

Suplementação e uso terapêutico de vitamina D nos pacientes com esclerose múltipla: Consenso do Departamento Científico de Neuroimunologia da Academia Brasileira de Neurologia

Doralina Guimarães Brum¹, Elizabeth Regina Comini-Frota², Cláudia Cristina F. Vasconcelos³, Elza Dias-Tosta⁴

RESUMO

A esclerose múltipla (EM) é uma doença inflamatória, autoimune, desmielinizante e degenerativa do sistema nervoso central. Estudos epidemiológicos têm identificado associações de hipovitaminose D com doenças autoimunes. O principal objetivo desta revisão é responder se há evidências que indiquem o uso terapêutico de vitamina D em monoterapia para pacientes com EM. Por meio dos sites PUBMED, EM-BASE, LILACS e Scielo foram realizadas buscas usando os descritores “vitamin D”, e “multiple sclerosis” até 12/09/2013. Estudos clínicos randomizados, controlados e duplo-cegos foram selecionados para avaliar a resposta terapêutica da vitamina D na EM. Não foram encontradas evidências científicas que justifiquem o uso da vitamina D em monoterapia no tratamento da EM, na prática clínica.

Palavras-chave: Vitamina D, esclerose múltipla, encefalite autoimune experimental.

O uso terapêutico da vitamina D para tratamento da esclerose múltipla (EM) é assunto polêmico que interessa aos médicos, pesquisadores e pacientes. O Departamento Científico de Neuroimunologia (DCNI) da Academia Brasileira de Neurologia (ABN) promoveu reunião no dia 12/09/2013, na qual foram discutidos os aspectos básicos do metabolismo da vitamina D, resultados de estudos *in vitro* e experimentais na encefalomielite autoimune experimental (EAE), e estudos clínicos controlados com vitamina D na EM. Os neurologistas e pesquisadores participantes da reunião desenvolveram e

aprovaram consenso acerca de normas para orientar os neurologistas brasileiros no cuidado de pacientes com EM.

VITAMINA D, EM E EAE

A vitamina D é um importante hormônio para a homeostase do cálcio e o metabolismo ósseo¹. Em adição a essa ação no tecido ósseo, há evidências de que a vitamina D tenha papel na diferenciação celular, inibição do crescimento celular

¹Departamento de Neurologia, Psicologia e Psiquiatria, Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu SP, Brasil;

²Hospital das Clínicas, Faculdade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte MG, Brasil;

³Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro RJ, Brasil;

⁴Hospital de Base do Distrito Federal, Brasília DF, Brasil.

Correspondência: Doralina G. Brum. Departamento de Neurologia, Psicologia e Psiquiatria da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista - UNESP. Distrito de Rubião Júnior, s/n CEP 18.618-970 – Botucatu SP, Brasil. E-mail: dbrum@fmb.unesp.br

Suporte: Este consenso foi desenvolvido com apoio financeiro da Academia Brasileira de Neurologia. Nenhum dos autores recebeu honorários por sua participação.

Conflito de interesses: A Academia Brasileira de Neurologia (ABN) se compromete a produzir consensos clínicos de maneira crítica e independente. Este consenso faz parte das atividades de educação continuada da ABN e se baseia na avaliação de conhecimentos científicos e clínicos. Ela não pretende esgotar o tema. A decisão de tratamento é assunto compartilhado pelo paciente e seu médico dentro de um contexto.

