, desempenha um papel catabólico, desencadeando uma resposta do organismo para a preservação de níveis adequados deste ião, incluindo um aumento da absorção intestinal e reabsorção renal de cálcio, como já descrito, e ainda uma mobilização do cálcio do osso, sendo reabsorvido para a circulação, em detrimento de uma adequada mineralização óssea.^{2,10,18}

Através do VDR, a 1,25(OH)₂D, vai atuar diretamente ao nível dos osteoblastos, através da ativação da via do NF-κB, promovendo a transcrição do fator osteogénico RANKL (ligante do recetor ativador do NF-κB).^{2,10,19-22} Este, ao ligar-se ao recetor RANK, presente nos precursores dos osteoclastos, induz a sua diferenciação em osteoclastos, e estimula a sua ação osteoclastogénica.^{2,10,19,21,22} Concomitantemente, ainda ao nível dos osteoblastos, a 1,25(OH)₂D reprime o recetor solúvel osteoprotegerina (OPG), um recetor solúvel que bloqueia a ação da RANKL.^{2,10} Desta forma, amplifica a ação biológica do RANKL. Além

disto, a 1,25(OH)2D é ainda responsável pela inibição da diferenciação dos osteoblastos, através da sequestração do fator de transcrição Runx2, um conhecido mediador anabólico que participa na via da BMP (*bone morphogenetic protein*) e interage com a via do Wnt.^{10,20} Ao reprimir a diferenciação osteoblástica, a 1,25(OH)2D induz, indiretamente, a reabsorção óssea de cálcio.^{2,10} Contudo, alguns autores referem ainda a estimulação da atividade osteoclástica na ausência de células osteoblásticas, sugerindo uma ação direta da 1,25(OH)2D em precursores de osteoclastos, através de mecanismos ainda não esclarecidos.²²

A 1,25(OH)2D além de induzir a atividade osteoclástica, também inibe a mineralização da matriz óssea, de forma a assegurar a preservação de valores normais de calcémia. Assim, atuando ao nível dos osteoblastos, vai aumentar os níveis de pirofosfato e a expressão de osteopontina, ambos inibidores potentes da mineralização.^{2,18,20}

No entanto, a 1,25(OH)2D não regula estes processos de reabsorção e mineralização óssea apenas de forma local, tendo uma ação endócrina no sentido em que induz a libertação de FGF23, ao nível dos osteócitos da linhagem osteoblástica, como já anteriormente descrito.²

De facto, estudos mostram que em ratos VDR^{-/-}, os baixos níveis séricos de fosfato correlacionam-se com uma diminuição da apoptose dos condrócitos hipertróficos, resultando no alargamento e expansão da placa epifisária.¹⁸ Devido à hipofosfatémia e hipocalcémia, concomitante, o fornecimento mineral para um adequado processo de mineralização óssea encontra-se diminuído, levando ao desenvolvimento de osteomalácia.^{2,18}

O papel da sinalização óssea da 1,25(OH)2D aquando um balanço positivo de cálcio sérico, isto é, normocalcémia, não está totalmente esclarecido e necessita de investigação adicional.² No entanto, a expressão da CYP27B1 e a ação da 1,25(OH)2D nas células ósseas parece variar consoante o estadió de diferenciação dos osteoblastos, sendo que, em progenitores osteoblásticos e osteoblastos, induz a atividade e diferenciação osteoclástica, como já descrita, mas por outro lado em osteoblastos maduros exerce uma atividade anabólica e anticatabólica,

estimulando a formação óssea e inibindo a reabsorção óssea, respetivamente.^{2,18,20,23} Este efeito anticatabólico parece ser mediado por uma diminuição da expressão de RANKL na população de células osteoblásticas do osso trabecular, ou por uma estimulação da diferenciação de osteoblastos imaturos em osteoblastos maduros, que por sua vez apresentam uma menor expressão de RANKL, resultando na diminuição do rácio RANKL/OPG.^{2,18,22} O seu efeito anabólico parece estar associado ao aumento da expressão da lipoproteína transmembranar LRP-5. A LRP-5, por sua vez, funciona como coreceptor da via de sinalização Wnt, conhecida por mediar efeitos anabólicos nos osteoblastos (**Figura 6**).²

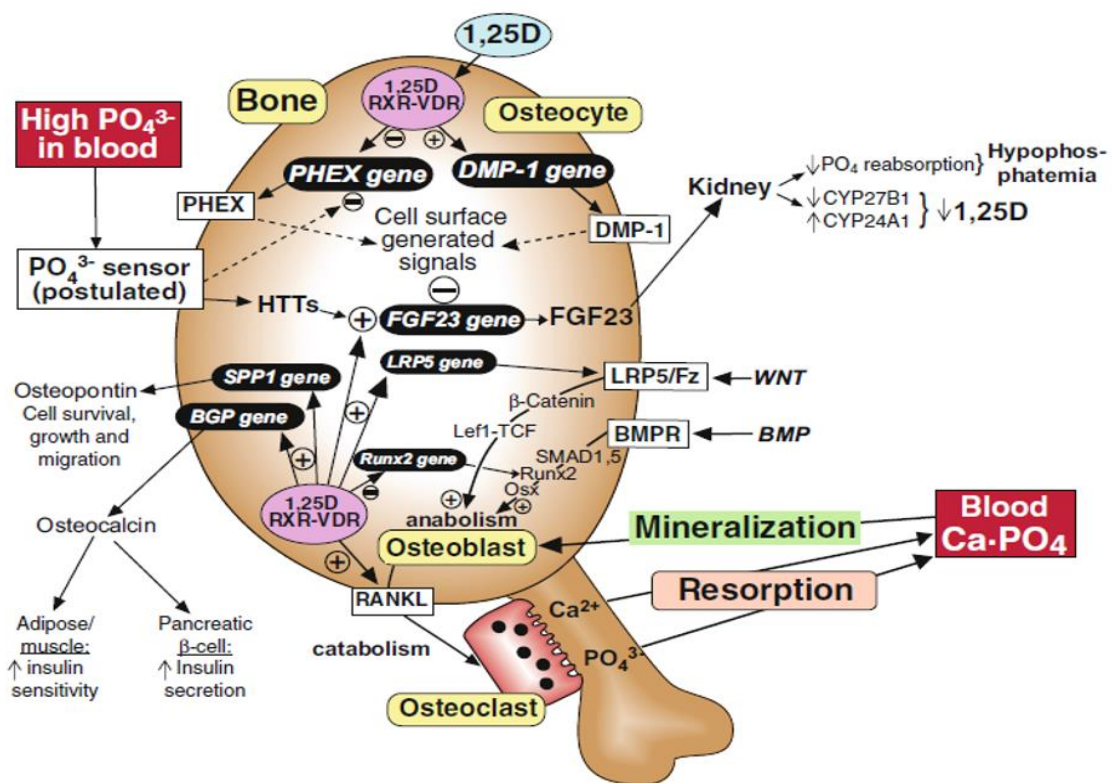


Figura 6 - Ação da 1,25(OH)2D na remodelação óssea e sinalização nos osteoblastos e osteoclastos.

