

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

**ESTUDO DOS POLIMORFISMOS *Bsm1* E *FokI* DO RECEPTOR DA
VITAMINA D E AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DA
25-HIDROXIVITAMINA D EM PACIENTES COM
LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO**

Odirlei André Monticielo

Orientador: João Carlos Tavares Brenol

TESE DE DOUTORADO

2011

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

**ESTUDO DOS POLIMORFISMOS *Bsm1* E *FokI* DO RECEPTOR DA
VITAMINA D E AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DA
25-HIDROXIVITAMINA D EM PACIENTES COM
LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO**

Odirlei André Monticielo

Orientador: João Carlos Tavares Brenol

TESE DE DOUTORADO

2011

M791e **Monticielo, Odirlei André**

Estudo dos polimorfismos *BsmI* e *FokI* do receptor da vitamina D e avaliação dos níveis séricos da 25-hidroxivitamina D em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico / Odirlei André Monticielo ; orient. João Carlos Tavares Brenol. – 2011.

150 f. : il. color.

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina:

Ciências Médicas. Porto Alegre, BR-RS, 2011.

1. Lúpus eritematoso sistêmico 2. Polimorfismo genético 3.

Vitamina D 4. Marcadores biológicos 5. Hidroxicolecalciferóis I. Brenol,

João Carlos Tavares II. Título.

NLM: WD 380

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

Dedico ao meu pai, à minha mãe, ao meu irmão e, especialmente, à minha esposa, pelo apoio, compreensão e carinho destinados a mim durante a realização desta tese de doutorado.

AGRADECIMENTOS

Ao professor João Carlos Tavares Brenol, pela amizade, confiança e apoio durante a minha formação acadêmica, como médico reumatologista e pesquisador.

Ao professor Ricardo Machado Xavier, pela persistente cobrança por crescimento e desenvolvimento acadêmico.

Ao professor Roberto Eichenberg, pelos ensinamentos de reumatologia.

Ao professor José Artur Bogo Chies, pelos ensinamentos de biologia molecular e genética, pelo constante estímulo à pesquisa e pela participação neste trabalho.

À professora Tânia Furlanetto, pelo auxílio na elaboração deste trabalho e pela participação na minha formação médica durante a residência de medicina interna.

Ao Dr. Charles Lubianca Kohem, por seu envolvimento na minha formação como médico reumatologista, tanto durante quanto depois da especialização.

Ao Dr. Claiton Viegas Brenol, pela amizade e contribuição na minha formação acadêmica e como pesquisador.

À Dra. Tamara Mucenic, pelo convívio, participação e pioneirismo no ambulatório de lúpus eritematoso sistêmico e pela contribuição neste trabalho.

Aos colegas Yaser Mustafá, Rafael Chakr, Pedro Schneider, Rafael Tesche, Andrese Gasparin e Daniela Viecceli, pelo convívio dentro e fora do hospital.

À Rosana Scalco, por sua participação na realização das dosagens da vitamina D no laboratório do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Aos colegas do laboratório de imunogenética e aos bolsistas de iniciação científica do ambulatório de lúpus eritematoso sistêmico, pela participação na minha vida acadêmica.

Ao Guilherme Ruccatti, pelo apoio logístico e pela amizade que cultivamos dentro e fora do laboratório de imunogenética.

À Vera, secretária do Programa de Pós-Graduação, pelo apoio durante a minha trajetória no mestrado e doutorado.

À Juliana Rios, minha madrinha de casamento e pessoa fundamental na organização das ações relacionadas com o andamento deste trabalho.

Aos colegas da pesquisa e do serviço de reumatologia, em especial à Leila Krammer, pela amizade e dedicação no ambiente de trabalho.

Ao meu amigo Didio, pelo companheirismo e amizade, sendo uma importante pessoa na minha vida desde o ensino médio.

Ao meu irmão, Márcio Rafael Monticielo, por sua proximidade e apoio na minha trajetória acadêmica. À minha cunhada, Rosana Kuhn, que me acolheu em sua casa nas minhas viagens à Santa Maria. E ao meu afilhado, mais novo integrante da família, que trouxe muita alegria às nossas vidas.

À Dra. Briele Keiserman, agora minha esposa, pelo equilíbrio necessário para entender e ajudar na superação das dificuldades que passei ao longo da realização deste trabalho. Esteve presente em todos os momentos que fizeram parte da história do meu doutorado. Ao meu sogro e minha sogra, que me acolheram como filho.

Aos meus pais, Irineo Adão Monticielo e Lorena Lourdes Monticielo, pessoas que dedicaram integralmente suas vidas para dar o suporte que eu precisei para cursar medicina e hoje ter alcançado este nível acadêmico. Não tenho palavras para agradecer tudo que fizeram por mim.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	8
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	11
ABSTRACT.....	12
RESUMO.....	14
1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	18
2.1 LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO (LES).....	18
2.1.1 Conceito do LES.....	18
2.1.1 Epidemiologia do LES.....	18
2.1.2 Etiologia e patogênese do LES.....	21
2.2 VITAMINA D.....	27
2.2.1 Considerações gerais.....	27
2.2.2 Metabolismo da vitamina D.....	30
2.2.3 Níveis séricos e deficiência da vitamina D.....	32
2.2.4 Receptor da vitamina D (VDR).....	36
2.2.5 Gene <i>VDR</i>	37
2.2.6 Polimorfismos do gene <i>VDR</i>	38
2.2.7 Efeitos fisiológicos da vitamina D.....	43
2.3 DOENÇAS ASSOCIADAS COM DEFICIÊNCIA DE VITAMINA D.....	45
2.4 DEFICIÊNCIA DE VITAMINA D EM PACIENTES COM LES.....	48
2.5 DOENÇAS ASSOCIADAS COM POLIMORFISMOS DO GENE <i>VDR</i>	58
2.6 POLIMORFISMOS DO GENE <i>VDR</i> EM PACIENTES COM LES.....	61
3 OBJETIVOS.....	64
3.1 OBJETIVO GERAL.....	64
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	64
4 REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA.....	65
5 ARTIGO CIENTÍFICO.....	106
6 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	140
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	142
8 ANEXOS.....	144
8.1 ANEXO I - Critérios de classificação do LES.....	144
8.2 ANEXO II - Protocolo de pesquisa.....	147
8.3 ANEXO III - Ficha de avaliação para dosagem da vitamina D.....	148
8.4 ANEXO IV - Termo de consentimento livre e esclarecido.....	149

LISTA DE ABREVIATURAS

1,25(OH)₂D - 1,25-dihidroxitamina D

25(OH)D - 25-hidroxitamina D

3'UTR - 3' *untranslated region* (região 3' não traduzida)

ACR - *American College of Rheumatology* (Colégio Americano de Reumatologia)

AR - artrite reumatóide

BANK1 - *B cell scaffold protein with ankyrin repeats 1* (proteína 1 de estruturação de células B, com repetições anquirina)

BLyS - *B lymphocyte stimulator* (fator estimulante de linfócito B)

BLK - *B lymphoid tyrosine kinase* (tirosina quinase de linfócito B)

CRP - *C-reactive protein* (proteína C-reativa)

COL2A1 - *Collagen type II alpha 1* (colágeno tipo II alfa 1)

DNA - *deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucléico)

FcγRIIA - *Fc gamma receptor IIA* (receptor Fc gama IIA)

FcγRIIIA - *Fc gamma receptor IIIA* (receptor Fc gama IIIA)

FcγRIIIB - *Fc gamma receptor IIIB* (receptor Fc gama IIIB)

GST - *glutathione S-transferase* (glutathiona S-transferase)

HAS - hipertensão arterial sistêmica

HLA - *human leukocyte antigen* (antígeno leucocitário humano)

IFN-α - interferon alfa

IFN-γ - interferon gama

IL - interleucina

IRAK1 - *interleukin 1 receptor associated kinase 1* (quinase 1 associada ao receptor da IL1)

IRF5 - *interferon regulatory factor 5* (fator 5 regulador do interferon)

ITGAM - *integrin alpha M* (integrina alfa M)

kb - quilobase

kDa - quilodalton

LES - lúpus eritematoso sistêmico

LYN - *Src family of protein tyrosine kinase* (proteína tirosina quinase da família Src)

MBL - *mannose-binding lectin* (lectina ligadora da manose)

MECP2 - *methyl CpG binding protein 2* (proteína 2 de ligação a metil CpG)

MHC - *major histocompatibility complex* (complexo maior de histocompatibilidade)

NF-κB - *nuclear factor-kappa B* (fator nuclear-kapa B)

nm - nanômetro

nmol/l - nanomol por litro

ng/ml - nanograma por mililitro

OR - *odds ratio* (razão de chances)

OX40L - *OX40 ligand* (ligante OX40)

PD1- *programmed death 1* (morte programada 1)

pmol/l - picomol por litro

PTH - paratormônio

PTPN22 - *protein tyrosine phosphatase non-receptor 22* (proteína tirosina fosfatase não receptora tipo 22)

RNA - *ribonucleic acid* (ácido ribonucléico)

RXR - *retinoid X receptor* (receptor X retinóico)

SLE - *systemic lupus erythematosus* (lúpus eritematoso sistêmico)

SLEDAI - *systemic lupus erythematosus disease activity index*

SLICC/ACR - *systemic lupus international collaborating clinics* / American College of Rheumatology

STAT4 - *signal transducer and activator of transcription 4* (transdutor de sinal e ativação de transcrição 4)

SPP1 - *secreted phosphoprotein 1* (fosfoproteína secretada tipo 1)

TGF- β 1 - *transforming growth factor beta 1* (fator de transformação do crescimento beta 1)

Th - *T helper* (T auxiliar)

TLR - *toll-like receptor* (receptor toll-like)

TNFAIP3 - *tumor necrosis factor alpha induced protein 3* (proteína 3 induzida por fator de necrose tumoral alfa)

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

TREX1 - *three-prime repair exonuclease* (exonuclease 1 de reparo de extremidade 3 linha)

UVB - radiação ultravioleta B

VDR - *vitamin D receptor* (receptor da vitamina D)

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

VNTR - *variable number tandem repeat* (número variável de repetições em tandem)

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura química dos precursores e metabólitos da vitamina D.....	28
Figura 2 - Metabolismo da vitamina D e principais efeitos biológicos.....	32
Quadro 1 - Causas de hipovitaminose D.....	35
Figura 3 - Mecanismo de ação da vitamina D.....	37
Figura 4 - Estrutura do gene <i>VDR</i> e localização dos principais polimorfismos conhecidos	38
Tabela 1 - Principais estudos sobre níveis séricos da vitamina D no LES.....	54
Tabela 2 - Estudos de associação entre os polimorfismos do gene <i>VDR</i> e LES.....	62

ABSTRACT

Introduction: Vitamin D has pleiotropic actions on many chronic diseases. The expression of the VDR (vitamin D receptor) in various cells of the immune system strengthens the possible influence of vitamin D on autoimmune diseases. Genetic polymorphisms located in *VDR* gene may determine changes in the mechanisms of action of vitamin D, but with results still unknown. The *BsmI* *VDR* polymorphism was associated with systemic lupus erythematosus (SLE) in Asian patients. Studies with SLE patients in Brazil have not been conducted.

Objectives: To investigate the possibility of *BsmI* and *FokI* polymorphisms of *VDR* gene causing increased risk for development of SLE and to evaluate the possible association of these polymorphisms with clinical and laboratory manifestations of the disease. To determine serum levels of 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D] in patients and to investigate the possible association of their concentrations with the studied polymorphisms and clinical and laboratory expressions of SLE.

Materials and methods: Case-control study involving 195 SLE patients and 201 healthy controls from the same geographical area. The *BsmI* and *FokI* polymorphisms of *VDR* gene were studied. Serum 25(OH)D levels were measured in the cases. Genotyping was performed by Restriction Fragment Length Polymorphism-Polymerase Chain Reaction (RFLP-PCR), using primers and restriction enzymes specific for each polymorphism. The measurement of 25(OH)D was performed by chemiluminescence. The clinical and laboratory data were collected from medical records.

Results: There was no statistically significant difference in genotypic and allelic frequencies of *BsmI* and *FokI* polymorphisms among European-derived cases and

controls. There was no association between clinical and laboratory features in SLE patients and the studied polymorphisms. The mean serum levels of 25(OH)D were 25.51 ± 11.43 ng/ml in SLE patients. When patients were classified according to vitamin D status, the following distribution was observed: 55 (30.4%) had normal (≥ 30 ng/ml), 63 (34.8%) insufficient (20-30 ng/ml), 52 (28.7%) deficient (< 20 ng/ml) and 11 (6.1%) critically low serum levels (< 10 ng/ml). Fifty six percent of patients with deficiency received at least 800 IU of vitamin D per day. Based on genotype distribution, 25(OH)D levels were significantly higher in patients carrying the f/f genotype, when compared to patients carrying the F/F genotype (31.6 ± 14.1 ng/ml versus 23.0 ± 9.2 ng/ml, $p=0.004$). Vitamin D levels were not associated with clinical and laboratory features of SLE.

Conclusions: The *BsmI* and *FokI* polymorphisms did not present association with SLE in our European-derived studied patients. The *FokI* polymorphism showed significant influence on 25(OH)D levels, reinforcing its role in functional activity of VDR. This finding may be considered in future clinical and experimental studies involving vitamin D measurements. Serum concentrations of 25(OH)D required to maintain optimal musculoskeletal, cardiovascular and immune health should be individualized for each patient and new guidelines about vitamin D supplementation may have to take into consideration the individual genetic background. Genetic-specific definitions of ideal levels of vitamin D in SLE should therefore be established in future studies.

Keywords: systemic lupus erythematosus, vitamin D receptor, *BsmI* polymorphism, *FokI* polymorphism, vitamin D, 25-hydroxyvitamin D, genetics and immunology.

RESUMO

Introdução: A vitamina D tem ações pleiotrópicas em muitas doenças crônicas. A expressão do receptor da vitamina D (VDR - *vitamin D receptor*) em diversas células do sistema imune reforça a possível influência da vitamina D nas doenças autoimunes. Polimorfismos genéticos localizados no gene *VDR* podem determinar alterações nos mecanismos de ação da vitamina D, porém com resultados ainda pouco conhecidos. O polimorfismo *BsmI* do gene *VDR* foi associado com lúpus eritematoso sistêmico (LES) em pacientes asiáticos. Estudos com pacientes lúpicos no Brasil ainda não foram realizados.

Objetivos: Investigar a possibilidade dos polimorfismos *BsmI* e *FokI* do gene *VDR* aumentarem o risco para o desenvolvimento do LES e avaliar a possível associação destes polimorfismos com manifestações clínicas e laboratoriais da doença. Determinar os níveis séricos da 25-hidroxivitamina D [25(OH)D] nos pacientes e investigar a possível associação das suas concentrações com os polimorfismos estudados e expressões clínicas e laboratoriais do LES.

Materiais e métodos: Estudo caso-controle envolvendo 195 pacientes com LES e 201 controles saudáveis da mesma área geográfica. Foram pesquisados os polimorfismos *BsmI* e *FokI* do gene *VDR*. Os níveis séricos da 25(OH)D foram dosados nos casos. A genotipagem foi realizada por *Restriction Fragment Length Polymorphism-Polimerase Chain Reaction* (RFLP-PCR), usando *primers* e enzimas de restrição específicas para cada polimorfismo. A dosagem da 25(OH)D foi realizada por quimioluminescência. Os dados clínicos e laboratoriais foram coletados dos prontuários.

Resultados: Não houve diferença estatisticamente significativa nas frequências genóticas e alélicas dos polimorfismos *BsmI* e *FokI* entre casos e controles eurodescendentes. Não houve associação entre as manifestações clínicas e laboratoriais do LES e os polimorfismos estudados. Os níveis séricos médios da 25(OH)D foram de $25,51 \pm 11,43$ ng/ml nos pacientes com LES. Quando os pacientes foram classificados pelo estado de vitamina D, a seguinte distribuição foi observada: 55 (30,4%) normais (≥ 30 ng/ml), 63 (34,8%) insuficientes (20-30 ng/ml), 52 (28,7%) deficientes (< 20 ng/ml) e 11 (6,1%) com níveis criticamente baixos (< 10 ng/ml). Cinquenta e seis por cento dos pacientes com deficiência estavam usando pelo menos 800 UI de vitamina D por dia. Baseada na distribuição genotípica, a concentração da 25(OH)D foi significativamente maior nos pacientes com genótipo *f/f*, quando comparados com os pacientes com genótipo *F/F* ($31,6 \pm 14,1$ ng/ml versus $23,0 \pm 9,2$ ng/ml, $p=0,004$). Níveis de vitamina D não foram associados com aspectos clínicos e laboratoriais do LES.

Conclusões: Os polimorfismos *BsmI* e *FokI* não apresentaram associação com LES nos nossos pacientes eurodescendentes estudados. O polimorfismo *FokI* mostrou influência significativa nos níveis da 25(OH)D, o que reforça o papel deste polimorfismo na atividade funcional do VDR. Este achado poderia ser considerado em futuros estudos clínicos e experimentais envolvendo dosagem da vitamina D. A concentração da 25(OH)D necessária para manter o bom funcionamento do sistema musculoesquelético, cardiovascular e imunológico deveria ser individualizada para cada paciente e novas orientações sobre a suplementação de vitamina D poderiam ter que levar em consideração a ancestralidade genética. Assim, estudos adicionais são

necessários para estabelecer definições dos níveis ideais de vitamina D geneticamente especificados.

Palavras-chave: lúpus eritematoso sistêmico, receptor da vitamina D, polimorfismo *Bsm1*, polimorfismo *Fok1*, vitamina D, 25-hidroxivitamina D, genética e imunologia.

1 INTRODUÇÃO

A suscetibilidade ao desenvolvimento do lúpus eritematoso sistêmico (LES) está relacionada a fatores ambientais, hormonais, genéticos e imunológicos. Inúmeros genes têm sido relacionados com o surgimento do LES, incluindo o gene *VDR* (*vitamin D receptor* - receptor da vitamina D) que sintetiza o receptor da vitamina D. Vários polimorfismos têm sido descritos desde a descoberta deste gene. Os mais comumente estudados foram os polimorfismos *FokI*, *BsmI*, *Apal* e *TaqI*, entretanto seus efeitos na atividade do VDR ainda são pouco entendidos. As funções biológicas da vitamina D são mediadas pelo VDR. A vitamina D exerce inúmeras ações sobre o sistema imunológico e diversos estudos têm sugerido sua influência na patogênese de doenças autoimunes. Quando comparados com controles saudáveis, pacientes com LES apresentam baixos níveis séricos de vitamina D, o que suscita a possibilidade de associação entre a deficiência desta vitamina e o surgimento da doença. Os polimorfismos *FokI* e *BsmI* permanecem ainda pouco estudados no LES, tendo sido detectada evidência de que o alelo B do polimorfismo *BsmI* pode estar associado ao surgimento da doença em pacientes asiáticos. Os estudos ainda não avaliaram de forma concomitante os polimorfismos do gene *VDR*, níveis séricos de vitamina D e expressões fenotípicas da doença em uma mesma população. Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a frequência alélica e genotípica dos polimorfismos *FokI* e *BsmI* do gene *VDR* em pacientes com diagnóstico de LES, comparando-os com controles saudáveis. Além disso, os níveis séricos da 25(OH)D foram dosados nos casos, buscando encontrar possíveis associações com os polimorfismos estudados e com expressões clínicas e laboratoriais da doença.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO (LES)

2.1.1 Conceito do LES

O LES é uma doença autoimune sistêmica caracterizada pela produção de autoanticorpos, formação e deposição de imunocomplexos, inflamação em diversos órgãos e dano tecidual. A etiologia do LES permanece ainda pouco conhecida, porém sabe-se da importante participação de fatores hormonais, ambientais, genéticos e imunológicos para o surgimento da doença. As características clínicas são polimórficas e a evolução costuma ser crônica, com períodos de exacerbação e remissão. A doença pode cursar com sintomas constitucionais, artrite, serosite, nefrite, vasculite, miosite, manifestações mucocutâneas, hemocitopenias imunológicas, diversos quadros neuropsiquiátricos, hiperatividade reticuloendotelial e pneumonite. Diante disto, convencionou-se realizar seu diagnóstico através de achados clínicos e laboratoriais, conforme os critérios de classificação propostos pelo *American College of Rheumatology* (ACR) em 1982 e revisados em 1997, detalhados no anexo I (1-3).

2.1.2 Epidemiologia do LES

A incidência do LES em diferentes locais do mundo é de aproximadamente 1 a 22 casos para cada 100000 pessoas por ano. A prevalência pode variar de 7 a 160 casos para cada 100000 pessoas (4-7). Estudos epidemiológicos envolvendo o LES são complexos devido a diversidade de apresentações clínicas da doença, dependência de critérios de classificação para definição do diagnóstico e baixa

frequência na população. A variabilidade genética entre os povos e o local onde é conduzido o estudo influenciam nos resultados epidemiológicos referentes à doença. A prevalência do LES na população norte-americana é de cerca de 40 a 50 casos para cada 100000 pessoas (4) e estimativas de incidência variam aproximadamente de 2 a 8 casos para cada 100000 pessoas por ano (8). Nos últimos 40 anos, devido provavelmente à detecção mais precoce da doença, houve um aumento da incidência na ordem de até três vezes (8-10). Estudo epidemiológico incluindo os Estados Unidos, Ásia, Europa, Martinica e Austrália revelou uma variação de incidência de 1 a 32 casos para cada 100000 pessoas por ano. A prevalência neste estudo foi maior nos países europeus, quando comparados com os Estados Unidos. Dentre os países europeus, Espanha, Itália e França foram os que tiveram maior prevalência da doença (11). Estudo no nordeste do Brasil estimou uma incidência de LES em torno de 8,7 casos para cada 100000 pessoas por ano. Nas mulheres esta estimativa foi de 14 casos para cada 100000 pessoas por ano e nos homens foi de 2,2 casos para cada 100000 pessoas por ano. O pico de incidência ocorreu em mulheres entre 35 e 39 anos, com 32,7 casos para cada 100000 mulheres por ano (12).

O LES é mais comumente visto em mulheres durante a idade reprodutiva, com uma razão de aproximadamente 9 mulheres para cada 1 homem. Em crianças, esta razão é de 3:1; em adultos jovens chega a 15:1 e nos indivíduos com maior idade, novamente tende a ser menor, em torno de 8:1. Este fato é atribuído principalmente a fatores hormonais (13, 14). Nos Estados Unidos, mulheres afrodescendentes apresentam maior prevalência de LES (15). A incidência ajustada para sexo e raça para cada 100000 pessoas por ano é cerca de 0,4 para homens eurodescendentes, 3,5 para

mulheres eurodescendentes, 0,7 para homens afrodescendentes e 9,2 para mulheres afrodescendentes (16). Em geral, o surgimento da doença ocorre entre 16 e 55 anos em 65% dos casos, abaixo dos 16 anos em 20% e acima dos 55 anos em 15% dos casos (17, 18).

A sobrevida nos pacientes com LES tem melhorado muito nos últimos anos. Na década de 50, a sobrevida média em cinco anos era de 50%, enquanto na última década, a sobrevida média em dez anos alcançou 80 a 90% (19-24). Vários fatores contribuíram para isso, principalmente o diagnóstico inicial da doença, o melhor entendimento da sua fisiopatologia e as melhores condições de tratamento, com otimização do uso de glicocorticóides e drogas imunossupressoras, antibioticoterapia, suporte dialítico, transplante renal e melhor manejo dos fatores de risco cardiovasculares (21, 22, 25-27). Entretanto, a mortalidade permanece cerca de três a cinco vezes maior em relação à população geral (28). O prognóstico do LES tende a ser menos favorável em afrodescendentes, quando comparado com eurodescendentes, assim como em populações com baixo nível socioeconômico e em crianças de um modo geral (17, 29, 30). Nas crianças, a doença costuma ser mais grave, havendo maior incidência de manifestações cutâneas, glomerulonefrite, pericardite, hepatoesplenomegalia e alterações hematológicas (17, 31). Nos homens, o diagnóstico é mais tardio e a mortalidade dentro do primeiro ano da doença é maior (32), havendo maior incidência de acometimento renal, manifestações cutâneas, citopenias, serosite, envolvimento neurológico, trombose, doença cardiovascular e hipertensão arterial sistêmica (HAS), quando comparados com as mulheres (33). Nos idosos, o surgimento e a evolução da doença assemelham-se ao lúpus induzido por drogas, com maior

prevalência de síndrome *sicca*, serosite, envolvimento pulmonar e manifestações musculoesqueléticas. Há menor frequência de acometimento neurológico e renal nestes pacientes, no entanto, a doença cursa com diminuição da sobrevida (34-36).

A mortalidade no LES segue um padrão bimodal (37). Nas fases iniciais, deve-se à atividade da doença, especialmente quando há envolvimento renal e do sistema nervoso central e ao maior risco de infecções graves decorrentes da imunossupressão. Dados de um estudo brasileiro mostraram que até 58% das mortes nos pacientes com LES resultaram de infecções (38). Nas fases avançadas, resulta de complicações da própria doença e do tratamento, sendo a enfermidade cardiovascular um dos importantes fatores de morbidade e mortalidade nestes pacientes (23, 25-27, 39, 40).

2.1.3 Etiologia e patogênese do LES

A etiologia e a patogênese do LES são complexas e permanecem ainda pouco conhecidas, mas provavelmente envolvem múltiplos fatores, especialmente genéticos, imunológicos, hormonais e ambientais. O dano tecidual e o acometimento de órgãos e sistemas podem estar relacionados à presença de autoanticorpos patogênicos e imunocomplexos. No LES, observa-se ativação da imunidade inata e adaptativa, com a participação de receptores *toll-like* (TLR – *toll-like receptors*) 7 e 9 no reconhecimento de autoantígenos derivados do ácido ribonucléico (RNA – *ribonucleic acid*) e desoxirribonucléico (DNA – *deoxyribonucleic acid*), respectivamente, provenientes de células apoptóticas, e o envolvimento de células B e T ativadas a partir da interação com estes autoantígenos (41). A resposta imune anormal que permite a persistência de células B e T patogênicas, também aumenta o processamento de autoantígenos pelas

células apresentadoras de antígenos, ocasiona hiperativação linfocitária e determina falha nos mecanismos imunorregulatórios que poderiam interromper este processo.

A predisposição ao LES tem sido relacionada à herança de determinados genes e não segue um modelo monoalélico. Estudos mostraram altas taxas de concordância para a doença em gêmeos monozigóticos, que podem variar de 24 a 56%, enquanto que nos dizigóticos ou nos irmãos não gêmeos não ultrapassa 2 a 5% (42, 43). Cinco a 12% dos familiares de pacientes com LES poderão ter a doença, o que representa um risco 100 vezes maior do que a população geral (44). Crianças nascidas de mães com LES têm fator antinuclear positivo em cerca de 27% dos casos, sem necessariamente desenvolver quadro clínico compatível com a doença (45). Deficiências geneticamente herdadas de componentes do complemento (C1q, C4A e B e C2) e a mutação do gene que sintetiza a exonuclease 3'-5' envolvida no metabolismo e depuração do DNA (TREX1 – *three-prime repair exonuclease*, anteriormente conhecida como *DNaseIII*), apesar de raramente encontradas, são fatores genéticos fortemente associados com o desenvolvimento do LES (46, 47). O encontro de outras doenças autoimunes em familiares de pacientes com LES e sua associação com alguns distúrbios geneticamente determinados, também reforçam a importância da predisposição genética para o surgimento da doença. A combinação de fatores genéticos, tanto a presença de genes de suscetibilidade, quanto a ausência de genes de proteção, determina risco suficiente para o desencadeamento da doença.

