

**U.** PORTO



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR  
UNIVERSIDADE DO PORTO

Mestrado Integrado em Medicina

## **Dissertação de Mestrado**

Artigo de Revisão Bibliográfica

# ***Potencial preventivo e terapêutico da Vitamina D na patologia maligna***

AUTOR

***João Afonso Sarmiento Rodrigues***

ORIENTADOR

*José Manuel de Carvalho Tojal Monteiro*

Porto

Julho de 2010

## RESUMO

A patologia maligna é actualmente a 3ª maior causa de morte no mundo e os seus números continuam a crescer anualmente. Várias projecções admitem que, caso não se contrarie esta tendência, o cancro poderá atingir cerca de 75 milhões de pessoas e ser responsável por 13 milhões de mortes no ano de 2030. As medidas preventivas poderão ser a única abordagem fiável para diminuir e a longo prazo reverter este aumento global.

Estima-se que 1 bilião de pessoas no mundo tenha insuficiência ou deficiência de vitamina D, no entanto, esta situação não é para já reconhecida como um problema pela maioria dos médicos e doentes.

A recente demonstração de que a grande maioria dos tecidos do corpo humano apresentam o receptor da vitamina D e que muitos destes possuem o agrupamento enzimático que converte o seu metabolito circulante primário na sua forma activa, motivou na comunidade científica, uma nova atenção sobre as funções desta vitamina. Com o suporte das evidências epidemiológicas verificadas nas últimas décadas de uma associação entre altos níveis serológicos dos metabolitos da vitamina D e uma diminuição da incidência de vários cancros, elaborou-se a hipótese de um eventual potencial preventivo e terapêutico da vitamina D na patologia maligna.

Vários trabalhos experimentais têm demonstrado que os compostos de vitamina D interferem na proliferação, diferenciação e apoptose celular, tanto em células normais como em células malignas; o que tem contribuído para um enorme entusiasmo dentro da comunidade científica sobre diferentes intervenções que possam aproveitar o potencial anti-cancerígeno da vitamina D, entre as quais, incentivo à exposição solar, regime de suplementação ou síntese farmacológica de compostos análogos da vitamina D.

Este artigo faz uma análise de vários trabalhos efectuados nesta área, realizando uma revisão dos dados epidemiológicos e dos mecanismos que suportam o potencial recurso à vitamina D para efeitos preventivos e/ou terapêuticos na patologia maligna.

**Palavras-chave:** “vitamina D”, “cancro”, “prevenção”, “tratamento”, “mecanismos”, “25(OH)D”, “1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D”

## INTRODUÇÃO

As estimativas do impacto da patologia maligna em termos de incidência, prevalência e mortalidade para o ano de 2000 apontavam para 10-11 milhões de novos casos, 6-7 milhões de mortes e 22-25 milhões de pessoas portadoras da doença (Parkin D.M. 2001; Ferlay J. *et al.* 2004 in Boyle P. 2006). Estes valores representavam um aumento de cerca de 22% na incidência e mortalidade desde o último levantamento, no ano de 1990 (Parkin D.M. *et al.* 1990, Pissani P *et al.* 1999 in Parkin D.M. 2001). As previsões desse mesmo ano, indicavam que, mantendo as taxas de incidência, prevalência e mortalidade daquela altura, assistir-se-ia a um aumento de cerca de 25% em cada uma das décadas seguintes e, por volta de 2050, o número de novos casos seria de aproximadamente 24 milhões; o número de mortes atingiria os 10 milhões em 2020 e os 16 milhões em 2050 (Parkin D.M. 2001). Em 2008, as estimativas já registavam 12,4 milhões de novos casos e 7,6 milhões de mortes por doença oncológica (WHO - International Agency for Research on Cancer 2008). Sem uma alteração das actuais taxas de incidência e prevalência, prevê-se que em 2030 a patologia maligna poderá matar mais de 13 milhões de pessoas sendo que, caso estas taxas aumentassem 1%, o número de mortes por Cancro aumentaria para 17 milhões (WHO - International Agency for Research on Cancer 2008). Para o mesmo ano, a projecção de novos casos ronda os 26 milhões (Thun M.J. *et al.* 2010) e o número de portadores de doença maligna atingirá os 75 milhões (Boyle P. 2006).

Actualmente, a patologia maligna é já a 3ª maior causa de morte em todo o mundo (Thun M.J. *et al.* 2010) e o seu impacto nos índices demográficos tem vindo progressivamente a crescer, como se pode avaliar por estas projecções, que apenas sublinham a necessidade de procurar medidas preventivas eficientes, assim como de empenho no contínuo desenvolvimento da eficácia terapêutica (Parkin D.M. 2001).

O cancro é uma doença complexa de apresentação, evolução e prognóstico muito variáveis de doente para doente. Trata-se de um processo de várias etapas, nas quais as células são submetidas a profundas alterações metabólicas e funcionais, conduzindo a uma proliferação excessiva e inoportuna, que escapa à vigilância imunitária e, em última instância, à invasão de tecidos à distância – metastização. (Merlo L.M. 2006)

Os domínios da genética que se relacionam com os processos cancerígenos são inúmeros e extremamente vastos, mas apoiam-se essencialmente em duas vertentes: susceptibilidade genética e genética da célula somática. A primeira concentra-se nas variações do material genético herdado em genes susceptíveis de malignidade e o impacto das mesmas no risco relativo de cancro durante o ciclo de vida. Por contraste, a segunda diz respeito às mutações que surgem em células individuais durante o ciclo de vida e o seu papel na iniciação do processo tumoral e sua progressão (WHO - International Agency for Research on Cancer 2008). Para a maioria das neoplasias, cerca de 25% da diferença de

risco entre indivíduos é atribuída à susceptibilidade genética (Lichtenstein P. *et al.* 2000). Excepto para alguns tipos de neoplasias familiares, como a polipose adenomatosa familiar, o contributo de factores hereditários para o desenvolvimento da patologia maligna é considerado de menor relevância (Li FP. 1995, Easton D.F. 1994, Fearon E.R. 1997 *in* Lichtenstein P. *et al.* 2000). Esta premissa indica que o ambiente desempenha o papel principal na etiologia da patologia maligna esporádica (Lichtenstein P. *et al.* 2000, Parkin D.M. 2001). Sendo a intervenção no campo da genética muito mais limitada a curto-médio prazo, as atenções investigativas deverão centrar-se no impacto das múltiplas variantes e dimensões do ambiente no processo oncológico e nas possibilidades terapêuticas que com esse conhecimento se poderão desenvolver.

Em Fevereiro de 2009, durante uma revisão sobre a associação inversa entre vitamina D, os seus metabolitos e a patologia maligna, foram identificados através da base de dados da *PubMed*, cerca de 3000 estudos sobre esta temática, incluindo 275 estudos epidemiológicos (Garland C.F. *et al.* 2009). A maioria destes estudos epidemiológicos registava uma associação entre elevados níveis séricos de 25(OH)D – biomarcador da concentração sanguínea de vitamina D - e taxas de incidência mais baixas para vários cancros (Garland C. *et al.* 1989, Tangrea J. *et al.* 1997, Ahonen M.H. *et al.* 2000, Feskanich D. *et al.* 2004, Bertone-Johnson E.R. *et al.* 2005, Lowe L.C. *et al.* 2005, Tworoger S.S. *et al.* 2007, Abbas S. *et al.* 2008 *in* Garland C.F. *et al.* 2009).

A investigação oncológica nas últimas três décadas acumulou evidências que favorecem a hipótese de que um “status” pobre em vitamina D esteja associado a um aumento do risco de patologia maligna (Ingraham B.A. *et al.* 2008, Peterlick M. and Cross H.S. 2006 *in* Pilz *et al.* 2009). Isto é de particular importância para a Saúde Pública, considerando a alta prevalência da insuficiência da vitamina D a nível mundial (Holick MF 2007; Norman A.W. *et al.* 2007 *in* Pilz *et al.* 2009). Esta situação, somada à descoberta do risco aumentado de certos tipos de cancro naqueles que são vitamina D-deficientes, sugere que a carência de vitamina D poderá ser responsável por milhares de mortes prematuras anualmente por esses cancros (Garland C.F. *et al.* 2006).

A abordagem da investigação oncológica tem-se centrado historicamente na procura de carcinogêneos, com o intuito de reduzir a exposição aos mesmos. O conceito da vitamina D é o oposto – o défice de exposição é que consiste no factor causal (Garland C.F. and Garland F.C. 2006) e a correcção desse mesmo défice a janela de oportunidade terapêutica.

Para além da situação de carência, tanto 1,25(OH)D como os seus análogos sintéticos demonstraram actividade antiproliferativa, pró-diferenciadora e imunomoduladora em diversos ensaios clínicos e estudos experimentais e estão a ser investigados para o potencial tratamento de muitas condições patológicas, incluindo psoríase, diabetes mellitus tipo 1, artrite reumatóide, esclerose múltipla, doença de Crohn, hipertensão, doenças cardíacas e várias patologias tumorais malignas comuns (M.F. Holick 2006c).

Numa meta-análise realizada em 2007 sobre o possível impacto da suplementação de vitamina D na mortalidade por todas as causas, Autier e Gandini verificaram uma redução na ordem dos 7% na mortalidade total associada à toma de doses entre as 400-830 UI de suplementos de vitamina D (Autier P. and Gandini S. 2007).