Reproduzido com autorização a partir de: *Mark R. Haussler, et al. "Molecular Mechanisms of Vitamin D Action".¹⁰*

Contrariamente ao descrito, alguns autores demonstraram existir uma correlação positiva entre a expressão da CYP27B1 e do fator de transcrição Runx2, sugerindo um efeito estimulador da diferenciação osteoblástica por parte da 1,25(OH)2D que explicaria a sua participação nestes processos anabólicos.^{20,23}

À luz dos conhecimentos atuais, além da estimulação da libertação de FGF-23, a sinalização da 1,25(OH)2D nos osteócitos parece ser redundante, não tendo sido demonstrados efeitos consistentes quer ao nível da formação, reabsorção ou mineralização óssea.^{2,18} No entanto, dada a sua grande abundância no osso, e a sua capacidade de conversão local de 25(OH)D, alguns autores sugerem um papel modulador da 1,25(OH)2D na sua diferenciação e função.¹⁹

Durante o crescimento, o comprimento ósseo depende muito da atividade e diferenciação dos condrócitos.² E, visto que os condrócitos também expressam o VDR, também se demonstrou efeitos da 1,25(OH)2D a este nível.^{2,18} Estudos genéticos realizados em ratos, sugerem que a sinalização do VDR nestas células é especialmente significativa durante o crescimento ósseo, através da regulação da expressão do RANKL e, portanto, da remodelação do osso trabecular.² Indiretamente, também contribui para a produção de FGF23 nos osteócitos e, dessa forma, contribui também para todo o ciclo de regulação da 1,25(OH)2D.^{2,18} Em ratos adultos estes efeitos parecem diminuir, à medida que os osteoblastos e osteócitos predominam como fonte major de RANKL e FGF23, predominando a sinalização via VDR nestes tipos celulares.²

Dada a coexistência de todos estes tipos celulares no osso no mesmo momento, torna-se difícil a interpretação do impacto que a 1,25(OH)2D desempenha no normal funcionamento destes mecanismos, particularmente em relação à sua sinalização autócrina e/ou parácrina aquando normocalcémia.¹⁸ Estudos demonstraram ainda a presença de um recetor membranar da vitamina D (VDRm) em osteoblastos, no entanto estudos em osteoblastos humanos ainda

não permitiram concluir se alguns dos efeitos diretos da 1,25(OH)₂D nesta população de células poderá, de facto, ser mediado por este recetor.²⁰

Vitamina D e o Sistema Imunitário

O sistema imunitário corresponde à linha de defesa do nosso organismo face a estímulos patogénicos externos, como por exemplo bactérias, vírus e parasitas, e até mesmo células do nosso próprio organismo. Por vezes, um erro no reconhecimento de células saudáveis como pertencentes ao nosso organismo (*self*) leva à instalação de um processo de autoimunidade, em que o sistema imunitário sinaliza e elimina, de forma errónea, essas mesmas células.²⁴

De uma forma geral, podemos dividir o sistema imunitário em dois tipos diferentes, mas altamente relacionados entre si: a imunidade inata e imunidade adaptativa.^{8,13} A imunidade inata atua como a primeira linha de defesa do organismo face a um estímulo patogénico, sendo responsável por uma resposta rápida, mas inespecífica (não antígeno-específica), no sentido de promover a rápida eliminação de organismos patogénicos invasores, nomeadamente bactérias, prevenindo a instalação de infeção e/ou a sua exacerbação.^{8,13} Por outro lado, a imunidade adaptativa é iniciada por células especializadas em apresentação antigénica (células dendríticas, sobretudo), sendo estes antígenos depois reconhecidos pelos linfócitos T e B que, quando ativos, vão desempenhar funções especializadas, que incluem produção de citocinas, síntese de anticorpos e eliminação celular.^{6,13} Trata-se, portanto, de uma resposta mais lenta, mas antígeno-específica, mediada por células e/ou anticorpos.¹³

Teoriza-se atualmente que muitas doenças desde a depressão à doença cardiovascular, bem como cancro e doenças autoimunes, têm como fator etiológico central um processo inflamatório.²⁵ De facto, os processos e vias moleculares envolvidas na resposta inflamatória são muito variadas e complexas, sendo que muitas das terapêuticas atuais de várias doenças passam pela modulação de citocinas inflamatórias.²⁵

A relação entre a vitamina D e o seu papel na inflamação e modulação de todo o sistema imunitário tem sido controversa. No entanto, demonstrou-se que o VDR está presente em todas as células do sistema imunitário, e vários estudos *in vitro* mostram que a 1,25(OH)₂D tem propriedades anti-inflamatórias significativas, regulando simultaneamente o sistema imunitário inato e adaptativo, pelo que atualmente aceita-se que a vitamina D é um importante regulador do sistema imunitário.^{2,13,25-27}

Os mecanismos através do qual a 1,25(OH)₂D modula o sistema imunitário são variados e complexos, no entanto evidenciou-se que esta é capaz de inibir a imunidade adaptativa e promover a imunidade inata.^{2,13,24} Esta atividade está intimamente relacionada com a capacidade de conversão local de 25(OH)D em 1,25(OH)₂D pelos monócitos e/ou células dendríticas, mas não exclusivamente.²⁷

Como já referido anteriormente, muitas das células envolvidas na resposta imunitária expressam o VDR e a maquinaria enzimática necessária à conversão da 25(OH)D na sua forma ativa, nomeadamente a 1 α -hidroxilase CYP27B1, permitindo uma síntese local de 1,25(OH)₂D que atuará de forma autócrina e/ou parácrina.^{13,24} A regulação da atividade da CYP27B1, nestas células, é diferente da que se processa a nível renal, havendo uma ausência de resposta à ação da PTH, mas sim a citocinas como interleucina (IL)-1, IL-4, IL-15, fator de necrose tumoral (TNF), interferão (IFN)- γ e também 25(OH)D circulante.^{13,24,27} Estudos que utilizaram queratinócitos, evidenciaram um papel indutor potente da CYP27B1 por parte do TNF- α e IFN- γ .² Em monócitos circulantes, a síntese de 1,25(OH)₂D₃ pode ser induzida pelo IFN e outras citocinas como TNF, IL-1 e IL-2, através das vias JAK/STAT, p38 MAPK e do fator nuclear kB (NF-kB).² No entanto, embora a indução da atividade da CYP27B1 seja fundamental para o normal funcionamento do sistema imunitário, a sua sobreestimulação pode resultar no aparecimento de doenças granulomatosas e hipercalcemia associada.^{13,27} Em monócitos, à semelhança do que ocorre a nível renal, a 1,25(OH)₂D estimula o seu próprio catabolismo,

