

Ana Filipa da Cruz Rolo

O papel da vitamina D na resposta imune ao SARS-CoV-2

Faculdade de Ciências da Saúde

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2022

Ana Filipa da Cruz Rolo

O papel da vitamina D na resposta imune ao SARS-CoV-2

Faculdade de Ciências da Saúde

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2022

Ana Filipa da Cruz Rolo

O papel da vitamina D na resposta imune ao SARS-CoV-2

Atesto a originalidade do trabalho,

Ana Filipa da Cruz Rolo

(Ana Filipa da Cruz Rolo)

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas sob a orientação da Professora Doutora Anabela Castro e da Professora Doutora Márcia Carvalho.

Porto, 2022

RESUMO

A importância da vitamina D para o organismo humano é sobejamente conhecida pela comunidade científica, estando a sua deficiência associada ao raquitismo. No entanto, o seu papel fisiológico tem sido amplamente estudado, evidenciando outras funções além do seu papel na regulação do metabolismo ósseo. Entre estas, a sua capacidade imunomoduladora tem despoletado um crescente interesse científico e clínico. A descoberta do SARS-CoV-2 e o alarme social por este provocado, fez com que surgisse interesse no potencial da suplementação com vitamina D para a prevenção e/ou tratamento da COVID-19. Neste contexto, a presente dissertação teve como objetivo analisar o possível benefício desta vitamina na modulação da resposta imune ao SARS-CoV-2 e avaliar a sua dispensa em Portugal em anos pré-pandémicos (2018 e 2019) e pandémicos (2020 e 2021). Foi realizada uma pesquisa bibliográfica nas bases de dados PubMed, Science Direct, B-on e Google Académico, utilizando as palavras-chave “vitamin D”, “imune response”, “SARS-CoV-2”, “COVID-19”. Para avaliar os padrões de consumo desta vitamina em Portugal, foi ainda realizado um estudo retrospectivo utilizando os dados da *Health Market Research* (HMR) relativos a medicamentos contendo colecalciferol dispensados em farmácias comunitárias portuguesas nos anos de 2018 a 2021. O sistema imune representa um fator determinante no combate à infeção pelo SARS-CoV-2. Os estudos mostraram que as propriedades imunomoduladoras da vitamina D podem estar associadas a um efeito benéfico na infeção por SARS-CoV-2, incluindo a estimulação da produção de peptídeos antimicrobianos, tais como as catelicidinas e as β -defensinas, a modulação das respostas pelos linfócitos Th para induzir uma mudança no perfil imunológico, favorecendo o fenótipo Th2 e a prevenção da tempestade de citocinas através da diminuição de citocinas pró-inflamatórias. Em Portugal, verificou-se um aumento do consumo de medicamentos contendo vitamina D em cerca de 85,4% nos anos da pandemia quando comparados com os anos pré-pandémicos. No entanto, apesar dos resultados promissores obtidos nos estudos clínicos, são ainda necessários estudos controlados de larga escala que sustentem a eficácia da suplementação com vitamina D no tratamento adjuvante da COVID-19.

Palavras-chave: Vitamina D; COVID-19; resposta imune; padrões de dispensa; Portugal

ABSTRACT

The importance of vitamin D to the human organism is abundantly recognised by the scientific community, with its deficiency linked to rickets. Nonetheless, its physiological role has been extensively studied, revealing other functions beyond its role in bone metabolism regulation. Among them, its immunomodulatory effects have triggered increasing scientific and clinical interest. The discovery of SARS-CoV-2 and the ensuing social alarm promoted an interest in the potential of vitamin D supplementation for the prevention and/or treatment of COVID-19. In this context, the objective of the present dissertation is to analyse the possible benefits of this vitamin in the modulation of the immune response to SARS-CoV-2 and the evaluation of its dispensing patterns in community pharmacies in Portugal in the pre pandemic (2018 and 2019) and pandemic years (2020 and 2021). A bibliographical search was carried out based on PubMed, Science Direct, B-on and Google Academic databases, using the keywords “vitamin D”, “immune response”, “SARS-CoV-2”, “COVID-19”. In order to evaluate the consumption patterns of this vitamin in Portugal, a retrospective study was also carried out utilising *Health Market Research* (HMR) data relating to medications containing cholecalciferol dispensed in Portuguese community pharmacies during the years 2018 to 2021. The immune system represents a determinant factor in the combat of SARS-CoV-2 infection. Studies showed that the immunomodulatory properties of vitamin D may be associated with a beneficial effect in the SARS-CoV-2 infection, including the stimulation of antimicrobial peptides such as cathelicidins and β -defensin, the modulation of T lymphocytes in inducing a change in the immunological profile, favouring the Th2 phenotype and the prevention of cytokine storm through the decrease of pro-inflammatory cytokines. In Portugal an increase of approximately 85.4% in the consumption of medication containing vitamin D was observed during pandemic compared to pre pandemic years. Nonetheless, despite the promising results obtained during clinical testing, further controlled large scale studies are necessary to sustain the efficiency of vitamin D supplementation in the adjuvant treatment of COVID-19.

Keywords: Vitamin D; COVID-19; immune response; dispensing patterns; Portugal

AGRADECIMENTOS

À Universidade Fernando Pessoa e a todos os professores que fizeram parte deste percurso, por todos os ensinamentos que me proporcionaram.

À minha orientadora, Professora Doutora Anabela Castro e à minha coorientadora, Professora Doutora Márcia Carvalho por todo o apoio, disponibilidade e orientação na escrita desta dissertação. Por ouvirem sempre os meus desabafos e por me ajudarem a superar todas as dificuldades.

À minha família, por todo o amor e apoio incondicional, por estarem sempre presentes em todos os momentos e por sempre acreditarem em mim e nunca me deixarem desistir.

Ao Bruno, um agradecimento especial por toda a paciência ao longo deste percurso, sempre compreensivo e com palavras de conforto nos momentos mais difíceis.

A todos os meus amigos e colegas por todo o apoio que sempre demonstraram. Em especial à Gisela que viveu esta aventura comigo desde o primeiro dia e foi sem dúvida um grande apoio.

Aos meus colegas de trabalho, porque sem a ajuda deles nada disto teria sido possível. Um agradecimento especial ao Doutor José Guedes, que me apoiou e incentivou desde o início e pela facilidade no horário de trabalho.

“O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso, existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.”

Fernando Pessoa

ÍNDICE GERAL

| | |
|--|-----|
| RESUMO | v |
| ABSTRACT | vi |
| AGRADECIMENTOS | vii |
| ÍNDICE DE FIGURAS | ix |
| ÍNDICE DE TABELAS | x |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | xi |
| I. INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1. Motivação | 1 |
| 1.2. Objetivos..... | 1 |
| 1.3. Metodologia..... | 2 |
| II. DESENVOLVIMENTO | 3 |
| 2.1 Perspetiva histórica da vitamina D | 3 |
| 2.2 Caracterização física e química da vitamina D..... | 4 |
| 2.3 Metabolismo da vitamina D..... | 4 |
| 2.4. Papel fisiológico da vitamina D..... | 7 |
| 2.5 Fontes de obtenção da vitamina D..... | 8 |
| 2.6 Vitamina D e SARS-CoV-2..... | 9 |
| 2.6.1 Descrição do coronavírus | 9 |
| 2.6.2 Imunopatologia do SARS-CoV-2 | 10 |
| i. Resposta imune inata contra o SARS-CoV-2..... | 11 |
| ii. Resposta imune adaptativa ao SARS-CoV-2 | 16 |
| 2.6.3 Papel da vitamina D na infeção por SARS-CoV-2 | 19 |
| 2.7 Recomendações do uso de vitamina D em Portugal..... | 28 |
| 2.8 Avaliação do consumo de vitamina D em Portugal na pandemia | 30 |
| III. CONCLUSÕES | 34 |
| IV. BIBLIOGRAFIA | 36 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Estrutura química da vitamina D ₂ e da vitamina D ₃ (adaptado de Câmara <i>et al.</i> , 2021)..... | 4 |
| Figura 2. Metabolismo da vitamina D (adaptado de Pilz <i>et al.</i> , 2016)..... | 5 |
| Figura 3. Estrutura do SARS-CoV-2 (adaptado de Kirtipal <i>et al.</i> , 2020)..... | 10 |
| Figura 4. Tempestade de citocinas na infecção por SARS-CoV-2 (adaptado de(Diamond <i>et al.</i> , 2022)..... | 16 |
| Figura 5. Possíveis mecanismos imunomoduladores da vitamina D envolvidos na resposta à infecção por SARS-Cov-2 (adaptado de Singh <i>et al.</i> , 2021)..... | 21 |

ÍNDICE DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Características dos ensaios clínicos avaliando os efeitos da suplementação de vitamina D em doentes com COVID-19. | 23 |
| Tabela 2. Classificação dos níveis séricos de 25(OH)D em Portugal (Direção-Geral da Saúde, 2019). | 28 |
| Tabela 3. Situações clínicas para o doseamento da 25(OH)D no adulto (Direção-Geral da Saúde, 2019). | 29 |
| Tabela 4. Recomendações para a suplementação vitamínica (Direção-Geral da Saúde, 2019). | 29 |
| Tabela 5. Número de embalagens de medicamentos contendo colecalciferol dispensadas em farmácias comunitárias portuguesas nos anos de 2018 a 2021. | 31 |
| Tabela 6. Indicações terapêuticas e nomes comerciais dos medicamentos contendo colecalciferol comercializados em Portugal (INFARMED, 2022). | 32 |

LISTA DE ABREVIATURAS

1,25(OH)₂D – 1,25-dihidroxitamina D ou calcitriol

25(OH)D – 25-hidroxitamina D ou calcidiol

7-DHC – 7-deidrocolesterol

ACE2 – Enzima de conversão da angiotensina II

AIM – Autorização de Introdução no Mercado

ARDS – Síndrome da dificuldade respiratória aguda

CoV_s – Coronavírus

CYP – Citocromo P450

DCs – Células dendríticas

DGS – Direção-Geral da Saúde

DBP – Proteína de ligação da vitamina D

FGF-23 – Fator de crescimento fibroblástico

HMR – *Health Market Research*

IFN – Interferão

IL – Interleucina

MERS-CoV – Síndrome respiratória do médio oriente

MNSRM – Medicamento Não Sujeito a Receita Médica

MSRM – Medicamento Sujeito a Receita Médica

NK – Células *Natural Killer*

OMS – Organização Mundial de Saúde

PAMPs – Padrões moleculares associados a patogénios

PTH – Hormona paratiroideia

PRRs – Recetores de reconhecimento de padrões

RNA – Ácido ribonucleico

RLRs – Recetores do tipo gene I induzido pelo ácido retinóico

SARS-CoV – Síndrome respiratória aguda grave

TLRs – Recetores do tipo *Toll*

TMPRSS2 – Protease serina transmembranar 2

TNF – Fator de necrose tumoral

UVB – Radiação Ultravioleta do tipo B

UI – Unidades Internacionais

VDR – Recetor da vitamina D

I. INTRODUÇÃO

O estudo da vitamina D iniciou-se há cerca de 100 anos quando foi descoberto que a sua deficiência estava relacionada com o raquitismo (Martens *et al.*, 2020). A função clássica desta vitamina está relacionada com o seu papel na regulação do metabolismo ósseo e na homeostasia do cálcio e do fósforo (Sassi *et al.*, 2018). No entanto, outras funções clinicamente relevantes têm sido associadas à vitamina D, devido à sua produção em tecidos extra renais. Deste modo, exerce efeitos a nível do sistema imune, do sistema cardiovascular e da proliferação e diferenciação celular (Pilz *et al.*, 2019; Ramasamy, 2020). A sua ação imunomoduladora tem despoletado um crescente interesse científico por esta vitamina, devido à sua capacidade de regular tanto a resposta imune inata como adaptativa (Dominguez *et al.*, 2021; Džopalić *et al.*, 2021).

Em 2019 foi descoberto um novo coronavírus capaz de causar doença em humanos, o SARS-CoV-2 (Azkur *et al.*, 2020). O sistema imune assume um papel vital no combate à infeção por SARS-CoV-2 (Shah Alam *et al.*, 2021). No sentido de melhorar ou prevenir as respostas imunes exacerbadas, surge um interesse significativo no potencial papel protetor da vitamina D na COVID-19. A capacidade desta vitamina modular diferentes aspetos da resposta imune, pode influenciar a severidade da doença, potenciando melhores resultados no decurso desta (Ghelani *et al.*, 2021). A suplementação com vitamina D na COVID-19 tem sido discutida como uma possível abordagem preventiva ou terapêutica (Albergamo *et al.*, 2022).

1.1. Motivação

A preferência por este tema deveu-se ao atual interesse em torno da vitamina D, não só pela insuficiência desta vitamina na população portuguesa, mas também pelo seu potencial papel benéfico na infeção por SARS-CoV-2. O farmacêutico comunitário pela sua proximidade com a população assume um papel fundamental na promoção da saúde pública, promovendo quer a educação para a saúde no sentido de prevenir a deficiência e insuficiência de vitamina D, quer o uso responsável da suplementação vitamínica.

1.2. Objetivos

A presente dissertação pretendeu analisar o papel da vitamina D na modulação da resposta imune, em particular na resposta à infeção pelo SARS-CoV-2. Teve ainda como

objetivo avaliar o impacto da pandemia da COVID-19 no padrão de consumo desta vitamina em Portugal.

1.3. Metodologia

Para a elaboração desta revisão narrativa, foi efetuada uma pesquisa de artigos científicos, em bases de dados como a PubMed, Science Direct, B-on e Google Académico, utilizando as seguintes palavras-chave: “vitamin D”, “imune response”, “SARS-CoV-2”, “COVID-19”, “dispense” e “Portugal”. Os critérios de inclusão basearam-se na seleção de artigos originais e de revisão que respeitassem as palavras-chave e que abordassem a temática em estudo. Além disso, apenas foram incluídos artigos escritos em língua inglesa, portuguesa e espanhola e com acesso à sua versão integral. Também foi recolhida informação em livros e websites governamentais através do motor de busca “Google”. A pesquisa bibliográfica foi efetuada entre novembro de 2021 e junho 2022. Para avaliar os padrões de consumo desta vitamina, foi ainda realizado um estudo retrospectivo utilizando os dados da *Health Market Research* (HMR) relativos a medicamentos com a denominação comum internacional “colecalfiferol” dispensados em farmácias comunitárias portuguesas nos anos de 2018 a 2021 (HMR, 2022).

II. DESENVOLVIMENTO

2.1 Perspetiva histórica da vitamina D

A história da vitamina D começou há cerca de 100 anos quando se descobriu que a sua deficiência causava raquitismo em crianças e osteomalácia em adultos (Martins e Silva, 2007; Martens *et al.*, 2020). No auge da revolução industrial, o raquitismo assumiu proporções epidémicas, o que levou ao desenvolvimento de vários estudos para aferir a causa e o tratamento desta doença (Câmara *et al.*, 2021). Inicialmente, pensava-se que a vitamina A era a substância responsável pela cura da doença e, de facto, foi evidenciado que o uso de suplementos alimentares de óleo de fígado de bacalhau (ricos em vitamina A) eram eficazes no tratamento desta patologia (Norman, 2012; Deluca, 2014; Câmara *et al.*, 2021). Porém, com o avançar dos estudos, verificou-se que uma outra substância de origem desconhecida estava na base do tratamento da doença, tendo sido designada por vitamina D (Jones, 2018; Câmara *et al.*, 2021). Foi por volta de 1920 que se começou a estabelecer uma relação entre a carência de vitamina D na alimentação e o raquitismo (Martins e Silva, 2007; Hill *et al.*, 2018).