A presente revisão bibliográfica expõe algumas das particularidades biológicas da vitamina D que justificam o seu actual destaque na comunidade científica e procura compilar os dados epidemiológicos que alertam para o risco oncológico da sua carência e os mecanismos bioquímicos propostos na literatura internacional que permitem estabelecer a hipótese de, no futuro, vir a recorrer à vitamina D para a prevenção/tratamento da patologia maligna.

## PERSPECTIVA SOBRE A VITAMINA D

**Vitamina D.** As vitaminas são compostos orgânicos que são essenciais, em pequenas quantidades, para o normal metabolismo do organismo (Guyton A.C. and Hall J.E. 2006). No entanto, a vitamina D não é tecnicamente, e ao contrário das outras vitaminas, um factor dietético essencial; ao invés, é uma pró-hormona produzida fotoquimicamente na pele a partir do 7-dihidrocolesterol. A estrutura molecular da vitamina D está intimamente relacionada com as clássicas hormonas esteróides (como estradiol, cortisol ou aldosterona), no sentido em que partilham a mesma estrutura base – um anel de

ciclopentanoperidrofenantreno. Sob o ponto de vista bioquímico, a vitamina D é um secoesteróide porque um dos anéis da sua estrutura não tem a ligação carbono-9-carbono-10 do anel B (Norman A.W. 2008). A designação “vitamina D” serve a um conjunto de compostos, dos quais para além da vitamina D<sub>3</sub> ou colecalciferol - formado na pele após exposição à luz solar ou a radiação ultra-violeta (UV) ou presente em alguns alimentos, se destaca a vitamina D<sub>2</sub> ou ergocalciferol, que é sintetizado nas plantas, também por um processo fotoquímico (Lips P. 2006) e que é utilizada em alguns suplementos dietéticos (Holick M.F. 2007). As duas formas distinguem-se na constituição química das suas cadeias laterais, o que condiciona diferentes capacidades de ligação à respectiva proteína transportadora no sangue – proteína de ligação à vitamina D (*vitamin D binding protein* – DBP) – e diferentes metabolismos, o que em último caso se traduz em diferentes rendimentos na produção de metabolitos activos e, conseqüentemente, no seu efeito biológico. (Bikle D. 2009) Alguns dados que sugeriam que a vitamina D<sub>3</sub> seria substancialmente mais efectiva foram confirmados em posteriores trabalhos (Norman A.W. 2008): num estudo com vinte voluntários saudáveis, verificou-se que a potência da vitamina D<sub>2</sub> é inferior a um terço da potência da vitamina D<sub>3</sub> com base na capacidade para elevar a concentração sérica de 25(OH)D (Norman A.W. 2008) – um dos metabolitos activos e o actual biomarcador de referência. O nível plasmático deste biomarcador reflecte,

assim, a soma das contribuições do metabolismo do colecalciferol sintetizado na pele e o do ergocalciferol que resulta da ingestão dietética, sendo assim um marcador confiável (Peterlik M. *et al.* 2009).

Nos últimos anos, a vitamina D recebeu uma renovada atenção da comunidade científica, principalmente ao nível da saúde pública, pelos seus inesperados múltiplos benefícios (DeLuca H.F. 2008, Bikle D. 2009). Vários estudos ajudaram a constatar que a importância da vitamina D se estende muito para lá do crescimento e mineralização óssea: também desempenha importantes funções na diminuição do risco de várias doenças crónicas (cancro, doenças auto-imunes, doenças infecciosas, doenças cardiovasculares), na regulação das glândulas paratiróides, no sistema imunitário, na pele, no metabolismo xenobiótico, e no desenvolvimento e diferenciação celular (Holick M.F. 2007, DeLuca H.F. 2008, Grant W.B. *et al.* 2009).

**Fontes de Vitamina D.** Os humanos têm três possíveis vias para adquirir vitamina D: através da exposição solar, a partir da sua dieta alimentar ou por suplementos dietéticos (Holick M.F. 2007). Poucos alimentos contêm de forma natural vitamina D; apenas peixe gordo (incluindo salmão, arenque, cavala, sardinha), óleo de fígado de bacalhau, gema de ovo e alguns cogumelos são compostos por vitamina D<sub>3</sub> ou D<sub>2</sub> (Holick M.F. 2006b). Nos Estados Unidos da América (EUA), alguns alimentos são enriquecidos artificialmente em vitamina D, como o leite, alguns cereais, sumo de laranja, alguns iogurtes ou a margarina (Holick M.F.

2006a). Na maioria dos países europeus apenas a margarina e alguns cereais apresentam este reforço (Holick M.F. 2006a). A exposição à radiação solar de comprimento de onda entre os 290 e os 315 nm (dentro da gama da radiação ultravioleta B - UVB) é a principal fonte de vitamina D para a maioria das pessoas (Holick M.F. 2006a): os investigadores estimam que nas populações ocidentais 80 a 95% da vitamina D seja adquirida através deste processo (Holick M.F. 2006b, Prentice *et al.* 2008).

**Metabolismo da Vitamina D.** A irradiação da pele e olhos com UVB desencadeia a fotólise do 7-dihidrocolesterol (ou pré-vitamina D<sub>3</sub>), que integra a constituição destes órgãos em pré-vitamina D<sub>3</sub> (Holick M.F. 2006a, Albert P.J. *et al.* 2009). Uma vez formada, a pré-vitamina D<sub>3</sub> é rapidamente convertida em vitamina D<sub>3</sub> pela temperatura cutânea. É importante salientar que o excesso de radiação UVB não se traduz numa intoxicação, uma vez que os excedentes de vitamina D<sub>3</sub> e pré-vitamina D<sub>3</sub> são fotolisados em fotoprodutos inactivos (lumisterol, taquisterol, supraesteróis I e II e 5,6-transvitamina D<sub>3</sub>) (Bikle D. 2009). Após a sua síntese, a vitamina D cutânea entra em circulação e é transportada para o fígado, ligada à proteína de ligação da vitamina D (Prentice A. *et al.* 2008). O fígado produz esta proteína de ligação, que circula a uma maior concentração que a vitamina D e os seus metabolitos (Prentice A. *et al.* 2008). Tanto a vitamina D<sub>3</sub> sintetizada na pele como a vitamina D proveniente da dieta são

submetidas a duas hidroxilações: a primeira no fígado – onde são convertidas em 25(OH)D, a segunda no rim – dando origem à sua forma biologicamente activa, o 1,25(OH)<sub>2</sub>D (M.F. Holick 2006a). Duas enzimas foram estudadas como sendo responsáveis pela primeira hidroxilação: a enzima mitocondrial hepática CYP27A1 – que se provou não ter um desempenho relevante na produção de quantidades fisiológicas de 25-OH-D<sub>3</sub>, e uma enzima microsomal que parece actuar a nível fisiológico (Bikle D. 2009, DeLuca H.F. 2009). Estas enzimas são principalmente, mas não exclusivamente, encontradas no fígado (Bikle D. 2009). Em qualquer caso, a hidroxilação do carbono-25 não parece ser uma etapa rigorosamente regulada na activação da vitamina D, sendo que parece servir mais para reflectir o status de vitamina D do organismo, uma vez que a sua produção é essencialmente substrato-dependente; daí que a medição de 25-OH-D<sub>3</sub> seja universalmente aceite como um dos melhores biomarcadores para determinar o status de doentes ou populações (Bikle D. 2009, DeLuca H.F. 2009). Após a primeira hidroxilação, o 25(OH)D circula na sua grande maioria complexado com a DBP (apenas 0,04% circula livre no plasma - do restante, 85-88% circula associado à DBP e 12-15% associado à albumina) pelo que, dado o seu relativamente longo tempo de semi-vida de 2-3 semanas, funciona como reservatório dos metabolitos biologicamente activos da vitamina D (Prentice et al. 2008, Campbell F.C. et al 2010). Para ser totalmente activo, o 25(OH)D tem de ser convertido em 1α,25(OH)<sub>2</sub>D

através da acção de uma enzima mitocondrial do P450, a CYP27B1 ou 1α-hidroxilase (Bikle D. 2009) – transformação que ocorre principalmente no rim (Peterlik M et al. 2009). Esta produção de 1α,25(OH)<sub>2</sub>D mediada pela enzima CYP27B1 no túbulo proximal renal é rigorosamente regulada pela PTH e pelos níveis séricos de cálcio e fósforo (Holick M.F. 2007). O factor de crescimento de fibroblastos 23 (FGF-23), secretado pelo osso, promove a interiorização do co-transportador sódio-fosfato pelas células tubulares renais e enterócitos, suprimindo assim a síntese de 1α,25-dihidroxitamina D, e integrando, embora de forma indirecta, a regulação da sua produção (Holick M.F. 2007). O tempo de semi-vida do metabolito 1α,25(OH)<sub>2</sub>D é de apenas 4-6 horas (Prentice et al. 2008). A sua degradação e eliminação são, em grande parte, responsabilidades da 24-hidroxilase (também conhecida por CYP24A1), que não só promove a sua conversão em 24,25(OH)<sub>2</sub>D como também conduz à sua transformação em ácido calcitriólico, que depois é eliminado através da via biliar (DeLuca H.F. 2009). Esta enzima é induzida pelo próprio 1α,25(OH)<sub>2</sub>D e seus análogos através do receptor da vitamina D (VDR) (DeLuca H.F. 2009).

