

Eu, Cristina Gonzales, tradutora pública e intérprete comercial, certifico e dou fé, para os devidos fins, que me foi apresentado um documento no idioma INGLÊS, em **PDF**, que passo a traduzir para o vernáculo no seguinte teor:

RELATÓRIO

Dermato-Endocrinologia 5:1, 1-13; Janeiro/Fevereiro/Março 2013; © 2013 Landes Bioscience

Um estudo piloto que avalia o efeito da administração prolongada de altas doses diárias de vitamina D no curso clínico de vitiligo e psoríase

Danilo C. Finamor,¹ Rita Sinigaglia-Coimbra,¹ Luiz C.M. Neves,² Marcia Gutierrez,³ Jeferson J. Silva,¹ Lucas D. Torres,¹ Fernanda Surano,¹ Domingos J. Neto,⁵ Neil F. Novo,⁶ Yara Juliano,⁶ Antonio C. Lopes⁴ e Cicero Galli Coimbra^{1,*}

¹Laboratório de Fisiopatologia Clínica e Experimental; Universidade Federal de São Paulo; São Paulo, Brasil; ²Instituto de Ciências da Saúde; Universidade Paulista; São Paulo, Brasil; ³Farmácia Sensitiva; São Paulo, Brasil; ⁴Disciplina de Clínica Médica; Universidade Federal de São Paulo; São Paulo, Brasil; ⁵Hospital Heliópolis; São Paulo, Brasil; ⁶Disciplina de Cirurgia Plástica; Universidade Federal de São Paulo; São Paulo, Brasil

Palavras-chave: vitiligo, psoríase, vitamina D, 25(OH)D3, alta dose, cálcio, tratamento, toxicidade, autoimunidade

Abreviaturas: IMC, índice de massa corporal; ICs, intervalos de confiança; CYP, superfamília citocromo P450; CYP27B1, 25-hidroxivitamina D-1 alfa-hidroxilase; DBP, proteína de ligação de vitamina D; VDR, receptor de vitamina D; FGF23, fator de crescimento do fibroblasto 23; HPLC, cromatografia líquida de alta eficiência; IOM, Institute of Medicine; PI, padrão interno; K_m, Constante de Michaelis-Menten; PASI, índice da gravidade da psoríase por área; PTH, paratormônio; IDR, ingestão diária recomendada; Treg, Linfócitos T reguladores; VDR, receptor de vitamina D; V_{máx}, velocidade máxima de reação enzimática; UV, ultravioleta; UVA, ultravioleta A

A autoimunidade tem sido associada à deficiência e resistência da vitamina D, com polimorfismos genéticos relacionados ao metabolismo de vitamina D frequentemente descritos em pacientes afetados. Altas doses de vitamina D3 podem compensar a resistência herdada aos seus efeitos biológicos. Este estudo teve como objetivo avaliar a eficácia e a segurança do tratamento prolongado de alta dosagem de vitamina D3 em pacientes com psoríase e vitiligo. Nove pacientes com psoríase e 16 pacientes com vitiligo receberam vitamina D3 35.000 UI uma vez por dia durante seis meses em associação com uma dieta de baixo cálcio (evitando laticínios e alimentos enriquecidos com cálcio, como “leite” de aveia, arroz ou soja) e hidratação (mínimo de 2,5 L diários). Todos os pacientes com psoríase pontuaram de acordo com o “índice da gravidade da psoríase por área” (PASI) na referência e após o tratamento. A avaliação da resposta clínica dos pacientes com vitiligo exigiu uma escala de classificação de quartis. Todos os pacientes apresentaram baixos níveis de vitamina D (soro 25(OH)D3 ≤ 30 ng/mL) na referência. Após o tratamento, os níveis de 25(OH)D3 aumentaram significativamente (de 14,9 ± 7,4 para 106,3 ± 31,9 ng/mL e de 18,4 ± 8,9 para 132,5 ± 37,0 ng/mL) e os níveis de PTH diminuíram significativamente (de 57,8 ± 16,7 para 28,9 ± 8,2 pg/mL e de 55,3 ± 25,0 para 25,4 ± 10,7 pg/mL) em pacientes com psoríase e vitiligo, respectivamente. Concentrações de soro de PTH e 25(OH)D3 correlacionadas inversamente. O escore PASI melhorou significativamente em todos os nove pacientes com psoríase. Catorze dos 16 pacientes com vitiligo apresentaram de 25-75% de repigmentação. A ureia sérica, creatinina e cálcio (total e ionizado) não mudaram e a excreção urinária de cálcio aumentou dentro da faixa normal. A terapia de vitamina D3 de alta dosagem pode ser eficaz e segura para pacientes com vitiligo e psoríase.

Introdução

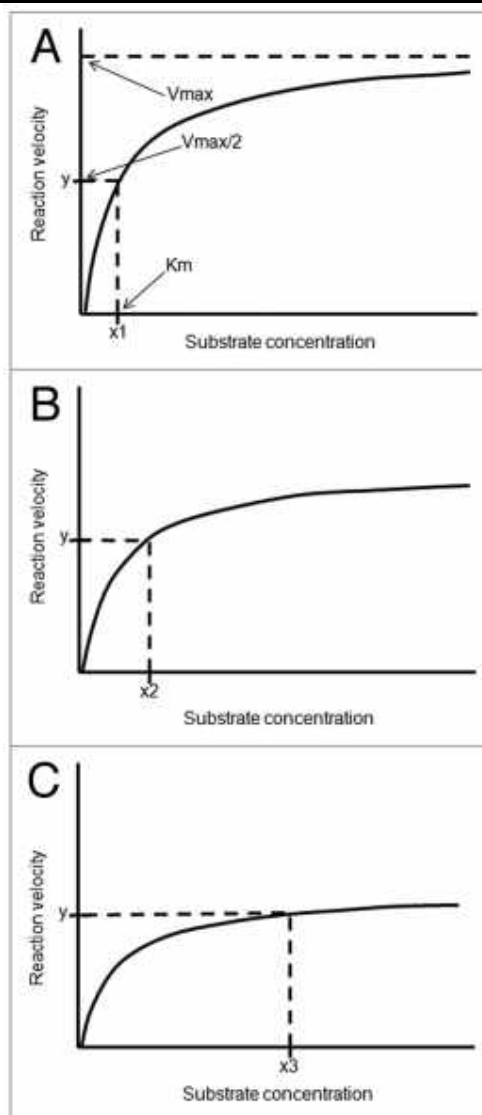
O hormônio esteroide conhecido como a forma ativa de vitamina D (“calcitriol”, “1,25-1,25-dihidroxicolecalciferol” ou “1,25(OH)2D”) gera uma ampla gama de respostas biológicas. O genoma humano possui 2.776 posições ocupadas pelo VDR; cerca de 10% dos genes humanos são, portanto, direta e/ou indiretamente responsivos à vitamina D.¹ Da mesma forma, diversas células humanas (incluindo osso, cólon, mama, próstata, pele, músculo, vaso sanguíneo, cérebro e células imunes) expressam a enzima 25-hidroxivitamina D-1 α -hidroxilase (CYP27B1), indicando que a síntese intrácina e parácina extra-renal 1,25(OH)2D3 pode afetar criticamente as atividades de muitos tecidos e órgãos.²⁻⁴ Nesse ponto, os dados cumulativos associaram baixos níveis de vitamina D (como avaliado pela medição de “25-hidroxivitamina D3” ou “25(OH)D3”— a principal forma de circulação da vitamina D) não só para raquitismo e osteoporose, mas também para um número crescente de doenças prevalentes, incluindo doenças autoimunes, infecciosas e cardiovasculares, hipertensão, diabetes e cânceres mortais.^{2,5-7}

Contrastando com a importância fisiopatológica de 1,25(OH)2D3, a deficiência de vitamina D é uma epidemia mundial pouco reconhecida entre crianças e adultos.² Exposição solar regular e moderada (a única fonte natural significativa de vitamina D para a maioria dos indivíduos) é atualmente incomum devido ao estilo de vida em ambientes fechados (*indoor*), à prevenção a exposição solar e ao uso indiscriminado do protetor solar.⁷ Embora haja evidências que indicam que as doses fisiológicas devem estar mais próximas das alcançadas por alguns minutos diários de exposição da pele à luz solar,² a IDR atualizada (de 200 para 600 UI por dia) pelo Institute of Medicine em 2010⁸ permanece muito menor do que isso,⁷ e é inferior às doses diárias necessárias para corrigir a deficiência de vitamina D na maioria dos indivíduos.⁹

*Correspondência para: Cicero G. Coimbra; E-mail: coimbracg.nexp@epm.br

Apresentado: 29/01/2013; Revisado: 10/04/2013; Aceito: 25/04/2013

<http://dx.doi.org/10.4161/derm.24808>



Legenda:

Reaction velocity

Substrate concentration

V_{max}

Velocidade de reação

Concentração de substrato

$V_{m\acute{a}x}$

Figura 1. Cinética enzimática de três variantes polimórficas hipotéticas de 25-hidroxivitamina D-1 α -hidroxilase (CYP27B1), “A”, “B” e “C”. Algumas variantes previsivelmente apresentam diminuição da afinidade pelo substrato (aumento da K_m) e/ou diminuição da $V_{m\acute{a}x}$, exigindo uma concentração de substrato suprafisiológico para alcançar uma taxa fisiológica de transformação de substrato. As variantes polimórficas “B” e “C” requerem concentrações plasmáticas mais elevadas de 25-hidroxivitamina D (“ x_2 ” e “ x_3 ” respectivamente) para alcançar a taxa “y” da síntese da 1,25-dihidroxivitamina D do que a K_m (“ x_1 ”) da variante enzimática “A”. Comparada com “A” ou “B”, a variante polimórfica “C” requer uma concentração plasmática muito maior de 25-hidroxivitamina D para compensar uma atividade intracelular reduzida e alcançar concentrações fisiológicas de 1,25-dihidroxivitamina D dentro das células imunes.

Doses diárias mais altas podem ser particularmente críticas para controlar a atividade de doenças autoimunes. Dados cumulativos nos últimos 30 anos estabeleceram os efeitos regulatórios da vitamina D em respostas imunes inatas e adaptativas,^{10,11} e níveis circulantes de 25(OH)D3 inversamente relacionados

à atividade da doença autoimune.¹²⁻¹⁹ Ações intrócrinas e parócrinas de 1,25(OH)2D3 sintetizadas dentro de células imunes podem controlar a ativação inadequada de células produtoras de interleucina-17²⁰⁻²⁵ — a resposta aberrante Th17, que pode desempenhar um papel patogênico importante em múltiplas doenças inflamatórias e autoimunes.²⁶ Evidências cumulativas também indicam que a vitamina D promove — por mecanismos diretos e indiretos — células T reguladoras (Treg) que inibem uma variedade de respostas imunes inadequadas (inatas e adaptativas) subjacentes à doença autoimune.^{21,27}

As estimativas das exigências diárias de vitamina D3 para pacientes com doenças autoimunes devem levar em conta as consequências funcionais dos polimorfismos genéticos relacionados ao metabolismo da vitamina D. Por exemplo, as alterações polimórficas da enzima CYP27B1 associadas à autoimunidade^{28,29} previsivelmente resultam em uma resistência relativa à vitamina D, ou seja, um nível mais alto de circulação 25(OH)D3 necessário para alcançar concentrações normais de 1,25(OH)2D3 dentro das células imunes. Enquanto a K_m in vivo da enzima normal excede a variação da concentração fisiológica de 25(OH)D3,^{30,31} uma variante polimórfica pode ter uma K_m mais alto (diminuição da afinidade com o substrato) e/ou uma $V_{máx}$ inferior, exigindo maiores concentrações de substrato para alcançar uma taxa fisiológica de formação do produto (**Fig. 1**). Polimorfismos genéticos frequentes e variabilidade ampla (dez a cem vezes) na expressão enzimática da superfamília citocromo P450 de enzimas (CYPs) são comuns e podem modificar consideravelmente a atividade enzimática, causando grande variabilidade interindividual na taxa de formação do produto.³²⁻³⁵ Portanto, um indivíduo portador de um polimorfismo CYP27B1 pode ser propenso a desenvolver autoimunidade ao manter concentrações de 1,25(OH)2D3 dentro das células imunes que são insuficientes para os efeitos tolerogênicos totais da intrócrina e parócrina desta poderosa molécula de esteroides. Altas doses de vitamina D3 levando à faixa suprafisiológica de circulação de 25(OH)D3 podem compensar esse estado genético relacionado à deficiência relativa de vitamina D, estabelecendo assim tolerância aos auto-antígenos.

Doses que variam até 40.000 UI/dia de vitamina D3 provavelmente são seguras para indivíduos saudáveis,^{36,37} e polimorfismos enzimáticos que afetam o metabolismo da vitamina D podem aumentar a tolerabilidade em pacientes com doenças autoimunes. Este estudo teve como objetivo avaliar a eficácia terapêutica e a segurança de uma dose diária de 35.000 UI de vitamina D3 administrada com dieta de baixo cálcio por 6 meses para pacientes com psoríase e vitiligo.

Resultados

Indivíduo: As características físicas dos 25 pacientes que participaram deste estudo estão mostradas na **Tabela 1**.

Parâmetros laboratoriais. Como mostrado nas **Tabelas 2 e 3** e **Figuras 2 e 5**, todos os pacientes apresentaram baixos níveis de referência de 25(OH)D3 (≤ 30 ng/mL ou ≤ 75 nmol/L), com média de $14,9 \pm 7,4$ ng/mL no grupo com psoríase e média de $18,4 \pm 8,9$ ng/mL em pacientes com vitiligo. Após 6 meses de tratamento com vitamina D3 (35.000 UI por dia), os níveis de 25(OH)D3 aumentaram significativamente, a $106,3 \pm 31,9$ ng/mL no grupo com psoríase ($p < 0,0001$, Teste de Postos Sinalizados de Wilcoxon) e $132,5 \pm 37,0$ ng/mL em pacientes com vitiligo ($p < 0,0005$, Teste de Postos Sinalizados de Wilcoxon).

As concentrações de referência de PTH foram de $57,8 \pm 16,7$ pg/mL no grupo com psoríase e $55,3 \pm 25,0$ pg/mL em pacientes com vitiligo. Após 6 meses de tratamento com vitamina D3, os níveis de PTH diminuíram significativamente, a $28,9 \pm 8,2$ pg/mL no grupo com psoríase ($p = 0,0039$, Teste de Postos Sinalizados de Wilcoxon) e $25,4 \pm 10,7$ pg/mL em pacientes com vitiligo ($p = 0,0005$, Teste de Postos Sinalizados de Wilcoxon) (**Tabelas 2 e 3**, **Fig. 2 e 5**).

A análise estatística revelou uma correlação negativa entre os níveis de 25(OH)D3 e PTH ($r = -0,6753$, $p = 0,0153$ no grupo com psoríase; $r = -0,5091$, $p = 0,0015$ em pacientes com vitiligo, correlação de Pearson).

A regressão linear também revelou correlação negativa entre esses dois parâmetros utilizando dados coletados na referência e resultado de 6 meses (**Fig. 2 e 5**, r^2 e valores-p indicados).

As concentrações de cálcio sérico, ureia e creatinina (total e ionizado) não diferem significativamente dos valores da referência após 6 meses de tratamento de alta dosagem de vitamina D3 (**Tabelas 2 e 3**; **Fig. 3 e 6**; Teste de Postos Sinalizados de Wilcoxon).

A excreção urinária de cálcio aumentou significativamente em 6 meses de tratamento de vitamina D3 em ambos os grupos de $123,6 \pm 60,0$ mg/24 h para $226,8 \pm 41,6$ mg/24 h no grupo com psoríase ($p = 0,0039$, Teste de Postos Sinalizados de Wilcoxon) e de $158,3 \pm 73,6$ mg/24 h a $230,1 \pm 81,4$ mg/24 h no grupo com vitiligo ($p = 0,0239$, Teste de Postos Sinalizados de Wilcoxon), mas permaneceu dentro da faixa normal (**Tabelas 2 e 3**; **Fig. 3 e 6**). A análise estatística revelou correlação positiva entre excreção urinária de cálcio e os níveis de 25(OH)D3 em ambos os grupos de pacientes ($r = 0,5372$, $p = 0,0108$ no grupo com psoríase; $r = 0,3972$, $p = 0,0122$ em pacientes com vitiligo, correlação de Pearson). A regressão linear também revelou correlação negativa entre esses parâmetros (**Fig. 3 e 6**, r^2 e valores-p indicados).

Resultado clínico. A condição clínica de todos os pacientes com psoríase ($n = 9$) melhorou significativamente durante o tratamento (**Fig. 4 e 8**; $p = 0,0023$, Teste de Postos Sinalizados de Wilcoxon). A análise estatística revelou correlação negativa entre o escore PASI e os níveis de 25(OH)D3 ($r = -0,5614$, $p = 0,0011$, correlação de Pearson). A regressão linear também demonstrou correlação entre esses parâmetros (**Fig. 4**, r^2 e valores-p indicados).

Dois dos 16 pacientes com vitiligo não apresentaram repigmentação das áreas afetadas; quatro pacientes apresentaram 1-25% de repigmentação, cinco pacientes apresentaram 26-50% de repigmentação, cinco pacientes apresentaram 51-75% de repigmentação e nenhum apresentou mais de 75% de repigmentação das áreas afetadas (**Fig. 7 e 9**).

Discussão

Trata-se de um ensaio aberto em que todos os pacientes com psoríase ou vitiligo receberam tratamento oral com 35.000 UI de vitamina D por dia durante seis meses associados a medidas preventivas (restrição parcial de cálcio dietético e hidratação diária de pelo menos 2,5 L). O tratamento proporcionou benefício para 9 de 9 pacientes com psoríase e para 14 de 16 pacientes com vitiligo.

Uma abordagem controlada com placebo foi evitada por razões éticas. Dados cumulativos implicaram deficiência de vitamina D na fisiopatologia de vitiligo^{38,39} e psoríase.³⁹⁻⁴¹ Deficiência de vitamina D (níveis deficientes de um potente hormônio esteroide que modula centenas de genes humanos) também aumenta o risco de desenvolver ou agravar uma miríade de transtornos graves de saúde,^{1,5-7} incluindo câncer⁴² ou morte por eventos cardiovasculares.⁴³ Administrar placebo a pacientes com deficiência de vitamina D por causa da randomização pode não ser eticamente aceitável.^{44,45} Os potenciais participantes da pesquisa não correriam o risco de serem designados ao grupo controle se informados sobre a associação dos níveis de vitamina D e atividade da doença. Por outro lado, omitir intencionalmente informações essenciais para facilitar o consentimento ao tratamento com placebo pode implicar desrespeito à autonomia do paciente⁴⁶ e violação do princípio da beneficência por parte do médico.⁴⁷ Além disso, restaurar os níveis intracelulares fisiológicos de um potente hormônio esteroide (aumentando a disponibilidade de substrato à sua enzima de ativação polimórfica) deve ser considerada como uma boa prática médica.