As diversas experiências realizadas também constataram que a exposição à luz solar e à luz ultravioleta artificial apresentavam efeitos semelhantes aos do óleo de fígado de bacalhau no que concerne à prevenção e tratamento do raquitismo (Pereira *et al.*, 2008; Deluca, 2014; Câmara *et al.*, 2021).

A natureza química da vitamina D apenas passou a ser conhecida na década de 30 do século XX após Adolf Windaus ter isolado e identificado as formas nutricionais desta vitamina, o que lhe valeu o prémio Nobel da Química em 1928 (Pereira *et al.*, 2008; Jones, 2018).

No decorrer dos vários estudos realizados, constatou-se que a vitamina D estava classificada de forma incorreta uma vez que as vitaminas eram classificadas como compostos essenciais de origem exógena fornecidas através da dieta. No que diz respeito à vitamina D, esta pode ser obtida de forma exógena, mas também pode ser sintetizada pelo organismo humano a partir de um composto intermediário da biossíntese do colesterol através da exposição da pele à luz solar (Martins e Silva, 2007; Martens *et al.*, 2020).

2.2 Caracterização física e química da vitamina D

A vitamina D é uma vitamina lipossolúvel considerada única relativamente às outras vitaminas, uma vez que também é definida como sendo uma hormona esteroide (Catarino *et al.*, 2017). As duas formas mais importantes desta vitamina são: a vitamina D₂ ou ergocalciferol e a vitamina D₃ ou colecalciferol (Saponaro *et al.*, 2020; Diachkova *et al.*, 2021).

A vitamina D₂ é de origem vegetal sendo produzida por fungos e leveduras pela exposição do ergosterol à radiação ultravioleta do tipo B (UVB). A vitamina D₃ é de origem animal e pode ser produzida endogenamente na pele também por exposição à radiação UVB (Bikle, 2014; Kumar *et al.*, 2021a; Shah Alam *et al.*, 2021). A nível estrutural diferem no carbono 17 a nível da cadeia lateral, como pode ser observado na Figura 1. A vitamina D₂ apresenta uma ligação dupla entre o carbono 22 e 23 e um grupo metilo no carbono 24 (Bikle, 2014; Catarino *et al.*, 2017; de la Guía-Galipienso *et al.*, 2021).

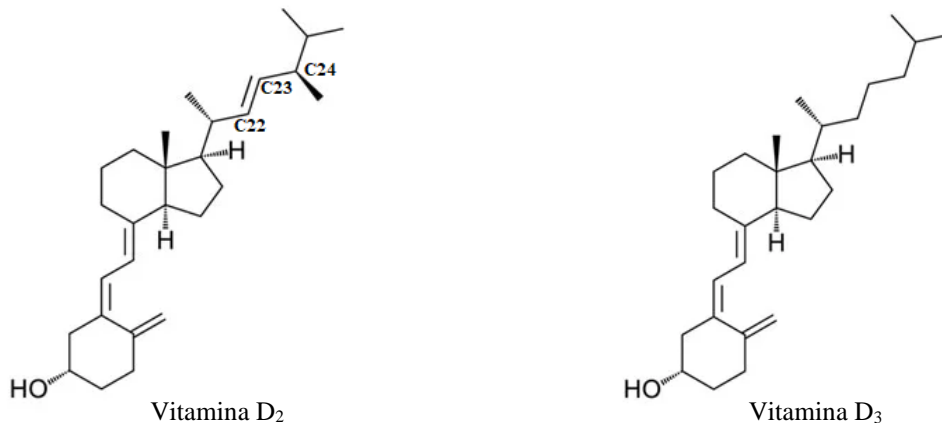


Figura 1. Estrutura química da vitamina D₂ e da vitamina D₃ (adaptado de Câmara *et al.*, 2021).

2.3 Metabolismo da vitamina D

A vitamina D₃ é sintetizada a nível cutâneo através da metabolização do 7-deidrocolesterol (7-DHC) por exposição à radiação UVB no comprimento de onda de 290-320 nm (Ramasamy, 2020; Dominguez *et al.*, 2021). Através desta reação fotolítica, o 7-DHC é convertido a pré-vitamina D₃. Esta é termicamente instável e sofre uma reação não enzimática, nomeadamente uma isomerização térmica, levando à formação da

vitamina D₃ (Lichtenstein *et al.*, 2013; Chang *et al.*, 2019; Câmara *et al.*, 2021; Dominguez *et al.*, 2021).

A vitamina D obtida através da dieta ou da suplementação é absorvida pelo intestino delgado e é transportada até ao fígado incorporada em quilomicrons (Alves *et al.*, 2013). Por outro lado, a vitamina D produzida endogenamente circula na corrente sanguínea maioritariamente ligada à proteína transportadora da vitamina D (DBP), em menor extensão à albumina e uma pequena fração circula de forma livre (menos de 1%) (Pilz *et al.*, 2019; Ramasamy, 2020; de la Guía-Galipienso *et al.*, 2021).

Tanto a vitamina D₂ como a D₃ são biologicamente inativas e necessitam de etapas sucessivas de hidroxilação mediadas por enzimas do citocromo P450 de modo a formar a vitamina D ativa (Chang *et al.*, 2019; Kumar *et al.*, 2021a). A Figura 2 representa esquematicamente o metabolismo da vitamina D.

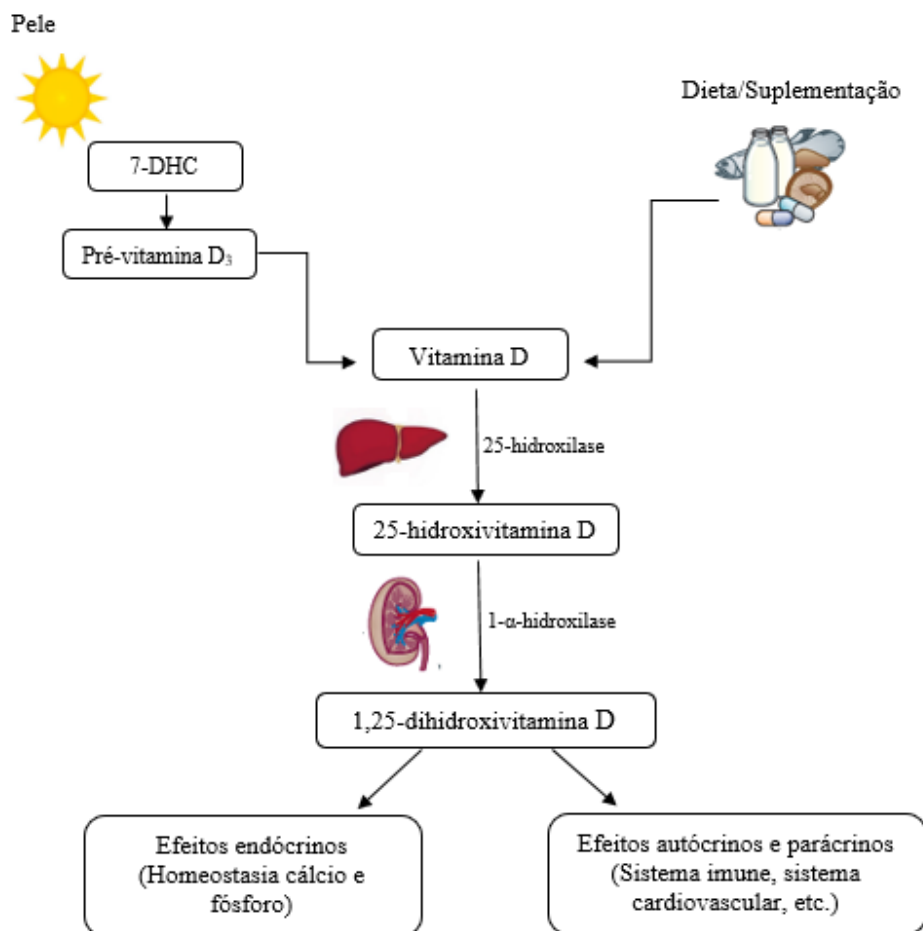


Figura 2. Metabolismo da vitamina D (adaptado de Pilz *et al.*, 2016).

A primeira hidroxilação ocorre no fígado pela ação da 25-hidroxilase (CYP27A1 e CYP2R1) levando a formação de 25-hidroxivitamina D [25(OH)D ou calcidiol] (Dominguez *et al.*, 2021). Esta constitui a principal forma circulante de vitamina D sendo utilizada como indicador para avaliar o nível sérico desta vitamina na prática clínica, dado que apresenta um tempo de semivida de duas a três semanas (Chang *et al.*, 2019; Ramasamy, 2020). A 25(OH)D reflete não só a ingestão alimentar e a produção através da pele, como também a sua conversão a partir do tecido adiposo no fígado, que constitui a sua principal fonte de reserva (Alves *et al.*, 2013; Catarino *et al.*, 2017). Este metabolito apresenta uma forte afinidade para a DBP no sangue, o que lhe confere estabilidade. No entanto, não apresenta atividade biológica, pelo que é necessária uma segunda hidroxilação. Esta ocorre a nível renal, mais precisamente nos túbulos proximais renais mediada pela ação da 1- α -hidroxilase (CYP27B1). Esta reação leva à formação da forma biologicamente ativa da vitamina D, a 1,25-dihidroxivitamina D [1,25(OH)₂D] ou também conhecida como calcitriol, que apresenta um tempo de semivida de quatro a seis horas (Chang *et al.*, 2019; Kumar *et al.*, 2021a).

O calcitriol encontra-se em circulação em quantidades inferiores às da 25(OH)D, porém é biologicamente mais potente e possui maior afinidade para o seu recetor (Alves *et al.*, 2013). A enzima 1- α -hidroxilase é regulada de modo a que sejam mantidas as concentrações plasmáticas de 1,25(OH)₂D adequadas às necessidades do organismo humano. A sua atividade é estimulada pela hormona paratiroideia (PTH) e inibida pelo fator de crescimento fibroblástico (FGF-23) e pela própria 1,25(OH)₂D (Bikle, 2014; Saponaro *et al.*, 2020). Os níveis séricos de cálcio e fósforo também apresentam influência na atividade enzimática, uma vez que níveis elevados conduzem à diminuição da síntese de 1,25(OH)₂D. Estes dois minerais também apresentam efeitos indiretos na produção da vitamina D, pois os níveis elevados de cálcio conduzem à diminuição da secreção da PTH (regulação negativa) e os níveis elevados de fósforo induzem o aumento do FGF-23 (regulação positiva) (Lichtenstein *et al.*, 2013; Prietl *et al.*, 2013).

Além do rim, existem outros tecidos que também expressam a enzima 1- α -hidroxilase, nomeadamente células epiteliais (pele, pulmões, próstata, intestino, mama), glândulas endócrinas (placenta, ovários, pâncreas), células do sistema imune (macrófagos, linfócitos B e T, células dendríticas (DCs)) e ainda osteoblastos e osteoclastos. A 1,25(OH)₂D produzida em tecidos extra renais apresenta um efeito local

que atua de forma autócrina ou parácrina, desempenhando diferentes funções dependendo da localização (Prietl *et al.*, 2013; Catarino *et al.*, 2017; Kumar *et al.*, 2021a).

A etapa final do metabolismo é mediada pela enzima 24-hidroxilase (CYP27A1) que conduz à inativação da vitamina D. Assim, esta enzima metaboliza a 25(OH)D e a 1,25(OH)₂D com formação dos metabolitos inativos, que são posteriormente excretados pela bÍlis ou pela urina (Pilz *et al.*, 2019; Ramasamy, 2020).

2.4. Papel fisiológico da vitamina D

A 1,25(OH)₂D exerce as suas funções fisiológicas através da via genómica ou não genómica sendo estas mediadas pela ligação ao recetor da vitamina D (VDR), um fator de transcrição que pertence à família dos recetores hormonais nucleares (Pilz *et al.*, 2019; Ramasamy, 2020). O papel clássico desta vitamina está relacionado com a regulação do metabolismo ósseo e da homeostasia do cálcio e do fósforo (Sassi *et al.*, 2018). No entanto, a descoberta do VDR em quase todas as células humanas, evidenciou funções não clássicas desta vitamina, atuando a nível do sistema imune, do sistema cardiovascular, da proliferação e diferenciação celular, entre outras (Pilz *et al.*, 2019; Ramasamy, 2020).

A vitamina D assume um papel fundamental na regulação do cálcio e do fósforo, atuando essencialmente no intestino, no osso e nos rins (Pilz *et al.*, 2019). A nível intestinal, promove o aumento da absorção tanto do cálcio como do fósforo e promove também a síntese do transportador intestinal do cálcio. A nível ósseo, a vitamina D estimula a reabsorção óssea e induz a diferenciação dos osteoblastos maduros. Nos rins, verifica-se um aumento da reabsorção do cálcio a nível tubular (Dominguez *et al.*, 2021).

A presença do VDR e a produção da 1- α -hidroxilase na maioria das células imunes, demonstrou que a vitamina D assume uma ação imunomoduladora, exercendo efeitos na função imune a diferentes níveis (Martens *et al.*, 2020; Dominguez *et al.*, 2021). Através de diversos estudos realizados, verificou-se que a 1,25(OH)₂D é capaz de promover a imunidade inata e inibir a imunidade adaptativa (Wei *et al.*, 2015; Džopalić *et al.*, 2021). O mecanismo de regulação da CYP27B1 nas células imunes é mediado por citocinas como a interleucina 1 (IL-1), o interferão γ (IFN γ), o fator de necrose tumoral α (TNF α) e também pelos níveis circulantes de 25(OH)D (Gil *et al.*, 2018; Medrano *et al.*, 2018).

2.5 Fontes de obtenção da vitamina D

A vitamina D pode ser obtida essencialmente a partir de três fontes: produção endógena por exposição à radiação UVB, alimentação e suplementação (Prietl *et al.*, 2013). Através destas fontes podem obter-se variações significativas de vitamina D no organismo humano devido a fatores genéticos, ambientais e ao estilo de vida (Pilz *et al.*, 2019).

A síntese cutânea induzida pela radiação UVB constitui a principal fonte de obtenção da vitamina D (80%). No entanto, é necessário ter em consideração que existem diversos fatores que podem condicionar a eficiência deste processo, tais como idade, cor da pele, latitude, estação do ano, condições meteorológicas, vestuário e uso de protetores solares (Alves *et al.*, 2013; Kutner *et al.*, 2018; de la Guía-Galipienso *et al.*, 2021; Dominguez *et al.*, 2021). O aumento da pigmentação da pele (maior teor de melanina) pode diminuir a síntese de vitamina D e assim os indivíduos de pele escura apresentam níveis reduzidos desta vitamina comparativamente aos indivíduos de pele clara (Alves *et al.*, 2013; Cashman, 2020; de la Guía-Galipienso *et al.*, 2021). Nos idosos, a síntese cutânea pode encontrar-se reduzida em cerca de 75%, especialmente durante o inverno e em latitudes nórdicas (Dominguez *et al.*, 2021). Além disso, o uso de protetor solar com fator de proteção 15 pode reduzir a síntese da vitamina através da pele em cerca de 97% (de la Guía-Galipienso *et al.*, 2021).

