

Il ruolo della vitamina D nelle malattie autoimmuni (Rassegna)

Antonio Antico¹, Marilina Tampona², Renato Tozzoli³

¹Dipartimento di Patologia Clinica, Ospedale Generale, Cittadella (PD)

²Servizio Medicina di Laboratorio, Policlinico Universitario, Bari

³Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Laboratorio di Patologia Clinica, Azienda Ospedaliera "S. Maria degli Angeli", Pordenone

LA VITAMINA D E I SUOI PRO-ORMONI

La 1,25-diidrossivitamina D₃ [1,25(OH)₂D₃] o calcitriolo rappresenta il substrato biochimico su cui si basa il sistema endocrino D, la cui funzione più conosciuta è la regolazione dell'omeostasi del calcio e la formazione delle ossa¹. Deriva da un precursore circolante, la 25-idrossivitamina D₃ [25(OH)D₃] o calcifediolo², forma ancora inattiva dell'ormone sintetizzato nel fegato dall'enzima 25α-idrossilasi CYP2R1, la cui produzione è regolata con un meccanismo a feed-back. La 25(OH)D₃ è veicolata in circolo dalla proteina legante la vitamina D (DBP) e la sua trasformazione in 1,25(OH)₂D₃ avviene principalmente nel rene, dove è filtrata dal glomerulo e riassorbita dalle cellule dei tubuli prossimali renali, mediante endocitosi megalina-mediata, e di nuovo idrossilata da parte dell'enzima 1α-idrossilasi CYP27B1^{3,4}. La produzione renale di 1,25(OH)₂D₃ è strettamente regolata dai livelli plasmatici di paratormone (PTH), calcio e fosforo e la sua concentrazione svolge azioni endocrine sistemiche come la regolazione del metabolismo osseo, l'aumento del riassorbimento renale del calcio, il trasporto intestinale del calcio, la regolazione della pressione sanguigna e la secrezione di insulina¹.

Altri tipi di cellule possiedono il corredo enzimatico per produrre l'ormone attivo *in loco*: la 1,25(OH)₂D₃ extrarenale sembra agire in primo luogo come fattore autocrino/paracrino con specifiche funzioni cellulari, come l'inibizione della proliferazione, la promozione della differenziazione, la regolazione della risposta immune^{1,5}. L'enzima 1α-idrossilasi è presente in almeno 10 diversi tessuti oltre che nel tubulo prossimale del rene (Tab. 1), ma la sua regolazione nei siti extrarenali è molto diversa e coerente con le funzioni autocrine/paracrine che 1,25(OH)₂D₃ svolge *in situ*⁶⁻¹⁵.

La sintesi e catabolismo di 1,25(OH)₂D₃ sono sotto il controllo di fattori locali, citochine e fattori di crescita, che ottimizzano i livelli di ormone per specifiche azioni cellulari, attraverso meccanismi ancora sconosciuti⁴. La 1,25(OH)₂D₃ svolge la sua azione legandosi ad un recettore tissutale, il recettore della vitamina D (VDR), membro della superfamiglia dei recettori steroidei, che agisce come fattore di trascrizione di un gene bersaglio⁴.

La presenza di VDR in tessuti che non partecipano all'omeostasi minerale ha portato alla scoperta di una miriade di altre funzioni controllate dall'ormone D (Tab. 2). La capacità di 1,25(OH)₂D₃ di inibire la crescita e promuovere la differenziazione di certi tipi cellulari ha suggerito che il sistema endocrino D possa avere un ruolo molto importante nella prevenzione dei tumori, nella regolazione del sistema immunitario e nella modulazione di altri sistemi endocrini; questo ruolo è stato recentemente dimo-

strato da studi osservazionali, che hanno associato una carenza di vitamina D con il cancro, malattie autoimmuni, ipertensione e diabete e hanno rilevato che tale ormone può agire in alcuni tessuti anche con meccanismo autocrino e/o paracrino^{16,17}.

Il catabolismo di 25(OH)D₃ e 1,25(OH)D₃ in acido calcitroico, biologicamente inattivo e solubile in acqua è effettuato dall'enzima 24α-idrossilasi (CYP24A1), espresso quasi ubiquitariamente. La stessa 1,25(OH)₂D₃ è un induttore molto forte dell'espressione di 24α-idrossilasi, attraverso la presenza di 2 sequenze di elementi che rispondono alla vitamina D (VDRE) nel promoter di questo gene, così da indurre il suo stesso catabolismo. Questo feed-back negativo serve come controllo interno per evitare eccessivi livelli di 1,25(OH)₂D₃^{4,18,19}.

Se l'azione più conosciuta della vitamina D riguarda il metabolismo osseo, oggi è chiaro che tale ormone è in grado di svolgere altre funzioni: funge da immunoregolare con prospettive terapeutiche per le malattie autoimmuni e da anti-proliferativo per il trattamento della psoriasi e delle neoplasie, e contribuisce a prevenire le malattie cardiovascolari²⁰.

LA REGOLAZIONE DEL SISTEMA ORMONALE D

Il sistema ormonale D è modulato da meccanismi intrinseci che ne regolano l'attività e l'efficacia a livello sia del metabolismo osseo, sia delle altre molteplici funzioni tissutali. La prima regolazione avviene attraverso lo stretto controllo della concentrazione in circolo di 1,25(OH)₂D₃, la cui produzione è modulata in relazione al fabbisogno di calcio e altri ormoni dell'organismo ed è inibita dallo stesso composto attivo. Gli altri fattori regolatori sono: il tra-

Tabella 1

Siti di produzione extrarenale di 1,25(OH)₂D₃ nell'uomo

Tessuto	Riferimento
Colon	(6)
Cellule Dendritiche	(7)
Cellule Endoteliali	(8)
Cervello	(9)
Mammella	(10)
Insule Pancreatiche	(11)
Ghiandole Paratiroidee	(12)
Placenta, decidua	(13)
Prostata	(14)
Cute	(15)

Tabella 2
Distribuzione tissutale del recettore della vitamina D

Tessuto Adiposo	Linfociti T Attivati
Surrene	Cuore
Osso	Cellule Endoteliali AorticheOsteoblasti
Midollo Osseo	Osteoblasti
Cervello	Cellule Insule Pancreatiche
Ghiandola Mammaria	Paratiroide
Cellule Neoplastiche	Parotide
Condrociti	Ipofisi
Colon	Placenta
Ovaio	Prostata
Epididimo	Retina
Follicolo Pilifero	Cute
Cellule intestinali	Stomaco
Cellule Renali Distali	Testicolo
Fegato	Timo
Polmone	Tiroide
Linfociti B	Utero
Cellule Dendritiche	
Macrofagi	

sporto in circolo, la captazione renale, la regolazione di 1α -idrossilasi renale ed extra-renale.

Trasporto in circolo. La $25(\text{OH})\text{D}_3$ si lega con elevata affinità alla proteina di trasporto (Vitamin D-binding protein-DBP), i cui livelli plasmatici, 20 volte superiori, condizionano la farmacocinetica del metabolita, in quanto il composto legato ha un accesso limitato alle cellule bersaglio ed è meno suscettibile al metabolismo epatico con conseguente aumento della sua emivita in circolo²¹. DBP pertanto agisce, oltre che come trasportatore, anche come modulatore del metabolismo della vitamina D in relazione alla sua concentrazione ematica, ottimizzandone il catabolismo cellulare e/o regolandone l'attività biologica, correlata con la concentrazione di ormone libero, proteggendo così i tessuti da livelli tossici di vitamina²². La concentrazione di DBP si riduce in corso di malattia epatica, sindrome nefrosica e malnutrizione, patologie nelle quali il rischio di intossicazione da D è elevato, mentre aumenta durante la gravidanza e in corso di terapia estrogenica⁵.

Captazione nei tubuli renali. La $25(\text{OH})\text{D}_3$ legata a DBP viene trasportata attivamente all'interno delle cellule dell'orletto a spazzola del tubulo prossimale renale, che contengono 1α -idrossilasi, attraverso un processo di endocitosi megalina-mediato²³. La megalina fa parte di un gruppo di proteine complesse localizzate sulla superficie delle cellule del tubulo renale prossimale, in grado di riassorbire il complesso $25(\text{OH})\text{D}_3$ -DBP filtrato dal rene. DBP è degradato nei lisosomi e $25(\text{OH})\text{D}_3$ viene veicolata all' 1α -idrossilasi, oppure, in base alla concentrazione dell'ormone attivo, ritorna in circolo dove si lega di nuovo a DBP²⁴⁻²⁶. I livelli di megalina sono aumentati da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ e ciò costituisce un meccanismo di controllo positivo nella produzione dell'ormone attivo²⁷.