Tabela 1. Características dos indivíduos do estudo

Z	Vitiligo	Psoríase
Idade (a $\pm$ DP)	49,2 $\pm$ 11,9	45,3 $\pm$ 12,2
Sexo (N)	3	4
M	13	5

F		
IMC ± DP (Kg/m ²)	26,6 ± 4,4	27,0 ± 4,0
Fototipo cutâneo de Fritzpatrik	(N)	(N)
I	0	1
II	0	2
III	11	3
IV	4	3
V	1	0
VI	0	0

IMC, índice de massa corporal; a, anos; N, número de indivíduos; DP, desvio padrão.

Tabela 2. A concentrações de soro de 25(OH)D₃, PTH, cálcio total, cálcio ionizado, ureia e creatinina e estado clínico de nove pacientes com psoríase na referência e após o tratamento com vitamina D (35.000 UI por dia por 6 meses)

Parâmetro (faixa normal)	Período de Referência (média ± DP)	6 meses (média ± DP)	Valor-p *
25(OH)D₃ (30–100 ng/mL)	14,9 ± 7,4	106,3 ± 31,9	< 0,0001
PTH (8–74 pg/mL)	57,8 ± 16,7	28,9 ± 8,2	0,0039
Cálcio Sérico (8,4–11 mg/dL)	9,7 ± 0,7	9,4 ± 0,7	0,1641
Cálcio ionizado (1,10–1,40 mmol/L)	1,4 ± 0,3	1,2 ± 0,2	0,1641
Cálcio Urinário (100–300 mg/24h)	123,6 ± 60,0	226,8 ± 41,6	0,0039
Ureia (< 50 mg/dL)	35,8 ± 8,3	28,9 ± 9,8	0,1289
Creatinina (0,7–1,5 mg/dL)	0,9 ± 0,2	0,8 ± 0,2	0,6406

* Teste de Postos Sinalizados de Wilcoxon.

Não foram observados sinais laboratoriais ou clínicos de toxicidade (hipercalcemia, hipercalcúria ou disfunção renal) em nenhum dos 25 participantes, incluindo um paciente com vitiligo que atingiu uma concentração de soro de 25(OH)D₃ de 202,2 ng/mL (504,49 nmol/L). Considerando que 25(OH)D₃ tem uma meia-vida de 15 dias ⁴⁸ essas altas concentrações de 25(OH) D₃ foram alcançadas em dois meses e sustentadas nos últimos quatro meses de tratamento sem efeitos colaterais. Até onde sabemos, esta é a maior dose de vitamina D₃ administrada terapeuticamente a pacientes com doenças autoimunes diariamente por vários meses. Esses achados são consistentes com o ponto de vista de que as concentrações de soro 25(OH)D inferiores a 750 nmol/L (300 ng/mL) são improváveis de causar toxicidade.⁴⁹ O aprimoramento da imunidade inata e adaptativa⁵⁰ é uma vantagem significativa da terapia de vitamina D₃ de alta dosagem para doenças autoimunes com relação ao tratamento atual com imunossuppressores.

Tabela 3. A concentrações de soro de 25(OH)D₃, PTH, cálcio total, cálcio ionizado, ureia e creatinina e estado clínico de 16 pacientes com vitiligo na referência e após o tratamento com vitamina D (35.000 UI por dia por 6 meses)

Parâmetro (faixa normal)	Período de Referência (média ± DP)	6 meses (média ± DP)	Valor-p *
-----------------------------	---------------------------------------	-------------------------	-----------

Cristina Gonzales

Tradutora Pública e Intérprete Comercial
Inglês - Português

Matrícula na JUCESP nº 787
CCM nº 9.743.188-5 (São Paulo, SP)

CPF/MF nº 108.911.608-09
RG nº 14.873.251 SSP/SP

Tradução nº 12045

Livro nº 203

Folha nº 433

25(OH)D3 (30–100 ng/mL)	18,4 ± 8,9	132,5 ± 37,0	0,0005
PTH (8–74 pg/mL)	55,3 ± 25,0	25,4 ± 10,7	0,0005
Cálcio Sérico (8,4–11,0 mg/dL)	9,2 ± 0,3	9,2 ± 0,3	0,7615
Cálcio ionizado (1,10–1,40 mmol/L)	1,2 ± 0,2	1,2 ± 0,1	0,5417
Cálcio Urinário (100–300 mg/24h)	158,3 ± 73,6	230,1 ± 81,4	0,0239
Ureia (< 50 mg/dL)	35,5 ± 7,2	33,9 ± 9,9	0,7148
Creatinina (0,7–1,5 mg/dL)	0,9 ± 0,2	0,9 ± 0,2	0,5016

* Teste de Postos Sinalizados de Wilcoxon

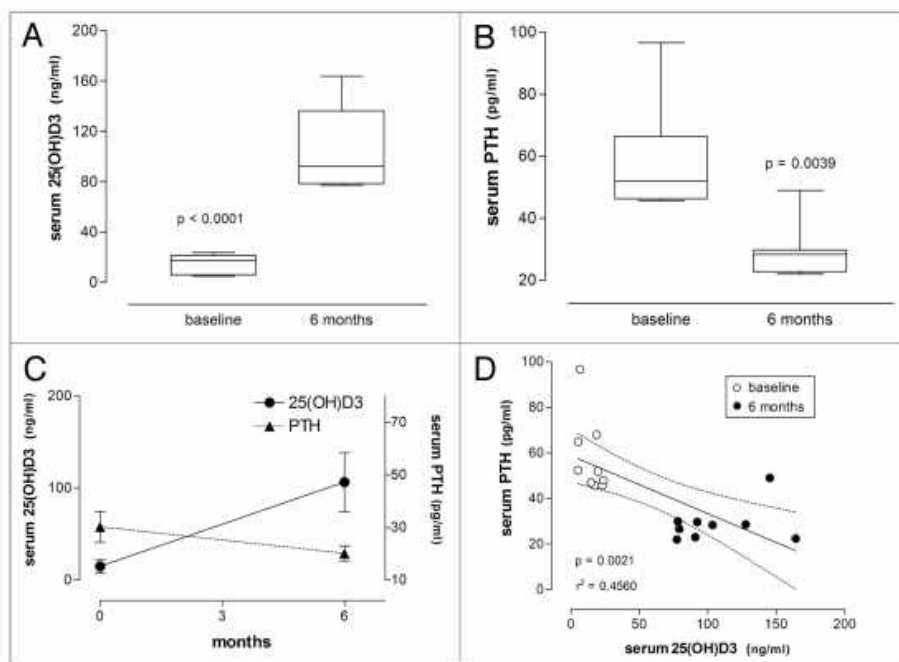
A suplementação de alta dosagem de vitamina D3 para pacientes com doenças autoimunes é concebivelmente vantajosa ao longo do tratamento de 1,25 (OH)2D3 com relação a efeitos calcêmicos mais baixos e controle mais eficiente da autoimunidade. A administração de 1,25(OH)2D3 ou 1,25(OH)2D3 análogos ultrapassa mecanismos regulatórios críticos relacionados aos efeitos calciotrópicos da vitamina D estimulando diretamente o VDR intestinal e a absorção de cálcio. Em contrapartida, a administração de vitamina D3 aumenta as concentrações circulantes de 25(OH)D3, que então enfrenta diferentes mecanismos de controle renal e extra-renal para expressão e atividade da enzima 1 α -hidroxilase.⁴¹ A 1 α -hidroxilase renal sofre uma sub-regulação na resposta (associado com suprarregulação da 24-hidroxilase) com a produção de 1,25 (OH)2D3 e 1,25(OH)2D3 também está sob controle rigoroso de outros hormônios reguladores de cálcio e fosfato (PTH e FGF23).⁵¹ Por outro lado, a disponibilidade de 25(OH)D3 para células imunes (a produção da qual não é fortemente controlada pelo fígado)³⁷ pode ser o determinante primário da quantidade de 1,25(OH)2D3 produzida para os efeitos intrócrinos e parócrinos em locais de inflamação,⁵⁰ onde a expressão local de citocinas pode, em vez disso, facilitar a conversão de 25(OH)D3 induzindo a expressão de 1 α -hidroxilase.^{51,52}

A hipervitaminose D está associada à suprarregulação do VDR intestinal e ao aumento da absorção de cálcio dietético.⁵³ Uma dieta de baixo cálcio protege contra a toxicidade da vitamina D, não apenas pela redução da disponibilidade de cálcio para absorção gastrointestinal, mas também pela facilitação da inativação da vitamina D em locais relacionados ao metabolismo do cálcio.³⁷ Redução do cálcio intestinal por restrição alimentar do leite, laticínios e alimentos enriquecidos com cálcio (como “leite” de aveia, arroz ou soja) contribuíram para minimizar os efeitos calciotrópicos das altas doses diárias de vitamina D3 no presente estudo. O aumento da absorção gastrointestinal de cálcio é parcialmente responsável pela hipercalcemia na intoxicação por vitamina D e uma baixa ingestão de cálcio dietético reduz gradualmente o cálcio sérico nesses pacientes.⁵⁴ Dados preliminares (não mostrados) obtidos de pacientes tratados com doses progressivamente maiores de vitamina D3 até 35.000 UI diariamente mostraram que a adoção de recomendações alimentares tão facilmente compreensíveis reduziu o cálcio urinário dos níveis elevados limítrofes (cerca de 400 mg ou 10 mmol por dia, com cálcio sérico sustentado na faixa normal superior) a valores dentro da faixa normal sem alterar a dose diária de vitamina D. Outra restrição do cálcio dietético (evitando também alimentos preparados com leite, como purê de batatas, pães, bolos e bolachas) reduziu o cálcio urinário para níveis abaixo do limite inferior da faixa normal adotada pelo laboratório local (100 mg ou 2,5 mmol por dia) enquanto o cálcio sérico permaneceu em torno do limite inferior (8,6 mg/dL ou 2,15 mmol/L).

Juntos, esses dados sugerem que a restrição parcial de cálcio dietético previne eficientemente a hipercalcemia e a hipercalcúria, controlando a disponibilidade gastrointestinal de cálcio sob o efeito calciotrópico do paradigma de tratamento empregado em pacientes com psoríase e vitiligo neste estudo. A

potencialização da atividade osteoclástica no osso por níveis farmacologicamente altos de 25(OH)D3 competindo pela vinculação ao VDR é um mecanismo reconhecido de hipercalcemia na intoxicação por vitamina D.^{37,55} As altas doses diárias de vitamina D3 administradas para 6 meses neste estudo, no entanto, não parecem ter significativamente melhorado a atividade osteoclástica em pacientes com psoríase e vitiligo, uma vez que a restrição parcial do cálcio dietético impediu a hipercalcemia e a hipercalcúria de forma eficiente.

Em comparação com este estudo, pesquisas de acompanhamento de longo prazo devem procurar efeitos colaterais potenciais ainda desconhecidos relacionados ao tratamento de alta dosagem de vitamina D3 de uma amostra maior de indivíduos com doenças autoimunes. Estudos futuros também devem visar desenvolver um método para definir a dose diária específica que compense polimorfismos genéticos e outras características distintas, proporcionando o maior efeito terapêutico contra a autoimunidade sem causar efeitos colaterais como hipercalcemia/hipercalcúria devido à atividade osteoclástica aprimorada. A dose individual necessária para alcançar os efeitos biológicos ideais da vitamina D pode estar relacionada não apenas a um único polimorfismo genético, mas também a polimorfismos genéticos múltiplos que afetam as hidroxilases de vitamina D, DBP e/ou VDR,⁴⁸ bem como ao peso corporal, gordura corporal, idade, cor da pele, estação, latitude e hábitos de exposição solar;⁵⁶ efeito terapêutico ideal na autoimunidade, além disso, deve exigir doses farmacológicas, muito superiores às necessárias para medidas preventivas. Todas as intervenções utilizando alta dosagem de vitamina D3 até agora aplicadas para tratar doenças autoimunes, incluindo a atual, utilizaram doses arbitrariamente selecionadas, sem levar em conta a potencial grande variabilidade da resistência aos benefícios e efeitos colaterais da vitamina D entre os pacientes participantes do ensaio clínico. Tal abordagem de pesquisa uniforme impede o desenvolvimento de um protocolo racional para estabelecer a dose diária ideal de vitamina D para cada paciente, o que melhoraria tanto a segurança quanto a eficácia terapêutica no cenário clínico. Em última análise, com todas essas múltiplas variáveis interagindo no mesmo organismo, a concentração sérica de PTH pode ser o melhor indicador biológico para a configuração individual da dose terapêutica ideal de vitamina D3 para o tratamento de doenças autoimunes. Uma medição isolada da concentração de PTH sérico não fornece um parâmetro auxiliar confiável para estimar a dose de vitamina D3 necessária para o controle ideal da autoimunidade. O efeito de aumento do PTH na produção renal de 1,25(OH)2D3 diminui com a idade,⁵⁷ para que pacientes jovens possam sustentar uma absorção gastrointestinal eficiente de cálcio sem elevar o PTH à faixa normal superior ou acima em contraste com adultos mais velhos ou idosos. Por outro lado, a magnitude da diminuição da concentração de PTH sérico, do valor basal ao nível alcançado após um período de tratamento, pode fornecer uma estimativa razoável de quanto a dose diária inicial de vitamina D3 deve ser aumentada para reduzir os níveis de PTH sérico para a faixa de referência mais baixa. Um período de pelo menos 2 meses deve ser permitido entre as duas medidas de PTH sérico, considerando que 25(OH)D3 tem uma meia-vida de 15 dias.⁴⁸ Usando o nível PTH como índice auxiliar de resposta terapêutica requer uma dieta apenas parcialmente restrita em cálcio (como a descrita neste estudo) uma vez que a restrição excessiva da ingestão de cálcio manteria o aumento da reabsorção óssea para preservar a normocalcemia, com isso limitando ou prevenindo a queda de PTH induzida por vitamina D3. Evitar doses excessivamente altas de vitamina D3 capazes de suprimir PTH e medir periodicamente a densidade óssea, por outro lado, pode indicar que os níveis de 25(OH)D3 provavelmente não atingiram concentrações circulantes capazes de aumentar a atividade osteoclástica. De acordo com essa visão, as reduções de PTH observadas com soro normal sustentado e cálcio urinário após 6 meses de tratamento, seja em pacientes com psoríase (de $57,8 \pm 16,7$ pg/mL para $28,9 \pm 8,2$ pg/mL) ou vitiligo (de $55,7$ pg/mL $3 \pm 25,0$ pg/mL a $25,4 \pm 10,7$ pg/mL) não atingiram o limite inferior da faixa de referência (8-74 pg/mL), sugerindo que poderiam obter benefício terapêutico adicional de doses ainda maiores de vitamina D3 do que as utilizadas no presente estudo sem comprometer a segurança do tratamento.



Legenda:

serum 25(OH)D3 (ng/ml)

baseline

6 months

serum PTH (pg/ml)

months

PTH

soro 25(OH)D3 (ng/ml)

Referência

6 meses

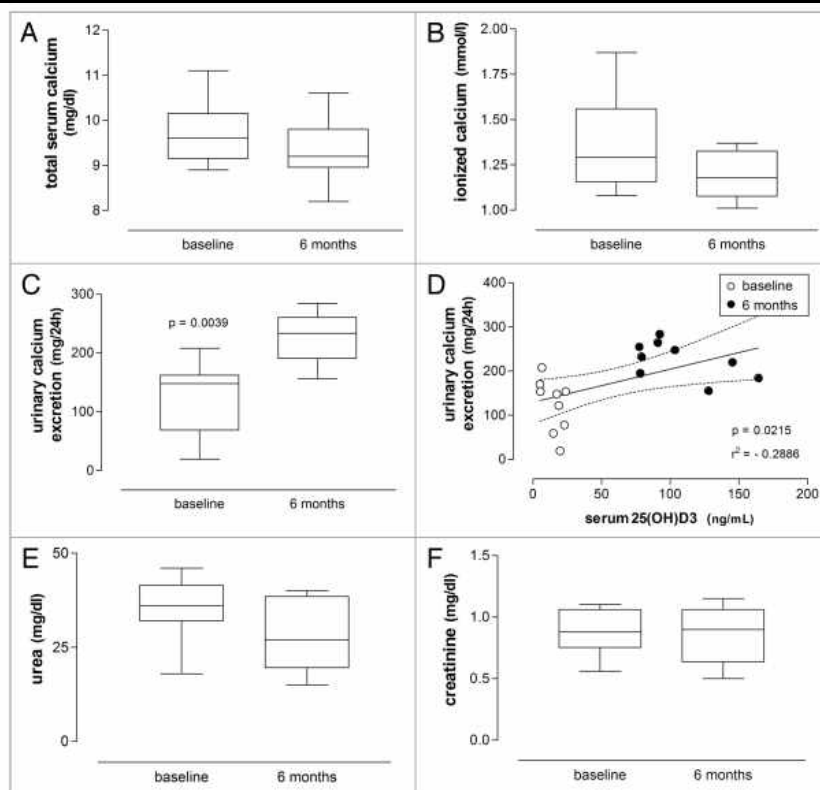
soro PTH (pg/ml)

meses

PTH

Figura 2. Concentrações de soro de 25(OH)D3 e PTH em pacientes com psoríase antes e depois do tratamento com vitamina D (35.000 UI por dia durante 6 meses). **(A)** Gráfico mostrando as concentrações de soro de 25(OH)D3 antes e depois do tratamento. **(B)** O mesmo para as respectivas concentrações de PTH sérico. Nível de significância (Teste de Postos Sinalizados de Wilcoxon) indicado em **(A)** e **(B)**. **(C)** Concentrações de soro de 25(OH)D3 e PTH, respectivamente, aumentaram e diminuíram durante o tratamento. **(D)** A regressão linear do soro PTH nas concentrações de soro 25(OH)D3 é significativa (nível de significância e valor r^2 são mostrados; as linhas tracejadas representam os 95% de CIs para a linha de regressão linear; as referências e valores para 6 meses são respectivamente mostrados como círculos vazios e preenchidos).