#### **Actividade biológica da vitamina D.**

Apesar dos enormes esforços em identificar alguns dos 33 metabolitos da vitamina D (DeLuca H.F. 2009), o 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> parece ser a sua forma biologicamente funcional, embora alguns investigadores também advoguem o 24,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub> como um metabolito activo (DeLuca H.F. 2009).

O  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$  circulante é fundamental para a homeostase sistêmica de cálcio e fósforo, ao participar na regulação dos fluxos iônicos nos seus clássicos órgãos-alvo: intestino delgado, rim e osso (Peterlick M. et al. 2009). A vitamina D participa no processo de mineralização óssea ao promover a elevação das concentrações séricas de cálcio e fósforo que, em última instância, resulta na mineralização esquelética por um lado e, por outro, na prevenção da tetania hipocalcêmica (DeLuca H.F. 2009). Nos enterócitos do intestino delgado acciona o transporte activo do cálcio contra o gradiente de concentração e o transporte activo de fosfato; quando a ingestão cálcica é insuficiente, o metabolito biologicamente activo da vitamina D estimula, em acção conjunta com a PTH, a reabsorção óssea mediada pelos osteoclastos e a reabsorção renal de cálcio no túbulo distal, uma vez mais na presença de PTH (DeLuca H.F. 2009).

A vitamina D exerce os seus efeitos biológicos através de dois tipos de mecanismos. O mecanismo é semelhante ao de outras hormonas esteróides e é mediado pela sua ligação ao receptor – *Vitamin D Receptor* (VDR). O VDR é um membro da superfamília dos receptores hormonais nucleares que inclui os receptores das hormonas esteróides, tiroideias e do ácido retinóico. O VDR funciona como um heterodímero, geralmente complexado com o receptor X retinóico, regulando os genes-alvo da vitamina D (Bikle D. 2009). Estes complexos interagem com sequências específicas de DNA, os *Vitamin D*

*Response Elements* (VDREs), que integram habitualmente a região promotora dos genes-alvo, resultando na activação ou repressão da sua transcrição (in Bikle D. 2009), processos que geralmente levam horas ou dias a concretizarem-se – processos genómicos. Por outro lado, o  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$  pode exercer as suas funções com mecanismos mais rápidos, através de um receptor presente na membrana plasmática e segundos mensageiros como a MAP-cinase ou AMP cíclico – processos não-genómicos, influenciando por exemplo os canais de cálcio (Lips P. 2006). As respostas rápidas através de segundos mensageiros incluem também efeitos nas células  $\beta$  do pâncreas, no tecido muscular liso vascular, no intestino ou em monócitos (Lips P. 2006). De notar que tanto a vitamina D não hidroxilada como o  $25(\text{OH})\text{D}$  que têm uma insignificante ou nula interacção com o VDR e como tal não induzem directamente respostas biológicas (Prentice et al. 2008).

A descoberta de que a maioria dos tecidos e células do organismo humano apresentam o receptor da vitamina D (células das glândulas paratiróides, queratinócitos, pró-mielócitos, monócitos, linfócitos, células dos ovários, células das ilhotas do pâncreas, ...) e que muitas possuem a maquinaria enzimática necessária para converter a forma primária da vitamina D nos seus metabolitos activos, providenciou novas descobertas sobre a função desta vitamina. As investigações nesta área mostraram que 36 tecidos possuem definitivamente o receptor VDR e que a enzima que converte o  $25(\text{OH})\text{D}$  em

$1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$ , está presente em pelo menos 10 tecidos, para além do túbulo proximal renal (Norman A.W. 2008). Os reguladores da actividade da  $1\alpha$ -hidroxilase nos vários tecidos extra-renais não estão ainda bem determinados, no entanto não parece existir relação com a PTH ou  $\text{Ca}^{2+}$  (Giovanucci E. 2005). Assim, as células que expressam de forma funcional esta enzima têm a possibilidade de produzir concentrações locais da forma activa da vitamina D e, deste modo, gerar respostas biológicas de modo autócrino e parácrino mediadas pela hormona D, de forma independente do eixo de controlo do metabolismo ósseo (PTH,  $\text{Ca}^{2+}$ ). Acredita-se que o metabolito  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  gerado desta forma não é colocado em circulação, não interferindo portanto com os níveis séricos de forma mensurável (Norman A.W. 2008).

O metabolito  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$  e os seus análogos sintéticos (designados colectivamente por ligandos do VDR) demonstraram uma panóplia de acções biológicas quando produzidas de modo autócrino/parácrino, nomeadamente relacionadas com a regulação da secreção hormonal, regulação da função imunológica e, de acordo com resultados obtidos em sistemas experimentais, actividade antiproliferativa, pró-diferenciadora e imunomoduladora, em muitos órgãos e sistemas celulares que expressam a enzima  $25(\text{OH})\text{D}$ - $1\alpha$ -hidroxilase e o VDR (Holick M.F. 2006a, Bikle D. 2009, Peterlick M. *et al.* 2009).

Parece existir uma hierarquização da utilização da vitamina D pelo organismo. Em

primeiro lugar, o organismo mantém o cálcio iónico extracelular entre os limites fisiológicos, de modo a manter a transdução de sinal e a maioria das suas funções metabólicas, através da sua acção no intestino, rim e osso. Apenas quando a requisição de cálcio extracelular está assegurada é que o  $25(\text{OH})\text{D}$  será convertido periféricamente para actuar localmente. Após o desempenho de todas as funções autócrinas, o metabolito  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$  induz a sua própria destruição ao promover a expressão de CYP24A1. Deste modo, o metabolito nunca deixa os tecidos não-calcémicos para integrar a corrente sanguínea e assim influenciar o metabolismo do cálcio (Holick M.F. 2006b). Desta hierarquização também se depreende que o determinante crítico para a regulação da proliferação celular é a concentração de  $25(\text{OH})\text{D}$  e não os níveis séricos do metabolito activo  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$ . Perante baixas concentrações séricas de  $25(\text{OH})\text{D}$ , a actividade da enzima  $25(\text{OH})\text{D}$ - $1\alpha$ -hidroxilase pode não ser suficiente para a manutenção dos níveis tecidulares necessários para assegurar uma eficiente regulação autócrina/parácrina do crescimento e função celular (Peterlik M. *et al.* 2009). Assim, as funções endócrinas, em especial a regulação do cálcio e fósforo séricos, dependem dos níveis circulantes de calcitriol; no entanto, a partir de uma série de modelos de animais e sistemas biocelulares, parece que estas concentrações de calcitriol não são suficientes para suportar os efeitos regulatórios e imunes que compõem a função autócrina do sistema

da vitamina D. Estas quantidades são sintetizadas intracelularmente a partir do 25(OH)D, tecido a tecido (Lappe *et al.* 2007).

**Carência de vitamina D.** Embora não exista consenso sobre o nível sérico ótimo de 25-hidroxivitamina D, a deficiência de vitamina D é definida pela maioria dos peritos para uma concentração inferior a 20 ng.mL<sup>-1</sup> (50 nmol.L<sup>-1</sup>) (Holick M.F. 2007). Nesta situação, a produção renal de 1,25(OH)<sub>2</sub>D é extremamente limitada pelo défice de substrato, resultando numa diminuição na absorção intestinal de cálcio e com o raquitismo e atraso de crescimento nas crianças ou osteopenia e osteoporose nos adultos como possíveis consequências (Holick M.F. and Chen T.C. 2008). Tendo por base estudos relacionados com o metabolismo ósseo, níveis de 21 a 29 ng.mL (51-74 nmol.L<sup>-1</sup>) podem ser considerados como uma insuficiência relativa e um nível de 30 ng.mL<sup>-1</sup> (75 nmol.L<sup>-1</sup>) ou maior indica um *status* suficiente (Holick M.F. 2007). A intoxicação por vitamina D é observada quando os níveis séricos excedem os 150 ng.mL<sup>-1</sup> (375 nmol.L<sup>-1</sup>). A toxicidade poderá resultar em hipercalcemia, nefrocalcinose, calcificação aórtica e outros depósitos indesejados de cálcio e fósforo nos tecidos moles (DeLuca H.F. 2008).