através da indução da CYP24A1, especialmente após ativação dos recetores *toll-like* (TLR).²⁷ Estudos recentes também demonstram que a IL-4 tem uma atividade inibidora suprimindo, de forma autócrina, a resposta antibacteriana induzida pela 25(OH)D.²⁷ Visto que a IL-4 está intimamente relacionada com a diferenciação dos linfócitos T, este mecanismo sugere que estes são capazes de, indiretamente, suprimir a síntese de 1,25(OH)2D ao nível dos monócitos e/ou células dendríticas.²⁷ A regulação que se processa ao nível da CYP27B1, mais especificamente a sua inibição, em relação à síntese de 1,25(OH)2D mediada pelos monócitos, ainda não está bem descrita.²⁷ No entanto, embora a sinalização pela PTH não se verifique nestas células, recentemente demonstrou-se um papel inibitório pela FGF-23.²

O interesse no papel imunomodulador da vitamina D advém da necessidade de novas terapêuticas em doenças autoimunes, ou doenças com um componente inflamatório significativo (por exemplo Doença Inflamatória Intestinal (DII)), cujos tratamentos atuais são limitados e, por vezes, com efeitos secundários e toxicidades significativas. A descoberta de um efeito anti-inflamatório e imunossupressor da vitamina D, uma hormona cuja maioria da população mundial apresenta em níveis baixos ou sub-ótimos e que facilmente pode ser corrigida, fornece uma nova perspetiva no seu uso terapêutico adjuvante no controle destas doenças e na prevenção da sua deficiência como fator de risco universal. De facto, vários estudos no âmbito da Diabetes mellitus tipo 1 (DM1), Esclerose Múltipla (EM) e Doença Autoimune da tiróide constaram que estas pessoas apresentavam níveis de 1,25(OH)2D sérica ou 25(OH)D diminuídos. Um estudo realizado em mulheres com doenças autoimunes verificou que uma suplementação de vitamina D na dose de 400 UI/dia reduzia o risco de EM, fadiga crónica, doença de Behçet e Artrite Reumatóide (AR) em cerca de 40%.¹¹ Verificou-se também uma associação entre baixos níveis séricos de vitamina D com um aumento da prevalência de DII e AR, no entanto nem todos os estudos verificam esta correlação.¹¹ O papel imunossupressor seletivo da vitamina D parece estar relacionado com uma diminuição da

severidade de algumas doenças autoimunes, comprovado em estudos que verificaram uma diminuição das exacerbações de Doença de Crohn e AR.¹¹

No que diz respeito a doenças infecciosas, verificou-se que a deficiência de vitamina D correlaciona-se com um aumento da suscetibilidade a infecções bacterianas e víricas, particularmente infecções intracelulares como a Tuberculose (causada pelo *Mycobacterium tuberculosis*).¹¹ Nestes casos, o que se verifica é uma estimulação da atividade da CYP27B1, na presença desta micobactéria, ao nível dos macrófagos nos tecidos granulomatosos, resultando num aumento dos níveis intracelulares de 1,25(OH)2D3 e da expressão do VDR.²⁸

i) 1,25(OH)2D na Imunidade Inata

Ao contrário da imunidade adaptativa, que envolve uma resposta mais lenta, mas específica mediada por células e/ou anticorpos, o sistema imunitário inato envolve a ativação dos TLRs, uma família de recetores transmembranares que reconhecem motivos moleculares associados a agentes patogénicos (PAMPs).^{6,13,28} Existem cerca de 10 tipos de TLRs no genoma humano, e estes podem ser expressos por uma grande variedade de células, sobretudo células polimorfonucleares, monócitos e macrófagos, mas também por uma grande variedade de células epiteliais (na pele, intestino, vagina, bexiga e pulmões).^{6,13} A ativação da via dos TLR induz a libertação de citocinas, e vários peptídeos antimicrobianos, como por exemplo catelicidinas, β -defensinas, e espécies reativas de oxigénio (ROS).^{8,13} As catelicidinas correspondem a uma família de proteínas, com ação antimicrobiana de largo espectro, cobrindo gram-negativos e gram-positivos.⁸ Deste conjunto de proteínas, a única conhecida em humanos é a hCAP18, codificada pelo gene CAMP (*human cathelicidin antimicrobial peptide*), que se expressa em neutrófilos, monócitos, linfócitos, células dendríticas, células *natural-killer* (NK), e ainda ao nível da pele, trato respiratório e gastrointestinal.⁸ Além da atividade antimicrobiana, também promove a quimiotaxia de neutrófilos, macrófagos e células T para a pele, interligando

a imunidade inata e adaptativa nos processos imunitários que ocorrem a nível da pele e outros tecidos.¹³

Através da produção local de 1,25(OH)₂D, mediante ativação por uma variedade de fatores imunomoduladores, após reconhecimento de PAMPs, esta atua de forma autócrina e/ou parácrina, estimulando o sistema imunitário inato, através da indução de péptidos antibacterianos como as catelicidinas e β -defensina 2.^{6,27,28} No entanto, embora ambos os genes codificantes destes dois peptídeos apresentem VDREs, apenas a catelicidina é transcricionalmente induzida isoladamente pela 1,25(OH)₂D, em monócitos, sendo que a indução da β -defensina 2 (codificada pelo gene *DEFB4*) envolve a participação de não só a 1,25(OH)₂D, mas também do NF- κ B que, por sua vez, é estimulado pela IL-1, ou pela ativação do recetor NOD2.²⁸ Encontra-se descrito um papel regulador *major* da 1,25(OH)₂D sobre a CAMP em monócitos, mas também a nível pulmonar, células epiteliais intestinais, queratinócitos e trofoblastos da placenta.^{2,8} Estudos em monócitos e queratinócitos, demonstraram um aumento de atividade dos TLR 2/1 e da CAMP, mediante estimulação pela 1,25(OH)₂D, que resultou num aumento da atividade antibacteriana sobre o *Mycobacterium tuberculosis* e *Staphylococcus aureus*, respetivamente.^{8,13,28,29} Estimulação do TLR2 pelo *Mycobacterium tuberculosis* em macrófagos resultou num aumento da expressão da CYP27B1 e do VDR que, sob níveis adequados de 25(OH)D induzia a produção de catelicidina.^{6,13,28,29} Ao nível dos trofoblastos placentários e tecido pulmonar, a 1,25(OH)₂D também atua de forma autócrina e parácrina, verificando-se uma indução da CAMP, no entanto independente da sinalização pelos TLR.⁸