Em resumo, o presente estudo sugere que, pelo menos para pacientes com doenças autoimunes como vitiligo e psoríase, uma dose diária de 35.000 UI de vitamina D é uma abordagem terapêutica segura e eficaz para a redução da atividade da doença. O cálcio dietético limitado ao evitar laticínios e alimentos enriquecidos com cálcio — como “leite” de aveia, arroz ou soja e hidratação mínima (2,5 L por dia) garante a segurança. Novas pesquisas devem investigar se a magnitude da redução do PTH pode ser um marcador valioso para a definição individual de doses diárias máximas de vitamina D em doenças autoimunes.



Legenda:

total serum calcium (mg/dl)
urinary calcium excretion (mg/24h)
urea (mg/dl)
ionized calcium (mmol/l)
serum 25(OH)D3 (ng/ml)
creatinine (mg/dl)
baseline
6 months

cálcio sérico total (mg/dl)
excreção de cálcio urinário (mg/24h)
ureia (mg/dl)
cálcio ionizado (mmol/l)
soro 25(OH)D3 (ng/ml)
creatinina (mg/dl)
Referência
6 meses

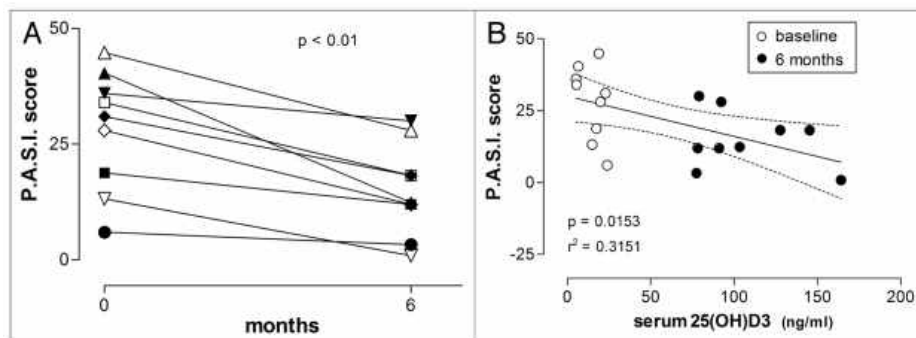
Figura 3. Gráficos (A), (B), (C), (D), (F), respectivamente, que mostram as concentrações de cálcio sérico, a excreção de cálcio urinário de 24 h, ureia sérica e creatinina sérica em pacientes com psoríase antes e depois do tratamento com vitamina D (35.000 UI por dia durante 6 meses), com uma diferença significativa pré- e pós-tratamento encontrada apenas para excreção de cálcio urinário de 24 horas (Teste de Postos Sinalizados de Wilcoxon). (D) A regressão linear da excreção urinária de cálcio de 24 h nas concentrações de soro 25(OH)D3 é significativa (nível de significância e valor r^2 são mostrados; as linhas tracejadas representam os 95% de CIs para a linha de regressão linear; as referências e valores para 6 meses são respectivamente mostrados como círculos vazios e preenchidos).

Materiais e Métodos

Indivíduos: O Comitê de Ética do Hospital Heliópolis (São Paulo) e o Comitê de Ética da Universidade Federal de São Paulo aprovaram este protocolo de estudo (registrado perante CONEP sob o nº 0356/08). Todos os pacientes deram consentimento oral e por escrito antes da inclusão no estudo.

O estudo incluiu nove pacientes com psoríase e 16 pacientes com vitiligo de dois ambulatórios de São Paulo — a Clínica de Dermatologia do Hospital Heliópolis e a Clínica de Medicina Interna da Universidade Federal de São Paulo. Os indivíduos eram homens ou mulheres maiores de 18 anos. O protocolo de estudo excluiu (1) pacientes em tratamento com os diuréticos tiazida ou lítio para evitar interações medicamentosas

e vitamina D no metabolismo do cálcio;⁵⁸ (2) pacientes que tomam medicamentos indutores de psoríase ou vitiligo;^{59,60} (3) pacientes com comprometimento cognitivo; (d) Pacientes com insuficiência renal e (4) pacientes com cálcio/calciúria elevado ou hiperparatireoidismo primário.



Legenda:

P.A.S.I. score

baseline

6 months

months

serum 25(OH)D3 (ng/ml)

escore P.A.S.I.

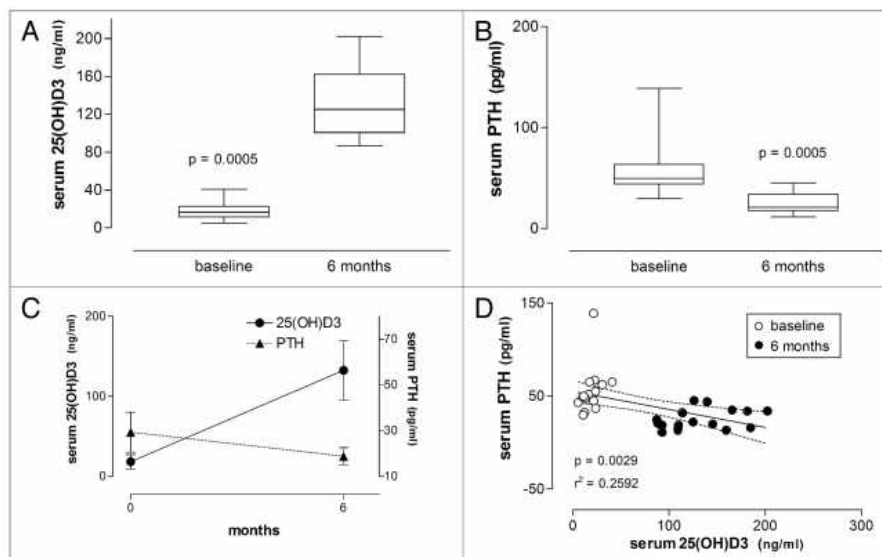
referência

6 meses

meses

soro 25(OH)D3 (ng/ml)

Figura 4. O escore PASI em pacientes com psoríase antes e depois do tratamento com vitamina D (35.000 UI por dia durante 6 meses). (A) Os perfis temporais individuais do escore P.A.S.I. durante o tratamento apresentando melhora clínica em todos os pacientes. (B) A regressão linear do escore P.A.S.I. com relação à concentração de 25(OH)D3 é significativa (nível de significância e valor r^2 são mostrados; as linhas tracejadas representam os 95% de CIs para a linha de regressão linear; as referências e valores para 6 meses são respectivamente mostrados como círculos vazios e preenchidos).



Legenda:

serum 25(OH)D3 (ng/ml)

baseline

6 months

serum PTH (pg/ml)

months

PTH

soro 25(OH)D3 (ng/ml)

referência

6 meses

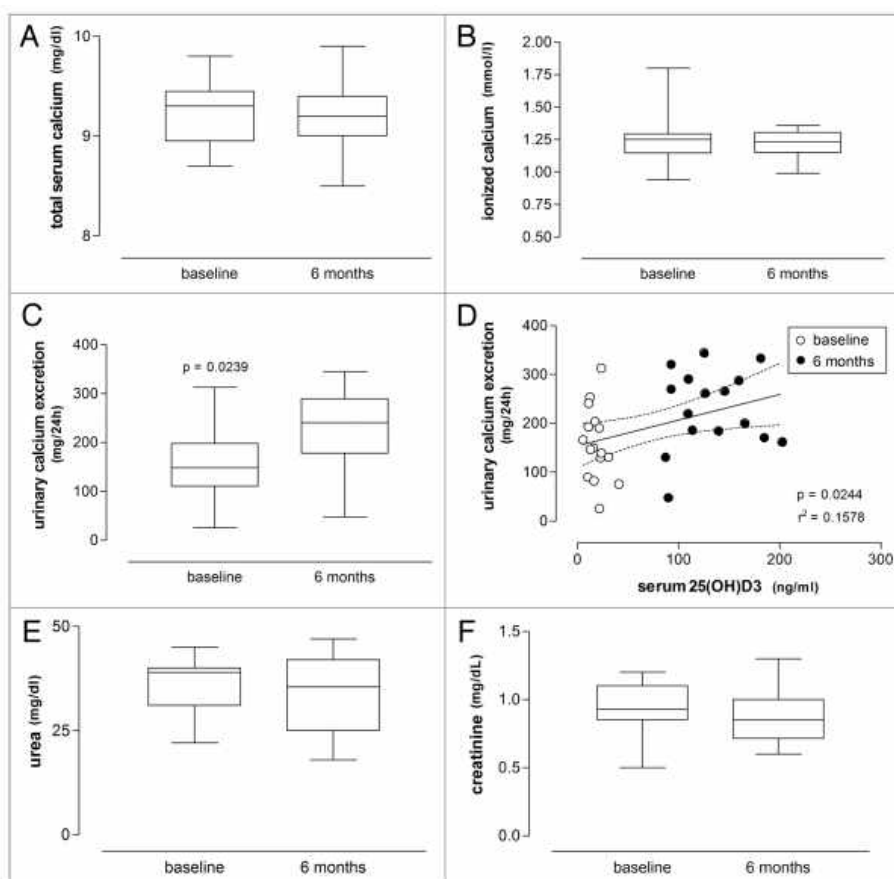
soro PTH (pg/ml)

meses

PTH

Figura 5. As concentrações de soro de 25(OH)D3 e PTH em pacientes com vitiligo antes e depois do tratamento com vitamina D (35.000 UI por dia durante 6 meses). (A) Gráfico mostrando as concentrações de soro de 25(OH)D3 antes e depois do tratamento. (B) O mesmo para as respectivas concentrações de PTH sérico. Nível de significância (Teste de Postos Sinalizados de Wilcoxon) indicado em (A) e (B). (C) As concentrações de soro de 25(OH)D3 e PTH, respectivamente, aumentaram e diminuíram durante o tratamento. (D) A regressão linear de soro PTH nas concentrações de soro de 25(OH)D3 é significativa (nível de significância e valor r^2 são mostrados; as linhas tracejadas representam os 95% de CIs para a linha de regressão linear; as referências e valores para 6 meses são respectivamente mostrados como círculos vazios e preenchidos).

Projeto: Trata-se de um ensaio aberto em que todos os pacientes receberam tratamento oral com 35.000 UI de vitamina D (1,75 ml de uma solução de óleo de girassol de 20.000 UI/mL) por dia. Sempre que presentes, os tratamentos padrão não foram alterados. Seguindo as instruções, todos os pacientes excluíram leite e laticínios (bem como alimentos fortificados com cálcio, como leite de soja, aveia ou arroz) de sua dieta e ingeriram pelo menos 2,5 L de líquido por dia para evitar, respectivamente, absorção excessiva de cálcio intestinal e cálcio urinário concentrado. A suplementação de cálcio não foi permitida. O aparecimento de sintomas sugestivos de hipercalcemia (aumento da sede, prisão de ventre, náusea, vômito) exigiria a realização de exames laboratoriais extras. Consultas regulares de acompanhamento médico garantiram o cumprimento da restrição alimentar e da ingestão de fluidos.



Legenda:

total serum calcium (mg/dl)
urinary calcium excretion (mg/24h)
urea (mg/dl)
ionized calcium (mmol/l)

cálcio sérico total (mg/dl)
excreção de cálcio urinário (mg/24h)
ureia (mg/dl)
cálcio ionizado (mmol/l)

serum 25(OH)D3 (ng/ml)
creatinine (mg/dl)
baseline
6 months

soro 25(OH)D3 (ng/ml)
creatinina (mg/dl)
referência
6 meses

Figura 6. Gráficos (A), (B), (C), (D), (F), respectivamente, mostrando concentrações de cálcio sérico, excreção de cálcio urinário de 24 h, ureia sérica e creatinina sérica em pacientes com vitiligo antes e depois do tratamento com vitamina D (35.000 UI por dia durante 6 meses), com uma diferença significativa de pré- e pós-tratamento encontrada apenas para excreção de cálcio urinário de 24h (Teste de Postos Sinalizados de Wilcoxon). **(D)** A regressão linear da excreção de cálcio urinário de 24 h nas concentrações de soro 25(OH)D3 é significativa (nível de significância e valor r^2 são mostrados; as linhas tracejadas representam os 95% de CIs para a linha de regressão linear; as referências e valores para 6 meses são respectivamente mostrados como círculos vazios e preenchidos).

Após o diagnóstico clínico, todos os pacientes apresentaram pontuação clínica, documentação fotográfica das áreas afetadas da pele, exames laboratoriais realizados anteriormente e exames realizados com três e seis meses de tratamento. Os testes laboratoriais incluíram níveis de vitamina D basal (níveis de 25(OH)D3), cálcio sérico total e ionizado, excreção de cálcio urinário total de 24 h, paratormônio (PTH), ureia sérica e creatinina. Ao coletar todos os dados de março a outubro de 2011 e de março a outubro de 2012, os autores tentaram minimizar as variações sazonais nos níveis de 25(OH)D3 e efeitos relacionados.

Métodos analíticos. Os níveis de 25(OH)D3 foram determinados por HPLC (LC 20AT) com detecção UV a 265 nm (UV/VIS modelo SPD-20A). Padrão 25(OH)D3, solventes e outros reagentes foram de grau analítico (todos comprados da Sigma-Aldrich).

Um padrão interno (PI) de 25(OH)D3 compensou a sensibilidade reduzida do HPLC para detectar níveis muito baixos de 25(OH) D3. A solução padrão de PI foi preparada em metanol a 100 µg/mL e mantida a -20°C em tubo âmbar. As condições HPLC foram LiChrosorb RP-18 5 µm, coluna de 12,5 x 0,44 mm (Merck), 40°C, acetonitrilo-metanol-água (90:4:6, v/v) como fase móvel, 3,2 min. para o tempo de retenção e a taxa de fluxo de 1 ml/min. A curva de calibração foi linear sobre a faixa de concentração de 9,8 ng/mL a 1250,0 ng/mL ($r^2 = 0,9994$).

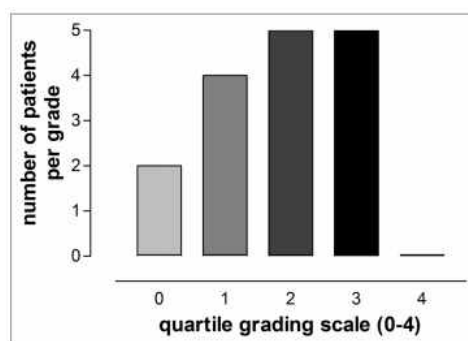
Amostras de soro foram imediatamente armazenadas a -80°C até a análise. As etapas seguintes foram realizadas sob proteção leve. Cada amostra de soro de 100 µL foi descongelada, adicionada a 70 µL de mistura de metanol-2-propanol (80:20) e depois misturada com centrifuga por 30 segundos. Posteriormente, foram adicionados 400 µL de hexano, misturados novamente por 60 segundos e centrifugados abaixo de 2500 g por 10 min a 10°C. Um volume de 100 µL da fase orgânica resultante foi submetido à evaporação em um Concentrador modelo 5301 por 10 minutos à temperatura ambiente. O resíduo seco resultante foi então suspenso novamente em 50 µL de metanol mais 50 µL de PI (solução de trabalho de 200 ng/mL) e centrifugado por 2 minutos antes da injeção no HPLC. O resultado final foi obtido deduzindo a quantidade correspondente ao PI adicionado do valor final liberado do HPLC. O método PI apropriadamente correlacionou com avaliações de concentrações padrão 25(OH)D3 e amostras de soro.

O PTH foi ensaiado por quimioluminescência, enquanto outros testes laboratoriais (cálcio sérico total e ionizado, ureia e creatinina) foram analisados por métodos padrão no Laboratório Central do Hospital Universitário (Universidade Federal de São Paulo).

Parâmetros clínicos de vitiligo e psoríase. O escore PASI utilizado para avaliação da gravidade e extensão da psoríase⁶¹ possibilitou a avaliação da resposta ao tratamento. A documentação fotográfica pré- e pós-tratamento da pele afetada sob a luz de Wood (UVA 351 nm) e uma escala de classificação de quartil⁶² permitiram a avaliação da resposta clínica ao tratamento em pacientes com vitiligo. A porcentagem da superfície da pele afetada que alcançou a repigmentação em 6 meses de tratamento rendeu cinco categorias de resposta clínica. Estes incluíam “0” para nenhuma repigmentação; “1” para 1 a 25% de repigmentação,

“2” para 26 a 50% de repigmentação, “3” para 51 a 75% de repigmentação e “4” para repigmentação acima de 75% da área de referência total da pele afetada.

Estatística. Os resultados são expressos em tabelas como média de $\pm$ desvio padrão. O Teste de Postos Sinalizados de Wilcoxon foi empregado para avaliar o efeito do tratamento com vitamina D (50.000 UI diariamente durante seis meses). A relação entre 25(OH)D3 e variáveis contínuas (PTH e excreção de cálcio urinário) foi avaliada utilizando-se um coeficiente de correlação de Pearson. Curvas que relacionam os níveis de soro 25(OH)D3 e PTH ou os níveis de cálcio urinário foram montadas utilizando modelos de regressão linear. Análises estatísticas e apresentação gráfica foram realizadas utilizando-se o GraphPad Prism (Versão 3.02, San Diego, EUA).



Legenda:

number of patients per grade
quartile grading scale

número de pacientes por categoria
escala de classificação de quartil

Figura 7. A resposta clínica de 16 pacientes com vitiligo após tratamento com vitamina D (35.000 UI por dia durante seis meses). Dois pacientes não apresentaram repigmentação (quartil 0); quatro pacientes apresentaram repigmentação de 1 a 25% (quartil 1), cinco pacientes apresentaram repigmentação de 26 a 50% (quartil 2), cinco pacientes apresentaram repigmentação de 51 a 75% (quartil 3) e nenhum apresentou mais de 75% de repigmentação (quartil 4).

Divulgação de Potenciais Conflitos de Interesse

Os autores declaram que não há conflito de interesses.