De acordo com estas definições, estima-se que 1 bilião de pessoas no mundo tenha insuficiência ou deficiência de vitamina D (Holick M.F. 2007). De acordo com diversos trabalhos, 40 a 100% dos idosos nos E.U.A. e Europa que vivem na comunidade (e não em lares) são deficientes em vitamina D (Holick

M.F. 2007). Mais de 50% das mulheres pós-menopausa a fazer medicação para osteoporose têm níveis subótimos de 25-hidroxivitamina D – abaixo dos 30 ng.mL<sup>-1</sup> (75 nmol.L<sup>-1</sup>) (Holick M.F. 2007). A proporção da população geral que apresenta um nível de 25(OH)D abaixo do valor desejável (<30 ng.mL<sup>-1</sup> ou <75 nmol.L<sup>-1</sup>) é de 73% nos EUA (Peterlick M. *et al.* 2009) e de 84-87% na Europa (Peterlick M. *et al.* 2009). No entanto, com a evidência acumulada sobre os seus efeitos extra-esqueléticos, a vitamina D não pode mais ser encarada apenas como um nutriente necessário para a prevenção das patologias ósseas mas sim como factor essencial para a saúde geral do organismo (Holick M.F. 2004) e, como tal, os níveis necessários para otimizar os seus benefícios para a saúde serão provavelmente maiores do que previamente se pensava (Holick M.F. 2006) e deverão ter em atenção todos os objectivos da actividade biológica da vitamina D (Bischoff-Ferrari H.A. *et al.* 2006). Numa análise de alguns trabalhos, tendo já em atenção as “novas” funções da vitamina D, Norman refere que um nível ótimo de vitamina D estaria associado a concentrações de 25(OH)D circulantes superiores a 40 ng.mL<sup>-1</sup> (100 nmol.L<sup>-1</sup>) (Norman A.W. 2008).

O 25(OH)D circulante é alvo de uma regulação muito menos rigorosa que o 1,25(OH)<sub>2</sub>D; existem vários factores que contribuem para a sua variância e que assim estão relacionados com a insuficiência/deficiência pandémica de vitamina D (Giovannucci E. 2005). Factores físicos

que atenuam a exposição a UVB, incluindo vestuário e protectores solares, reduzem marcadamente a sua produção cutânea (Holick M.F. 2006c). Para latitudes acima dos 37°N e abaixo dos 37°S, a luz solar é insuficiente para induzir a síntese cutânea durante os meses de Inverno (Holick M.F. 2006c). A elevada prevalência de osteomalácia nas mulheres da Arábia Saudita, de raquitismo nas crianças sauditas e os défices de vitamina D apresentados por estes grupos, podem ser atribuídos à prática cultural de utilizar peças de vestuário que cobrem a totalidade do corpo e que assim impedem o contacto directo da pele com a radiação solar. Os factores biológicos que também diminuem a biodisponibilidade de vitamina D incluem a pigmentação cutânea, alguns fármacos, o percentual de massa gorda, distúrbios de absorção de gorduras (Holick M.F. 2006c), a ingestão de vitamina A (Giovannucci E. 2005), a doença crónica renal (Holick M.F. 2007) e a idade (Holick M.F. 2006c). O aumento da pigmentação cutânea pode reduzir a produção cutânea até 99,9% (Holick M.F. 2006c), já que a melanina actua como um eficaz filtro de radiação UVB; assim, um indivíduo de pele escura, poderá necessitar de uma exposição à radiação UVB 10-50 vezes maior do que um indivíduo de pele clara para produzir quantidade equivalente de vitamina D (Giovannucci E. 2005). Algumas drogas (como anticonvulsivos, corticosteróides, rifampina e colestiramina) podem afectar adversamente o metabolismo ou a biodisponibilidade da vitamina D (Holick M.F. 2006). Alguns estudos recentes mostraram

que o índice de massa corporal (IMC) e o percentual de massa gorda estão inversamente relacionados com os níveis séricos de 25(OH)D e directamente relacionados com os níveis de PTH (Holick M.F. 2006c), o que poderá ser justificado pelo sequestro de vitamina D pelos compartimentos de tecido adiposo corporal (Giovannucci E. 2005, Holick M.F. 2006c). Doentes com síndromes de má absorção como doença celíaca, fibrose cística ou doença de Crohn, estão em risco elevado de deficiência de vitamina D (Holick M.F. 2006c). Os mecanismos celulares mediados pelos metabolitos da vitamina A e da vitamina D pressupõem a conjugação com os respectivos receptores e a complexação dos mesmos com receptores retinóides. Como a actividade de ambas as vitaminas requer proteínas de receptores retinóide X (RXR), doses altas de vitamina A poderão antagonizar as acções da vitamina D (Giovannucci E. 2005). Os doentes com doença crónica renal em estadio 4 ou 5 e uma taxa de filtração glomerular inferior a 30 mL.1.73m<sup>-2</sup> de área corporal, assim como os doentes que necessitam de diálise, são incapazes de produzir níveis suficientes de 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D (Holick M.F. 2007). Entre os doentes idosos, múltiplos factores contribuem para a insuficiência de vitamina D, incluindo as deficiências dietéticas e a diminuição da capacidade de sintetizar vitamina D, independentemente da época do ano, na pele: um homem de 70 anos sintetiza quatro vezes menos vitamina D que um de 20 anos (Holick M.F. 2006c).

Estima-se que os suplementos de vitamina D poderão prevenir a sua deficiência em aproximadamente 98% da população geral (Holick M.F. 2006c). A suplementação e a exposição à luz solar natural ou simulada aumentam a concentração de 25(OH)D circulante nos idosos de acordo com alguns trabalhos (Holick M.F. 2006c). Um relatório do *Scientific Committee for Food* realizado pela Comissão Europeia, indicou que adultos com 65 anos ou mais deveriam receber 400 UI diárias (ou 10 µg) de vitamina D<sub>3</sub> e sugeriu que a quantidade necessária para todos os adultos, incluindo aqueles com exposição solar inadequada, deveria ser calculada de acordo com o consumo dietético (Holick M.F. 2006c). Esta recomendação vai de encontro às directrizes propostas pelo organismo norte-americano FDA (*Food and Drug Administration*), que aconselham um suplemento na ordem dos 400 UI diárias independentemente da idade (Holick M.F. 2006c). Como tem sido sugerido que quantidades até 1000 UI/dia poderão ser necessárias para manter a concentração sérica de 25(OH)D num valor superior aos 30 ng.L<sup>-1</sup> (75 nmol.L<sup>-1</sup>), a ingestão de 400 UI/dia poderá representar a dose mínima, em especial durante o Inverno ou nos casos de crianças e adultos não expostos à radiação UVB (Holick M.F. 2006c).

## VITAMINA D E O RISCO DE CANCRO

### *Vitamina D, radiação UVB e cancro.*

Vários estudos epidemiológicos têm demonstrado que o *status* em vitamina D,

influenciado pela latitude, exposição à radiação UV solar e pela ingestão dietética de vitamina D, está inversamente relacionado com a incidência de alguns cancros (Chiang K.C. and Chen T.C. 2009).

Em 1941, Frank L. Apperly publicou os primeiros resultados que apontavam para uma associação entre a radiação solar e a mortalidade por cancro, concluindo que a exposição à luz solar poderia reduzir a incidência da patologia maligna; no entanto, o seu trabalho não suscitou maior interesse naquela altura. Em 1980, Garland e Garland foram os primeiros na literatura moderna a lançar a hipótese de que baixos níveis de radiação UVB, e consequentemente reduzidos níveis de 25(OH)D, eram factores de risco para mortalidade por cancro (com base na premissa de que a vitamina D é formada na pele aquando da exposição à radiação UVB solar) (Pilz *et al.* 2009). Numa revisão efectuada em 2009 por Grant e Mohr dos trabalhos realizados neste âmbito a partir de 2000, foi identificada uma associação inversa entre radiação UVB e a incidência e mortalidade de cancro para 19 origens cancerígenas (Grant WB and Mohr SB 2009). Grant *et al.* mostraram que mesmo após considerar factores confusionais como consumo etílico, descendência hispânica, residência urbana/rural, nível económico e hábitos tabágicos, 13 origens cancerígenas continuavam a demonstrar uma associação inversa com a radiação UVB: bexiga, mama, cólon, esófago, vesícula biliar, estômago, ovário, pâncreas, próstata, recto, rim, corpo uterino e linfoma de Hodgkin (Grant

W.B. and Garland C.F. 2006). Por exemplo, no estudo norte-americano NHANES III (*Third National Health and Nutrition Examination Survey*), as mulheres com uma maior exposição à radiação UVB solar tinham apenas metade da incidência de cancro da mama comparativamente com aquelas com menor exposição; enquanto que os homens, numa outra sondagem nos EUA, com maior exposição solar apresentaram apenas metade da incidência de cancro prostático fatal em relação aos restantes (Garland C.F. *et al.* 2009). Em 2006, Giovannucci *et al.* foram os primeiros a apresentar resultados de um estudo prospectivo entre os níveis de 25(OH)D e a mortalidade por cancro, ao analisar dados do estudo *Health Professionals Follow-Up Study* (HPFS). Neste estudo, com um total de 47800 homens, em 1095 foram medidos os níveis circulantes de 25(OH)D e para os restantes estes valores foram estimados a partir de determinantes da concentração sérica do biomarcador (ingestão de vitamina D, pigmentação cutânea, área geográfica de residência, exposição solar, IMC). Durante o período de *follow-up* ocorreram 4286 carcinomas e 2025 mortes por cancro. Após ajustamento a possíveis factores confusionais, um aumento de 25 nmol.L<sup>-1</sup> dos níveis estimados foi associado a reduções de 17% na incidência total de cancro e de 29% na mortalidade total por cancro. Gorham e os seus colaboradores, ao quantificarem a relação inversa entre a concentração sérica de 25(OH)D e o risco de cancro cólon-rectal, calcularam uma redução de 50% no risco de

cancro para concentrações séricas iguais ou superiores a 80 nmol.L<sup>-1</sup> (Lappe *et al.* 2007). Está também relatado que o risco para desenvolver cancro da próstata ou mama diminui em cerca de 30-50% se as concentrações séricas médias de 25(OH)D excederem os 50 nmol.L<sup>-1</sup> (Chiang K.C. and Chen T.C. 2009).

