



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

ALINE PARISOTO MISSIO

**Comparação do efeito imunomodulador da vitamina D e do
paricalcitol em camundongos C57BL/6 e DBA/1J**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais

Orientadora: Profa. Dra. Alexandrina Sartori
Coorientadora: Dra. Sofia Fernanda Gonçalves Zorzella Pezavento

**Botucatu
2016**

ALINE PARISOTO MISSIO

Comparação do efeito imunomodulador da vitamina D e do paricalcitol em camundongos C57BL/6 e DBA/1J

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais.

Orientadora: Profa. Dra. Alexandrina Sartori
Coorientadora: Dra. Sofia Fernanda Gonçalves Zorzella Pezavento

Botucatu
2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Missio, Aline Parisoto.

Comparação do efeito imunomodulador da vitamina D e do paricalcitol em camundongos C57BL/6 e DBA/1J / Aline Parisoto Missio. - Botucatu, 2016

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Alexandrina Sartori

Coorientador: Sofia Fernanda Gonçalves Zorzella

Pezavento

Capes: 21102007

1. Vitamina D. 2. Citocinas. 3. Fatores imunológicos.
4. Camundongo como animal de laboratório.

Palavras-chave: Camundongos; Citocinas; Imunorregulação; Paricalcitol; Vitamina D.

Epigrafe

*“Em algum lugar, alguma coisa incrível
está esperando para ser descoberta.”*

Carl Sagan

Dedicatória

*Dedico este trabalho aos meus pais, Simone e Osmair, e
minha irmã, Ingrid, que mesmo longe sempre estão perto
de alguma forma. Obrigada por ser essa família
maravilhosa! Amo vocês!*

Agradecimientos

Agradecer...

Tenho imensa gratidão a tanta gente que seria impossível colocar o nome de todos aqui. Cada pessoa que passou por mim desde o início do mestrado teve influência na minha trajetória. Mas há algumas que não posso deixar de citar aqui.

Agradeço de toda a minha alma a minha “mãe científica”, Alexandrina Sartori, ela que foi mãe no mais belo e amplo sentido da palavra. Ela não somente me orientou cientificamente. Ela me orientou em experimentos de laboratório e da vida. Sempre esteve ali para me ajudar em qualquer coisa (mas qualquer coisa mesmo) e para receber os “abraços matinais”. Ah se ela soubesse da importância da sua vida na minha...

À Sofia, coorientadora, que me ensinou a montar protocolos, preparar os experimentos e os demais processos laboratoriais. Sua competência e seriedade são inigualáveis! Tenho orgulho de ter sido sua coorientada!

Às “meninas do laboratório”. Nenhum experimento, nada, mas nada mesmo seria possível sem elas. Me ensinaram tudo desde as coisas mais simples até as mais complexas. Tudo que sei sobre experimentação animal é devido a elas. Devo tudo a Luiza, Thaís de Bauru, Thaís da Gigi, Lari, Lari de São Manuel e Karen, que nunca mediram esforços e finais de semanas para me ajudar nos experimentos. E não é só ajuda com os animais. É com dinheiro para animais, reagentes, em análise de citometria, análise de elisa, análises, análises e mais análises. Vocês sabem onde eu estaria agora sem a ajuda de vocês? Tentando o primeiro protocolo (risos).

Aos funcionários do departamento de Microbiologia e Imunologia. Em especial ao Lula e ao Rafael, que me salvaram inúmeras vezes quando eu não podia fazer algum procedimento do departamento devido ao mestrado. Pode ter certeza, tudo seria muito difícil sem vocês dois!

Às chefias que passaram pelo departamento no período do meu mestrado (Dr. Maurício, Dr. Ary e Dr. Ramon) por me liberarem nessa fase tão importante da minha vida profissional.

Aos professores e alunos do departamento por entenderem que eu não estaria às vezes 100% disponível devido os experimentos. Especialmente a Carol e a Thaisy que estiveram ao meu lado nas horas mais difíceis dessa fase!

Ao prof. Dr. Silvio Luis de Oliveira e à prof. Dra. Maria Terezinha Serrão Peraçoli pela contribuição durante meu exame de Qualificação.

À Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP – Botucatu) pelo suporte técnico. Em especial à funcionária Bruna, sempre alegre, simpática e disposta a ajudar!

Aos meus familiares, especialmente os meus pais que sempre colocaram a minha educação em primeiro lugar. Nunca sai da minha mente as manhãs de domingo na banca da “Praça do Jacaré”. Quantas revistinhas, revistas e livros! Obrigada por sempre me incentivarem a leitura e o amor aos animais!

Aos meus dois gatos Raji e Bartolomeu. Eu sei que eles não lerão esse agradecimento mas, com certeza, todos os dias eu demonstro a esses dois que eles foram um dos melhores encontros casuais que tive na vida.