Outros marcadores de suscetibilidade genética têm sido descritos em pacientes com LES. A contribuição isolada de cada um deles no desenvolvimento da doença é pequena, geralmente com risco inferior a 2 ou 3 vezes (48). Estudo de associação global do genoma humano identificou entre 30 e 40 polimorfismos genéticos que podem

predispor ao LES (49). Dentre os alelos do complexo maior de histocompatibilidade (MHC – *major histocompatibility complex*), destacam-se o antígeno leucocitário humano (HLA – *human leukocyte antigen*) DR2, DR3, DR8 e, recentemente, o HLA-G (50, 51). Polimorfismos genéticos de suscetibilidade podem influenciar a depuração de imunocomplexos e células apoptóticas através da alteração de componentes do sistema complemento, como os descritos anteriormente (C1q, C4A e B e C2) e também outros, tais como a lectina ligadora da manose (MBL – *mannose-binding lectin*), receptores Fc gama IIA (FcγRIIA – *Fc gamma receptor IIA*), IIIA (FcγRIIIA – *Fc gamma receptor IIIA*), IIIB (FcγRIIIB – *Fc gamma receptor IIIB*), proteína C-reativa (CRP – *C-reactive protein*) e integrina alfa M (ITGAM – *integrin alpha M*) (46, 52-60). Há variantes alélicas encontradas nos genes *PTPN22* (*protein tyrosine phosphatase non-receptor 22*), *OX40L* (*OX40 ligand*, também conhecida como glicoproteína 34 kDa), *PD1* (*Programmed death 1*), *BANK1* (*B cell scaffold protein with ankyrin repeats*), *LYN* (*Src family of protein tyrosine kinase*) e *BLK* (*B lymphoid tyrosine kinase*) que afetam a sinalização de linfócitos, resultando em mudanças na ativação, supressão e sobrevivência das células B e T (61-65). Há estudos com polimorfismos cuja influência se dá através de alterações envolvendo a imunidade inata, dentre eles, os que são encontrados nos genes *IRF5* (*interferon regulatory factor 5*), *STAT4* (*signal transducer and activator of transcription 4*), *IRAK1* (*interleukin 1 receptor associated kinase 1*), *TNFAIP3* (*tumor necrosis factor alpha induced protein 3*) e *SPP1* (*secreted phosphoprotein 1*), os quais estão associados com níveis elevados de interferon-alfa (IFN-α), uma importante citocina envolvida na fisiopatogenia do LES (66-72). O alelo B do polimorfismo *Bsm1* do gene que sintetiza o receptor da vitamina D (VDR - *vitamin D receptor*) mostrou significativa associação com LES em pacientes asiáticos (73). O alelo nulo do gene

GSTM (*glutathione S-transferase M*), responsável pela metabolização de radicais livres decorrentes do estresse oxidativo causado pela radiação ultravioleta B (UVB) na pele, associou-se com maior risco de desenvolver LES, em população de origem eurodescendente (74). Todos estes marcadores genéticos são encontrados de maneira muito variada em diferentes populações, especialmente os que se relacionam com o MHC, sendo alguns mais ou menos frequentes, de acordo com a etnia. A influência genética destes fatores potencialmente pode alterar a regulação imune, a degradação de proteínas, o transporte de peptídeos através da membrana celular, a cascata do complemento, o funcionamento do sistema reticuloendotelial, a produção de imunoglobulinas, a apoptose e a produção e liberação de hormônios (75).

Os hormônios têm função imunorregulatória e alterações em suas concentrações podem ter papel na patogênese do LES, influenciando na incidência e no curso clínico da doença (76, 77). O estrogênio estimula timócitos, linfócitos T CD8+ e CD4+, linfócitos B, macrófagos, liberação de citocinas e a expressão de moléculas do HLA, tanto de classe I, quanto de classe II e moléculas de adesão endotelial, além de reduzir a apoptose de linfócitos B ativados (78, 79). Os androgênios evidenciam efeito imunossupressor (80). O desequilíbrio entre os níveis de estrogênio e androgênio parece influenciar a resposta imune. Isto justificaria, em parte, o maior número de casos de LES em mulheres na idade reprodutiva e em indivíduos com síndrome de Klinefelter e a menor prevalência da doença em pacientes com síndrome de Turner (14, 81). Estas duas síndromes suscitam a possibilidade de o risco para desenvolver LES estar relacionado à existência de dose genética cumulativa, visto que há pelo menos 3 genes predisponentes ao LES localizados no cromossomo X (*IRAK1*, *TLR7* e *MECP2 – methyl CpG binding protein 2*) (81, 82). Estudo de uma coorte de mulheres do *Nurse's Health*

Study, demonstrou que maior exposição estrogênica, decorrente de menarca precoce ou do uso de estrogênio exógeno através de contraceptivos orais ou terapia de reposição hormonal na pós-menopausa, aumentou em 1,5 a 2,5 vezes o risco do desenvolvimento do LES (83). Outras alterações mediadas por hormônios também estão sendo descritas. A progesterona diminui a proliferação de células T e aumenta o número de células CD8+ (84). Em pacientes com LES, há evidências de baixos níveis de progesterona, podendo atuar como possível fator predisponente para a doença (85). A prolactina encontra-se elevada em situações de reativação do LES (86, 87). Ocorre também aumento de doença tireoidiana autoimune em pacientes com LES, o que altera os níveis dos hormônios tireoidianos e do hormônio tireoestimulante (88, 89). A vitamina D apresenta efeitos imunorregulatórios em diversas células do sistema imune, especialmente linfócitos T, linfócitos B e células dendríticas (90, 91). Alguns estudos têm mostrado associação entre níveis baixos de vitamina D e LES, sugerindo sua participação na etiopatogenia desta doença (92).

Anormalidades na regulação do sistema imune que são características de pacientes com LES contribuem para a perda da autotolerância, reconhecimento de autoantígenos, ativação de linfócitos T e B, secreção de citocinas, proliferação e diferenciação de linfócitos B e produção de autoanticorpos (93). Defeitos nos mecanismos de fagocitose e depuração ineficaz de material apoptótico, restos celulares e de imunocomplexos são achados que colaboram para perpetuação da autoimunidade no LES (94).

Plasmócitos produtores de autoanticorpos estão persistentemente sendo ativados por uma molécula estimuladora, conhecida como BLYS (*B lymphocyte stimulator*), a qual encontra-se elevada em pacientes com LES (95, 96). Outras

anormalidades também podem ser destacadas, dentre elas: a diminuição do número dos linfócitos T supressores e citotóxicos (97); deficiência qualitativa e quantitativa de células T regulatórias (98); defeitos na atividade citolítica dos linfócitos T (96); aumento dos linfócitos T auxiliares (Th – *T helper*) CD4+ (99); ativação policlonal de linfócitos B e defeitos na tolerância destes linfócitos (97, 100-102); sinalização anormal das células do sistema imune caracterizada por aumento da resposta ao cálcio intracelular, hiperfosforilação de proteínas citosólicas e diminuição do fator nuclear-kapa B (NF- κ B – *nuclear fator-kappa B*) (103, 104); aumento do microquimerismo fetal, provendo antígenos para o sistema imune (105); elevação dos níveis circulantes de IFN- α e aumento da expressão da transcrição do RNA indutor de IFN- α pelas células mononucleares (106-109). A sinalização anormal dos TLR7 e 9, levando ao reconhecimento de autoantígenos contendo RNA e DNA, respectivamente, aliada ao aumento de células B de memória e plasmócitos expressando TLR9, apontam uma possível ativação de linfócitos B diretamente através do sistema imune inato, independente de células T, o que tem sido relacionado com predisposição e modulação do quadro clínico de pacientes com LES (110, 111).

Vários fatores ambientais têm sido associados ao desenvolvimento do LES. Infecções causadas por vírus, dentre eles o vírus Epstein Barr, poderiam contribuir para o desenvolvimento de autoimunidade, principalmente por mimetismo molecular (112). Outros vírus, como Citomegalovírus, Parvovírus B19 e alguns retrovírus, também estão relacionados, porém as evidências são controversas. Infecções como tripanossomíase e micobacterioses podem induzir a produção de anticorpos contra DNA e sintomas semelhantes ao LES (103, 113). Raios UVB podem estimular os queratinócitos a expressarem antígenos nucleares em sua superfície e aumentar a secreção de

citocinas que estimulam linfócitos B à produção de autoanticorpos (114, 115). Pó de sílica e tabagismo podem aumentar o risco de desenvolver LES (13, 116-118). Medicamentos, como procainamida, hidralazina e isoniazida podem desencadear lúpus induzido por droga, que é caracterizado pelo surgimento de manifestações clínicas e laboratoriais após exposição a estes fármacos, seguido por desaparecimento do quadro com a suspensão dos mesmos.

2.2 VITAMINA D

2.2.1 Considerações gerais

As vitaminas são compostos orgânicos essenciais para o metabolismo dos seres vivos. A vitamina D compreende compostos lipossolúveis, de origem vegetal (vitamina D₂ ou ergocalciferol) ou animal (vitamina D₃ ou colecalciferol), responsáveis principalmente pela manutenção do equilíbrio do metabolismo ósseo (119). Ambas as vitaminas D₂ e D₃ são metabolizadas pela mesma via e produzem metabólitos ativos com efeitos biológicos equivalentes (figura1) (120). A vitamina D pode ser encontrada em alguns alimentos e suplementos alimentares, porém sua maior fonte é proveniente da síntese cutânea, a partir da adequada exposição à radiação UVB da luz solar. Apenas cerca de 20% das necessidades corporais diárias são supridas pela alimentação, fato que a torna diferente da maioria das demais vitaminas que geralmente precisam ser adquiridas através da dieta (121). Poucos alimentos, como óleo de fígado de peixe, naturalmente contêm ou são enriquecidos com vitamina D. A vitamina D₂ é uma molécula com 28 carbonos e pode ser manufaturada através da irradiação UVB do ergosterol encontrado em fungos. A vitamina D₃ apresenta 27

carbonos e pode ser obtida através da irradiação UVB do 7-deidrocolesterol proveniente da lanolina (122). Diante destas particularidades envolvendo a biodisponibilidade da vitamina D nos seres humanos, entende-se o crescente interesse em pesquisas envolvendo este esteróide, visto que estudos em diferentes populações têm mostrado uma alta prevalência de hipovitaminose D e a implicação clínica deste achado ainda continua pouco entendida (123).

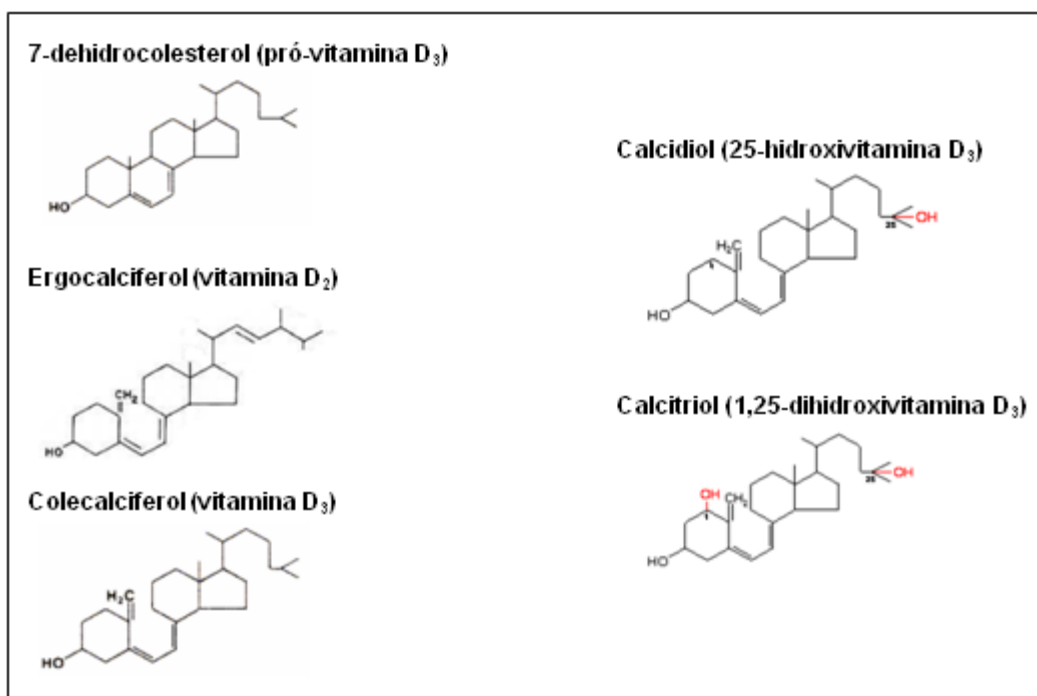


Figura 1 Estrutura química dos precursores e metabólitos da vitamina D

Fonte: Modificado de Oliveira, N.M.P., et. al. Papel da vitamina D na susceptibilidade para o diabetes mellitus tipo 1, 2010 (120).

A vitamina D tem um importante papel no metabolismo ósseo, incluindo absorção de cálcio e fósforo. A descoberta de que a maioria das células expressa o VDR, e algumas possuem também maquinaria enzimática para produzir formas ativas da vitamina D, tem gerado grande interesse nos seus potenciais efeitos biológicos, visto

que há evidências da influência desta vitamina na patogenia de doenças autoimunes, neoplásicas, osteometabólicas, infecciosas e cardiovasculares (123). Estudos sugerem que a vitamina D apresenta efeitos regulatórios em aproximadamente 900 genes (124). A identificação do VDR nas células responsáveis pela resposta imune, tais como células mononucleares, dendríticas e apresentadoras de antígeno e também nos linfócitos B e T, sugere que a vitamina D possa exercer atividade imunorregulatória (90, 91). No sistema imune, a vitamina D promove diferenciação e regulação de monócitos, linfócitos e células exterminadoras naturais (NK – *natural killer*), além de interferir na secreção de algumas citocinas. Entre os efeitos imunomoduladores, destacam-se a diminuição da produção de IL2, do interferon-gama (IFN- γ) e do fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α - *tumor necrosis factor-alpha*), inibição da expressão de IL6 e inibição da secreção e produção de autoanticorpos pelos linfócitos B (125-127).

Há grandes diferenças interpessoais quanto aos efeitos da vitamina D no organismo e, parte desta variação, deve-se a alterações nas sequências de DNA que sintetizam importantes proteínas envolvidas no metabolismo e na ação da vitamina D nas células-alvo. Um exemplo disto seria a mutação deletéria no gene *VDR* que causa raquitismo por resistência à 1,25-dihidroxitamina D [1,25(OH)₂D]. Outras variações genéticas mais sutis envolvem a presença de alguns polimorfismos no gene *VDR*, porém com consequências funcionais ainda pouco conhecidas (128-130). É possível que estes polimorfismos possam estar em desequilíbrio de ligação com polimorfismos verdadeiramente funcionais em algum outro lugar do gene, podendo explicar algumas associações descritas com determinadas doenças (130).

2.2.2 Metabolismo da vitamina D (figura 2)

Nos seres humanos, a pele é o único sítio capaz de produzir vitamina D (131). A pró-vitamina D (7-deidrocolesterol) é produzida na derme e epiderme e, sob ação da radiação UVB com comprimento de onda entre 290 e 315 nm, sofre conjugação de pontes de hidrogênio nos carbonos C5 e C7, dando origem a pré-vitamina D. Esta, após aproximadamente 24 horas, forma homodímeros, transformando-se em vitamina D (132).

A vitamina D proveniente da dieta é absorvida no intestino delgado e, juntamente com a vitamina D endógena, transportada até o fígado para ser metabolizada. O transporte ocorre principalmente através da proteína ligadora da vitamina D e, em menor proporção, com a albumina (132). A enzima hepática 25-hidroxilase (CYP27A1) incorpora um radical hidroxila na posição 25 da molécula da vitamina D, originando a forma 25-hidroxivitamina D [25(OH)D], também conhecida como calcidiol. Por manter níveis séricos mais estáveis, esta é forma usada para dosar a vitamina D do paciente. O fígado é o reservatório usual da vitamina D. O tecido adiposo também pode atuar como reservatório. Além do fígado, outros tecidos, como pele, intestino e rins são capazes de promover a 25-hidroxilação da vitamina D, porém em menor proporção (129). A 25(OH)D circula ligada à proteína ligadora da vitamina D até o rim, onde sofre nova hidroxilação, resultado da atividade das enzimas 1 α -hidroxilase (CYP27B1) ou 24-hidroxilase (CYP24A1). Os produtos são, respectivamente, a 1,25(OH)₂D (calcitriol), a forma mais ativa e a 24,25-dihidroxivitamina D [24,25(OH)₂D], um metabólito inativo hidrossolúvel, conhecido também como ácido calcitróico que é excretado na bile. Outros metabólitos da vitamina D também já foram descritos, mas com função biológica ainda

não conhecida (119). A concentração plasmática da $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ é regulada a partir dos níveis de $25(\text{OH})\text{D}$ e da atividade das enzimas 1α -hidroxilase e 24-hidroxilase. A enzima 1α -hidroxilase é regulada pelo paratormônio (PTH), pela concentração de fósforo e pelos níveis séricos de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ (133). Aumento do PTH e hipofosfatemia estimulam a enzima a sintetizar $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, enquanto a $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ exerce estímulo negativo sobre esta enzima (133, 134). Ambas, $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ e $25(\text{OH})\text{D}$ são degradadas, em parte, pela enzima 24-hidroxilase, através da síntese do ácido calcitróico (119). Os níveis séricos da $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, ao contrário da $25(\text{OH})\text{D}$, são fortemente controlados por mecanismos de retroalimentação, com níveis séricos bastante variados e meia-vida de cerca de 6 horas (132). Recentemente, a 1α -hidroxilase vem sendo descrita em outras células, especialmente as do sistema imune, o que torna possível a produção local da forma ativa da vitamina D, que passa a ter efeito parácrino/autócrino. É importante salientar que a 1α -hidroxilase extra-renal é regulada diferentemente da resposta vista ao PTH, cálcio e fósforo séricos (135). Particularmente, esta 1α -hidroxilase não é estimulada pelo PTH e, conseqüentemente, a produção de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ passa a depender das concentrações do substrato, ou seja, a $25(\text{OH})\text{D}$, o que pode determinar maior impacto na função da vitamina D nestes locais em casos de hipovitaminose D (135, 136). Por outro lado, alguns estudos sugerem um mecanismo de auto-regulação negativo exercido pela $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ sobre a síntese do seu precursor via inibição da 25-hidroxilase (137, 138).

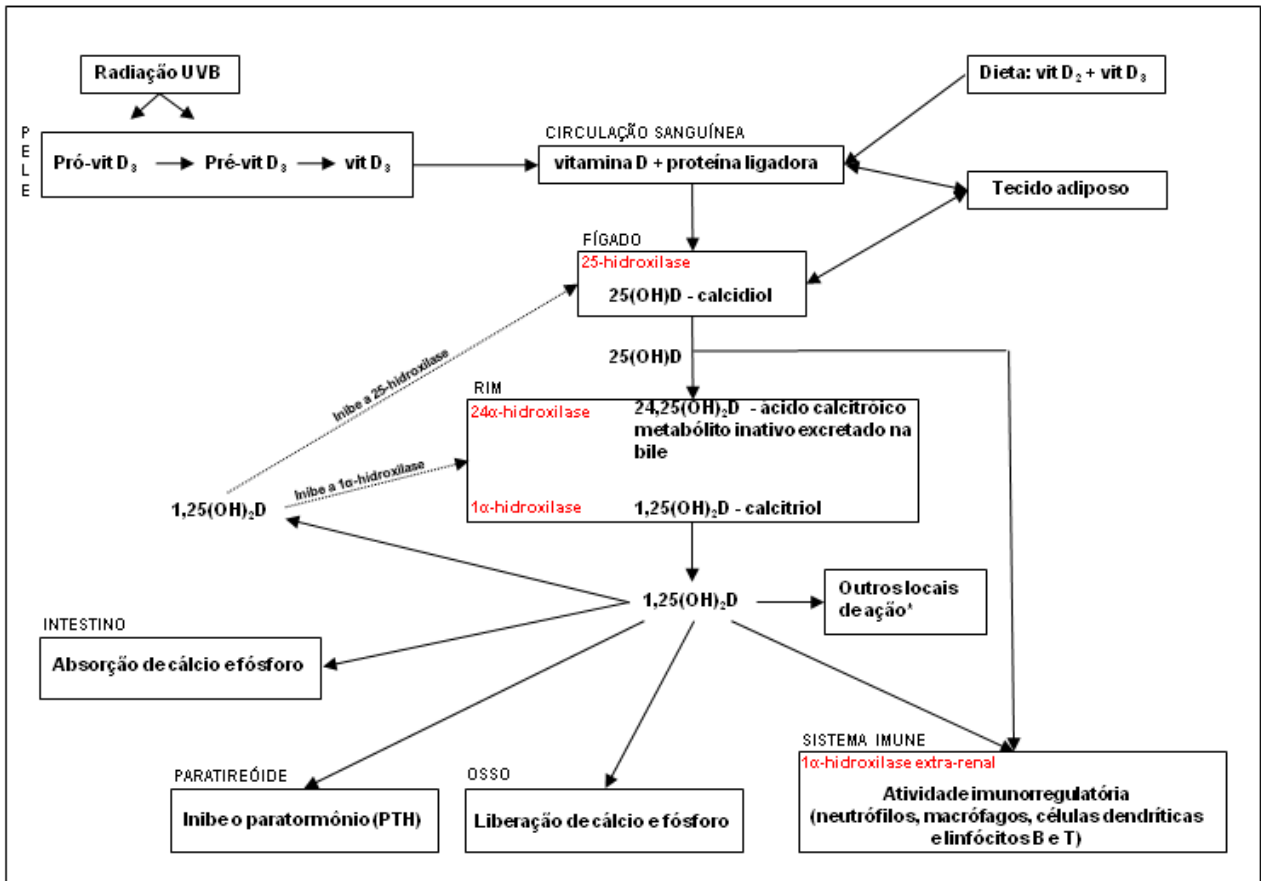


Figura 2 Metabolismo da vitamina D e principais efeitos biológicos

* Trato reprodutivo (útero, ovário, placenta, testículo e próstata), mamas, ilhotas pancreáticas, hipófise, tireóide, córtex adrenal, musculatura lisa e esquelética, coração, pele, cérebro e fígado.

2.2.3 Níveis séricos e deficiência da vitamina D

A vitamina D pode ser quantificada a partir da verificação da concentração da 25(OH)D, que representa sua forma circulante em maior quantidade, com meia-vida de aproximadamente três semanas. A 1,25(OH)₂D não costuma ser usada para avaliação da concentração da vitamina D, devido a sua curta meia-vida e sua baixa concentração, cerca de 1000 vezes inferior à da 25(OH)D (139). Além disso, no caso de deficiência de vitamina D, existe um aumento compensatório na secreção do PTH, o que estimula o rim a aumentar a produção de 1,25(OH)₂D. Deste modo, quando ocorre deficiência de

vitamina D e queda nos níveis de 25(OH)D, a concentração sérica de 1,25(OH)₂D se mantém dentro dos níveis normais ou mesmo elevados (140).

A interpretação dos níveis séricos da 25(OH)D é realizada a partir da variação do PTH (141). Usando a elevação do PTH como biomarcador refletindo baixos níveis fisiológicos da vitamina D, alguns estudos indicam que a deficiência da vitamina D deve ser definida como concentração sérica menor que 80 nmol/l (32 ng/ml) (92). Não existe consenso sobre a concentração sérica da 25(OH)D. Há uma concordância de que os níveis séricos de vitamina D sejam mantidos dentro de uma faixa que não induza o aumento do PTH (142, 143). A deficiência de vitamina D é definida pela maioria dos autores como níveis séricos de 25(OH)D inferiores a 50 nmol/l (20 ng/ml) (122, 144-146). Níveis séricos entre 50 e 75 nmol/l (20 e 30 ng/ml) seriam indicativos de insuficiência relativa de 25(OH)D e níveis iguais ou maiores que 75 nmol/l (30 ng/ml) poderiam ser considerados estado suficiente de vitamina D (132). Valores abaixo de 25 nmol/l (10 ng/ml) indicariam níveis criticamente baixos, segundo alguns autores (147). Intoxicação associada com hipervitaminose D poderia ser vista com níveis de 25(OH)D superiores a que 374 nmol/l (150 ng/ml) (123). O fator de conversão de nmol/l para ng/ml é multiplicar por 0,4 (148).

As concentrações plasmáticas ideais da 25(OH)D foram definidas, como visto anteriormente, a partir da sua influência sobre os níveis séricos do PTH, o que as tornam clinicamente relevantes para a manutenção da homeostase do cálcio. Entretanto, as concentrações ideais de 25(OH)D necessárias para o bom funcionamento do sistema imunológico ainda não foram definidas e podem ser distintas daqueles valores que atualmente são conhecidos (127). Além disso, estudos recentes vêm demonstrando que alguns polimorfismos genéticos envolvendo a proteína ligadora

da vitamina D, enzimas envolvidas no seu metabolismo, e o próprio VDR podem determinar variações nos níveis séricos da 25(OH)D e tornam ainda mais complexa a definição da concentração ideal de vitamina D, a qual pode ser diferente para cada indivíduo (149).

Há inúmeras causas para haver deficiência de vitamina D, dentre elas, redução da síntese cutânea e da absorção intestinal, além de doenças herdadas ou adquiridas do seu metabolismo ou que interfiram na responsividade à vitamina D (134). O quadro 1 resume as principais causas conhecidas de hipovitaminose D (123).

Quadro 1 Causas de hipovitaminose D

Redução da síntese cutânea

- Uso de bloqueadores solares
- Hiperpigmentação cutânea
- Envelhecimento
- Estação climática, latitude e horário do dia
- Grandes queimados e enxertos de pele

Redução da biodisponibilidade

- Situações relacionadas com má absorção intestinal, tais como fibrose cística, doença de Crohn, doença celíaca, doença de Whipple, desvio cirúrgico do trato digestivo, pancreatite crônica, fármacos que reduzem a absorção de colesterol
- Obesidade

Aumento da catabolismo

- Fármacos anticonvulsivantes e glicocorticóides

Amamentação

- Leite materno é pobre em vitamina D

Diminuição da síntese de 25(OH)D

- Hepatopatia crônica

Aumento da perda urinária de 25(OH)D

- Síndrome nefrótica

Diminuição da síntese da 1,25(OH)₂D

- Insuficiência renal crônica

Doenças hereditárias

- Raquitismo dependente de vitamina D tipos 1,2 e 3
- Raquitismo hipofosfatêmico autossômico dominante
- Raquitismo hipofosfatêmico ligado ao X

Doenças adquiridas

- Osteomalácia associada com tumores
- Hiperparatireoidismo primário
- Doenças granulomatosas
- Hipertireoidismo

Fonte: Modificado de Holick, M.F. Vitamin D deficiency. N Engl J Med. 2007 (123).

2.2.4 Receptor da vitamina D (VDR)

O VDR é um receptor nuclear de 50 kDa, pertencente à família dos receptores esteróides de classe 2, semelhante aos receptores do ácido retinóico e do hormônio tireoestimulante (119). Ele possui um domínio bem definido para ligação com o DNA e um domínio ainda não bem definido para ligação com a $1,25(\text{OH})_2\text{D}$. Além do clássico VDR nuclear, acredita-se que exista um VDR de membrana responsável por ações rápidas da vitamina D (150). Exemplo disto seria o aumento acelerado na absorção de cálcio pelo enterócito, em resposta ao aumento dos níveis plasmáticos de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, independente da sua ação genômica (132).

A $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ liga-se ao VDR nuclear e determina uma resposta genômica através da regulação da transcrição de alguns genes. As principais etapas envolvidas no controle da transcrição genética incluem a ligação da $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ ao VDR, heterodimerização com o receptor X retinóico (RXR), ligação deste heterodímero a sequências específicas do DNA, também conhecidas como elementos de resposta à vitamina D (VDRE – *vitamin D response elements*) localizados no DNA, nas regiões promotoras dos genes que são ativados pela vitamina D e recrutamento de outras proteínas nucleares para dentro do complexo transcricional (figura 3) (151).

Nas últimas décadas, diversos autores descreveram o VDR não somente em tecidos clássicos como ossos, rins e intestino, mas também em outros locais não clássicos, tais como células do sistema imune, trato reprodutivo (útero, ovário, placenta, testículo e próstata), mamas, sistema endocrinológico (ilhotas pancreáticas, hipófise, tireóide, paratireóide e córtex adrenal), musculatura lisa e esquelética, coração, pele, cérebro e fígado (152). Além da distribuição quase universal do VDR, algumas células (queratinócitos, monócitos, ossos e placenta) expressam a enzima 1α -hidroxilase que

produz a forma ativada da vitamina D *in situ*, podendo ocorrer efeito parácrino/autócrino deste hormônio (119, 135).