As demonstrações da ubiquidade do VDR, da presença da enzima 25(OH)D-1 $\alpha$ -hidroxilase (CYP27B1) em vários tecidos e a capacidade destes mesmos tecidos produzirem concentrações locais de 1 $\alpha$ -25(OH)<sub>2</sub>D sem influência da PTH e Ca<sup>2+</sup>, vieram reforçar as evidências acumuladas através de estudos ecológicos e geográficos.

Apesar da crescente evidência de que um melhor status de vitamina D esteja associado a uma redução do risco de cancro, esta hipótese tem sido encarada com algum cepticismo pela comunidade científica (Grant W.B. and Boucher B. 2009), aguardando-se por novos ensaios clínicos que ajudem a generalizar a aceitação destas relações para se avançar para intervenções clínicas.

**VDR, polimorfismos e cancro.** Os últimos trabalhos estimam que o VDR pode regular a expressão de mais de 913-6000 genes, regulando directa ou indirectamente cerca de 3% do genoma humano (Albert P.J. *et al.* 2009, Holick M.F. 2009, Pilz S. *et al.* 2009). O número elevado de genes regulados pelo VDR reflecte indubitavelmente a consequência da larga distribuição tanto do VDR como da enzima 25(OH)D<sub>3</sub>-1 $\alpha$ -hidroxilase em vários órgãos (Norman A.W. 2008). Grande parte do conhecimento do VDR está ainda para ser

esclarecida; a literatura é ainda bastante confusa, mas parece já estabelecido que alguns tecidos não expressam o receptor em quantidades suficientes para desempenharem um papel substancial, enquanto outros expressam o mesmo receptor de forma descontrolada (DeLuca H.F. 2008). Foram já determinados dois factores que condicionam a expressão do VDR: o cálcio e o  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$  são ambos necessários para a máxima expressão do receptor tanto nos rins como nas glândulas paratiróides (DeLuca H.F. 2008). No entanto, não é ainda claro se a mesma situação se verifica para os outros tecidos, sabendo-se porém que uma dieta sem cálcio e sem vitamina D tem apenas um pequeno efeito na expressão do receptor no duodeno – local de maior concentração do mesmo (DeLuca H.F. 2008).

As variações genéticas que codificam o VDR – os polimorfismos de VDR - têm sido associadas a diferentes riscos para o desenvolvimento e prognóstico de vários cancros (Holick M.F. 2006a, Köstner K. *et al.* 2009). Para o VDR humano já foram descritos mais de 470 polimorfismos; a sua distribuição e frequência são altamente variáveis entre as diversas etnias (Davis C.D. 2008). Dentro dos diversos genótipos de VDR mais estudados (*Cdx2*, *FokI*, *BsmI*, *ApaI* ou *TaqI*), aquele que parece ser mais importante para a incidência da patologia maligna é o *BsmI* (Garland *et al.* 2006), que apresenta 3 variantes: BB, Bb e bb. O genótipo bb está presente em 35% da população dos EUA (Garland *et al.* 2006) e está associado a baixas concentrações de

$1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$ . Homens com o genótipo bb registam o dobro da incidência de cancro do cólon em relação áqueles com o genótipo BB (Garland *et al.* 2006). Entre os homens com níveis séricos de  $25(\text{OH})\text{D}$  baixos, aqueles que apresentam um genótipo bb têm uma taxa de incidência de cancro da próstata mais de duas vezes superior aos restantes (Garland *et al.* 2006). No cancro da mama, as mulheres com o genótipo bb têm um risco 2 vezes superior e uma probabilidade 4 vezes maior de desenvolver metástases do que mulheres com o genótipo BB (Garland *et al.* 2006). Mas os polimorfismos estão também associados a formas mais severas de malignidade, como serve de exemplo o *TaqI* e as suas três formas TT, Tt e tt. Homens com um genótipo TT apresentam uma probabilidade 5 vezes superior de vir a desenvolver uma forma grave de carcinoma prostático (grau de Gleason  $\geq 5$ ) que aqueles que têm outro genótipo (Garland *et al.* 2006). Os casos de cancro da mama associados a um genótipo TT são 2 vezes mais prováveis de ter metástases linfáticas (Garland *et al.* 2006). Existe ainda, na actual literatura, evidência de uma associação sólida entre polimorfismos de VDR (*FokI*) e o risco de cancro de mama, próstata e melanoma maligno; bem como uma forte associação com o prognóstico desfavorável do cancro da próstata (*FokI*), mama (*BsmI*, *TaqI*), melanoma maligno (*BsmI*) e do carcinoma de células renais (*TaqI*). Outras associações significativas têm sido descritas entre outros polimorfismos e outras patologias malignas,

no entanto, a maioria tem apresentado resultados contraditórios.

Parece provável que interações do próprio VDR com outros factores, como o consumo de cálcio e vitamina D, níveis plasmáticos de 25(OH)D e a exposição à radiação UV, desempenhem um papel decisivo na ocorrência da patologia maligna e, portanto, não devem ser subestimadas (Köstner K. *et al.* 2009, Davis C.D. 2008) devendo ser feito um investimento científico no sentido de aprofundar o conhecimento sobre estas interações genes-ambiente.

## **MECANISMOS PROPOSTOS PARA ACTIVIDADE ANTI-TUMORAL DA VITAMINA D**

Na base de muitas das acções não relacionadas com o metabolismo cálcio-fosfato da hormona D, incluindo efeitos na carcinogénese, função imune, doenças auto-imunes e distúrbios cardiovasculares, está a capacidade dos compostos de vitamina D inibirem a proliferação celular (Samuel S. and Sitrin M.D. 2008). Tem sido demonstrado, de modo altamente específico, que estes compostos alteram a proliferação celular através de múltiplos mecanismos, com maior evidência para efeitos na progressão do ciclo celular, apoptose e diferenciação (Samuel S. and Sitrin M.D. 2008). Em muitos casos, a associação ligando-VDR induz ou suprime directamente a transcrição de genes-chave para a regulação do crescimento celular; noutras situações, a vitamina D de algum modo influencia

indirectamente o ciclo celular, a apoptose e/ou diferenciação ao interagir com outros importantes reguladores transcricionais ou sistemas de sinalização celular (Samuel S. and Sitrin M.D. 2008).

Em 1982, Suda *et al.* notaram que ratos com leucemia sobreviviam por mais tempo se tratados com um análogo de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$  (Holick M.F. 2006c); no mesmo ano Tanaka *et al.* mostraram que em células leucémicas humanas e de ratos que expressavam VDR o crescimento era inibido e a diferenciação em macrófagos maduros era estimulada quando as mesmas eram tratadas com  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$  (Tanaka H. *et al.* 1982 *in* Holick M.F. 2006). Estudos com ratos manipulados geneticamente para não apresentarem o receptor VDR revelaram que as vias de sinalização hormona D/VDR desempenhavam um importante papel no crescimento de tecidos normais - a título de exemplo: ratos sem VDR apresentaram um desenvolvimento lobuloalveolar do tecido mamário e expressão precoce de caseína durante o período de gravidez e demonstraram uma involução atrasada após a lactação; ratos sem VDR também apresentaram uma proliferação e actividade mitótica epitelial aumentada ao nível do cólon descendente (Deeb K.K. *et al.* 2007, Samuel S. and Sitrin M.D. 2008). Estes trabalhos vieram sugerir um papel para o  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$  na supressão tumoral (Deeb K.K. *et al.* 2007).

A proliferação e diferenciação celular são controladas por uma regulação transcripcional de um grande subconjunto do genoma humano. Estudos utilizando técnicas de

*microarray analysis* revelaram que os *transcriptomes* das células normais e tumorais apresentam diferenças substanciais, sugerindo que, no processo maligno, a perda do controlo preciso da transcrição deve-se à hiperactividade de oncogenes e perda de função de genes supressores tumorais (Carlberg C. and Seuter S. 2009).