Agradecimentos

C.G.C., R.S.G., D.C.F. e A.C.L. projetaram o estudo; D.C.F. e R.S.C. realizaram a pesquisa; M.G. forneceu e preparou o suplemento de vitamina D, R.S.C., L.C.M.N., L.D.T., J.J.S. e F.S. realizaram o método analítico para as medições de 25(OH)D3; N.F.N. e Y.J. realizaram análise estatística; C.G.C., R.S.C., D.C.F., L.C.M.N., D.J.N. e A.C.L. analisaram os dados; C.G.C., R.S.C. e D.C.F. escreveram o artigo. Todos os autores aprovaram o manuscrito. O projeto contou com o apoio de bolsas da CAPES, Instituto de Investigação e Tratamento da Autoimunidade (I.I.T.A.) e UNIMED do ABC, Brasil. DCF foi um bolsista CAPES.



Figura 8. Para a legenda da figura, consulte a página 11.

Figura 8. Fotografias de dois pacientes do sexo masculino com psoríase antes (**A e C**) e depois (**B e D**) com seis meses de tratamento com vitamina D (35.000 UI por dia). (**A e B**) Um paciente de 59 anos com IMC de 24,8 apresentando escore PASI de 31 antes do tratamento e alcançando o escore de 18,2 após seis meses de tratamento; sua concentração de soro de 25(OH)D3 foi de 22,8 ng/mL na referência, atingindo 127,5 ng/mL após 6 meses de tratamento. (**C e D**) pacientes de 60 anos com IMC de 33,6 apresentando escore PASI de 40,4 na referência, alcançando o escore de 12,4 após seis meses; sua concentração de soro de 25(OH)D3 foi de 5,6 ng/mL, atingindo 103,2 ng/mL após seis meses de tratamento.



Figura 9. Para a legenda da figura, consulte a página 13.

Figura 9. Fotografias de duas pacientes do sexo feminino com vitiligo antes (A e C) e depois (B e D) de seis meses de tratamento com vitamina D (35.000 UI por dia). (A e B) Uma paciente de 50 anos com IMC de 28,3 alcançando entre 51 e 75% de repigmentação (quartil 3) após seis meses de tratamento; sua concentração de soro de 25(OH)D3 foi de 12,5 ng/mL na referência, atingindo 92,4 ng/mL após 6 meses de tratamento. (C e D). Uma paciente de 36 anos com IMC de 22,7 alcançando entre 1 e 25% de repigmentação (quartil 1) após seis meses de tratamento; sua concentração de soro de 25(OH)D3 foi de 12,0 ng/mL na referência, atingindo 92,5 ng/mL após 6 meses de tratamento.

Referências

References

1. Ramagopalan SV, Heger A, Berlanga AJ, Mauger NJ, Lincoln MR, Burrell A, et al. A ChIP-seq defined genome-wide map of vitamin D receptor binding: associations with disease and evolution. *Genome Res* 2010; 20:1352-60; PMID:20736230; <http://dx.doi.org/10.1101/gr.107920.110>
2. Holick MF. The vitamin D deficiency pandemic and consequences for nonskeletal health: mechanisms of action. *Mol Aspects Med* 2008; 29:361-8; PMID:18801384; <http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2008.08.008>
3. Eyles DW, Smith S, Kinobe R, Hewison M, McGrath JJ. Distribution of the vitamin D receptor and 1 alpha-hydroxylase in human brain. *J Chem Neuroanat* 2005; 29:21-30; PMID:15589699; <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchemneu.2004.08.006>
4. Adams JS, Hewison M. Extrarenal expression of the 25-hydroxyvitamin D-1-hydroxylase. *Arch Biochem Biophys* 2012; 523:95-102; PMID:22446158; <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2012.02.016>
5. Eyles DW, Burne TH, McGrath JJ. Vitamin D, effects on brain development, adult brain function and the links between low levels of vitamin D and neuropsychiatric disease. *Front Neuroendocrinol* 2013; 34:47-64; PMID:22796576; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ynrne.2012.07.001>
6. Hewison M. An update on vitamin D and human immunity. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2012; 76:315-25; PMID:21995874; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2265.2011.04261.x>
7. Holick MF. Evidence-based D-bare on health benefits of vitamin D revisited. *Dermatoendocrinol* 2012; 4:183-90; PMID:22928075; <http://dx.doi.org/10.4161/derm.20015>
8. IOM (Institute of Medicine). Dietary reference intakes for calcium and vitamin D. Committee to Review Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D. Washington, DC: The National Academies Press. 2011.

9. Heaney RP, Davies KM, Chen TC, Holick MF, Barger-Lux MJ. Human serum 25-hydroxycholecalciferol response to extended oral dosing with cholecalciferol. *Am J Clin Nutr* 2003; 77:204-10; PMID:12499343
10. Lagishetty V, Liu NQ, Hewison M. Vitamin D metabolism and innate immunity. *Mol Cell Endocrinol* 2011; 347:97-105; PMID:21664425; <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2011.04.015>
11. Sterling KA, Eftekhar P, Gander M, Kimmel PL, Raj DS. The immunoregulatory function of vitamin D: implications in chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol* 2012; 8:403-12; PMID:22614789; <http://dx.doi.org/10.1038/nrneph.2012.93>
12. Patel S, Farragher T, Berry J, Bunn D, Salman A, Symmonds D. Association between serum vitamin D metabolite levels and disease activity in patients with early inflammatory polyarthritis. *Arthritis Rheum* 2007; 56:2143-9; PMID:17599737; <http://dx.doi.org/10.1002/art.22722>
13. Smolders J, Menheere P, Kessels A, Damoiseaux J, Hupperts R. Association of vitamin D metabolite levels with relapse rate and disability in multiple sclerosis. *Multi Scler* 2008; 14:1220-4; PMID:18653736; <http://dx.doi.org/10.1177/1352458508094399>
14. Amiral H, Szekács Z, Szécs G, Dankó K, Nagy E, Csépany 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; 69:1155-7; PMID:20439290; <http://dx.doi.org/10.1136/ard.2009.120329>
15. Haque UJ, Bartlett SJ. Relationships among vitamin D, disease activity, pain and disability in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2010; 28:745-7; PMID:20883640
16. Mowry EM, Krupp LB, Milazzo M, Chabas D, Srober JB, Belman AL, et al. Vitamin D status is associated with relapse rate in pediatric-onset multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2010; 67:618-24; PMID:20437559
17. Ullrich A, Ananthakrishnan AN, Naik A, Skaros S, Zadvochnova Y, Binion DG, et al. Vitamin D deficiency in patients with inflammatory bowel disease: association with disease activity and quality of life. *J Parenter Enteral Nutr* 2011; 35:308-16; PMID:21527593; <http://dx.doi.org/10.1177/0148607110381267>
18. Weinrock-Guttman B, Zivadinov R, Qu J, Cookfair D, Duan X, Bang E, et al. Vitamin D metabolites are associated with clinical and MRI outcomes in multiple sclerosis patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2011; 82:189-95; PMID:21047880; <http://dx.doi.org/10.1136/jnnp.2010.227942>
19. Rania TF, Hop WC, de Rijke YB, Buljevac D, Hintzen RC. Lower serum vitamin D levels are associated with a higher relapse risk in multiple sclerosis. *Neurology* 2012; 79:261-6; PMID:22700811; <http://dx.doi.org/10.1212/WNL.0b013e31825fdec7>
20. Correale J, Ysraelit MC, Gaitan MI. Immunomodulatory effects of Vitamin D in multiple sclerosis. *Brain* 2009; 132:1146-60; PMID:19321461; <http://dx.doi.org/10.1093/brain/awp033>
21. Bruce D, Yu S, Choi JH, Cantorna MT. Converging pathways lead to overproduction of IL-17 in the absence of vitamin D signaling. *Int Immunol* 2011; 23:519-28; PMID:21697289; <http://dx.doi.org/10.1093/intimm/dar045>
22. Daniel C, Sartory NA, Zahn N, Radeke HH, Stein JM. Immune modulatory treatment of trinitrobenzene sulfonic acid colitis with calcitriol is associated with a change of a T helper (Th) 1/Th17 to a Th2 and regulatory T cell profile. *J Pharmacol Exp Ther* 2008; 324:23-33; PMID:17911375; <http://dx.doi.org/10.1124/jpet.107.127209>
23. Chang JH, Chu HR, Lee DS, Seo KY, Kwon MN. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits the differentiation and migration of T(H)17 cells to protect against experimental autoimmune encephalomyelitis. *PLoS One* 2010a; 5:e12925; PMID:20886077; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0012925>
24. Chang SH, Chung Y, Dong C. Vitamin D suppresses Th17 cytokine production by inducing C/EBP homologous protein (CHOP) expression. *J Biol Chem* 2010b; 285:38751-5; PMID:20974859; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.C110.185777>
25. Hegri Z, Zwicker S, Burek D, Peric M, Koglin S, Barycka-Baran A, et al. Vitamin D analog calcipotriol suppresses the Th17 cytokine-induced proinflammatory S100 "alarmin" psoriasin (S100A7) and keratinin (S100A15) in psoriasis. *J Invest Dermatol* 2012; 132:1416-24; PMID:22402441; <http://dx.doi.org/10.1038/jid.2011.486>
26. Waite JC, Skokos D. Th17 response and inflammatory autoimmune diseases. *Int J Inflam* 2012; 2012:819467; PMID:22229105; <http://dx.doi.org/10.1155/2012/819467>
27. Chambers ES, Hawrylowicz CM. The impact of vitamin D on regulatory T cells. *Curr Allergy Asthma Rep* 2011; 11:29-36; PMID:21104171; <http://dx.doi.org/10.1007/s11882-010-0161-8>
28. Pani MA, Regulla K, Segni M, Krause M, Hofmann S, Hufner M, et al. Vitamin D 1alpha-hydroxylase (CYP11alpha) polymorphism in Graves' disease, Hashimoto's thyroiditis and type 1 diabetes mellitus. *Eur J Endocrinol* 2002; 146:777-81; PMID:12039697; <http://dx.doi.org/10.1530/eje.0.1460777>
29. Sundqvist E, Bärnhielm M, Alfredsson L, Hillert J, Olsson T, Kockum I. Confirmation of association between multiple sclerosis and CYP27B1. *Eur J Hum Genet* 2010; 18:1349-52; PMID:20648053; <http://dx.doi.org/10.1038/ejhg.2010.113>
30. Vieth R, Fraser D. Kinetic behavior of 25-hydroxyvitamin D-1-hydroxylase and 24-hydroxylase in rat kidney mitochondria. *J Biol Chem* 1979; 254:12455-60; PMID:500724
31. Vieth R, McCarten K, Norwich KH. Role of 25-hydroxyvitamin D3 dose in determining rat 1,25-dihydroxyvitamin D3 production. *Am J Physiol* 1990; 258:E780-9; PMID:2185661
32. Rodriguez-Antona C, Donato MT, Pareja E, Gómez-Lechón MJ, Castell JV. Cytochrome P-450 mRNA expression in human liver and its relationship with enzyme activity. *Arch Biochem Biophys* 2001; 393:308-15; PMID:11556818; <http://dx.doi.org/10.1006/abbi.2001.2499>
33. Nebert DW, Russell DW. Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet* 2002; 360:1155-62; PMID:12387968; [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)11203-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(02)11203-7)
34. Ingelman-Sundberg M, Sim SC, Gomez A, Rodriguez-Antona C. Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoeconomic and clinical aspects. *Pharmacol Ther* 2007; 116:496-526; PMID:18001838; <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2007.09.004>
35. Zhou SF, Liu JP, Chowbay B. Polymorphism of human cytochrome P450 enzymes and its clinical impact. *Drug Metab Rev* 2009; 41:89-295; PMID:19514967; <http://dx.doi.org/10.1080/03602530902843483>
36. Vieth R. Toxicity of Vitamin D. In: Holick MF, ed. *Vitamin D*. New York, NY: Humana Press, 2010:603-612.
37. Casano NE, Thys-Jacobs S, Bilezikian JP. Hypercalcemia due to vitamin D toxicity. In: Feldman D, Pike JW, Adams JS, ed. *Vitamin D*. San Diego, CA: Academic Press, 2011:1381-1402.
38. Silverberg JL, Silverberg AL, Malka E, Silverberg NB. A pilot study assessing the role of 25 hydroxy vitamin D levels in patients with vitiligo vulgaris. *J Am Acad Dermatol* 2010; 62:937-41; PMID:20466170; <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaad.2009.11.024>
39. Benrathid M, Moyers K, Mohty M, Savani BN. Vitamin D deficiency, autoimmunity, and graft-versus-host-disease risk: Implication for preventive therapy. *Exp Hematol* 2012; 40:263-7; PMID:22265707; <http://dx.doi.org/10.1016/j.exphem.2012.01.006>
40. Giondri P, Rossini M, Di Cesare A, Idolazzi L, Farina S, Beltrami G, et al. Vitamin D status in patients with chronic plaque psoriasis. *Br J Dermatol* 2012; 166:505-10; PMID:22013980; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2133.2011.10669.x>
41. Ortega-Molina J, Buesada-Eisman A, Arrabal-Polo MA, Ruiz JC, Arias-Santiago S. Deficiency of serum concentration of 25-hydroxyvitamin D in psoriatic patients: a case-control study. *J Am Acad Dermatol* 2012; 67:931-8; PMID:22387034; <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaad.2012.01.040>
42. Byers SW, Rowlands T, Beildeck M, Bong YS. Mechanism of action of vitamin D and the vitamin D receptor in colorectal cancer prevention and treatment. *Rev Endocr Metab Disord* 2012; 13:31-8; PMID:21861107; <http://dx.doi.org/10.1007/s11154-011-9196-y>
43. Mancogiuri G, Sorice GP, Ajjan R, Mezza T, Pilz S, Prioretti A, et al. Can vitamin D deficiency cause diabetes and cardiovascular diseases? Present evidence and future perspectives. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2012; 22:81-7; PMID:22265795; <http://dx.doi.org/10.1016/j.numecd.2011.11.001>
44. Rothman KJ, Michels KB. The continuing unethical use of placebo controls. *N Engl J Med* 1994; 331:394-8; PMID:8028622; <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM199408113310611>
45. Kavanaugh A. Ethical and practical issues in conducting clinical trials in psoriasis and psoriatic arthritis. *Ann Rheum Dis* 2005; 64(Suppl 2):ii46-8; PMID:15708936; <http://dx.doi.org/10.1136/ard.2004.030817>
46. Resnik DB. Ethical dilemmas in communicating medical information to the public. *Health Policy* 2001; 55:129-49; PMID:11163652; [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-8510\(00\)00121-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-8510(00)00121-4)
47. Simon R. Are placebo-controlled clinical trials ethical or needed when alternative treatment exists? *Ann Intern Med* 2000; 133:474-5; PMID:10975967; <http://dx.doi.org/10.7326/0003-4819-133-6-200009190-00017>
48. Zhang F, Mouyzeri A, Spector TD. Genetic influences on circulating vitamin D level: a review. *Curr Cardiovasc Risk Rep* 2012; 6:549-55; <http://dx.doi.org/10.1007/s12170-012-0278-5>
49. Jones G. Pharmacokinetics of vitamin D toxicity. *Am J Clin Nutr* 2008; 88:582S-6S; PMID:18689406
50. Hewison M. Vitamin D and immune function: an overview. *Proc Nutr Soc* 2012; 71:50-61; PMID:21849106; <http://dx.doi.org/10.1017/S0029665111001650>

51. Henry HL. Regulation of vitamin D metabolism. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2011; 25:531-41; PMID:21872796; <http://dx.doi.org/10.1016/j.beem.2011.05.003>
52. Bikle DD. Vitamin D and immune function: understanding common pathways. *Curr Osteoporos Rep* 2009; 7:58-63; PMID:19631030; <http://dx.doi.org/10.1007/s11914-009-0011-6>
53. Beckman MJ, Horst RL, Reinhardt TA, Beitz DC. Up-regulation of the intestinal 1,25-dihydroxyvitamin D receptor during hypervitaminosis D: a comparison between vitamin D2 and vitamin D3. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 169:910-5; PMID:2163637; [http://dx.doi.org/10.1016/0006-291X\(90\)91979-3](http://dx.doi.org/10.1016/0006-291X(90)91979-3)
54. Buckle RM, Gamlen TR, Pullen IM. Vitamin D intoxication treated with porcine calcitonin. *Br Med J* 1972; 3:205-7; PMID:4261142; <http://dx.doi.org/10.1136/bmj.3.5820.205>
55. Selby PL, Davies M, Marks JS, Mawer EB. Vitamin D intoxication causes hypercalcaemia by increased bone resorption which responds to pamidronate. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1995; 43:531-6; PMID:8548936; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2265.1995.tb02916.x>
56. Cannell JJ, Hollis BW. Use of vitamin D in clinical practice. *Altern Med Rev* 2008; 13:6-20; PMID:18377099
57. Tsai KS, Wahner HW, Offord KP, Melton LJ 3rd, Kumar R, Riggs BL. Effect of aging on vitamin D stores and bone density in women. *Calcif Tissue Int* 1987; 40:241-3; PMID:3107776; <http://dx.doi.org/10.1007/BF02555255>
58. Hariri A, Mount DB, Rastegar A. Disorders of calcium, phosphate, and magnesium metabolism. In: Mount DB, Sayegh MH, Singh AK, ed. *Core Concepts in the Disorders of Fluid, Electrolytes and Acid-Base Balance*. New York, NY: Springer US, 2013:103-146.
59. Duhra P, Foulds IS. Persistent vitiligo induced by diphenacyprone. *Br J Dermatol* 1990; 123:415-6; PMID:2206982; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2133.1990.tb06306.x>
60. Basavataj KH, Ashok NM, Rashmi R, Praveen TK. The role of drugs in the induction and/or exacerbation of psoriasis. *Int J Dermatol* 2010; 49:1351-61; PMID:21091671; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-4632.2010.04570.x>
61. Fredriksson T, Pettersson U. Severe psoriasis - oral therapy with a new retinoid. *Dermatologica* 1978; 157:238-44; PMID:57213; <http://dx.doi.org/10.1159/000250839>
62. Shin J, Lee JS, Hann SK, Oh SH. Combination treatment by 10 600 nm ablative fractional carbon dioxide laser and narrowband ultraviolet B in refractory non-segmental vitiligo: a prospective, randomized half-body comparative study. *Br J Dermatol* 2012; 166:658-61; PMID:22050270; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2133.2011.10723.x>

[Margem direita:] ©2013 Landes Bioscience. Distribuição proibida

<http://www.landesbioscience.com/>

Dermato-Endocrinologia

NADA MAIS. Li, conferi, achei conforme e dou fé.