As fontes alimentares representam uma menor contribuição para a obtenção de vitamina D, uma vez que os alimentos ricos nesta vitamina são consumidos com menor frequência e, assim, através da alimentação não são obtidas as quantidades adequadas pela maioria das pessoas (Pilz *et al.*, 2016; de la Guía-Galipienso *et al.*, 2021; Dominguez *et al.*, 2021). Os alimentos mais ricos em vitamina D₃ são os peixes gordos, como o salmão, o atum e a sardinha, o óleo de fígado de bacalhau e a gema do ovo (Prietl *et al.*, 2013; Dominguez *et al.*, 2021).

Alguns países europeus e os Estados Unidos da América recorrem à fortificação de alimentos como estratégia para aumentar a ingestão de vitamina D nas suas populações (Jäpelt *et al.*, 2013). Os principais alimentos fortificados são o leite, a manteiga, a margarina, os cereais de pequeno-almoço, o pão, o sumo de laranja, o queijo e os iogurtes (Catarino *et al.*, 2017; Cashman, 2020; Dominguez *et al.*, 2021). A obtenção de vitamina

D através de fontes alimentares está então dependente dos hábitos nutricionais e da fortificação de alimentos adotada por cada país (Jäpelt *et al.*, 2013; Prietl *et al.*, 2013).

A suplementação pode ser necessária quando existe uma exposição solar inadequada, como, por exemplo, no caso do confinamento imposto pela COVID-19. O facto das pessoas estarem confinadas, reduz a exposição à luz solar e, conseqüentemente, a síntese cutânea de vitamina D (de la Guía-Galipienso *et al.*, 2021).

2.6 Vitamina D e SARS-CoV-2

2.6.1 Descrição do coronavírus

Os coronavírus (CoVs) são um grupo de vírus de RNA de cadeia simples com polaridade positiva e envelope que apresentam capacidade de infetar tanto humanos como animais (Azkur *et al.*, 2020; Kumar *et al.*, 2021a). Estes vírus pertencem à família *Coronaviridae* e à sub-família *Coronavirinae* que de acordo com as estruturas genómicas e as relações filogenéticas se dividem em quatro géneros: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* e *Deltacoronavirus* (Hosseini *et al.*, 2020; Kumar *et al.*, 2020b). De entre os quatro géneros, os *Alphacoronavirus* e os *Betacoronavirus* infetam apenas mamíferos e geralmente causam doença respiratória em humanos e gastroenterites em animais (Cui *et al.*, 2019).

Até 2019, eram conhecidos apenas seis CoVs capazes de causar doença em humanos, sendo o *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus* (SARS-CoV) e o *Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus* (MERS-CoV) os mais importantes, pois eram os únicos capazes de provocar doença respiratória grave em humanos, podendo causar infeções pulmonares graves e fatais (Hosseini *et al.*, 2020; Kumar *et al.*, 2021b).

No final de dezembro de 2019, surgiram casos de pneumonia de etiologia desconhecida na cidade de Wuhan, na China (Hassan *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2020). Após a análise genómica de amostras clínicas de um grupo de doentes foi identificado um novo coronavírus, tendo sido oficialmente designado pelo Comité Internacional de Taxonomia de Vírus de SARS-CoV-2, devido à semelhança genética com o SARS-CoV (Azkur *et al.*, 2020; Yadav *et al.*, 2021). A doença causada por este novo coronavírus foi designada de COVID-19 pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e declarada uma pandemia a 11 de março de 2020 (Kumar *et al.*, 2020a; Shah Alam *et al.*, 2021).

O SARS-CoV-2 é um membro do género *Betacoronavirus* que se caracteriza por apresentar RNA de cadeia simples com sentido positivo e com aproximadamente 30000 bases (Kumar *et al.*, 2020b; Sofi *et al.*, 2020). O genoma deste novo vírus codifica proteínas estruturais, não estruturais e também acessórias (Mittal *et al.*, 2020; Yadav *et al.*, 2021). As funções atribuídas às proteínas não estruturais e acessórias estão relacionadas com a virulência, dado que estão envolvidas na replicação viral e na montagem de novos vírus (Ning *et al.*, 2021). As quatro proteínas estruturais principais são: a glicoproteína *spike* (S) de superfície, a proteína de membrana (M), a glicoproteína do envelope viral (E) e a proteína do nucleocapsídeo (N) (Dhakal *et al.*, 2020; Peng *et al.*, 2021). A estrutura do SARS-CoV-2 encontra-se representada na Figura 3.

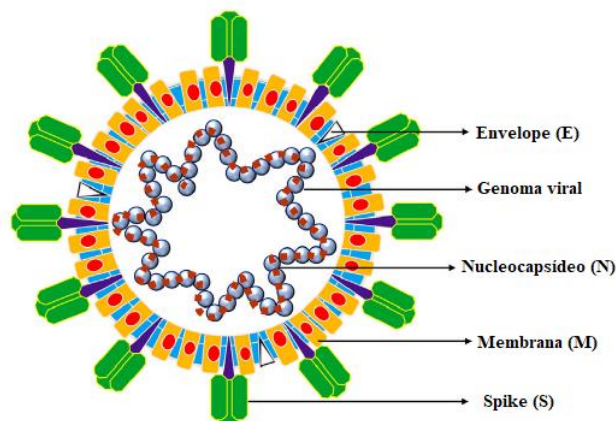


Figura 3. Estrutura do SARS-CoV-2 (adaptado de Kirtipal *et al.*, 2020).

A glicoproteína S assume um papel importante uma vez que facilita a ligação do vírus ao seu recetor celular, o recetor da enzima de conversão da angiotensina 2 (ACE2) (Kumar *et al.*, 2020a; Kumar *et al.*, 2021b). Após o processo de ligação, o vírus entra na célula e inicia-se o seu ciclo de replicação culminando na formação de viriões maduros que são libertados da célula infetada por exocitose (Alanagreh *et al.*, 2020; Robson *et al.*, 2020).

2.6.2 Imunopatologia do SARS-CoV-2

Os vírus são parasitas intracelulares obrigatórios que se replicam no interior das células do hospedeiro. Infetam diversas populações celulares através de endocitose mediada por recetores, após a ligação a moléculas expressas na superfície celular. A replicação viral vai interferir com a síntese e função de proteínas celulares normais

causando danos nas células infetadas e levando à sua morte por lise. Assim, os vírus podem estimular a resposta inflamatória e causar danos nos tecidos (Abbas *et al.*, 2021).

A resposta imune do hospedeiro contra a infecção por SARS-CoV-2 resulta num bloqueio da infecção e eliminação por apoptose das células infetadas. A resposta do sistema imune inato contra o vírus inicia-se após a sua deteção, ocorrendo a produção de citocinas pró-inflamatórias que vão desencadear uma resposta imune. Seguem-se as respostas geradas pelo sistema imune adaptativo onde desempenham um papel determinante as células T citotóxicas que induzem apoptose nas células infetadas por vírus e as células B que produzem anticorpos específicos contra o agente viral (Abbas *et al.*, 2021).

i. Resposta imune inata contra o SARS-CoV-2

A resposta imune inata constitui a primeira linha de defesa contra a infecção por SARS-CoV-2 sendo responsável por limitar a entrada, tradução, replicação e montagem viral; ajudar a identificar e remover as células infetadas; e coordenar e acelerar o desenvolvimento da resposta imune adaptativa (Li *et al.*, 2020; Abbas *et al.*, 2021). Os principais componentes da imunidade inata envolvidos na resposta contra vírus são: as barreiras físicas e químicas, as células fagocitárias (macrófagos e neutrófilos), as DCs e as células *natural killer* (NK) e ainda componentes do sistema do complemento (Abbas *et al.*, 2021). De uma forma geral, os principais mecanismos utilizados pela imunidade inata contra os vírus são: (i) a produção de IFN tipo 1 que vai promover uma maior resistência das células à infecção viral e ativar a resposta adaptativa; e (ii) a indução de apoptose das células infetadas ou que apresentem danos pelas células NK (Abbas *et al.*, 2021).

A infecção da maioria das células do hospedeiro por SARS-CoV-2 ocorre através da ligação da proteína S ao seu principal recetor celular, a proteína ACE2. Adicionalmente, é necessário que esta proteína seja clivada por proteases celulares para que ocorram interações com o recetor que favoreçam a entrada do vírus (Mortaz *et al.*, 2020). As principais proteases utilizadas pelo SARS-CoV-2 são a protease serina transmembranar 2 (TMPRSS2) presente na membrana plasmática que permite a fusão direta entre o invólucro viral e a membrana da célula do hospedeiro; e as catepsinas B e L que se encontram nos endossomas facilitando a entrada do vírus através do processo de endocitose (Hoffmann *et al.*, 2020; Jackson *et al.*, 2022).

Após entrada do SARS-CoV-2 na célula hospedeira, a infecção viral é detetada através de recetores de reconhecimento de padrões (PRRs) que identificam padrões moleculares associados a patogénios (PAMPs), isto é, moléculas que normalmente não são encontradas nas células hospedeiras e que são reconhecidas pelo sistema imune inato como sinal de invasão (Oliveira *et al.*, 2020). Existem diferentes classes de PRRs envolvidos na resposta imune, destacando-se os recetores tipo *Toll* (TLRs) e os recetores do tipo gene I induzido pelo ácido retinóico (RLRs), que se localizam, respetivamente, nos endossomas e no citosol (Li *et al.*, 2020).

A sinalização mediada por estes recetores vai promover a ativação de fatores de transcrição, culminando na secreção de IFNs do tipo I e III, quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-6 e TNF (Lee *et al.*, 2020). As citocinas pró-inflamatórias são amplamente benéficas para o hospedeiro e desencadeiam a infiltração de células imunes nos tecidos infetados para remover agentes virais infecciosos, no entanto, quando desreguladas conduzem a um estado de hiper-inflamação sistémica e danos teciduais (Lee *et al.*, 2020).

Os IFNs I e III são essenciais para limitar a infecção viral através da inibição da replicação do vírus e indução de resistência viral tanto nas células infetadas como não infetadas (Birra *et al.*, 2020; Kim *et al.*, 2021). A principal diferença entre estes dois tipos de interferões está relacionada com a expressão dos seus recetores: os do INF-I estão presentes em praticamente todas as células nucleadas ao passo que os do INF-III se encontram apenas em células epiteliais, neutrófilos e algumas células imunes ativadas (macrófagos, DCs) (Boechat *et al.*, 2021; Kim *et al.*, 2021). O INF-I é uma citocina com um potente efeito sistémico pró-inflamatório e antiviral desencadeando uma resposta antiviral mais rápida e mais forte do que o IFN-III. Porém, promovem a expressão adicional de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias que estão relacionadas com a imunopatologia da infecção por SARS-CoV-2, aquando de uma resposta descontrolada (Kim *et al.*, 2021). O IFN-III tem uma expressão mais restrita e não apresenta o potencial efeito pró-inflamatório, podendo até exercer efeitos anti-inflamatórios e protetores tecidulares (Boechat *et al.*, 2021). Uma resposta adequada do sistema imune inato através da produção de IFNs limita a replicação viral, no entanto, o SARS-CoV-2 desenvolve mecanismos de evasão que lhe permite escapar ao reconhecimento imunológico e suprimir as funções dos IFNs (Park *et al.*, 2020; Miyasaka, 2021).

Os componentes celulares do sistema imune também apresentam um papel vital no combate à infecção por SARS-CoV-2, nomeadamente os neutrófilos, macrófagos, DCs e células NK (Gustine *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2021).

Os neutrófilos, como primeira linha de defesa, são recrutados para o local da infecção com o objetivo de eliminar o vírus através do processo de fagocitose e da produção de espécies reativas de oxigénio (Ruenjaiman *et al.*, 2021). Nos casos mais graves da COVID-19, aquando da elevada produção de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias, a atividade dos neutrófilos aumenta e pode resultar numa acumulação destas células no tecido infetado contribuindo para a imunopatologia da doença. Assim, a quantidade de neutrófilos presentes na corrente sanguínea é um dos marcadores da gravidade da doença (Arcanjo *et al.*, 2020; Molaei *et al.*, 2021; Ruenjaiman *et al.*, 2021). Estas células são ainda capazes de promover a morte do vírus através da formação de armadilhas extracelulares de neutrófilos, cuja produção excessiva destas estruturas pode causar inflamação, danos nos tecidos e ainda interferir no processo da coagulação, podendo levar à formação de trombos (Arcanjo *et al.*, 2020; Ruenjaiman *et al.*, 2021).

As células NK são importantes no reconhecimento e eliminação das células infetadas pelo vírus podendo induzir a morte celular através de diferentes mecanismos: desgranulação dos seus grânulos citotóxicos (perforinas e granzimas), produção de citocinas inflamatórias (INF- γ e TNF- α) e ativação de recetores de morte celular na célula alvo através de ligandos (Oliveira *et al.*, 2020; Narni-Mancinelli *et al.*, 2021). Apesar de estas células responderem rapidamente a infeções virais agudas e serem vitais na manutenção da homeostasia imunológica, no caso do SARS-CoV-2 a sua função parece estar comprometida (Maucourant *et al.*, 2020; van Eeden *et al.*, 2020). Em doentes com COVID-19 com sintomatologia moderada a severa, verificou-se uma diminuição do número de células NK na circulação sanguínea e também uma desregulação no seu funcionamento, verificando-se assim, que existe uma relação positiva para a progressão da doença, nomeadamente complicações a nível pulmonar (Oliveira *et al.*, 2020; Gallardo-Zapata *et al.*, 2022).

Existem ainda as DCs que desempenham um papel fundamental na resposta imune, uma vez que estabelecem a ligação entre o sistema imune inato e o adaptativo. Estas células têm como principal função a apresentação de antígenos aos linfócitos T, permitindo assim a sua ativação e diferenciação (Borges *et al.*, 2021). As DCs sofrem um

processo de diferenciação em que as células imaturas apresentam uma forte capacidade de migração e de processar antígenos, enquanto as células maduras permitem ativar eficazmente os linfócitos T (Li *et al.*, 2020). A defesa inata promovida pelas DCs está relacionada principalmente com a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-12, IL-10, IFN do tipo I e TNF- α . Estas células encontram-se amplamente distribuídas no sistema respiratório atuando como sentinelas, no entanto, também podem ser infectadas pelo SARS-CoV-2 (Li *et al.*, 2020). No caso de a infecção ocorrer nas células imaturas, ocorrem alterações no processo de maturação e conseqüentemente fica comprometida a resposta dos linfócitos T (Borges *et al.*, 2021). Além disso, o vírus pode também desregular a função das DCs levando à produção de grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias. Assim, o SARS-CoV-2 pode comprometer a resposta dos linfócitos T e exacerbar a inflamação, o que resulta num pior prognóstico da doença (Li *et al.*, 2020; Borges *et al.*, 2021).