Lista dos colaboradores Membros da Academia Brasileira de Neurologia/ Departamento Científico de Neuroimunologia: Amilton Antunes Barreira, Antônio Pereira Gomes Neto, Cláudio Roberto Carneiro, Carlos Augusto de Albuquerque Damasceno, Daniel Lima Varela, Damácio Ramón Kaimen-Maciél, Denis Bernardi Bichuetti, Denise Sisterolli Diniz, Eber Castro Correa, Elizabeth Batista da Silva, Fabio Siquineli, Fernando Coronetti Gomes da Rocha, Felipe von Glehn Silva, Fernando Faria Andrade Figueira, Gutemberg Augusto Cruz dos Santos, Heloise Helena de Figueiredo Siqueira, Jefferson Becker, Leandro Cortoni Calia, José Mauricio Godoy Barreiros, Luiz Domingos Mendes Melges, Marcos Aurélio Moreira, Marcos Papais-Alvarenga, Maria Cecília Aragon de Vecino, Maria Cristina Brandão de Giacomo, Maria Fernanda Mendes, Maria Lúcia Brito Ferreira, Maria Lúcia Vellutini Pimentel, Monica Koncke Fiuza Parolin, Nívea de Macedo Oliveira Morales, Osvaldo J.M. do Nascimento, Paulo Pereira Christo, Regina Maria Papais Alvarenga, Renata Brandt, Renato Puppi Munhoz, Rogério de Rizo Morales, Sidney Gomes, Solange Maria das G. G. Camargo, Soniza Vieira Alvez-Leon, Suzana Costa Nunes Machado, Tarso Adoni, Thereza Cristina D'Avila Winckler, Thiago de Faria Junqueira, Yara Dadalti Fragoso, Yuna de Ribeiro Araújo.

Colaboradores externos: Alessandro Farias (pesquisador), Eduardo Antônio Donadi (Imunologista) e Marcelo de Paula Corrêa (Meteorologista).

Received 10 January 2014; Accepted 20 January 2014.

e modulação do sistema imune². A principal fonte de vitamina D é a exposição à radiação ultravioleta B (R-UV) (95%). Ainda não há consenso entre as várias sociedades científicas sobre os níveis séricos de vitamina D ideais para as necessidades do metabolismo humano^{3,4}. Nos últimos anos, têm sido identificadas associações da vitamina D com doenças autoimunes e neoplasias⁵, porém essas ainda não foram totalmente elucidadas.

A EM é uma doença inflamatória, autoimune, desmielinizante e degenerativa do sistema nervoso central (SNC), que apresenta distribuição geográfica e étnica caracterizada por prevalência maior nos países do hemisfério norte, particularmente na população de origem caucasiana⁶.

Considerando o clima predominantemente temperado no hemisfério norte, com períodos de pouca radiação solar e prevalência relativamente alta de hipovitaminose D, constatada em estudos populacionais⁷, a hipótese é de que essa deficiência poderia explicar a distribuição geográfica da EM. Adicionalmente, postulou-se que concentração sérica adequada de vitamina D poderia contribuir para a redução de risco de desenvolvimento da EM^{8,9}.

A etiologia da EM ainda não foi completamente elucidada, embora existam evidências de que fatores genéticos^{10,11} e ambientais¹² interajam para o desenvolvimento da doença. Entre os principais fatores ambientais estudados, os que apresentam mais forte evidência de associação com a EM incluem determinados vírus¹³, tabagismo¹⁴ e hipovitaminose D^{15,16}. Esse último, particularmente, é importante no hemisfério norte onde ocorre uma nítida variação sazonal, com queda da radiação ultravioleta B no inverno, podendo acarretar maior prevalência de hipovitaminose D⁷. Algumas condições representam risco de desenvolver hipovitaminose D para a população geral, como longo tempo de permanência em ambiente interno, uso de filtro solar e pigmentação da pele^{17,18}. As limitações motoras associadas a fase mais tardia da EM podem contribuir para a ocorrência de hipovitaminose D nesse grupo de pacientes¹⁹.

No Brasil, diferente dos países do hemisfério norte, temos grande disponibilidade de radiação solar em quase todas as estações do ano e em todas as regiões. Essa condição pode ser suficiente para evitar hipovitaminose D em indivíduos saudáveis e expostos por intervalos de tempo relativamente curtos. Não temos estudos que comparem as diferentes regiões do Brasil, em termos de concentração sérica de vitamina D na população saudável. Foram realizados poucos estudos, em grupos de risco selecionados, que verificaram a concentração sérica de vitamina D.^{18,20}

Estudos experimentais iniciais evidenciaram papel imunomodulador da vitamina D sobre as células do sistema imune humano *in vitro*^{21,22} e no modelo experimental animal, a EAE^{23,24}. Estudo *in vitro* com células do sangue periférico de pacientes em uso de vitamina D evidenciou que níveis séricos acima de 40 ng/mL podem provocar ação moduladora

nas células do sistema imune²¹. Novos estudos estão em andamento para melhor compreensão desse efeito imunomodulador nas doenças autoimunes.