São Paulo, 5 de julho de 2021

CRISTINA GONZALES

Rec. Nº.: 6146

Talão Nº.: 54

Emol.: R\$ 2.776,30

Nº de caracteres: 34086 (sem espaço)

A pilot study assessing the effect of prolonged administration of high daily doses of vitamin D on the clinical course of vitiligo and psoriasis

Danilo C. Finamor,¹ Rita Sinigaglia-Coimbra,¹ Luiz C.M. Neves,² Marcia Gutierrez,³ Jeferson J. Silva,¹ Lucas D. Torres,¹ Fernanda Surano,¹ Domingos J. Neto,⁵ Neil F. Novo,⁶ Yara Juliano,⁶ Antonio C. Lopes⁴ and Cicero Galli Coimbra^{1,*}

¹Laboratório de Fisiopatologia Clínica e Experimental; Universidade Federal de São Paulo; São Paulo, Brazil; ²Instituto de Ciências da Saúde; Universidade Paulista; São Paulo, Brazil; ³Farmácia Sensitiva; São Paulo, Brazil; ⁴Disciplina de Clínica Médica; Universidade Federal de São Paulo; São Paulo, Brazil; ⁵Hospital Heliópolis; São Paulo, Brazil; ⁶Disciplina de Cirurgia Plástica; Universidade Federal de São Paulo; São Paulo, Brazil

Keywords: vitiligo, psoriasis, vitamin D, 25(OH)D3, high dose, calcium, treatment, toxicity, autoimmunity

Abbreviations: BMI, body mass index; CIs, confidence intervals; CYP, cytochrome P450 superfamily; CYP27B1, 25-hydroxyvitamin D-1 alpha-hydroxylase; DBP, vitamin D-binding protein; VDR, vitamin D receptor; FGF23, fibroblast growth factor 23; HPLC, high performance liquid chromatography; IOM, Institute of Medicine; IS, internal standard; K_m , Michaelis–Menten constant; PASI, psoriasis area and severity index; PTH, parathormone; RDA, recommended dietary allowance; Treg, regulatory T cells; VDR, vitamin D receptor; V_{max} , maximal velocity of enzymatic reaction; UV, ultraviolet; UVA, ultraviolet A

Autoimmunity has been associated with vitamin D deficiency and resistance, with gene polymorphisms related to vitamin D metabolism frequently described in affected patients. High doses of vitamin D3 may conceivably compensate for inherited resistance to its biological effects. This study aimed to assess the efficacy and safety of prolonged high-dose vitamin D3 treatment of patients with psoriasis and vitiligo. Nine patients with psoriasis and 16 patients with vitiligo received vitamin D3 35,000 IU once daily for six months in association with a low-calcium diet (avoiding dairy products and calcium-enriched foods like oat, rice or soya “milk”) and hydration (minimum 2.5 L daily). All psoriasis patients were scored according to “Psoriasis Area and Severity Index” (PASI) at baseline and after treatment. Evaluation of clinical response of vitiligo patients required a quartile grading scale. All patients presented low vitamin D status (serum 25(OH)D3 ≤ 30 ng/mL) at baseline. After treatment 25(OH)D3 levels significantly increased (from 14.9 ± 7.4 to 106.3 ± 31.9 ng/mL and from 18.4 ± 8.9 to 132.5 ± 37.0 ng/mL) and PTH levels significantly decreased (from 57.8 ± 16.7 to 28.9 ± 8.2 pg/mL and from 55.3 ± 25.0 to 25.4 ± 10.7 pg/mL) in patients with psoriasis and vitiligo respectively. PTH and 25(OH)D3 serum concentrations correlated inversely. The PASI score significantly improved in all nine patients with psoriasis. Fourteen of 16 patients with vitiligo had 25–75% repigmentation. Serum urea, creatinine and calcium (total and ionized) did not change and urinary calcium excretion increased within the normal range. High-dose vitamin D3 therapy may be effective and safe for vitiligo and psoriasis patients.

Introduction

The steroid hormone known as the active form of vitamin D (“calcitriol,” “1,25-dihydroxy vitamin D” or “1,25(OH)2D3”) generates a wide range of biological responses. The human genome possesses 2,776 positions occupied by the VDR; about 10% of the human genes are, therefore, directly and/or indirectly responsive to vitamin D.¹ Similarly, diverse human cells (including bone, colon, breast, prostate, skin, muscle, blood vessel, brain and immune cells) express the enzyme 25-hydroxyvitamin D-1 α -hydroxylase (CYP27B1), indicating that the extra-renal intracrine and paracrine 1,25(OH)2D3 synthesis may critically affect the activities of many tissues and organs.^{2–4} Accordingly, cumulative data have associated low vitamin D status (as assessed by

measuring “25-hydroxyvitamin D3” or “25(OH)D3”—the main circulating form of vitamin D) not only to rickets and osteoporosis, but also to an increasing number of prevalent health disorders including autoimmune, infectious and cardiovascular diseases, hypertension, diabetes and deadly cancers.^{2,5–7}

Contrasting with the pathophysiological importance of 1,25(OH)2D3, vitamin D deficiency is a poorly recognized worldwide epidemic among both children and adults.² Regular and moderate sun exposure (the only significant natural source of vitamin D for most subjects) is currently uncommon due to indoor lifestyle, sun avoidance and indiscriminate sunscreen use.⁷ Even though there is mounting evidence indicating that physiologic doses should be closer to those achieved through a few minutes of daily skin exposure to sunlight,² the RDA upgraded (from

*Correspondence to: Cicero G. Coimbra; Email: coimbracg.nexp@epm.br
Submitted: 01/29/13; Revised: 04/10/13; Accepted: 04/25/13
<http://dx.doi.org/10.4161/derm.24808>

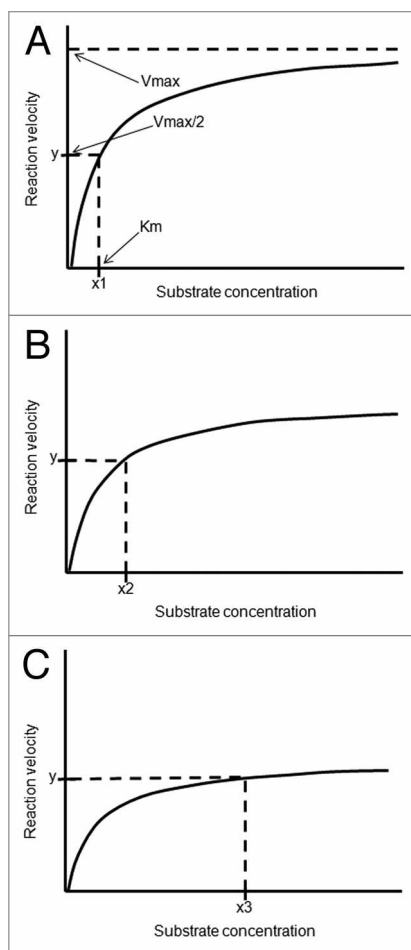


Figure 1. Enzyme kinetics of three hypothetical polymorphic variants of 25-hydroxyvitamin D-1 α -hydroxylase (CYP27B1), "A," "B" and "C." Some variants predictably exhibit decreased affinity for the substrate (increased K_m) and/or decreased V_{max} , requiring requiring a supra-physiologic substrate concentration to achieve a physiologic rate of substrate transformation. The polymorphic variants "B" and "C" require higher plasma concentrations of 25-hydroxyvitamin D ("x2" and "x3" respectively) to achieve the rate "y" of 1,25-dihydroxy vitamin D synthesis than the K_m ("x1") of the enzyme variant "A." Compared with "A" or "B," the polymorphic variant "C" requires a much higher plasma concentration of 25-hydroxyvitamin D to compensate for a reduced intracellular activity and achieve physiologic concentrations of 1,25-dihydroxy vitamin D within the immune cells.

200 to 600 IU per day) by the Institute of Medicine in 2010⁸ remains much lower than that,⁷ and are lower than the daily doses required to correct vitamin D deficiency in most subjects.⁹

Higher daily doses may be particularly critical for controlling the activity of autoimmune disorders. Cumulative data over the past 30 y have established the regulatory effects of vitamin D on both innate and adaptive immune responses,^{10,11} and circulating levels of 25(OH)D3 inversely relate to the activity of autoimmune disease.¹²⁻¹⁹ Intracrine and paracrine actions of 1,25(OH)2D3 synthesized within immune cells may control inappropriate activation of interleukin-17-producing cells²⁰⁻²⁵—the Th17 aberrant response, which may play a major pathogenic role in multiple inflammatory and autoimmune disorders.²⁶ Cumulative evidence

also indicates that vitamin D promotes—by both direct and indirect mechanisms—regulatory T cells (Treg) that inhibit a variety of inappropriate (both innate and adaptive) immune responses underlying autoimmune disease.^{21,27}

Estimations of daily requirements of vitamin D3 for patients with autoimmune disorders should take account of the functional consequences of genetic polymorphisms related to vitamin D metabolism. For instance, the polymorphic changes of the enzyme CYP27B1 associated with autoimmunity^{28,29} predictably originates a relative resistance to vitamin D, i.e., a higher level of circulating 25(OH)D3 required to achieve normal 1,25(OH)2D3 concentrations within the immune cells. While the *in vivo* K_m of the normal enzyme exceeds the physiologic range of 25(OH)D3 concentrations,^{30,31} a polymorphic variant may have a higher K_m (decreased affinity for substrate) and/or a lower V_{max} , requiring higher concentrations of substrate to achieve a physiologic rate of product formation (Fig. 1). Frequent genetic polymorphisms and wide (ten to a hundred fold) variability in enzyme expression of the cytochrome P450 superfamily of enzymes (CYPs) are common and may considerably modify enzyme activity, causing large interindividual variability in the rate of product formation.³²⁻³⁵ Therefore, a subject bearing a CYP27B1 polymorphism may be prone to develop autoimmunity for sustaining concentrations of 1,25(OH)2D3 within the immune cells that are insufficient for full intracrine and paracrine tolerogenic effects of this powerful steroid molecule. High doses of vitamin D3 leading to supraphysiologic range of circulating 25(OH)D3 may compensate for this genetic-related status of relative vitamin D deficiency, thereby establishing tolerance to auto-antigens.

Doses ranging up to 40,000 IU/day of vitamin D3 are probably safe for healthy individuals,^{36,37} and enzyme polymorphisms affecting vitamin D metabolism may conceivably increase tolerability in patients with autoimmune disorders. This study aimed to assess the therapeutic efficacy and safety of a daily dose of 35,000 IU of vitamin D3 administered with a low-calcium diet for 6 mo to patients with psoriasis and vitiligo.

Results

Subjects. The physical characteristics of the 25 patients who participated in this study are shown in Table 1.

Laboratory parameters. As shown in Table 2 and 3 and Figures 2 and 5, all patients presented low baseline levels of 25(OH)D3 (≤ 30 ng/mL or ≤ 75 nmol/L), with a mean of 14.9 ± 7.4 ng/mL in the psoriasis group and a mean of 18.4 ± 8.9 ng/mL in vitiligo patients. After 6 mo of treatment with vitamin D3 (35,000 IU per day), 25(OH)D3 levels increased significantly, to 106.3 ± 31.9 ng/mL in the psoriasis group ($p < 0.0001$, Wilcoxon signed rank test) and to 132.5 ± 37.0 ng/mL in vitiligo patients ($p < 0.0005$, Wilcoxon signed rank test).

Baseline concentrations of PTH were 57.8 ± 16.7 pg/mL in the psoriasis group and 55.3 ± 25.0 pg/mL in vitiligo patients. After 6 mo of treatment with vitamin D3 PTH levels decreased significantly to 28.9 ± 8.2 pg/mL in the psoriasis group ($p = 0.0039$, Wilcoxon signed rank test) and to 25.4 ± 10.7 pg/mL in

vitiligo patients ($p = 0.0005$, Wilcoxon signed rank test) (Tables 2 and 3, Figs. 2 and 5).

Statistical analysis revealed a negative correlation between 25(OH)D3 and PTH levels ($r = -0.6753$, $p = 0.0153$ in the psoriasis group; $r = -0.5091$, $p = 0.0015$ in vitiligo patients, Pearson's correlation). Linear regression also revealed negative correlation between these two parameters using data collected at baseline and 6-mo outcome (Fig. 2 and 5, r^2 and p values indicated).

The concentrations of (total and ionized) serum calcium, urea and creatinine did not differ significantly from baseline values after 6 mo of high-dose vitamin D3 treatment (Tables 2 and 3; Fig. 3 and 6; Wilcoxon signed rank test).

Urinary calcium excretion significantly increased at 6 mo of vitamin D3 treatment in both groups from 123.6 ± 60.0 mg/24 h to 226.8 ± 41.6 mg/24 h in psoriasis group ($p = 0.0039$, Wilcoxon signed rank test) and from 158.3 ± 73.6 mg/24 h to 230.1 ± 81.4 mg/24 h in vitiligo group ($p = 0.0239$, Wilcoxon signed rank test), but remained within the normal range (Tables 2 and 3; Fig. 3 and 6). Statistical analysis revealed a positive correlation between urinary calcium excretion and 25(OH)D3 levels in both groups of patients ($r = 0.5372$, $p = 0.0108$ in the psoriasis group; $r = 0.3972$, $p = 0.0122$ in vitiligo patients, Pearson's correlation). Linear regression also revealed a negative correlation between these parameters (Fig. 3 and 6, r^2 and p values indicated).

Clinical outcome. The clinical condition of all patients with psoriasis ($n = 9$) significantly improved during the treatment (Fig. 4 and 8; $p = 0.0023$, Wilcoxon signed rank test). Statistical analysis revealed a negative correlation between the PASI score and 25(OH)D3 levels ($r = -0.5614$, $p = 0.0011$, Pearson's correlation). Linear regression also demonstrated correlation between these parameters (Fig. 4, r^2 and p values indicated).

Two out of 16 vitiligo patients showed no repigmentation of the affected areas; four patients showed 1–25% repigmentation, five patients showed 26–50% repigmentation, five patients showed 51–75% repigmentation and none showed more than 75% repigmentation of the affected areas (Fig. 7 and 9).

Discussion

This is an open-label study where all patients with psoriasis or vitiligo received oral treatment with 35,000 IU of vitamin D per day for six months associated with preventive measures (partial dietary calcium restriction and a daily hydration of at least 2.5 L). The treatment provided benefit to 9 out of 9 patients with psoriasis and to 14 out of 16 patients vitiligo.

A placebo-controlled approach was avoided for ethical reasons. Cumulative data have implicated vitamin D deficiency in the pathophysiology of vitiligo^{38,39} and psoriasis.³⁹⁻⁴¹ Vitamin D deficiency (deficient levels of a potent steroid hormone that modulates hundreds of human genes) also increases the risk of developing or aggravating a myriad of serious health disorders,^{1,5-7} including cancer⁴² or death from cardiovascular events.⁴³ Administering placebo to vitamin D-deficient patients for the sake of randomization may not be ethically acceptable.^{44,45} Potential research participants would not take the chances of being assigned to the control group if informed of the association

Table 1. Characteristics of study subjects

z	Vitiligo	Psoriasis
Age (y $\pm$ SD)	49.2 $\pm$ 11.9	45.3 $\pm$ 12.2
Sex (N)	3	4
M	13	5
F		
BMI $\pm$ SD (Kg/m²)	26.6 $\pm$ 4.4	27.0 $\pm$ 4.0
Fritzpatrik skin phototype	(N)	(N)
I	0	1
II	0	2
III	11	3
IV	4	3
V	1	0
VI	0	0

BMI, body mass index; y, years; N, number of subjects; SD, standard deviation.

Table 2. Serum concentrations of 25(OH)D3, PTH, total calcium, ionized calcium, urea and creatinine and clinical status of nine patients with psoriasis at baseline and after treatment with vitamin D (35,000 IU per day for 6 mo)

Parameter (normal range)	Baseline (mean $\pm$ SD)	6 mo (mean $\pm$ SD)	p value *
25(OH)D3 (30–100 ng/mL)	14.9 $\pm$ 7.4	106.3 $\pm$ 31.9	< 0.0001
PTH (8–74 pg/mL)	57.8 $\pm$ 16.7	28.9 $\pm$ 8.2	0.0039
Serum Calcium (8.4–11 mg/dL)	9.7 $\pm$ 0.7	9.4 $\pm$ 0.7	0.1641
Ionized Calcium (1.10–1.40 mmol/L)	1.4 $\pm$ 0.3	1.2 $\pm$ 0.2	0.1641
Urinary Calcium (100–300 mg/24h)	123.6 $\pm$ 60.0	226.8 $\pm$ 41.6	0.0039
Urea (< 50 mg/dL)	35.8 $\pm$ 8.3	28.9 $\pm$ 9.8	0.1289
Creatinine (0.7–1.5 mg/dL)	0.9 $\pm$ 0.2	0.8 $\pm$ 0.2	0.6406

* Wilcoxon signed rank test.

of vitamin D levels and disease activity. On the other hand, intentionally omitting essential information to facilitate consent to placebo treatment may imply disregard for patient autonomy⁴⁶ and violation of the principle of beneficence on the part of the physician.⁴⁷ Conversely, restoring the physiologic intracellular levels of a potent steroid hormone (by increasing the availability of substrate to its polymorphic activating enzyme) should be regarded as good medical practice.

Laboratory or clinical signs of toxicity (hypercalcemia, hypercalciuria or kidney dysfunction) were not observed in any of the 25 participants, including a patient with vitiligo who reached a serum concentration of 25(OH)D3 of

Table 3. Serum concentrations of 25(OH)D3, PTH, total calcium, ionized calcium, urea and creatinine and clinical status of 16 patients with vitiligo at baseline and after treatment with vitamin D (35,000 IU per day for 6 mo)

Parameter (normal range)	Baseline (mean $\pm$ SD)	6 mo (mean $\pm$ SD)	p value *
25(OH)D3 (30–100 ng/mL)	18.4 $\pm$ 8.9	132.5 $\pm$ 37.0	0.0005
PTH (8–74 pg/mL)	55.3 $\pm$ 25.0	25.4 $\pm$ 10.7	0.0005
Serum Calcium (8.4–11.0 mg/dL)	9.2 $\pm$ 0.3	9.2 $\pm$ 0.3	0.7615
Ionized Calcium (1.10–1.40 mmol/L)	1.2 $\pm$ 0.2	1.2 $\pm$ 0.1	0.5417
Urinary Calcium (100–300 mg/24h)	158.3 $\pm$ 73.6	230.1 $\pm$ 81.4	0.0239
Urea ($<$ 50 mg/dL)	35.5 $\pm$ 7.2	33.9 $\pm$ 9.9	0.7148
Creatinine (0.7 – 1.5 mg/dL)	0.9 $\pm$ 0.2	0.9 $\pm$ 0.2	0.5016

* Wilcoxon signed rank test.