Regolazione di 1α -idrossilasi renale. L'attività di 1α -idrossilasi, CYP27B1, è fortemente regolata dall'asse PTH-Ca-P. Il calcio introdotto con la dieta regola l'enzima direttamente, attraverso variazioni del calcio serico o per azione sulle cellule dei tubuli prossimali, e indirettamente alterando i livelli di PTH: l'ipocalcemia infatti aumenta i livelli dell'ormone circolante che è in grado di stimolare l' 1α -idrossilasi²⁵. Anche la restrizione dietetica del fosfato accresce l'attività dell'enzima renale, indipendentemente dalla concentrazione del calcio e PTH, probabilmente attraverso l'azione delle fosfatoinne, fosfoglicoproteine della matrice extracellulare, che sono in grado di agire come mediatori della regolazione del fosfato sull'attività dell'enzima e/o sul gene che lo controlla^{4,28}. Sono considerati regolatori positivi di 1α -idrossilasi anche calcitonina, ormone somatotropo e somatomedina. L' $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ limita, con meccanismo di feed-back negativo, i suoi stessi livelli circolanti attraverso l'inibizione dell'induzione PTH-mediata dell'attività del gene promotore²⁹. Anche il prodotto del gene *Klotho*, indotto da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, è ritenuto un regolatore negativo di 1α -idrossilasi³⁰.

Regolazione di 1α -idrossilasi extra-renale. La regolazione di 1α -idrossilasi che si trova nei siti extrarenali (Tab. 1) è molto diversa da quella dell'enzima renale ed in linea con le funzioni autocrine/paracrine svolte da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ prodotto localmente, sebbene il gene che controlla l'espressione e l'attività di 1α -idrossilasi nei tessuti extrarenali sia identico a quello che lo governa nel rene (*locus* cromosomiale 12q13.1-q13.3)⁴. Sintesi e catabolismo sono sotto il controllo di fattori locali, citochine e fattori di crescita, che ottimizzano i livelli di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ per specifiche azioni cellulari, attraverso meccanismi non ancora completamente conosciuti. In particolare, nei macrofagi l'espressione di 1α -idrossilasi è stimolata significativamente da segnali immuno-mediati da interferone γ ($\text{IFN}\gamma$), lipopolisaccaridi e infezioni virali; nelle cellule dendritiche (DC) l'espressione di 1α -idrossilasi è associata con la maturazione p38 MAPK e NF- κ B- dipendente delle stesse cellule³¹.

La produzione locale di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ dipende dai livelli dei precursori circolanti e ciò potenzialmente spiega l'associazione tra deficit di vitamina D e malattie autoimmuni e/o neoplasie, che, non essendo soggetta a un feedback negativo mediato da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ come avviene per l'enzima renale, non aumenta la concentrazione di ormone attivo circolante. Dati recenti dimostrano che anche le cellule T esprimono gli enzimi responsabili della produzione di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ³².

L'interazione recettoriale

Il legame di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ con un recettore nucleare e/o con un recettore della membrana plasmatica negli organi bersaglio genera una appropriata risposta biologica capace di regolare la trascrizione genica (azione genomica) o di attivare rapidamente una varietà di segnali di trasduzione sulla o vicino alla membrana plasmatica (azione rapida non genomica)³³.

Azione genomica. Il calcitriolo è uno dei più importanti regolatori di geni e agisce all'interno della cellula bersaglio legandosi direttamente ad un recettore ad alta affinità (Vitamin D Receptor - VDR), appartenente alla superfamiglia dei recettori nucleari per gli ormoni steroidei, deputati

a modulare l'espressione genica delle cellule e presente in molti tessuti³⁴ (Tab. 2).

Il VDR è composto da una singola catena polipeptidica di 427 aminoacidi strutturata in 3 domini funzionali:

- C-terminale (*ligand binding domain-LBD*) che lega l'ormone a livello del suo anello A, contenente il gruppo 1α -idrossilato;

- DNA legante (*DNA binding domain-DBD*), organizzato in 2 moduli zinco-nucleati (*zinc finger*), responsabili dell'interazione ad alta affinità con specifiche sequenze di DNA delle regioni promotrici del gene bersaglio, chiamate elementi che rispondono alla vitamina D (VDRE);

- N-terminale, per i processi di trascrizione⁴.

Il VDR regola la trascrizione del DNA in mRNA, effettuata dalla RNA polimerasi II, che migrando nel citoplasma trasduce l'informazione ai ribosomi per la sintesi proteica³⁵. Attraverso 4 fasi successive in cui VDR lega $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ nel dominio LBD, tale reazione induce cambi conformazionali nel recettore che favoriscono il legame eterodimerico con il recettore dell'acido retinoico X (RXR) a livello di LBD e la traslocazione nel nucleo; il nuovo complesso $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -VDR/RXR si lega, mediante il DBD, a sequenze specifiche di VDRE e causa modifiche conformazionali del DNA genomico^{36,37}. Infine VDR recluta proteine nucleari co-attivatrici e/o co-repressive^{38,39} che lo aiutano a modulare la trascrizione genica⁴⁰⁻⁴⁷; l'equilibrio finale tra co-attivatori e co-repressori determina il controllo della trascrizione genica in presenza di stimoli fisiologici o patologici⁴⁸.

Le azioni genomiche della D si distinguono in classiche e non classiche (Tab. 3). Riguardo le prime, il sistema endocrino D agisce come attore essenziale nell'interazione tra rene, osso, paratiroide e intestino per mantenere i livelli di calcio extracellulare entro i limiti di normalità. Tra le azioni genomiche non classiche, la recente scoperta di VDR nelle cellule del sistema immune ed il fatto che numerose di queste cellule posseggono il corredo enzima-

tico per produrre l'ormone hanno indicato che esso svolge importanti proprietà immunoregatorie^{4,32}.

Regolazione della risposta immune

La $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ modula il sistema immune determinando effetti regolatori diretti sulle funzioni dei linfociti B e T e influenzando il fenotipo e la funzione delle cellule presentanti l'antigene (APC) e delle DC, promuovendo proprietà tollerogeniche che favoriscono l'induzione dei T regolatori (Treg) al posto dei T effettori⁵⁰. Questa regolazione è mediata dall'azione della vitamina D su fattori di trascrizione nucleare come NF-AT e NF- κ B o per diretta interazione con VDRE nelle regioni promotrici dei geni delle citochine. La vitamina è prodotta dagli stessi macrofagi e dalle cellule DC, T e B, e pertanto è capace di contribuire fisiologicamente, attraverso VDR espresso nel loro nucleo, alla regolazione autocrina e paracrina sia dell'immunità innata che di quella adattiva⁵⁰⁻⁵¹. Questo stretto controllo della produzione dell'ormone da parte delle cellule dello stesso sistema immune, innato e adattativo, conferma la rilevanza del sistema endocrino D nella modulazione della risposta immune nei soggetti sani e nei malati.