Além da indução da catelicidina e β -defensina 2 na resposta à infeção por *Mycobacterium tuberculosis*, evidenciou-se também que a 1,25(OH)₂D e os seus análogos sintéticos promovem a autofagia, um processo importante no combate a infeções intracelulares, como é o caso. O mecanismo preciso não é claro, no entanto acredita-se que envolva a inibição

da via do mTOR (família de proteínas cinases conhecidas por regular processos de crescimento e proliferação celular, síntese proteica, entre outros) que, por sua vez, suprime a via da autofagia.²⁸⁻³⁰ Além disto, observou-se ainda uma correlação direta entre a diminuição dos níveis de 1,25(OH)₂D e uma contagem de linfócitos T CD4⁺ mais baixa, um valor elevado de TNF e uma maior velocidade de progressão da doença.²⁹ Embora a suplementação de vitamina D possa ser útil nestes casos, infelizmente a capacidade da vitamina D de tratar estas infeções, mesmo em populações com deficiência de vitamina D, não tem sido universalmente bem-sucedida, pelo que a sua prática não está recomendada até à realização de mais estudos prospetivos no tema.^{13,29} Estudos fisiopatológicos realizados no âmbito da psoríase, evidenciam que a atividade promotora da 1,25(OH)₂D ao nível da imunidade inata não resulta apenas em efeitos benéficos, já que a ativação crónica destes mecanismos, em particular a eventual sobreexpressão de catelicidina, resulta na formação de complexos de “*self-DNA*”, que são detetados por células dendríticas plasmocitóides, ativando-as, contribuindo para o processo psoriático.¹³

Embora também se encontrem descritos efeitos ao nível da indução de intermediários reativos ao oxigénio e indução da autofagia antibacteriana, apoiado por estudos *in vitro*, existem relativamente poucos estudos *in vivo*, e os que existem apresentam resultados inconclusivos.^{8,29,30}

No caso dos monócitos, a 1,25(OH)₂D promove a diferenciação destes em macrófagos através da indução da proteína p21, que participa no ciclo celular.³¹ Induz ainda a atividade do fator de transcrição C/EBP β (*CCAAT-enhancer-binding protein beta*), essencial para diferenciação dos monócitos, aumentando desta forma a atividade dos macrófagos e a sua citotoxicidade.^{9,31} Nestas células a atividade da 1,25(OH)₂D pode ser estimulada por citocinas como IL-15 e IFN- γ , enquanto que citocinas como a IL-4 ao induzirem o catabolismo da

1,25(OH)2D através da estimulação da CYP24A1, impedem a indução autócrina da atividade antibacteriana pela 1,25(OH)2D.²⁷

ii) 1,25(OH)3D na Imunidade Adaptativa

Ao contrário do papel promotor que a 1,25(OH)2D tem ao nível da imunidade inata, na resposta imunitária adaptativa a 1,25(OH)2D tem um papel anti-inflamatório, inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias e estimulando a libertação de citocinas anti-inflamatórias.^{6,8,32}

Epidemiologicamente parece existir uma relação entre a deficiência de vitamina D e um aumento de risco de desenvolver doenças imunomediadas.³² Em modelos animais a 1,25(OH)2D parece ser particularmente útil em doenças como Esclerose Múltipla (EM) e Doença Inflamatória Intestinal (Doença de Crohn e Colite Ulcerosa), que incluem processos de autoimunidade na sua patogénese.^{29,32} Epidemiologicamente, parece existir uma correlação entre níveis mais elevados de vitamina D e diminuição do risco de desenvolver EM. Sendo que, estudos conduzidos em mulheres, sob suplementação com vitamina D, constataram que as mulheres submetidas a doses superiores de vitamina D tinham uma diminuição do risco de desenvolver EM de cerca de 42%.²⁹ Resultados semelhantes foram observados em estudos com artrite reumatóide e asma alérgica.²⁹ Vários estudos com animais mostraram um efeito terapêutico da suplementação com 1,25(OH)2D3, nomeadamente na DM1, DII, e Lúpus Eritematoso Sistémico (LES).³²

Alguns dos achados observados, tanto em estudos *in vitro* como *in vivo*, na génese dos efeitos imunomoduladores e imunossupressores da 1,25(OH)2D foram os seguintes: diminuição da produção de IL-2, IL-12 e IL-6, bem como de IFN- γ ; diminuição da libertação de fator de necrose tumoral (TNF); estimulação da produção de IL-4, IL-5 e IL-10; e, finalmente uma inibição da síntese e libertação de autoanticorpos pelos linfócitos B.³²

Linfócitos T

Existe uma grande variedade de tipos de linfócitos T, de forma a que o organismo possa responder a todos os diferentes tipos de agressões possíveis.²⁶ Podemos subdividir em linfócitos T citotóxicos CD8+, células T *natural killer* (NK), linfócitos T $\gamma\delta$, células de memória, linfócitos T *helper* CD4+ (Th) e linfócitos T reguladores (Treg).²⁸ O efeito da 1,25(OH)₂D encontra-se melhor descrito ao nível dos linfócitos Th, no que toca à proliferação e produção de citocinas. Neste grupo incluem-se os linfócitos T *helper* (Th), que se subdividem em Th1, Th2, Th9 e Th17. As ações dos linfócitos Th são bastante heterogêneas, no entanto demonstrou-se a existência de padrões de citocinas específicos no controlo da suscetibilidade a infeções.²⁶

A 1,25(OH)₂D é um inibidor potente da proliferação dos linfócitos T, bloqueando a transição da fase G1 inicial para a fase G1 tardia.^{28,33} Estudos utilizando linfócitos T isolados de tecido linfático mostraram que a expressão do VDR e a atividade da 1,25(OH)₂D é proporcional à taxa de proliferação destas células.²⁸ Embora estudos iniciais têm dado ênfase ao papel da 1,25(OH)₂D como regulador da proliferação das células T e B, tem se tornado cada vez mais claro que os efeitos predominantes da vitamina D na imunidade adaptativa envolvem a modulação do fenótipo dos linfócitos T.