À Dra. Vanessa Ito pela imensurável ajuda na minha jornada do autoconhecimento! Sem a sua competência e profissionalismo tudo seria muito mais difícil!

Ao CNPq pelo apoio financeiro concedido.

E quero deixar a gratidão mais especial para eles, os camundongos. Eu sei que eles foram “feitos para isso”, sacrificar suas vidas por um “bem maior”. Achei que seria fácil. Mas, de todo coração, não foi. Deixo aqui um sentimento indescritível porque se existe algo maior que gratidão é o que eu sinto por cada “camundonguim” que passou pelas minhas mãos.

Enfim, minha eterna gratidão a todos que contribuíram indiretamente ou diretamente nessa fase tão importante da minha vida!

Resumo

Resumo

MISSIO, A. P.. Comparação do efeito imunomodulador da vitamina D e do paricalcitol em camundongos C57BL/6 e DBA/1J. 2016. 85 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu – SP, 2016.

A vitamina D (VitD) ativa possui várias funções importantes incluindo efeitos imunomoduladores na imunidade inata e na específica. A deficiência desta vitamina já alcançou proporções epidêmicas em várias regiões e por isto sua suplementação tem sido sugerida em algumas doenças. Diferentes linhagens de camundongos têm sido utilizadas para avaliar os efeitos imunomoduladores da VitD. O estudo dos efeitos da deficiência e da suplementação com VitD tem sido realizado em seres humanos e também em linhagens isogênicas de camundongos. Neste trabalho comparamos o efeito da suplementação com 0,1 µg de VitD e de paricalcitol nas linhagens murinas C57BL/6 e DBA/1J. Estes animais foram injetados com 0,1 µg de VitD ou paricalcitol durante 15 dias, em dias alternados. O peso corporal foi avaliado diariamente e sangue e baço foram coletados 24 horas após a última dose. Na linhagem C57BL/6 a VitD diminuiu o peso corporal e aumentou a concentração de cálcio sérico. Em relação aos parâmetros imunológicos, houve diminuição da produção de citocinas por células esplênicas e maior expressão de MHC II nas células dendríticas. O paricalcitol não afetou o peso corporal e o nível de cálcio sérico, mas diminuiu a produção de citocinas nesta linhagem. Com exceção do peso corporal que diminuiu, os demais parâmetros não foram afetados pela VitD ou pelo paricalcitol nos camundongos DBA/1J. A suplementação com 0,2 µg de VitD nos animais DBA/1J desencadeou a diminuição de peso corporal, queda na produção de IL-2, IFN-γ e IL-5 por células esplênicas mas não afetou a expressão de moléculas co-estimuladoras. Esta mesma dose elevada de paricalcitol nesta linhagem aumentou a produção de TNF-α, mas não determinou outros efeitos significativos. Analisados de forma conjunta estes resultados mostram que camundongos C57BL/6 e DBA/1J diferem na resposta à suplementação com VitD e paricalcitol, sendo a linhagem DBA/1J mais resistente ao seu efeito.

Palavras-chave: Vitamina D, paricalcitol, imunomodulação, citocinas, C57BL/6, DBA/1J.

Abstract

Abstract

MISSIO, A. P.. Differential immunomodulatory effect of vitamin D and paricalcitol in C57BL/6 and DBA/1J. 2016. 85 p. Dissertation (Master) – Botucatu Medical School, São Paulo State University, Botucatu – SP, 2016.

Active vitamin D (VitD) has a relevant role in many body functions, including effects on innate and adaptive immunity. However, as VitD deficiency already reached epidemic proportions worldwide, its supplementation has been used in various diseases. Different mice strains have been widely employed to investigate VitD immunomodulatory properties. In this work, we compared the effect of VitD and paricalcitol supplementation in C57BL/6 and DBA/1J. The mice were treated with 0.1 µg of VitD or paricalcitol, every other day, during 15 days. Body weight was assessed daily and blood and spleen cells were collected 24 hours after the last dose. In the C57BL/6 strain, VitD decreased body weight and also increased serum calcium concentration. Additionally, VitD decreased cytokine production by the spleen and increased the level of MHC II expression in dendritic cells. Paricalcitol did not affect body weight and serum calcium levels but it decreased cytokine production in this mice strain. Except body weight that was downregulated by VitD, the other parameters were not altered by VitD or paricalcitol in the DBA/1J strain. An increased dose (0.2 µg) of VitD decreased body weight, downregulated IL-2, IFN-γ and IL-5 production by spleen cells but did not affect the other cytokines neither the expression of costimulatory molecules in dendritic cells in DBA/1J mice. This higher dose of paricalcitol significantly increased TNF-α but had no other significant effects. Together, these results show that C57BL/6 and DBA/1J mice strains differ in their response to VitD and paricalcitol supplementation, being DBA/1J more resistant to their effects.

Keywords: Vitamin D, paricalcitol, immunomodulation, cytokines, C57BL/6, DBA/1J.