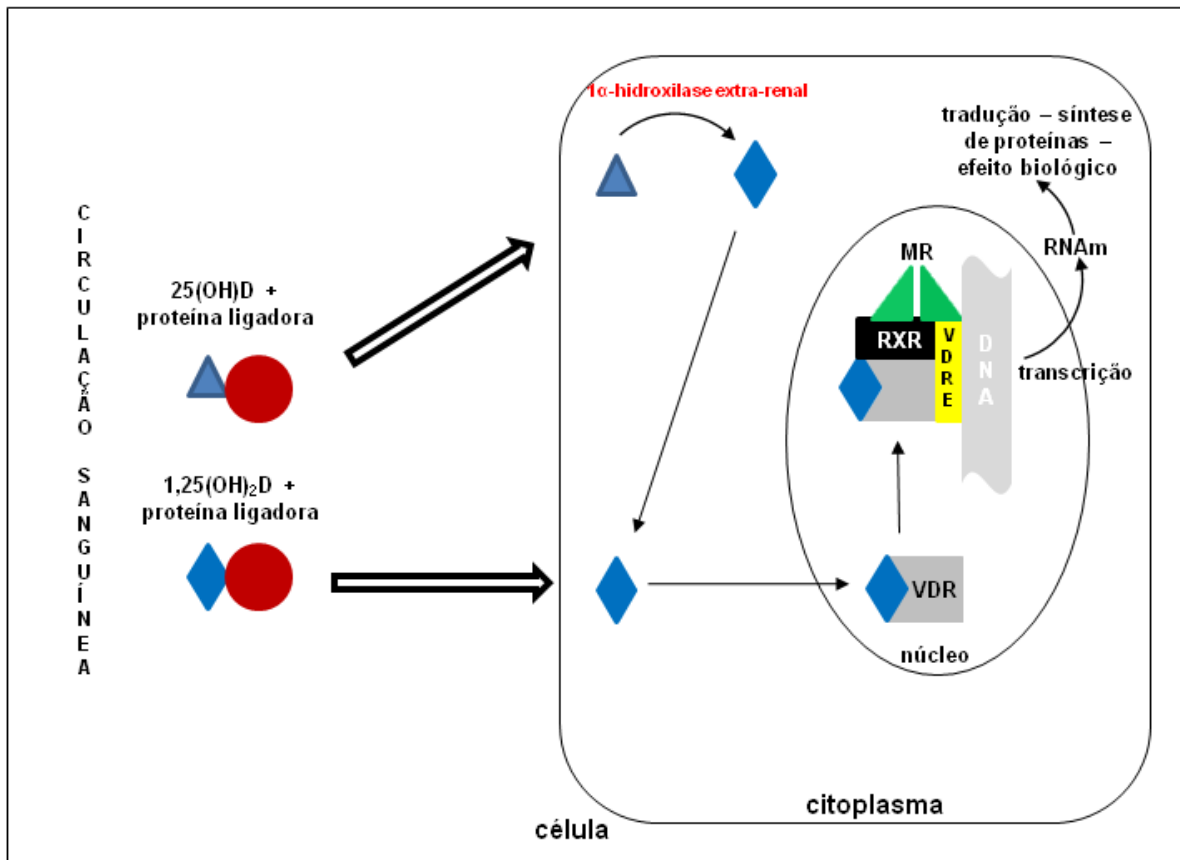


Figura 3 Mecanismo de ação da vitamina D

Abreviações: DNA (ácido desoxirribonucleico); MR (moléculas regulatórias da transcrição genética); RNAm (ácido ribonucleico mensageiro); RXR (receptor X retinóico); VDR (receptor da vitamina D); VDRE (elementos de resposta à vitamina D).

Fonte: Modificado de Oliveira, N.M.P., et. al. Papel da vitamina D na susceptibilidade para o diabetes mellitus tipo 1, 2010 (120).

2.2.5 Gene VDR

O VDR é sintetizado a partir de um gene localizado no cromossomo 12, na posição 12q13.1, conhecido como gene *VDR* (153). Este gene apresenta cerca de 100 kb e está muito próximo do gene *COL2A1*, responsável pela síntese da cadeia alfa 1 do colágeno tipo 2. Ele consiste basicamente em 9 exons distribuídos entre as regiões: 5' promotora e 3' regulatória (figura 4). Nesta última existe uma longa região 3' não

traduzida, conhecida como 3'UTR (*3' untranslated region*), envolvida na modulação da expressão genética, especialmente através da regulação da estabilidade do RNA mensageiro (154, 155).

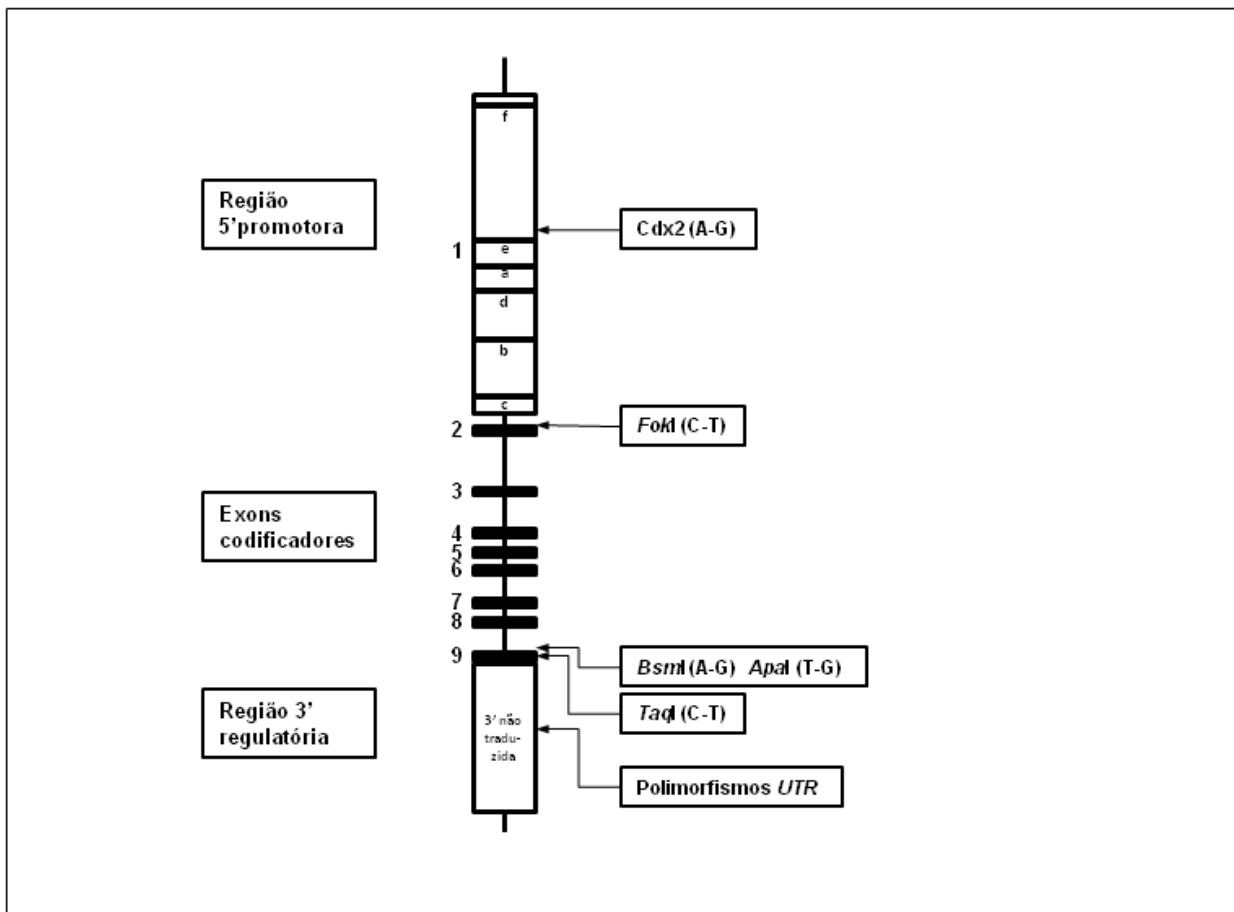


Figura 4 Estrutura do gene VDR e localização dos principais polimorfismos conhecidos

Fonte: Adaptado de Uitterlinden, A.G., et. al. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene*. 2004 (130).

2.2.6 Polimorfismos do gene VDR

O gene VDR apresenta alguns polimorfismos descritos especialmente em regiões promotoras próximas aos sítios f e c do *exon 1*, entre os *exons 2* e 9 e na região 3' não traduzida (figura 4) (130). A maioria dos polimorfismos identificados no gene VDR localiza-se em regiões regulatórias, o que pode determinar alterações na

expressão genética, mas não mudanças estruturais na sequência dos aminoácidos da proteína sintetizada. Alterações estruturais poderiam ocasionar profundas modificações funcionais, afetando as ligações do receptor com a vitamina D ou com ligantes do DNA, o que interferiria no metabolismo do cálcio, na proliferação celular e no sistema imune.

O polimorfismo *BsmI* (rs1544410) está localizado no *intron* 8, posição 63980, e resulta da substituição adenina-guanina (A-G) (156). Os polimorfismos *Apal* (rs7975232) e *TaqI* (rs731236) estão localizados na região 3' do gene. O polimorfismo *Apal* é definido pela substituição timina-guanina (T-G) no *intron* 8, na posição 64978, enquanto que polimorfismo *TaqI*, no *exon* 9, é definido pela substituição de citosina-timina (C-T) na posição 65058, resultando na troca do códon (ATC→ATT), mas mantendo o mesmo aminoácido isoleucina (157, 158). Baseados nestes polimorfismos, vários estudos investigaram a extensão do desequilíbrio de ligação entre eles. Atualmente, 3 haplótipos estão bem definidos envolvendo polimorfismos *Apal*, *BsmI* e *TaqI*: baT, BAAt e bAT (158). Os haplótipos baT e BAAt foram encontrados em 48% e 40% dos pacientes, respectivamente, em um estudo com indivíduos eurodescendentes (159). A relevância funcional destes polimorfismos ainda é pouco conhecida, apesar de algumas evidências mostrarem associação do haplótipo BAAt com maior estabilidade do RNA mensageiro (158).

A região 3' não traduzida contém diversos polimorfismos ainda pouco conhecidos. O polimorfismo VNTR (*variable number tandem repeat*) poliA apresenta pelo menos 12 diferentes alelos, mas o tamanho dos alelos segue basicamente uma distribuição bimodal. A partir disso, foi possível classificar estas variantes em formas curtas e longas, respectivamente, poliA curto e poliA longo. Há desequilíbrio de ligação entre estas mutações e os haplótipos descritos para os polimorfismos *BsmI*, *Apal* e

TaqI. O haplótipo baT está ligado com poliA longo e o haplótipo BAt está ligado com poliA curto (154, 158-160). O efeito funcional da presença destes haplótipos ainda precisa ser esclarecido.

O polimorfismo *Cdx2* (rs11574010) deriva de uma substituição adenina-guanina (A-G) localizada na porção 1e da região promotora do gene *VDR*, posição 4913, tendo sido primeiramente descrito em pacientes japoneses (161, 162). Acredita-se que esta região do gene tenha um importante papel na transcrição genética especialmente no intestino. Como neste órgão dá-se a absorção de cálcio, o polimorfismo *Cdx2* poderia influenciar a atividade da vitamina D nesta função. O alelo A demonstrou ser mais ativo que o alelo G na ligação do fator de transcrição, tendo maior atividade transcricional. Consequentemente, o alelo A incrementaria a expressão do receptor *VDR* no intestino, aumentando a transcrição das proteínas transportadoras de cálcio. Esta seria uma explicação plausível para o encontro de maior massa óssea em pacientes que são portadores do alelo A do polimorfismo *Cdx2* do gene *VDR* (163).

O polimorfismo *FokI* (rs2228570) resulta da substituição citosina-timina (C-T) na junção do *intron* 1 com o *exon* 2, na posição 30920, criando um códon de início adicional (ACG→ATG), 3 códons proximal ao local do início da transcrição. Este polimorfismo pode ser considerado um marcador genético independente, pois não parece estar em desequilíbrio de ligação com qualquer outro polimorfismo do gene *VDR*. A presença da variante *FokI*, definida como f (códon ATG), faz com que a proteína do *VDR* seja produzida de forma completa (427 aminoácidos), enquanto que a variante *FokI* definida como F (códon ACG), inicia a tradução de outro local e sintetiza uma versão levemente truncada da proteína do *VDR*, com três aminoácidos a menos (424 aminoácidos) (164, 165). A versão longa desta proteína, derivada do alelo f,

apresenta o aminoácido metionina na primeira posição (forma M1) e a versão curta, derivada do alelo F, apresenta este aminoácido na posição 4 (forma M4). Estudos *in vitro* demonstraram que a proteína curta parece ter atividade transcricional maior que a proteína longa (164, 166-168). Isto poderia ocasionar maior funcionalidade do VDR, o que modificaria o efeito determinado pela vitamina D em diferentes células e tecidos. O efeito do polimorfismo *FokI* na atividade transcricional de fatores de transcrição imuno-específicos, na proliferação de linfócitos e na síntese de proteínas por células do sistema imune apontam para a participação deste polimorfismo na imunorregulação (169).

Os níveis de 25(OH)D podem apresentar associação com polimorfismos do gene *VDR*, conforme dados recentes de uma metanálise que destacou 4 principais estudos (149). Em 2008, autores avaliando 99 pares de gêmeos canadenses com esclerose múltipla, ambos tendo a doença em 18 pares, encontraram níveis de 25(OH)D de $25,8 \pm 2,2$ ng/ml nos portadores do genótipo homocigoto para a proteína curta do VDR, comparado com $33,3 \pm 1,6$ ng/ml nos portadores dos genótipos heterocigoto e homocigoto para a proteína longa do VDR, relacionado ao polimorfismo *FokI* ($p=0,005$) (170). Concentrações significativamente menores de 25(OH)D também foram associadas com genótipo F/F comparado com genótipo f/f em pacientes com esclerose múltipla e controles saudáveis na Holanda (212 casos e 289 controles) (171). Apesar da influência nos níveis séricos da 25(OH)D, o papel do polimorfismo *FokI* do gene *VDR* no desenvolvimento da esclerose múltipla ainda é controverso (172). Estudo realizado nos Estados Unidos em 2008, com a participação de 1530 pacientes hispânicos e afrodescendentes da coorte *Insulin Resistance Atherosclerosis Family Study* não mostrou associação significativa entre níveis séricos de 25(OH)D e diversos

polimorfismos do gene *VDR*, dentre eles *FokI* e *BsmI* (173). Estudo semelhante realizado na Alemanha em 2006, havia encontrado resultados parecidos em 872 pacientes da coorte *German Asthma Family Study* (174). Estudos não referidos nesta metanálise também avaliaram níveis séricos da 25(OH)D e polimorfismos do gene *VDR*. Estudo publicado em 2005 e conduzido nos Estados Unidos, avaliando metabolismo e massa óssea em 99 adolescentes, encontrou níveis de 25(OH)D menores nos pacientes com genótipo F/F, quando comparados com genótipo f/f ($26,2 \pm 1,2$ ng/ml versus $32,4 \pm 1,6$ ng/ml, $p=0,009$) (175). Entretanto, estudo alemão envolvendo 1408 pacientes com câncer de mama não encontrou associação entre os níveis de 25(OH)D e o polimorfismo *FokI* (176). Estes achados sugerem possível participação do polimorfismo *FokI* do gene *VDR* na regulação dos níveis da 25(OH)D, mas estudos adicionais em diferentes populações são necessários para confirmá-la. Além disso, outros fatores genéticos envolvidos na produção, transporte e eliminação da vitamina D poderiam influenciar as concentrações da 25(OH)D e tornar ainda mais complexa a interpretação destes resultados.

Os polimorfismos envolvendo o gene *VDR* têm sido amplamente estudados em população eurodescendente, havendo menor número de estudos com outros grupos étnicos. Existe uma grande diferença na frequência destes polimorfismos nas populações estudadas. Há maior prevalência do alelo f do polimorfismo *FokI* em asiáticos e eurodescendentes, quando comparados com afrodescendentes, respectivamente 51%, 34% e 24%; enquanto o alelo B do polimorfismo *BsmI* é menos frequente em asiáticos, quando comparados com eurodescendentes e afrodescendentes, respectivamente 7%, 42% e 36% (130). Os haplótipos baT, BA_t e bAT foram encontrados em 43%, 39% e 11% dos pacientes eurodescendentes, 75%,

7% e 17% dos asiáticos e 26%, 16% e 59% dos afrodescendentes, respectivamente (130). O alelo mais comum encontrado em afrodescendentes têm sido o alelo A do polimorfismo Cdx2, com frequência de até 74% (162). Todas essas diferenças observadas entre os diversos grupos étnicos estudados podem ser decorrentes provavelmente da diversidade genética entre as populações.

2.2.7 Efeitos fisiológicos da vitamina D

A função clássica da $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ relaciona-se com a regulação da homeostase do cálcio. No duodeno, estimula o transporte ativo de cálcio para a corrente circulatória. A absorção de fósforo também é aumentada sob ação deste hormônio. Há participação na manutenção da massa óssea, permitindo a mineralização normal do osso e atuando na maturação do colágeno e da matriz (177). Atua de forma sinérgica com o PTH na ativação e maturação de osteoclastos, resultando na mobilização do cálcio do osso para a circulação. Nos rins, é responsável por incrementar a reabsorção de cálcio e fósforo. Além dos efeitos no metabolismo do cálcio, a $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ está envolvida na regulação do magnésio, liberação de insulina pelo pâncreas, secreção de prolactina pela hipófise, inibição da síntese de renina, aumento da contratilidade miocárdica, manutenção da musculatura esquelética e depuração de creatinina endógena (178-182).

A $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ interfere de forma direta ou indireta no controle de mais de 200 genes envolvidos na regulação do ciclo celular, diferenciação, apoptose e angiogênese, podendo determinar diminuição da proliferação de células normais ou neoplásicas (183). Estudos com animais evidenciaram que a $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ pode suprimir o crescimento tumoral por indução da apoptose, inibição da angiogênese e redução da

atividade invasiva das células cancerígenas (184). Na pele, atua de forma parácrina, inibindo a proliferação de queratinócitos e fibroblastos (132).

Vários efeitos imunomodulatórios também têm sido atribuídos à $1,25(\text{OH})_2\text{D}$. O sistema imune inato atua como primeira barreira na defesa contra invasão de microorganismos e a presença de alguns peptídeos antimicrobianos tem sido um fator importante neste contexto. Em humanos, pode ser encontrada a catelicidina, um peptídeo antimicrobiano produzido por macrófagos, monócitos e queratinócitos, com grande atividade contra bactérias, micobactérias, vírus e fungos (185, 186). A vitamina D ativada parece estimular a produção de catelicidina por estas células (187). Monócitos e macrófagos expostos a lipopolissacarídeos bacterianos ou à presença do *Mycobacterium tuberculosis* ativam o gene *VDR* e 1α -hidroxilase, levando ao aumento local da $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ e do seu receptor, o que eleva a produção de catelicidina. Esta resposta frente aos microorganismos parece ser atenuada em indivíduos que apresentam deficiência de $25(\text{OH})\text{D}$ (188).

Como descrito anteriormente, a vitamina D tem efeitos conhecidos sobre diversas células do sistema imune, dentre elas linfócitos T, linfócitos B e células dendríticas (90, 91). Cada uma destas células expressa *VDR* e 1α -hidroxilase, podendo produzir $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ localmente. Seus efeitos parácrinos/autócrinos dependem da adequada concentração da $25(\text{OH})\text{D}$, o que faz da deficiência de vitamina D um fator crucial no funcionamento do sistema imune (136). Nos linfócitos podem ser verificadas as seguintes alterações relacionadas à vitamina D: supressão do receptor de célula T, alteração no perfil de citocinas (diminuição de $\text{IFN-}\gamma$ e IL2 e aumento de $\text{TGF-}\beta 1$, IL4 , IL5 e IL10) e troca do fenótipo Th1 para Th2 , com maior tolerância imunológica; supressão das células Th17 envolvidas na autoimunidade e redução da produção de

IL17; supressão da produção de IL6 e IL12 e IL23; estímulo à atividade de células T regulatórias na supressão da proliferação de células T; inibição da produção de imunoglobulinas e interrupção da diferenciação de células B (136). Todos estes efeitos salientam o importante papel da vitamina D na resposta das células B e T, no processo inflamatório e na produção de autoanticorpos, o que potencialmente pode resultar em dano tecidual. Nas células dendríticas, os efeitos da vitamina D talvez sejam os mais relevantes para o fenômeno da autoimunidade, devido ao papel protetor e mantenedor da tolerância imunológica desempenhado por estas células (189), visto que a $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, atuando na sua maturação, diferenciação e migração (190), estimula a produção de células dendríticas mais tolerantes (136).

2.3 DOENÇAS ASSOCIADAS COM DEFICIÊNCIA DE VITAMINA D

Níveis séricos baixos de $25(\text{OH})\text{D}$ têm sido associados com diversas doenças, especialmente aquelas envolvendo o metabolismo ósseo (123). As taxas de absorção intestinal do cálcio e fósforo podem cair a 10% e 60% das taxas normais, respectivamente, em situações de hipovitaminose D (119). Com a diminuição do cálcio sérico, ocorre estímulo à produção e liberação do PTH pela glândula paratireóide, resultando em estado de hiperparatireoidismo compensatório. Este hormônio, por sua vez, estimula a produção de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ e a reabsorção de cálcio nos rins e é responsável pela ativação de osteoblastos que estimulam a transformação de pré-osteoclastos em osteoclastos maduros que dissolvem a matrix colagenosa mineralizada do osso, resultando em osteopenia, osteoporose e aumento do risco de fraturas (119, 122). Em adultos, estados crônicos de hipovitaminose D podem resultar em quadro

clínico de osteomalácia, caracterizado por dor óssea e pseudofraturas. Em crianças, podem surgir achados clássicos de raquitismo, com deformidades ósseas típicas.

A deficiência de vitamina D pode resultar em diminuição da força muscular, o que explicaria os achados de alguns estudos que evidenciaram redução do número de quedas após reposição de vitamina D, especialmente nos pacientes com níveis basais baixos (191, 192). Estudo mostrou que 93% das pessoas com idade entre 10 e 65 anos que foram admitidas na emergência de um hospital com dores osteomusculares crônicas, apresentavam deficiência de vitamina D (193). Em crianças com formas hereditárias de deficiência de vitamina D, há fraqueza muscular que rapidamente melhora com a reposição desta vitamina (194). No entanto, uma revisão sistemática de 8 estudos observacionais e 8 intervencionistas, avaliando o efeito da reposição de vitamina D sobre o sistema musculoesquelético, medido através da força muscular, marcha e balanço, em pacientes com idade acima de 65 anos, encontrou resultados conflitantes (195).

Alguns tipos de neoplasias têm sido associados com deficiência de vitamina D. Em estudo com animais, por exemplo, a ausência genética do VDR predispôs a lesões pré-malignas de mama e intestino (184). Estudos observacionais em humanos têm apontado um risco entre 30 e 50% maior para surgimento de neoplasia de cólon, próstata e mama em pacientes com níveis deficientes de 25(OH)D (183, 196).

Devido a extensa influência da vitamina D sobre o sistema imune, diversas doenças autoimunes e infecciosas têm sido estudadas em relação à sua potencial deficiência. A mais estudada até o momento, é o diabetes melito tipo 1 (DM1), onde diversos autores concordaram com esta relação, havendo dados que mostram que a suplementação de vitamina D na infância pode diminuir o risco de DM1 em 30% (197).

A esclerose múltipla parece ter um risco aumentado em 2 vezes em pacientes com níveis deficientes de vitamina D (172). O desenvolvimento do LES e maiores índices de atividade e cronicidade da doença têm sido associados com deficiência de vitamina D (198). Outras doenças como artrite reumatóide (AR) e doença inflamatória intestinal mostram resultados controversos (126). Estudo envolvendo 161 pacientes com doença indiferenciada do tecido conectivo mostrou níveis baixos da 25(OH)D, quando comparados com controles saudáveis ($33 \pm 13,4$ ng/ml versus $39,9 \pm 11,7$ ng/ml, respectivamente, $p=0,01$). O acompanhamento destes pacientes por 2,3 anos constatou que a progressão para uma doença definida do tecido conectivo, que ocorreu em 21,7% dos pacientes, foi maior entre aqueles com menores níveis de 25(OH)D ($14,7 \pm 6,45$ ng/ml versus $33,0 \pm 13,4$ ng/ml, $p=0,0001$) (199). Autores tentaram associar a deficiência de vitamina D a algumas infecções, mas os resultados não foram conclusivos. A reposição de vitamina D ainda tem um papel incerto na redução do número destas infecções. Quanto à associação da hipovitaminose D e tuberculose, os resultados dos estudos são mais convergentes. Afrodescendentes americanos são mais propensos a ter hipovitaminose D e esta seria uma das explicações para esta população apresentar maior risco de desenvolver tuberculose e evoluir com formas mais graves da doença do que os eurodescendentes americanos (188). Metanálise comparando concentrações de 25(OH)D em pacientes com tuberculose e controles saudáveis, encontrou maior risco de deficiência de vitamina D nos indivíduos doentes (200).

Outras doenças estão sendo relacionadas com níveis deficientes de vitamina D. Estudos em animais mostraram a influência da $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ no sistema renina-angiotensina e camundongos com ausência genética do VDR estão mais propensos a desenvolver HAS e hipertrofia cardíaca (180). Metanálise de 8 ensaios clínicos

randomizados com suplementação oral de vitamina D em pacientes hipertensos mostrou discreta, mas significativa, redução na pressão arterial diastólica (201). A avaliação destes pacientes é complicada visto que a obesidade, conhecido fator de risco para HAS, tem relação inversa com níveis séricos de 25(OH)D e, sendo assim, os resultados são muito controversos. Doença cardíaca isquêmica, insuficiência cardíaca e doença arterial periférica também têm mostrado associação com deficiência de vitamina D, mas a relação causal ainda é pouco entendida (202-204). Doenças neuropsiquiátricas, dentre elas a esquizofrenia e depressão, mostraram associação com deficiência de vitamina D pré-natal (205, 206).

2.4 DEFICIÊNCIA DE VITAMINA D EM PACIENTES COM LES (tabela 1)

A vitamina D exerce inúmeras ações sobre o sistema imunológico e várias descobertas têm sido feitas a respeito da sua influência na etiopatogenia de algumas doenças autoimunes. Há evidências de que a vitamina D administrada *in vitro* reduz a chance de desenvolver doença autoimune em modelos murinos experimentais de encefalite e lúpus (207). Um estudo brasileiro, realizado em 2000, com camundongos geneticamente predispostos a desenvolver LES, mostrou piores achados histopatológicos na biópsia renal no grupo que recebeu suplementação de vitamina D, sugerindo que a vitamina D pudesse ter atuado como fator agravante da doença. Estes dados não foram reproduzidos em outros estudos (208).

Em 1979, surgiu a primeira descrição que sugeriu a associação entre deficiência de vitamina D e LES em humanos. Foi um estudo com doze adolescentes lúpicas usuárias de glicocorticóides que evidenciou baixos níveis de 1,25(OH)₂D em 7 delas

(209). Em 1995, um estudo realizado na Dinamarca envolvendo 21 pacientes com LES, 29 com AR, 12 com osteoartrose (OA) e 72 indivíduos saudáveis, evidenciou níveis significativamente menores de 25(OH)D nos pacientes lúpicos em comparação com pacientes com OA ou controles saudáveis. Neste estudo, os níveis de 1,25(OH)₂D foram semelhantes entre os grupos (210). Em 2001, autores alemães avaliando 57 pacientes com LES, encontraram deficiência de vitamina D em 25 pacientes (43,9%), sendo que em 9 deles foram encontrados níveis de 25(OH)D abaixo de 5 ng/ml. Este estudo também evidenciou associação dos baixos níveis de 25(OH)D com maiores índices de atividade de doença (211). Em 2006, no estado da Carolina do Sul, nos Estados Unidos, 123 pacientes com LES e 240 controles saudáveis foram avaliados quanto aos níveis de 25(OH)D. Após ajustar os resultados para etnia, sexo, tabagismo e estação do ano, pacientes eurodescendentes tiveram níveis significativamente menores dos que os controles (21,6±12,9 ng/ml versus 27,4±15,7 ng/ml, p=0,04). Em afrodescendentes, esta diferença não foi estatisticamente significativa. De uma forma geral, 67% dos pacientes tinham deficiência de vitamina D, sendo que a dose média de 25(OH)D foi significativamente menor em afrodescendentes, quando comparados com eurodescendentes (15,9±9,4 ng/ml versus 31,3±14,9 ng/ml, p<0,01). Níveis críticos de vitamina D, definidos neste estudo como 25(OH)D abaixo de 10 ng/ml, foram encontrados em 22 pacientes lúpicos, sendo a fotossensibilidade e o acometimento renal, seus maiores preditores de risco [*odds ratio* (OR)=13,3, p<0,01 e OR=12,9, p<0,01, respectivamente] (147). Em 2008, estudo conduzido no Texas com 37 mulheres lúpicas, mostrou níveis de 25(OH)D abaixo de 32 ng/ml e abaixo de 19 ng/ml em 65% e 20% delas, respectivamente (212). No mesmo ano, autores espanhóis realizaram estudo transversal com 92 pacientes e evidenciaram níveis de 25(OH)D

abaixo de 30 ng/ml em 69 (75%) pacientes e abaixo de 10 ng/ml em 14 (15%) pacientes. O sexo feminino, uso de hidroxicloroquina, e reposição de cálcio e vitamina D foram preditores de maiores níveis de 25(OH)D. Fotossensibilidade e uso de fotoprotetor foram preditores para menores níveis de 25(OH)D. Houve uma correlação inversa entre dosagem de vitamina D e escala de fadiga e nenhum resultado significativo foi encontrado com índices de atividade e cronicidade da doença (213). Estes pacientes foram acompanhados por 2 anos com recomendação de reposição oral de vitamina D. Sessenta pacientes fizeram a reposição e uma melhora significativa foi vista na escala de fadiga, enquanto não houve influência nos índices de atividade e cronicidade da doença (214). Em 2009, estudo realizado em Chicago, incluiu 181 mulheres com LES e encontrou níveis médios de 25(OH)D de $27,1 \pm 11,9$ ng/ml, sendo que 62,2% das pacientes tinham dosagens inferiores a 30 ng/ml. Índices de atividade foram inversamente relacionados com os valores da 25(OH)D (215). Neste mesmo ano, autores estudando 165 pacientes com LES e 214 controles saudáveis na Arábia Saudita, evidenciaram níveis insuficientes (>20 e <30 ng/ml) e deficientes (≤ 20 ng/ml) de 25(OH)D significativamente menores nos casos (98% versus 55% e 89,7% versus 20%, respectivamente, $p < 0,0001$). Níveis médios de 25(OH)D foram de $9,4 \pm 5,5$ ng/ml nos pacientes, valor significativamente menor do que nos controles, cuja dosagem foi de $25,8 \pm 11,6$ ng/ml ($p < 0,0001$) (216). No ano de 2010, mais cinco estudos avaliaram níveis de 25(OH)D em pacientes com LES. Autores canadenses da cidade de Toronto, estudaram 124 pacientes com LES e encontraram níveis de 25(OH)D menores que 32 ng/ml em 66,7% e inferiores a 16 ng/ml em 17,9% dos indivíduos, estando associados com estação do ano, dose cumulativa de glicocorticóide e creatinina sérica (217). Em Nova Iorque, 198 pacientes com LES foram selecionados consecutivamente e destes,

29,3% dos afroamericanos e 11,8% dos hispânicos apresentavam níveis de 25(OH)D abaixo de 10 ng/ml. O grau de deficiência teve correlação inversa com a atividade da doença ($r=-0,234$, $p=0,002$) (218). Estudo coreano avaliando 102 pacientes com LES e 42 controles evidenciou diferença estatisticamente significativa nas dosagens da 25(OH)D ($42,49\pm 15,08$ ng/ml versus $52,72\pm 15,19$ ng/ml, $p<0,001$), mas não encontrou diferença nos índices de atividade e cronicidade de doença (219). Trezentos e setenta e oito pacientes foram avaliados em estudo multicêntrico envolvendo Europa e Israel, com o objetivo de verificar a relação da 25(OH)D com índices de atividade. Os autores concluíram que deficiência de vitamina D correlacionou-se com aumento dos índices de atividade (220). Na China também parece haver menores níveis de vitamina D em pacientes com LES, quando comparados com controles saudáveis (221). Estudo com 177 pacientes húngaros mostrou níveis médios de 25(OH)D de $26,88\pm 13,25$ ng/ml, com 18,1% deles apresentando dosagem normal (≥ 30 ng/ml), 44,6% insuficiente (15-30 ng/ml) e 37,3% deficiente (≤ 15 ng/ml). Houve uma relação inversa entre 25(OH)D e índice de atividade de doença (222).