202.2 ng/mL (504.49 mmol/L). Considering that 25(OH)D3 has a half-life of 15 d⁴⁸ those high concentrations of 25(OH)D3 were achieved at two months and sustained for the last four months of treatment without side effects. To the best of our knowledge, this is the highest dose of vitamin D3 administered therapeutically to patients with autoimmune disorders on a regular daily basis for several months. These findings are consistent with the viewpoint that serum 25(OH)D concentrations lower than 750 nmol/L (300 ng/mL) are unlikely to cause toxicity.⁴⁹ Enhancing both innate and adaptive immunity⁵⁰ is a significant advantage of high-dose vitamin D3 therapy for autoimmune disorders over the current treatment with immunosuppressive drugs.

High-dose vitamin D3 supplementation to patients with autoimmune disorders is conceivably advantageous over 1,25(OH)2D3 treatment concerning lower calcemic effects and more efficient control of autoimmunity. Administration of 1,25(OH)2D3 or 1,25(OH)2D3 analogs overpasses critical regulatory mechanisms related to the calcitropic effects of vitamin D by directly stimulating intestinal VDR and calcium absorption. In contrast, administration of vitamin D3 increases circulating concentrations of 25(OH)D3, which then faces different renal and extra-renal control mechanisms for expression and activity of the enzyme 1 α -hydroxylase.⁴¹ Renal 1 α -hydroxylase undergoes feedback downregulation (associated with 24-hydroxylase upregulation) by 1,25(OH)2D3 and 1,25(OH)2D3 production is also under strict control of other calcium- and phosphate-regulating hormones (PTH and FGF23).⁵¹ Conversely, the availability of 25(OH)D3 to immune cells (the production of which is not tightly controlled by the liver)³⁷ may be the primary determinant of the amount of 1,25(OH)2D3 produced for intracrine and paracrine effects at sites of inflammation,⁵⁰ where the local

expression of cytokines may instead facilitate the conversion of 25(OH)D3 by inducing the expression of 1 α -hydroxylase.^{51,52}

Hypervitaminosis D is associated with upregulation of intestinal VDR and increased absorption of dietary calcium.⁵³ A low calcium diet protects against vitamin D toxicity, not only by reducing the availability of calcium for gastrointestinal absorption, but also by facilitating vitamin D inactivation at sites related to calcium metabolism.³⁷ Reduced intestinal calcium by dietary restriction of milk, dairy products and calcium-enriched foods (like oat, rice or soya “milk”) has contributed to minimize the calcitropic effects of high daily doses of vitamin D3 in the current study. Increased gastrointestinal absorption of calcium is partly responsible for the hypercalcemia in vitamin D intoxication and a low dietary calcium intake gradually reduces serum calcium in such patients.⁵⁴ Preliminary data (not shown) obtained from patients treated with progressively higher doses of vitamin D3 up to 35,000 IU daily showed that the adoption of such easily understandable dietary recommendations reduced urinary calcium from borderline elevated levels (around 400 mg or 10 mmol per day, with serum calcium sustained at the upper normal range) to values within the normal range without changing vitamin D daily dose. Further restriction of dietary calcium (by also avoiding foods prepared with milk, such as smashed potatoes, bread, cakes and cookies) dropped urinary calcium to levels below the lower limit of the normal range adopted by the local laboratory (100 mg or 2.5 mmol per day) while serum calcium remained around the lower limit (8.6 mg/dL or 2.15 mmol/L).

Taken together, those data suggest that partial dietary calcium restriction efficiently prevents hypercalcemia and hypercalciuria by controlling the gastrointestinal availability of calcium under the calcitropic effect of the treatment paradigm employed in patients with psoriasis and vitiligo in this study. Potentiation of osteoclastic activity in bone by pharmacologically high levels of 25(OH)D3 competing for binding to VDR is a recognized mechanism of hypercalcemia in vitamin D intoxication.^{37,55} The high daily doses of vitamin D3 administered for 6 mo in this study, however, do not seem to have significantly enhanced osteoclastic activity in patients with psoriasis and vitiligo, since partial restriction of dietary calcium efficiently prevented hypercalcemia and hypercalciuria.

Compared with this study, longer-term follow up research should look for yet unknown potential side-effects related to high-dose vitamin D3 treatment of a larger sample of subjects with autoimmune disorders. Future studies should also aim to develop a method for setting the particular daily dose that compensates for genetic polymorphisms and other distinctive features, providing the highest therapeutic effect against autoimmunity without causing side effects like hypercalcemia/hypercalciuria due to enhanced osteoclastic activity. The individual dose needed to achieve optimal biological effects of vitamin D might be related not only to a single but also to multiple gene polymorphisms affecting vitamin D hydroxylases, DBP and/or VDR,⁴⁸ as well as to body weight, body fat, age, skin color, season, latitude and sunning habits;⁵⁶ optimal therapeutic effect in autoimmunity, in addition, should conceivably require pharmacological doses, much higher than those necessary for

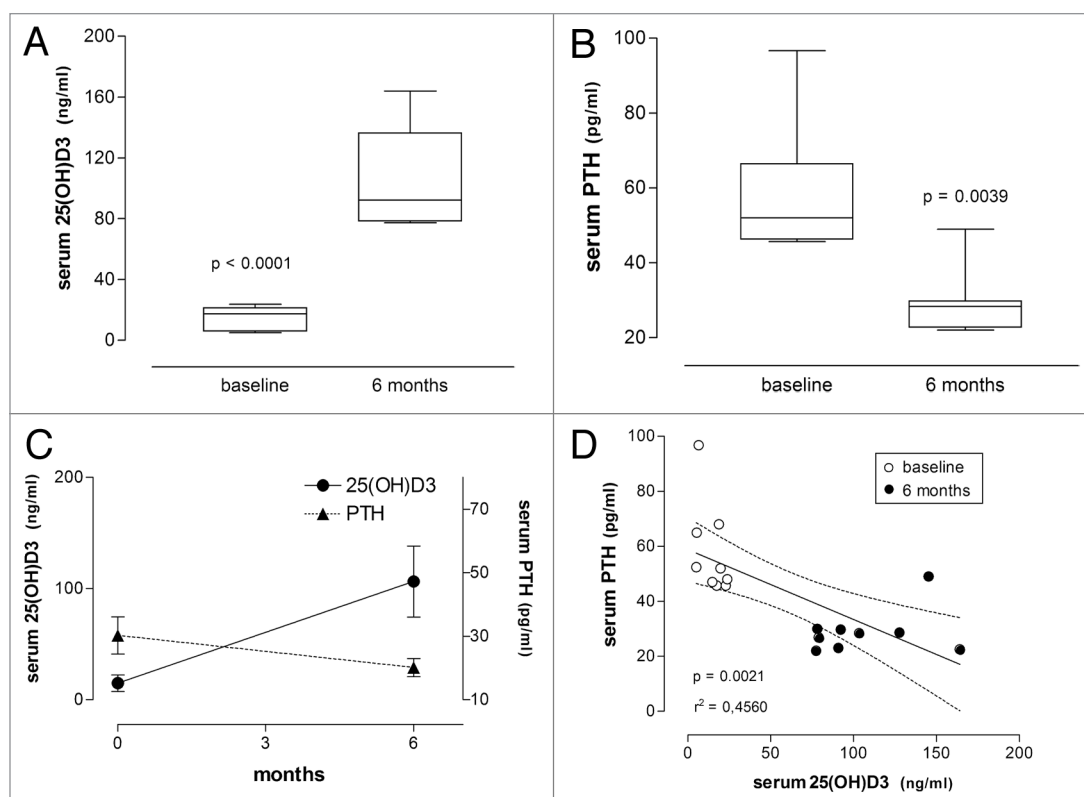


Figure 2. Serum concentrations of 25(OH)D3 and PTH in patients with psoriasis before and after treatment with vitamin D (35,000 IU per day for 6 mo). (A) Box plot showing serum concentrations of 25(OH)D3 before and after treatment. (B) Same for the respective serum PTH concentrations. Significance level (Wilcoxon signed rank test) indicated in (A) and (B). (C) Serum concentrations of 25(OH)D3 and PTH respectively increased and decreased during treatment. (D) Linear regression of serum PTH on serum 25(OH)D3 concentrations is significant (significance level and r^2 value are shown; dashed lines represent the 95% CIs for the linear regression line; baseline and 6-mo values are respectively shown as empty and filled circles).

preventive measures. All interventions using high-dose vitamin D3 so far applied to treat autoimmune disorders, including the current one, have used arbitrarily selected doses, without taking into account the potentially large variability of resistance to the benefits and side-effects of vitamin D among the patients participating in the clinical trial. Such uniform research approach precludes the development of a rational protocol for establishing the optimal daily dose of vitamin D for each patient, which would improve both safety and therapeutic effectiveness in the clinical setting. Ultimately resulting from all these multiple variables interacting in the same organism, the serum concentration of PTH may be the best biological indicator for the individual setting of the optimal therapeutic dose of vitamin D3 for the treatment of autoimmune disorders. An isolated measurement of serum PTH concentration does not provide a reliable ancillary parameter to estimate the dose of vitamin D3 required for optimal control of autoimmunity. The enhancing effect of PTH on renal 1,25(OH)2D3 production declines with age,⁵⁷ so that young patients may sustain efficient gastrointestinal absorption of calcium without raising PTH to the upper normal range or above in contrast to mature or old adults. Conversely, the magnitude of the decrease in serum PTH concentration, from the basal value to the level achieved after a period of treatment, may provide a reasonable estimation of how much the initial daily

dose of vitamin D3 should be increased to reduce serum PTH levels to the lower reference range. A period of at least 2 mo should be allowed between the two serum PTH measurements, considering that 25(OH)D3 has a half-life of 15 d.⁴⁸ Using the PTH level as an ancillary index of therapeutic response requires a diet only partially restricted in calcium (like the one described in this study) since excessive restriction of calcium intake would maintain increased bone resorption to preserve normocalcemia, thereby limiting or preventing vitamin D3-induced PTH drop. Avoiding excessively high doses of vitamin D3 capable of suppressing PTH and periodically measuring bone density, on the other hand, may conceivably indicate that 25(OH)D3 probably have not reached circulating concentrations capable of increasing osteoclastic activity. According to this view, the PTH reductions observed with sustained normal serum and urinary calcium after 6 mo of treatment either in patients with psoriasis (from 57.8 ± 16.7 pg/mL to 28.9 ± 8.2 pg/mL) or vitiligo (from 55.3 ± 25.0 pg/mL to 25.4 ± 10.7 pg/mL) did not reach the lower limit of the reference range (8–74 pg/mL), suggesting that they could obtain additional therapeutic benefit from even higher doses of vitamin D3 than those used in the current study without compromising the safety of treatment.

In summary, the present study suggests that, at least for patients with autoimmune disorders like vitiligo and psoriasis, a daily

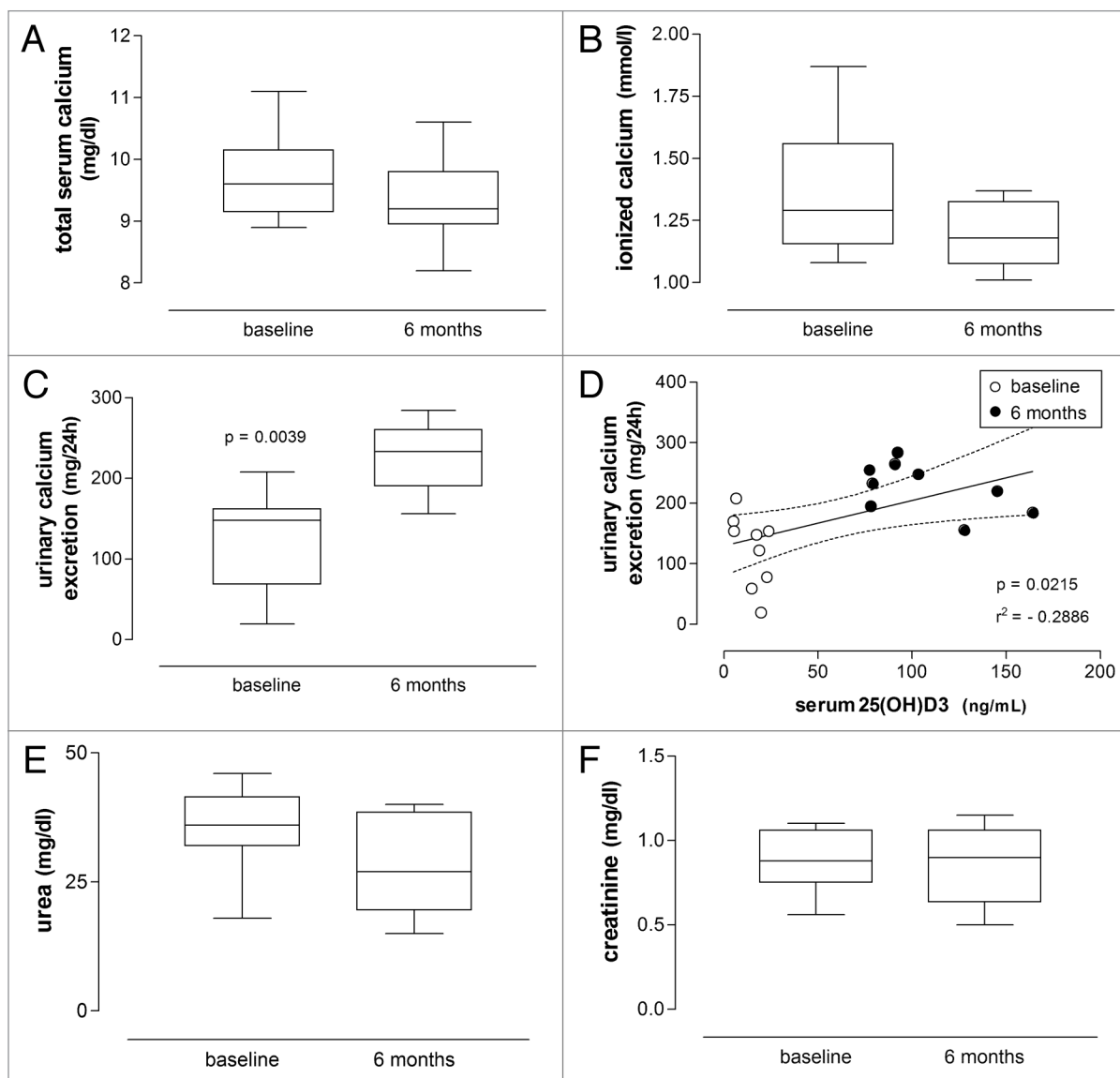


Figure 3. (A), (B), (C), (D), (F) Box plots respectively showing concentrations of serum calcium, 24-h urinary calcium excretion, serum urea and serum creatinine in patients with psoriasis before and after treatment with vitamin D (35,000 IU per day for 6 mo), with a significant pre- and post-treatment difference only found for 24-h urinary calcium excretion (Wilcoxon signed rank test). (D) Linear regression of 24-h urinary calcium excretion on serum 25(OH)D3 concentrations is significant (significance level and r^2 value are shown; dashed lines represent the 95% CIs for the linear regression line; baseline and 6-mo values are respectively shown as empty and filled circles).

dose of 35,000 IU of vitamin D is a safe and effective therapeutic approach for reducing disease activity. Dietary calcium limited by avoiding dairy products and calcium-enriched foods – like oat, rice or soya “milk” and minimum hydration (2.5 L daily) ensures safety. Further research should investigate whether the magnitude of PTH reduction may be a valuable marker for the individual setting of maximal daily doses of vitamin D in autoimmune diseases.

Materials and Methods

Subjects. The Ethics Committee of the Hospital Heliópolis (Sao Paulo Brazil) and the Ethics Committee of the Universidade Federal de São Paulo approved this study protocol (registered

under the CONEP number 0356/08). All patients gave spoken and written informed consent before inclusion in the study.

This study included nine psoriasis patients and 16 vitiligo patients from two outpatient clinics in São Paulo, Brazil—the Dermatology Clinic of the Hospital Heliópolis and the Internal Medicine Clinic of Universidade Federal de São Paulo. Subjects were men or women over 18 y of age. The study protocol excluded (1) patients under treatment with thiazide diuretics or lithium to avoid drug-vitamin D interactions on calcium metabolism;⁵⁸ (2) patients taking psoriasis- or vitiligo-inducing drugs;^{59,60} (3) patients with cognitive impairment; (d) patients with renal insufficiency and (4) patients with elevated calcium/calciuria or primary hyperparathyroidism.

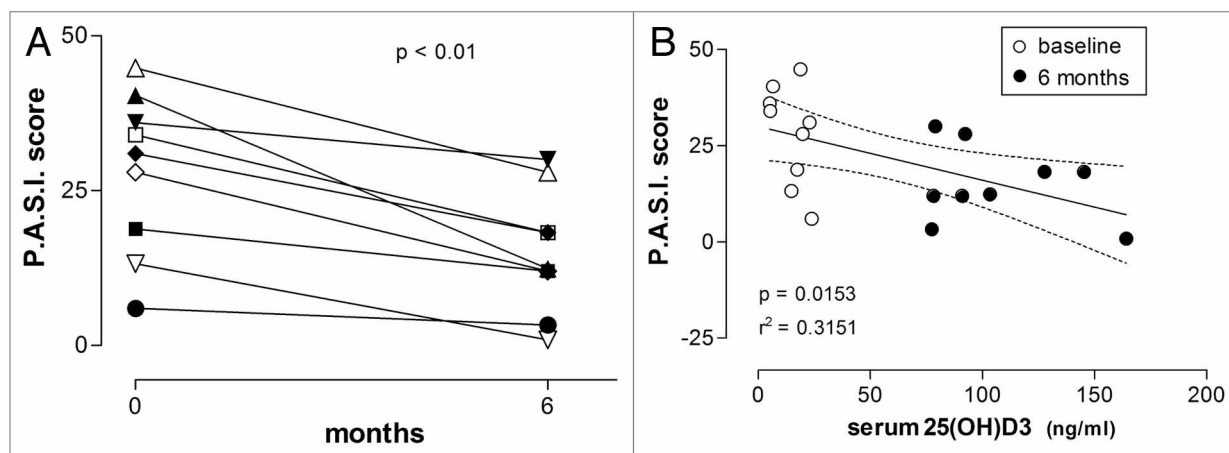


Figure 4. PASI scores in patients with psoriasis before and after treatment with vitamin D (35,000 IU per day for 6 mo). (A) Individual temporal profiles of the P.A.S.I. score during the treatment showing clinical improvement in all patients. (B) Linear regression of P.A.S.I. on 25(OH)D3 concentration is significant (significance level and r^2 value are shown; dashed lines represent the 95% CIs for the linear regression line; baseline and 6-mo values are respectively shown as empty and filled circles).