Potenziamento della risposta del sistema immune

innato. La risposta immune innata implica l'attivazione di *Toll-Like Receptor* (TLR), recettori transmembrana deputati al riconoscimento dei patogeni, nei polimorfonucleati, monociti, macrofagi, come pure nelle cellule epiteliali (epidermiche, gengive, intestino, vagina, vescica e polmone) che scatenano la risposta immune innata nell'ospite⁵². La $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ rappresenta il legame chiave tra l'attivazione dei TLR e la risposta antibatterica del sistema immune innato, soprattutto in corso di infezione tubercolare dove è in grado di indurre la produzione di un peptide antimicrobico, la catelicidina, che è codificato da un gene primario che risponde ed è fortemente regolato da D⁵³. Questo suggerisce che una quantità sufficiente di ormone attivo con-

Tabella 3

Azioni genomiche della vitamina D

Azioni genomiche classiche

- Mantenimento dei livelli di calcio extracellulare entro i limiti di normalità
- Aumento dell'assorbimento intestinale di calcio e fosforo dalla dieta
- Regolazione dello sviluppo e mantenimento della mineralizzazione dell'osso
- Modulazione della funzione della ghiandola paratiroide
- Riassorbimento del calcio nel tubulo prossimale attraverso la simultanea soppressione di 1α -idrossilasi e stimolazione di 24-idrossilasi

Azioni genomiche non classiche

- Inibizione della crescita cellulare
- Regolazione dell'apoptosi
- Controllo della differenziazione cellulare
- Modulazione della risposta immune
- Prevenzione della trasformazione neoplastica
- Controllo del sistema renina-angiotensina
- Controllo della secrezione insulinica
- Controllo della funzione muscolare
- Controllo del sistema nervoso

tribuisce a diminuire la suscettibilità all'infezione tubercolare. Altri studi dimostrano che la D consente ai cheratinociti di difendere il processo di riparazione delle ferite dalle infezioni batteriche^{32,54}. Inoltre la produzione autocrina di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ da parte di DC è in grado di programmare l'*homing* delle cellule T associate alla cute, che includono Treg capaci di contrastare gli effetti pro-infiammatori indotti nel tessuto stesso; l'ormone regola inoltre l'espressione del recettore per le chemochine epidermiche CCR10 nelle cellule T attivate, codificato da un gene primario che risponde alla D, favorendone l'azione tissutale⁵⁵.

Regolazione delle risposte del sistema immune adattivo. La $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ esercita un'azione inibitoria sul sistema immune adattivo; essa infatti: a) sopprime la proliferazione e la produzione delle immunoglobuline e ritarda la differenziazione dei precursori B in plasmacellule⁵⁶; b) inibisce la proliferazione dei Th1, capaci di produrre IFN γ e IL-2 e di attivare i macrofagi^{57,58}; c) agisce a livello delle DC/APC favorendo la produzione di IL-4, IL-5 e IL-10 e spostando la differenziazione T a favore del fenotipo Th2³²; e infine d) accresce la quantità dei Treg CD4⁺/CD25⁺ che producono IL-10, mediante la quale bloccano lo sviluppo di Th1, e inibisce la secrezione di IL-17 da parte dei T effettori⁵⁹.

Queste azioni regolano successive presentazioni di antigeni ai linfociti da parte del sistema delle APC e di conseguenza il reclutamento (favorito da IFN γ) e la proliferazione (agevolata da IL-2) dei T effettori.

Inoltre gli agonisti di VDR favoriscono la proliferazione di DC con proprietà di tolleranza⁶⁰:

- arrestando la differenziazione e la maturazione di DC;
- diminuendo l'espressione delle molecole co-stimolatorie CD40, CD80 e CD86;
- diminuendo marcatamente la produzione di IL-12;
- aumentando la produzione di IL-10⁶¹;
- inducendo l'espressione di ILT3 (*immunoglobulin-like transcript 3*), una molecola inibitoria associata con l'induzione di tolleranza⁶².

Le DC costituiscono un sistema altamente specializzato di APC, critico per l'iniziazione della risposta T CD4⁺; sono presenti in diversi stadi maturativi in circolo come pure negli organi linfoidi e non linfoidi, dove esercitano una funzione di sentinella. Dopo il contatto con l'antigene, migrano verso le aree T dipendenti dei linfonodi afferenti, dove possono trasformare i T nativi in Th1. Pertanto le DC possono essere immunogene, ma anche indurre tolleranza, sia nel timo sia in periferia, e possono modulare lo sviluppo dei T; in particolare le DC immature sembrano capaci di indurre tolleranza e proliferazione di Treg⁶³.

Studi sperimentali hanno dimostrato che le DC con proprietà di tolleranza, indotte dagli agonisti di VDR, sono in grado di indurre la differenziazione di Treg CD4⁺/CD25⁺, capaci di arrestare lo sviluppo del diabete autoimmune⁶⁰. Da ciò si evince che la sintesi attiva di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ all'interno delle cellule dendritiche, oltre ad inibire la differenziazione da precursori dei monociti in DC immature, blocca anche la loro capacità di subire la differenziazione finale in risposta a stimoli di maturazione⁶⁴. Lavori recenti hanno evidenziato che durante i processi infiammatori il calcitriolo regola negativamente, con meccanismo paracrina e attraverso il reclutamento ligando-indotto di deacetilasi istonica, l'espressione del fattore nucleare κB , indi-

spensabile sia per la differenziazione e maturazione di DC sia per innescare la risposta infiammatoria; questo spiega l'effetto inibitorio dell'ormone attivo sulla maturazione di DC e sulla produzione di mediatori proinfiammatori^{65,66}. La $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ e gli agonisti di VDR esplicano la loro azione esclusivamente sulle DC di origine midollare, regolando la loro produzione di citochine e chemochine e modulando la loro capacità di inibire lo sviluppo di T *helper* e aumentare la funzione di Treg^{60,67}.

Gli agonisti di VDR inoltre possono espletare anche effetti diretti su B e T inibendo selettivamente lo sviluppo dei Th1 e Th17^{57,68}, oppure inibendo direttamente le citochine di tipo 1 come IL-2 e IFN γ ⁶⁹.

E' stato anche dimostrato che $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ aumenta la quantità dei Th2 attraverso un effetto diretto sui CD4 nativi⁷⁰. Quindi Th1 e Th2 sono regolati dall'azione degli agonisti di VDR, sia per l'attivazione, come per la differenziazione⁷¹.

La $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ha effetti potenti e diretti anche sulla risposta cellulare B determinando induzione di apoptosi ed inibizione della proliferazione, generazione di cellule B memoria, differenziazione in plasmacellule e produzione di immunoglobuline⁵⁶.

I linfociti B, come i macrofagi, le DC e i T, esprimono il VDR e possono sintetizzare l'ormone attivo che può esercitare azioni regolatorie autocrine e paracrine. Il trattamento con agonisti di VDR inibisce la produzione da parte dei T di IL-17, una citochina proinfiammatoria prodotta da T patogenetici in diverse malattie autoimmuni organo-specifiche che colpiscono il cervello, il cuore, la sinovia e l'intestino^{59,72}. La produzione di IL-17 è sostenuta da IL-23, membro della famiglia dell'IL-12, formato da catene p19 e p40, la seconda delle quali è fortemente inibita da agonisti di VDR⁶⁸.

Le DC che inducono tolleranza, prodotte dopo un breve trattamento con $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ o suoi analoghi, portano allo sviluppo di Treg CD4⁺/CD25⁺, capaci di mediare la tolleranza ai trapianti ed arrestare lo sviluppo di diabete autoimmune⁷³. Gli agonisti di VDR non solo favoriscono l'induzione di Treg ed aumentano la loro attività inibitoria, ma possono anche agevolare il loro reclutamento nei siti infiammatori⁷⁴.

I METODI DI DOSAGGIO DELLA VITAMINA D

L'idrossilazione della vitamina D nel fegato a livello del carbonio 25 ha portato allo sviluppo dei primi metodi per misurare i livelli circolanti di vitamina, utilizzando il legame competitivo con le proteine vettrici (DBP)⁷⁵. Il vantaggio di questi metodi era la capacità di riconoscere contemporaneamente $25(\text{OH})\text{D}_2$ e $25(\text{OH})\text{D}_3$, mentre il loro limite principale era costituito dal fatto che dosavano anche altri metaboliti, tra cui la 24,25-diidrossivitamina D, la 25,26-diidrossivitamina D, e la 23-lattone vitamina D, presenti nel siero in quantità inferiore al 10-15% della concentrazione totale di $25(\text{OH})\text{D}_2$ e biologicamente inattivi⁷⁶.

Nel 1985 è stato sviluppato il primo metodo radioimmunologico (RIA) per il dosaggio di $25(\text{OH})\text{D}$ ^{76,77}, che riconosceva ugualmente $25(\text{OH})\text{D}_2$ e $25(\text{OH})\text{D}_3$, ma che, come il precedente, dosava anche altri metaboliti. Perciò i due metodi (DBP e RIA) sovrastimavano i livelli di $25(\text{OH})\text{D}$ di circa il 10-20%.