Em 2001, estudo canadense com 25 pacientes lúpicas e 25 fibromiálgicas, não encontrou diferença estatisticamente significativa nos níveis de 25(OH)D entre os grupos (18,6 ng/ml versus 20,6 ng/ml, $p>0,05$), mesmo após ajustar para idade, reposição de vitamina D e uso de bloqueador solar. Os autores encontraram níveis menores de 1,25(OH)₂D nas pacientes com LES (74,4 pmol/l versus 90,1 pmol/l, $p<0,05$) e a possível explicação deste achado seria o uso de hidroxicloroquina que poderia inibir a conversão de 25(OH)D em 1,25(OH)₂D. Quatorze das 25 pacientes com LES e 12 das 25 com fibromialgia tinham deficiência de vitamina D, definida como valor abaixo de 20 ng/ml (223).

Poucos estudos avaliaram níveis de vitamina D em crianças e adolescentes com LES. Um deles, dosou 25(OH)D em indivíduos de 5 a 21 anos e 207 controles saudáveis. Níveis muito baixos de 25(OH)D, definidos pelos autores como inferior a 10 ng/ml, foram significativamente mais frequentes nos pacientes com LES do que nos controles (36,8% versus 9,2%, $p < 0,001$). Houve uma relação inversa estatisticamente significativa entre índice de atividade de doença e níveis da 25(OH)D, principalmente quando encontrava-se abaixo de 20 ng/ml (224).

Indivíduos afrodescendentes, nos Estados Unidos, têm três vezes mais chance de ter LES do que os indivíduos eurodescendentes (225). Esta maior incidência de LES em afrodescendentes não pode ser explicada somente por fatores genéticos, desde que a doença é pouco frequente na população de mesma etnia vivendo no continente africano. Esta diferença poderia ser explicada pela baixa penetração da luz solar na pele escura, resultando em baixos níveis de vitamina D e aumento do risco de desenvolver LES (226).

A influência da reposição de vitamina D foi estudada em uma coorte de 186389 pacientes femininas do *Nurses' Health Study*. De 1980 até 2002, foram confirmados 190 casos incidentes de LES e as doses utilizadas de vitamina D não tiveram relação com o risco de desenvolver esta doença (227).

No Brasil, autores avaliaram 36 pacientes com LES e 26 controles saudáveis na cidade de São Paulo. Os pacientes foram divididos em 2 grupos, quanto aos valores do índice de atividade da doença (SLEDAI – *systemic lupus erythematosus disease activity index*): grupo 1 com SLEDAI médio de 22 (14-27) e grupo 2 com SLEDAI médio de 1,7 (0-3). Os níveis de 25(OH)D foram significativamente mais baixos no grupo 1, quando comparados com o grupo 2 ou com indivíduos saudáveis (17,4±12,5 ng/ml versus

44,6±14,5 ng/ml versus 37,8±13,7 ng/ml, respectivamente, $p < 0,001$). A conclusão foi que há uma prevalência aumentada de deficiência de vitamina D nos pacientes com LES, especialmente naqueles com doença ativa (228). Estudo piloto realizado no Rio Grande do Sul, envolvendo 68 pacientes com LES, encontrou níveis de 25(OH)D abaixo de 20 ng/ml em 20% dos casos (229).

Anticorpos anti-vitamina D foram estudados em pacientes com LES em 2007. Participaram deste estudo 171 indivíduos com LES, 56 com síndrome do anticorpo antifosfolípide, 18 com pênfigo vulgar e 78 controles saudáveis. Anticorpos anti-vitamina D foram encontrados em 7 (4%), 2 (3,5%) e 2 (11%) pacientes, respectivamente. Não houve associação com níveis séricos de 25(OH)D. A única associação significativa foi com a presença do anti-dsDNA nos pacientes com LES (230). Em 2010, estudo realizado na Polônia tentou correlacionar a presença do anticorpo contra 1,25(OH)₂D com níveis séricos de 25(OH)D. Foram incluídos 45 pacientes e 49 controles, sendo que destes, somente 30 dosaram o anticorpo contra 1,25(OH)₂D. A dosagem da 25(OH)D foi significativamente menor nos pacientes (15,03±8,69 ng/ml versus 23,37±12,34 ng/ml, respectivamente, $p = 0,0005$). Anticorpos contra 1,25(OH)₂D foram encontrados em 4 (8,88%) pacientes. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi vista entre estes anticorpos e a dosagem da vitamina D (231). O papel destes autoanticorpos ainda precisa ser melhor estabelecido.

Evidências sugerem que a deficiência de vitamina D tem associação com LES, apesar de existirem vários fatores de confusão que podem alterar seus níveis séricos nesta doença. A associação com características clínicas e laboratoriais é menos evidente, com estudos mostrando resultados contraditórios e pode depender da população avaliada. O papel dos autoanticorpos anti-vitamina D ainda é incerto.

Avaliação genética do *VDR* em conjunto com níveis séricos de vitamina D em pacientes com LES ainda não foi realizada.

Tabela 1 Principais estudos sobre níveis séricos da vitamina D no LES

Autor (referência)	Local	Objetivo	Tipo de estudo População	Resultados relevantes
Szodoray, <i>et. al.</i> , 2010 (222)	Hungria	Comparar achados clínicos e laboratoriais com níveis de 25(OH)D.	Transversal 177 pacientes	Nível médio: 26,88±13,25 ng/ml. 25(OH)D: 18,1% ≥30 ng/ml, 44,6% entre 15 e 30 ng/ml e 37,3% <15 ng/ml. Relação inversa com pericardite (p=0,013), doença neuropsiquiátrica (p=0,01), TVP (p=0,014) e índice de atividade (SLEDAI) (p=0,038).
Broder, <i>et.al.</i> , 2010 (232)	EUA	Comparar risco de deficiência de 25(OH)D (<20 ng/ml) em três doenças crônicas (LES, AR e DM1).	Transversal 123 LES / 100 AR / 3691 DM1	25(OH)D <20 ng/ml: 59% LES, 47% AR e 67% DM1 (A). 25(OH)D <20 ng/ml: 67% LES, 50% AR e 59% DM1 (hispânicos). Comparado com o LES, deficiência de vitamina D tem OR de 1,1 (IC95%: 0,62-2,1) na AR e 2,0 no DM1 (IC95%: 1,3-3,1).
Zheng, <i>et. al.</i> , 2010 (221)	China	Avaliar massa óssea e níveis de 25(OH)D e 1,25(OH) ₂ D.	Caso-controle	Massa óssea reduzida nos casos (p<0,05). Níveis de 25(OH)D e 1,25(OH) ₂ D reduzidos nos casos (p<0,01).
Amital, <i>et. al.</i> , 2010 (220)	Europa e Israel	Avaliar relação da atividade de doença com níveis de vitamina D.	Transversal 378 pacientes	Baixos níveis de 25(OH)D tiveram relação inversa com atividade de doença (SLEDAI-2K e ECLAM) (r=-0,12, p=0,018).

Bogaczewicz, <i>et. al.</i> , 2010 (231)	Polônia	Comparar níveis séricos de 25(OH)D em pacientes e controles.	Caso-controle 45/49	Níveis de 25(OH)D menores nos casos (15,03±8,69 versus 23,37±12,34 ng/ml, p=0,0005) → OR=3,28 (p=0,005). 25(OH)D <10 ng/ml: 35,55%; 10-20 ng/ml: 35,55%; 20-30 mg/ml: 22,22% e >30 ng/ml: 6,66% dos casos.
Kim, <i>et. al.</i> , 2010 (219)	Coréia	Comparar níveis séricos de 25(OH)D em pacientes e controles. Avaliar associação com índices de atividade e cronicidade de doença nos casos.	Caso-controle 104/49	Níveis de 25(OH)D menores nos casos (42,49±15,08 versus 52,72±15,19 ng/ml, p<0,001). 25(OH)D <30 ng/ml: 16,3% nos casos. OR para insuficiência de vitamina D foi de 4,6 (IC95% 1,0-20,7). Não foi encontrada associação com índices de atividade (SLEDAI) e cronicidade (SLICC/ACR) de doença.
Cutillas-Marco, <i>et. al.</i> , 2010 (233)	Espanha	Avaliar níveis séricos de 25(OH)D em pacientes com LC e comparar com controles normais.	Caso-controle 55/37	Níveis reduzidos nos pacientes (p=0,038).
Ben-Zvi, <i>et. al.</i> , 2010 (218)	EUA	Avaliar relação da atividade de doença com níveis de 25(OH)D.	Transversal 198 pacientes	Níveis médios de 25(OH)D: 14,2 ng/ml (A); 20,5 ng/ml (hispânicos); 22 ng/ml (asiáticos) e 29 ng/ml (E). O grau de deficiência de vitamina D teve relação inversa com atividade de doença (SLEDAI) (r=-0,234, p=0,002).
Tolozza, <i>et. al.</i> , 2010 (217)	Canadá	Dosar níveis séricos de 25(OH)D e 1,25(OH) ₂ D. Avaliar associação com achados clínicos da doença, índices de atividade e cronicidade e massa óssea.	Transversal 124 pacientes	25(OH)D <32 ng/ml: 66,7%. 25(OH)D <16 ng/ml: 17,9%. 25(OH)D associou-se diretamente com estação do ano (verão) e creatinina e inversamente com dose de glicocorticoide.

				1,25(OH) ₂ D associou-se diretamente com etnia (A) e inversamente com a creatinina e dose de glicocorticoide.
Damanhour, <i>et. al.</i> , 2009 (216)	Arábia Saudita	Comparar níveis séricos de 25(OH)D em pacientes e controles.	Caso-controle 165/214	Níveis de 25(OH)D menores nos casos (9,4±5,5 ng/ml versus 25,8±11,6, p<0,0001). Níveis <30ng/ml: 98,8% versus 55% e níveis ≤20 ng/ml: 89,7% versus 20%, p<0,0001).
Wu, <i>et. al.</i> , 2009 (215)	EUA	Avaliar associação entre níveis séricos de 25(OH)D e DCV.	Transversal 181 pacientes	Nível médio: 27,1±11,9 ng/ml. 25(OH)D ≤15 ng/ml: 20%. 25(OH)D <30 ng/ml: 62,2%. Em modelo ajustado, maior atividade de doença (SLEDAI) associou-se com baixos níveis de 25(OH)D.
Wright, <i>et. al.</i> , 2009 (224)	EUA	Avaliar relação da atividade de doença com níveis de vitamina D em crianças e adolescentes.	Caso-controle 38/207	Níveis de 25(OH)D: 18,0 ng/ml versus 22,3 ng/ml (p=0,004). 25(OH)D <10 ng/ml: 36,8% versus 9,2%, p<0,001). 25(OH)D <20 ng/ml → maior índice de atividade de doença (SLEDAI).
Borba, <i>et. al.</i> , 2009 (228)	Brasil	Avaliação de atividade de doença, marcadores inflamatórios, metabolismo ósseo e vitamina D.	Caso-controle 36/26	Níveis de 25(OH)D: Grupo 1 (SLEDAI 14-27): 17,4±12,5ng/ml; Grupo 2 (SLEDAI 0-3): 44,6±14,5 ng/ml e Grupo 3 (controle): 37,8±13,7 ng/ml (p<0,001). Níveis de 25(OH)D tiveram relação inversa com atividade de doença (r=-0,65, p<0,001) no grupo 1.
Lora, <i>et.al.</i> , 2008 (229)	Brasil	Determinar níveis de 25(OH) nos pacientes.	Transversal 68 pacientes	Níveis de 25(OH)D: 30,9±14,1 ng/ml. 25(OH)D <20 ng/ml: 20%.

Ruiz- Irastorza, <i>et.al.</i> , 2008 (213)	Espanha	Determinar prevalência, preditores e consequências clínicas da deficiência de vitamina D, definida como 25(OH)D <10 ng/ml.	Transversal 92 pacientes	Níveis <30 ng/ml: 75%. Níveis <10 ng/ml: 15%. Deficiência de vitamina D → maior grau de fadiga (VAS 0-10) (5,32 versus 4,03, p=0,08). Não encontrou associação com índices de atividade (SLEDAI) e cronicidade SLICC/ACR) de doença.
Thudi, <i>et. al.</i> , 2008 (212)	EUA	Determinar prevalência de insuficiência de vitamina D, definida como 25(OH)D<32 ng/ml.	Transversal 37 pacientes	Níveis <32 ng/ml e <19 ng/ml em 65% e 20% dos pacientes, respectivamente. Níveis <19 ng/ml associaram-se com pior estado funcional (HAQ) e fadiga (VAS 0-10) nos pacientes.
Carvalho, <i>et. al.</i> , 2007 (230)	Israel	Determinar níveis de 25(OH)D e anticorpos anti-vitamina D nos pacientes.	Transversal 171 pacientes	Frequência de anti-vitamina D: 4%. 25(OH)D: 28,4±9,6 ng/ml no grupo anti-vitamina D (+) versus 26,4±13,9 ng/ml no grupo (-) (p=0,35).
Kamen, <i>et. al.</i> , 2006 (147)	EUA	Comparar níveis séricos de 25(OH)D em pacientes e controles. Avaliar associação com características clínicas e laboratoriais nos pacientes.	Caso-controle 123/240	Níveis reduzidos nos casos (21,6±12,9 ng/ml versus 27,4±15,7 ng/ml). Resultado significativo nos E (p=0,04). Indivíduos A versus E: 15,9±9,4 ng/ml versus 31,3±14,9 ng/ml (p<0,01). Níveis <10ng/ml → fotossensibilidade (OR=12,9, IC95% 2,2-75,5) e nefrite (OR=13,3, IC95% 2,3-76,7).
Huisman, <i>et. al.</i> , 2001 (223)	Canadá	Comparar níveis de vitamina D nos grupos.	Caso-controle 25 LES / 25 FM	Níveis de 25(OH)D: LES (18,6 ng/ml) e FM (20,6 ng/ml) → NS Níveis de 1,25(OH) ₂ D: LES (74,4 pmol/l) e FM (90,1 pmol/l) → NS Menores níveis de 1,25(OH) ₂ D → uso de hidroxiquina.

Becker, <i>et. al.</i> , 2001 (211)	Alemanha	Avaliar influência da 25(OH)D sobre o metabolismo ósseo, massa óssea e índices de atividade de doença.	Transversal 57 pacientes	25/57: níveis reduzidos. 9/57: abaixo de 5 ng/ml. Níveis baixos foram associados com maior índice de atividade de doença.
Muller <i>et. al.</i> , 1995 (210)	Dinamarca	Avaliar níveis de vitamina D em diferente grupos.	Caso-controle 21 LES / 29 AR / 12 OA / 72 controles	Níveis reduzidos de 25(OH)D no LES em comparação com OA (p=0,0168) e controles saudáveis (p=0,0008).
O'Regan <i>et. al.</i> , 1979 (209)	não referido	Avaliar níveis de 1,25(OH) ₂ D.	Série de casos 12 adolescentes	7/12 apresentavam níveis reduzidos.

Abreviações: A (afrodescendente); AR (artrite reumatóide), DCV (doença cardiovascular); DM1 (diabetes melito tipo 1); E (eurodescendente); ECLAM (*European consensus lupus activity measurement*); EUA (Estados Unidos da América); VAS (*visual analogue scale*); FM (fibromialgia); HAQ (*Health Assessment Questionnaire*); IC95% (intervalo de confiança 95%); LC (lúpus cutâneo); LES (lúpus eritematoso sistêmico); NS (não significativo); OA (osteoartrose); OR (*odds ratio*); SLEDAI (*systemic lupus erythematosus disease activity index*); SLEDAI-2K (*systemic lupus erythematosus disease activity index - 2000*); SLICC/ACR (*systemic lupus international collaborating clinics / American College of Rheumatology*); TVP (trombose venosa profunda).

2.5 DOENÇAS ASSOCIADAS COM POLIMORFISMOS DO GENE *VDR*

A influência de alguns polimorfismos do gene *VDR* tem sido estudada em diversas condições clínicas. Evidências, muitas vezes controversas, da participação destas alterações genéticas, já foram encontradas em pacientes com hiperparatireoidismo, nefrolitíase, cânceres, calcificação arterial coronariana, hipertensão arterial sistêmica e doenças autoimunes (129).

Em pacientes com insuficiência renal crônica há evidências da influência dos polimorfismos *BsmI* e *FokI* nos níveis do PTH. O alelo b do polimorfismo *BsmI* relacionou-se com maiores níveis de PTH e, conseqüentemente, com maior frequência

de hiperparatireodismo secundário (234). Neste sentido, o alelo B associou-se com menores níveis de PTH, principalmente naqueles pacientes que eram homozigotos (235). Pacientes com o genótipo BB apresentaram maior redução do PTH após injeção de calcitriol (236). Estas evidências sugerem que o polimorfismo *Bsml* pode interferir no funcionamento do VDR localizado nas glândulas paratireóides em pacientes com insuficiência renal crônica. Além dos achados com o polimorfismo *Bsml*, estudo sugeriu associação entre o alelo F do polimorfismo *FokI* e níveis aumentados de PTH. Este resultado foi contrário ao esperado, visto que este alelo associa-se com maior atividade funcional do VDR. Uma possível explicação seria que menores níveis de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ associadas ao alelo F, poderiam exercer menor controle negativo sobre o PTH (237).

Os polimorfismos *Bsml*, *FokI*, *TaqI* e *Apal* foram estudados em pacientes com nefrolitíase. Evidências significativas, porém discrepantes entre os autores, mostraram associação com hipercalciúria e hipocitratúria, condições predisponentes à formação de cálculos renais (129).

Quanto a influência genética destes polimorfismos no metabolismo ósseo, há evidências que pacientes com genótipo b/b têm maior massa óssea do que pacientes com genótipo B/B (158, 238), entretanto muitos resultados controversos têm sido encontrados. O efeito do polimorfismo *Bsml* é pequeno (2-3%) e fortemente influenciado por fatores não genéticos (129).

Recente revisão sobre a participação dos polimorfismos do VDR em neoplasias concluiu que há significativa associação com câncer de mama (*FokI*, *Bsml*, *TaqI*, *Apal*, e poliA), pele (*FokI* e *Bsml*), cólon (*FokI* e *Bsml*), ovário (*FokI* e *Apal*), bexiga (*FokI*) e rim (*TaqI* e *Apal*). Para todas elas, no entanto, há dados muito controversos. As associações mais robustas são para câncer de mama (*Bsml* e *FokI*), próstata (*FokI*) e

melanoma (*FokI*). Quanto ao prognóstico, há maior associação com câncer de próstata (*FokI*), mama (*BsmI* e *TaqI*), rim (*TaqI*) e melanoma (*BsmI*) (239).

O papel exercido pela vitamina D e seu receptor nas células T e também nas células β pancreáticas ajuda a entender melhor a relação que os polimorfismos *FokI*, *BsmI*, *TaqI* e *Apal* têm mostrado com DM1 e 2 (129). Os alelos B e F parecem ter relação com resistência à insulina, maior índice de massa corporal e dislipidemia. Dados de diferentes populações, entretanto, mostraram resultados discrepantes (240).

Outras doenças também evidenciam relação com polimorfismos do *VDR* (129). Estudos sugerem influência do polimorfismo *BsmI* na pressão arterial e em doenças cardiovasculares. Ambos alelos B e b já foram relacionados com hipertensão arterial sistêmica e o alelo B com susceptibilidade a infarto do miocárdio e espessamento miointimal das artérias (241-243). Diversos autores de diferentes partes do mundo têm sugerido a influência de alguns polimorfismos do *VDR* em pacientes com LES, AR, doença de Crohn, doença de Graves, doença celíaca, cirrose biliar primária, hepatite autoimune, doença de Addison, esclerose múltipla e infecção por tuberculose.

Existe vasta quantidade de informação sobre o papel dos polimorfismos do gene *VDR* na susceptibilidade de doenças, porém, os resultados são conflitantes. É possível que a influência da etnia, da dieta, da latitude e de fatores ainda desconhecidos determine esta variabilidade. O conhecimento ainda pequeno das consequências funcionais a nível molecular e celular destas alterações genéticas também contribuir para estes achados.

2.6 POLIMORFISMOS DO GENE *VDR* EM PACIENTES COM LES

Estudos têm mostrado associação do polimorfismo *BsmI* do gene *VDR* com LES (tabela 2). Em 2000, estudo com 58 pacientes japoneses com LES evidenciou maior frequência do genótipo B/B (15,5% versus 5,7%, $p < 0,0001$), quando comparados com controles sem a doença. Adicionalmente, foi encontrada uma maior frequência do genótipo b/b nos pacientes que apresentavam doença renal com síndrome nefrótica (61,5% versus 35,7%, $p = 0,0034$) (244). Em 2002, autores chineses, estudando 47 pacientes com LES e 90 controles saudáveis, encontraram maior frequência do alelo B nos casos (39,4% versus 8,3%, $OR = 7,4$, $p < 0,0001$). Neste estudo não foi encontrada associação com manifestações clínicas ou laboratoriais da doença (245). Em 2006 e 2010, estudos com 101 pacientes tailandeses e 60 iranianos, respectivamente, não encontraram associação entre o polimorfismo *BsmI* e LES ou manifestações clínicas e laboratoriais da doença (246, 247). Em 2002, um único estudo avaliou o polimorfismo *FokI* em 52 pacientes com LES e 90 controles saudáveis e não encontrou diferenças significativas quanto as frequências alélicas e genotípicas (248).

Em 2010, foi publicada uma metanálise com os estudos que avaliaram os polimorfismos *BsmI* e *FokI* em pacientes com LES. Os autores mostraram que o alelo B tem associação significativa com LES ($OR = 3,58$, $p = 0,007$). Os resultados com o polimorfismo *FokI* não foram significativos (249).

Tabela 2 Estudos de associação entre os polimorfismos do gene *VDR* e LES

Autor (referência)	País (etnicidade)	População (casos/controles)	Polimorfismo estudado	Resultados relevantes
Ozaki <i>et. al.</i> , 2000 (244)	Japão (asiáticos)	58/87	<i>BsmI</i>	LES e alelo B ($p < 0,0001$) Nefrite e alelo b ($p = 0,03$)
Huang <i>et. al.</i> , 2002 (245)	Taiwan (asiáticos)	47/90	<i>BsmI</i>	LES e alelo B ($p < 0,0001$)
Huang <i>et. al.</i> , 2002 (248)	Taiwan (asiáticos)	52/90	<i>FokI</i>	Não significativos
Sakulpipatsin <i>et. al.</i> , 2006 (246)	Tailândia (asiáticos)	101/194	<i>BsmI</i>	Não significativos
Abbasi <i>et. al.</i> , 2010 (247)	Irã (não referida)	60/45	<i>BsmI</i>	Não significativos

A deficiência da vitamina D associa-se com o LES e índices de atividade e cronicidade da doença, porém com algumas discrepâncias nas diferentes populações estudadas, muito provavelmente por fatores de confusão relacionados com etnia, dieta, uso de medicações, latitude, obesidade, tabagismo, variações climáticas, ritmo circadiano e fatores ainda desconhecidos. O papel dos polimorfismos do gene *VDR* ainda é limitado, visto que há poucas evidências sobre sua influência na ação da vitamina D. Evidências recentes sugerem sua influência nos níveis de 25(OH)D em pacientes com esclerose múltipla. Embasados no conhecimento atual, propomos a realização de um estudo caso-controle para avaliar se polimorfismos *BsmI* e *FokI* do gene *VDR* conferem risco aumentado para o desenvolvimento do LES na nossa população. Adicionalmente, haverá dosagem da 25(OH)D nos pacientes e avaliação da

possibilidade de associação dos seus níveis séricos com os polimorfismos *BsmI* e *FokI* ou com expressões clínicas e laboratoriais da doença. Este trabalho poderá contribuir para melhorar o entendimento do papel da vitamina D e do seu receptor nos pacientes com LES, especialmente no nosso meio.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a frequência dos polimorfismos *BsmI* e *FokI* do gene *VDR* em uma população de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e comparar com controles saudáveis.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1- Avaliar possível associação entre os polimorfismos *BsmI* e *FokI* do gene *VDR* e expressões clínicas e laboratoriais encontradas em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico.

2- Determinar os níveis séricos de vitamina D nos pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e investigar se existe associação da sua concentração com os polimorfismos *BsmI* e *FokI* do gene *VDR*.

2- Identificar possível associação entre os níveis séricos de vitamina D e manifestações clínicas e laboratoriais encontradas em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico.

4 REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA

1. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1997 Sep;40(9):1725.
2. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1982 Nov;25(11):1271-7.
3. Edworthy SM, Zatarain E, McShane DJ, Bloch DA. Analysis of the 1982 ARA lupus criteria data set by recursive partitioning methodology: new insights into the relative merit of individual criteria. *J Rheumatol.* 1988 Oct;15(10):1493-8.
4. Lawrence RC, Helmick CG, Arnett FC, Deyo RA, Felson DT, Giannini EH, et al. Estimates of the prevalence of arthritis and selected musculoskeletal disorders in the United States. *Arthritis Rheum.* 1998 May;41(5):778-99.
5. D'Cruz DP, Khamashta MA, Hughes GR. Systemic lupus erythematosus. *Lancet.* 2007 Feb 17;369(9561):587-96.
6. Chakravarty EF, Bush TM, Manzi S, Clarke AE, Ward MM. Prevalence of adult systemic lupus erythematosus in California and Pennsylvania in 2000: estimates obtained using hospitalization data. *Arthritis Rheum.* 2007 Jun;56(6):2092-4.

7. Pons-Estel GJ, Alarcon GS, Scofield L, Reinlib L, Cooper GS. Understanding the epidemiology and progression of systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum.* 2010 Feb;39(4):257-68.
8. Uramoto KM, Michet CJ, Jr., Thumboo J, Sunku J, O'Fallon WM, Gabriel SE. Trends in the incidence and mortality of systemic lupus erythematosus, 1950-1992. *Arthritis Rheum.* 1999 Jan;42(1):46-50.
9. Fessel WJ. Systemic lupus erythematosus in the community. Incidence, prevalence, outcome, and first symptoms; the high prevalence in black women. *Arch Intern Med.* 1974 Dec;134(6):1027-35.
10. Michet CJ, Jr., McKenna CH, Elveback LR, Kaslow RA, Kurland LT. Epidemiology of systemic lupus erythematosus and other connective tissue diseases in Rochester, Minnesota, 1950 through 1979. *Mayo Clin Proc.* 1985 Feb;60(2):105-13.
11. Danchenko N, Satia JA, Anthony MS. Epidemiology of systemic lupus erythematosus: a comparison of worldwide disease burden. *Lupus.* 2006;15(5):308-18.
12. Vilar MJ, Sato EI. Estimating the incidence of systemic lupus erythematosus in a tropical region (Natal, Brazil). *Lupus.* 2002;11(8):528-32.