O principal objetivo desta revisão é responder se há evidências que indiquem o uso de vitamina D como monoterapia ou como adjuvante em pacientes com EM. Foram realizadas buscas para estudos publicados até 12 de setembro de 2013 nas bases de dados *PUBMED*, *EMBASE*, *COCHRANNE* E *LILACS*, utilizando os descritores “multiple sclerosis”, “vitamin D” e “clinical trial”. Foram incluídos nesta análise estudos clínicos randomizados e controlados com vitamina D em pacientes com EM.

ESTUDOS CLÍNICOS RANDOMIZADOS E CONTROLADOS COM VITAMINA D NO TRATAMENTO DA EM

Nesta revisão para avaliar a resposta terapêutica da vitamina D em pacientes com EM, foram selecionados estudos clínicos randomizados, controlados e duplo-cegos^{25,26-28}. Esses ainda são escassos na literatura científica mundial, e a maioria deles não foi delineada para avaliar a resposta terapêutica. Novos estudos sobre esse tema estão em andamento e poderão contribuir para melhor definição do papel da vitamina D na EM. A seguir, abordaremos os estudos atuais mais relevantes.

Um estudo clínico desenvolvido na Finlândia, em 66 pacientes com EM remitente recorrente (EMRR), comparou dois grupos: um com 34 pacientes que usaram 20.000 UI/semana de vitamina D e mais o imunomodulador betainterferona 1B (IFN β -1b), e o outro com 32 pacientes que usaram exclusivamente IFN β -1b²⁵. Nesse estudo, os desfechos primários avaliados foram segurança, tolerância e o número de lesões captantes de gadolínio e de lesões novas em sequência ponderada T2 à ressonância magnética (RM). Desfechos secundários incluíram parâmetros clínicos - taxa anual de surtos e alterações no *EDSS* (*Expanded Disability Scale Score*), além de outros parâmetros de imagem. Ao final do estudo, não foram evidenciadas diferenças nos parâmetros clínicos entre os dois grupos após 12 meses. Houve, entretanto, redução significativa das lesões captantes de gadolínio no grupo de pacientes que usou betainterferona e vitamina D.

Outro estudo, conduzido na Noruega, comparou os parâmetros de densidade mineral óssea, frequência de surtos, progressão da doença e medidas da função motora em 70 pacientes com EM. Trinta e cinco pacientes usaram 20.000 UI de vitamina D3 (colecalférol) por semana associado a 500 mg/dia de cálcio, enquanto o outro grupo usou apenas 500 mg/dia de cálcio durante dois anos²⁶. Os pacientes de ambos os grupos já faziam uso de imunomoduladores, acetato de glatiramer ou betainterferona, por tempo semelhante. Não foram observadas diferenças entre o grupo que recebeu

vitamina D e o que não recebeu, quanto à taxa anual de surtos ou à modificação da capacidade funcional medida pelo EDSS. O estudo não apresentou poder estatístico adequado para detectar desfechos clínicos¹².

Um estudo fase II realizado no Irã comparou 25 pacientes com EMRR que receberam vitamina D na forma ativa (calcitriol ou 1,25(OH)D₃) na dose de 0,25 µg/dia com pacientes que receberam placebo²⁷. Ambos os grupos faziam uso de imunomoduladores convencionais. A comparação entre o grupo tratado e o grupo não tratado com vitamina D ativa não apresentou diferença quanto ao EDSS alcançado após 12 meses de seguimento¹³. Destaca-se a pequena casuística e o fato de que era critério de entrada no estudo ter níveis maiores que 40 ng/mL de vitamina D₃

Na Austrália, em estudo randomizado, 11 pacientes com EMRR foram tratados com vitamina D₂ na dose de 6.000 UI duas vezes ao dia, acrescida de mais uma dose de 1.000 UI/dia, e comparados a 12 pacientes que receberam somente a dose de 1.000 UI/dia²⁸. O índice de atividade inflamatória na RM do neuroeixo foi comparado entre os grupos de pacientes tratados com dose alta versus dose baixa. Não foram evidenciadas diferenças significantes entre os grupos.