Solo la tecnica di preparazione dei campioni con cromatografia semplice era in grado di rimuovere possibili interferenze con altri metaboliti della vitamina D e a partire dalla metà degli anni 1970, la cromatografia liquida ad alta risoluzione (HPLC) è stata applicata al dosaggio della vitamina D⁷⁸.

Tale metodo è considerato attualmente il *gold standard*; tuttavia è indaginoso e non è routinariamente utilizzato nei laboratori clinici.

Recentemente lo sviluppo di una tecnica in cromatografia liquida di massa (LC-MS) è stata utilizzata per dosaggio diretto di 25(OH)D nel siero. Questa analisi quantitativa, oggi presente in alcuni laboratori, permette di dosare entrambe le frazioni 25(OH)D₂ e 25(OH)D₃⁷⁹⁻⁸⁰ e di fornire il risultato quantitativo espresso dalla somma delle due molecole.

Del tutto recentemente sono stati messi a punto metodi immunometrici chemiluminescenti, che si basano sull'impiego di anticorpi in grado di dosare contemporaneamente 25(OH)D₂ e D₃; questi ultimi, implementati su analizzatori automatici ad elevata capacità analitica, sono sempre più utilizzati nei laboratori clinici⁸¹.

I due gruppi di metodi, immunometrici e cromatografici, sembrano presentare una buona concordanza di risultati e una ridotta variabilità⁸¹.

LA CARENZA E L'INSUFFICIENZA DI VITAMINA D

La 25(OH)D è il solo metabolita della vitamina D che viene utilizzato per stabilire se un paziente è carente di vitamina D, sufficiente o intossicato, poiché è la maggiore forma circolante di vitamina D e ha una emivita di circa 2-3 settimane. La 1,25(OH)₂D è la forma biologicamente attiva, ma la sua emivita in circolo è di solo di 4-6 ore, i suoi livelli circolanti sono mille volte inferiori a quelli di 25(OH)₂D ed in caso di carenza di vitamina sono normalizzati dall'azione del PTH^{18,82-84}.

Non vi è consenso assoluto sull'intervallo di normalità per 25(OH)₂D. Parte della difficoltà a definire un normale intervallo di riferimento è determinata dalla necessità di reperire centinaia di soggetti normali. Tuttavia, dal momento che è ormai riconosciuto che il 30-50% delle popolazioni sia europea che statunitense sono vitamina D insufficienti o carenti, l'attribuzione di valori normali di 10-55 ng/ml risulta del tutto inadeguata⁸⁵⁻⁸⁸. Chapuy et al.⁸⁹ hanno riferito che i livelli circolanti di 25(OH)₂D sono in funzione dei livelli di PTH. Gli autori hanno osservato che i livelli di PTH aumentano in seguito ai bassi livelli di vitamina D fino ad un *plateau* che raggiunge il *nadir* quando la concentrazione è di 30-40 ng/mL. Un'osservazione analoga è stata fatta da Thomas et al.⁹⁰ e Holick⁸². Sulla base di queste osservazioni, vi è consenso nel ritenere 20 ng/dL la soglia per la carenza e 30 ng/dL la soglia per l'insufficienza, ma tali livelli decisionali non sono ancora stati sottoposti ad una rigorosa valutazione critica, sulla base nei nuovi metodi immunometrici automatizzati del commercio.

VITAMINA D E MALATTIE AUTOIMMUNI

Un rapporto tra deficit di vitamina D e prevalenza di alcune malattie autoimmuni come il diabete mellito di tipo 1 (DM1), la sclerosi multipla (SM), l'artrite reumatoide

(AR), il lupus eritematoso sistemico (LES) è stato ampiamente dimostrato⁹¹⁻⁹⁷. Non solo la vitamina D e suoi analoghi possono prevenire lo sviluppo di malattie autoimmuni, ma possono anche essere utilizzati nel loro trattamento⁹⁶. La supplementazione di vitamina D infatti ha dimostrato di essere terapeuticamente efficace in diversi modelli sperimentali animali, come l'encefalomielite allergica, l'artrite collagene-indotta, il DM1, la malattia infiammatoria intestinale, la tiroidite autoimmune ed il LES⁹⁴.

I bassi livelli sierici di vitamina D presenti in pazienti affetti da patologie autoimmuni potrebbero essere collegati ad altri fattori, oltre che nutrizionali, come la riduzione dell'attività fisica, la diminuita esposizione al sole, l'aumento della frequenza dei polimorfismi dei geni VDR e gli effetti collaterali di farmaci assunti^{95,96}.

Artrite reumatoide. L'AR è malattia autoimmune in cui il processo infiammatorio è sostenuto da linfociti di tipo Th1, che provocano l'attivazione e la proliferazione delle cellule endoteliali e sinoviali, il reclutamento e l'attivazione delle cellule infiammatorie, la secrezione di citochine e proteasi da parte dei macrofagi e delle cellule sinoviali fibroblasto-simili, e la produzione di autoanticorpi⁹⁸.

E' noto che la carenza di vitamina D si associa ad un aggravamento della risposta immunitaria Th1 e il suo possibile ruolo nella patogenesi di AR si basa proprio su prove che mostrano un'aumentata espressione di VDR su macrofagi, condrociti e cellule sinoviali delle articolazioni dei pazienti⁹⁹⁻¹⁰⁰.

La relazione tra i polimorfismi del gene VDR e l'inizio dell'attività AR è stata dimostrata in uno studio in cui pazienti con genotipi BB o Bb per VDR avevano più elevati indici di qualità di vita (*Health Assessment Questionnaire-HAQ*), VES, dose di corticosteroidi e numero di farmaci antireumatici assunti rispetto ai pazienti con il solo genotipo bb¹⁰¹.

Alcuni lavori hanno dimostrato che l'integrazione con la dieta e/o la somministrazione orale di vitamina D impedisce lo sviluppo o il ritardo della progressione dell'artrite; il rischio di sviluppare AR è inversamente correlato alla maggiore assunzione di vitamina D¹⁰².

In realtà non vi è ampio consenso tra gli autori. Infatti, in un ampio studio prospettico, che ha valutato 186.389 donne tra il 1980 ed il 2002, non è stata evidenziata alcuna associazione tra maggiore assunzione di vitamina D e il rischio di sviluppare AR o LES¹⁰³ e, in un altro studio, i livelli sierici basali di vitamina D in 79 donatori di sangue non sono stati differenti tra pazienti che hanno in seguito sviluppato malattia ed il gruppo di controllo¹⁰⁴. Tuttavia, in pazienti con AR trattati con farmaci tradizionali (*Disease Modifying Antirheumatic Drugs*, DMARD) la supplementazione orale con dosi elevate di alfacalcidolo per tre mesi ha ridotto la gravità dei sintomi nel 89% dei pazienti, il 45% dei quali ha raggiunto la remissione completa¹⁰⁵.

Altri studi hanno riportato una relazione inversa tra attività di malattia e concentrazione di metaboliti della vitamina D nei pazienti affetti da artriti infiammatorie¹⁰⁶ e in condizioni basali è stato osservato un rapporto di proporzionalità inversa tra i livelli di vitamina D ed il numero di dolori articolari, indici di attività di malattia (*Disease Activity Score-DAS28*) e PCR. Per ogni aumento di 10 ng/ml di livelli sierici di vitamina D il DAS28 si è ridotto di 0,3 punti ed i livelli di PCR del 25%^{105,106}.

Lupus eritematoso sistemico. Diversi autori hanno dimostrato una maggior prevalenza di carenza di vitamina D nei pazienti con LES rispetto ai soggetti affetti da altre malattie autoimmuni e rispetto ai soggetti sani¹⁰⁷⁻¹⁰⁹.

In uno studio trasversale, Muller et al.¹¹⁰ hanno evidenziato che i livelli di vitamina D sono risultati significativamente inferiori nei pazienti con LES (in media 13 ng/mL) rispetto ai pazienti con AR (24 ng/mL), osteoartrite (32 ng/mL), e controlli sani (27 ng/mL). Huisman et al.¹⁰⁹ hanno osservato che il 50% dei pazienti con LES hanno carenza di vitamina D (< 20 ng/mL).