13. Cooper GS, Dooley MA, Treadwell EL, St Clair EW, Parks CG, Gilkeson GS. Hormonal, environmental, and infectious risk factors for developing systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1998 Oct;41(10):1714-24.
14. Lahita RG. The role of sex hormones in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol.* 1999 Sep;11(5):352-6.
15. Hochberg MC. The incidence of systemic lupus erythematosus in Baltimore, Maryland, 1970-1977. *Arthritis Rheum.* 1985 Jan;28(1):80-6.
16. McCarty DJ, Manzi S, Medsger TA, Jr., Ramsey-Goldman R, LaPorte RE, Kwok CK. Incidence of systemic lupus erythematosus. Race and gender differences. *Arthritis Rheum.* 1995 Sep;38(9):1260-70.
17. Schaller J. Lupus in childhood. *Clin Rheum Dis.* 1982 Apr;8(1):219-28.
18. Ballou SP, Khan MA, Kushner I. Clinical features of systemic lupus erythematosus: differences related to race and age of onset. *Arthritis Rheum.* 1982 Jan;25(1):55-60.
19. Cervera R, Khamashta MA, Font J, Sebastiani GD, Gil A, Lavilla P, et al. Morbidity and mortality in systemic lupus erythematosus during a 10-year period: a comparison of early and late manifestations in a cohort of 1,000 patients. *Medicine (Baltimore).* 2003 Sep;82(5):299-308.

20. Kasitanon N, Magder LS, Petri M. Predictors of survival in systemic lupus erythematosus. *Medicine (Baltimore)*. 2006 May;85(3):147-56.

21. Boumpas DT, Fessler BJ, Austin HA, 3rd, Balow JE, Klippel JH, Lockshin MD. Systemic lupus erythematosus: emerging concepts. Part 2: Dermatologic and joint disease, the antiphospholipid antibody syndrome, pregnancy and hormonal therapy, morbidity and mortality, and pathogenesis. *Ann Intern Med*. 1995 Jul 1;123(1):42-53.

22. Hochberg MC. Systemic lupus erythematosus. *Rheum Dis Clin North Am*. 1990 Aug;16(3):617-39.

23. Pistiner M, Wallace DJ, Nessim S, Metzger AL, Klinenberg JR. Lupus erythematosus in the 1980s: a survey of 570 patients. *Semin Arthritis Rheum*. 1991 Aug;21(1):55-64.

24. Tucker LB, Menon S, Schaller JG, Isenberg DA. Adult- and childhood-onset systemic lupus erythematosus: a comparison of onset, clinical features, serology, and outcome. *Br J Rheumatol*. 1995 Sep;34(9):866-72.

25. Boumpas DT, Austin HA, 3rd, Fessler BJ, Balow JE, Klippel JH, Lockshin MD. Systemic lupus erythematosus: emerging concepts. Part 1: Renal, neuropsychiatric, cardiovascular, pulmonary, and hematologic disease. *Ann Intern Med*. 1995 Jun 15;122(12):940-50.

26. Jonsson H, Nived O, Sturfelt G. Outcome in systemic lupus erythematosus: a prospective study of patients from a defined population. *Medicine (Baltimore)*. 1989 May;68(3):141-50.
27. Swaak AJ, Nossent JC, Smeenk RJ. Prognostic factors in systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int*. 1991;11(3):127-32.
28. Abu-Shakra M, Urowitz MB, Gladman DD, Gough J. Mortality studies in systemic lupus erythematosus. Results from a single center. I. Causes of death. *J Rheumatol*. 1995 Jul;22(7):1259-64.
29. Callahan LF, Pincus T. Associations between clinical status questionnaire scores and formal education level in persons with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1990 Mar;33(3):407-11.
30. Ward MM, Studenski S. Clinical manifestations of systemic lupus erythematosus. Identification of racial and socioeconomic influences. *Arch Intern Med*. 1990 Apr;150(4):849-53.
31. Cervera R, Khamashta MA, Font J, Sebastiani GD, Gil A, Lavilla P, et al. Systemic lupus erythematosus: clinical and immunologic patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients. The European Working Party on Systemic Lupus Erythematosus. *Medicine (Baltimore)*. 1993 Mar;72(2):113-24.

32. Ward MM, Studenski S. Systemic lupus erythematosus in men: a multivariate analysis of gender differences in clinical manifestations. *J Rheumatol.* 1990 Feb;17(2):220-4.
33. Lu LJ, Wallace DJ, Ishimori ML, Scofield RH, Weisman MH. Review: Male systemic lupus erythematosus: a review of sex disparities in this disease. *Lupus.* 2010 Feb;19(2):119-29.
34. Boddaert J, Huong DL, Amoura Z, Wechsler B, Godeau P, Piette JC. Late-onset systemic lupus erythematosus: a personal series of 47 patients and pooled analysis of 714 cases in the literature. *Medicine (Baltimore).* 2004 Nov;83(6):348-59.
35. Bertoli AM, Alarcon GS, Calvo-Alen J, Fernandez M, Vila LM, Reveille JD. Systemic lupus erythematosus in a multiethnic US cohort. XXXIII. Clinical [corrected] features, course, and outcome in patients with late-onset disease. *Arthritis Rheum.* 2006 May;54(5):1580-7.
36. Ward MM, Polisson RP. A meta-analysis of the clinical manifestations of older-onset systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1989 Oct;32(10):1226-32.
37. Urowitz MB, Bookman AA, Koehler BE, Gordon DA, Smythe HA, Ogryzlo MA. The bimodal mortality pattern of systemic lupus erythematosus. *Am J Med.* 1976 Feb;60(2):221-5.

38. Iriya SM, Capelozzi VL, Calich I, Martins MA, Lichtenstein A. Causes of death in patients with systemic lupus erythematosus in Sao Paulo, Brazil: a study of 113 autopsies. *Arch Intern Med.* 2001 Jun 25;161(12):1557.
39. Chogle AR, Chakravarty A. Cardiovascular events in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis : emerging concepts, early diagnosis and management. *J Assoc Physicians India.* 2007 Jan;55:32-40.
40. Manzi S, Selzer F, Sutton-Tyrrell K, Fitzgerald SG, Rairie JE, Tracy RP, et al. Prevalence and risk factors of carotid plaque in women with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1999 Jan;42(1):51-60.
41. Schur PH, Hahn BH. Epidemiology and pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *UpToDate.* 2010(18.2).
42. Alarcon-Segovia D, Alarcon-Riquelme ME, Cardiel MH, Caeiro F, Massardo L, Villa AR, et al. Familial aggregation of systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, and other autoimmune diseases in 1,177 lupus patients from the GLADEL cohort. *Arthritis Rheum.* 2005 Apr;52(4):1138-47.
43. Deapen D, Escalante A, Weinrib L, Horwitz D, Bachman B, Roy-Burman P, et al. A revised estimate of twin concordance in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1992 Mar;35(3):311-8.

44. Arnett FC, Reveille JD, Wilson RW, Provost TT, Bias WB. Systemic lupus erythematosus: current state of the genetic hypothesis. *Semin Arthritis Rheum.* 1984 Aug;14(1):24-35.
45. Murashima A, Fukazawa T, Hirashima M, Takasaki Y, Oonishi M, Niijima S, et al. Long term prognosis of children born to lupus patients. *Ann Rheum Dis.* 2004 Jan;63(1):50-3.
46. Yang Y, Lhotta K, Chung EK, Eder P, Neumair F, Yu CY. Complete complement components C4A and C4B deficiencies in human kidney diseases and systemic lupus erythematosus. *J Immunol.* 2004 Aug 15;173(4):2803-14.
47. Lee-Kirsch MA, Gong M, Chowdhury D, Senenko L, Engel K, Lee YA, et al. Mutations in the gene encoding the 3'-5' DNA exonuclease TREX1 are associated with systemic lupus erythematosus. *Nat Genet.* 2007 Sep;39(9):1065-7.
48. Deng Y, Tsao BP. Genetic susceptibility to systemic lupus erythematosus in the genomic era. *Nat Rev Rheumatol.* 2010 Dec;6(12):683-92.
49. Graham RR, Hom G, Ortmann W, Behrens TW. Review of recent genome-wide association scans in lupus. *J Intern Med.* 2009 Jun;265(6):680-8.

50. Veit TD, Cordero EA, Mucenic T, Monticielo OA, Brenol JC, Xavier RM, et al. Association of the HLA-G 14 bp polymorphism with systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2009 Apr;18(5):424-30.
51. Barcellos LF, May SL, Ramsay PP, Quach HL, Lane JA, Nititham J, et al. High-density SNP screening of the major histocompatibility complex in systemic lupus erythematosus demonstrates strong evidence for independent susceptibility regions. *PLoS Genet*. 2009 Oct;5(10):e1000696.
52. Yang W, Zhao M, Hirankarn N, Lau CS, Mok CC, Chan TM, et al. ITGAM is associated with disease susceptibility and renal nephritis of systemic lupus erythematosus in Hong Kong Chinese and Thai. *Hum Mol Genet*. 2009 Jun 1;18(11):2063-70.
53. Dijkstra HM, Bijl M, Fijnheer R, Scheepers RH, Oost WW, Jansen MD, et al. Fcγ receptor polymorphisms in systemic lupus erythematosus: association with disease and in vivo clearance of immune complexes. *Arthritis Rheum*. 2000 Dec;43(12):2793-800.
54. Magnusson V, Johanneson B, Lima G, Odeberg J, Alarcon-Segovia D, Alarcon-Riquelme ME. Both risk alleles for FcγRIIA and FcγRIIIA are susceptibility factors for SLE: a unifying hypothesis. *Genes Immun*. 2004 Mar;5(2):130-7.

55. Monticielo OA, Chies JA, Mucenic T, Rucatti GG, Junior JM, da Silva GK, et al. Mannose-binding lectin gene polymorphisms in Brazilian patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2010 Mar;19(3):280-7.
56. Kyogoku C, Tsuchiya N, Wu H, Tsao BP, Tokunaga K. Association of Fcγ receptor IIA, but not IIB and IIIA, polymorphisms with systemic lupus erythematosus: A family-based association study in Caucasians. *Arthritis Rheum*. 2004 Feb;50(2):671-3.
57. Jonsen A, Gunnarsson I, Gullstrand B, Svenungsson E, Bengtsson AA, Nived O, et al. Association between SLE nephritis and polymorphic variants of the CRP and FcγR3A genes. *Rheumatology (Oxford)*. 2007 Sep;46(9):1417-21.
58. Kyogoku C, Dijstelbloem HM, Tsuchiya N, Hatta Y, Kato H, Yamaguchi A, et al. Fcγ receptor gene polymorphisms in Japanese patients with systemic lupus erythematosus: contribution of FCGR2B to genetic susceptibility. *Arthritis Rheum*. 2002 May;46(5):1242-54.
59. Morris DL, Roberts AL, Witherden AS, Tarzi R, Barros P, Whittaker JC, et al. Evidence for both copy number and allelic (NA1/NA2) risk at the FCGR3B locus in systemic lupus erythematosus. *Eur J Hum Genet*. 2010 Sep;18(9):1027-31.
60. Siriboonrit U, Tsuchiya N, Sirikong M, Kyogoku C, Bejrachandra S, Suthipinittharm P, et al. Association of Fcγ receptor IIb and IIIb polymorphisms

with susceptibility to systemic lupus erythematosus in Thais. *Tissue Antigens*. 2003 May;61(5):374-83.

61. Guan M, Yu B, Wan J, Zhang X, Wu Z, Zhong Q, et al. Identification of BANK1 polymorphisms by unlabelled probe high resolution melting: association with systemic lupus erythematosus susceptibility and autoantibody production in Han Chinese. *Rheumatology (Oxford)*. 2010 Nov 14.

62. Kaufman KM, Kelly JA, Herring BJ, Adler AJ, Glenn SB, Namjou B, et al. Evaluation of the genetic association of the PTPN22 R620W polymorphism in familial and sporadic systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2006 Aug;54(8):2533-40.

63. Manku H, Graham DS, Vyse TJ. Association of the co-stimulator OX40L with systemic lupus erythematosus. *J Mol Med*. 2009 Mar;87(3):229-34.

64. Lee YH, Woo JH, Choi SJ, Ji JD, Song GG. Association of programmed cell death 1 polymorphisms and systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Lupus*. 2009 Jan;18(1):9-15.

65. Fan Y, Tao JH, Zhang LP, Li LH, Ye DQ. Association of BLK (rs13277113, rs2248932) polymorphism with systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Mol Biol Rep*. 2010 Dec 9.

66. Graham RR, Kozyrev SV, Baechler EC, Reddy MV, Plenge RM, Bauer JW, et al. A common haplotype of interferon regulatory factor 5 (IRF5) regulates splicing and expression and is associated with increased risk of systemic lupus erythematosus. *Nat Genet.* 2006 May;38(5):550-5.
67. Kariuki SN, Crow MK, Niewold TB. The PTPN22 C1858T polymorphism is associated with skewing of cytokine profiles toward high interferon-alpha activity and low tumor necrosis factor alpha levels in patients with lupus. *Arthritis Rheum.* 2008 Sep;58(9):2818-23.
68. Kariuki SN, Kirou KA, MacDermott EJ, Barillas-Arias L, Crow MK, Niewold TB. Cutting edge: autoimmune disease risk variant of STAT4 confers increased sensitivity to IFN-alpha in lupus patients in vivo. *J Immunol.* 2009 Jan 1;182(1):34-8.
69. Abelson AK, Delgado-Vega AM, Kozyrev SV, Sanchez E, Velazquez-Cruz R, Eriksson N, et al. STAT4 associates with systemic lupus erythematosus through two independent effects that correlate with gene expression and act additively with IRF5 to increase risk. *Ann Rheum Dis.* 2009 Nov;68(11):1746-53.
70. Niewold TB, Kelly JA, Flesch MH, Espinoza LR, Harley JB, Crow MK. Association of the IRF5 risk haplotype with high serum interferon-alpha activity in systemic lupus erythematosus patients. *Arthritis Rheum.* 2008 Aug;58(8):2481-7.

71. Jacob CO, Zhu J, Armstrong DL, Yan M, Han J, Zhou XJ, et al. Identification of IRAK1 as a risk gene with critical role in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Apr 14;106(15):6256-61.
72. Musone SL, Taylor KE, Lu TT, Nititham J, Ferreira RC, Ortmann W, et al. Multiple polymorphisms in the TNFAIP3 region are independently associated with systemic lupus erythematosus. *Nat Genet*. 2008 Aug 1.
73. Lee YH, Bae SC, Choi SJ, Ji JD, Song GG. Associations between vitamin D receptor polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Mol Biol Rep*. 2010 Nov 26.
74. Fraser PA, Ding WZ, Mohseni M, Treadwell EL, Dooley MA, St Clair EW, et al. Glutathione S-transferase M null homozygosity and risk of systemic lupus erythematosus associated with sun exposure: a possible gene-environment interaction for autoimmunity. *J Rheumatol*. 2003 Feb;30(2):276-82.
75. Theofilopoulos AN. The basis of autoimmunity: Part II. Genetic predisposition. *Immunol Today*. 1995 Mar;16(3):150-9.
76. Li J, May W, McMurray RW. Pituitary hormones and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2005 Dec;52(12):3701-12.

77. McMurray RW, May W. Sex hormones and systemic lupus erythematosus: review and meta-analysis. *Arthritis Rheum.* 2003 Aug;48(8):2100-10.
78. Cutolo M, Sulli A, Seriolo B, Accardo S, Masi AT. Estrogens, the immune response and autoimmunity. *Clin Exp Rheumatol.* 1995 Mar-Apr;13(2):217-26.
79. Cohen-Solal JF, Jeganathan V, Grimaldi CM, Peeva E, Diamond B. Sex hormones and SLE: influencing the fate of autoreactive B cells. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2006;305:67-88.
80. Lahita RG. Sex hormones and the immune system--Part 1. Human data. *Baillieres Clin Rheumatol.* 1990 Apr;4(1):1-12.
81. Scofield RH, Bruner GR, Namjou B, Kimberly RP, Ramsey-Goldman R, Petri M, et al. Klinefelter's syndrome (47,XXY) in male systemic lupus erythematosus patients: support for the notion of a gene-dose effect from the X chromosome. *Arthritis Rheum.* 2008 Aug;58(8):2511-7.
82. Moser KL, Kelly JA, Lessard CJ, Harley JB. Recent insights into the genetic basis of systemic lupus erythematosus. *Genes Immun.* 2009 Jul;10(5):373-9.
83. Costenbader KH, Feskanich D, Stampfer MJ, Karlson EW. Reproductive and menopausal factors and risk of systemic lupus erythematosus in women. *Arthritis Rheum.* 2007 Apr;56(4):1251-62.

84. Clemens LE, Siiteri PK, Stites DP. Mechanism of immunosuppression of progesterone on maternal lymphocyte activation during pregnancy. *J Immunol.* 1979 May;122(5):1978-85.
85. Arnalich F, Benito-Urbina S, Gonzalez-Gancedo P, Iglesias E, de Miguel E, Gijon-Banos J. Inadequate production of progesterone in women with systemic lupus erythematosus. *Br J Rheumatol.* 1992 Apr;31(4):247-51.
86. Blanco-Favela F, Quintal-Alvarez G, Leanos-Miranda A. Association between prolactin and disease activity in systemic lupus erythematosus. Influence of statistical power. *J Rheumatol.* 1999 Jan;26(1):55-9.
87. Tiskievicz F, Mallmann ES, Xavier RM, Brenol JCT. Prolactina e Macroprolactina no Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES). *Revista Brasileira de Reumatologia.* 2005 mai./jun.;45(3):191-4.
88. Goh KL, Wang F. Thyroid disorders in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.* 1986 Jul;45(7):579-83.
89. Weetman AP, Walport MJ. The association of autoimmune thyroiditis with systemic lupus erythematosus. *Br J Rheumatol.* 1987 Oct;26(5):359-61.
90. Arnson Y, Amital H, Shoenfeld Y. Vitamin D and autoimmunity: new aetiological and therapeutic considerations. *Ann Rheum Dis.* 2007 Sep;66(9):1137-42.

91. Deluca HF, Cantorna MT. Vitamin D: its role and uses in immunology. *Faseb J*. 2001 Dec;15(14):2579-85.
92. Kamen D, Aranow C. Vitamin D in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol*. 2008 Sep;20(5):532-7.
93. Elkon K. Autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol*. 1995 Sep;7(5):384-8.
94. Munoz LE, Gaipf US, Franz S, Sheriff A, Voll RE, Kalden JR, et al. SLE--a disease of clearance deficiency? *Rheumatology (Oxford)*. 2005 Sep;44(9):1101-7.
95. Cancro MP, D'Cruz DP, Khamashta MA. The role of B lymphocyte stimulator (BLyS) in systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest*. 2009 May;119(5):1066-73.
96. Stohl W. Impaired polyclonal T cell cytolytic activity. A possible risk factor for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1995 Apr;38(4):506-16.
97. Klinman DM, Steinberg AD. Inquiry into murine and human lupus. *Immunol Rev*. 1995 Apr;144:157-93.
98. Bonelli M, Smolen JS, Scheinecker C. Treg and lupus. *Ann Rheum Dis*. 2010 Jan;69 Suppl 1:i65-6.

99. Tsokos GC. Lymphocytes, cytokines, inflammation, and immune trafficking. *Curr Opin Rheumatol.* 1995 Sep;7(5):376-83.
100. Mohan C, Datta SK. Lupus: key pathogenic mechanisms and contributing factors. *Clin Immunol Immunopathol.* 1995 Dec;77(3):209-20.
101. Prodeus AP, Goerg S, Shen LM, Pozdnyakova OO, Chu L, Alicot EM, et al. A critical role for complement in maintenance of self-tolerance. *Immunity.* 1998 Nov;9(5):721-31.
102. Yurasov S, Wardemann H, Hammersen J, Tsuiji M, Meffre E, Pascual V, et al. Defective B cell tolerance checkpoints in systemic lupus erythematosus. *J Exp Med.* 2005 Mar 7;201(5):703-11.
103. Steinberg AD. Insights into the basis of systemic lupus. *J Autoimmun.* 1995 Dec;8(6):771-75.
104. Tsokos GC, Wong HK, Enyedy EJ, Nambiar MP. Immune cell signaling in lupus. *Curr Opin Rheumatol.* 2000 Sep;12(5):355-63.
105. Abbud Filho M, Pavarino-Bertelli EC, Alvarenga MP, Fernandes IM, Toledo RA, Tajara EH, et al. Systemic lupus erythematosus and microchimerism in autoimmunity. *Transplant Proc.* 2002 Nov;34(7):2951-2.

106. Baechler EC, Batliwalla FM, Karypis G, Gaffney PM, Ortmann WA, Espe KJ, et al. Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Mar 4;100(5):2610-5.
107. Bennett L, Palucka AK, Arce E, Cantrell V, Borvak J, Banchereau J, et al. Interferon and granulopoiesis signatures in systemic lupus erythematosus blood. *J Exp Med*. 2003 Mar 17;197(6):711-23.
108. Kirou KA, Lee C, George S, Louca K, Papagiannis IG, Peterson MG, et al. Coordinate overexpression of interferon-alpha-induced genes in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2004 Dec;50(12):3958-67.
109. Ronnblom L, Eloranta ML, Alm GV. The type I interferon system in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2006 Feb;54(2):408-20.
110. Papadimitraki ED, Choulaki C, Koutala E, Bertias G, Tsatsanis C, Gergianaki I, et al. Expansion of toll-like receptor 9-expressing B cells in active systemic lupus erythematosus: implications for the induction and maintenance of the autoimmune process. *Arthritis Rheum*. 2006 Nov;54(11):3601-11.
111. Christensen SR, Shlomchik MJ. Regulation of lupus-related autoantibody production and clinical disease by Toll-like receptors. *Semin Immunol*. 2007 Feb;19(1):11-23.

112. James JA, Harley JB, Scofield RH. Epstein-Barr virus and systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol*. 2006 Sep;18(5):462-7.
113. Via CS, Handwerger BS. B-cell and T-cell function in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol*. 1993 Sep;5(5):570-4.
114. Casciola-Rosen LA, Anhalt G, Rosen A. Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes. *J Exp Med*. 1994 Apr 1;179(4):1317-30.
115. Lehmann P, Holzle E, Kind P, Goerz G, Plewig G. Experimental reproduction of skin lesions in lupus erythematosus by UVA and UVB radiation. *J Am Acad Dermatol*. 1990 Feb;22(2 Pt 1):181-7.
116. Costenbader KH, Kim DJ, Peerzada J, Lockman S, Nobles-Knight D, Petri M, et al. Cigarette smoking and the risk of systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Arthritis Rheum*. 2004 Mar;50(3):849-57.
117. Ghaussy NO, Sibbitt WL, Jr., Qualls CR. Cigarette smoking, alcohol consumption, and the risk of systemic lupus erythematosus: a case-control study. *J Rheumatol*. 2001 Nov;28(11):2449-53.
118. Parks CG, Cooper GS, Nylander-French LA, Sanderson WT, Dement JM, Cohen PL, et al. Occupational exposure to crystalline silica and risk of systemic lupus

erythematosus: a population-based, case-control study in the southeastern United States. *Arthritis Rheum.* 2002 Jul;46(7):1840-50.

119. DeLuca HF. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *Am J Clin Nutr.* 2004 Dec;80(6 Suppl):1689S-96S.

120. Oliveira NMP, Lemos MC. Papel da vitamina D na susceptibilidade para a Diabetes Mellitus tipo 1. Universidade da Beira Interior - Covilha - Portugal. 2010.

121. Huotari A, Herzig KH. Vitamin D and living in northern latitudes--an endemic risk area for vitamin D deficiency. *Int J Circumpolar Health.* 2008 Jun;67(2-3):164-78.

122. Holick MF. High prevalence of vitamin D inadequacy and implications for health. *Mayo Clin Proc.* 2006 Mar;81(3):353-73.

123. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med.* 2007 Jul 19;357(3):266-81.

124. Wang TT, Tavera-Mendoza LE, Laperriere D, Libby E, MacLeod NB, Nagai Y, et al. Large-scale in silico and microarray-based identification of direct 1,25-dihydroxyvitamin D3 target genes. *Mol Endocrinol.* 2005 Nov;19(11):2685-95.

125. Linker-Israeli M, Elstner E, Klinenberg JR, Wallace DJ, Koeffler HP. Vitamin D(3) and its synthetic analogs inhibit the spontaneous in vitro immunoglobulin production by SLE-derived PBMC. *Clin Immunol.* 2001 Apr;99(1):82-93.

126. Marques CDL, Dantas AT, Fragoso TS, Duarte ÂLBP. A importância dos níveis de vitamina D nas doenças autoimunes. *Revista Brasileira de Reumatologia*. 2010;50(1):67-80.
127. Cantorna MT, Mahon BD. Mounting evidence for vitamin D as an environmental factor affecting autoimmune disease prevalence. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2004 Dec;229(11):1136-42.
128. Uitterlinden AG, Fang Y, van Meurs JB, van Leeuwen H, Pols HA. Vitamin D receptor gene polymorphisms in relation to Vitamin D related disease states. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2004 May;89-90(1-5):187-93.
129. Valdivielso JM, Fernandez E. Vitamin D receptor polymorphisms and diseases. *Clin Chim Acta*. 2006 Sep;371(1-2):1-12.
130. Uitterlinden AG, Fang Y, Van Meurs JB, Pols HA, Van Leeuwen JP. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene*. 2004 Sep 1;338(2):143-56.
131. Schuessler M, Astecker N, Herzig G, Vorisek G, Schuster I. Skin is an autonomous organ in synthesis, two-step activation and degradation of vitamin D(3): CYP27 in epidermis completes the set of essential vitamin D(3)-hydroxylases. *Steroids*. 2001 Mar-May;66(3-5):399-408.

132. Premaor MO, Furlanetto TW. Hipovitaminose D em adultos: entendendo melhor a apresentação de uma velha doença. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia*. 2006;50(1):25-37.
133. Takeyama K, Kitanaka S, Sato T, Kobori M, Yanagisawa J, Kato S. 25-Hydroxyvitamin D3 1alpha-hydroxylase and vitamin D synthesis. *Science*. 1997 Sep 19;277(5333):1827-30.
134. Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005 Jul;289(1):F8-28.
135. Cross HS. Extrarenal vitamin D hydroxylase expression and activity in normal and malignant cells: modification of expression by epigenetic mechanisms and dietary substances. *Nutr Rev*. 2007 Aug;65(8 Pt 2):S108-12.
136. Kamen DL, Tangpricha V. Vitamin D and molecular actions on the immune system: modulation of innate and autoimmunity. *J Mol Med*. 2010 May;88(5):441-50.
137. Theodoropoulos C, Demers C, Delvin E, Menard D, Gascon-Barre M. Calcitriol regulates the expression of the genes encoding the three key vitamin D3 hydroxylases and the drug-metabolizing enzyme CYP3A4 in the human fetal intestine. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2003 Apr;58(4):489-99.

138. Theodoropoulos C, Demers C, Petit JL, Gascon-Barre M. High sensitivity of rat hepatic vitamin D3-25 hydroxylase CYP27A to 1,25-dihydroxyvitamin D3 administration. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003 Jan;284(1):E138-47.
139. Holick MF. Vitamin D status: measurement, interpretation, and clinical application. *Ann Epidemiol.* 2009 Feb;19(2):73-8.
140. Cavalier E, Delanaye P, Chapelle JP, Souberbielle JC. Vitamin D: current status and perspectives. *Clin Chem Lab Med.* 2009;47(2):120-7.
141. Souberbielle JC, Cormier C, Kindermans C, Gao P, Cantor T, Forette F, et al. Vitamin D status and redefining serum parathyroid hormone reference range in the elderly. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 Jul;86(7):3086-90.
142. Dawson-Hughes B, Heaney RP, Holick MF, Lips P, Meunier PJ, Vieth R. Estimates of optimal vitamin D status. *Osteoporos Int.* 2005 Jul;16(7):713-6.
143. Bandeira F, Griz L, Dreyer P, Eufrazino C, Bandeira C, Freese E. Vitamin D deficiency: A global perspective. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2006 Aug;50(4):640-6.
144. Bischoff-Ferrari HA, Giovannucci E, Willett WC, Dietrich T, Dawson-Hughes B. Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes. *Am J Clin Nutr.* 2006 Jul;84(1):18-28.

145. Malabanan A, Veronikis IE, Holick MF. Redefining vitamin D insufficiency. *Lancet*. 1998 Mar 14;351(9105):805-6.
146. Thomas MK, Lloyd-Jones DM, Thadhani RI, Shaw AC, Deraska DJ, Kitch BT, et al. Hypovitaminosis D in medical inpatients. *N Engl J Med*. 1998 Mar 19;338(12):777-83.
147. Kamen DL, Cooper GS, Bouali H, Shaftman SR, Hollis BW, Gilkeson GS. Vitamin D deficiency in systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev*. 2006 Feb;5(2):114-7.
148. Lips P. Vitamin D deficiency and secondary hyperparathyroidism in the elderly: consequences for bone loss and fractures and therapeutic implications. *Endocr Rev*. 2001 Aug;22(4):477-501.
149. McGrath JJ, Saha S, Burne TH, Eyles DW. A systematic review of the association between common single nucleotide polymorphisms and 25-hydroxyvitamin D concentrations. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2010 Jul;121(1-2):471-7.
150. Norman AW, Henry HL, Bishop JE, Song XD, Bula C, Okamura WH. Different shapes of the steroid hormone 1 α ,25(OH) $_2$ -vitamin D $_3$ act as agonists for two different receptors in the vitamin D endocrine system to mediate genomic and rapid responses. *Steroids*. 2001 Mar-May;66(3-5):147-58.