Existe ainda um outro componente crítico da resposta imune inata ao vírus que é o sistema do complemento (Boechat *et al.*, 2021). É um sistema que compreende mais de 30 proteínas que atuam no plasma, nos tecidos e na superfície e interior das células, estando as proteínas organizadas de modo a promover a ativação do complemento por três vias independentes, mas que interagem entre si (via clássica, via alternativa e ativação da lectina) (Agostinis *et al.*, 2021). O papel do sistema do complemento na COVID-19 está essencialmente relacionado com a sua ativação durante a resposta inata que ocorre na infecção aguda (Kurtovic *et al.*, 2021). Apesar do seu potencial papel benéfico na defesa do hospedeiro contra a infecção numa fase inicial, a ativação excessiva ou desregulada do sistema do complemento pode contribuir para o desenvolvimento de casos severos da doença (Boechat *et al.*, 2021; Kurtovic *et al.*, 2021).

A imunopatologia associada à doença severa está relacionada com a replicação rápida e exponencial do SARS-CoV-2 que resulta num aumento da carga viral podendo provocar uma desregulação da resposta imune inata. Quando isto acontece, desenvolve-se uma resposta inflamatória excessiva com libertação de uma grande quantidade de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-10, IL-1, TNF e IFN- γ), a chamada tempestade de citocinas (Mangalmurti *et al.*, 2020; Pinheiro *et al.*, 2021).

As citocinas representam uma parte essencial do processo inflamatório que decorre na resposta imune inata, sendo produzidas por várias células imunitárias incluindo

macrófagos, DCs, células NK, B e T. Durante a resposta imune inata, os PRRs reconhecem estruturas moleculares características do SARS-CoV-2, designadas por PAMPs. A ligação dos recetores aos PAMPs vai desencadear o início da resposta inflamatória contra o vírus, promovendo a ativação de várias vias de sinalização e também de fatores de transcrição (Ragab *et al.*, 2020). Por sua vez, os fatores de transcrição induzem a expressão de genes que codificam citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e moléculas de adesão. Esta sequência de eventos resulta no recrutamento de leucócitos e proteínas plasmáticas para o local da infeção, desempenhando várias funções efetoras para combater a infeção (Ragab *et al.*, 2020).

As três citocinas pró-inflamatórias mais importantes da resposta imune inata são a IL-1, a IL-6 e o TNF- α , cuja sua principal fonte são os macrófagos tecidulares, mastócitos, células endoteliais e epiteliais (Ragab *et al.*, 2020). A tempestade de citocinas resulta de um aumento agudo dos níveis circulantes de diferentes citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-1, TNF- α e IFN), promovendo o influxo de várias células imunitárias da circulação para o local da infeção, podendo provocar danos locais e/ou sistémicos. Assim, o gatilho que desencadeia este evento é o desenvolvimento de uma resposta imune exacerbada que resulta na ativação e expansão contínua de células imunitárias (macrófagos e linfócitos) que produzem grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias (Ragab *et al.*, 2020).

A lesão pulmonar é uma das consequências da tempestade de citocinas e pode progredir para lesão pulmonar aguda ou para a sua forma mais grave, a síndrome da dificuldade respiratória aguda (ARDS). A ARDS provoca diminuição dos níveis de saturação de oxigénio que constitui uma das principais causas de morte por COVID-19 (Ragab *et al.*, 2020). As manifestações clínicas desenvolvem-se a nível sistémico, cardíaco, renal e hepático, sendo que nos casos mais extremos da doença pode ocorrer falência de múltiplos órgãos e em última instância a morte (Tay *et al.*, 2020; Mirtaleb *et al.*, 2021). Assim, a tempestade de citocinas representa uma condição crítica de risco de vida que requer internamento dos doentes nos cuidados intensivos e está associada a uma elevada mortalidade (Figura 4). Os resultados clínicos associados a este evento são atribuídos à ação das citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6, IL-18, IFN- γ e TNF- α (Ragab *et al.*, 2020). Os níveis de concentração de IL-6 encontram-se aumentados em doentes com COVID-19 associados a uma maior taxa de mortalidade. Deste modo, as

abordagens terapêuticas com foco na tempestade de citocinas podem contribuir para a diminuição da morbidade e mortalidade da COVID-19 (Ragab *et al.*, 2020).

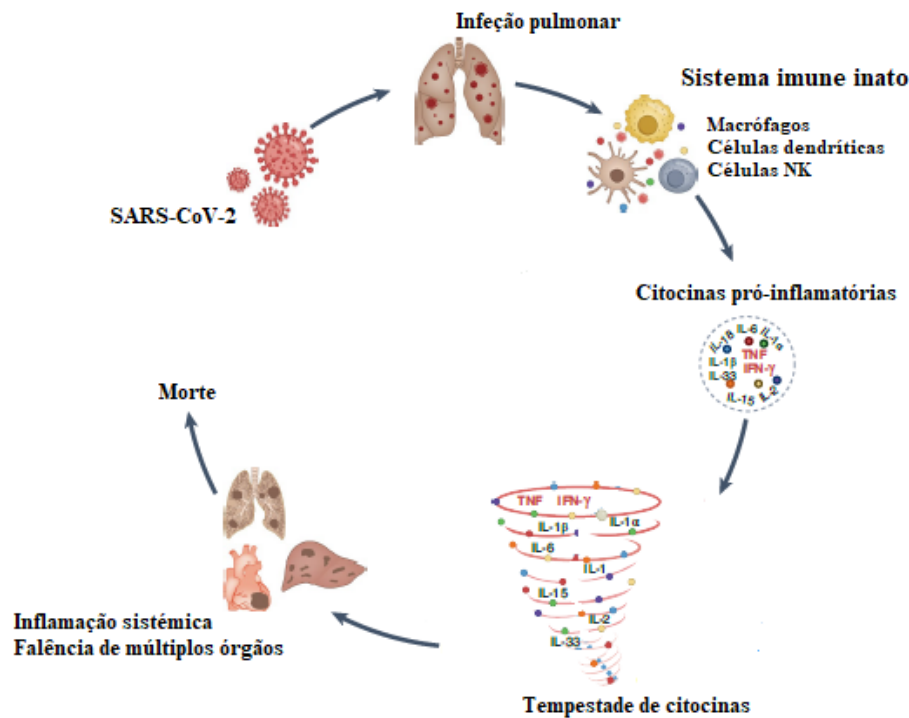


Figura 4. Tempestade de citocinas na infecção por SARS-CoV-2 (adaptado de Diamond *et al.*, 2022).

ii. Resposta imune adaptativa ao SARS-CoV-2

A resposta imune adaptativa é caracterizada por apresentar especificidade e diversidade assim como pela capacidade de gerar memória imunológica, sendo crucial para controlar e eliminar a infecção por SARS-CoV-2 (Li *et al.*, 2020). Ocorrem dois tipos distintos de respostas imunes adaptativas, a imunidade celular ou mediada por células T e imunidade humoral mediada por anticorpos (Abbas *et al.*, 2021).

O controle da infecção em doentes com doença assintomática ou ligeira deve-se à ação da resposta imune inata, em que a ativação não depende da ação dos linfócitos T. As formas graves da doença, por sua vez, podem ser devidas à falha de mecanismos de defesa não específicos de primeira linha e/ou ao desenvolvimento de uma resposta imune

adaptativa, que, se exacerbada, pode tornar-se patogénica para o hospedeiro (Boechat *et al.*, 2021).

No que diz respeito à imunidade celular, a resposta dos linfócitos T é uma componente chave da resposta imune adaptativa à infeção viral. Os linfócitos T citotóxicos ou T CD8+ são importantes porque apresentam uma função citotóxica específica para as células alvo do vírus, desempenhando um papel vital na eliminação e morte dessas mesmas células. Por sua vez, os linfócitos T auxiliares, T *helper* (Th) ou T CD4+, são cruciais para ativarem os linfócitos T CD8+ e para promoverem a produção de anticorpos específicos contra o vírus pela ativação dos linfócitos B. Além disso, são também responsáveis pela produção de citocinas que favorecem o recrutamento de outras células imunitárias (Li *et al.*, 2020; Boechat *et al.*, 2021).

As células apresentadoras de antígenos, nomeadamente os macrófagos e as DCs, estabelecem a ponte entre a imunidade inata e a adaptativa, sendo responsáveis por apresentar os peptídeos virais aos linfócitos T (Li *et al.*, 2020).

As respostas das células T específicas do SARS-CoV-2 foram identificadas em quase todos os doentes com COVID-19, sendo mais proeminentes as respostas das células T CD4+ comparativamente com as células T CD8+. Além disso, as células T CD4+ também têm sido associadas ao controlo da infeção viral primária (Sette *et al.*, 2021; Torbati *et al.*, 2021). A prevalência e magnitude das respostas destas células está relacionada com o nível de expressão de cada proteína do vírus, sendo as proteínas S, M e N os principais alvos (Sette *et al.*, 2021). As células T CD4+ têm a capacidade de se diferenciar em vários tipos de células em resposta ao SARS-CoV-2 exercendo funções auxiliares e efectoras. Estas células incluem os linfócitos Th1 que possuem atividade antiviral pela produção de IFN- γ e outras citocinas e os linfócitos T auxiliares foliculares que auxiliam a maturação dos linfócitos B e são essenciais para o desenvolvimento de anticorpos neutralizantes, assim como para promover a imunidade humoral a longo prazo (Sette *et al.*, 2021). A rápida indução destas células na COVID-19 foi associada a doença ligeira e a uma eliminação viral acelerada. Em contraste, a sua ausência prolongada foi associada a doença grave e em certos casos fatal (Sette *et al.*, 2021).

As células T CD8+ são essenciais para a eliminação da infeção viral, devido à sua capacidade de matar as células infetadas. Na infeção por SARS-CoV-2, a presença destas células está associada a uma melhoria da sintomatologia (Sette *et al.*, 2021). As respostas

das células T CD8+ específicas do vírus podem desenvolver-se rapidamente durante a fase aguda da COVID-19, apresentando elevados níveis de moléculas associadas a funções citotóxicas (IFN- γ , granzima B e perforina) (Sette *et al.*, 2021).

A linfopenia, caracterizada por uma baixa quantidade de linfócitos no sangue, tem sido descrita em doentes com COVID-19, sendo mais acentuada nas formas mais graves da doença (Fathi *et al.*, 2020). Desta forma, é considerada como um biomarcador da severidade da doença e um possível alvo de intervenção para minimizar a progressão da mesma (Azkur *et al.*, 2020). Os mecanismos pelos quais o SARS-CoV-2 induz a linfopenia não são totalmente conhecidos, mas são apontadas algumas possíveis causas relacionadas com a proliferação linfocitária reduzida, a apoptose das células T e também com a sua migração para os tecidos infetados (Moss, 2022).

A imunidade humoral é também importante no controlo da infeção viral, através da produção de anticorpos que conferem proteção contra a infeção por SARS-CoV-2. Após a infeção, os linfócitos B específicos do vírus diferenciam-se em plasmócitos que produzem anticorpos específicos para os antígenos virais (Torbati *et al.*, 2021). A resposta dos anticorpos pode ser dirigida a praticamente todas as proteínas virais, no entanto, as proteínas S e N são consideradas os principais alvos da resposta humoral (Carrillo *et al.*, 2021; Sette *et al.*, 2021). Os anticorpos produzidos contra o SARS-CoV-2 foram detetados em quase todos os doentes após a infeção (Torbati *et al.*, 2021). A resposta humoral segue uma sequência definida iniciada pela produção de imunoglobulinas (Igs). Deste modo, os anticorpos da classe IgA e IgM aparecem em primeiro lugar após a infeção inicial seguindo-se os da classe IgG que surgem mais tardiamente. Na COVID-19, a cinética da resposta humoral inicia-se por volta do 5º/6º dia após o início dos sintomas, sendo que na maioria dos casos, as IgM são detetáveis entre o 7º e o 10º dia e as IgG por volta do 10º até ao 20º dia (Guo *et al.*, 2020; Zhao *et al.*, 2020). Assim, os anticorpos da classe IgG específicos do SARS-CoV-2 permanecem mais tempo no organismo do que os da classe IgM, indicando um possível efeito protetor (Hosseini *et al.*, 2020). No entanto, a intensidade da resposta mediada pelas IgG parece estar relacionada não só com a carga viral, mas também com a gravidade da doença, dado que se verificou que indivíduos assintomáticos apresentaram níveis de IgG relativamente mais baixos quando comparados com indivíduos com sintomas mais severos (Boechat *et al.*, 2021).

Os anticorpos neutralizantes desempenham um importante papel protetor, uma vez que podem bloquear a entrada do vírus nas células hospedeiras, bloqueando a ligação da proteína S ao seu recetor (Wang *et al.*, 2021). Verificou-se também uma associação entre os níveis de anticorpos neutralizantes e a severidade da doença, dado que os indivíduos assintomáticos ou com sintomas ligeiros apresentam maior dificuldade em gerar uma resposta neutralizante (Sette *et al.*, 2021). Enquanto que os anticorpos neutralizantes parecem fornecer imunidade antiviral, os anticorpos específicos do SARS-CoV-2 podem facilitar a entrada do vírus através da ligação a partículas virais contribuindo assim, para o agravamento da doença. Este fenómeno pode induzir a apoptose das células imunitárias, levando ao desenvolvimento de uma cascata inflamatória, da linfopenia das células T e da tempestade de citocinas (Wang *et al.*, 2021).

2.6.3 Papel da vitamina D na infeção por SARS-CoV-2

O papel da vitamina D na regulação da resposta imune inata e adaptativa foi demonstrado pela descoberta do VDR em quase todas as células do sistema imune, verificando-se, assim, que esta vitamina apresenta uma ação imunomoduladora (Martens *et al.*, 2020). A COVID-19 está fortemente relacionada com o sistema imune, pelo que tem havido um interesse significativo no potencial papel da vitamina D nesta doença, no sentido de melhorar ou prevenir episódios de resposta imune exacerbada (Ghelani *et al.*, 2021). A vitamina D tem sido associada como sendo benéfica na infeção por SARS-CoV-2, permitindo reduzir as respostas inflamatórias locais e sistémicas e também as respostas das citocinas (Shah Alam *et al.*, 2021). Desta forma, a sua ação imunomoduladora promove a imunidade inata e inibe a imunidade adaptativa (Rivera *et al.*, 2020).

A $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ sintetizada a nível local, assume um papel importante na modulação do sistema imune inato através da ativação dos TLRs, que se encontram presentes nos macrófagos, monócitos e células epiteliais, principalmente do trato respiratório. Estes recetores são ativados após identificarem os PAMPs, libertando citocinas e peptídeos antimicrobianos, tais como as catelicidinas e as β -defensinas (Rivera *et al.*, 2020; Hadizadeh, 2021). Estes peptídeos são importantes na infeção por SARS-CoV-2, uma vez que podem prevenir a entrada do vírus nas células e atuar como inibidores da replicação viral (Chiu *et al.*, 2021). A ação antimicrobiana da catelicidina é crucial, no entanto, este peptídeo apresenta uma série de outras funções, como a estimulação da quimiotaxia de várias células imunitárias, indução de uma variedade de citocinas pró-inflamatórias,

indução da apoptose e autofagia das células epiteliais infetadas e ainda a ativação dos linfócitos B e T. As defensinas promovem alterações nas membranas microbianas, incluindo no envelope do SARS-CoV-2 (Bilezikian *et al.*, 2020; Shah Alam *et al.*, 2021).