I pazienti con LES presentano fattori di rischio multipli per deficit di vitamina D. La caratteristica fotosensibilità della malattia e la raccomandazione di applicare protezioni solari, sono responsabili di una più bassa esposizione al sole e di una minore produzione di vitamina D nella pelle. Il trattamento cronico con corticosteroidi e idrossiclorochina sembrano influenzare il metabolismo della vitamina D, anche se i dati non sono ancora così chiari ancora. Inoltre, il grave coinvolgimento renale nella nefrite lupica, può influenzare l'idrossilazione di 25(OH)D nel rene.

La più alta incidenza e la gravità del LES in individui di origine africana è stata ben documentata. Si ritiene che questa sia una conseguenza non solo di fattori genetici ma anche del minore tasso di conversione cutanea secondaria al colore della pelle⁶⁷. È stato osservato che i livelli critici di vitamina D (< 10 ng/mL) sono più comuni nei pazienti con coinvolgimento renale e lesioni cutanee fotosensibili⁹⁸. Pure documentata è l'associazione tra livelli sierici di vitamina D ed il grado di attività di malattia secondo SLEDAI (SLE Disease Activity Index) ed ECLAM (European Consensus Lupus Activity Measure)^{110,111}.

Thudi et al.¹¹² hanno dimostrato che la valutazione funzionale di malattia mediante HAQ modificato e VAS è peggiore nei pazienti con diagnosi probabile o accertata di LES e carenza di vitamina D. Questo stesso studio tuttavia non ha dimostrato un'associazione tra carenza di vitamina D e livelli di autoanticorpi anti-dsDNA. L'associazione tra deficit di vitamina D ed attività di malattia è stata dimostrata in uno studio brasiliano, condotto su 36 pazienti: i livelli di 25(OH)D erano più bassi (media 17,4 ± 12,5 ng/mL) nei pazienti con un'elevata attività di malattia (SLEDAI > 12) rispetto a quelli con attività di malattia lieve (SLEDAI < 3) e nel gruppo di controllo¹¹³. In uno studio spagnolo con 92 pazienti affetti da LES, gli autori hanno osservato bassi livelli di vitamina D (< 30 ng/ml) nel 75% dei pazienti ed una vera carenza (< 10 ng/ml) nel 45% di essi⁹⁷.

Per spiegare la carenza di vitamina D nelle malattie autoimmuni, Carvalho et al.¹¹⁴ hanno indagato la presenza di anticorpi anti-vitamina D nel siero di 171 pazienti con LES: il 4% aveva anticorpi anti-vitamina D, ma i livelli sierici di vitamina D erano simili nei pazienti con o senza tali autoanticorpi e tra le associazioni cliniche laboratoristiche ricercate, la presenza di anticorpi anti-dsDNA è stata l'unica che ha mostrato un forte legame con gli anticorpi anti-vitamina D.

Malattia indifferenziata del connettivo. Zöld et al.¹¹⁵ hanno dimostrato la presenza di una variazione stagionale dei livelli di vitamina D nei pazienti con malattia indifferenziata del tessuto connettivo (UCTD) e che tali livelli erano più bassi in questa popolazione rispetto alla popolazione di controllo. Il 21,7% dei pazienti con UCTD e deficit

di vitamina D ha sviluppato una malattia del connettivo ben caratterizzata, in particolare AR, LES, sindrome di Sjögren e UCTD e i loro livelli di vitamina D erano più bassi rispetto ai pazienti rimasti con malattia indifferenziata, non diagnosticata.

Malattie infiammatorie intestinali. Bassi livelli sierici di vitamina D sono state descritte anche nelle malattie infiammatorie croniche intestinali (IBD). Jahnsen et al.¹¹⁶ hanno osservato deficit di vitamina D nel 27% dei pazienti con malattia di Crohn e nel 15% dei pazienti con colite ulcerosa. Sembra che una combinazione di fattori come la ridotta introduzione con la dieta, il malassorbimento di vitamina D e la ridotta esposizione al sole, siano responsabili della maggiore frequenza di carenza di vitamina D nelle IBD⁹⁴. Nella IBD indotta in vitro mediante somministrazione di IL-10 in topi *knockout*, il deficit di vitamina D accelera la malattia, con sviluppo precoce di diarrea e cachessia e mortalità più elevata. D'altra parte, il trattamento con 1,25(OH)₂D₃ impedisce lo sviluppo di sintomi, oltre a ridurre la progressione e l'attività della malattia⁹⁹.

Sclerosi multipla. Alcuni studi hanno anche dimostrato l'associazione tra deficit di vitamina e SM e il ruolo della vitamina D non solo nella riduzione della percentuale di recidive, ma anche nella prevenzione dello sviluppo di malattia^{117,118}. Il rischio di SM si riduce notevolmente (fino al 40%) in individui caucasici con assunzione di vitamina D. Lo stesso vantaggio non è stato osservato negli individui di discendenza africana ed ispanici¹¹⁷. In uno studio su modelli sperimentali di SM, la somministrazione di vitamina D ha impedito la comparsa di encefalite autoimmune e rallentato la progressione della malattia¹¹⁹.

Diabete mellito di tipo I. Diversi meccanismi effettori che portano alla distruzione delle β-cellule sono coinvolti nella fisiopatologia del DM1, inclusa la presenza di linfociti CD8+ e macrofagi che regolano la differenziazione delle cellule Th1 mediante secrezione di IL-12¹²⁰. In modelli sperimentali su topi non diabetici obesi (topi NOD), il deficit di vitamina D accelera l'insorgenza di DM1¹²¹; invece la supplementazione precoce di 1,25(OH)₂D₃ in questo stesso modello, prima che la infiltrazione di cellule T nel pancreas produca l'insulite autoimmune, impedisce lo sviluppo di diabete¹²². Studi epidemiologici hanno dimostrato che l'integrazione alimentare di vitamina D durante l'infanzia può ridurre il rischio di sviluppare DM1. Uno studio che ha effettuato un follow-up di 30 anni ha osservato una significativa riduzione nella prevalenza di DM1 in bambini che avevano ricevuto supplementazione giornaliera di vitamina D¹²³.

Gastrite autoimmune. È una malattia organo-specifica caratterizzata dalla presenza di anticorpi circolanti contro l'enzima H⁺/K⁺ATPasi, pompa protonica delle cellule parietali (PC), e contro il fattore intrinseco (FI), prodotto di secrezione di PC. La cronica autoaggressione contro questo enzima provoca perdita di cellule parietali e zimogeniche e risulta in una diminuzione della secrezione acida gastrica, ipergastrinemia e anemia da carenza di ferro. In uno stadio più tardivo della malattia insorge l'anemia perniciosa, causata dalla carenza di vitamina B12 che non viene più assorbita dall'intestino per la presenza nel siero e/o nel succo gastrico dei pazienti di autoanticorpi contro il FI. Questa malattia, spesso asintomatica, può causare atrofia della mucosa gastrica e nel 10% dei casi può evol-

vere verso un adenocarcinoma o un tumore carcinoide¹²⁴. Recentemente Antico et al. hanno studiato la concentrazione dell'ormone in un gruppo di pazienti affetti da AIG diagnosticata istologicamente, per verificare se l'ipovitaminosi D si associ anche con questa patologia. I livelli di vitamina D nei pazienti con gastrite autoimmune erano significativamente più bassi rispetto ai pazienti con gastrite non specifica o al gruppo di controllo, supportando l'ipotesi che l'ipovitaminosi D potrebbe costituire un fattore di rischio per lo sviluppo della malattia autoimmune e agire come fattore favorente una più severa aggressione da parte dei linfociti Th1 all'epitelio dello stomaco¹²⁵.

Supplementazione di vitamina D nelle malattie autoimmuni. Sebbene le evidenze cliniche e sperimentali dimostrino che la carenza di vitamina D è un fattore responsabile dell'aumento della prevalenza di specifiche malattie autoimmuni, si sa poco circa gli effetti della supplementazione di vitamina D nella prevenzione e trattamento di tali patologie. La maggior parte degli studi disponibili ha utilizzato modelli sperimentali e tutti hanno dimostrato effetti benefici della supplementazione di vitamina D nel modulare le componenti del sistema immunitario.