151. Yamada S, Yamamoto K, Masuno H, Choi M. Three-dimensional structure-function relationship of vitamin D and vitamin D receptor model. *Steroids*. 2001 Mar-May;66(3-5):177-87.
152. Braidman IP, Anderson DC. Extra-endocrine functions of vitamin D. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1985 Oct;23(4):445-60.
153. Miyamoto K, Kesterson RA, Yamamoto H, Taketani Y, Nishiwaki E, Tatsumi S, et al. Structural organization of the human vitamin D receptor chromosomal gene and its promoter. *Mol Endocrinol*. 1997 Jul;11(8):1165-79.
154. Durrin LK, Haile RW, Ingles SA, Coetzee GA. Vitamin D receptor 3'-untranslated region polymorphisms: lack of effect on mRNA stability. *Biochim Biophys Acta*. 1999 Mar 30;1453(3):311-20.
155. Decker CJ, Parker R. Diversity of cytoplasmic functions for the 3' untranslated region of eukaryotic transcripts. *Curr Opin Cell Biol*. 1995 Jun;7(3):386-92.
156. Morrison NA, Yeoman R, Kelly PJ, Eisman JA. Contribution of trans-acting factor alleles to normal physiological variability: vitamin D receptor gene polymorphism and circulating osteocalcin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Aug 1;89(15):6665-9.
157. Faraco JH, Morrison NA, Baker A, Shine J, Frossard PM. Apal dimorphism at the human vitamin D receptor gene locus. *Nucleic Acids Res*. 1989 Mar 11;17(5):2150.

158. Morrison NA, Qi JC, Tokita A, Kelly PJ, Crofts L, Nguyen TV, et al. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature*. 1994 Jan 20;367(6460):284-7.
159. Uitterlinden AG, Pols HA, Burger H, Huang Q, Van Daele PL, Van Duijn CM, et al. A large-scale population-based study of the association of vitamin D receptor gene polymorphisms with bone mineral density. *J Bone Miner Res*. 1996 Sep;11(9):1241-8.
160. Ingles SA, Haile RW, Henderson BE, Kolonel LN, Nakaichi G, Shi CY, et al. Strength of linkage disequilibrium between two vitamin D receptor markers in five ethnic groups: implications for association studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1997 Feb;6(2):93-8.
161. Arai H, Miyamoto KI, Yoshida M, Yamamoto H, Taketani Y, Morita K, et al. The polymorphism in the caudal-related homeodomain protein Cdx-2 binding element in the human vitamin D receptor gene. *J Bone Miner Res*. 2001 Jul;16(7):1256-64.
162. Fang Y, van Meurs JB, Bergink AP, Hofman A, van Duijn CM, van Leeuwen JP, et al. Cdx-2 polymorphism in the promoter region of the human vitamin D receptor gene determines susceptibility to fracture in the elderly. *J Bone Miner Res*. 2003 Sep;18(9):1632-41.
163. Uitterlinden AG, Ralston SH, Brandi ML, Carey AH, Grinberg D, Langdahl BL, et al. The association between common vitamin D receptor gene variations and

osteoporosis: a participant-level meta-analysis. *Ann Intern Med.* 2006 Aug 15;145(4):255-64.

164. Arai H, Miyamoto K, Taketani Y, Yamamoto H, Iemori Y, Morita K, et al. A vitamin D receptor gene polymorphism in the translation initiation codon: effect on protein activity and relation to bone mineral density in Japanese women. *J Bone Miner Res.* 1997 Jun;12(6):915-21.

165. Gross C, Eccleshall TR, Malloy PJ, Villa ML, Marcus R, Feldman D. The presence of a polymorphism at the translation initiation site of the vitamin D receptor gene is associated with low bone mineral density in postmenopausal Mexican-American women. *J Bone Miner Res.* 1996 Dec;11(12):1850-5.

166. Jurutka PW, Remus LS, Whitfield GK, Thompson PD, Hsieh JC, Zitzer H, et al. The polymorphic N terminus in human vitamin D receptor isoforms influences transcriptional activity by modulating interaction with transcription factor IIB. *Mol Endocrinol.* 2000 Mar;14(3):401-20.

167. Whitfield GK, Remus LS, Jurutka PW, Zitzer H, Oza AK, Dang HT, et al. Functionally relevant polymorphisms in the human nuclear vitamin D receptor gene. *Mol Cell Endocrinol.* 2001 May 25;177(1-2):145-59.

168. Colin EM, Weel AE, Uitterlinden AG, Burman CJ, Birkenhager JC, Pols HA, et al. Consequences of vitamin D receptor gene polymorphisms for growth inhibition of

cultured human peripheral blood mononuclear cells by 1, 25-dihydroxyvitamin D₃. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2000 Feb;52(2):211-6.

169. van Etten E, Verlinden L, Giulietti A, Ramos-Lopez E, Branisteanu DD, Ferreira GB, et al. The vitamin D receptor gene FokI polymorphism: functional impact on the immune system. *Eur J Immunol*. 2007 Feb;37(2):395-405.

170. Orton SM, Morris AP, Herrera BM, Ramagopalan SV, Lincoln MR, Chao MJ, et al. Evidence for genetic regulation of vitamin D status in twins with multiple sclerosis. *Am J Clin Nutr*. 2008 Aug;88(2):441-7.

171. Smolders J, Damoiseaux J, Menheere P, Tervaert JW, Hupperts R. Fok-I vitamin D receptor gene polymorphism (rs10735810) and vitamin D metabolism in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2009 Feb 15;207(1-2):117-21.

172. Simon KC, Munger KL, Xing Y, Ascherio A. Polymorphisms in vitamin D metabolism related genes and risk of multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2010 Feb;16(2):133-8.

173. Engelman CD, Fingerlin TE, Langefeld CD, Hicks PJ, Rich SS, Wagenknecht LE, et al. Genetic and environmental determinants of 25-hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D levels in Hispanic and African Americans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008 Sep;93(9):3381-8.

174. Wjst M, Altmuller J, Faus-Kessler T, Braig C, Bahnweg M, Andre E. Asthma families show transmission disequilibrium of gene variants in the vitamin D metabolism and signalling pathway. *Respir Res.* 2006;7:60.
175. Abrams SA, Griffin IJ, Hawthorne KM, Chen Z, Gunn SK, Wilde M, et al. Vitamin D receptor Fok1 polymorphisms affect calcium absorption, kinetics, and bone mineralization rates during puberty. *J Bone Miner Res.* 2005 Jun;20(6):945-53.
176. Abbas S, Nieters A, Linseisen J, Slanger T, Kropp S, Mutschelknauss EJ, et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms and haplotypes and postmenopausal breast cancer risk. *Breast Cancer Res.* 2008;10(2):R31.
177. van Leeuwen JP, van den Bemd GJ, van Driel M, Buurman CJ, Pols HA. 24,25-Dihydroxyvitamin D(3) and bone metabolism. *Steroids.* 2001 Mar-May;66(3-5):375-80.
178. Fonseca V, Mohiuddin J, Weerakoon J, Boss M, Mikhailidis DP, Dandona P. Plasma creatinine and creatinine clearance in nutritional osteomalacia. *Lancet.* 1984 May 19;1(8386):1093-5.
179. Walters MR. Newly identified actions of the vitamin D endocrine system. *Endocr Rev.* 1992 Nov;13(4):719-64.
180. Li YC. Vitamin D regulation of the renin-angiotensin system. *J Cell Biochem.* 2003 Feb 1;88(2):327-31.

181. Chiu KC, Chu A, Go VL, Saad MF. Hypovitaminosis D is associated with insulin resistance and beta cell dysfunction. *Am J Clin Nutr.* 2004 May;79(5):820-5.
182. Pfeifer M, Begerow B, Minne HW. Vitamin D and muscle function. *Osteoporos Int.* 2002 Mar;13(3):187-94.
183. Bouillon R, Eelen G, Verlinden L, Mathieu C, Carmeliet G, Verstuyf A. Vitamin D and cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2006 Dec;102(1-5):156-62.
184. Welsh J. Vitamin D and breast cancer: insights from animal models. *Am J Clin Nutr.* 2004 Dec;80(6 Suppl):1721S-4S.
185. Trinchieri G, Sher A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat Rev Immunol.* 2007 Mar;7(3):179-90.
186. Ramanathan B, Davis EG, Ross CR, Blecha F. Cathelicidins: microbicidal activity, mechanisms of action, and roles in innate immunity. *Microbes Infect.* 2002 Mar;4(3):361-72.
187. Wang TT, Nestel FP, Bourdeau V, Nagai Y, Wang Q, Liao J, et al. Cutting edge: 1,25-dihydroxyvitamin D3 is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression. *J Immunol.* 2004 Sep 1;173(5):2909-12.

188. Liu PT, Stenger S, Li H, Wenzel L, Tan BH, Krutzik SR, et al. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science*. 2006 Mar 24;311(5768):1770-3.
189. Lanzavecchia A, Sallusto F. Regulation of T cell immunity by dendritic cells. *Cell*. 2001 Aug 10;106(3):263-6.
190. Griffin MD, Lutz W, Phan VA, Bachman LA, McKean DJ, Kumar R. Dendritic cell modulation by 1alpha,25 dihydroxyvitamin D3 and its analogs: a vitamin D receptor-dependent pathway that promotes a persistent state of immaturity in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jun 5;98(12):6800-5.
191. Bischoff-Ferrari HA, Dawson-Hughes B, Staehelin HB, Orav JE, Stuck AE, Theiler R, et al. Fall prevention with supplemental and active forms of vitamin D: a meta-analysis of randomised controlled trials. *Bmj*. 2009;339:b3692.
192. Gillespie LD, Robertson MC, Gillespie WJ, Lamb SE, Gates S, Cumming RG, et al. Interventions for preventing falls in older people living in the community. *Cochrane Database Syst Rev*. 2009(2):CD007146.
193. Plotnikoff GA, Quigley JM. Prevalence of severe hypovitaminosis D in patients with persistent, nonspecific musculoskeletal pain. *Mayo Clin Proc*. 2003 Dec;78(12):1463-70.

194. Bouillon R, Carmeliet G, Verlinden L, van Etten E, Verstuyf A, Luderer HF, et al. Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. *Endocr Rev.* 2008 Oct;29(6):726-76.
195. Annweiler C, Schott AM, Berrut G, Fantino B, Beauchet O. Vitamin D-related changes in physical performance: a systematic review. *J Nutr Health Aging.* 2009 Dec;13(10):893-8.
196. Garland CF, Garland FC, Gorham ED, Lipkin M, Newmark H, Mohr SB, et al. The role of vitamin D in cancer prevention. *Am J Public Health.* 2006 Feb;96(2):252-61.
197. Zipitis CS, Akobeng AK. Vitamin D supplementation in early childhood and risk of type 1 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Arch Dis Child.* 2008 Jun;93(6):512-7.
198. Kamen DL. Vitamin D in lupus - new kid on the block? *Bull NYU Hosp Jt Dis.* 2010;68(3):218-22.
199. Zold E, Szodoray P, Gaal J, Kappelmayer J, Csathy L, Gyimesi E, et al. Vitamin D deficiency in undifferentiated connective tissue disease. *Arthritis Res Ther.* 2008;10(5):R123.
200. Nnoaham KE, Clarke A. Low serum vitamin D levels and tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Int J Epidemiol.* 2008 Feb;37(1):113-9.

201. Witham MD, Nadir MA, Struthers AD. Effect of vitamin D on blood pressure: a systematic review and meta-analysis. *J Hypertens*. 2009 Oct;27(10):1948-54.
202. Kendrick J, Targher G, Smits G, Chonchol M. 25-Hydroxyvitamin D deficiency is independently associated with cardiovascular disease in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Atherosclerosis*. 2009 Jul;205(1):255-60.
203. Kim DH, Sabour S, Sagar UN, Adams S, Whellan DJ. Prevalence of hypovitaminosis D in cardiovascular diseases (from the National Health and Nutrition Examination Survey 2001 to 2004). *Am J Cardiol*. 2008 Dec 1;102(11):1540-4.
204. Wang TJ, Pencina MJ, Booth SL, Jacques PF, Ingelsson E, Lanier K, et al. Vitamin D deficiency and risk of cardiovascular disease. *Circulation*. 2008 Jan 29;117(4):503-11.
205. McGrath J. Does 'imprinting' with low prenatal vitamin D contribute to the risk of various adult disorders? *Med Hypotheses*. 2001 Mar;56(3):367-71.
206. Gloth FM, 3rd, Alam W, Hollis B. Vitamin D vs broad spectrum phototherapy in the treatment of seasonal affective disorder. *J Nutr Health Aging*. 1999;3(1):5-7.
207. Lemire JM, Ince A, Takashima M. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ attenuates the expression of experimental murine lupus of MRL/l mice. *Autoimmunity*. 1992;12(2):143-8.

208. Vaisberg MW, Kaneno R, Franco MF, Mendes NF. Influence of cholecalciferol (vitamin D3) on the course of experimental systemic lupus erythematosus in F1 (NZBxW) mice. *J Clin Lab Anal.* 2000;14(3):91-6.
209. O'Regan S, Chesney RW, Hamstra A, Eisman JA, O'Gorman AM, Deluca HF. Reduced serum 1,25-(OH)₂ vitamin D3 levels in prednisone-treated adolescents with systemic lupus erythematosus. *Acta Paediatr Scand.* 1979 Jan;68(1):109-11.
210. Muller K, Kriegbaum NJ, Baslund B, Sorensen OH, Thymann M, Bentzen K. Vitamin D3 metabolism in patients with rheumatic diseases: low serum levels of 25-hydroxyvitamin D3 in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol.* 1995 Jul;14(4):397-400.
211. Becker A, Fischer R, Schneider M. [Bone density and 25-OH vitamin D serum level in patients with systemic lupus erythematosus]. *Z Rheumatol.* 2001 Oct;60(5):352-8.
212. Thudi A, Yin S, Wandstrat AE, Li QZ, Olsen NJ. Vitamin D levels and disease status in Texas patients with systemic lupus erythematosus. *Am J Med Sci.* 2008 Feb;335(2):99-104.
213. Ruiz-Irastorza G, Egurbide MV, Olivares N, Martinez-Berriotxo A, Aguirre C. Vitamin D deficiency in systemic lupus erythematosus: prevalence, predictors and clinical consequences. *Rheumatology (Oxford).* 2008 Jun;47(6):920-3.

214. Ruiz-Irastorza G, Gordo S, Olivares N, Egurbide MV, Aguirre C. Changes in vitamin D levels in patients with systemic lupus erythematosus: Effects on fatigue, disease activity, and damage. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2010 Aug;62(8):1160-5.
215. Wu PW, Rhew EY, Dyer AR, Dunlop DD, Langman CB, Price H, et al. 25-hydroxyvitamin D and cardiovascular risk factors in women with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2009 Oct 15;61(10):1387-95.
216. Damanhoury LH. Vitamin D deficiency in Saudi patients with systemic lupus erythematosus. *Saudi Med J*. 2009 Oct;30(10):1291-5.
217. Toloza SM, Cole DE, Gladman DD, Ibanez D, Urowitz MB. Vitamin D insufficiency in a large female SLE cohort. *Lupus*. 2010 Jan;19(1):13-9.
218. Ben-Zvi I, Aranow C, Mackay M, Stanevsky A, Kamen DL, Marinescu LM, et al. The impact of vitamin D on dendritic cell function in patients with systemic lupus erythematosus. *PLoS One*. 2010;5(2):e9193.
219. Kim HA, Sung JM, Jeon JY, Yoon JM, Suh CH. Vitamin D may not be a good marker of disease activity in Korean patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int*. 2010 Mar 30.
220. Amital H, Szekanecz Z, Szucs G, Danko K, Nagy E, Csepany T, et al. Serum concentrations of 25-OH vitamin D in patients with systemic lupus erythematosus (SLE)

are inversely related to disease activity: is it time to routinely supplement patients with SLE with vitamin D? *Ann Rheum Dis.* 2010 Jun;69(6):1155-7.

221. Zheng YJ, Chen S, Li ZQ, Yuan M, Ao W, Bao CD, et al. [The relationship of vitamin D endocrine system and estrogen receptor expression with bone mineral density in initial systemic lupus erythematosus]. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi.* 2010 Apr;49(4):309-12.

222. Szodoray P, Tarr T, Bazso A, Poor G, Szegedi G, Kiss E. The immunopathological role of vitamin D in patients with SLE: data from a single centre registry in Hungary. *Scand J Rheumatol.* 2010 Oct 26.

223. Huisman AM, White KP, Algra A, Harth M, Vieth R, Jacobs JW, et al. Vitamin D levels in women with systemic lupus erythematosus and fibromyalgia. *J Rheumatol.* 2001 Nov;28(11):2535-9.

224. Wright TB, Shults J, Leonard MB, Zemel BS, Burnham JM. Hypovitaminosis D is associated with greater body mass index and disease activity in pediatric systemic lupus erythematosus. *J Pediatr.* 2009 Aug;155(2):260-5.

225. Alarcon GS, Friedman AW, Straaton KV, Moulds JM, Lisse J, Bastian HM, et al. Systemic lupus erythematosus in three ethnic groups: III. A comparison of characteristics early in the natural history of the LUMINA cohort. *LUpus in MInority populations: NAture vs. Nurture.* *Lupus.* 1999;8(3):197-209.

226. Cutolo M, Otsa K. Review: vitamin D, immunity and lupus. *Lupus*. 2008;17(1):6-10.
227. Costenbader KH, Feskanich D, Holmes M, Karlson EW, Benito-Garcia E. Vitamin D intake and risks of systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis in women. *Ann Rheum Dis*. 2008 Apr;67(4):530-5.
228. Borba VZ, Vieira JG, Kasamatsu T, Radominski SC, Sato EI, Lazaretti-Castro M. Vitamin D deficiency in patients with active systemic lupus erythematosus. *Osteoporos Int*. 2009 Mar;20(3):427-33.
229. Lora P, Scalco R, Furlanetto TW, Xavier RM. Vitamin D status in patients with systemic lupus erythematosus from Southern Brazil. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, New York: Walter de Gruyter. 2008;46(Supplement: IFCC WorldLab Fortaleza 2008):7.
230. Carvalho JF, Blank M, Kiss E, Tarr T, Amital H, Shoenfeld Y. Anti-vitamin D, vitamin D in SLE: preliminary results. *Ann N Y Acad Sci*. 2007 Aug;1109:550-7.
231. Bogaczewicz J, Sysa-Jedrzejowska A, Arkuszewska C, Zabek J, Kontny E, Wozniacka A. [Prevalence of autoantibodies directed against 1,25(OH)₂D₃ in patients with systemic lupus erythematosus]. *Pol Merkur Lekarski*. 2010 Feb;28(164):103-7.

232. Broder AR, Tobin JN, Putterman C. Disease-specific definitions of vitamin D deficiency need to be established in autoimmune and non-autoimmune chronic diseases: a retrospective comparison of three chronic diseases. *Arthritis Res Ther.* 2010;12(5):R191.
233. Cutillas-Marco E, Morales-Suarez-Varela M, Marquina-Vila A, Grant W. Serum 25-hydroxyvitamin D levels in patients with cutaneous lupus erythematosus in a Mediterranean region. *Lupus.* 2010;19(7):810-4.
234. Tsukamoto Y, Heishi M, Nagaba Y, Kobayashi N, Nomura Y, Takahashi K, et al. More on hyperparathyroidism and the vitamin D receptor. *Nat Med.* 1996 Nov;2(11):1162.
235. Marco MP, Martinez I, Amoedo ML, Borrás M, Saracho R, Almirall J, et al. Vitamin D receptor genotype influences parathyroid hormone and calcitriol levels in predialysis patients. *Kidney Int.* 1999 Oct;56(4):1349-53.
236. Marco MP, Martinez I, Betriu A, Craver L, Fibla MJ, Fernandez E. Influence of Bsm1 vitamin D receptor gene polymorphism on the response to a single bolus of calcitriol in hemodialysis patients. *Clin Nephrol.* 2001 Aug;56(2):111-6.
237. Vigo Gago E, Cadarso-Suarez C, Perez-Fernandez R, Romero Burgos R, Devesa Mugica J, Segura Iglesias C. Association between vitamin D receptor FokI.

Polymorphism and serum parathyroid hormone level in patients with chronic renal failure. *J Endocrinol Invest.* 2005 Feb;28(2):117-21.

238. Thakkinstian A, D'Este C, Eisman J, Nguyen T, Attia J. Meta-analysis of molecular association studies: vitamin D receptor gene polymorphisms and BMD as a case study. *J Bone Miner Res.* 2004 Mar;19(3):419-28.

239. Kostner K, Denzer N, Muller CS, Klein R, Tilgen W, Reichrath J. The relevance of vitamin D receptor (VDR) gene polymorphisms for cancer: a review of the literature. *Anticancer Res.* 2009 Sep;29(9):3511-36.

240. Takiishi T, Gysemans C, Bouillon R, Mathieu C. Vitamin D and diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2010 Jun;39(2):419-46, table of contents.

241. Muray S, Parisi E, Cardus A, Craver L, Fernandez E. Influence of vitamin D receptor gene polymorphisms and 25-hydroxyvitamin D on blood pressure in apparently healthy subjects. *J Hypertens.* 2003 Nov;21(11):2069-75.

242. Muray S, Parisi E, Cardus A, Craver L, Marco MP, Fernandez E. [Influence of the vitamin D receptor gene polymorphism and 25-hydroxyvitamin D on arterial pressure in health individuals]. *Nefrologia.* 2003;23 Suppl 2:32-6.

243. Ortlepp JR, Krantz C, Kimmel M, von Korff A, Vesper K, Schmitz F, et al. Additive effects of the chemokine receptor 2, vitamin D receptor, interleukin-6 polymorphisms

and cardiovascular risk factors on the prevalence of myocardial infarction in patients below 65 years. *Int J Cardiol.* 2005 Oct 20;105(1):90-5.

244. Ozaki Y, Nomura S, Nagahama M, Yoshimura C, Kagawa H, Fukuhara S. Vitamin-D receptor genotype and renal disorder in Japanese patients with systemic lupus erythematosus. *Nephron.* 2000 May;85(1):86-91.

245. Huang CM, Wu MC, Wu JY, Tsai FJ. Association of vitamin D receptor gene BsmI polymorphisms in Chinese patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2002;11(1):31-4.

246. Sakulpipatsin W, Verasertniyom O, Nantiruj K, Totemchokchayakarn K, Lertsrisatit P, Janwityanujit S. Vitamin D receptor gene BsmI polymorphisms in Thai patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther.* 2006;8(2):R48.

247. Abbasi M, Rezaieyazdi Z, Afshari JT, Hatef M, Sahebari M, Saadati N. Lack of association of vitamin D receptor gene BsmI polymorphisms in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int.* 2010 Sep;30(11):1537-9.

248. Huang CM, Wu MC, Wu JY, Tsai FJ. No association of vitamin D receptor gene start codon fok 1 polymorphisms in Chinese patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 2002 Jun;29(6):1211-3.

249. Lee YH, Bae SC, Choi SJ, Ji JD, Song GG. Associations between vitamin D receptor polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Mol Biol Rep.* 2010; Nov 26.

5 ARTIGO CIENTÍFICO

**The role of *Bsm1* and *FokI* vitamin D receptor gene polymorphisms
and serum 25-hydroxyvitamin D in Brazilian patients with Systemic
Lupus Erythematosus**

^{1,2}Odirlei André Monticielo, ³José Artur Bogo Chies, ¹Maria Gabriela Figueiró Longo, ¹Guilherme Gischkow Rucatti, ⁴Rosana Scalco, ¹João Carlos Tavares Brenol.

¹Division of Rheumatology, Department of Internal Medicine, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.

²Department of Internal Medicine, Universidade Federal de Santa Maria, Brazil.

³Department of Genetics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.

⁴Laboratory of Clinical Pathology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil.

Correspondence address:

Odirlei André Monticielo

Serviço de Reumatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre - HCPA

Rua Ramiro Barcelos, 2350 – Largo Eduardo Zaccaro Faraco, Sala 645, 6º andar, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil - Zip Code 90035-903

Telephone/Fax number: +55 51 33313834

E-mail: omonticielo@yahoo.com.br

Abstract

Vitamin D deficiency has been described in systemic lupus erythematosus (SLE). The *BsmI* *VDR* (vitamin D receptor) gene polymorphism was associated with SLE in Asian patients. Studies in the Brazilian population have not been conducted. A case-control study with 195 SLE patients and 201 healthy controls was performed to investigate the influence of *BsmI* and *FokI* *VDR* gene polymorphisms on the susceptibility to SLE. In addition, 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D] was measured in SLE patients in order to evaluate possible associations with *VDR* polymorphic variants and clinical and laboratory expressions of the disease. Genotyping was performed using RFLP-PCR. The measurement of 25(OH)D was performed by chemiluminescence. There was no statistically significant difference in genotypic and allelic frequencies of *BsmI* and *FokI* polymorphisms among European-derived cases and controls. The mean serum levels of 25(OH)D were 25.51 ± 11.43 ng/ml in SLE patients. Based on the genotype distribution, 25(OH)D concentrations were significantly higher in patients carrying the *FokI* f/f genotype, when compared with patients carrying the F/F genotype (31.6 ± 14.1 ng/ml versus 23.0 ± 9.2 ng/ml, $p=0.004$), thus reinforcing its role in the functional activity of *VDR*. This feature may be considered in future clinical and experimental studies involving vitamin D measurements. Genetic-specific definitions of ideal levels of vitamin D in SLE should therefore be established in future studies.

Keywords: systemic lupus erythematosus, vitamin D receptor, *BsmI* polymorphism, *FokI* polymorphism, vitamin D, 25-hydroxyvitamin D, genetics and immunology.

Introduction

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a chronic autoimmune inflammatory disease that affects many organs and systems. Etiology and pathogenesis of SLE still remains poorly understood. Many observations suggest a role of genetic, immunologic, hormonal and environmental factors (1). Abnormal immune system response allows the processing of self antigens by antigen presenting cells, hyperactivation of B and T cells and failure of immunoregulatory mechanisms.

Vitamin D and its associated receptor (VDR - vitamin D receptor) have immunomodulatory properties. In addition, studies on the role of vitamin D in the activation of the immune response have provided new insights into the function of this vitamin. It presents inhibitory effects on T cells, B cells and dendritic cells, while it alters the cytokine profile toward the Th2 phenotype tolerogenic (2). These suppressive immunologic properties have led to the investigation of a possible role in SLE pathogenic mechanisms (3).

Studies have shown lower levels of vitamin D in SLE patients, thereby suggesting that vitamin D deficiency may be a risk factor for SLE development (4). However, vitamin D intake was not associated with risk of SLE in a large prospective cohort of women (5). Most studies have documented an association between higher disease activity and lower vitamin D levels (4). Up until now, the physiologic and clinical significance of vitamin D deficiency in SLE is still not entirely known.

The action of vitamin D depends on the VDR synthesized by the *VDR* gene, which is located on chromosome 12 and composed of 9 exons (6). It has emerged as a candidate for SLE susceptibility, as a result of the role of vitamin D in the immune system. Four major polymorphisms (*BsmI*, *Apal*, *TaqI* and *FokI*) have been described,

although their influences on VDR function are still unknown. Some studies have verified the occurrence of certain *VDR* gene polymorphic variants in SLE patients. A recent meta-analysis has suggested that allele B from *BsmI* *VDR* gene polymorphism had a significant association with SLE in Asian patients (7). The *FokI* polymorphism did not show association with SLE in a single Chinese study (8). Furthermore, different studies have described controversial associations of such allelic variants with specific clinical features in SLE patients.

Facing the lack of reports concerning the role of vitamin D and *VDR* gene allelic variants in SLE and the fact that there are few studies in Brazil, a case-control study was conducted to investigate whether *BsmI* and *FokI* *VDR* gene polymorphisms could be susceptibility or severity markers of SLE. In addition, 25-hydroxyvitamin [25(OH)D] was measured in SLE patients for the purpose of assessing possible associations with *VDR* gene polymorphic variants, as well as clinical and laboratory expressions of the disease.

Patients and Methods

Study Population

The study population consisted of 195 consecutive SLE patients identified as European-derived and as African-derived. The classification was based on physical appearance, as judged by the researcher at the time of blood collection, and data on the ethnicity of parents/grandparents, as reported by the participants. The classification criteria used in Brazil is well documented and had been used by our group in previous studies (9). Also, a recent study assessing individual interethnic admixture and population substructure by means of a panel composed of 48-insertion-deletion ancestry-informative markers has validated this classification in European-derived

individuals from our region (10). SLE patients were followed up at the Rheumatology Clinic of Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Demographic, clinical and laboratory data about patients were collected from the medical records. All patients had fulfilled the American College of Rheumatology (ACR) revised criteria for the classification of SLE (11). The control group consisted of 201 healthy sex-matched European-derived individuals from the same urban center. African-derived controls were not included in the control group. The Ethics Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre has approved the study protocol while the free and informed consent - in accordance with the Declaration of Helsinki - was obtained from all participants.