Os linfócitos T CD4+ são essenciais para a atividade dos linfócitos B e, portanto, produção de anticorpos, bem como outros tipos de células efetoras como os linfócitos T citotóxicos CD8+ e macrófagos.²⁶ O IFN- γ promove a diferenciação em linfócitos Th1, enquanto que IL-10 e IL-4 inibem esta diferenciação. A IL-4 promove a diferenciação em Th2, enquanto que o IFN- γ inibe este processo. Os linfócitos Th1 (produtores de IL-2, IL-12, IFN- γ e TNF- α) e os linfócitos Th2 (produtores de IL-3, IL-4, IL-5, IL-10) vão, por sua vez, estimular a imunidade mediada por células e humoral, respetivamente.^{26,28,33}

Observou-se que, *in vitro*, a 1,25(OH)₂D inibe a proliferação de linfócitos T, mais especificamente dos linfócitos Th1 e, conseqüentemente, a formação de IFN- γ , IL-2, e IL-12.^{28,33} Além disto, a 1,25(OH)₂D exerce ainda um efeito direto ao nível da transcrição do IFN-

γ e da IL-2. A inibição da transcrição do IFN- γ envolve um VDRE com ação inibitória, no promotor do gene do IFN- γ .^{2,13} A inibição transcricional da IL-2, por outro lado, envolve o bloqueio da ligação do fator nuclear das células T ativadas NFAT (uma família de fatores de transcrição) ao promotor do gene codificante, bloqueio da formação do complexo NFAT/AP-1 pelo VDR/RXR, e ainda o bloqueio da ligação do fator de transcrição Runx1 (*runt-related transcription factor 1*) pelo VDR.^{2,13}

Tem ainda um efeito inibidor da apresentação antigénica pelas células apresentadoras de antigénios (APCs), modulando indiretamente a resposta Th1.³³

Por outro lado, promove a atividade dos linfócitos Th2, induzindo a produção de citocinas como IL-4, IL-5 e IL-10.^{2,8,28,29,33} Inibe ainda a diferenciação e expressão dos linfócitos Th17 e Th9, inibindo indiretamente a libertação de IL-17 e IL-9.^{2,33,34} No entanto, à semelhança do que ocorre ao nível da expressão da IL-2, modula ainda diretamente a expressão da IL-17, bloqueando a ligação do NFAT ao promotor do gene da IL-17, bloqueia ainda a ação do Runx1 através do VDR e induz a ação do fator de transcrição Foxp3 (um fator de transcrição envolvido também no desenvolvimento e função dos linfócitos Treg) que, por sua vez se vai associar e inibir a ação do NFAT e Runx1.^{2,13}

Está ainda associada à estimulação da atividade dos linfócitos Treg, através da indução do fator de transcrição Foxp3, que têm uma atividade anti-inflamatória importante nomeadamente na inibição da ação dos linfócitos Th1 e Th17.^{8,13,26,33} Estudos *in vitro* evidenciaram ainda uma estimulação da produção de IL-10.^{26,34}

Os linfócitos Th1 são importantes na resposta a infeções intracelulares por vírus, e algumas bactérias, sendo produtores de IFN- γ que leva à ativação de macrófagos.^{26,35} Os linfócitos Th2, produtores de IL-4, IL-5 e IL-13 participam na resposta contra parasitas helmintas.²⁶ Linfócitos Th17 participam na resposta a patogéneos extracelulares, e produzem IL-1, IL-22, IL-17 e fator estimulador de colónias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF).²⁶

Embora a IL-17 seja uma citocina pró-inflamatória, com um papel na patogênese de doenças inflamatórias, também tem um papel promotor da imunidade inata, induzindo a libertação de peptídeos antimicrobianos e quimiocinas, que participam no recrutamento de neutrófilos.² Por esta razão muitos estudos que analisam o papel da 1,25(OH)₂D₃ na infeção apresentam resultados inconclusivos.¹³

Os linfócitos T CD8+, ou linfócitos T citotóxicos, são responsáveis pela eliminação de células infetadas por bactérias e/ou vírus.²⁶ Expressam a CYP27B1, bem como níveis relativamente altos de VDR.^{14,28}

As células T NK são responsáveis pelo reconhecimento de antígenos lipídicos (em vez de proteicos) e produção de grandes quantidades de citocinas durante os estádios iniciais de uma infeção.²⁶ Estudos *in vitro* demonstraram que a 1,25(OH)₂D inibe a proliferação das células T NK bem como dos linfócitos T CD8+. Na ausência do VDR estas células sofriam proliferação, sem estimulação antigénica, explicada talvez em parte devido à sobreprodução de IL-2.²⁶

Os linfócitos Treg, por sua vez, atuam de forma antígeno-específica e não antígeno-específica, produzem a citocina anti-inflamatória IL-10, e são responsáveis pela inibição dos linfócitos T efetores, prevenindo a ativação crónica destes e, desta forma, o desenvolvimento de doenças imunomediadas.^{14,26,34} A deficiência destas células reguladoras está associada ao desenvolvimento de doença multiorgânica imunomediada.²⁶ Adquire ainda uma importância acrescida aquando da gravidez, onde é necessária uma sobre estimulação destas células de forma a que não exista uma resposta imunitária contra o feto.¹⁴

Este desvio do domínio do fenótipo dos linfócitos Th1 para Th2 pode ter efeitos adversos em doenças alérgicas como asma e dermatite atópica, visto que nessas doenças a inflamação é dominada pelos linfócitos Th2, em vez de Th1 e Th17.^{13,33} Nestes casos parece contribuir para a patogênese de rinite alérgica, no entanto o mecanismo exato não se encontra

bem esclarecido e vários estudos apresentam resultados contraditórios, alguns mencionando um papel protetor da 1,25(OH)2D contra a asma experimentalmente induzida.^{13,33} Estudos recentes apontam também para um possível papel dos linfócitos Th17 e Treg na evolução natural da rinite alérgica.³³

Suprimindo a produção de IL-12, importante para o desenvolvimento de Th1, e IL-23 e IL-6, importantes para o desenvolvimento e função de Th17, a 1,25(OH)2D inibe o desenvolvimento das células Th1 capazes de produzir IFN- γ IL-2, e das Th17 produtoras de IL-17.⁶

Linfócitos B

Linfócitos B ativados, em particular, tem o potencial de metabolizar vitamina D e de responder à forma ativa 1,25(OH)2D3.³⁶ Demonstrou-se que a vitamina D consegue inibir a produção de anticorpos pelas células mononucleares do sangue periférico.³⁶ Esta ação pode ser mediada indiretamente por outras células imunitárias ou diretamente por efeitos nos linfócitos B.^{28,36} No entanto pouco se sabe sobre a expressão do VDR em plasmócitos. Alguns estudos mostram que a 1,25(OH)2D é capaz de inibir a diferenciação e induzir a apoptose dos linfócitos B.³³ Inibe ainda a diferenciação dos plasmócitos e a secreção de imunoglobulinas, incluindo IgE.^{32,33} Alguns autores também descrevem que a 1,25(OH)2D é capaz de regular a expressão de IL-10 e do recetor CCR10 pelas células B, sugerindo que os efeitos da 1,25(OH)2D não se prendem apenas à modulação da produção de imunoglobulinas.²⁸