Solo piccoli studi controllati sono stati effettuati nell'uomo: questi tuttavia sembrano indicare gli effetti benefici della supplementazione di vitamina D nella prevenzione dello sviluppo di malattie autoimmuni e nella riduzione della gravità di una preesistente malattia. Sulla base di tali evidenze un gruppo di esperti raccomanda di mantenere i livelli di vitamina D in pazienti affetti da malattie autoimmuni al di sopra di 30 ng/mL e il monitoraggio dei livelli circolanti per non superare il limite superiore di sicurezza fissato a 100 ng/ml¹²⁶.

CONCLUSIONI

Numerose osservazioni suggeriscono che la carenza di vitamina D può svolgere un ruolo importante nella regolazione del sistema immunitario e che la vitamina può essere utile nella prevenzione delle malattie immunomediata. Tuttavia ulteriori studi sono necessari per definire lo stato di deficit/insufficienza in determinati gruppi di pazienti, determinare i rischi e i benefici della supplementazione di vitamina D e stabilire frequenza e temporizzazione del monitoraggio.

BIBLIOGRAFIA

1. **Norman AW.** From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health. *Am J Clin Nutr* 2008; 88: 491S-9S
2. **Holick MF, Garabedian M.** Vitamin D: photobiology, metabolism, mechanism of action, and clinical applications. In: Favus MJ (ed). *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. 6th ed. American Society for Bone and Mineral Research, Washington 2006; 129-137
3. **Rojas-Rivera J, De La Piedra C, Ramos A, et al.** The expanding spectrum of biological actions of vitamin D. *Nephrol Dial Transplant* 2010; 25:2850-65
4. **Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E.** Vitamin D. *Am J Physiol Ren Physiol* 2005; 289: F8-F28
5. **Hewison M, Zehnder D, Chakraverty R, Adams JS.** Vitamin D and barrier function: a novel role for extra-renal 1 α -hydroxylase. *Mol Cell Endocrinol* 2004; 215: 31-8
6. **Bises G, Kallay E, Weiland T, et al.** 25-Hydroxyvitamin D3-1 α -hydroxylase expression in normal and malignant human colon. *J Histochem Cytochem* 2004; 52: 985-9
7. **Adorini L, Penna G, Giarratana N, et al.** Dendritic cells as key targets for immunomodulation by vitamin D receptor ligands. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004; 89-90: 437-41
8. **Zehnder D, Bland R, Chana RS, et al.** Synthesis of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ by human endothelial cells is regulated by inflammatory cytokines: a novel autocrine determinant of vascular cell adhesion. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 621-9
9. **Eyles DW, Smith S, Kinobe R, et al.** Distribution of the vitamin D receptor and 1 α -hydroxylase in human brain. *J Chem Neuroanat* 2005; 29: 21-30
10. **Segersten U, Holm PK, Bjorklund P, et al.** 25-Hydroxyvitamin D₃ 1 α -hydroxylase expression in breast cancer and use of non-1 α -hydroxylated vitamin D analogue. *Breast Cancer Res* 2005;7:980-6.
11. **Townsend K, Evans KN, Campbell MJ, et al.** Biological actions of extra-renal 25-hydroxyvitamin D-1 α -hydroxylase and implications for chemoprevention and treatment. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005; 97: 103-9
12. **Segersten U, Correa P, Hewison M, et al.** 25-hydroxyvitamin D(3)-1 α -hydroxylase expression in normal and pathological parathyroid glands. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 2967-72
13. **Evans KN, Bulmer JN, Kilby MD, Hewison M.** Vitamin D and placental-decidual function. *J Soc Gynecol Investig* 2004;11:263-71
14. **Ma JF, Nonn L, Campbell MJ, et al.** Mechanisms of decreased vitamin D 1 α -hydroxylase activity in prostate cancer cells. *Mol Cell Endocrinol* 2004;221:67-74
15. **Bikle DD, Chang S, Crumrine D, et al.** 25 Hydroxyvitamin D 1 α -hydroxylase is required for optimal epidermal differentiation and permeability barrier homeostasis. *J Invest Dermatol* 2004;122:984-92
16. **Griffin MD, Xing N, Kumar R.** Vitamin D and its analogs as regulators of immune activation and antigen presentation. *Annu Rev Nutr* 2003;23:117-45
17. **Norman AW, Mizwicki MT, Okamura WH.** Ligand structure-function relationships in the vitamin D endocrine system from the perspective of drug development (including cancer treatment). *Recent Results Cancer Res* 2003;164:55-82
18. **Holick MF.** Resurrection of vitamin D deficiency and rickets. *J Clin Invest* 2006;116:2062-72
19. **De Luca HF.** Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *Am J Clin Nutr* 2004; 80:1689-96
20. **Holick MF.** Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 2007;

- 357:266-81
21. **Cooke NE, Haddad JG.** Vitamin D binding protein (Gc-globulin). *Endocr Rev* 1989;10:294-307
 22. **Dusso AS, Negrea L, Gunawardhana S, et al.** On the mechanisms for the selective action of vitamin D analogs. *Endocrinology* 1991;128:1687-92
 23. **Takemoto F, Shinki T, Yokoyama K, et al.** Gene expression of vitamin D hydroxylase and megalin in the remnant kidney of nephrectomized rats. *Kidney Int* 2003;64:414-20
 24. **Yamane T, Takeuchi K, Yamamoto Y, et al.** Legumin from bovine kidney: its purification, molecular cloning, immunohistochemical localization and degradation of annexin II and vitamin D-binding protein. *Biochim Biophys Acta* 2002;1596:108-20
 25. **Adams JS, Chen H, Chun RF, et al.** Novel regulators of vitamin D action and metabolism: lessons learned at the Los Angeles zoo. *J Cell Biochem* 2003;88:308-14
 26. **Nykjaer A, Dragun D, Walther D, et al.** An endocytic pathway essential for renal uptake and activation of the steroid 25-(OH) vitamin D₃. *Cell* 1999;96:507-15
 27. **Liu W, Yu WR, Carling T, et al.** Regulation of gp330/megalyn expression by vitamins A and D. *Eur J Clin Invest* 1998;28:100-7
 28. **Brandi L.** 1 α (OH)D₃ One-alpha-hydroxy-cholecalciferol--an active vitamin D analog. Clinical studies on prophylaxis and treatment of secondary hyperparathyroidism in uremic patients on chronic dialysis. *Dan Med Bull* 2008;55:186-210
 29. **Brenza HL, Kimmel-Jehan C, Jehan F, et al.** Parathyroid hormone activation of the 25-hydroxyvitamin D₃-1 α -hydroxylase gene promoter. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:1387-91
 30. **Tsujikawa H, Kurotaki Y, Fujimori T, et al.** Klotho, a gene related to a syndrome resembling human premature aging, functions in a negative regulatory circuit of vitamin D endocrine system. *Mol Endocrinol* 2003;17:2393-403
 31. **Dong X, Lutz W, Schroeder TM, et al.** Regulation of relB in dendritic cells by means of modulated association of vitamin D receptor and histone deacetylase 3 with the promoter. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:16007-12
 32. **Adorini L, Penna G.** Control of autoimmune diseases by the vitamin D endocrine system. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2008;4:404-12
 33. **Norman AW, Mizwicki MT, Norman DPG.** Steroid hormone rapid actions, membrane receptors and a conformational ensemble model. *Nat Rev Drug Discov* 2004;3:27-41
 34. **Pinette KV, Yee YK, Amegadzie BY, Nagpal S.** Vitamin D receptor as a drug discovery target. *Mini Rev Med Chem* 2003;3:193-204
 35. **Brown AJ, Dusso A, Slatopolsky E.** Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol* 1999;277:F157-F175
 36. **Sutton ALM, MacDonald PN.** Vitamin D: more than a "bone-a-fide" hormone. *Mol Endocrinol* 2003;17:777-91
 37. **Strugnell SA, Deluca HF.** The vitamin D receptor--structure and transcriptional activation. *Proc Soc Exp Biol Med* 1997;215:223-8
 38. **Kliwer SA, Umesono K, Mangelsdorf DJ, Evans RM.** Retinoid X receptor interacts with nuclear receptors in retinoic acid, thyroid hormone and vitamin D₃ signalling. *Nature* 1992;355:446-9
 39. **Cheskis B, Freedman LP.** Ligand modulates the conversion of DNA-bound vitamin D₃ receptor (VDR) homodimers into VDR-retinoid X receptor heterodimers. *Mol Cell Biol* 1994;14:3329-38
 40. **Dusso AS, Brown AJ.** Vitamin D: molecular biology and gene regulation. In: Singh AJ, Williams GH (eds). *Textbook of Nephro-endocrinology*. Elsevier, California 2009;69-93
 41. **Nagpal S, Na S, Rathnachalam R.** Noncalcemic actions of vitamin D receptor ligands. *Endocr Rev* 2005;26:662-87
 42. **Oñate SA, Tsai SY, Tsai MJ, et al.** Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science* 1995;270:1354-7
 43. **Chen HW, Lin RJ, Schiltz RL, et al.** Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300. *Cell* 1997;90:569-80
 44. **Chiba N, Suldan Z, Freedman LP, Parvin JD.** Binding of liganded vitamin D receptor to the vitamin D receptor interacting protein coactivator complex induces interaction with RNA polymerase II holoenzyme. *J Biol Chem* 2000;275:10719-22
 45. **Rachez C, Suldan Z, Ward J, et al.** A novel protein complex that interacts with the vitamin D₃ receptor in a ligand-dependent manner and enhances VDR transactivation in a cell-free system. *Genes Dev* 1998;12:1787-800
 46. **Baudino TA, Kraichely DM, Jefcoat SC Jr, et al.** Isolation and characterization of a novel coactivator protein, NCoA-62, involved in vitamin D-mediated transcription. *J Biol Chem* 1998;273:1643-41
 47. **Zhang C, Dowd DR, Staal A, et al.** Nuclear coactivator-62 kDa/Ski-interacting protein Is a nuclear matrix-associated coactivator that may couple vitamin D receptor-mediated transcription and RNA splicing. *J Biol Chem* 2003;278:35325-6
 48. **Dunlop TW, Väisänen S, Frank C, Carlberg C.** The genes of the coactivator TIF2 and the corepressor SMRT are primary 1 α ,25(OH)₂D₃ targets. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004;89-90:257-60
 49. **Adorini L, Penna G.** Dendritic cell tolerogenicity: a key mechanism in immunomodulation by vitamin D receptor agonists. *Hum Immunol* 2009;70:345-52
 50. **Cutolo M.** Vitamin D and autoimmune rheumatic diseases. *Rheumatology* 2009;48:210-2
 51. **van Etten E, Mathieu C.** Immunoregulation by 1,25-dihydroxyvitamin D₃: basic concepts. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005;97:93-101
 52. **Liu PT, Stenger S, Li H, et al.** Toll-like receptor trigge-