Clinical and laboratory variables

Using a standardized questionnaire, the following variables were recorded during recruitment of patients: age, gender, phototype (12), smoking status, alcohol consumption, body mass index (BMI), oral vitamin D supplementation and treatment with hydroxychloroquine, corticosteroids and immunosuppressive drugs. Clinical manifestations of SLE included the presence of photosensitivity, malar rash, discoid rash, oral or nasal ulcers, arthritis, serositis (pleuritis or pericarditis), nephritis and neurological diseases defined as seizures or psychosis. The laboratory evaluation included the presence of hematological disorders (hemolytic anemia, leukopenia, lymphopenia or thrombocytopenia), positive antinuclear antibody (ANA) (titer>1:100), or other autoantibodies such as anti-dsDNA, anti-Sm, anti-RNP, anti-Ro/SS-A, anti-La/SS-B, anticardiolipin, lupus anticoagulant and false positive VDRL. Patients were also evaluated in regard to secondary antiphospholipid syndrome and Sjögren's syndrome, based on the classification criteria established for both diseases (13, 14). SLEDAI (15)

and SLICC damage index (16) were applied to each patient as a measurement of disease activity and cumulative damage, respectively.

Measurement of vitamin D

Blood samples were collected during the medical consultation, between 4 and 6 p.m., after at least 4 hours of fasting. In order to limit the effect of seasonal fluctuation of vitamin D photosynthesis, patients were recruited in spring period. All samples were frozen at -70°C and analyzed at the same time. Serum 25(OH)D levels were measured by chemiluminescence assay (LIAISON - DiaSorin Inc, Stillwater/MN, CV 6% intra-assay).

Vitamin D deficiency was considered when levels corresponded to 25(OH)D <20 ng/ml (17). The normal range of 25(OH)D levels was defined as ≥30 ng/ml (18). Serum levels between 20 and 30 ng/ml were classified as insufficiency status and those <10 ng/ml were categorized as critically low vitamin D levels (19).

DNA Extraction and Genotyping

Using a salting out method, genomic DNA was isolated from peripheral blood cells (20). Then, DNA samples were stored at -20°C, and genotyping was performed as previously described (8, 21-25). For *FokI* genotyping (rs10735810, recently merged with rs2228570), a polymerase chain reaction (PCR) amplification of *VDR* gene fragment was carried out up to a total volume of 25 µl, containing genomic DNA, Taq polymerase buffer, MgCl₂, dNTP, specific primers and Taq DNA polymerase (Invitrogen Corporation, San Diego, CA, USA). The primers used were 5'-AGCTGGCCCTGGCACTGACTCTGCTCT-3' and 5'-

ATGGAAACACCTTGCTTCTTCTCCCTC-3' (8). The cycling conditions were set as follows: one cycle at 94°C for 5 minutes, 35 cycles at 94°C for 30 seconds, 58°C for 30 seconds, 72°C for 20 seconds, and a final cycle of extension at 72°C, for 7 minutes. The PCR product of 265 bp was cleaved by *FokI* (FastDigest® *BseGI*, Fermentas, Canadá), according to manufacturer's instructions. Two fragments of 169 bp and 96 bp were obtained in case the product was excisable. The fragments were visualized in 6% polyacrylamide gel stained with ethidium bromide under ultraviolet light. The polymorphism was then divided into 3 groups: excisable (ff), unexcisable (FF) and heterozygote (Ff). For *BsmI* genotyping (rs1544410), a PCR was carried out up to a total volume of 50 µl, which contained the reagents described above. The primers used were 5'-CAACCAAGACTACAAGTACCGCGTCAGTGA-3' and 5'-AACCAGCGGGAAGAGGTCAAGGG-3' (23). The cycling conditions were set as follows: one cycle at 95°C for 3 minutes, 30 cycles at 95°C for 30 seconds, 56°C for 30 seconds, 72°C for 30 seconds, and a final cycle of extension at 72°C, for 10 minutes (21). The PCR product of 825 bp was cleaved by *BsmI* (FastDigest® *Mva1269I*, Fermentas, Canadá), according to manufacturer's instructions. Two fragments of 650 bp and 175 bp were obtained in case the product was excisable. The fragments were visualized at the same conditions described above. Polymorphism was therefore divided into 3 groups: excisable (bb), unexcisable (BB) and heterozygote (Bb).

Statistical analysis

A descriptive analysis of data was conducted through the calculation of mean and standard deviation (SD) for quantitative variables, while frequency and percentage were calculated for categorical variables. Median and interquartile range were calculated for

quantitative variables with asymmetrical distribution. The chi-square test with continuity correction or Fisher's exact test has been used in order to compare the frequencies of polymorphic variants. The odds ratio and 95% confidence interval were likewise calculated. For the comparison of clinical and laboratory variables with the frequencies of polymorphic variants, the chi-square test has been used to compare qualitative variables, while the ANOVA (or Kruskal-Wallis) was used for quantitative variables, and the Bonferroni correction was used to set the level of statistical significance. The Hardy-Weinberg equilibrium test was performed in cases and controls using the chi-square test.

A multiple linear regression was used to evaluate associations within genotypes with levels of 25(OH)D, thereby adjusting potential confounders (26), such as phototype, ethnicity, age, gender, smoking status, BMI, hydroxychloroquine use, corticosteroids use and vitamin D supplementation. After the variable has been categorized as previously described, a multiple logistic regression was used to evaluate factors associated with 25(OH)D deficiency. Odds ratio and 95% confidence intervals were estimated using logistic regression to determine the disease characteristics associated with vitamin D deficiency, thus adjusting the same confounding factors described above.

Data were analyzed using the SPSS software version 17.0, whereas the two-tailed values of $p < 0.05$ were considered to indicate statistical significance.

Results

One hundred and ninety five SLE patients were included in the study: 148 (75.9%) European-derived and 47 (24.1%) African-derived. One hundred and eighty three (93.8%) were women and 12 (6.2%) were men. The average age of patients was

42.6±13.9 years and the average age at diagnosis was 32.5±13.7 years. Table 1 shows the frequencies of clinical and laboratory features of SLE patients. Secondary Sjögren's syndrome was found in 6.7% (13/195), while antiphospholipid syndrome was noted in 7.2% (14/195) of patients. The medians for SLEDAI and SLICC were 2 and 0, respectively. It has been noted that male patients had a higher frequency of nephritis (83.3% versus 43.2%, $p=0.016$), although the number of individuals in this group was relatively small. No other statistically significant differences were found between genders.

One hundred and fifty three in the 195 SLE patients analyzed, had complete *FokI* and *BsmI* genotyping and 25(OH)D measurement. Forty two patients have not completed at least one of these variables due to problems during the implementation of techniques for genotyping and determination of vitamin D. The missing data were random and did not interfere in the final analysis, since when comparing the two groups (with and without all data), no significant differences were found for clinical and laboratory features (data not shown).

The frequencies of *BsmI* and *FokI* *VDR* gene polymorphisms were studied in European-derived SLE patients and healthy controls (Table 2). The genotypic frequencies were in Hardy-Weinberg equilibrium in both cases and controls. Twenty (16.5%) in 121 European-derived SLE patients were B/B, while 61 (50.4%) were B/b and 40 (33.1%) were b/b. When compared to 201 healthy European-derived controls [31 (15.4%), 97 (48.3%) and 73 (36.3%), respectively], no statistically significant difference was observed for *BsmI* genotypes distribution ($p=0.836$). Sixty four (48.9%) in the 131 European-derived SLE patients were genotyped as F/F, 56 (42.7%) as F/f and 11

(8.4%) as f/f. When compared to 198 healthy European-derived controls [86 (43.4%), 94 (47.5%) and 18 (9.1%), respectively], no statistically significant difference were noted in the *FokI* genotype distribution ($p=0.626$). In addition, no statistically significant difference was found in the frequencies of *BsmI* and *FokI* among European and African-derived SLE patients (Table 2) ($p=0.248$ and $p=0.775$, respectively). The allelic frequencies of alleles B, b, F and f were studied for European-derived SLE patients and compared to European-derived controls and African-derived patients. No significant differences were observed (Table 2). Associations between *VDR* polymorphisms and clinical and laboratory features of SLE patients described in table 1 were investigated. Both allelic and genotypic distribution were considered. After applying the Bonferroni correction, no results achieved statistical significance (data not shown).

The 25(OH)D levels were measured in 181 SLE patients and a mean of 25.51 ± 11.43 ng/ml was found. European-derived patients ($n=134$) had levels of 25.9 ± 11.43 ng/ml, while African-derived ($n=47$) had levels of 24.3 ± 11.44 ng/ml ($p=0.384$). When patients were classified according to vitamin D status, the following distribution was observed: 55 (30.4%) had normal, 63 (34.8%) insufficient, 52 (28.7%) deficient and 11 (6,1%) critically low serum levels. Fifty six percent of patients with deficiency received at least 800 IU of vitamin D per day. According to genotype distribution, 25(OH)D levels were significantly higher in patients carrying the f/f genotype, when compared to F/F (31.6 ± 14.1 ng/ml versus 23.0 ± 9.2 ng/ml, $p=0.004$), even after adjusting for confounding variables (Tables 3 and 4). Vitamin D levels were not different when *BsmI* genotypes were considered (Table 3).

Vitamin D deficiency did not present association with any demographic, clinical and laboratory features in SLE patients (Table 5). Secondary antiphospholipid syndrome, Sjögren's syndrome, SLEDAI and SLICC damage index were similar in patients with or without levels of 25(OH)D inferior to 20 ng/ml. All data were adjusted for confounding variables.

Discussion

The pathogenesis of SLE is complex and probably involves multiple factors. Target tissue damage could be caused by pathogenic autoantibodies and immune complexes. Abnormalities in the immune system allow the processing of self antigen by antigen presenting cells, persistence and hiperactivation of B and T cells and failure to maintain immunoregulatory networks. Several cells involved in the immune system express VDR and key vitamin D metabolizing enzymes, which could explain the suppressive effects of vitamin D on immunity.

Most biological activities of vitamin D are mediated by the VDR. Genetic variation on the *VDR* gene could lead to significant receptor dysfunction, which could affect calcium metabolism, cell proliferation and the immune response. Polymorphisms in *VDR* gene have been associated with health outcomes involving low bone density, cardiovascular disease, cancers, autoimmunity and infections; yet, the effects of these polymorphisms on the VDR protein expression and function need more clarification (27). The *Bsml*, *Apal* and *TaqI* polymorphisms show strong linkage disequilibrium with each other. The *Bsml* and *Apal* polymorphisms are located in intron 8 and the *TaqI* polymorphism is located at exon 9, a region that was suggested by some authors to be related to mRNA stability (23). Other studies suggest that a polymorphism in the *FokI*

located inside a start codon creates an alternative start site, thus leading to the occurrence of a different length protein. With respect to its transactivation activity as a transcription factor, the short protein (allele F) seems to be more active than the long variant (allele f). However, this effect seems to be gene and cell specific (28, 29). An *in vitro* study has provided evidences that alleles F and f lead to different effects in the immune system. When compared with allele f, the allele F showed a higher transcriptional activity of immune specific transcription factors, as well as on the more functional level of proliferation and cytokine synthesis by immune cells (30). Still, the clinical impact of the *VDR FokI* polymorphism remains unclear.

Some authors have studied the association of *BsmI* and *FokI VDR* polymorphisms with SLE development, but results were limited. Studies of Japanese (n=58) (24) and Chinese (n=47) (31) patients have reported an association of the BB genotype with SLE, whereas studies of Thai (n=101) (21) and Iranian (n=60) (32) patients have not reproduced these results. In addition, bb genotype has been associated with renal disease in Japanese patients (24). When compared with controls, a Chinese study (n=52) examining the *VDR FokI* polymorphism could not identify any association of *FokI* polymorphism in patients diagnosed with SLE (8). Our study has involved the largest number of SLE patients studied so far. No associations were found between *BsmI* and *FokI* polymorphisms and SLE susceptibility or clinical and laboratory expressions of disease. These results could be explained by ethnic factors, since the influence of *BsmI* on Japanese and Chinese SLE patients were also different from Thai and Iranian SLE patients. The *FokI* polymorphism seems not to be associated with SLE in different populations. Another interesting finding was the similar distribution of allele f between European and African-derived patients, thereby agreeing with the results of

another study conducted in Brazil (33). This data is different from that present in the literature, where the allele f is predominantly found in European-derived and Asian people (34). That could result from the high degree of genetic admixture of our African-derived population (35).

A recent systematic review has described two studies that showed a significant relationship between the *FokI* polymorphism and 25(OH)D serum levels (36). Orton et. al. have found 25(OH)D concentrations of 25.8 ± 2.2 ng/ml in homozygous genotype coding for the shorter VDR variant, in comparison with 33.3 ± 1.6 ng/ml in heterozygous and homozygous genotypes coding for the longer VDR variant ($p=0.005$) (37). Smolders et. al. showed statistically significant lower concentrations of 25(OH)D associated with F/F genotype, when compared with f/f genotype (38). Both studies involved patients with multiple sclerosis (MS). Yet, two other studies have not evidenced significant differences: neither Engelman et. al. studying Hispanics and African Americans patients from Insulin Resistance Atherosclerosis Family Study or Wjst et. al. studying patients from German Asthma Family Study have observed associations between vitamin D levels and *FokI* and *BsmI* polymorphisms (39, 40). Other studies - not included in this systematic review - have reported controversial findings. When compared to f/f genotype, Abrams et. al. have published in 2005 a significant association of F/F genotype with lower 25(OH)D serum concentrations, in healthy American adolescents (26.2 ± 1.2 ng/ml versus 32.4 ± 1.6 ng/ml, $p=0.009$) (41). When studying patients with breast cancer, Abbas et. al. has not observed the same results (42). For the first time ever, we report that the carriers of F/F genotype have significantly lower 25(OH)D concentrations than the carriers of f/f genotype among SLE patients. Although *FokI* polymorphism has not had significant association with SLE, it could have implicated

important consequences for vitamin D metabolism in SLE patients. Previous studies suggest that 1,25-dihydroxyvitamin D [$1,25(\text{OH})_2\text{D}$], an active form of vitamin D, has negative control over its own levels and the levels of its precursor [$25(\text{OH})\text{D}$] through the VDR (43-45). Allele f may be associated with VDR dysfunction, hence allowing an increased synthesis of $25(\text{OH})\text{D}$, which could explain the observation of higher vitamin D levels in individuals with f/f genotype. Still, other described genetic factors influencing production, elimination and transportation of vitamin D could influence $25(\text{OH})\text{D}$ concentration and confound our results.

Vitamin D deficiency has been associated with SLE in studies with different populations. The first study that demonstrated low levels of vitamin D among SLE patients was published in 1979 (46). Since then, multiple studies have confirmed that the majority of SLE patients have decreased levels of vitamin D (19, 47, 48). By comparing 123 SLE patients and 240 age and sex-matched controls from United States, Kamen et. al. have noticed a trend toward lower $25(\text{OH})\text{D}$ levels in cases (21.6 ± 12.9 ng/ml versus 27.4 ± 15.7 ng/ml), which was significant in European-derived ($p=0.04$), but not in African-derived individuals ($p=0.36$). Overall, 67% of patients had vitamin D deficiency, and the average dose of $25(\text{OH})\text{D}$ was significantly lower in African-derived patients, when compared with European-derived individuals (15.9 ± 9.4 ng/ml versus 31.3 ± 14.9 ng/ml, $p < 0.01$) (19). Despite there is evidence of a relationship between vitamin D deficiency and SLE, vitamin D intake was not associated with risk of SLE in a large prospective cohort of women (5). The role of vitamin D on clinical and laboratory features of SLE has been demonstrated, specially associating low levels of vitamin D with activity and damage indexes, fatigue index and cardiovascular disease; yet, results

are controversial in the different populations studied (49-55). In São Paulo - Brazil, a study has evaluated 36 patients with SLE and 26 healthy controls. Patients were divided into 2 groups, considering the values of SLEDAI: Group 1 with mean SLEDAI of 22 (14-27) and Group 2 with mean SLEDAI of 1.7 (0-3). Levels of 25(OH)D were significantly lower in Group 1, when compared with Group 2, or healthy controls (17.4 ± 12.5 ng/ml versus 44.6 ± 14.5 versus 37.8 ± 13.7 , respectively, $p < 0.001$). There was an increased prevalence of vitamin D deficiency in SLE patients, especially those with active disease (51). Our study has not found a significant association between vitamin D deficiency and clinical and laboratory manifestations of SLE. No associations with vitamin D status were observed for SLEDAI, SLICC damage index, Sjögren's syndrome and antiphospholipid syndrome. Factors such as season, age, ethnicity, sun exposure, use of sunscreens, smoking status, certain drugs, skin pigmentation, limited amount of vitamin D obtained from diet and the recently described genetic factors may influence results in different studies and requires careful consideration when evaluating the serum levels of vitamin D (26).

Vitamin D deficiency in our population was observed in 34.8% of all patients and the mean level of 25(OH)D was 25.51 ± 11.43 ng/ml, and the result was already expected. Other studies concerning specific groups of people in our region have shown a high prevalence of vitamin D deficiency. Scalco et. al. have detected 25(OH)D levels < 20 ng/ml in 85.6% of 98 individuals living in two non-profit homes for old people (56). When studying resident physicians, Premaor et. al. have found mean levels of 25(OH)D of 17.9 ± 8.0 ng/ml, while 57.4% presented serum 25(OH)D levels below 20 ng/ml (57). Our patients may have had a lower prevalence of vitamin D deficiency due to the

frequent use of oral vitamin D supplementation. Even so, more than 50% of patients with vitamin D deficiency were taking at least 800 IU of vitamin D per day. It has been suggested that SLE patients need larger doses of vitamin D in order to achieve normal serum levels. Current recommendations about vitamin D supplementation in SLE patients are being discussed, but there is still no consensus (18, 58, 59); besides, our findings should be considered in order to determine optimal doses of vitamin D replacement.

Hence, it follows that our results have clearly indicated that *FokI* and *BsmI* *VDR* polymorphisms are not risk factors for SLE, thus supporting the idea that *VDR* polymorphisms influence SLE development, according to the genetic background of the studied population. Vitamin D deficiency seems not to have a direct effect on clinical and laboratory features of SLE patients in our population. Nevertheless, our study is the first report that describes *FokI* genotypes as an important factor in the 25(OH)D concentration among SLE patients. It is important to take this finding into consideration for future clinical and experimental studies aiming to evaluate 25(OH)D levels. In case genotypes are related to vitamin D status, the serum concentrations of 25(OH)D required to reduce disease outcomes should be individualized for each patient and new guidelines about vitamin D supplementation shall include such new genetic information. Genetic-specific definitions of ideal levels of vitamin D in SLE need therefore to be established in future studies.

Acknowledgements

This work was supported by grants from FIPE (Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos) of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, CAPES (Coordenação de

Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

References

1. Manson JJ, Isenberg DA. The pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Neth J Med*. 2003 Nov;61(11):343-6.
2. Kamen DL, Tangpricha V. Vitamin D and molecular actions on the immune system: modulation of innate and autoimmunity. *J Mol Med*. 2010 May;88(5):441-50.
3. Kamen D, Aranow C. Vitamin D in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol*. 2008 Sep;20(5):532-7.
4. Kamen DL, Aranow C. The link between vitamin D deficiency and systemic lupus erythematosus. *Curr Rheumatol Rep*. 2008 Aug;10(4):273-80.
5. Costenbader KH, Feskanich D, Holmes M, Karlson EW, Benito-Garcia E. Vitamin D intake and risks of systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis in women. *Ann Rheum Dis*. 2008 Apr;67(4):530-5.
6. Miyamoto K, Kesterson RA, Yamamoto H, Taketani Y, Nishiwaki E, Tatsumi S, et al. Structural organization of the human vitamin D receptor chromosomal gene and its promoter. *Mol Endocrinol*. 1997 Jul;11(8):1165-79.

7. Lee YH, Bae SC, Choi SJ, Ji JD, Song GG. Associations between vitamin D receptor polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Mol Biol Rep.* 2010 Nov 26.
8. Huang CM, Wu MC, Wu JY, Tsai FJ. No association of vitamin D receptor gene start codon fok 1 polymorphisms in Chinese patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 2002 Jun;29(6):1211-3.
9. Monticielo OA, Chies JA, Mucenic T, Rucatti GG, Junior JM, da Silva GK, et al. Mannose-binding lectin gene polymorphisms in Brazilian patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2010 Mar;19(3):280-7.
10. Santos NP, Ribeiro-Rodrigues EM, Ribeiro-Dos-Santos AK, Pereira R, Gusmao L, Amorim A, et al. Assessing individual interethnic admixture and population substructure using a 48-insertion-deletion (INSEL) ancestry-informative marker (AIM) panel. *Hum Mutat.* 2010 Feb;31(2):184-90.
11. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1997 Sep;40(9):1725.
12. Astner S, Anderson RR. Skin phototypes 2003. *J Invest Dermatol.* 2004 Feb;122(2):xxx-xxxi.

13. Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, Moutsopoulos HM, Alexander EL, Carsons SE, et al. Classification criteria for Sjogren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann Rheum Dis.* 2002 Jun;61(6):554-8.
14. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost.* 2006 Feb;4(2):295-306.
15. Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, Caron D, Chang CH. Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE. *Arthritis Rheum.* 1992 Jun;35(6):630-40.
16. Gladman D, Ginzler E, Goldsmith C, Fortin P, Liang M, Urowitz M, et al. The development and initial validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology damage index for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1996 Mar;39(3):363-9.
17. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med.* 2007 Jul 19;357(3):266-81.
18. Bischoff-Ferrari HA, Giovannucci E, Willett WC, Dietrich T, Dawson-Hughes B. Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes. *Am J Clin Nutr.* 2006 Jul;84(1):18-28.

19. Kamen DL, Cooper GS, Bouali H, Shaftman SR, Hollis BW, Gilkeson GS. Vitamin D deficiency in systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev.* 2006 Feb;5(2):114-7.
20. Lahiri DK, Nurnberger JI, Jr. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res.* 1991 Oct 11;19(19):5444.
21. Sakulpipatsin W, Veraseritniyom O, Nantiruj K, Totemchokchayakarn K, Lertsrisatit P, Janwityanujit S. Vitamin D receptor gene BsmI polymorphisms in Thai patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther.* 2006;8(2):R48.
22. Harris SS, Eccleshall TR, Gross C, Dawson-Hughes B, Feldman D. The vitamin D receptor start codon polymorphism (FokI) and bone mineral density in premenopausal American black and white women. *J Bone Miner Res.* 1997 Jul;12(7):1043-8.
23. Morrison NA, Qi JC, Tokita A, Kelly PJ, Crofts L, Nguyen TV, et al. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature.* 1994 Jan 20;367(6460):284-7.
24. Ozaki Y, Nomura S, Nagahama M, Yoshimura C, Kagawa H, Fukuhara S. Vitamin-D receptor genotype and renal disorder in Japanese patients with systemic lupus erythematosus. *Nephron.* 2000 May;85(1):86-91.
25. Mory DB, Rocco ER, Miranda WL, Kasamatsu T, Crispim F, Dib SA. Prevalence of vitamin D receptor gene polymorphisms FokI and BsmI in Brazilian individuals with

type 1 diabetes and their relation to beta-cell autoimmunity and to remaining beta-cell function. *Hum Immunol.* 2009 Jun;70(6):447-51.

26. Hollis BW. Circulating 25-hydroxyvitamin D levels indicative of vitamin D sufficiency: implications for establishing a new effective dietary intake recommendation for vitamin D. *J Nutr.* 2005 Feb;135(2):317-22.

27. Valdivielso JM, Fernandez E. Vitamin D receptor polymorphisms and diseases. *Clin Chim Acta.* 2006 Sep;371(1-2):1-12.

28. Uitterlinden AG, Fang Y, Van Meurs JB, Pols HA, Van Leeuwen JP. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene.* 2004 Sep 1;338(2):143-56.

29. Colin EM, Weel AE, Uitterlinden AG, Buurman CJ, Birkenhager JC, Pols HA, et al. Consequences of vitamin D receptor gene polymorphisms for growth inhibition of cultured human peripheral blood mononuclear cells by 1, 25-dihydroxyvitamin D₃. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2000 Feb;52(2):211-6.

30. van Etten E, Verlinden L, Giulietti A, Ramos-Lopez E, Branisteanu DD, Ferreira GB, et al. The vitamin D receptor gene FokI polymorphism: functional impact on the immune system. *Eur J Immunol.* 2007 Feb;37(2):395-405.

31. Huang CM, Wu MC, Wu JY, Tsai FJ. Association of vitamin D receptor gene BsmI polymorphisms in Chinese patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2002;11(1):31-4.
32. Abbasi M, Rezaieyazdi Z, Afshari JT, Hatef M, Sahebari M, Saadati N. Lack of association of vitamin D receptor gene BsmI polymorphisms in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int*. 2010 Sep;30(11):1537-9.
33. Rezende VB, Barbosa F, Jr., Montenegro MF, Sandrim VC, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. An interethnic comparison of the distribution of vitamin D receptor genotypes and haplotypes. *Clin Chim Acta*. 2007 Sep;384(1-2):155-9.
34. Zmuda JM, Cauley JA, Ferrell RE. Molecular epidemiology of vitamin D receptor gene variants. *Epidemiol Rev*. 2000;22(2):203-17.
35. Bortolini MC, Da Silva WAJWA, De Guerra DC, Remonato G, Mirandola R, Hutz MH, et al. African-derived South American populations: A history of symmetrical and asymmetrical matings according to sex revealed by bi- and uni-parental genetic markers. *Am J Hum Biol*. 1999;11(4):551-63.
36. McGrath JJ, Saha S, Burne TH, Eyles DW. A systematic review of the association between common single nucleotide polymorphisms and 25-hydroxyvitamin D concentrations. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2010 Jul;121(1-2):471-7.

37. Orton SM, Morris AP, Herrera BM, Ramagopalan SV, Lincoln MR, Chao MJ, et al. Evidence for genetic regulation of vitamin D status in twins with multiple sclerosis. *Am J Clin Nutr.* 2008 Aug;88(2):441-7.
38. Smolders J, Damoiseaux J, Menheere P, Tervaert JW, Hupperts R. Fok-I vitamin D receptor gene polymorphism (rs10735810) and vitamin D metabolism in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2009 Feb 15;207(1-2):117-21.
39. Engelman CD, Fingerlin TE, Langefeld CD, Hicks PJ, Rich SS, Wagenknecht LE, et al. Genetic and environmental determinants of 25-hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D levels in Hispanic and African Americans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008 Sep;93(9):3381-8.
40. Wjst M, Altmuller J, Faus-Kessler T, Braig C, Bahnweg M, Andre E. Asthma families show transmission disequilibrium of gene variants in the vitamin D metabolism and signalling pathway. *Respir Res.* 2006;7:60.
41. Abrams SA, Griffin IJ, Hawthorne KM, Chen Z, Gunn SK, Wilde M, et al. Vitamin D receptor Fok1 polymorphisms affect calcium absorption, kinetics, and bone mineralization rates during puberty. *J Bone Miner Res.* 2005 Jun;20(6):945-53.
42. Abbas S, Nieters A, Linseisen J, Slinger T, Kropp S, Mutschelknauss EJ, et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms and haplotypes and postmenopausal breast cancer risk. *Breast Cancer Res.* 2008;10(2):R31.

43. Takeyama K, Kitanaka S, Sato T, Kobori M, Yanagisawa J, Kato S. 25-Hydroxyvitamin D3 1 α -hydroxylase and vitamin D synthesis. *Science*. 1997 Sep 19;277(5333):1827-30.
44. Theodoropoulos C, Demers C, Delvin E, Menard D, Gascon-Barre M. Calcitriol regulates the expression of the genes encoding the three key vitamin D3 hydroxylases and the drug-metabolizing enzyme CYP3A4 in the human fetal intestine. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2003 Apr;58(4):489-99.
45. Theodoropoulos C, Demers C, Petit JL, Gascon-Barre M. High sensitivity of rat hepatic vitamin D3-25 hydroxylase CYP27A to 1,25-dihydroxyvitamin D3 administration. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003 Jan;284(1):E138-47.
46. O'Regan S, Chesney RW, Hamstra A, Eisman JA, O'Gorman AM, Deluca HF. Reduced serum 1,25-(OH)₂ vitamin D3 levels in prednisone-treated adolescents with systemic lupus erythematosus. *Acta Paediatr Scand*. 1979 Jan;68(1):109-11.
47. Damanhoury LH. Vitamin D deficiency in Saudi patients with systemic lupus erythematosus. *Saudi Med J*. 2009 Oct;30(10):1291-5.
48. Toloza SM, Cole DE, Gladman DD, Ibanez D, Urowitz MB. Vitamin D insufficiency in a large female SLE cohort. *Lupus*. 2010 Jan;19(1):13-9.