**Interferência de  $1\alpha,25(OH)_2D$  na proliferação celular.** A perturbação do ciclo celular é central na actividade antiproliferativa mediada pelo  $1\alpha,25(OH)_2D$  nas células tumorais. O efeito mais comumente relatado tem sido a interrupção do ciclo celular na fase G0/1 para S (Samuel S. and Sitrin M.D. 2008). A progressão do ciclo celular é mediada por ciclinas tipo-D e a sua associação a ciclinas dependentes de cinases (Cdk) e inibidores das ciclinas dependentes de cinases (CdkI) (Chiang K.C. and Chen T.C. 2009). Para a transição da fase G1 para a fase S, as ciclinas tipo-D complexam-se com Cdk4 ou Cdk6 para formarem cinases activas que fosforilam e activam proteínas da família do retinoblastoma (Rb). No estado hiperfosforilado as proteínas Rb libertam os factores de transcrição E2F que activam a transcrição de muitos genes necessários à replicação de DNA, à mitose e ao controlo da transição de fases tardias do ciclo celular; já no estado de hipofosforilação, as proteínas Rb inibem o crescimento celular ao sequestrarem os factores E2F (Samuel S. and Sitrin M.D. 2008). Os CdkI's, como o p21 e/ou p27, têm VDRE's nas suas regiões promotoras e, como tal, são alvos genómicos dos complexos  $1\alpha,25(OH)_2D/VDR$

em muitos tipos celulares, induzindo a desfosforilação das proteínas Rb e, conseqüentemente, a interrupção do ciclo celular (Chiang K.C. and Chen T.C. 2009). Está também descrita a alteração mediada pelos compostos da vitamina D de outras proteínas reguladoras do ciclo celular, como as proteínas INK4, p53, p21-cinase activada 1, em muitos tipos celulares. Nas células de leucemia mielóide, o calcitriol induz a expressão de HOXA10 que também promove a interrupção em G1 (Samuel S. and Sitrin M.D. 2008); em células malignas do cólon, a vitamina D inactiva a cinase p70-S6, essencial para a transição G1-S (Samuel S. and Sitrin M.D. 2008). No entanto, a transcrição de alguns genes é afectada pelos compostos da vitamina D sem que estes apresentem VDRE's na sua constituição, o que sugere que o  $1\alpha,25(OH)_2D$  induz efeitos indirectos no ciclo celular, através de outras vias de sinalização (Chiang K.C. and Chen T.C. 2009). Embora a comunidade científica ainda não esteja em total acordo quanto ao modo de iniciação das acções não-genómicas, grande parte dos dados recolhidos aponta para que estes efeitos tenham como primeiro local de acção a membrana plasmática, envolvendo um receptor de membrana não-clássico (memVDR) (Deeb K.K. *et al.* 2007), já descrito para células intestinais com o exemplo mais bem estudado da absorção intestinal rápida de  $Ca^{2+}$  (Deeb K.K. *et al.* 2007). A ligação de  $1\alpha,25(OH)_2D$  ao proposto receptor memVDR pode activar inúmeras cascatas sinalizadoras (Deeb K.K. *et al.* 2007), como é o caso da proteína cinase C, da

qual resulta a rápida abertura dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  e o aumento do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular que, por sua vez, irá acabar por também activar cascatas reaccionais que resultarão na estabilização por fosforilação do receptor nuclear VDR, afectando a sua actividade transcripcional. Assim, a activação não genómica destas vias de sinalização pode cooperar com os processos genómicos tradicionais para activar o receptor VDR e reforçar os seus efeitos anti-proliferativos (Deeb K.K. *et al.* 2007).

**Interferência de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$  na diferenciação celular.** O  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$  também pode controlar a proliferação celular ao induzir a diferenciação celular, tanto em células benignas como malignas (Samuel S. and Sitrin M.D. 2008, Chiang K.C. and Chen T.C. 2009). Esta situação foi verificada, por exemplo, para várias linhagens de células de leucemia mielóide que, através da activação do VDR pelo calcitriol, evoluíram para um fenótipo de monócito/macrófago, num processo mediado por um inibidor de ciclinas dependentes de cinases, alvo genómico do complexo  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}/\text{VDR}$  (Deeb K.K. *et al.* 2007, Samuel S. and Sitrin M.D. 2008). No entanto, em células hematopoiéticas progenitoras, o  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$  inibe a diferenciação celular por via da supressão da secreção de interleucina-12 (IL-12) e hiporregulação de outras moléculas co-estimuladoras (CD40, CD80, CD86), num processo independente do VDR (Deeb K.K. *et al.* 2007). Estudos de *microarray analysis* do tratamento de células de carcinoma espinocelular com análogos da vitamina D

mostraram uma supressão da expressão de marcadores de progressão maligna e indução da expressão de genes associados com a diferenciação epitelial (cistatina, protease M, colagénio-13, desmogleína) (Samuel S. and Sitrin M.D. 2008). Em células de tumores da cabeça e pescoço, cólon e próstata, a administração de análogos da vitamina D também induziu a expressão de genes associados ao processo de diferenciação da célula de origem (Deeb K.K. *et al.* 2007). Uma vez mais, parece não existir um mecanismo único que justifique a capacidade pró-diferenciadora em células tumorais, mas sim uma pluralidade de vias de acordo com o tecido em causa (Deeb K.K. *et al.* 2007).

Em vários sistemas celulares, os compostos de vitamina D provocam tanto uma diminuição da proliferação como induzem a transformação num fenótipo mais diferenciado. No entanto, deve ser enfatizado que estes eventos nem sempre ocorrem simultaneamente, sendo que em alguns casos se verifica uma diminuição da taxa de crescimento sem ocorrer uma estimulação da diferenciação e vice-versa (Samuel S. and Sitrin M.D. 2008).

**$1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$  e apoptose.** A indução da apoptose é outra importante função do  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$ . Este efeito anti-tumoral é exercido através da regulação de mediadores-chave do processo de apoptose. Assim, a vitamina D afecta os níveis de proteínas pró-apoptose (bax, bak) e/ou anti-apoptose (bcl-2 e bcl-Xl), promovendo um desequilíbrio no sentido da morte celular programada (Chang K.C. and Chen T.C. 2009). Tem sido relatada a

hiporregulação da expressão de bcl2 em células de linhagens de tumores mamários e células leucémicas e hiperregulação da expressão de bax e bak em estudos do cancro da próstata, adenoma e carcinoma colo-rectal (Deeb K.K. *et al.* 2007). Para além da regulação da expressão das proteínas da família bcl-2, o  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$  também pode activar directamente caspases (proteases com papel essencial no processo de apoptose) por diversos mecanismos, embora não esteja ainda estabelecido se todas essas vias são caspase-dependentes (Deeb K.K. *et al.* 2007, Samuel S. and Sitrin M.D. 2008, Chang K.C. and Chen T.C. 2009). O aumento intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , mediado pelos compostos de vitamina D, é também um modo indirecto de induzir a apoptose, pois promove a activação de proteases pró-apoptose como sejam a microcalpaína e a caspase 12 (Samuel S. and Sitrin M.D. 2008). Para além disso, tem sido demonstrado que o  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$  em combinação com radiação ou agentes quimioterápicos, causa um efeito aditivo na morte de células cancerígenas (Chiang K.C. and Chen T.C. 2009).

**$1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$  e angiogénese.** A inibição da angiogénese é também um importante mecanismo anti-cancerígeno do  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$ . O metabolito activo da vitamina D é capaz de reprimir o crescimento endotelial *in vitro* e reduzir a angiogénese *in vivo* (Chiang K.C. and Chen T.C. 2009). Os efeitos anti-angiogénicos de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$  podem subsequentemente conduzir à inibição do processo metastático, como de resto já foi demonstrado em modelos

prostáticos e pulmonares tratados com  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$  (Chiang K.C. and Chen T.C. 2009).

A vitamina D e o seu receptor têm demonstrado interacções com outros factores de transcrição e sistemas de sinalização celular que também desempenham importantes funções na regulação do crescimento celular (Samuel S. and Sitrin M.D. 2008), como sejam: hiporregulação da expressão de estrogénio, factor de crescimento epidermal, factor de crescimento insulínico 1 e factor de crescimento de queratinócitos e hiperregulação de factores inibitórios de crescimento, como a transformação do factor de crescimento  $\beta$  (Chiang K.C. and Chen T.C. 2009).

A multiplicidade de mecanismos observados para a actividade anti-proliferativa do  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$  contra a patologia tumoral sugere que, embora os efeitos anti-proliferativos sejam claros *in vivo* e *in vitro*, dissecar o mecanismo central exacto destas actividades (dependentes ou independentes do VDR), permanece um desafio (Deeb K.K. *et al.* 2007, Chiang K.C. and Chen T.C. 2009). Esta ideia encontra suporte na investigação por ensaios de *microarray analysis*: a comparação das listas de genes regulados pelo  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$  em diversos tipos de células cancerígenas encontrou apenas um pequeno conjunto de genes individuais regulados comumente (Kriebitzsch C. *et al.* 2009).

É, no entanto, já sabido que a actividade do calcitriol sobre o ciclo celular compreende vários mecanismos diferentes em diversos tipos de células, alterando o nível e a

actividade dos intervenientes de um modo célula-específico (Samuel S. and Sitrin M.D. 2008). Para além disso, as diferentes células podem variar significativamente na sua sensibilidade à inibição do crescimento induzido pelo  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$  e os seus análogos, mesmo em células com origem no mesmo tecido, como é o caso de células de várias linhas do cancro prostático. Múltiplos factores parecem interferir e determinar a resposta à vitamina D – níveis de expressão e polimorfismos de VDR, actividade e concentração das enzimas 1-hidroxilase e 24-hidroxilase, interferência de outras vias metabólicas, biodisponibilidade da vitamina D para complexação com o VDR, função dos co-reguladores nucleares, entre outros (Samuel S. and Sitrin M.D. 2008).

## **PERSPECTIVAS PREVENTIVAS E TERAPÊUTICAS DA VITAMINA D PARA A PATOLOGIA MALIGNA**

Face à crescente evidência científica sugerindo que a manutenção de um adequado *status* de vitamina D é um factor importante na prevenção de um vasto leque de cancros mortais, três possíveis intervenções para atingir os níveis séricos de  $25(\text{OH})\text{D}$  pretendidos seriam: aumento da exposição solar/radiação UVB, regime de suplementação ou a terapêutica a partir de análogos da vitamina D.