A meta-análise dos trabalhos acima citados não evidenciou diferença entre os grupos em relação ao número de surtos²⁹. O número de lesões novas e de lesões captantes de gadolínio foram comparadas às concentrações séricas de vitamina D em dois outros estudos, e os achados foram conflitantes^{28,30}. Limitações dos estudos incluem diferentes posologias utilizadas e diferentes formas moleculares da vitamina D administradas.

Em contraste aos estudos epidemiológicos e experimentais, os estudos randomizados²⁵⁻²⁸ acerca do uso de vitamina D na EM não evidenciaram diferença significativa nos parâmetros de atividade da doença. Essas diferenças e contradições indicam a necessidade de realização de estudos randomizados, controlados e duplo-cegos, em grandes grupos de pacientes. Esses devem considerar as diferenças entre variáveis clínicas, de neuroimagem e imunológicas com poder estatístico para estimar com precisão a eficácia terapêutica e efeitos colaterais.

VITAMINA D E TÓPICOS DIVERSOS

Faixa de normalidade

O *Institute of Medicine (IOM)* e The *Endocrine Society (ES)* defendem diferentes níveis de vitamina D necessários para a manutenção da saúde óssea, respectivamente ≥ 20 ng/mL e ≥ 30 ng/mL³⁴. Não está definido se as células ósseas e as do sistema imune requerem concentrações diferentes ou similares de vitamina D. Em adição à ausência de consenso quanto aos valores da faixa de normalidade da

vitamina D, há também conflito quanto à concentração sérica considerada tóxica, e a dose que alcança essa condição. No adulto, doses maiores ou iguais a 10.000 UI/dia estão associadas à hipercalemia^{31,32}.

O método considerado padrão ouro para dosagem da concentração sérica de 25-OH vitamina D é a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) seguida de espectrometria de massa. Porém, a técnica é laboriosa e de custo elevado. Outros métodos, como quimiluminescência, imunoenensaio enzimático e radioimunensaio, também são utilizados. Pode ocorrer variabilidade dos resultados conforme o método utilizado³³. Determinados medicamentos como anticonvulsivantes e corticosteroides podem influenciar a redução da concentração sérica de vitamina D. A título de informação adicional, considerando a alta frequência de conversão entre as taxas utilizadas para referir-se à concentração de vitamina D, 1 ng/mL equivale a 2,496 nmol/ml.

Perfil de Segurança

O perfil de segurança de diferentes níveis séricos de vitamina D foi avaliado em um estudo que usou doses elevadas. Trata-se de um estudo aberto e randomizado, conduzido no Canadá³² no qual um grupo de 25 pacientes com EM usou doses escalonadas de até 40.000 UI/dia de vitamina D₃, enquanto o outro usou 4.000 UI/dia. Pacientes de ambos os grupos faziam uso concomitante de imunomoduladores (betainterferonas e acetato de glatiramer). A dose máxima de 40.000 UI/dia foi usada por até seis meses, seguida de 10.000 UI/dia por três meses e suspensão gradativa em três meses. Os dois grupos receberam 1200 mg de cálcio por dia, e as dosagens séricas de cálcio foram medidas. A concentração de vitamina D (25-OH-vitamina D) alcançou níveis superiores a 250 nmol/L ou 100 ng/mL, durante o período em que foram ministradas doses de 40.000 UI/dia. Durante o período do uso de 10.000 UI/dia de vitamina D, não foram detectados níveis de vitamina D ≥ 100 ng/mL ou hipercalemia, o que sugere ser esta uma dose segura (nível de evidência classe II). Os pacientes foram acompanhados com ultrassonografia renal e não foi evidenciada nefrolitíase. Tampouco os níveis de cálcio sérico e urinário e paratormônio se alteraram mesmo em períodos de concentração sérica mais elevada. Outros estudos são necessários para confirmar esses achados.