Células dendríticas

A 1,25(OH)2D atua também sobre as células dendríticas, inibindo a sua diferenciação e, conseqüente libertação de IL-12, uma citocina pró-inflamatória.^{2,28,32,33} Além de atuar sobre a diferenciação das células dendríticas, também atua diretamente ao nível da transcrição da IL-12, bloqueando a ligação entre o NF-kB e o promotor do gene codificante da IL-12.^{2,8,32}

Intervém também ao nível da apresentação antigénica, diminuindo a expressão de moléculas de classe II do complexo major de histocompatibilidade (MHC) e também de moléculas co-estimuladoras como CD40, CD80 e CD86.^{2,13} Sendo que as células dendríticas intervêm no processo de apresentação antigénica e, consequente ativação de linfócitos T, a inibição deste processo pela 1,25(OH)₂D, indiretamente, modula também a resposta linfocítica, promovendo uma resposta mais tolerante com predomínio de linfócitos Th2 e Treg (Figura 7).²

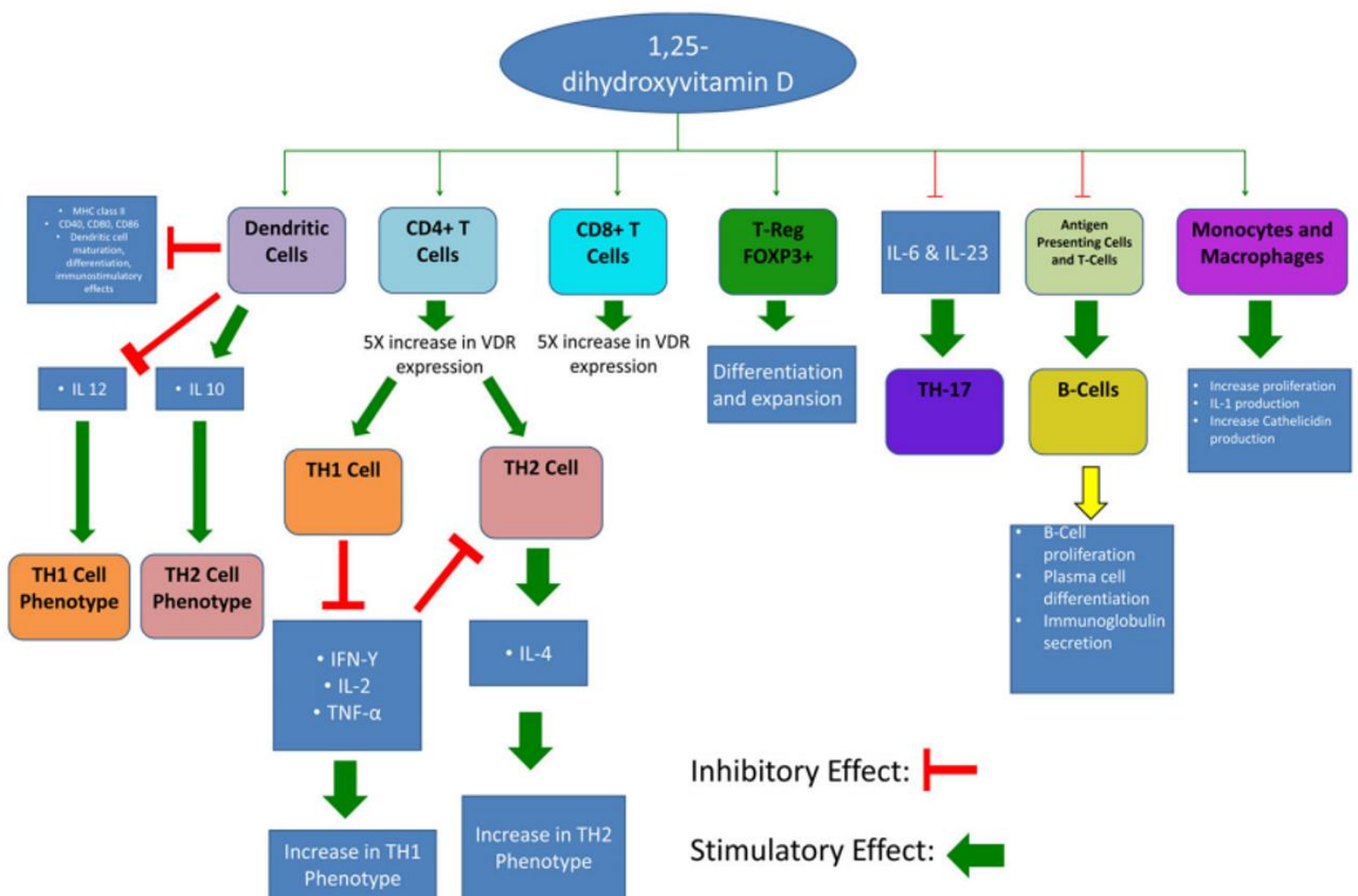


Figura 7- Papel imunomodulador da 1,25(OH)₂D₃ ao nível das células dendríticas, linfócitos T CD4+, linfócitos T CD8+, linfócitos T reguladores (Tregs), linfócitos T helper-17 (Th17), monócitos e macrófagos. Reproduzido com autorização a partir de: Tyler A. Smith, et al. “Immunomodulatory Role of Vitamin D in the Pathogenesis of Preeclampsia”.¹⁴

Além destes mecanismos celulares mencionados, a via dos TLRs também é essencial na ativação da imunidade adaptativa, nomeadamente na ativação da expressão de linfócitos T através da indução de moléculas coestimuladoras (CD80 e CD86) via indução pelo IFN- β .³⁵ Estas moléculas também são importantes para a ativação de linfócitos B.³⁵ Estudos demonstram um efeito inconstante na expressão do TLR2 e TLR4, sugerindo a hipótese de que o papel imunomodulador da vitamina D varia consoante a presença ou não de inflamação. Perante condições inflamatórias a vitamina D poderá atuar no sentido de diminuição deste processo inflamatório, diminuindo a expressão dos TLRs. O contrário ocorre em indivíduos saudáveis, onde a estimulação dos TLRs poderá garantir uma resposta adequada perante possíveis agressões por patogéneos externos.³⁵

Discussão e Conclusão

De facto, a 1,25(OH)₂D₃ modula a atividade de uma grande quantidade de células envolvidas na resposta imunitária, com um papel imunomodulador potente tanto a nível da imunidade inata como adaptativa e os vários estudos epidemiológicos e alguns *in vivo* permitem reconhecer esse papel.