A vitamina D também promove o aumento da fagocitose por parte dos macrófagos e exerce um efeito anti-inflamatório, por um lado ao reduzir a produção de citocinas pró-inflamatórias tais como o TNF- α , a IL-1 e a IL-6, e, por outro, ao aumentar a produção de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10 (Ghelani *et al.*, 2021; Albergamo *et al.*, 2022).

Em relação às DCs, a 1,25(OH)₂D desencadeia uma mudança para um fenótipo mais tolerogénico, atuando não só ao nível do processo de diferenciação como também na expressão de proteínas de superfície. Isto promove uma redução da apresentação de antígenos que é acompanhada por uma menor produção de IL-12, mas em contrapartida com um aumento da produção de IL-10 (Charoenngam *et al.*, 2020). A vitamina D também demonstrou modular a resposta das células NK diminuindo a expressão do IFN e reduzindo a atividade citotóxica (Ghelani *et al.*, 2021).

Como referido anteriormente, o efeito da 1,25(OH)₂D nas DCs atrasa o seu processo de maturação, o que resulta numa diminuição da sua capacidade de apresentação antigénica o que vai afetar o processo de diferenciação dos linfócitos (Bikle, 2022b). A 1,25(OH)₂D suprime a proliferação dos linfócitos T e modula a produção de citocinas por parte destas células, originando diversos efeitos nos diferentes subgrupos de linfócitos T (Th1, Th2, Th17 e T reguladores) (Charoenngam *et al.*, 2020). Deste modo, a vitamina D promove uma mudança no perfil imunológico, uma vez que inibe a diferenciação dos fenótipos Th1 e Th17 e promove o fenótipo Th2 (Ghelani *et al.*, 2021; Albergamo *et al.*, 2022). Como consequência desta mudança, a produção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-2, IFN- γ , TNF- α (Th1) e IL-17, IL-21 (Th17), provenientes destas células é inibida. Por outro lado, verifica-se um aumento da produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 pelos linfócitos Th2 (Charoenngam *et al.*, 2020).

A vitamina D pode ainda promover a diferenciação dos linfócitos T reguladores, o que permite suprimir o estado pró-inflamatório (Albergamo *et al.*, 2022). Este tipo de linfócitos é importante para induzir uma tolerância imunológica e possivelmente têm um

papel fundamental na prevenção da tempestade de citocinas associada à infecção por SARS-CoV-2 (Bikle, 2022a).

Relativamente à ação da vitamina D sobre os linfócitos B, esta vai inibir a formação de plasmócitos e induzir a apoptose tanto dos linfócitos B ativados como dos plasmócitos. Assim, promove a secreção de citocinas anti-inflamatórias (IL-10), que por sua vez suprimem a ativação dos linfócitos Th1 e conseqüentemente ocorre uma redução do processo inflamatório. Ao controlar a atividade dos linfócitos B e a sua transformação em plasmócitos, a vitamina D promove uma redução na produção autoanticorpos (Charoenngam *et al.*, 2020; Bae *et al.*, 2022).

Em suma, a vitamina D modula a resposta imune inata e adaptativa contra o SARS-CoV-2 por diversos mecanismos, como ilustrado na Figura 5. Entre estes destacam-se: (i) secreção de peptídeos antimicrobianos (catelicidinas e β -defensinas); (ii) ativação dos TLRs; (iii) promoção da fagocitose por parte dos macrófagos e indução da quimiotaxia; (iv) indução da apoptose e autofagia de células infetadas; (v) promoção de um estado anti-inflamatório pela diminuição de citocinas pró-inflamatórias e aumento de citocinas anti-inflamatórias; (vi) supressão da maturação das DCs enfraquecendo a apresentação antigénica; (vii) aumento da produção de citocinas anti-inflamatórias induzida pelos linfócitos Th2; (viii) promoção da eficácia dos linfócitos T reguladores; (ix) diminuição da proliferação dos linfócitos T; e (x) indução da apoptose dos linfócitos B e inibição da proliferação dos plasmócitos e secreção de imunoglobulinas (Chiu *et al.*, 2021; Panfili *et al.*, 2021; Singh *et al.*, 2021).

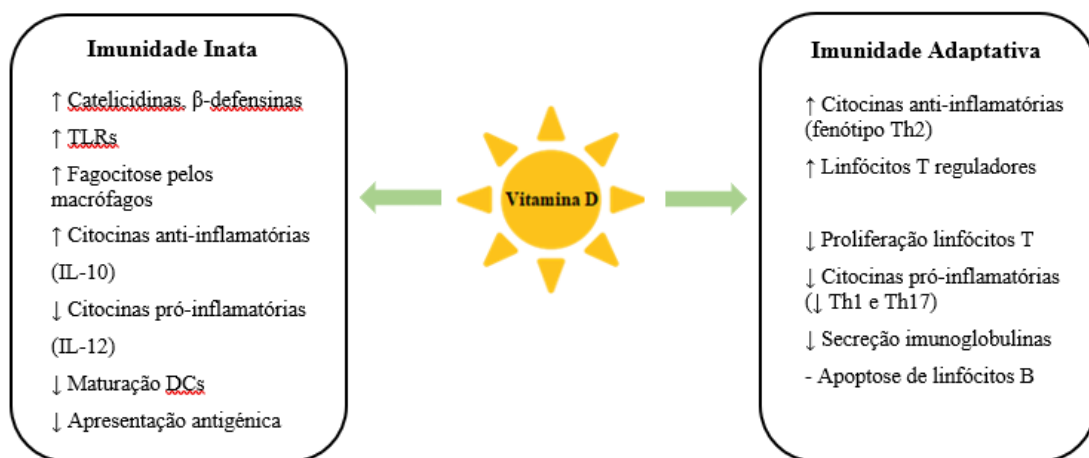


Figura 5. Possíveis mecanismos imunomoduladores da vitamina D envolvidos na resposta à infecção por SARS-Cov-2 (adaptado de Singh *et al.*, 2021).

Além dos efeitos imunomoduladores e anti-virais, a 1,25(OH)₂D também atua como modulador do eixo renina-angiotensina, regulando a expressão da ACE2, que é utilizada pelo SARS-CoV-2 como recetor de entrada na célula hospedeira (Charoenngam *et al.*, 2020). Na COVID-19, ocorre uma desregulação da ACE2, provocando uma acumulação tóxica de angiotensina II tendo como consequências a vasoconstrição, inflamação e apoptose, o que contribui para a ARDS (Ghelani *et al.*, 2021). Porém, verificou-se que a vitamina D atenua os efeitos que decorrem da interação do vírus com o eixo renina-angiotensina, atuando como um regulador endócrino negativo neste eixo, sendo capaz de promover vasodilatação e efeitos anti-inflamatórios, protegendo assim, contra lesões pulmonares agudas e a ARDS. O SARS-CoV-2 diminui a expressão da ACE2, enquanto a vitamina D aumenta a sua expressão (Albergamo *et al.*, 2022).

O potencial papel da vitamina D no tratamento ou gestão da COVID-19 é ainda complexo e dinâmico. No entanto, como descrito acima, a vitamina D é capaz de modular diferentes aspetos da resposta imune, com potencial para minorar a severidade dos sintomas e os resultados da COVID-19 (Ghelani *et al.*, 2021). A gravidade desta doença está fortemente associada com o desenvolvimento da tempestade de citocinas. Tendo em conta o efeito anti-inflamatório da vitamina D, coloca-se a hipótese de que uma hipovitaminose D possa estar relacionada com o desenvolvimento de complicações, nomeadamente a hospitalização e os cuidados intensivos (Albergamo *et al.*, 2022). De facto, os estudos observacionais realizados em doentes com COVID-19 mostraram que a deficiência/insuficiência de vitamina D está associada a um pior prognóstico da doença (Pizzini *et al.*, 2020; Saponaro *et al.*, 2021; Robeck *et al.*, 2022; Voelkle *et al.*, 2022). Deste modo, a suplementação com vitamina D tem sido proposta como uma possível abordagem preventiva ou terapêutica (Albergamo *et al.*, 2022), o que motivou a realização de ensaios clínicos randomizados no intuito de analisar a eficácia da suplementação de vitamina D nos resultados clínicos de COVID-19. Os dados desses ensaios estão sumariados na Tabela 1. A seriação dos artigos foi baseada nas evidências apenas em ensaios clínicos que relacionassem a suplementação de vitamina D na COVID-19, utilizando um filtro temporal de 01/01/2020 a 31/08/2022.

Tabela 1. Características dos ensaios clínicos avaliando os efeitos da suplementação de vitamina D em doentes com COVID-19.

| AUTORES | TIPO DE ESTUDO | AMOSTRA | OBJETIVOS | MÉTODOS | RESULTADOS |
|----------------------------------|----------------------------|--|---|--|---|
| (Annweiler <i>et al.</i> , 2021) | Estudo quase-experimental | n= 95 idosos hospitalizados com COVID-19 | Determinar se a suplementação com vitamina D ₃ tomada antes ou durante a COVID-19 está associada a melhor sobrevivência a 3 meses em idosos hospitalizados com COVID-19 | <u>Grupo 1:</u> suplementação oral de vitamina D ₃ antes ou após o diagnóstico de COVID-19 <u>Grupo 2:</u> sem suplementação antes ou após o diagnóstico de COVID-19 | <ul style="list-style-type: none"> Sobrevivência a 3 meses de 76,1% no grupo de intervenção, em comparação com apenas 53,6% no grupo sem suplementação com vitamina D₃ ($p=0,03$) |
| (Maghbooli <i>et al.</i> , 2021) | Ensaio clínico randomizado | n=106 doentes hospitalizados com COVID-19 (rácio 1:1) | Investigar a eficácia terapêutica da 25(OH)D ₃ na melhoria dos níveis séricos de vitamina D em doentes com COVID-19 com deficiência/insuficiência em vitamina D (< 30 ng/mL) | <u>Grupo 1:</u> dose oral de 25 µg de 25(OH)D ₃ (calcifediol) uma vez por dia durante 30 dias <u>Grupo 2:</u> placebo | <ul style="list-style-type: none"> Tendência para menor tempo de hospitalização no grupo 1, mas não foi estatisticamente significativo ($p=0,1$) Sem diferenças significativas nas admissões na UCI, necessidade de ventilação, e taxa de mortalidade entre os grupos Aumento significativo na percentagem de linfócitos no grupo 1 ($p=0,03$) |
| (Murai <i>et al.</i> , 2021) | Ensaio clínico randomizado | n=240 adultos hospitalizados com COVID-19 moderada a grave (rácio 1:1) | Investigar o efeito de uma única dose elevada de vitamina D ₃ no tempo de internamento hospitalar de pacientes com COVID-19 e outros desfechos clínicos | <u>Grupo 1:</u> dose oral única de 200000 UI de vitamina D ₃ <u>Grupo 2:</u> placebo | <ul style="list-style-type: none"> O tempo de hospitalização não foi significativamente diferente entre os grupos ($p=0,62$) A suplementação com vitamina D₃ não reduziu significativamente a mortalidade hospitalar ($p=0,43$), a admissão na UCI ($p=0,30$) ou a necessidade de ventilação mecânica ($p=0,09$) |

O papel da vitamina D na resposta imune ao SARS-CoV-2

| | | | | | |
|---------------------------------|--|---|--|--|--|
| (Sabico et al., 2021) | Ensaio clínico multicêntrico e randomizado | <i>n</i> =69 adultos hospitalizados com COVID-19 leve a moderada | Comparar o efeito da suplementação oral com vitamina D ₃ na dose de 5000 UI versus 1000 UI na recuperação de pacientes com sintomas leves a moderados de COVID-19 com vitamina D subótima | <u>Grupo 1:</u> dose oral de vitamina D ₃ 5000 UI uma vez por dia durante 2 semanas <u>Grupo 2:</u> controlo; dose oral de vitamina D ₃ 1000 UI uma vez por dia durante 2 semanas | <ul style="list-style-type: none"> • Aumento significativo dos níveis de 25(OH)D apenas no grupo 1 (<i>p</i>=0,003) • Tempo de recuperação da tosse foi significativamente menor no grupo 1 (<i>p</i>=0,007), tal como na recuperação do paladar (<i>p</i>=0,035) • Diminuição significativa dos níveis de IL-6 em ambos os grupos (<i>p</i><0,05) |
| (Elamir et al., 2022) | Estudo piloto de ensaio clínico randomizado | <i>n</i> = 50 pacientes hospitalizados com COVID-19 (rácio 1:1) | Investigar o potencial benefício da terapia com calcitriol em pacientes hospitalizados com COVID-19 | <u>Grupo 1:</u> dose oral de 0,5 µg de calcitriol por dia durante 14 dias ou até alta hospitalar <u>Grupo 2:</u> controlo; sem suplementação | <ul style="list-style-type: none"> • O tempo de hospitalização não foi significativamente diferente entre os grupos (5,5 (±3,9) dias no grupo do calcitriol e 9,24 (±9,4) dias no grupo controlo; <i>p</i>=0,14) • Melhoria na oxigenação entre os pacientes do grupo 1 comparativamente ao grupo 2 (<i>p</i>=0,0305) |
| (Fernandes et al., 2022) | Análise exploratória de resultados secundários de ensaio clínico randomizado | <i>n</i> = 240 doentes hospitalizados COVID-19 moderada a grave (rácio 1:1) | Investigar o efeito de uma única dose elevada de vitamina D ₃ nas citocinas, quimiocinas, e fator de crescimento em doentes hospitalizados com COVID-19 moderada a grave | <u>Grupo 1:</u> dose oral única de 200000 UI de vitamina D ₃ <u>Grupo 2:</u> placebo (veículo) | <ul style="list-style-type: none"> • Aumento significativo das concentrações médias de 25(OH)D no grupo 1 (<i>p</i><0,001) • Sem diferenças significativas entre os grupos para os níveis de IL-1β, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-17A, IFN-γ, TNF-α, IL-8, IP-10, MIP-1β, MCP-1, e VEGF, e para contagem de leucócitos |
| (Karonova et al., 2022) | Ensaio clínico randomizado | <i>n</i> = 129 pacientes hospitalizados com COVID-19 | Avaliar os efeitos da suplementação com colexaliferol sobre as características clínicas e marcadores inflamatórios em doentes com COVID-19 | <u>Grupo 1:</u> bolús de 50000 UI de vitamina D ₃ no 1º e 8º dia de hospitalização <u>Grupo 2:</u> controlo; sem suplementação | <ul style="list-style-type: none"> • Diferenças significativas no 9º dia de hospitalização entre os grupos nos níveis de 25(OH)D (<i>p</i> < 0,001) • No grupo 1, a contagem de neutrófilos e linfócitos foi significativamente mais elevada (<i>p</i>=0,04; <i>p</i>=0,02), enquanto o nível de proteína C-reativa foi significativamente mais baixo no 9º dia de hospitalização (<i>p</i>=0,02) |