Vitamina D - Efeitos Colaterais

O quadro clínico de intoxicação por vitamina D pode apresentar sinais e sintomas diversos: náusea e vômito, anorexia, dor abdominal, obstipação; polidipsia, poliúria, desidratação, nefrolitíase, nefrocalcinose, *diabetes insipidus* nefrogênico, nefrite intersticial crônica, insuficiência renal aguda e crônica; hipotonia, parestesias, confusão mental, crise convulsiva, apatia, coma; arritmia, bradicardia, hipertensão, cardiomiopatia; fraqueza muscular, calcificação, osteoporose; calcificação conjuntival³⁴⁻³⁶. Hipercalemia é o mais

importante efeito colateral e quando observado laboratorialmente sugere intoxicação^{7,37}.

Durante o uso de vitamina D, além do cálcio sérico, o cálcio urinário pode ser dosado periodicamente. A concentração sérica do paratormônio (PTH) também deve ser verificada e não deve ultrapassar os valores inferiores de referência da normalidade, o que indicaria supressão, uma condição não recomendável³⁵.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando o conjunto de informações aqui apresentadas, o DCNI/ABN assume em consenso o seguinte:

1. É recomendado realizar dosagem de vitamina D nos pacientes com síndrome clinicamente isolada e EM, independentemente da fase da doença, sobretudo em pacientes que fazem uso frequente de corticosteroides ou anticonvulsivantes.
2. Níveis da vitamina D abaixo de 30 ng/mL no sangue periférico devem ser corrigidos nos pacientes com EM, em qualquer fase, ou em pacientes com síndrome desmielinizante isolada (grau de recomendação D).
3. Níveis de vitamina D acima de 100 ng/mL no sangue periférico devem ser evitados até que novas definições sejam estabelecidas (grau de recomendação D).
4. **Até a publicação deste consenso, não existem evidências científicas que justifiquem o uso da vitamina D em monoterapia no tratamento da EM, na prática clínica.** Portanto, atualmente, o uso de vitamina D como monoterapia na EM é considerado experimental. O uso em estudos clínicos requer aprovação por um Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos regulamentado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) e aprovado por um Conselho Regional de Medicina, além de exigir consentimento esclarecido assinado pelos pacientes.
5. De acordo com dados de um estudo *in vitro* com células do sangue periférico de pacientes em uso de vitamina D, níveis séricos acima de 40 ng/mL são passíveis de provocar ação moduladora nas células do sistema imune²¹. Com base nessa evidência, pode-se recomendar o uso

de suplementação de vitamina D em doses capazes de manter os níveis séricos dos pacientes entre 40 ng/mL e 100 ng/mL, pois estes são considerados não tóxicos (grau de recomendação D).

6. Considerando: i) as diferenças individuais de necessidades de reposição e níveis séricos de vitamina D; ii) que um estudo realizado em indivíduos saudáveis demonstrou que o uso de 5.000 UI de vitamina D por dia, durante 15 semanas, aumentou os níveis até 60 ng/mL; iii) doses até 10.000 UI dia foram consideradas seguras, sugerimos doses individualizadas até alcançar níveis entre 40 ng/mL e 100 ng/mL (grau de recomendação D).
7. Considerando que em pacientes com síndrome desmielinizante isolada baixas concentrações séricas de vitamina D poderiam influenciar o risco relativo de conversão para EM¹⁶, sugerimos a pesquisa do nível sérico dessa vitamina nesses pacientes e correção, se necessária (grau de recomendação D).
8. Sendo a vitamina D3 um hormônio secoesteroide, consideramos que doses devam ser administradas de modo escalonado. Seria ainda de extrema importância o monitoramento da 25-hidroxi-vitamina D sérica antes do aumento das doses, a fim de avaliar se a suplementação está realmente sendo efetiva para o paciente em questão. (grau de recomendação D).