O seu papel ao nível do sistema imunitário inato é sobretudo estimulador, promovendo a libertação de catelicidinas e β -defensina 2 - peptídeos antimicrobianos envolvidos na resposta a infeções.^{6,27,28} Este mecanismo é particularmente evidente em monócitos, no entanto também se encontra descrito a nível pulmonar, intestinal, pele e placenta.^{2,8}

Ao nível do sistema imunitário adaptativo atua sobre diversas células, incluindo células dendríticas, linfócitos T CD4+, CD8+, Treg, Th17, monócitos e macrófagos, e ainda linfócitos B. Diminui a atividade dos linfócitos Th1, através da inibição da produção de IFN- γ , IL-2, IL-12 e TNF- α . No entanto, ao mesmo tempo favorece uma resposta imunitária mediada pelos linfócitos Th2, através do aumento da IL-10 e diminuição da IL-2. O efeito inibidor que também exerce ao nível dos linfócitos Th17, e ao mesmo tempo estimulador dos linfócitos Treg, tem implicações clinicamente importantes dada a sua utilidade em patologias inflamatórias como DII, EM, e especificamente no caso dos linfócitos Treg, na gravidez, transplante de órgãos, e autoimunidade.¹⁴

Atua ainda sobre a atividade das células dendríticas, inibindo a sua diferenciação e expressão de marcadores específicos como CD40, CD80, e CD86, e ainda do complexo major de histocompatibilidade tipo II, impedindo a ativação de uma resposta mediada por células.

A atividade inibidora ao nível das células apresentadoras de antígenos (APCs) e da resposta mediada pelos linfócitos Th1, resulta ainda na diminuição da proliferação de linfócitos B, diferenciação em plasmócitos e secreção de imunoglobulinas.

Apesar da atividade da 1,25(OH)2D3 no sistema imunitário se prender sobretudo com a alteração fenotípica dos linfócitos Th, promovendo uma resposta mais tolerante com predomínio de linfócitos Th2, particularmente útil no futuro tratamento de patologias inflamatórias ou autoimunes, em situações fisiológicas tanto a resposta imunitária inata como adaptativa são essenciais para o normal funcionamento do organismo sendo necessário um equilíbrio entre as duas. Neste sentido, parece haver um controlo bastante aperfeiçoado que impede a sobreestimulação ou inibição indesejada de ambos estes tipos de resposta imunitária. Estes mecanismos de controlo e a interligação complexa entre os dois tipos de resposta imunitária, necessitam de esclarecimento se pretendemos no futuro compreender melhor o papel da vitamina D e, possivelmente a sua utilidade clínica neste âmbito.

Embora uma relação causal entre o seu défice e doenças imunomediadas ainda não esteja estabelecida, muitos dos estudos laboratoriais demonstram efeitos terapêuticos em variadas patologias, nomeadamente patologias que advêm da ativação crónica de linfócitos Th1 ou Th17. No entanto, são necessários mais estudos *in vivo* para melhor caracterização dos efeitos desta hormona e de forma a possibilitar uma visão holística do seu papel nos mais variados sistemas, e ainda estudos clínicos conclusivos que permitam esclarecer os benefícios da utilização da vitamina D ou análogos, em várias patologias. O papel da 1,25(OH)2D, a nível da regulação da CAMP, sugere ainda o seu potencial uso como terapêutica adjuvante em contexto infeccioso, importante face ao paradigma atual das resistências antibióticas, e possível alvo de investigação futura.

De facto, a 1,25(OH)2D3 é uma hormona bastante peculiar, relacionando-se com uma grande vastidão de mecanismos moleculares muitos ainda não compreendidos na sua totalidade. Desses mecanismos, muitos estão relacionados com a proliferação celular, diferenciação, apoptose, inflamação, angiogénese, secreção de outras hormonas como insulina, metabolismo lipídico, entre outros. Atualmente sabe-se que a vitamina D também participa nesses processos.

Uma hormona que no passado se pensava estar apenas envolvida na homeostasia do cálcio e fosfato, e metabolismo ósseo, atualmente descrevem-se efeitos sistémicos em quase todos os tipos celulares e sistemas de órgãos. A sua participação e interação em vias como o Wnt, NF- κ B, via das caspases, ciclinas, mTOR, e ainda uma grande variedade de proteínas com atividade MAP cinase, abre inúmeras possibilidades no que toca a investigação no cancro, doenças inflamatórias, autoimunes, sistema cardiovascular, obesidade, insulinoresistência, etc. As hipóteses são infinitas. E, embora os avanços na compreensão da participação da vitamina D nestes campos sejam notáveis, os estudos clínicos e *in vivo* nem sempre são concordantes, sugerindo que ainda existem muitas lacunas no que toca à atividade fisiológica desta hormona, incluindo no seu papel “clássico” – homeostasia do cálcio e fosfato, e metabolismo ósseo, onde embora muitos dos mecanismos estejam bem descritos, algumas dúvidas persistem, por vezes fruto de estudos mal desenhados, com *outcomes* mal definidos e conceitos ainda não uniformizados. Atualmente, os níveis séricos de 25(OH)D, considerados ótimos (>30 ng/mL) baseiam-se na ação da vitamina D na homeostasia do cálcio e fosfato e metabolismo ósseo, no entanto o papel que esta desempenha a nível dos outros sistemas, inclusive sistema imunitário, só ocorre com níveis séricos considerados “supra-fisiológicos”. A variabilidade que existe entre os demais estudos em relação às doses utilizadas e aos níveis séricos de 25(OH)D abaixo do qual consideram como insuficientes ou baixos, dificulta a interpretação dos resultados obtidos e, conseqüentemente, o sucesso dos estudos. Neste sentido, é necessária investigação e standardização destes conceitos, para que futuramente se possam retirar conclusões fiáveis.

A participação do VDR em diversos mecanismos intracelulares, particularmente de uma forma 1,25(OH)₂D-independente levanta ainda novas possibilidades investigacionais que devem ser abordadas. É necessário um melhor esclarecimento destes mecanismos não-genómicos de forma a que possamos compreender melhor o papel fisiológico da vitamina D, pois apenas percebendo melhor os mecanismos fisiológicos em que esta participa, e o seu

metabolismo nos vários sistemas em que atua, podemos tentar compreender o potencial desta hormona e a sua utilidade clínica. Espera-se que estudos futuros resultem numa melhor compreensão dos efeitos da vitamina D e esclareçam a sua aplicabilidade como medida terapêutica.

Agradecimentos

À minha orientadora, Professora Doutora Anabela Mota Pinto, e coorientadora, Professora Doutora Ana Todo Bom, pela disponibilidade incansável, orientação e paciência, que foram imprescindíveis para a realização deste trabalho.

Aos meus pais e irmão, por todo o apoio e motivação constante ao longo da minha vida.

A todos aqueles que me motivam e apoiam quando preciso, em especial a Marta, André e Bruno.