O papel da vitamina D na resposta imune ao SARS-CoV-2

| | | | | | |
|---------------------------------------|--|--|--|---|---|
| (Mariani et al., 2022) | Ensaio clínico multicêntrico e randomizado | n= 218 pacientes hospitalizados com COVID-19 leve a moderada | Avaliar se a suplementação com vitamina D ₃ pode evitar o agravamento respiratório entre os pacientes hospitalizados com COVID-19 | <u>Grupo 1:</u> dose oral única de 500000 UI de vitamina D ₃ <u>Grupo 2:</u> placebo | <ul style="list-style-type: none"> Os níveis de 25(OH)D foram de 102 ng/mL e 30 ng/mL, para o grupo da vitamina D₃ e placebo, respetivamente ($p=0,001$) Sem diferenças significativas entre os grupos na distribuição das alterações no rSOFA ($p=0,825$) O tempo médio de hospitalização não foi significativamente diferente entre os dois grupos ($p=0,614$) |
| (Sharif-Askari et al., 2022) | Ensaio clínico randomizado | n= 45 doentes hospitalizados com COVID-19 severa | Avaliar a capacidade da vitamina D para atenuar as respostas inflamatórias em doentes com COVID-19 grave | <u>Grupo 1:</u> dose de 50000 UI de vitamina D ₃ por semana durante 3 semanas <u>Grupo 2:</u> controlo; sem suplementação | <ul style="list-style-type: none"> Níveis circulatórios mais baixos de citocinas pró-inflamatórias no grupo 1 foram associados a níveis séricos mais baixos de marcadores de gravidade relacionados com a COVID-19, tais como D-dímero e proteínas C-reativas ($p < 0,001$) Tempo de internamento hospitalar significativamente menor no grupo suplementado em comparação ao grupo controlo ($p=0,01$) |
| (Torres et al., 2022) | Ensaio clínico randomizado | n= 85 adultos hospitalizados com pneumonia devido à COVID-19 | Avaliar o efeito da suplementação com colecalciferol em combinação com o regime terapêutico padrão em doentes hospitalizados com pneumonia devido à COVID-19 | <u>Grupo 1:</u> dose oral de 10000 UI de vitamina D ₃ por dia durante 14 dias <u>Grupo 2:</u> comparação; dose oral de 2000 UI de vitamina D ₃ por dia durante 14 dias | <ul style="list-style-type: none"> Aumento significativo das concentrações médias de 25(OH)D no grupo 1 em comparação ao grupo 2 (29 ng/mL no grupo 1 versus 19 ng/mL no grupo 2; $p < 0,0001$) Tempo de hospitalização em doentes que desenvolveram ARDS foi de 8 dias no grupo 1 e de 29,2 dias no grupo 2 ($p=0,0381$) Aumento da citocina anti-inflamatória IL-10 |
| (Villasis-Keever et al., 2022) | Ensaio clínico randomizado | n= 321 trabalhadores da linha da frente em unidades COVID-19 | Determinar a eficácia e segurança da suplementação de vitamina D na prevenção da infeção por SARS-CoV-2 em indivíduos altamente expostos | <u>Grupo 1:</u> dose oral de 4000 UI de vitamina D ₃ por dia durante 30 dias <u>Grupo 2:</u> placebo | <ul style="list-style-type: none"> Taxa de infeção por SARS-CoV-2 foi mais baixa no grupo suplementado comparativamente ao grupo placebo (6,4% vs. 24,5%, $p < 0,001$) O risco de adquirir infeção foi menor no grupo suplementado sendo associado a um aumento dos níveis séricos de 25(OH)D₃ independentemente da deficiência de vitamina D |

Pela análise da tabela anterior, pode-se verificar que nem todos os estudos apoiam a suplementação de vitamina D na COVID-19. Alguns estudos evidenciaram que a suplementação levou ao aumento dos níveis séricos de 25(OH)D (Sabico *et al.*, 2021; Fernandes *et al.*, 2022; Torres *et al.*, 2022), redução do tempo de hospitalização (Sharif-Askari *et al.*, 2022; Torres *et al.*, 2022), melhoria dos resultados clínicos (Annweiler *et al.*, 2021; Elamir *et al.*, 2022; Villasis-Keever *et al.*, 2022), melhoria da resposta imune (Maghbooli *et al.*, 2021; Karonova *et al.*, 2022; Sharif-Askari *et al.*, 2022; Torres *et al.*, 2022), enquanto outros não encontram benefícios na sua utilização (Murai *et al.*, 2021; Mariani *et al.*, 2022).

No ensaio clínico realizado por Sabico *et al.*, constatou-se que a suplementação com 5000 UI de vitamina D₃, mesmo por um curto período de tempo, foi eficaz como terapia adjuvante em doentes com COVID-19 com níveis subótimos de vitamina D. No entanto, é necessário ter em consideração que a deficiência de vitamina D foi observada em 55% dos casos (sem diferença entre grupos; $p=0,1$), enquanto os restantes doentes apresentavam insuficiência de vitamina D (Sabico *et al.*, 2021). Noutro ensaio clínico, realizado na população idosa, a suplementação com vitamina D₃ antes ou durante a COVID-19 foi associada a uma melhor taxa de sobrevivência após 3 meses em idosos com a doença, o que corrobora a suplementação como tratamento adjuvante na infeção por SARS-CoV-2 (Annweiler *et al.*, 2021). O estudo piloto de Elamir *et al.* ilustra uma melhoria significativa da oxigenação em doentes hospitalizados com COVID-19 tratados com calcitriol, podendo este ser um possível candidato no tratamento de doentes que desenvolvem doença moderada a grave. Porém, estes autores sugerem a necessidade de um ensaio aleatório maior (Elamir *et al.*, 2022). Para investigar o papel da vitamina D na prevenção da doença, o ensaio clínico conduzido por Villasis-Keever *et al.* envolveu os trabalhadores da linha da frente. Demonstrou-se que a suplementação com vitamina D foi eficaz na prevenção da infeção por SARS-CoV-2 em indivíduos altamente expostos. De notar que o efeito protetor observado da vitamina D foi independente das concentrações basais de 25(OH)D (Villasis-Keever *et al.*, 2022).

Alguns ensaios clínicos avaliaram também a resposta do sistema imune à suplementação. O estudo de Maghbooli *et al.* indicou que a utilização diária de 25 µg de calcifediol resultou numa melhoria da resposta imune, verificada, por exemplo através do aumento da percentagem de linfócitos na circulação sanguínea (Maghbooli *et al.*, 2021).

Também Sharif-Askari *et al.* demonstraram no seu estudo que a vitamina D desempenha um papel imunomodulador na infecção por SARS-CoV-2, tendo encontrado níveis reduzidos de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-17 e IL-1) no grupo suplementado (Sharif-Askari *et al.*, 2022). No mesmo seguimento, Karonova *et al.*, constataram que o aumento da concentração de 25(OH)D causado pela suplementação de vitamina D em doentes com deficiência/insuficiência desta vitamina, pode afetar positivamente o sistema imune (níveis mais elevados de linfócitos e neutrófilos e diminuição de marcadores de inflamação) e, por conseguinte, o curso da COVID-19. Este estudo corrobora a suplementação com colecalciferol como tratamento adjuvante em doentes com COVID-19 (Karonova *et al.*, 2022). Foram ainda descobertos níveis aumentados da citocina anti-inflamatória IL-10, o que pode contribuir para diminuir o estado inflamatório característico das formas mais graves da doença (Torres *et al.*, 2022).

Por outro lado, os estudos de Mariani *et al.* e Murai *et al.* falharam em mostrar evidências da eficácia da vitamina D₃ no tratamento da COVID-19. Em ambos os estudos foi testada uma dose única e elevada de vitamina D₃ que não impediu o agravamento respiratório de doentes com COVID-19 de sintomatologia ligeira a moderada, quando comparado com o grupo placebo (Mariani *et al.*, 2022), ou o tempo de internamento ou mortalidade hospitalar da COVID-19 moderada a grave (Murai *et al.*, 2021).

Em suma, é difícil estabelecer uma correlação significativa entre a suplementação com vitamina D e o decurso da COVID-19, dado que existem várias variáveis a ter em consideração. As diferenças encontradas nos estudos acima referidos podem estar relacionadas com os diferentes desenhos experimentais, envolvendo a participação de doentes com características diferentes (por exemplo, idade, níveis séricos de vitamina D, estado clínico, outras comorbidades), intervenções com diferentes preparados de vitamina D (colecalciferol, calcifediol e calcitriol), doses e tempos de suplementação.

2.7 Recomendações do uso de vitamina D em Portugal

Como já foi referido, o melhor indicador para avaliar o nível de vitamina D no organismo é a determinação da concentração sérica de 25(OH)D, uma vez que esta representa a principal forma circulante desta vitamina (Chang *et al.*, 2019).

Vários estudos realizados na população portuguesa estimaram uma enorme prevalência de níveis séricos subótimos ou deficientes de vitamina D, o que levou a Direção Geral da Saúde (DGS) a emitir a 14 de agosto de 2019 a Norma nº 0014/2019 referente à “Prevenção e Tratamento das Deficiências de Vitamina D” (Bettencourt *et al.*, 2018; Duarte *et al.*, 2020). Os níveis séricos de 25(OH)D podem ser classificados em níveis deficientes, insuficientes e normais, embora não exista um consenso nesta classificação (Holick, 2017). Em Portugal, foram definidos nesta norma clínica, os valores das concentrações plasmáticas de 25(OH)D para estabelecer a deficiência ou insuficiência de vitamina D, tanto para a idade adulta como para a idade pediátrica (Tabela 2) (Direção-Geral da Saúde, 2019).

Tabela 2. Classificação dos níveis séricos de 25(OH)D em Portugal (Direção-Geral da Saúde, 2019).

| Classificação | Níveis séricos de 25(OH)D | |
|------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| | Idade adulta | Idade pediátrica |
| Deficiência de vitamina D | < 50 nmol/L (ou 20 ng/mL) | < 30 nmol/L (ou 12 ng/mL) |
| Insuficiência de vitamina D | 50-75 nmol/L (ou 20-30 ng/mL) | 30-50 nmol/L (ou 12-20 ng/mL) |
| Suficiência de vitamina D | ≥ 75 nmol/L (ou 30 ng/mL) | ≥ 50 nmol/L (ou 20 ng/mL) |

No entanto, a norma clínica refere que o parâmetro de doseamento da 25(OH)D não deve ser incluído nas análises laboratoriais de rotina, sendo apenas considerado nas situações descritas na Tabela 3 (Direção-Geral da Saúde, 2019).

Tabela 3. Situações clínicas para o doseamento da 25(OH)D no adulto (Direção-Geral da Saúde, 2019).

| Situações clínicas para o doseamento da 25(OH)D |
|---|
| a) Idade superior a 65 anos a viver em unidades de internamento de cuidados continuados de longa duração (superior a 90 dias) com baixa exposição solar |
| b) Pessoas com fatores de risco documentados para deficiência e insuficiência de vitamina D <ul style="list-style-type: none"> • Exposição solar limitada • Síndrome de má absorção intestinal • Insuficiência renal crónica |
| c) Histórico de alterações metabólicas congénitas ou adquiridas do metabolismo do cálcio e da vitamina D |
| d) História prévia, conhecida, de deficiência de vitamina D |
| e) Condições de saúde ou exames sugestivos de deficiência de vitamina D |

A suplementação vitamínica deve ser iniciada em casos de deficiência confirmada de vitamina D e também noutras situações descritas na Tabela 4 (Direção-Geral da Saúde, 2019).

Tabela 4. Recomendações para a suplementação vitamínica (Direção-Geral da Saúde, 2019).

| Situação Clínica | Dose recomendada | Observações |
|--|------------------|--|
| Crianças saudáveis até aos 12 meses | 400 UI/dia | Independente do tipo de alimentação |
| Raquitismo de causa nutricional em crianças (12 meses até 10 anos de idade) | 2000 UI/dia | Período mínimo de 3 meses |
| Adultos e idosos até aos 70 anos | 600 UI/dia | Com deficiência de vitamina D confirmada |
| Idosos com mais de 70 anos | 800 UI/dia | Com deficiência de vitamina D confirmada |
| Situação de maior gravidade clínica (fratura, osteoporose) | 1000-2000 UI/dia | Exceionalmente, 50000 UI/semana durante 8 semanas, seguida de 50000 UI a cada 2 semanas durante 6 anos |

Todas as doses recomendadas devem ser administradas por via oral e a dose máxima diária de vitamina D é de 4000 UI devido ao risco de efeitos secundários (Direção-Geral da Saúde, 2019).

No que diz respeito aos doentes com COVID-19, a referência que existe em Portugal é Orientação nº 021/2020 “COVID-19: Terapêutica nutricional no doente com COVID-19”, emitida a 6 de abril de 2020 e posteriormente atualizada a 18 de fevereiro de 2021, elaborada pelo Programa Nacional para a Promoção da Alimentação Saudável da DGS em conjunto com a Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto, a Sociedade Portuguesa de Cuidados Intensivos, o Grupo de Infecção e Sépsis e a Ordem dos Nutricionistas. Esta orientação refere que os doentes com COVID-19 devem ser suplementados com vitamina D, caso apresentem deficiência documentada, ou seja, uma concentração sérica de 25(OH)D inferior a 50 nmol/L ou inferior a 20 ng/mL (Direção-Geral da Saúde, 2020).

No entanto, importa notar que os serviços nacionais de saúde de alguns países como a Inglaterra e a Irlanda recomendaram a suplementação de vitamina D às pessoas que se encontravam em confinamento imposto pela COVID-19, sobretudo às mais idosas (Ferder *et al.*, 2020) (NICE, 2022).

2.8 Avaliação do consumo de vitamina D em Portugal na pandemia

Atendendo ao referido papel da vitamina D na infeção por SARS-CoV-2 e à recomendação de suplementação desta vitamina aos doentes com COVID-19 com deficiência documentada, nesta dissertação pretendeu-se avaliar os padrões de consumo desta vitamina em Portugal durante a pandemia da COVID-19. Para tal foram utilizados os dados da HMR relativos a medicamentos com a denominação comum internacional “colecalférol” dispensados em farmácias comunitárias portuguesas nos períodos pré-pandémicos (2018 a 2019) e pandémicos (2020 e 2021). A recolha da informação teve por base o número de embalagens de medicamentos sujeitos a receita médica (MSRM) e não sujeitos a receita médica (MNSRM) dispensadas em 2517 farmácias o que corresponde a 87% do universo das farmácias portuguesas (HMR, 2022). Os dados obtidos foram tratados e analisados, e são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Número de embalagens de medicamentos contendo colecalciferol dispensadas em farmácias comunitárias portuguesas nos anos de 2018 a 2021.

| SUBSTÂNCIAS ATIVAS | 2018 | 2019 | 2020 | 2021 | % variação 2018/2021 |
|--|------------------|------------------|------------------|------------------|---------------------------------|
| Colecalciferol | 1.047.214 | 1.082.845 | 1.267.347 | 1.942.039 | 85,4 |
| Carbonato de cálcio + Colecalciferol | 658339 | 699586 | 717313 | 752682 | 14,3 |
| Ácido alendrónico + Colecalciferol | 521108 | 506826 | 480658 | 473219 | -9,2 |
| Ácido ibandrónico + Colecalciferol | 0 | 0 | 7879 | 31256 | - |
| Retinol + Colecalciferol | 8.022 | 9.009 | 8.899 | 614 | -92,3 |
| Vitaminas complexo B + Ácido ascórbico + Colecalciferol + Retinol | 4.628 | 5.668 | 5.954 | 8.063 | 74,2 |
| Gluconato de cálcio + Hidrogenofostato de cálcio + Colecalciferol | 9.213 | 8.803 | 9.879 | 7.671 | -16,7 |
| Hidrogenofostato de cálcio + Colecalciferol | 295 | 14 | 0 | 1 | - |
| Fosfato tricálcio + Colecalciferol | 1 | 0 | 0 | 0 | - |
| Colecalciferol + Resorcinol + Retinol e outras associações | 0 | 1 | 0 | 0 | - |
| Pidolato cálcio + Colecalciferol | 0 | 0 | 1 | 0 | - |
| Outros | 22.159 | 23.495 | 32.612 | 47.605 | 114,8 |
| TOTAL | 2.248.820 | 2.312.752 | 2.497.930 | 3.215.545 | 43,0 |

Para uma mais fácil compreensão destes dados, apresentam-se na Tabela 6 as indicações terapêuticas e os nomes dos medicamentos contendo colecalciferol comercializados em Portugal (INFARMED, 2022).