**Exposição solar/radiação UVB.** Uma vez 80-95% da vitamina D é adquirida através do processo fotoquímico na pele, o aumento da

exposição cutânea à radiação UVB poderia contribuir para a elevação dos níveis séricos de  $25(\text{OH})\text{D}$  para um patamar preventivo. Esta ideia é bastante discutível, uma vez que a associação de excessiva exposição à radiação UVB solar e o aumento de risco de desenvolver cancro de pele não-melanoma está bem documentada (Holick M.F. 2009). No entanto, está também descrito que as formas mais mortais de melanoma ocorrem nas áreas menos expostas ao sol e que a exposição ocupacional diminui o risco relativo destas variantes (Holick M.F. 2009). É necessário bastante moderação no que concerne à exposição solar. Alterações actínicas estão associadas com a exposição à radiação ultravioleta e existe considerável evidência do seu papel no cancro da pele (Garland C.F. 2006). Se a luz solar for utilizada como fonte de vitamina D, a exposição deverá ser escrupulosamente monitorizada, de modo a que a queimadura solar seja evitada e a exposição intencional da face seja minimizada (Garland C.F. 2006). Indivíduos com tipos de pele I e II não deverão exceder os 20 minutos por dia ao sol. Tempos de exposição muito superiores a 20 minutos não aumentam apreciavelmente a síntese de vitamina D e podem aumentar o risco de cancro da pele. A suplementação oral, ao invés da exposição solar, deverá ser utilizada por pessoas de pele clara e pelos indivíduos a fazer medicação que induz fotossensibilidade (Garland C.F. 2006).

**Suplementação de Vitamina D.** Uma vez que através de produtos alimentares naturais é bastante difícil atingir níveis suficientes de

vitamina D, a dieta alimentar deveria ser enriquecida com suplementos de vitamina D, de forma a aumentar a fonte oral de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$ .

A dose diária recomendada de vitamina D é geralmente de 200-400 UI. Este valor está relacionado com a prevenção do raquitismo (Grant W.B. *et al.* 2009). Muitos ensaios clínicos realizados na última década indicam que a dose de 400 UI/dia não é suficiente para prevenir fracturas ou a patologia maligna (Grant W.B. *et al.* 2009). No entanto, doses diárias de 800-2000 UI, muitas vezes associadas a doses de 1000-1500 mg de cálcio, são capazes de reduzir o risco de fracturas, infecções virais (Grant W.B. *et al.* 2009) e cancro (Lappe *et al.* 2007).

**Análogos da vitamina D.** Com o reconhecimento dos efeitos antiproliferativos e pró-diferenciadores da vitamina D nas décadas de 70 e 80, foram realizadas várias tentativas para traduzir esse conhecimento na prática clínica. Estas descobertas lançaram uma grande onda de entusiasmo sobre a possibilidade de desenvolver e aplicar o  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$  e seus análogos no tratamento da patologia maligna. Koeffler *et al.* iniciaram em 1985 um dos primeiros trabalhos nesse sentido, obtendo uma remissão significativa nos doentes que sofriam de pré-leucemia e que foram tratados por  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$  (Holick M.F. 2006b). Infelizmente, os doentes não só desenvolveram hipercalcemia como se tornaram irresponsivos aos efeitos antiproliferativos e pró-diferenciadores do  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$  e acabaram por sucumbir à condição maligna. Estes resultados vieram

esfriar o entusiasmo sobre a “hipótese vitamina D” (Holick M.F. 2006a). Ainda assim, desde estas primeiras observações, tem-se verificado que culturas de linhagens de células cancerígenas de próstata, cólon, mama, pulmão e melanoma que apresentam o VDR mostram marcada inibição do crescimento celular quando expostas a  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  (Holick M.F. 2006b).

Sendo o papel primário do  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$  ajustar as concentrações séricas de cálcio e fósforo, o principal objectivo da criação de análogos da vitamina D para o tratamento do cancro é elaborar compostos capazes de desenvolver as actividades antiproliferativas da vitamina D, sem a necessidade de simultaneamente induzirem a actividade sobre o metabolismo do cálcio. O invulgar grau de flexibilidade molecular revelado pelo  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$  permite a síntese de análogos estruturais que foquem uma actividade mais específica dentro de todo o potencial biológico da vitamina D (Campbell F.C. *et al.* 2010). Mais de 1000 análogos foram criados, sendo que muitos destes têm sido eficientemente utilizados como agentes antiproliferativos para o tratamento da psoríase (Holick M.F. 2006b, DeLuca H.F. 2004). Várias alterações estruturais têm sido estudadas e, recentemente, os análogos da vitamina D que têm uma cadeia lateral adicional (são 25% maiores do que o composto natural), conhecidos por análogos *Gemini*, mostraram ser 100-1000 vezes mais potentes do que a hormona natural na sua actividade antiproliferativa (Spina C. *et al.* 2005,

Holick M.F. 2006b). Alguns estudos em ratos sugerem que poderão ser utilizados no tratamento de alguns cancros, incluindo o cancro do cólon (Spina et al. 2005 *in* Holick M.F. 2006b).

Para a futura utilização de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$  e dos seus análogos no tratamento de patologias malignas, deverão existir mais estudos dirigidos para esta temática, de forma a abrir caminho para o desenvolvimento de compostos mais potentes (Chiang K.C. and Chen T.C. 2009).

## CONCLUSÃO

As actuais evidências moleculares e epidemiológicas são convincentes sobre um efeito protector e eventualmente terapêutico da vitamina D contra o cancro. Ainda assim, a situação de carência de vitamina D não é para já reconhecida como um problema pela maioria dos médicos e doentes, pese embora a sua significativa prevalência à escala global. Os trabalhos mais recentes sublinham a importância de dar maior relevância por parte dos investigadores, clínicos e doentes à epidémica carência de vitamina D e à necessidade de realizar um rastreio mais agressivo e de estabelecer estratégias de combate a esta situação.

Está também já comprovado que os compostos de vitamina D alteram o crescimento e diferenciação do número e tipo normais dos tipos celulares patológicos. Os seus efeitos antiproliferativos são a base de importantes terapêuticas, como o tratamento

tópico e sistémico da psoríase e a supressão da hiperplasia das glândulas paratiróides na insuficiência renal crónica. Estes compostos demonstraram em inúmeros ensaios experimentais com animais a inibição do crescimento de muitos tipos de cancro. No entanto, é necessária uma melhor compreensão sobre que metabolitos poderão vir a ser utilizados nos diversos tecidos ou células, em que estádios de evolução da patologia deverão ser aplicados, assim como que interacções terão com os restantes alvos-moleculares. Os análogos da vitamina D que são particularmente potentes na regulação do crescimento e diferenciação celular, mas que evitam toxicidade ao produzirem menor efeito do metabolismo de cálcio, são grandes promessas enquanto novos tratamentos para o cancro e outras doenças envolvendo crescimento celular desregulado.

De forma a reunir um maior consenso dentro da comunidade científica e de, a longo prazo, impelir intervenções no sentido de melhorar o *status* de vitamina D das populações, será necessário continuar a desenvolver esforços no sentido de estimar as concentrações óptimas de  $25(\text{OH})\text{D}$  para os diversos efeitos da vitamina D nos índices de saúde.

Face ao crescente impacto nefasto da patologia tumoral nos índices de saúde mundiais, é urgente encontrar medidas que permitam contrariar esta evolução e, nesse sentido, deverá ser apoiado um maior investimento no desenvolvimento de

compostos relacionados com  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$  e no estudo de possíveis intervenções de saúde

pública para elevar os níveis circulantes de  $25(\text{OH})\text{D}$ .