Este consenso será revisto com regularidade na medida em que novos conhecimentos forem sendo adicionados aos atualmente existentes.

Agradecimentos

Agradecemos aos pesquisadores Alessandro Farias (Pesquisador), Eduardo Antônio Donadi (Imunologista) e aos demais colaboradores que realizaram revisão crítica do manuscrito: Amilton Antunes Barreira, Danilo Lima Varela, Denis B. Bichuetti, Felipe von Glehn Silva, Gutemberg Augusto Cruz dos Santos, Marcos Papais-Alvarenga, Maria Fernanda Mendes, Maria Cecília Vecino, Maria Lúcia Vellutini Pimentel, Paulo Pereira Christo, Thiago Faria Junqueira, Soniza Vieira Alvez Leon e Yara Dadalti Fragoso. Agradecemos também a valiosa assistência especializada de Paulo S. Moraes Júnior no suporte à reunião online utilizando Microsoft Lync.

References

1. Grant WB, Holick MF. Benefits and requirements of vitamin D for optimal health: a review. *Altern Med Rev* 2005;10:94-111.
2. Bikle DD. Vitamin D regulation of immune function. *Vitam Horm* 2011;86:1-21.
3. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:1911-1930.
4. Rosen CJ, Abrams SA, Aloia JF, et al. IOM committee members respond to Endocrine Society vitamin D guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97:1146-1152.
5. Holick MF. Vitamin D: important for prevention of osteoporosis, cardiovascular heart disease, type 1 diabetes, autoimmune diseases, and some cancers. *South Med J* 2005;98:1024-1027.
6. Kurtzke J. A reassessment of the distribution of multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 1975;51:137-157.
7. Hossein-nezhad A, Holick MF. Vitamin D for health: a global perspective. *Mayo Clin Proc* 2013;88:720-755.
8. Goldberg P, Fleming MC, Picard EH. Multiple sclerosis: decreased relapse rate through dietary supplementation with calcium, magnesium and vitamin D. *Med Hypotheses* 1986;21:193-200.