- ring of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science* 2006;311:1770-3
53. **Wang TT, Nestel FP, Bourdeau V, et al.** Cutting edge: 1,25-dihydroxyvitamin D3 is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression. *J Immunol* 2004;173:2909-12
 54. **Schauber J, Dorschner RA, Coda AB, et al.** Injury enhances TLR2 function and antimicrobial peptide expression through a vitamin D-dependent mechanism. *J Clin Invest* 2007;117:803-11
 55. **Sigmundsdottir H, Pan J, Debes GF, et al.** DCs metabolize sunlight-induced vitamin D3 to 'program' T cell attraction to the epidermal chemokine CCL27. *Nat Immunol* 2007;8:285-93
 56. **Chen S, Sims GP, Chen XX, et al.** Modulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on human B cell differentiation. *J Immunol* 2007;179:1634-47
 57. **Mattner F, Smioldo S, Galbiati F, et al.** Inhibition of Th1 development and treatment of chronic-relapsing experimental allergic encephalomyelitis by a non-hypercalcemic analogue of 1,25-dihydroxyvitamin D(3). *Eur J Immunol* 2000;30:498-508
 58. **Cippitelli M, Santoni A.** Vitamin D3: a transcriptional modulator of the interferon-gamma gene. *Eur J Immunol* 1998;28:3017-30
 59. **Penna G, Amuchastegui S, Cossetti C, et al.** Treatment of experimental autoimmune prostatitis in nonobese diabetic mice by the vitamin D receptor agonist elocalcitol. *J Immunol* 2006;177:8504-11
 60. **Adorini L, Giarratana N, Penna G.** Pharmacological induction of tolerogenic dendritic cells and regulatory T cells. *Semin Immunol* 2004;16:127-34
 61. **Penna G, Adorini L.** 1 Alpha,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation. *J Immunol* 2000;164:2405-11
 62. **Penna G, Roncari A, Amuchastegui S, et al.** Expression of the inhibitory receptor ILT3 on dendritic cells is dispensable for induction of CD4+Foxp3+ regulatory T cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Blood* 2005;106:3490-7
 63. **Penna G, Amuchastegui S, Giarratana N, et al.** 1,25-dihydroxyvitamin D3 selectively modulates tolerogenic properties in myeloid but not plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* 2007;178:145-53
 64. **Hewison M, Freeman L, Hughes SV, et al.** Differential regulation of vitamin D receptor and its ligand in human monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 2003;170:5382-90
 65. **Adorini L.** Intervention in autoimmunity: the potential of vitamin D receptor agonists. *Cell Immunol* 2005;233:115-24
 66. **Dong X, Lutz W, Schroeder TM, et al.** Regulation of relB in dendritic cells by means of modulated association of vitamin D receptor and histone deacetylase 3 with the promoter. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:16007-12
 67. **Liu YJ.** IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu Rev Immunol* 2005;23:275-306
 68. **Lemire JM, Archer DC, Beck L, Spiegelberg HL.** Immunosuppressive actions of 1,25-dihydroxyvitamin D3: preferential inhibition of Th1 functions. *J Nutr* 1995;125:1704S-8S
 69. **Cippitelli M, Santoni A.** Vitamin D3: a transcriptional modulator of the interferon-gamma gene. *Eur J Immunol* 1998;28:3017-30
 70. **Boonstra A, Barrat FJ, Crain C, et al.** 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 has a direct effect on naive CD4(+) T cells to enhance the development of Th2 cells. *J Immunol* 2001;167:4974-80
 71. **Mahon BD, Wittke A, Weaver V, Cantorna MT.** The targets of vitamin D depend on the differentiation and activation status of CD4 positive T cells. *J Cell Biochem* 2003;89:922-32
 72. **Steinman L.** A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med* 2007;13:139-45
 73. **Gregori S, Giarratana N, Smioldo S, et al.** A 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3) analog enhances regulatory T-cells and arrests autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes* 2002;51:1367-74
 74. **Gregori S, Casorati M, Amuchastegui S, et al.** Regulatory T cells induced by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and mycophenolate mofetil treatment mediate transplantation tolerance. *J Immunol* 2001;167:1945-53
 75. **Chen TC, Turner AK, Holick MF.** Methods for the determination of the circulating concentration of 25-hydroxyvitamin D. *J Nutr Biochem* 1990;1:315-19
 76. **Horst RL, Hollis BW.** Vitamin D assays and their clinical utility. In: Holick MF, ed. *Physiology, molecular biology, and clinical applications*. Humana Press, Totowa 1999;239-71
 77. **Hollis B.** The determination of circulating 25-hydroxyvitamin D: no easy task. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:3149-51
 78. **Jones G.** Assay of vitamin D2 and D3 in human plasma by high performance liquid chromatography. *Clin Chem* 1978;24:287-98
 79. **Holick MF.** Variations in 25-hydroxyvitamin D assay results. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:210
 80. **Guo T, Taylor RL, Singh RJ, Soldin SJ.** Simultaneous determination of 12 steroids by isotope dilution liquid chromatography-photospray ionization tandem mass spectrometry. *Clin Chim Acta* 2006;372:76-82
 81. **Binkley N, Krueger DC, Morgan S, Wiebe D.** Current status of clinical 25-hydroxyvitamin D measurement: an assessment of between-laboratory agreement. *Clin Chim Acta* 2010;411:1976-82
 82. **Holick MF.** High prevalence of vitamin D inadequacy and implications for health. *Mayo Clin Proc* 2006;81:353-73