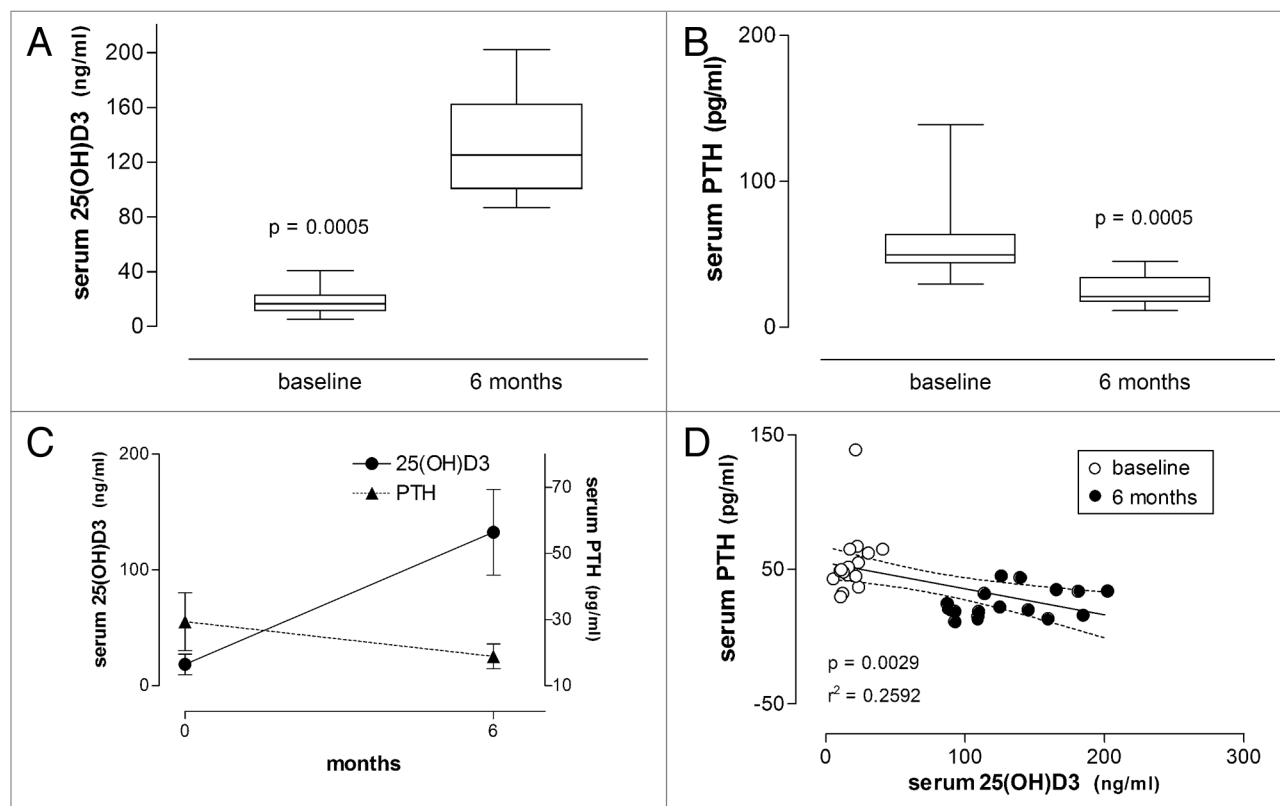


Figure 5. Serum concentrations of 25(OH)D3 and PTH in patients with vitiligo before and after treatment with vitamin D (35,000 IU per day for 6 mo). (A) Box plot showing serum concentrations of 25(OH)D3 before and after treatment. (B) Same for the respective serum PTH concentrations. Significance level (Wilcoxon signed rank test) indicated in (A) and (B). (C) Serum concentrations of 25(OH)D3 and PTH respectively increased and decreased during treatment. (D) Linear regression of serum PTH on serum 25(OH)D3 concentrations is significant (significance level and r^2 value are shown; dashed lines represent the 95% CIs for the linear regression line; baseline and 6-mo values are respectively shown as empty and filled circles).

Design. This is an open-label study where all patients received oral treatment with 35,000 IU of vitamin D (1.75 ml of a 20,000 IU/mL sunflower oil solution) per day. Whenever present,

standard treatments were not changed. Following instructions, all patients excluded milk and dairy products (as well as calcium-fortified foods like soy, oat or rice milk) from their diet and

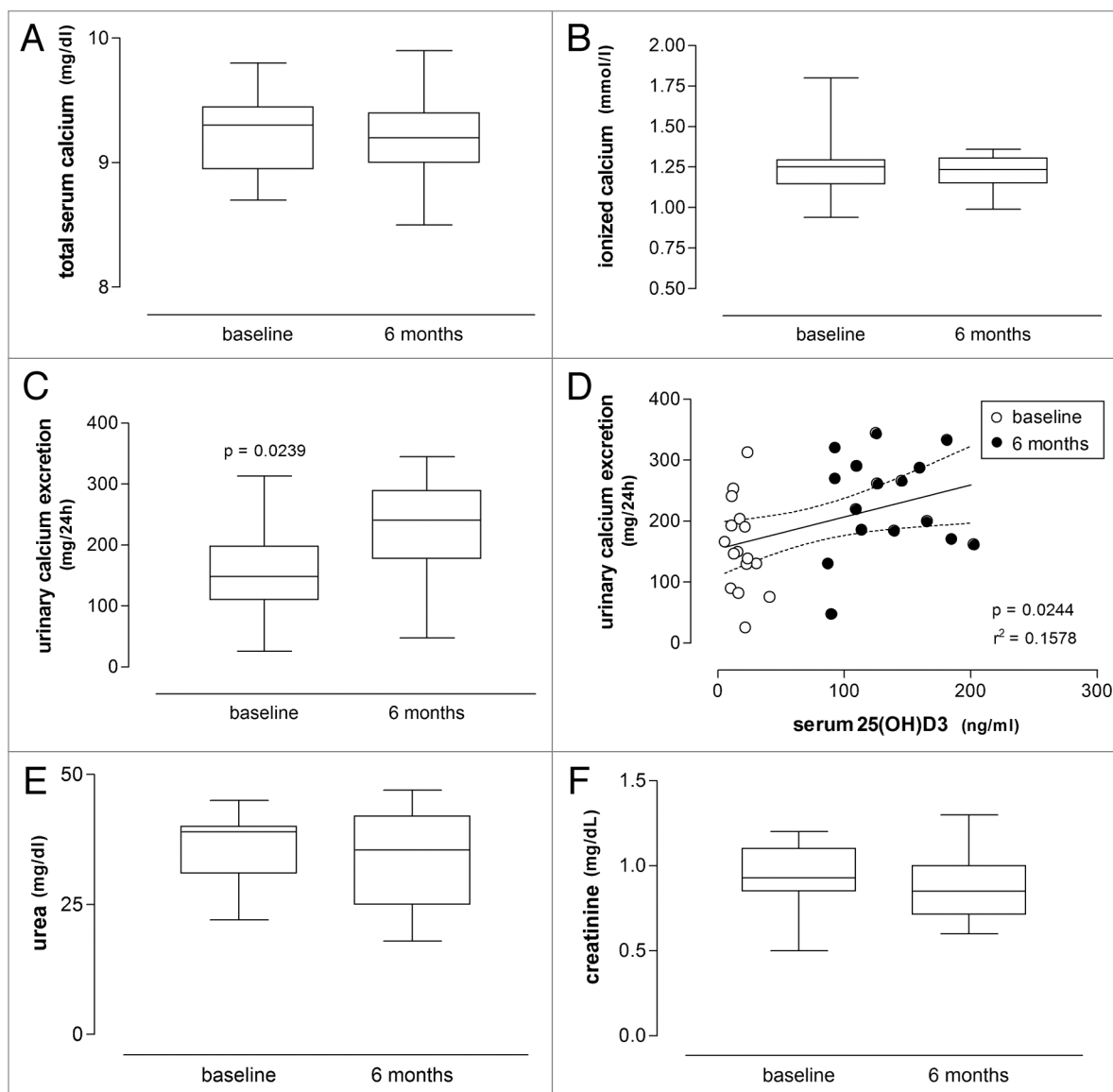


Figure 6. (A), (B), (C), (D), (F) Box plots respectively showing concentrations of serum calcium, 24-h urinary calcium excretion, serum urea and serum creatinine in patients with vitiligo before and after treatment with vitamin D (35,000 IU per day for 6 mo), with a significant pre- and post-treatment difference only found for 24-h urinary calcium excretion (Wilcoxon signed rank test). (D) Linear regression of 24-h urinary calcium excretion on serum 25(OH)D3 concentrations is significant (significance level and r^2 value are shown; dashed lines represent the 95% CIs for the linear regression line; baseline and 6-mo values are respectively shown as empty and filled circles).

ingested at least 2.5 L of fluid per day to prevent, respectively, excessive absorption of intestinal calcium and concentrated urinary calcium. Calcium supplementation was not allowed. The onset of symptoms suggestive of hypercalcemia (increased thirst, constipation, nausea, vomiting) would require performing extra laboratory tests. Regular medical follow-up appointments ensured compliance with dietary restriction and fluid intake.

After clinical diagnosis, all patients had clinical scoring, photo documentation of affected skin areas, laboratory tests performed before, at three and six mo of treatment. Laboratory tests included basal vitamin D status (25(OH)D3 levels), total and ionized serum calcium, total 24-h urinary calcium excretion,

parathormone (PTH), serum urea and creatinine levels. By collecting all data from March to October 2011 and from March to October 2012, the authors attempted to minimize seasonal variations in 25(OH)D3 levels and related effects.

Analytical methods. 25(OH)D3 levels were determined by HPLC (LC 20AT) with UV detection at 265 nm (UV/VIS model SPD-20A). 25(OH)D3 standard, solvents and other reagents were of analytical grade (all purchased from Sigma-Aldrich).

An internal standard (IS) of 25(OH)D3 compensated the reduced HPLC sensitivity to detect very low levels of 25(OH)D3. Stock solution of IS was prepared in methanol at 100 μ g/mL and kept at -20°C in amber tube. The HPLC conditions

were LiChrosorb RP-18 5 μ m, 12.5 $\times$ 0.44 mm column (Merck), 40°C, acetonitrile-methanol-water (90:4:6, v/v) as the mobile phase, 3.2 min for retention time and flow rate of 1 ml/min. The calibration curve was linear over the concentration range of 9.8 ng/mL to 1250.0 ng/mL ($r^2 = 0.9994$).

Serum samples were immediately stored at -80°C until analysis. The following steps were performed under light protection. Each serum sample of 100 μ L was thawed, added to 70 μ L of methanol-2-propanol mixture (80:20) and then vortex-mixed for 30 sec. Subsequently, 400 μ L of hexane was added, vortex-mixed again for 60 sec and centrifuged under 2500 g for 10 min at 10°C . A volume of 100 μ L of the resulting organic phase was submitted to evaporation in a Concentrator model 5301 for 10 min at room temperature. The resulting dried residue was then resuspended in 50 μ L of methanol plus 50 μ L of IS (working solution of 200 ng/mL) and vortex-mixed for 2 min prior to injection into HPLC. The final result was obtained by deducting the amount corresponding to added IS from the ultimate figure released from HPLC. The IS method appropriately correlated with assessments of standard 25(OH)D3 concentrations and serum samples.

PTH was assayed by chemiluminescence, while other laboratory tests (total and ionized serum calcium, urea and creatinine) were analyzed by standard methods at the Central Laboratory of the University Hospital (Federal University of São Paulo).

Clinical parameters of vitiligo and psoriasis. The PASI score used for assessment of severity and extent of psoriasis⁶¹ enabled the evaluation of the response to treatment. Pre- and post-treatment photographic documentation of the affected skin under Wood's light (UVA 351 nm) and a quartile grading scale⁶² enabled the evaluation of the clinical response to the treatment in patients with vitiligo. The percentage of the affected skin surface that achieved repigmentation at 6 mo of treatment yielded five categories of clinical response. These included "0" for no repigmentation; "1" for 1 to 25% repigmentation, "2" for 26 to 50% repigmentation, "3" for 51 to 75% repigmentation and "4" for repigmentation above 75% of the total baseline area of affected skin.

Statistics. Results are expressed in tables as mean $\pm$ standard deviation. The Wilcoxon assigned rank test was employed to assess the effect of treatment with vitamin D (50,000 IU daily for six months). The relationship between 25(OH)D3 and continuous variables (PTH and urinary calcium excretion) was

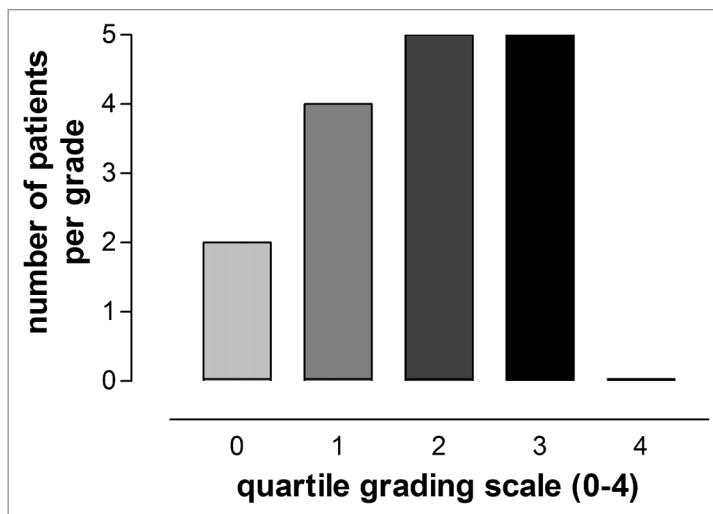


Figure 7. Clinical response of 16 patients with vitiligo after treatment with vitamin D (35,000 IU per day for six months). Two patients showed no repigmentation (quartile 0); four patients showed 1–25% repigmentation (quartile 1), five patients showed 26–50% repigmentation (quartile 2), five patients showed 51–75% repigmentation (quartile 3) and none showed more than 75% repigmentation (quartile 4).

evaluated using a Pearson correlation coefficient. Curves relating serum 25(OH)D3 and PTH or urinary calcium levels were fitted using linear regression models. Statistical analyses and graphical presentation were performed using the GraphPad Prism (Version 3.02, San Diego, USA).

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

C.G.C., R.S.G., D.C.F. and A.C.L. designed the study; D.C.F. and R.S.C. conducted the research; M.G. provided and prepared vitamin D supplement, R.S.C., L.C.M.N., L.D.T., J.J.S. and F.S. performed the analytical method for 25(OH)D3 measurements; N.F.N. and Y.J. performed statistical analysis; C.G.C., R.S.C., D.C.F., L.C.M.N., D.J.N. and A.C.L. analyzed data; C.G.C., R.S.C. and D.C.F. wrote the paper. All authors have approved the manuscript. This project was supported by grants from CAPES, Institute for Investigation and Treatment of Autoimmune Disorders (I.I.T.A.) and UNIMED do ABC, Brazil. DCF was a CAPES fellow.

References

1. Ramagopalan SV, Heger A, Berlanga AJ, Maugeri NJ, Lincoln MR, Burrell A, et al. A ChIP-seq defined genome-wide map of vitamin D receptor binding: associations with disease and evolution. *Genome Res* 2010; 20:1352-60; PMID:20736230; <http://dx.doi.org/10.1101/gr.107920.110>
2. Holick MF. The vitamin D deficiency pandemic and consequences for nonskeletal health: mechanisms of action. *Mol Aspects Med* 2008; 29:361-8; PMID:18801384; <http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2008.08.008>
3. Eyles DW, Smith S, Kinobe R, Hewison M, McGrath JJ. Distribution of the vitamin D receptor and 1 α -hydroxylase in human brain. *J Chem Neuroanat* 2005; 29:21-30; PMID:15589699; <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchemneu.2004.08.006>
4. Adams JS, Hewison M. Extrarenal expression of the 25-hydroxyvitamin D-1-hydroxylase. *Arch Biochem Biophys* 2012; 523:95-102; PMID:22446158; <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2012.02.016>
5. Eyles DW, Burne TH, McGrath JJ. Vitamin D, effects on brain development, adult brain function and the links between low levels of vitamin D and neuropsychiatric disease. *Front Neuroendocrinol* 2013; 34:47-64; PMID:22796576; <http://dx.doi.org/10.1016/j.yfrne.2012.07.001>
6. Hewison M. An update on vitamin D and human immunity. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2012; 76:315-25; PMID:21995874; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2265.2011.04261.x>
7. Holick MF. Evidence-based D-bate on health benefits of vitamin D revisited. *Dermatoendocrinol* 2012; 4:183-90; PMID:22928075; <http://dx.doi.org/10.4161/derm.20015>
8. IOM (Institute of Medicine). Dietary reference intakes for calcium and vitamin D. Committee to Review Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D. Washington, DC: The National Academies Press. 2011.



Figure 8. For figure legend, see page 11.

Figure 8. Photographs of two male patients with psoriasis before (**A and C**) and after (**B and D**) six months of treatment with vitamin D (35,000 IU per day). (**A and B**) A 59 y-old patient with BMI of 24.8 presenting a PASI score of 31 before treatment and achieving score of 18.2 after six months of treatment; his serum concentration of 25(OH)D3 was 22.8 ng/mL at baseline, reaching 127.5 ng/mL after 6 mo of treatment. (**C and D**) 60 y-old patient with BMI of 33.6 presenting a PASI score of 40.4 at baseline, achieving score of 12.4 after six months; his serum concentration of 25(OH)D3 was 5.6 ng/mL, reaching 103.2 ng/mL after six months of treatment.