Referências bibliográficas

1. Berridge MJ. Biochemical and Biophysical Research Communications Vitamin D cell signalling in health and disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2015;460(1):53–71.
2. Christakos S, Dhawan P, Verstuyf A, Verlinden L, Carmeliet G. Vitamin D: Metabolism, Molecular Mechanism of Action, and Pleiotropic Effects. *Physiological Reviews*. 2016;96(1):365–408.
3. Hussin AM, Ashor AW, Schoenmakers I, Hill T, Mathers JC, Siervo M. Effects of vitamin D supplementation on endothelial function: a systematic review and meta-analysis of randomised clinical trials. *European Journal of Nutrition*. 2016;56(3):1095–1104.
4. Walsh JS, Bowles S, Evans AL. Vitamin D in obesity. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*. 2017;24(6):389–394.
5. Herrmann M, Farrell C-JL, Pusceddu I, Fabregat-Cabello N, Cavalier E. Assessment of vitamin D status – a changing landscape. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. 2016;55(1):1–24.
6. Bikle DD. Vitamin D metabolism, mechanism of action, and clinical applications. *Chemistry and Biology*. 2014;21(3):319–329.
7. Ryan JW, Anderson PH, Morris H a. Pleiotropic Activities of Vitamin D Receptors - Adequate Activation for Multiple Health Outcomes. *Clin Biochem Rev*. 2015;36(2):53–61.
8. Wei R, Christakos S. Mechanisms underlying the regulation of innate and adaptive immunity by vitamin D. *Nutrients*. 2015;7(10):8251–8260.
9. Hii CS, Ferrante A. The non-genomic actions of vitamin D. *Nutrients*. 2016;8(3):1–14.

10. Haussler MR, Whitfield GK, Kaneko I, Haussler CA, Hsieh D, Hsieh JC, Jurutka PW. Molecular mechanisms of vitamin D action. *Calcified Tissue International*. 2013;92(2):77–98.
11. Wimalawansa SJ. Non-musculoskeletal benefits of vitamin D. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2016;175:60–81.
12. Jones G. Metabolism and biomarkers of Vitamin D. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*. 2012;72(SUPPL. 243):7–13.
13. Bikle DD. Extraskelatal actions of vitamin D. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2016;1376(1):29–52.
14. Smith TA, Kirkpatrick DR, Kovilam O, Agrawal DK. Immunomodulatory role of Vitamin D in the pathogenesis of preeclampsia. *Expert Review of Clinical Immunology*. 2015;11(9):1055–1063.
15. van Goor MKC, Hoenderop JGJ, van der Wijst J. TRP channels in calcium homeostasis: from hormonal control to structure-function relationship of TRPV5 and TRPV6. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. 2017;1864(6):883–893.
16. Gattineni J, Friedman PA. *Regulation of hormone-sensitive renal phosphate transport*. 1st ed. Elsevier Inc.; 2015.
17. Suda T, Masuyama R, Bouillon R, Carmeliet G. Physiological functions of vitamin D: what we have learned from global and conditional VDR knockout mouse studies. *Current Opinion in Pharmacology*. 2015;22:87–99.
18. Carmeliet G, Dermauw V, Bouillon R. Vitamin D signaling in calcium and bone homeostasis: A delicate balance. *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2015;29(4):621–631.
19. Turner AG, Hanrath MA, Morris HA, Atkins GJ, Anderson PH. The local production of 1,25(OH)₂D₃ promotes osteoblast and osteocyte maturation. *Journal of Steroid*

- Biochemistry and Molecular Biology*. 2014;144(PART A):114–118.
20. van Driel M, van Leeuwen JPTM. Vitamin D endocrinology of bone mineralization. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2017;453(June):46–51.
 21. Cong L, Zhang C, Tu G. Osteoblastic NF- κ B pathway is involved in $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -induced osteoclast-like cells formation in vitro. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2015;8(5):5988–96.
 22. Takahashi N, Udagawa N, Suda T. Vitamin D endocrine system and osteoclasts. *BoneKEy Reports*. 2014;3(October 2013):1–9.
 23. Ormsby RT, Findlay DM, Kogawa M, Anderson PH, Morris HA, Atkins GJ. Analysis of vitamin D metabolism gene expression in human bone: Evidence for autocrine control of bone remodelling. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2014;144:110–113.
 24. Rosen Y, Daich J, Soliman I, Brathwaite E, Shoenfeld Y. Vitamin D and autoimmunity. *Scandinavian Journal of Rheumatology*. 2016;45(6):439–447.
 25. Cannell JJ, Grant WB, Holick MF. Vitamin D and inflammation. 2014;(December):1–10.
 26. Cantorna M, Snyder L, Lin Y-D, Yang L. Vitamin D and $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ Regulation of T cells. *Nutrients*. 2015;7(4):3011–3021.
 27. Bacchetta J, Sea JL, Chun RF, Lisse TS, Gales B, Adams JS, Salusky IB. FGF-23 inhibits extra-renal synthesis of $1,25$ -dihydroxyvitamin D in human monocytes. *J Bone Miner Res*. 2013;28(1):46–55.
 28. Chun RF, Liu PT, Modlin RL, Adams JS, Hewison M. Impact of vitamin D on immune function: Lessons learned from genome-wide analysis. *Frontiers in Physiology*. 2014;5 APR(April):1–15.
 29. Visweswaran Rk, Lekha H. Extraskeletal effects and manifestations of Vitamin D

- deficiency. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*. 2013;17(4):602.
30. Scott T, Weiss AAL. Vitamin D in Host Defense : Implications for Future Research. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 2017;56(6).
 31. Lai Y-H, Fang T-C. The Pleiotropic Effect of Vitamin D. *ISRN Nephrology*. 2013;2013:1–6.
 32. Alhassan Mohammed H, Saboor-Yaraghi AA, Mirshafiey A, Vahedi H, Shiri-Shahsavari MR, Mousavi Nasl Khameneh A. Immunomodulatory and Immunosuppressive Roles of $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in Autoimmune Diseases. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2017;85(2):95–103.
 33. Tian H-Q, Cheng L. Asia Pacific allergy and evolving concepts. *Asia Pacific Allergy*. 2017;7:65–73.
 34. Cassim R, Russell MA, Lodge CJ, Lowe AJ, Koplin JJ, Dharmage SC. The role of circulating 25 hydroxyvitamin D in asthma: A systematic review. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2015;70(4):339–354.
 35. Ojaimi S, Skinner NA, Strauss BJG, Sundararajan V, Woolley I, Visvanathan K. Vitamin d deficiency impacts on expression of toll-like receptor-2 and cytokine profile: A pilot study. *Journal of Translational Medicine*. 2013;11(1):1.
 36. Rolf L, Muris A-H, Hupperts R, Damoiseaux J. Vitamin D effects on B cell function in autoimmunity. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2014;1317(1):84–91.