9. Martinelli V, Dalla Costa G, Colombo B, et al. Vitamin D levels and risk of multiple sclerosis in patients with clinically isolated syndromes. *Mult Scler* 2013, Epub Ahead of Print
10. Ebers GC, Bulman DE, Sadovnick AD, et al. A population-based study of multiple sclerosis in twins. *N Engl J Med* 1986;315:1638-1642.
11. Sawcer S, Hellenthal G, Pirinen M, et al. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature* 2011;476:214-219.
12. Cantorna MT, Mahon BD. Mounting evidence for vitamin D as an environmental factor affecting autoimmune disease prevalence. *Exp Biol Med (Maywood)* 2004;229:1136-1142.
13. Lucas RM, Ponsonby AL, Dear K, et al. Current and past Epstein-Barr virus infection in risk of initial CNS demyelination. *Neurology* 2011;77:371-379.
14. Hedström AK, Sundqvist E, Bäärnhielm M, et al. Smoking and two human leukocyte antigen genes interact to increase the risk for multiple sclerosis. *Brain* 2011;134:653-664.
15. Ascherio A, Munger K. Epidemiology of multiple sclerosis: from risk factors to prevention. *Semin Neurol* 2008;28:17-28.
16. Munger KL, Levin LI, Hollis BW, Howard NS, Ascherio A. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *JAMA* 2006;296:2832-2838.
17. Maeda SS, Saraiva GL, Kunii IS, et al. Factors affecting vitamin D status in different populations in the city of Sao Paulo, Brazil: the Sao Paulo vitamin D Evaluation Study (SPADES). *BMC Endocr Disord* 2013;13:14.
18. Libon F, Cavalier E, Nikkels AF. Skin color is relevant to vitamin D synthesis. *Dermatology* 2013;227:250-254.
19. Smolders J, Menheere P, Kessels A, Damoiseaux J, Hupperts R. Association of vitamin D metabolite levels with relapse rate and disability in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2008;14:1220-1224.
20. Arantes HP, Kulak CA, Fernandes CE, et al. Erratum to: correlation between 25-hydroxyvitamin D levels and latitude in Brazilian postmenopausal women: from the Arzoxifene Generations Trial. *Osteoporos Int* 2013;24:2899-2900.
21. Kimball S, Vieth R, Dosch HM, et al. Cholecalciferol plus calcium suppresses abnormal PBMC reactivity in patients with multiple sclerosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:2826-2834.
22. Allen AC, Kelly S, Basdeo SA, et al. A pilot study of the immunological effects of high-dose vitamin D in healthy volunteers. *Mult Scler* 2012;18:1797-1800.
23. Farias AS, Spagnol GS, Bordeaux-Rego P, et al. Vitamin D3 induces IDO(+) tolerogenic DCs and enhances Treg, reducing the severity of EAE. *CNS Neurosci Ther* 2013;19:269-277.
24. Correale J, Ysraelit MC, Gaitán MI. Vitamin D-mediated immune regulation in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 2011;311:23-31.
25. Soilu-Hänninen M, Aivo J, Lindström BM, et al. A randomised, double blind, placebo controlled trial with vitamin D3 as an add on treatment to interferon β -1b in patients with multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2012;83:565-571.
26. Kampran MT, Steffensen LH, Mellgren SI, Jørgensen L. Effect of vitamin D3 supplementation on relapses, disease progression, and measures of function in persons with multiple sclerosis: exploratory outcomes from a double-blind randomised controlled trial. *Mult Scler* 2012;18:1144-1151.
27. Shaygannejad V, Janghorbani M, Ashtari F, Dehghan H. Effects of adjunct low-dose vitamin d on relapsing-remitting multiple sclerosis progression: preliminary findings of a randomized placebo-controlled trial. *Mult Scler Int* 2012;2012:452-541.
28. Stein MS, Liu Y, Gray OM, et al. A randomized trial of high-dose vitamin D2 in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neurology* 2011;77:1611-1618.
29. James E, Dobson R, Kuhle J, Baker D, Giovannoni G, Ramagopalan SV. The effect of vitamin D-related interventions on multiple sclerosis relapses: a meta-analysis. *Mult Scler* 2013;19:1571-1579.
30. Mowry EM, Waubant E, McCulloch CE, et al. Vitamin D status predicts new brain magnetic resonance imaging activity in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2012;72:234-240.
31. Gallo S, Comeau K, Vanstone C, et al. Effect of different dosages of oral vitamin D supplementation on vitamin D status in healthy, breastfed infants: a randomized trial. *JAMA* 2013;309:1785-1792.
32. Burton JM, Kimball S, Vieth R, et al. A phase I/II dose-escalation trial of vitamin D3 and calcium in multiple sclerosis. *Neurology* 2010;74:1852-1859.
33. Roth HJ, Schmidt-Gayk H, Weber H, Niederau C. Accuracy and clinical implications of seven 25-hydroxyvitamin D methods compared with liquid chromatography-tandem mass spectrometry as a reference. *Ann Clin Biochem* 2008;45:153-159.
34. Koul PA, Ahmad SH, Ahmad F, Jan RA, Shah SU, Khan UH. Vitamin d toxicity in adults: a case series from an area with endemic hypovitaminosis d. *Oman Med J* 2011;26:201-204.
35. Zittermann A, Prokop S, Gummert JF, Börgermann J. Safety issues of vitamin D supplementation. *Anticancer Agents Med Chem* 2013;13:4-10.
36. Ashizawa N, Arakawa S, Koide Y, Toda G, Seto S, Yano K. Hypercalcemia due to vitamin D intoxication with clinical features mimicking acute myocardial infarction. *Intern Med* 2003;42:340-344.
37. Bell DA, Crooke MJ, Hay N, Glendenning P. Prolonged vitamin D intoxication: presentation, pathogenesis and progress. *Intern Med J* 2013;43:1148-1150.