83. **Bouillon R.** Vitamin D: from photosynthesis, metabolism, and action to clinical applications. In: DeGroot LJ, Jameson JL (eds). *Endocrinology*. WB Saunders, Philadelphia 2001:1009-28
84. **Dawson-Hughes B, Heaney RP, Holick MF, et al.** Estimates of optimal vitamin D status. *Osteoporos Int* 2005;16:713-6
85. **Chapuy MC, Chapuy P, Thomas JL, et al.** Biochemical effects of calcium and vitamin D supplementation in elderly, institutionalized, vitamin D-deficient patients. *Rev Rheum* 1996;63:135-40
86. **Bakhtiyarova S, Lesnyak O, Kyznesova N, et al.** Vitamin D status among patients with hip fracture and elderly control subjects in Yekaterinburg, Russia. *Osteoporos Int* 2006;17:441-6
87. **Larsen ER, Mosekilde L, Foldspang A.** Vitamin D and calcium supplementation prevents osteoporotic fractures in elderly community dwelling residents: a pragmatic population-based 3-year intervention study. *J Bone Miner Res* 2004;19:370-8
88. **McKenna MJ, Freany R.** Secondary hyperparathyroidism in the elderly: means to defining hypovitaminosis D. *Osteoporos Int* 1998; 8 (Suppl): S3-6.
89. **Chapuy MC, Preziosi P, Maaner M, et al.** Prevalence of vitamin D insufficiency in an adult normal population. *Osteoporos Int* 1997;7:439-43
90. **Thomas KK, Lloyd-Jones DH, Thadhani RI, et al.** Hypovitaminosis D in medical inpatients. *N Engl J Med* 1998;338:777-83
91. **Cantorna MT, Mahon B.** Mounting evidence for vitamin D as an environmental factor affecting autoimmune disease prevalence. *Exp Bio Med (Maywood)* 2004;229:1136-42
92. **Lemire JM, Ince A, Takashima M.** 1,25-dihydroxyvitamin D3 attenuates the expression of experimental murine lupus of MRL/l mice. *Autoimmunity* 1992;12:143-8
93. **Linker-Israeli M, Elstner E, Klinenberg JR, et al.** Vitamin D(3) and its synthetic analogs inhibit the spontaneous in vitro immunoglobulin production by SLE-derived PBMC. *Clin Immunol* 2001;99:82-93
94. **Arnson Y, Amital H, Shoenfeld Y.** Vitamin D and autoimmunity: new etiological and therapeutic considerations. *Ann Rheum Dis* 2007;66:1137-42
95. **Leventis P, Patel S.** Clinical aspects of vitamin D in the management of rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 2008;47:1617-21
96. **Szodoray P, Nakken B, Gaal J, et al.** The complex role of vitamin D in autoimmune diseases. *Scand J Immunol* 2008;68:261-9
97. **Ruiz-Irastorza G, Egurbide MV, Olivares N, et al.** Vitamin D deficiency in systemic lupus erythematosus: prevalence, predictors and clinical consequences. *Rheumatology* 2008;47:920-3
98. **Harris Jr ED, Schur PH.** Pathogenesis of rheumatoid arthritis. In: Basow DS (ed). *UpToDate*, Waltham 2007:123-34
99. **Nagpal S, Na S, Rathnachalam R.** Noncalcemic actions of vitamin D receptor ligands. *Endocr Rev* 2005;26:662-87
100. **Manolagas SC, Werntz DA, Tsoukas CD, et al.** 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptors in lymphocytes from patients with rheumatoid arthritis. *J Lab Clin Med* 1986;108:596-600
101. **Gomez-Vaquero C, Fiter J, Enjuanes A, et al.** Influence of the Bsm1 polymorphism of the vitamin D receptor gene on rheumatoid arthritis clinical activity. *J Rheumatol* 2007;34:1823-6
102. **Merlino LA, Curtis J, Mikuls TR, et al.** Vitamin D intake is inversely associated with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2004;50:72-7
103. **Costenbader KH, Feskanich D, Holmes M, et al.** Vitamin D intake and risks of systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis in women. *Ann Rheum Dis* 2008;67:530-5
104. **Nielen MMJ, Schaardenburg D, Lems WF, et al.** Vitamin D deficiency does not increase the risk of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2006;54:3719-24
105. **Andjelkovic Z, Vojinovic J, Pejnovic N, et al.** Disease modifying and immunomodulatory effects of high dose 1a(OH) D3 in rheumatoid arthritis patients. *Clin Exper Rheumatol* 1999;17:453-6
106. **Patel S, Farragher T, Berry J, et al.** Association between serum vitamin D metabolite levels and disease activity in patients with early inflammatory polyarthritis. *Arthritis Rheum* 2007;56:2143-9
107. **Kamen DL, Cooper GS, Bouali H, et al.** Vitamin D deficiency in systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev* 2006;5:114-7
108. **Bultink IE, Lems WF, Kostense PJ, et al.** Prevalence of and risk factors for low bone mineral density and vertebral fractures in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2005;52:2044-50
109. **Huisman AM, White KP, Algra A, et al.** Vitamin D levels in women with systemic lupus erythematosus and fibromyalgia. *J Rheumatol* 2001;28:2535-39
110. **Muller K, Kriegbaum NJ, Baslund B, et al.** Vitamin D3 metabolism in patients with rheumatic diseases: low serum levels of 25-hydroxyvitamin D3 in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol* 1995;14:397-400
111. **Cutolo M, Otsa K.** Review: vitamin D, immunity and lupus. *Lupus* 2008;17:6-10
112. **Thudi A, Yin S, Wandstrat AE, et al.** Vitamin D levels and disease status in Texas patients with systemic lupus erythematosus. *Am J Med Sci* 2008;335:99-104
113. **Borba VZC, Vieira JGH, Kasamatsu T, et al.** Vitamin D deficiency in patients with active systemic lupus erythematosus. *Osteoporos Int* 2009;20:427-33
114. **Carvalho JF, Blank M, Kiss E, et al.** Antivitamin D in SLE: preliminary results. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1109:550-7

115. **Zold E, Szodoray P, Gaal J, et al.** Vitamin D deficiency in undifferentiated connective tissue disease. *Arthritis Res Ther* 2008;10:R123
116. **Jahnsen J, Falch JA, Mowinckel P, Aadland E.** Vitamin D status, parathyroid hormone and bone mineral density in patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 2002;37:192-9
117. **Munger KL, Zhang SM, O'Reilly E, et al.** Vitamin D intake and incidence of multiple sclerosis. *Neurology* 2004;62:60-5
118. **Goldberg P, Fleming MC, Picard EH.** Multiple sclerosis: decreased relapse rate through dietary supplementation with calcium, magnesium and vitamin D. *Med Hypotheses* 1986;21:193-200
119. **Mark BL, Carson JA.** Vitamin D and autoimmune disease-implications for practice from the multiple sclerosis literature. *J Am Diet Assoc* 2006;106:418-24
120. **Salomon B, Lenschow DJ, Rhee L, et al.** B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4⁺ CD25⁺ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity* 2000;12:431-40
121. **Giulietti A, Gysemans C, Stoffels K, et al.** Vitamin D deficiency in early life accelerates Type 1 diabetes in non-obese diabetic mice. *Diabetologia* 2004;47:451-62
122. **Mathieu C, Laureys J, Sobis H, et al.** 1,25-Dihydroxyvitamin D3 prevents insulinitis in NOD mice. *Diabetes* 1992;41:1491-5
123. **EURODIAB study group.** Vitamin D supplement in early childhood and risk for type I (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 1999;42:51-4
124. **Antico A.** La gastrite autoimmune. *RIME/LIJLaM* 2008;4:125-133
125. **Antico A, Tozzoli R, Giavarina D, et al.** Hypovitaminosis D as predisposing factor for atrophic type A gastritis: a case-control study and review of the literature on the interaction of vitamin D with the immune system. *Clin Rev Allergy Immunol* 2011 [Epub ahead of print].
126. **Souberbielle JC, Body JJ, Lappe JM, et al.** Vitamin D and musculoskeletal health, cardiovascular disease, autoimmunity and cancer: recommendations for clinical practice. *Autoimmun Rev* 2010;9:709-715

Per corrispondenza:

Dott. Renato Tozzoli
Dipartimento di Medicina di Laboratorio
Laboratorio di Patologia Clinica,
Azienda Ospedaliera S. Maria degli Angeli
Via Montereale 24, 33107 Pordenone
Tel.: 0434399213 - Fax: 0434399906
email: renato.tozzoli@aopn.fvg.it