49. Amital H, Szekanecz Z, Szucs G, Danko K, Nagy E, Csepany T, et al. Serum concentrations of 25-OH vitamin D in patients with systemic lupus erythematosus (SLE) are inversely related to disease activity: is it time to routinely supplement patients with SLE with vitamin D? *Ann Rheum Dis*. 2010 Jun;69(6):1155-7.
50. Ruiz-Irastorza G, Gordo S, Olivares N, Egurbide MV, Aguirre C. Changes in vitamin D levels in patients with systemic lupus erythematosus: Effects on fatigue, disease activity, and damage. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2010 Aug;62(8):1160-5.
51. Borba VZ, Vieira JG, Kasamatsu T, Radominski SC, Sato EI, Lazaretti-Castro M. Vitamin D deficiency in patients with active systemic lupus erythematosus. *Osteoporos Int*. 2009 Mar;20(3):427-33.
52. Thudi A, Yin S, Wandstrat AE, Li QZ, Olsen NJ. Vitamin D levels and disease status in Texas patients with systemic lupus erythematosus. *Am J Med Sci*. 2008 Feb;335(2):99-104.
53. Wu PW, Rhew EY, Dyer AR, Dunlop DD, Langman CB, Price H, et al. 25-hydroxyvitamin D and cardiovascular risk factors in women with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2009 Oct 15;61(10):1387-95.
54. Kim HA, Sung JM, Jeon JY, Yoon JM, Suh CH. Vitamin D may not be a good marker of disease activity in Korean patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int*. 2010 Mar 30.

55. Szodoray P, Tarr T, Bazso A, Poor G, Szegedi G, Kiss E. The immunopathological role of vitamin D in patients with SLE: data from a single centre registry in Hungary. *Scand J Rheumatol*. 2010 Oct 26.
56. Scalco R, Premaor MO, Froehlich PE, Furlanetto TW. High prevalence of hypovitaminosis D and secondary hyperparathyroidism in elders living in nonprofit homes in South Brazil. *Endocrine*. 2008 Feb;33(1):95-100.
57. Premaor MO, Paludo P, Manica D, Paludo AP, Rossatto ER, Scalco R, et al. Hypovitaminosis D and secondary hyperparathyroidism in resident physicians of a general hospital in southern Brazil. *J Endocrinol Invest*. 2008 Nov;31(11):991-5.
58. Holick MF. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr*. 2004 Dec;80(6 Suppl):1678S-88S.
59. Kamen DL. Vitamin D in lupus - new kid on the block? *Bull NYU Hosp Jt Dis*. 2010;68(3):218-22.

Table 1 Demographic, clinical, and laboratory features of SLE patients.

Patients's features	Whole (n=195)	European-derived (n=148)	African-derived (n=47)	p value ^a
Females (%)	183 (93.8)	138 (93.2)	45 (95.7)	0.734
Age (years±SD)	42.6±13.9	42.3±14.0	43.5±13.7	0.607
Age at diagnosis (years±SD)	32.5±13.7	32.7±13.7	33.9±13.6	0.425
Disease duration (years) ^b	9.2 (3.4-15.2)	9.7 (3.4-15.7)	8.2 (3.3-14.8)	0.600
Malar rash (%)	120 (61.5)	94 (63.5)	26 (55.3)	0.404
Discoid rash (%)	27 (13.8)	16 (10.8)	11 (23.4)	0.053
Photosensitivity (%)	153 (78.5)	123 (83.1)	30 (63.8)	0.009
Oral ulcers (%)	78 (40.0)	62 (41.9)	16 (34.0)	0.432
Arthritis (%)	165 (84.6)	127 (85.8)	38 (80.9)	0.556
Serositis (%)	55 (28.2)	40 (27.0)	15 (31.9)	0.644
Nephritis (%)	89 (45.6)	65 (43.9)	24 (51.1)	0.491
Neurologic disorders (%)	24 (12.3)	19 (12.8)	5 (10.6)	0.885
Hematologic disorders (%)	151 (77.4)	111 (75.0)	40 (85.1)	0.214
Hemolytic anemia (%)	59 (30.3)	45 (30.4)	14 (29.8)	1.000
Leuko/lymphopenia (%)	124 (63.6)	90 (60.8)	34 (72.3)	0.209
Thrombocytopenia (%)	50 (25.6)	35 (23.6)	15 (31.9)	0.348
Immunologic disorders (%)	142 (72.8)	110 (74.3)	32 (68.1)	0.516
Anti-dsDNA (%)	107 (54.9)	83 (56.1)	24 (51.1)	0.664
Anti-Sm (%)	31 (15.9)	20 (13.7)	11 (23.4)	0.178
Anticardiolipin (%)	59 (30.3)	44 (29.9)	15 (31.9)	0.940
Lupic Anticoagulant (%)	21 (10.8)	20 (13.6)	1 (2.1)	0.053
False positive VDRL (%)	14 (7.2)	10 (6.8)	4 (8.5)	0.747
ANA (%)	193 (99.0)	146 (99.3)	47 (100)	1.000
Anti-Ro/SSA (%)	87 (44.6)	62 (42.5)	25 (53.2)	0.264

Anti-La/SSB (%)	28 (14.4)	18 (12.3)	10 (21.3)	0.202
Anti-RNP (%)	56 (28.7)	41 (28.1)	15 (31.9)	0.750
Sjögren (%)	13 (6.7)	12 (8.2)	1 (2.1)	0.194
Antiphospholipid syndrome (%)	14 (7.2)	11 (7.4)	3 (6.4)	1.000
SLEDAI ^b	2 (0-4)	2 (0-4)	2 (0-5)	0.625
SLICC ^b	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-1)	0.814

Abbreviations: SD (standard deviation); SLEDAI (systemic lupus erythematosus disease activity index); SLICC (systemic lupus international collaborating clinics).

^aChi square test for qualitative variables and Mann-Whitney for asymmetric quantitative variables or Student's t-test for symmetric quantitative variables.

^bMedian (interquartile range).

Table 2 *BsmI* and *FokI* genotypic and allelic frequency on European-derived SLE patients, European-derived controls and African-derived SLE patients.

	European-derived Patients (%)	European-derived Controls (%)	African-derived Patients (%)
<i>BsmI</i> Genotype	n=121	n=201	n=42
BB	20 (16.5)	31 (15.4)	03 (07.1)
Bb	61 (50.4)	97 (48.3)	21 (50.0)
bb	40 (33.1)	73 (36.3)	18 (42.9)
p value ^a	0.836		0.248
<i>BsmI</i> Alleles	2n=242	2n=402	2n=84
B	101 (41.7)	159 (39.6)	27 (32.1)
b	141 (58.3)	243 (60.4)	57 (68.9)
p value ^a	0.643		0.155
<i>FokI</i> Genotype	n=131	n=198	n=42
FF	64 (48.9)	86 (43.4)	19 (45.2)
Ff	56 (42.7)	94 (47.5)	18 (42.9)
ff	11 (8.4)	18 (9.1)	05 (11.9)
p value ^a	0.626		0.775
<i>FokI</i> Alleles	2n=262	2n=396	2n=84
F	184 (70.2)	266 (67.2)	56 (66.7)
f	078 (29.8)	130 (32.8)	28 (33.3)
p value ^a	0.459		0.631

Abbreviations: B (allele B); b (allele b), F (allele F) and f (allele f).

^aChi-square test to compare European-derived patients and controls and European and African-derived patients.

Table 3 Vitamin D levels according to *Bsm1* and *Fok1* genotypic frequency in SLE patients.

Genotype	25(OH)D measurement (ng/ml)
BB (n=22)	25.5±9.4
Bb (n=81)	23.7±12.1
bb (n=54)	26.7±11.1
p value ^a	0.322
FF (n=77)	23.0±9.2
Ff (n=67)	25.2±12.5
ff (n=15)	31.6±14.1
p value ^a	0.025

Abbreviations: B (allele B); b (allele b); F (allele F) and f (allele f).

^aANOVA test.

Table 4 Model of multiple linear regression^a for possible factors associated with serum 25(OH)D in SLE patients (n=181).

Variable <i>FokI</i> ^b	B	Standard Error	Beta	CI95% B	p value
Ff	2.07	1.91	0.092	-1.71-5.86	0.281
ff	9.09	3.14	0.243	2.88-15.30	0.004

^aCo-variables that were included in the model: phototype, ethnicity, age, gender, smoking status, BMI (body mass index), hydroxychloroquine use, current corticosteroids use and vitamin D supplementation.

^bBoth categories was compared to FF genotype.

Table 5 Clinical and laboratory features in SLE patients according to vitamin D deficiency.

Clinical Features	Whole (n=181)	25(OH)D		Not adjusted OR (CI95%)	Adjusted OR (CI95%)	p value ^a
		<20 ng/ml (n=63)	≥20 ng/ml (n=118)			
European-derived (%)	134 (74.0)	44 (69.8)	90 (76.3)	0.72 (0.36-1.43)	0.82 (0.40-1.76)	0.589
Female (%)	170 (93.9)	58 (92.1)	112 (94.9)	0.62 (0.18-2.12)	0.59 (0.17-2.05)	0.409
Age (years) ^b	42.6±13.9	41.7±14.9	43.0±13.4	0.99 (0.97-1.02)	0.99 (0.97-1.02)	0.527
Age at diagnosis (years) ^b	32.3±13.5	30.6±12.9	33.2±13.8	0.98 (0.96-1.01)	0.96 (0.92-1.01)	0.117
Disease duration (years) ^c	9.2 (3.4-15.2)	10.9 (3.6-18.4)	8.2 (3.3-14.5)	1.03 (0.97-1.07)	1.04 (0.99-1.08)	0.117
Smoking (%)	61 (33.7)	21 (33.3)	40 (33.9)	0.98 (0.51-1.86)	0.92 (0.46-1.81)	0.802
BMI (kg/m ²) ^b	26.9±5.3	27.3±6.0	26.7±5.0	1.02 (0.97-1.08)	1.03 (0.97-1.09)	0.385
Vitamin D intake (IU) ^c	800 (0-800)	800 (0-800)	800 (0-800)	1.00 (0.99-1.00)	1.00 (0.99-1.00)	0.894
Hydroxychloroquine (%)	176 (97.2)	61 (96.8)	115 (97.5)	0.80 (0.13-4.89)	0.91 (0.14-5.84)	0.919
Corticosteroids - current dose (mg/dia) ^c	0 (0-10.0)	0 (0-17.5)	0 (0-10.0)	1.00 (0.98-1.03)	1.00 (0.98-1.03)	0.815
Corticosteroids - cumulative dose (mg/dia) ^{c, d}	3.15 (0-15.0)	5 (0-15.0)	2.5 (0-15.0)	1.00 (0.98-1.02)	0.99 (0.96-1.03)	0.657
Immunosuppressants (%) ^e	122 (67.4)	40 (63.5)	82 (69.5)	0.76 (0.40-1.46)	0.62 (0.29-1.30)	0.207
Malar rash (%)	111 (61.3)	35 (55.6)	76 (64.4)	0.70 (0.37-1.29)	0.67 (0.35-1.29)	0.230
Discoid rash (%)	24 (13.3)	9 (14.3)	15 (12.7)	1.14 (0.47-2.79)	1.23 (0.49-3.05)	0.660
Photosensitivity (%)	143 (79.0)	48 (76.2)	95 (80.5)	0.78 (0.37-1.62)	0.74 (0.35-1.59)	0.442

Oral ulcers (%)	72 (39.8)	24 (38.1)	48 (40.7)	0.90 (0.48-1.68)	0.82 (0.43-1.59)	0.563
Arthritis (%)	152 (84.0)	56 (88.9)	96 (81.4)	1.83 (0.74-4.56)	1.89 (0.75-4.8)	0.180
Serositis (%)	51 (28.2)	23 (36.5)	28 (23.7)	1.85 (0.95-3.60)	1.70 (0.85-3.41)	0.136
Nephritis (%)	83 (45.9)	25 (39.7)	58 (49.2)	0.68 (0.37-1.27)	0.57 (0.29-1.13)	0.109
Neurologic disorders (%)	22 (12.2)	7 (11.1)	15 (12.7)	0.86 (0.33-2.23)	0.72 (0.26-2.01)	0.536
Hematologic disorders (%)	140 (77.3)	49 (77.8)	91 (77.1)	1.04 (0.50-2.16)	1.01 (0.48-2.14)	0.975
Immunologic disorders (%)	134 (74.0)	51 (81.0)	83 (70.3)	1.79 (0.85-3.77)	2.00 (0.91-4.36)	0.085
ANA (%)	179 (99.4)	62 (98.4)	117 (99.2)	-	-	-
Sjögren's syndrome (%)	11 (6.1)	2 (3.2)	9 (7.6)	0.40 (0.08-1.92)	0.41 (0.83-1.98)	0.264
Antiphospholipid syndrome (%)	14 (7.7)	7 (11.1)	7 (5.9)	1.98 (0.66-5.93)	2.13 (0.65-6.98)	0.214
SLEDAI ^c	2 (0-4)	2 (0-5)	2 (0-4)	1.09 (0.96-1.10)	1.03 (0.95-1.10)	0.485
SLICC ^c	0 (0-1)	0 (0-2)	0 (0-1)	1.18 (0.92-1.52)	1.19 (0.96-1.54)	0.196

Abbreviations: BMI (body mass index); OR (odds ratio); SLEDAI (systemic lupus erythematosus disease activity index); SLICC (systemic lupus international collaborating clinics); IU (international units).

^aLogistic regression adjusted to phototype, ethnicity, age, gender, smoking status, BMI, hydroxychloroquine use, current corticosteroids use and vitamin D supplementation. ^bMean±SD (standard deviation). ^cMedian (interquartile range). ^dMean daily dose of corticosteroids used in the last 12 months. ^eCurrent use of mycophenolate mofetil, cyclophosphamide, azathioprine, methotrexate, cyclosporin or rituximab.

6 CONSIDERAÇÕES GERAIS

O presente estudo não encontrou aumento significativo dos polimorfismos *BsmI* e *FokI* nos pacientes eurodescendentes com LES, quando comparados com controles saudáveis, o que pode ser uma característica própria da população estudada, visto que estes dados discordam de estudos realizados em países asiáticos com número menor de pacientes. Estes polimorfismos não apresentaram associação com expressões clínicas e laboratoriais da doença.

O polimorfismo *FokI* do gene *VDR* influenciou significativamente os níveis plasmáticos da 25(OH)D nos pacientes com LES, achado ainda inédito na literatura. O genótipo *f/f* associou-se significativamente com maiores concentrações da 25(OH)D, quando comparado com o genótipo *F/F*. Este achado reforça o importante papel deste polimorfismo na função do VDR. O genótipo *f/f* é responsável pela síntese da forma longa da proteína do VDR que é menos ativa que a forma curta relacionada com o genótipo *F/F* e, conseqüentemente, diminui a auto-regulação negativa que a 1,25(OH)₂D exerce sobre seu precursor, aumentando as concentrações da 25(OH)D. Esta informação é útil para futuros estudos clínicos e experimentais e deve ser considerada no momento da determinação dos níveis da 25(OH)D. Além disto, ela deve ser incluída nos debates sobre quais seriam as concentrações ideais de vitamina D para o bom funcionamento musculoesquelético, cardiovascular e imunológico e como melhorar a suplementação.

A deficiência da vitamina D é muito prevalente no nosso meio. Os pacientes com LES estão mais suscetíveis em virtude da frequente necessidade de evitar exposição solar. Mais da metade dos pacientes com deficiência de vitamina D estava fazendo

reposição, o que suscita questionamentos a respeito de como usar e quanto devemos realmente recomendar aos pacientes para que sejam atingidos níveis séricos normais. Associação entre deficiência de vitamina D e expressões clínicas e laboratoriais do LES não foi encontrada nos pacientes estudados.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presente tese de doutorado é fruto do trabalho realizado no ambulatório de Lúpus Eritematoso Sistêmico do Serviço de Reumatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em parceria com o Laboratório de Imunogenética do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. A participação de professores, médicos contratados, alunos e bolsistas de iniciação científica foi fundamental para a idealização, realização e manutenção deste ambiente de pesquisa que é muito produtivo para todos os integrantes.

Durante o programa de pós-graduação que iniciou em janeiro de 2007, o autor participou das seguintes publicações:

1. Monticielo OA, Chies JA, Mucenic T, Rucatti GG, Junior JM, da Silva GK, et al. Mannose-binding lectin gene polymorphisms in Brazilian patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2010 Mar;19(3):280-7.
2. Palominos PE, Massignan A, Monticielo OA, Bortoli R, Kohem C, Cruz DB, et al. Abdominal angiostrongyliasis: what does the rheumatologist must know about it? *Int J Rheum Dis*. 2009 Sep;12(3):267-71.
3. Bortoli R, Monticielo OA, Chakr RM, Palominos PE, Rohsig LM, Kohem CL, et al. Acquired factor XI inhibitor in systemic lupus erythematosus - case report and literature review. *Semin Arthritis Rheum*. 2009 Aug;39(1):61-5.
4. Mucenic T, Brenol JC, Bredemeier M, Paiva Dos Santos B, Chies JA, Monticielo OA, et al. Glu298Asp eNOS polymorphism is not associated with SLE. *Lupus*. 2009 Apr;18(5):448-51.

5. Veit TD, Cordero EA, Mucenic T, Monticielo OA, Brenol JC, Xavier RM, et al. Association of the HLA-G 14 bp polymorphism with systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2009 Apr;18(5):424-30.
6. Brenol CV, Chies JA, Brenol JC, Monticielo OA, Franciscatto P, Birriel F, et al. Endothelial nitric oxide synthase T-786C polymorphism in rheumatoid arthritis: association with extraarticular manifestations. *Clin Rheumatol*. 2009 Feb;28(2):201-5.
7. Monticielo OA, Mucenic T, Xavier RM, Brenol JC, Chies JA. The role of mannose-binding lectin in systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol*. 2008 Apr;27(4):413-9.
8. Monticielo, Odirlei André; Palominos, Penélope Esther; Chakr, Rafael Mendonça da Silva; Bortoli, Rodrigo; Xavier, Ricardo Machado; Brenol, João Carlos Tavares. Esclerose sistêmica e níveis séricos elevados de organoclorado: uma associação possível?/ Systemic sclerosis and elevated organochlorine blood levels: a possible association? *Rev. Bras. Reumatol*. 48(1): 51-54, ND. 2008 Feb.
9. Brenol CV, Monticielo OA, Xavier RM, Brenol JC. [Rheumatoid arthritis and atherosclerosis]. *Rev Assoc Med Bras*. 2007 Sep-Oct;53(5):465-70.

8 ANEXOS

8.1 ANEXO I

CRITÉRIOS DE CLASSIFICAÇÃO DO LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

1. Eritema malar: eritema fixo, plano ou elevado, nas eminências malares, tendendo a poupar a região nasolabial.

2. Eritema Discóide: placas eritematosas elevadas, ocorrendo cicatrização atrófica nas lesões antigas.

3. Fotossensibilidade: eritema cutâneo resultante de reação incomum ao sol, por história do paciente ou observação do médico.

4. Úlcera oral: ulceração oral ou nasofaríngea, geralmente não dolorosa, observada pelo médico.

5. Artrite: artrite não erosiva envolvendo 2 ou mais articulações periféricas, caracterizada por dor à palpação, edema ou derrame.

6. Serosite:

(a) pleurite – história convincente de dor pleurítica, atrito auscultado pelo médico ou evidência de derrame pleural.

ou

(b) pericardite – documentada por ECG, atrito ou evidência de derrame pericárdico.

7. Alteração renal:

(a) proteinúria persistente >0,5 g por dia ou >3+ se não quantificada.

ou

(b) cilindros celulares: podem ser hemáticos, granulares, tubulares ou mistos.

8. Alteração neurológica:

(a) convulsão – na ausência de drogas implicadas ou alterações metabólicas conhecidas (ex.: uremia, cetoacidose ou distúrbios hidroeletrólíticos).

ou

(b) psicose - na ausência de drogas implicadas ou alterações metabólicas conhecidas (ex.: uremia, cetoacidose ou distúrbios hidroeletrólíticos).

9. Alteração hematológica:

(a) anemia hemolítica com reticulocitose.

ou

(b) leucopenia – $<4000/\text{mm}^3$ total em 2 ou mais ocasiões.

ou

(c) linfopenia – $<1500/\text{mm}^3$ em 2 ou mais ocasiões.

ou

(d) trombocitopenia – $<100\ 000/\text{mm}^3$ na ausência de drogas causadoras.

10. Alteração imunológica:

(a) anti-dsDNA – anticorpo ao DNA nativo em títulos anormais.

ou

(b) Anti-Sm – presença do anticorpo ao antígeno nuclear Sm.

ou

(c) Achados positivos de anticorpos antifosfolípeos baseados em: (1) concentração sérica anormal de anticardiolipina IgG ou IgM; (2) teste positivo para anticoagulante lúpico usando teste-padrão ou (3) VDRL falso positivo por pelo menos 6 meses e confirmado por FTA-Abs.

11. Anticorpo antinuclear (FAN): título anormal do FAN por imunofluorescência ou método equivalente em qualquer momento, na ausência de drogas sabidamente associadas ao lúpus induzido por drogas.

Para fins de classificação de doença, o (a) paciente deve apresentar pelo menos 4 dos 11 critérios.

8.2 ANEXO II

PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO CLÍNICA E LABORATORIAL DO AMBULATÓRIO DE LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

IDENTIFICAÇÃO

Nome: _____ Registro: _____ n° _____
 Sexo: F M Raça: Branca Não branca
 Data de nascimento: ____/____/____
 Profissão: _____ Estado civil: _____
 Naturalidade/Procedência: _____
 Endereço: _____
 Cidade: _____ CEP: _____ - _____
 Telefones: _____

DATA DO INÍCIO DOS SINTOMAS: ____/____/____ DATA DO DIAGNÓSTICO: ____/____/____
 MANIFESTAÇÕES INICIAIS NO DIAGNÓSTICO: _____
 INÍCIO DO ACOMPANHAMENTO NO HCPA: ____/____/____
 ÓBITO: S N DATA: ____/____/____
 CAUSA: _____

CRITÉRIOS PARA CLASSIFICAÇÃO PARA LES (ACR 1997)

1. Eritema malar 2. Eritema discóide 3. Fotossensibilidade 4. Úlceras orais/nasais
 5. Artrite 6. Serosite: Pleurite Pericardite
 7. Doença renal: Classe: _____ (data: ____/____/____) sem biópsia
 Índice de atividade ____/____ Índice de cronicidade: ____/____
 8. Doença neurológica: Psicose Convulsão
 9. Hematológico: Anemia hemolítica Leucopenia / linfopenia Plaquetopenia
 10. FAN: Titulação: _____ Padrão: _____
 11. Imunológico: anti DNA (Titulação: _____) anti Sm
 aCL: IgG: _____ IgM: _____
 Anticoagulante Lúpico VDRL

ALTERAÇÕES CLÍNICAS E LABORATORIAIS ASSOCIADAS

Hipertensão	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> N	Tabagismo	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> N	<input type="checkbox"/> Atual <input type="checkbox"/> Passado	Anos-maço: _____
Diabetes	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> N	Etilismo	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> N	<input type="checkbox"/> Atual <input type="checkbox"/> Passado	
Dislipidemia	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> N	Obesidade	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> N	Peso: _____ Altura: _____ IMC: _____	
Hist. Fam. DCV	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> N	SAAF	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> N	Assinalar critérios na folha anexa	
Hist. Fam. LES	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> N	S. de Sjögren	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> N	Assinalar critérios na folha anexa	
Eventos CV	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> N	<input type="checkbox"/> AVC <input type="checkbox"/> AIT <input type="checkbox"/> Angina <input type="checkbox"/> IAM <input type="checkbox"/> TVP <input type="checkbox"/> Claudicação intermitente <input type="checkbox"/> Outros: _____				

História obstétrica: G: ____/P: ____/C: ____/A: ____ obs.: _____

DAIs/Sobreposições: _____

Anti- ENA: _____

TRATAMENTO REALIZADO

- | | | |
|---|---|---|
| <input type="checkbox"/> Corticoterapia (Dose Max: _____ mg/kg/d) | <input type="checkbox"/> Pulsoterapia | <input type="checkbox"/> Ciclofosfamida |
| <input type="checkbox"/> Azatioprina | <input type="checkbox"/> Cloroquina / Hidroxicloroquina | <input type="checkbox"/> Metotrexate |
| <input type="checkbox"/> Micofenolato mofetil | <input type="checkbox"/> Dapsona | <input type="checkbox"/> Ciclosporina |
| <input type="checkbox"/> Rituximabe | <input type="checkbox"/> AAS | <input type="checkbox"/> Anticoagulante |
| <input type="checkbox"/> ACO/TRH | <input type="checkbox"/> CaCo3/D3 | <input type="checkbox"/> Bisfosfonados |
| <input type="checkbox"/> Estatina | <input type="checkbox"/> Danazol | <input type="checkbox"/> Anti-hipertensivos |

8.3 ANEXO III

FICHA DE AVALIAÇÃO PARA DOSAGEM DE VITAMINA D

IDENTIFICAÇÃO (data da coleta: ____/____/____)

PESQUISADOR: _____

NOME: _____ Nº _____

REGISTRO: _____

SEXO: F M

FOTOTIPO: _____

IDADE: _____ DATA DE NASCIMENTO: ____/____/____

DATA DO DIAGNÓSTICO: ____/____/____

SLEDAI: _____ - DATA: ____/____/____

SLICC: _____ - DATA: ____/____/____

PESO: _____ ALTURA: _____ IMC: _____

CICLO MENSTRUAL: _____

TABAGISMO: _____

ALCOOLISMO: _____

INGESTA DIETÉTICA DE CÁLCIO: _____

CARBONATO DE CÁLCIO (DOSE E DURAÇÃO): _____

VITAMINA D (DOSE E DURAÇÃO): _____

DOSE ATUAL DE CORTICÓIDE: _____

DOSE MÉDIA DE CORTICÓIDE NO ÚLTIMO ANO: _____

8.4 ANEXO IV

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

ESTUDO DA VITAMINA D EM PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

POR QUE ESTE ESTUDO ESTÁ SENDO REALIZADO?

Os portadores de Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) apresentam fatores hormonais implicados no seu surgimento e evolução. Este estudo está sendo realizado para tentar identificar possíveis fatores de risco para o desenvolvimento de LES e existência de correlação com as manifestações clínicas.

DE QUE CONSTA O ESTUDO?

Mediante consentimento do paciente, será coletada uma amostra de 10 ml sangue que será destinada à dosagem dos níveis de vitamina D.

QUAIS SÃO AS VANTAGENS DA PARTICIPAR NESTE ESTUDO?

1. Avaliar a influência da vitamina D nos pacientes com LES.
2. Colaborar para o avanço e progresso do conhecimento sobre a LES.

QUAIS SÃO AS DESVANTAGENS DA PARTICIPAÇÃO NESTE ESTUDO?

1. Comparecer ao hospital
2. Realizar punção venosa para coleta de sangue, que pode causar dor temporária e coleção de sangue na pele (equimose ou hematoma)

HÁ A POSSIBILIDADE DE ESTE ESTUDO CONTINUAR?

Este estudo foi planejado para encerrar em dezembro de 2010 e para avaliar a influência da vitamina D nos pacientes com LES. No entanto, é possível que outros fatores relacionados ao surgimento do LES possam ser analisados futuramente. Para tal, o paciente, através de um novo contato com a equipe pesquisadora, deverá autorizar novamente o uso da amostra já coletada e o novo projeto deverá ser avaliado pela Comissão de Ética em Pesquisa da instituição e Conselho Nacional de Ética em

Pesquisa. Outra possibilidade é a de um novo contato com o paciente em 5 ou 10 anos para verificar a evolução da doença.

DADOS RELATIVOS À PROTEÇÃO DO PACIENTE

- A. Os dados coletados neste estudo são confidenciais, e não serão revelados dados que permitam identificar os pacientes em hipótese alguma.
- B. A adesão ao estudo é voluntária, ou seja, cada paciente é livre para decidir não participar.
- C. A decisão de não participar não interferirá no acompanhamento normal dos pacientes no Ambulatório, na Emergência nem na Internação do Hospital de Clínicas.
- D. O paciente é livre para desistir em qualquer momento do estudo, sem necessidade de fornecer justificativa.

COMPREENSÃO E AUTORIZAÇÃO

Tendo compreendido as informações do presente termo de consentimento e concordado com elas, permito que os dados desta pesquisa sejam utilizados para análise da influência da vitamina D em pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico.

Paciente: _____

Registro: _____ Assinatura: _____

Pesquisador: _____

Assinatura do pesquisador: _____

Porto Alegre, ____ de _____ de 20____.

Pesquisadores responsáveis:

Prof. Dr. João Carlos Tavares Brenol: Telefone: (051) 2101 8340; FAX: (051) 3331 3834

Odirlei André Monticielo: Telefone: (051) 9652 6170

Comitê de Pesquisa e Ética em Saúde: Telefone: (051) 2101 8304