Verifica-se que as indicações terapêuticas são diversas, sendo que as associações são mais indicadas para o tratamento da osteoporose. Importa aqui referir que o medicamento mais relacionado com o efeito da pandemia da COVID-19 é o que contém colecalciferol como único princípio ativo, dado que é o único indicado para a prevenção e tratamento da deficiência de vitamina D, e de facto observou-se um aumento significativo de 85,4% na sua dispensa nos anos pandémicos em análise (Tabela 5).

Tabela 6. Indicações terapêuticas e nomes comerciais dos medicamentos contendo colecalciferol comercializados em Portugal (INFARMED, 2022).

| SUBSTÂNCIAS ATIVAS | INDICAÇÃO TERAPÊUTICA | NOME COMERCIAL |
|---|---|---|
| Colecalciferol | Prevenção e tratamento da deficiência de vitamina D | Vigantol ¹ ; Deltius ¹ ; Molinar ¹ ; Egostar ¹ |
| Carbonato de cálcio + Colecalciferol | Correção da carência combinada de vitamina D e cálcio; adjuvante no tratamento da osteoporose | Ideos ¹ ; Densical D ¹ , Demilos ¹ ; Calcitab D ¹ |
| Ácido alendrónico + Colecalciferol | Tratamento da osteoporose pós-menopáusia em doentes em risco de insuficiência de vitamina D; redução do risco de fraturas vertebrais e da anca | Fosavance ¹ ; Adroavance ¹ |
| Ácido ibandronico + Colecalciferol | Terapêutica de substituição no tratamento da osteoporose pós-menopáusia em mulheres com risco de insuficiência de vitamina D e risco aumentado de fratura | Tenossis ¹ |
| Retinol + Colecalciferol | Pomada cicatrizante indicada nos acamados e nas assaduras dos bebés, nas queimaduras e eczemas, acne e para acelerar a cicatrização | Vitamina A composta Labesfal ² (em rutura) |
| Vitaminas complexo B + Ácido ascórbico + Colecalciferol + Retinol | Prevenção e tratamento de estados de carência vitamínica | Dagravit 8 ² |
| Gluconato de cálcio + Hidrogenofostato de cálcio + Colecalciferol | Prevenção e tratamento de estados de carência em cálcio | Dagravit D Calcium ² |

¹MSRM: medicamento sujeito a receita médica; ²MNSRM: medicamento não sujeito a receita médica

Relativamente aos outros medicamentos que contêm na sua composição a substância ativa colecalciferol, verificou-se que estes apresentaram variações diversas ao longo dos quatro anos em estudo, o que pode ser explicado pelo facto de serem usados para outras indicações terapêuticas que não a prevenção e tratamento da deficiência de vitamina D. No entanto, verificou-se um aumento de 74,2% do medicamento contendo “vitaminas complexo B + ácido ascórbico + colecalciferol + retinol”, podendo estar relacionado com a COVID-19 dado que é indicado para a prevenção e tratamento de estados de carência vitamínica em geral.

Os restantes medicamentos que não se encontram na tabela 6 deixaram de ser comercializados, como por exemplo o Decalcit® (hidrogenofostato de cálcio + colecalciferol). De notar que alguns medicamentos contendo apenas colecalciferol foram introduzidos no mercado recentemente, como é o caso do Pravid® (AIM a 07/11/2018) e do Devik® (AIM a 26/10/2019) (INFARMED, 2022). Segundo os dados da HMR, o

Pravid® começou a ser vendido pelas farmácias portuguesas em junho de 2019 e o Devik® em junho de 2020.

III. CONCLUSÕES

O recente surto pandémico causado pela infeção por SARS-CoV-2 despoletou o interesse da comunidade científica pelo papel da vitamina D no sistema imune e pelo potencial da sua suplementação em doentes com COVID-19.

A COVID-19 é uma doença complexa na qual o sistema imune assume um papel vital no combate à infeção provocada pelo vírus. Atualmente sabe-se que a gravidade desta doença e as taxas de mortalidade são maiores nas populações com elevado risco de deficiência e insuficiência de vitamina D, que são sobretudo os idosos e doentes crónicos. Esta vitamina desempenha um papel imunomodulador importante, podendo contribuir para uma resposta adequada à infeção por SARS-CoV-2. Entre as propriedades imunomoduladoras da vitamina D que podem estar associadas a um efeito benéfico na infeção por SARS-CoV-2 incluem-se: (i) reforço da resposta imune inata ao promover a secreção de peptídeos antimicrobianos, tais como as catelicidinas e as β -defensinas responsáveis pelo recrutamento várias células imunitárias para o local da infeção, promovendo a eliminação e clearance do vírus através da apoptose/autofagia das células epiteliais infetadas; (ii) promoção do aumento da fagocitose pelos macrófagos e exerce um efeito anti-inflamatório ao reduzir a produção de citocinas pró-inflamatórias e ao aumentar a produção de citocinas anti-inflamatórias; (iii) modulação da resposta imune adaptativa através de um processo de limitação da maturação de DCs que vai diminuir a sua capacidade de apresentação antigénica aos linfócitos T, alterando assim o fenótipo das células T efectoras pró-inflamatórias Th1 e Th17 e promoção da diferenciação de células Th2 e Treg que vão ser responsáveis pela inibição do processo pró-inflamatório; e (iv) prevenção da tempestade de citocinas através da diminuição de citocinas pró-inflamatórias.

Importa ainda referir que os dados apresentados neste trabalho revelaram o forte impacto da pandemia nos padrões de consumo de medicamentos contendo vitamina D em Portugal, com um aumento na ordem dos 85% na dispensa de medicamentos contendo colicalciferol como princípio ativo único. Este resultado demonstra ainda o papel do farmacêutico comunitário como profissional na primeira linha de contacto com a população numa situação de surto ou epidemia.

Atendendo à reconhecida importância fisiológica da vitamina D e o facto de uma fração considerável da população portuguesa ter níveis séricos subótimos ou deficientes desta vitamina, é premente que seja dada mais atenção à deficiência desta vitamina na prática médica e farmacêutica. Atualmente não existe evidência científica que justifique o doseamento sérico da 25(OH)D tanto no rastreio como na prevenção primária da deficiência de vitamina D. Deste modo, o farmacêutico comunitário assume um papel importante no contexto de saúde pública, promovendo por um lado a educação para a saúde no sentido de prevenir a deficiência e insuficiência de vitamina D, destacando as medidas não farmacológicas, nomeadamente a ingestão de alimentos que contenham vitamina D (ovos e peixes gordos como a sardinha e o salmão) e a exposição solar moderada, e por outro o uso responsável dos medicamentos contendo vitamina D. Embora a terapia com vitamina D seja bem tolerada e considerada segura, com estudos revelando que o tratamento a longo prazo com doses até 10.000 UI diárias não está associado a toxicidade, a suplementação com preparações de vitamina D deve ser devidamente monitorizada por profissionais de saúde.

De uma maneira geral, os estudos observacionais realizados em doentes com COVID-19 e alguns ensaios clínicos randomizados mostraram a importância da suplementação com vitamina D na redução da gravidade da doença e do tempo de internamento hospitalar de doentes com carência desta vitamina. No entanto, alguns ensaios clínicos apresentaram resultados muito insatisfatórios, não encontrando qualquer benefício na suplementação. Deste modo, as evidências sobre os efeitos da suplementação no contexto da pandemia da COVID-19 são inconclusivas, sendo necessário a realização ensaios clínicos controlados e de larga escala (amostra representativa da população) para se apurar a eficácia da suplementação da vitamina D na prevenção e/ou tratamento da infeção por SARS-CoV-2, bem como da dose terapêutica ótima e a segurança desta.

IV. BIBLIOGRAFIA

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H. e Pillai, S. (2021). *Cellular and Molecular Immunology, 10th Edition-South Asia Edition - E-Book*. Elsevier Health Sciences.
- Agostinis, C. *et al.* (2021). COVID-19, Pre-Eclampsia, and Complement System. *Front Immunol*, 12, pp. 775168.
- Alanagreh, L., Alzoughool, F. e Atoum, M. (2020). The Human Coronavirus Disease COVID-19: Its Origin, Characteristics, and Insights into Potential Drugs and Its Mechanisms. *Pathogens*, 9(5), pp. 331.
- Albergamo, A., Apprato, G. e Silvagno, F. (2022). The Role of Vitamin D in Supporting Health in the COVID-19 Era. *Int J Mol Sci*, 23(7), pp. 3621.
- Alves, M. *et al.* (2013). Vitamina D—importância da avaliação laboratorial. *Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo*, 8(1), pp. 32-39.
- Annweiler, C. *et al.* (2021). Vitamin D supplementation prior to or during COVID-19 associated with better 3-month survival in geriatric patients: Extension phase of the GERIA-COVID study. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 213, pp. 105958.
- Arcanjo, A. *et al.* (2020). The emerging role of neutrophil extracellular traps in severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (COVID-19). *Scientific Reports*, 10(1), pp. 19630.
- Azkur, A. K. *et al.* (2020). Immune response to SARS-CoV-2 and mechanisms of immunopathological changes in COVID-19. *Allergy*, 75(7), pp. 1564-1581.
- Bae, J. H. *et al.* (2022). Association of vitamin D status with COVID-19 and its severity : Vitamin D and COVID-19: a narrative review. *Rev Endocr Metab Disord*, 23(3), pp. 579-599.
- Bettencourt, A. *et al.* (2018). Serum 25-hydroxyvitamin D levels in a healthy population from the North of Portugal. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 175, pp. 97-101.
- Bikle, D. D. (2014). Vitamin D metabolism, mechanism of action, and clinical applications. *Chem Biol*, 21(3), pp. 319-329.
- Bikle, D. D. (2022a). Vitamin D Regulation of Immune Function. *Curr Osteoporos Rep*, 20(3), pp. 186-193.
- Bikle, D. D. (2022b). Vitamin D regulation of immune function during covid-19. *Rev Endocr Metab Disord*, 23(2), pp. 279-285.
- Bilezikian, J. P. *et al.* (2020). MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: Vitamin D and COVID-19. *Eur J Endocrinol*, 183(5), pp. R133-R147.
- Birra, D. *et al.* (2020). COVID 19: a clue from innate immunity. *Immunol Res*, 68(3), pp. 161-168.
- Boechat, J. L. *et al.* (2021). The immune response to SARS-CoV-2 and COVID-19 immunopathology - Current perspectives. *Pulmonology*, 27(5), pp. 423-437.
- Borges, R. C., Hohmann, M. S. e Borghi, S. M. (2021). Dendritic cells in COVID-19 immunopathogenesis: insights for a possible role in determining disease outcome. *Int Rev Immunol*, 40(1-2), pp. 108-125.
- Câmara, J. *et al.* (2021). Vitamina D: uma revisão narrativa. *Brazilian Journal of Health Review*, 4(2), pp. 5904-5020.
- Carrillo, J. *et al.* (2021). Humoral immune responses and neutralizing antibodies against SARS-CoV-2; implications in pathogenesis and protective immunity. *Biochem Biophys Res Commun*, 538, pp. 187-191.
- Cashman, K. D. (2020). Vitamin D Deficiency: Defining, Prevalence, Causes, and Strategies of Addressing. *Calcif Tissue Int*, 106(1), pp. 14-29.

- Catarino, A., Claro, C. e Viana, I. (2017). Vitamina D – Perspetivas Atuais. *Revista da Sociedade Portuguesa de Dermatologia e Venereologia*, 74, pp. 345-353.
- Chang, S. W. e Lee, H. C. (2019). Vitamin D and health - The missing vitamin in humans. *Pediatr Neonatol*, 60(3), pp. 237-244.
- Charoenngam, N. e Holick, M. F. (2020). Immunologic Effects of Vitamin D on Human Health and Disease. *Nutrients*, 12(7), pp. 2097.
- Chiu, S. K. *et al.* (2021). Putative Role of Vitamin D for COVID-19 Vaccination. *Int J Mol Sci*, 22(16), pp. 8988.
- Cui, J., Li, F. e Shi, Z. L. (2019). Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat Rev Microbiol*, 17(3), pp. 181-192.
- de la Guía-Galipienso, F. *et al.* (2021). Vitamin D and cardiovascular health. *Clin Nutr*, 40(5), pp. 2946-2957.
- Deluca, H. F. (2014). History of the discovery of vitamin D and its active metabolites. *Bonekey Rep*, 3, pp. 479.
- Dhokal, B. P. *et al.* (2020). SARS-CoV-2 Infection and Cardiovascular Disease: COVID-19 Heart. *Heart Lung Circ*, 29(7), pp. 973-987.
- Diachkova, E. *et al.* (2021). Vitamin D and Its Role in Oral Diseases Development. Scoping Review. *Dent J (Basel)*, 9(11), pp. 129.
- Diamond, M. S. e Kanneganti, T. D. (2022). Innate immunity: the first line of defense against SARS-CoV-2. *Nat Immunol*, 23(2), pp. 165-176.
- Direção Geral da Saúde. (2019). Prevenção e Tratamento da Deficiência de Vitamina D. [Em linha]. Disponível em <<https://normas.dgs.min-saude.pt/2019/08/14/prevencao-e-tratamento-da-deficiencia-de-vitamina-d/>>. [Consultado em 22/01/2022].
- Dominguez, L. J. *et al.* (2021). Vitamin D Sources, Metabolism, and Deficiency: Available Compounds and Guidelines for Its Treatment. *Metabolites*, 11(4), pp. 255.
- Duarte, C. *et al.* (2020). Prevalence of vitamin D deficiency and its predictors in the Portuguese population: a nationwide population-based study. *Arch Osteoporos*, 15(1), pp. 36.
- Džopalić, T., Božić-Nedeljković, B. e Jurišić, V. (2021). The role of vitamin A and vitamin D in modulation of the immune response with a focus on innate lymphoid cells. *Cent Eur J Immunol*, 46(2), pp. 264-269.
- Elamir, Y. M. *et al.* (2022). A randomized pilot study using calcitriol in hospitalized COVID-19 patients. *Bone*, 154, pp. 116175.
- Fathi, N. e Rezaei, N. (2020). Lymphopenia in COVID-19: Therapeutic opportunities. *Cell Biol Int*, 44(9), pp. 1792-1797.
- Ferder, L. *et al.* (2020). Vitamin D supplementation as a rational pharmacological approach in the COVID-19 pandemic. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 319(6), pp. L941-L948.
- Fernandes, A. L. *et al.* (2022). Effect of a single high dose of vitamin D3 on cytokines, chemokines, and growth factor in patients with moderate to severe COVID-19. *Am J Clin Nutr*, 115(3), pp. 790-798.
- Gallardo-Zapata, J. e Maldonado-Bernal, C. (2022). Natural killer cell exhaustion in SARS-CoV-2 infection. *Innate Immun*, 28(6), pp. 189-198.
- Ghelani, D., Alesi, S. e Mousa, A. (2021). Vitamin D and COVID-19: An Overview of Recent Evidence. *Int J Mol Sci*, 22(19), pp. 10559.
- Gil, Á., Plaza-Diaz, J. e Mesa, M. D. (2018). Vitamin D: Classic and Novel Actions. *Ann Nutr Metab*, 72(2), pp. 87-95.