9. Heaney RP, Davies KM, Chen TC, Holick MF, Barger-Lux MJ. Human serum 25-hydroxycholecalciferol response to extended oral dosing with cholecalciferol. *Am J Clin Nutr* 2003; 77:204-10; PMID:12499343
10. Lagishetty V, Liu NQ, Hewison M. Vitamin D metabolism and innate immunity. *Mol Cell Endocrinol* 2011; 347:97-105; PMID:21664425; <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2011.04.015>
11. Sterling KA, Efekhari P, Girndt M, Kimmel PL, Raj DS. The immunoregulatory function of vitamin D: implications in chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol* 2012; 8:403-12; PMID:22614789; <http://dx.doi.org/10.1038/nrneph.2012.93>
12. Patel S, Farragher T, Berry J, Bunn D, Silman A, Symmons D. Association between serum vitamin D metabolite levels and disease activity in patients with early inflammatory polyarthritis. *Arthritis Rheum* 2007; 56:2143-9; PMID:17599737; <http://dx.doi.org/10.1002/art.22722>
13. Smolders J, Menheere P, Kessels A, Damoiseaux J, Hupperts R. Association of vitamin D metabolite levels with relapse rate and disability in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2008; 14:1220-4; PMID:18653736; <http://dx.doi.org/10.1177/135245808094399>
14. Amital H, Szekanez Z, Szűcs G, Dankó K, Nagy E, Csépanyi 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; 69:1155-7; PMID:20439290; <http://dx.doi.org/10.1136/ard.2009.120329>
15. Haque UJ, Bartlett SJ. Relationships among vitamin D, disease activity, pain and disability in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2010; 28:745-7; PMID:20883640
16. Mowry EM, Krupp LB, Milazzo M, Chabas D, Strober JB, Belman AL, et al. Vitamin D status is associated with relapse rate in pediatric-onset multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2010; 67:618-24; PMID:20437559
17. Ulitsky A, Ananthakrishnan AN, Naik A, Skaros S, Zadvornova Y, Binion DG, et al. Vitamin D deficiency in patients with inflammatory bowel disease: association with disease activity and quality of life. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2011; 35:308-16; PMID:21527593; <http://dx.doi.org/10.1177/0148607110381267>
18. Weinstock-Guttman B, Zivadinov R, Qu J, Cookfair D, Duan X, Bang E, et al. Vitamin D metabolites are associated with clinical and MRI outcomes in multiple sclerosis patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2011; 82:189-95; PMID:21047880; <http://dx.doi.org/10.1136/jnnp.2010.227942>
19. Runia TF, Hop WC, de Rijke YB, Buljevac D, Hintzen RQ. Lower serum vitamin D levels are associated with a higher relapse risk in multiple sclerosis. *Neurology* 2012; 79:261-6; PMID:22700811; <http://dx.doi.org/10.1212/WNL.0b013e31825fdec7>
20. Correale J, Yssraelit MC, Gaitán MI. Immunomodulatory effects of Vitamin D in multiple sclerosis. *Brain* 2009; 132:1146-60; PMID:19321461; <http://dx.doi.org/10.1093/brain/awp033>
21. Bruce D, Yu S, Ooi JH, Cantorna MT. Converging pathways lead to overproduction of IL-17 in the absence of vitamin D signaling. *Int Immunol* 2011; 23:519-28; PMID:21697289; <http://dx.doi.org/10.1093/intimm/dxr045>
22. Daniel C, Sartory NA, Zahn N, Radeke HH, Stein JM. Immune modulatory treatment of trinitrobenzene sulfonic acid colitis with calcitriol is associated with a change of a T helper (Th) 1/Th17 to a Th2 and regulatory T cell profile. *J Pharmacol Exp Ther* 2008; 324:23-33; PMID:17911375; <http://dx.doi.org/10.1124/jpet.107.127209>
23. Chang JH, Cha HR, Lee DS, Seo KY, Kweon MN. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits the differentiation and migration of T(H)17 cells to protect against experimental autoimmune encephalomyelitis. *PLoS One* 2010a; 5:e12925; PMID:20886077; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0012925>
24. Chang SH, Chung Y, Dong C. Vitamin D suppresses Th17 cytokine production by inducing C/EBP homologous protein (CHOP) expression. *J Biol Chem* 2010b; 285:38751-5; PMID:20974859; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.C110.185777>
25. Hegyi Z, Zwicker S, Bureik D, Peric M, Koglin S, Bartycka-Baran A, et al. Vitamin D analog calcipotriol suppresses the Th17 cytokine-induced proinflammatory S100 "alarmins" psoriasin (S100A7) and koebnerisin (S100A15) in psoriasis. *J Invest Dermatol* 2012; 132:1416-24; PMID:22402441; <http://dx.doi.org/10.1038/jid.2011.486>
26. Waite JC, Skokos D. Th17 response and inflammatory autoimmune diseases. *Int J Inflam* 2012; 2012:819467; PMID:22229105; <http://dx.doi.org/10.1155/2012/819467>
27. Chambers ES, Hawrylowicz CM. The impact of vitamin D on regulatory T cells. *Curr Allergy Asthma Rep* 2011; 11:29-36; PMID:21104171; <http://dx.doi.org/10.1007/s11882-010-0161-8>
28. Pani MA, Regulla K, Segni M, Krause M, Hofmann S, Hufner M, et al. Vitamin D 1alpha-hydroxylase (CYP1alpha) polymorphism in Graves' disease, Hashimoto's thyroiditis and type 1 diabetes mellitus. *Eur J Endocrinol* 2002; 146:777-81; PMID:12039697; <http://dx.doi.org/10.1530/eje.0.1460777>
29. Sundqvist E, Bäärnhielm M, Alfredsson L, Hillert J, Olsson T, Kockum I. Confirmation of association between multiple sclerosis and CYP27B1. *Eur J Hum Genet* 2010; 18:1349-52; PMID:20648053; <http://dx.doi.org/10.1038/ejhg.2010.113>
30. Vieth R, Fraser D. Kinetic behavior of 25-hydroxyvitamin D-1-hydroxylase and -24-hydroxylase in rat kidney mitochondria. *J Biol Chem* 1979; 254:12455-60; PMID:500724
31. Vieth R, McCarten K, Norwich KH. Role of 25-hydroxyvitamin D3 dose in determining rat 1,25-dihydroxyvitamin D3 production. *Am J Physiol* 1990; 258:E780-9; PMID:2185661
32. Rodríguez-Antona C, Donato MT, Pareja E, Gómez-Lechón MJ, Castell JV. Cytochrome P-450 mRNA expression in human liver and its relationship with enzyme activity. *Arch Biochem Biophys* 2001; 393:308-15; PMID:11556818; <http://dx.doi.org/10.1006/abbi.2001.2499>
33. Nebert DW, Russell DW. Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet* 2002; 360:1155-62; PMID:12387968; [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)11203-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(02)11203-7)
34. Ingelman-Sundberg M, Sim SC, Gomez A, Rodríguez-Antona C. Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoeconomic and clinical aspects. *Pharmacol Ther* 2007; 116:496-526; PMID:18001838; <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2007.09.004>
35. Zhou SF, Liu JP, Chowbay B. Polymorphism of human cytochrome P450 enzymes and its clinical impact. *Drug Metab Rev* 2009; 41:89-295; PMID:19514967; <http://dx.doi.org/10.1080/03602530902843483>
36. Vieth R. Toxicity of Vitamin D. In: Holick MF, ed. *Vitamin D*. New York, NY: Humana Press, 2010:603-612.
37. Cusano NE, Thys-Jacobs S, Bilezikian JP. Hypercalcemia due to vitamin D toxicity. In: Feldman D, Pike JW, Adams JS, ed. *Vitamin D*. San Diego, CA: Academic Press, 2011:1381-1402.
38. Silverberg JL, Silverberg AI, Malka E, Silverberg NB. A pilot study assessing the role of 25 hydroxy vitamin D levels in patients with vitiligo vulgaris. *J Am Acad Dermatol* 2010; 62:937-41; PMID:20466170; <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaad.2009.11.024>
39. Benrashid M, Moyers K, Mohty M, Savani BN. Vitamin D deficiency, autoimmunity, and graft-versus-host-disease risk: Implication for preventive therapy. *Exp Hematol* 2012; 40:263-7; PMID:22265707; <http://dx.doi.org/10.1016/j.exphem.2012.01.006>
40. Gisondi P, Rossini M, Di Cesare A, Idolazzi L, Farina S, Beltrami G, et al. Vitamin D status in patients with chronic plaque psoriasis. *Br J Dermatol* 2012; 166:505-10; PMID:22013980; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2133.2011.10699.x>
41. Orgaz-Molina J, Buendía-Eisman A, Arrabal-Polo MA, Ruiz JC, Arias-Santiago S. Deficiency of serum concentration of 25-hydroxyvitamin D in psoriatic patients: a case-control study. *J Am Acad Dermatol* 2012; 67:931-8; PMID:22387034; <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaad.2012.01.040>
42. Byers SW, Rowlands T, Beildeck M, Bong YS. Mechanism of action of vitamin D and the vitamin D receptor in colorectal cancer prevention and treatment. *Rev Endocr Metab Disord* 2012; 13:31-8; PMID:21861107; <http://dx.doi.org/10.1007/s11154-011-9196-y>
43. Muscogiuri G, Sorice GP, Ajan R, Mezza T, Pilz S, Priolella A, et al. Can vitamin D deficiency cause diabetes and cardiovascular diseases? Present evidence and future perspectives. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2012; 22:81-7; PMID:22265795; <http://dx.doi.org/10.1016/j.numecd.2011.11.001>
44. Rothman KJ, Michels KB. The continuing unethical use of placebo controls. *N Engl J Med* 1994; 331:394-8; PMID:8028622; <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM199408113310611>
45. Kavanaugh A. Ethical and practical issues in conducting clinical trials in psoriasis and psoriatic arthritis. *Ann Rheum Dis* 2005; 64(Suppl 2):ii46-8; PMID:15708936; <http://dx.doi.org/10.1136/ard.2004.030817>
46. Resnik DB. Ethical dilemmas in communicating medical information to the public. *Health Policy* 2001; 55:129-49; PMID:11163652; [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-8510\(00\)00121-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-8510(00)00121-4)
47. Simon R. Are placebo-controlled clinical trials ethical or needed when alternative treatment exists? *Ann Intern Med* 2000; 133:474-5; PMID:10975967; <http://dx.doi.org/10.7326/0003-4819-133-6-200009190-00017>
48. Zhang F, Moayyeri A, Spector TD. Genetic influences on circulating vitamin D level: a review. *Curr Cardiovasc Risk Rep* 2012; 6:549-55; <http://dx.doi.org/10.1007/s12170-012-0278-5>
49. Jones G. Pharmacokinetics of vitamin D toxicity. *Am J Clin Nutr* 2008; 88:582S-6S; PMID:18689406
50. Hewison M. Vitamin D and immune function: an overview. *Proc Nutr Soc* 2012; 71:50-61; PMID:21849106; <http://dx.doi.org/10.1017/S0029665111001650>

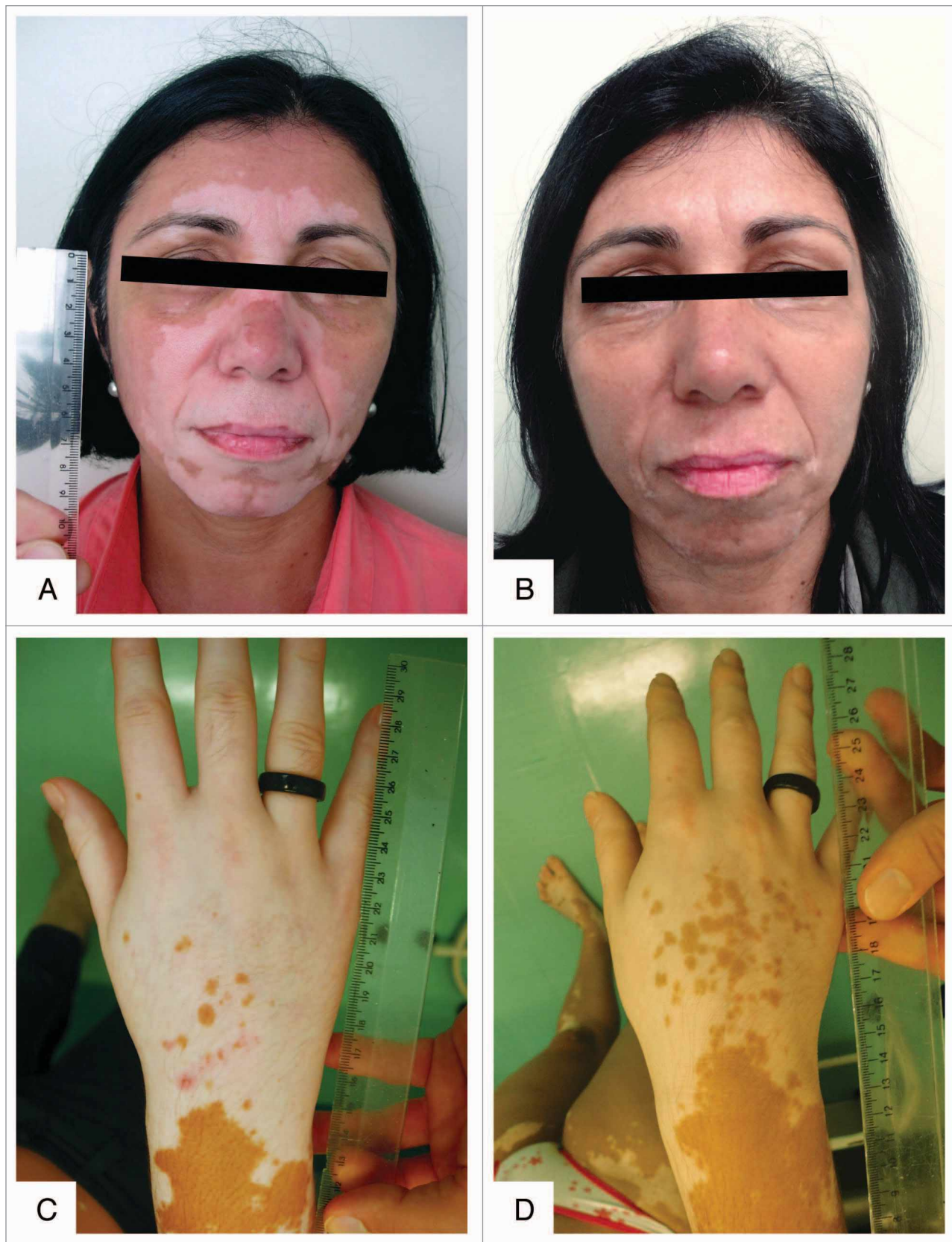


Figure 9. For figure legend, see page 13.

Figure 9. Photographs of two female patients with vitiligo before (**A and C**) and after (**B and D**) six months of treatment with vitamin D (35,000 IU per day). (**A and B**) A 50 y-old patient with BMI of 28.3 achieving between 51 and 75% of repigmentation (quartile 3) after six months of treatment; her serum concentration of 25(OH)D3 was 12.5 ng/mL, at baseline, reaching 92.4 ng/mL after 6 mo of treatment. (**C and D**) A 36 y-old patient with BMI of 22.7 achieving between 1 and 25% of repigmentation (quartile 1) after six months of treatment; her serum concentration of 25(OH)D3 was 12.0 ng/mL, at baseline, reaching 92.5 ng/mL after 6 mo of treatment.

51. Henry HL. Regulation of vitamin D metabolism. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2011; 25:531-41; PMID:21872796; <http://dx.doi.org/10.1016/j.beem.2011.05.003>
52. Bikle DD. Vitamin D and immune function: understanding common pathways. *Curr Osteoporos Rep* 2009; 7:58-63; PMID:19631030; <http://dx.doi.org/10.1007/s11914-009-0011-6>
53. Beckman MJ, Horst RL, Reinhardt TA, Beitz DC. Up-regulation of the intestinal 1,25-dihydroxyvitamin D receptor during hypervitaminosis D: a comparison between vitamin D2 and vitamin D3. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 169:910-5; PMID:2163637; [http://dx.doi.org/10.1016/0006-291X\(90\)91979-3](http://dx.doi.org/10.1016/0006-291X(90)91979-3)
54. Buckle RM, Gamlen TR, Pullen IM. Vitamin D intoxication treated with porcine calcitonin. *Br Med J* 1972; 3:205-7; PMID:4261142; <http://dx.doi.org/10.1136/bmj.3.5820.205>
55. Selby PL, Davies M, Marks JS, Mawer EB. Vitamin D intoxication causes hypercalcaemia by increased bone resorption which responds to pamidronate. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1995; 43:531-6; PMID:8548936; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2265.1995.tb02916.x>
56. Cannell JJ, Hollis BW. Use of vitamin D in clinical practice. *Altern Med Rev* 2008; 13:6-20; PMID:18377099
57. Tsai KS, Wahner HW, Offord KP, Melton LJ 3rd, Kumar R, Riggs BL. Effect of aging on vitamin D stores and bone density in women. *Calcif Tissue Int* 1987; 40:241-3; PMID:3107776; <http://dx.doi.org/10.1007/BF02555255>
58. Hariri A, Mount DB, Rastegar A. Disorders of calcium, phosphate, and magnesium metabolism. In: Mount DB, Sayegh MH, Singh AK, ed. *Core Concepts in the Disorders of Fluid, Electrolytes and Acid-Base Balance*. New York, NY: Springer US, 2013:103-146.
59. Duhra P, Foulds IS. Persistent vitiligo induced by diphenylhydron. *Br J Dermatol* 1990; 123:415-6; PMID:2206982; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2133.1990.tb06306.x>
60. Basavaraj KH, Ashok NM, Rashmi R, Praveen TK. The role of drugs in the induction and/or exacerbation of psoriasis. *Int J Dermatol* 2010; 49:1351-61; PMID:21091671; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-4632.2010.04570.x>
61. Fredriksson T, Pettersson U. Severe psoriasis-oral therapy with a new retinoid. *Dermatologica* 1978; 157:238-44; PMID:357213; <http://dx.doi.org/10.1159/000250839>
62. Shin J, Lee JS, Hann SK, Oh SH. Combination treatment by 10 600 nm ablative fractional carbon dioxide laser and narrowband ultraviolet B in refractory non-segmental vitiligo: a prospective, randomized half-body comparative study. *Br J Dermatol* 2012; 166:658-61; PMID:22050270; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2133.2011.10723.x>