## REFERÊNCIAS

- Abbas S, Linseisen J, Slanger T, Kroop S, Mutschelknauss EJ, Flesch-Janys D, *et al.* (2008) Serum 25-hydroxyvitamin D and risk of post-menopausal breast cancer – results of a large case-control study. *Carcinogenesis*; 29: 93-99.
- Ahonen MH, Tenkanen L, Teppo L, Hakama M, Tuohimaa P (2000) Prostate cancer risk and prediagnostic serum 25-hydroxyvitamin D levels (Finland). *Cancer Causes Control*; 11: 847-852.
- Albert PJ, Proal AD, Marshall TG (2009) Vitamin D: The alternative hypothesis. *Autoimmun Rev* 8: 639-644.
- Autier P and Gandini S (2007) Vitamin D Supplementation and Total Mortality. *Arch Intern Med* 167(16) 1730-1737.
- Bertone-Johnson ER, Chen WY, Holick MF, Hollis BW, Colditz GA, Willett WC, *et al.* (2005) Plasma 25-hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D and risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*; 14: 1991-1997.
- Bikle D (2009) Nonclassic Actions of Vitamin D. *J Clin Endocrinol Metab* 94(1): 26-34.
- Bischoff-Ferrari HA, Giovannucci E, Willett WC, Dietrich T, Dawson-Hughes B. Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes. *Am J Clin Nutr* 84: 18-28 [Erratum, *Am J Clin Nutr* 2006; 84:1253].
- Boyle P (2006) The globalisation of cancer. *Lancet*; 368: 629-630.
- Campbell FC, Xu H, El-Tanani M, Crowe P, Bingham V (2010) The Yin and Yang of vitamin D receptor (VDR) signaling in neoplastic progression: Operational networks and tissue-specific growth control. *Biochem Pharmacol* 79: 1-9.
- Carlberg C and Seuter S (2009) A Genomic Perspective on Vitamin D Signaling. *Anticancer Res* 29: 3485-3494.
- Chiang KC and Chen TC (2009) Vitamin D for the prevention and treatment of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 15(27): 3349-3354.
- Davis CD (2008) Vitamin D and cancer: current dilemmas and future research needs. *Am J Clin Nutr* 88(suppl): 565S-9S.
- Deeb KK, Trump DL, Johnson CS (2007) Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. *Nat Rev Cancer* 7(9): 684-700.
- DeLuca HF (2004) Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *Am J Clin Nutr* 80 (suppl): 1689S-96S.
- DeLuca HF (2008) Evolution of our understanding of vitamin D. *Nutrition Reviews* 66 (Suppl2): S73-S87.
- Easton DF (1994) The inherited component of cancer. *Br Med Bull*; 50: 527-35.
- Fearon ER (1997) Human cancer syndromes: clues to the origin and nature of cancer. *Science*; 278: 1043-50.
- Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM (2004) GLOBOCAN 2002: cancer incidence, mortality and prevalence worldwide. IARC CancerBase No5, version 2.0. Lyon: International Agency for Research on Cancer.
- Feskanish D, Ma J, Fuchs CS, Kirkner GJ, Hankinson SE, Hollis BW, *et al.* (2004) Plasma vitamin D concentrations and risk of colorectal cancer in women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*; 13: 1502-1508.
- Garland CF, Comstock G, Garland FC, Helsing K, Shaw E, Gorham E (1989) Serum 25-hydroxyvitamin D and colon cancer: eight-year prospective study. *Lancet* 2: 1176-1178.
- Garland CF, Garland FC (2006) Commentary: Progresso of a paradigm. *Int J Epidemiol*; 35: 220-222.

- Garland CF, Garland FC, Gorham ED, Lipkin M, Newmark H, Mohr SB, Holick MF (2006) The Role of Vitamin D in Cancer Prevention. *Am J Public Health* 96: 252-261.
- Garland CF, Gorham ED, Mohr SB, Garland FC (2009) Vitamin D for Cancer Prevention: Global Perspective. *Ann Epidemiol* 19: 468-483.
- Giovannucci E (2005) The epidemiology of vitamin D and cancer incidence and mortality: A review (United States). *Cancer Causes Control* 16: 83-95.
- Grant WB and Boucher B (2009) Current Impediments to Acceptance of the Ultraviolet-B-Vitamin D-Cancer Hypothesis. *Anticancer Res* 29: 3597-3604.
- Grant WB and Garland CF (2006) The association of solar ultraviolet B (UVB) with reducing risk of cancer: multifactorial ecologic analysis of geographic variation in age-adjusted cancer mortality rates. *Anticancer Res* 26: 2687-2700.
- Grant WB and Mohr SB (2009) Ecological studies of ultraviolet B, vitamin D and cancer since 2000. *Ann Epidemiol* 19: 446-54.
- Grant WB, Cross HS, Garland CF, Gorham ED, Moan J, Peterlik M, Porojnicu AC, Reichrath J, Zittermann A (2009) Estimated benefit of increased vitamin D status in reducing the economic burden of disease in western Europe. *Prog Biophys Mol Biol* 99: 104-113.
- Guyton AC and Hall JE (2006) *Textbook of medical physiology—11th ed.* Elsevier Saunders.
- Holick MF (2006a) High Prevalence of Vitamin D Inadequacy and Implications for Health. *Mayo Clin Proc* 81(3): 353-373.
- Holick MF (2006b) Vitamin D: It's role in cancer prevention and treatment. *Prog Biophys Mol Biol* 92: 49-59.
- Holick MF (2006c) High prevalence of vitamin D inadequacy and implications for health. *Mayo Clin Proc* 81: 353-73.
- Holick MF (2007) Vitamin D deficiency. *N Eng J Med* 357: 266-81
- Holick MF (2009) Shinning Light on the vitamin D: Cancer connection IARC report. *Dermatendocrinol* 1(1): 4-6.
- Holick MF and Chen TC (2008) Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. *Am J Clin Nutr* 87(suppl): 1080S-6S.
- Ingraham BA, Bragdon B and Nohe A (2008) Molecular basis of the potential of vitamin D to prevent cancer. *Curr Med Res Opin* 24: 139-149.
- Köstner K, Denzer N, Müller CSL, Klein R, Tielgen W, Reichrath J (2009) The Relevance of Vitamin D Receptor (VDR) Gene Polymorphisms for Cancer: A Review of the Literature. *Anticancer Res* 29: 3511-3536.
- Kriebitzsch C, Verlinden L, Eelen G, Tan BK, Van Camp M, Bouillon R, Verstuyf A (2009) The Impact of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> and its Structural Analogs on Gene Expression in Cancer Cells – A Microarray Approach. *Anticancer Res* 29: 3471-3484.
- Lappe JM, Travers-Gustafson D, Davies KM, Recker RR, Heaney RP (2007) Vitamin D and calcium supplementation reduces cancer risk: results of a randomized trial. *Am J Clin Nutr* 85: 1586-91.
- Li FP (1995) Phenotypes, genotypes, and interventions for hereditary cancers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 4: 579-82.
- Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK, et al. (2000) Environmental and heritable factors in the causation of cancer—analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N Eng J Med* 343: 78-85.
- Lips P (2006) Vitamin D physiology. *Prog Biophys Mol Biol* 92: 4-8.
- Lowe LC, Guy M, Mansi JL, Peckitt C, Bliss J, Wilson RG, et al. (2005) Plasma 25-hydroxy vitamin D concentrations, vitamin D receptor genotype and breast cancer risk in a UK Caucasian population. *Eur J Cancer*; 41: 1164-1169.
- Merlo LMF, Pepper JW, Reid BJ, Maley CC (2006) Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nat Rev Cancer* 6, 924-935.
- Norman AW (2008) From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health. *Am J Clin Nutr* 88(suppl): 491S-95S.
- Norman AW, Bouillon R, Whiting SJ, Vieth R and Lips P (2007) 13th Workshop consensus for vitamin D nutritional guidelines. *J Steroid Biochem Mol Biol* 103: 204-205.
- Parkin DM (2001) Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol*; 2(9): 533-43.

- Parkin DM, Pisani P, Ferlay J (1990) Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. *Int J Cancer*; 80: 827-41.
- Peterlik M and Cross HS (2006) Dysfunction of the vitamin D endocrine system as common cause for multiple malignant and other chronic diseases. *Anticancer Res* 26: 2581-2588.
- Peterlik M, Boonen S, Cross HS, Lamberg-Allardt C (2009) Vitamin D and Calcium Insufficiency-Related Chronic Diseases: an Emerging World-Wide Public Health Problem. *Int J Environ Res Public Health* 6: 2585-607.
- Pilz S, Tomaschitz A, Obermayer-Pietsch B, Dobnig H, Pieber TR. (2009) Epidemiology of Vitamin D Insufficiency and Cancer Mortality. *Anticancer Res*; 29: 3699-3704.
- Pisani P, Parkin DM, Bray FI, Ferlay J (1999) Estimates of the worldwide mortality from 25 major cancers in 1990. *Int J Cancer*; 83: 18-29.
- Prentice A, Goldberg GR, Schoenmakers I (2008) Vitamin D across the lifecycle: physiology and biomarkers. *Am J Clin Nutr* 88(suppl): 500S-6S.
- Samuel S and Sitrin MD (2008) Vitamin D's role in cell proliferation and differentiation. *Nutrition Reviews* 66(Suppl.2): S116-S124.
- Spina C, Tangpricha V, Yao M, Zhou W, Wolfe MM, Maehr H, Uskokovic M, Adorini L, Holick MF (2005) Colon cancer and solar ultraviolet B radiation and prevention and treatment of colon cancer in mice with vitamin D and its Gemini analogs. *J Steroid Biochem Mol Biol* 97: 111-120.
- Tanaka H, Abe E, Miyaura C, et al. (1982) 1 alpha,25-Dihydroxycholecalciferol and a human myeloid leukaemia cell line (HL-60). *Biochem J* 204: 713-719.
- Tangrea J, Helzlsouer K, Pietinen P, Taylor P, Hollis B, Virtamo J, et al. (1997) Serum levels of vitamin D metabolites and the subsequent risk of colon and rectal cancer in Finnish men. *Cancer Causes Control*; 8:615-625.
- Thun MJ, DeLancey JO, Center MM, Jemal A, Ward EM (2010) The global burden of cancer: priorities for prevention. *Carcinogenesis*; 31(1): 100-110.
- Tworoger SS, Lee IM, Buring JE, Rosner B, Hollis BW, Hankinson SE (2007) Plasma 25-hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D and risk of incident ovarian cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*; 16: 783-788.
- WHO - International Agency for Research on Cancer (2008) World Cancer Report 2008.