- Guo, L. *et al.* (2020). Profiling Early Humoral Response to Diagnose Novel Coronavirus Disease (COVID-19). *Clin Infect Dis*, 71(15), pp. 778-785.
- Gustine, J. N. e Jones, D. (2021). Immunopathology of Hyperinflammation in COVID-19. *Am J Pathol*, 191(1), pp. 4-17.
- Hadizadeh, F. (2021). Supplementation with vitamin D in the COVID-19 pandemic? *Nutr Rev*, 79(2), pp. 200-208.
- Hassan, S. A. *et al.* (2020). Coronavirus (COVID-19): A Review of Clinical Features, Diagnosis, and Treatment. *Cureus*, 12(3), pp. e7355.
- Hill, T. R., Granic, A. e Aspray, T. J. (2018). Vitamin D and Ageing. *Subcell Biochem*, 90, pp. 191-220.
- Hoffmann, M. *et al.* (2020). SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*, 181(2), pp. 271-280.e278.
- Holick, M. F. (2017). The vitamin D deficiency pandemic: Approaches for diagnosis, treatment and prevention. *Rev Endocr Metab Disord*, 18(2), pp. 153-165.
- Hosseini, A. *et al.* (2020). Innate and adaptive immune responses against coronavirus. *Biomed Pharmacother*, 132, pp. 110859.
- INFARMED. (2022). Pesquisa de Medicamentos. [Em linha]. Disponível em <<https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/>>. [Consultado em 22/01/2022].
- Jackson, C. B. *et al.* (2022). Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 23(1), pp. 3-20.
- Jäpelt, R. B. e Jakobsen, J. (2013). Vitamin D in plants: a review of occurrence, analysis, and biosynthesis. *Front Plant Sci*, 4, pp. 136.
- Jones, G. (2018). The discovery and synthesis of the nutritional factor vitamin D. *Int J Paleopathol*, 23, pp. 96-99.
- Karonova, T. L. *et al.* (2022). Effect of Cholecalciferol Supplementation on the Clinical Features and Inflammatory Markers in Hospitalized COVID-19 Patients: A Randomized, Open-Label, Single-Center Study. *Nutrients*, 14(13), pp. 2602.
- Kim, Y.-M. e Shin, E.-C. (2021). Type I and III interferon responses in SARS-CoV-2 infection. *Experimental & Molecular Medicine*, 53(5), pp. 750-760.
- Kirtipal, N., Bharadwaj, S. e Kang, S. G. (2020). From SARS to SARS-CoV-2, insights on structure, pathogenicity and immunity aspects of pandemic human coronaviruses. *Infect Genet Evol*, 85, pp. 104502.
- Kumar, M. e Al Khodor, S. (2020a). Pathophysiology and treatment strategies for COVID-19. *J Transl Med*, 18(1), pp. 353.
- Kumar, R. *et al.* (2021a). Putative roles of vitamin D in modulating immune response and immunopathology associated with COVID-19. *Virus Res*, 292, pp. 198235.
- Kumar, S. *et al.* (2020b). Morphology, Genome Organization, Replication, and Pathogenesis of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)*, pp. 23-31.
- Kumar, S. e Saxena, S. K. (2021b). Structural and molecular perspectives of SARS-CoV-2. *Methods*, 195, pp. 23-28.
- Kurtovic, L. e Beeson, J. G. (2021). Complement Factors in COVID-19 Therapeutics and Vaccines. *Trends Immunol*, 42(2), pp. 94-103.
- Kutner, A. e Brown, G. (2018). Vitamins D: Relationship between Structure and Biological Activity. *Int J Mol Sci*, 19(7), pp. 2119.
- Lee, S., Channappanavar, R. e Kanneganti, T. D. (2020). Coronaviruses: Innate Immunity, Inflammasome Activation, Inflammatory Cell Death, and Cytokines. *Trends Immunol*, 41(12), pp. 1083-1099.

- Li, G. *et al.* (2020). Coronavirus infections and immune responses. *J Med Virol*, 92(4), pp. 424-432.
- Lichtenstein, A. *et al.* (2013). Vitamina D: ações extraósseas e uso racional. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 59(5), pp. 495-506.
- Maghbooli, Z. *et al.* (2021). Treatment With 25-Hydroxyvitamin D(3) (Calcifediol) Is Associated With a Reduction in the Blood Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio Marker of Disease Severity in Hospitalized Patients With COVID-19: A Pilot Multicenter, Randomized, Placebo-Controlled, Double-Blinded Clinical Trial. *Endocr Pract*, 27(12), pp. 1242-1251.
- Mangalmurti, N. e Hunter, C. A. (2020). Cytokine Storms: Understanding COVID-19. *Immunity*, 53(1), pp. 19-25.
- Mariani, J. *et al.* (2022). High-dose vitamin D versus placebo to prevent complications in COVID-19 patients: Multicentre randomized controlled clinical trial. *PLoS One*, 17(5), pp. e0267918.
- Martens, P. J. *et al.* (2020). Vitamin D's Effect on Immune Function. *Nutrients*, 12(5), pp. 1248.
- Martins e Silva, J. (2007). [Brief history of rickets and of the discovery of vitamin D]. *Acta Reumatol Port*, 32(3), pp. 205-229.
- Maucourant, C. *et al.* (2020). Natural killer cell immunotypes related to COVID-19 disease severity. *Sci Immunol*, 5(50), pp. eabd6832.
- Medrano, M. *et al.* (2018). Vitamin D: Effect on Haematopoiesis and Immune System and Clinical Applications. *Int J Mol Sci*, 19(9), pp. 2663.
- Mirtaleb, M. S. *et al.* (2021). Potential therapeutic agents to COVID-19: An update review on antiviral therapy, immunotherapy, and cell therapy. *Biomed Pharmacother*, 138, pp. 111518.
- Mittal, A. *et al.* (2020). COVID-19 pandemic: Insights into structure, function, and hACE2 receptor recognition by SARS-CoV-2. *PLoS Pathog*, 16(8), pp. e1008762.
- Miyasaka, M. (2021). COVID-19 and immunity: quo vadis? *Int Immunol*, 33(10), pp. 507-513.
- Molaei, S. *et al.* (2021). The immune response and immune evasion characteristics in SARS-CoV, MERS-CoV, and SARS-CoV-2: Vaccine design strategies. *Int Immunopharmacol*, 92, pp. 107051.
- Mortaz, E. *et al.* (2020). The Immune Response and Immunopathology of COVID-19. *Front Immunol*, 11, pp. 2037.
- Moss, P. (2022). The T cell immune response against SARS-CoV-2. *Nature Immunology*, 23(2), pp. 186-193.
- Murai, I. H. *et al.* (2021). Effect of a Single High Dose of Vitamin D3 on Hospital Length of Stay in Patients With Moderate to Severe COVID-19: A Randomized Clinical Trial. *Jama*, 325(11), pp. 1053-1060.
- Narni-Mancinelli, E. e Vivier, E. (2021). Clues that natural killer cells help to control COVID. *Nature*, 600(7888), pp. 226-227.
- NICE (National Institute for Health and Care Excellence). (2022) COVID-19 rapid guideline: vitamin D. NICE guideline [Em linha]. Disponível em <www.nice.org.uk/guidance/ng187>. [Consultado em 22/01/2022].
- Ning, S. *et al.* (2021). SARS-CoV-2: Origin, Evolution, and Targeting Inhibition. *Front Cell Infect Microbiol*, 11, pp. 676451.
- Norman, A. W. (2012). The history of the discovery of vitamin D and its daughter steroid hormone. *Ann Nutr Metab*, 61(3), pp. 199-206.

- Oliveira, L. *et al.* (2020). Resposta Imune Contra O SARS-CoV-2. *Rev IPI*, 7(2), pp. 83-103.
- Panfili, F. M. *et al.* (2021). Possible role of vitamin D in Covid-19 infection in pediatric population. *J Endocrinol Invest*, 44(1), pp. 27-35.
- Park, A. e Iwasaki, A. (2020). Type I and Type III Interferons - Induction, Signaling, Evasion, and Application to Combat COVID-19. *Cell Host Microbe*, 27(6), pp. 870-878.
- Peng, M. Y. *et al.* (2021). Immunological Aspects of SARS-CoV-2 Infection and the Putative Beneficial Role of Vitamin-D. *Int J Mol Sci*, 22(10), pp. 5251.
- Pereira, F. e Almeida, M. (2008). Vitamina D: Uma verdadeira hormona. *Nutricias*, 8, pp. 42-47.
- Pilz, S. *et al.* (2016). Vitamin D and cardiovascular disease prevention. *Nat Rev Cardiol*, 13(7), pp. 404-417.
- Pilz, S. *et al.* (2019). Vitamin D testing and treatment: a narrative review of current evidence. *Endocr Connect*, 8(2), pp. R27-R43.
- Pinheiro, M. M., Fabbri, A. e Infante, M. (2021). Cytokine storm modulation in COVID-19: a proposed role for vitamin D and DPP-4 inhibitor combination therapy (VIDPP-4i). *Immunotherapy*, 13(9), pp. 753-765.
- Pizzini, A. *et al.* (2020). Impact of Vitamin D Deficiency on COVID-19-A Prospective Analysis from the CovILD Registry. *Nutrients*, 12(9), pp. 2775.
- Priehl, B. *et al.* (2013). Vitamin D and immune function. *Nutrients*, 5(7), pp. 2502-2521.
- Ragab, D. *et al.* (2020). The COVID-19 Cytokine Storm; What We Know So Far. *Front Immunol*, 11, pp. 1446.
- Ramasamy, I. (2020). Vitamin D Metabolism and Guidelines for Vitamin D Supplementation. *Clin Biochem Rev*, 41(3), pp. 103-126.
- Rivera, M. *et al.* (2020). Efectos inmunológicos de la vitamina D en COVID-19- Immunological effects of vitamin D on COVID-19. *Rev Endocr Metab Disord*, 7(2), pp. 94-98.
- Robeck, R. S., Moore, A. e Gendron, B. (2022). The Relationship of Serum 25-Hydroxyvitamin D at Admission and Severity of Illness in COVID-19 Patients. *Med J (Ft Sam Houst Tex)*, (Per 22-07/08/09), pp. 54-60.
- Robson, F. *et al.* (2020). Coronavirus RNA Proofreading: Molecular Basis and Therapeutic Targeting. *Mol Cell*, 79(5), pp. 710-727.
- Ruenjaiman, V., Hirankarn, N. e Palaga, T. (2021). Innate immunity in COVID-19: Drivers of pathogenesis and potential therapeutic targets. *Asian Pac J Allergy Immunol*, 39(2), pp. 69-77.
- Sabico, S. *et al.* (2021). Effects of a 2-Week 5000 IU versus 1000 IU Vitamin D3 Supplementation on Recovery of Symptoms in Patients with Mild to Moderate Covid-19: A Randomized Clinical Trial. *Nutrients*, 13(7), pp. 2170.
- Saponaro, F. *et al.* (2021). Is There a Crucial Link Between Vitamin D Status and Inflammatory Response in Patients With COVID-19? *Front Immunol*, 12, pp. 745713.
- Saponaro, F., Saba, A. e Zucchi, R. (2020). An Update on Vitamin D Metabolism. *Int J Mol Sci*, 21(18), pp. 6573.
- Sassi, F., Tamone, C. e D'Amelio, P. (2018). Vitamin D: Nutrient, Hormone, and Immunomodulator. *Nutrients*, 10(11), pp. 1656.
- Sette, A. e Crotty, S. (2021). Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. *Cell*, 184(4), pp. 861-880.
- Shah Alam, M. *et al.* (2021). The role of vitamin D in reducing SARS-CoV-2 infection: An update. *Int Immunopharmacol*, 97, pp. 107686.

- Sharif-Askari, F. S. *et al.* (2022). Vitamin D modulates systemic inflammation in patients with severe COVID-19. *Life Sci*, 307, pp. 120909.
- Singh, S. *et al.* (2021). Evidences suggesting a possible role of Vitamin D in COVID 19: The missing link. *Indian J Pharmacol*, 53(5), pp. 394-402.
- Sofi, M. S., Hamid, A. e Bhat, S. U. (2020). SARS-CoV-2: A critical review of its history, pathogenesis, transmission, diagnosis and treatment. *Biosaf Health*, 2(4), pp. 217-225.
- Tay, M. Z. *et al.* (2020). The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nat Rev Immunol*, 20(6), pp. 363-374.
- Torbati, E., Krause, K. L. e Ussher, J. E. (2021). The Immune Response to SARS-CoV-2 and Variants of Concern. *Viruses*, 13(10), pp. 1911.
- Torres, M. *et al.* (2022). Changes in the immune response against SARS-CoV-2 in individuals with severe COVID-19 treated with high dose of vitamin D. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 150, pp. 112965.
- van Eeden, C. *et al.* (2020). Natural Killer Cell Dysfunction and Its Role in COVID-19. *Int J Mol Sci*, 21(17), pp. 6351.
- Villasis-Keever, M. A. *et al.* (2022). Efficacy and Safety of Vitamin D Supplementation to Prevent COVID-19 in Frontline Healthcare Workers. A Randomized Clinical Trial. *Arch Med Res*, 53(4), pp. 423-430.
- Voelkle, M. *et al.* (2022). Prevalence of Micronutrient Deficiencies in Patients Hospitalized with COVID-19: An Observational Cohort Study. *Nutrients*, 14(9), pp. 1862.
- Wang, C. *et al.* (2021). The Impact of SARS-CoV-2 on the Human Immune System and Microbiome. 3(1), pp. 14-21.
- Wang, M. Y. *et al.* (2020). SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. *Front Cell Infect Microbiol*, 10, pp. 587269.
- Wei, R. e Christakos, S. (2015). Mechanisms Underlying the Regulation of Innate and Adaptive Immunity by Vitamin D. *Nutrients*, 7(10), pp. 8251-8260.
- Yadav, R. *et al.* (2021). Role of Structural and Non-Structural Proteins and Therapeutic Targets of SARS-CoV-2 for COVID-19. *Cells*, 10(4), pp. 821.
- Zhao, J. *et al.* (2020). Antibody Responses to SARS-CoV-2 in Patients With Novel Coronavirus Disease 2019. *Clin Infect Dis*, 71(16), pp. 2027-2034.