Sumário

Sumário

Resumo

Abstract

Lista de figuras

1. Introdução.....	22
1.1 Relação entre raquitismo e vitamina D.....	22
1.2 Aspectos gerais da vitamina D.....	24
1.3 Metabolismo da vitamina D.....	26
1.4 Receptores da Vitamina D	28
1.5 Vitamina D e hipercalcemia.....	30
1.6 Vitamina D e peso corporal.....	31
1.7.1 Ação da Vitamina D nos monócitos/macrófagos.....	32
1.8 Ação da Vitamina D nas células dendríticas.....	34
1.9 Ação da Vitamina D nos linfócitos T e B.....	35
1.10 Análogos da Vitamina D.....	37
1.11 Efeitos imunorreguladores <i>in vivo</i> da Vitamina D em camundongos C57BL/6 e DBA/1J.....	39
2. Racional.....	40
3. Referências	42
4. Objetivos.....	53
4.1 Objetivo geral.....	54
4.2 Objetivos específicos.....	54
5. Protocolos experimentais.....	55
5.1 Protocolo experimental geral.....	56
5.2 Protocolo de administração de Vitamina D e paricalcitol.....	56
6. Resultados e discussão.....	57
7. Artigo científico.....	59
8. Anexo.....	84
8.1 Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)	85

Lista de figuras

Lista de Figuras

Figura 1. Enzimas envolvidas na síntese, ativação e degradação da vitamina D.....	27
Figura 2. Tipos de receptores da vitamina D, ações genômicas e não genômicas	29
Figura 3. Indução de expressão de catelicidina pela vitamina D e morte bacteriana no monócito.....	33
Figura 4. Representação esquemática da ação da vitamina D nas células dendríticas e linfócitos T.....	34
Figura 5. Estrutura química da vitamina D e possíveis modificações em análogos.....	37

Introdução

1. Introdução

1.1 Breve histórico da vitamina D

A história da vitamina D (VitD) está intrinsecamente relacionada à história do raquitismo. No século XVII, a maioria das crianças que vivia nas cidades industrializadas do norte europeu desenvolvia uma doença caracterizada por graves deformações ósseas e baixa tonicidade muscular (Rajakumar, 2003). Foi então que o Dr. Daniel Whistler e o Prof. Francis Glisson da Universidade de Cambridge descreveram o raquitismo (denominado osteomalacia em adultos) pela primeira vez em 1650 (Norman, 2012). Em 1822, Sniadecki reconheceu a importância da exposição solar na prevenção e cura do raquitismo (Holick, 1995).

Em 1919, Mellanby propôs que o raquitismo seria uma doença relacionada à deficiência nutricional. Nesta época constatou que cães escoceses criados dentro de casa, longe da luz solar, apresentavam raquitismo idêntico ao humano. Após anos de estudos, Mellanby observou que o óleo de fígado de bacalhau era um agente antirraquítico que prevenia e curava os cães raquíticos e propôs que a vitamina A, presente no óleo de fígado de bacalhau, era a substância responsável pela cura e prevenção da doença (DeLuca, 2014). Entretanto, McCollum e colaboradores em 1922 demonstraram que a atividade antirraquítica do óleo de fígado de bacalhau se mantinha mesmo após a oxigenação e aquecimento a 100°C que é um processo que destrói a vitamina A. Concluíram então que os experimentos demonstravam a existência de uma nova vitamina com propriedades específicas e que era relacionada ao metabolismo ósseo. Nessa publicação, McCollum seguiu o nome das vitaminas em ordem alfabética e, como recentemente haviam sido descobertas as vitaminas A, B e C, ele denominou a nova substância de vitamina D (Norman, 2012).

Também em 1919, Huldschinsky demonstrou pela primeira vez a ação dos raios ultravioleta (UV) no aumento da calcificação da epífise de crianças raquíticas (Holick, 1995). Em 1921, Hess e Unger também observaram que pacientes raquíticos expostos à luz solar no verão ou aos raios UVB eram curados. No entanto, a conexão entre a luz solar e a retenção do cálcio foi experimentalmente demonstrada por Steenbock e Black em 1924. A irradiação de ratos prevenia e curava o raquitismo dos animais. Estas informações adicionais permitiram concluir que se tratava de uma substância da dieta e da pele que era convertida pelos raios

UV em uma substância antirraquítica ativa. Steenbock e Black então patentearam este processo de irradiação o que estimulou as indústrias farmacêuticas a irradiar produtos e eliminar o raquitismo e a osteomalacia (DeLuca, 2014).

Uma vez que a vitamina D foi quimicamente sintetizada a baixo custo a partir de levedura, ela foi adicionada ao leite para o consumo (Holick, 2006). Até então, pensava-se que a vitamina D obtida de levedura irradiada era idêntica à produzida pela pele. No entanto, foi observado que leveduras produziam uma vitamina D com menor efeito antirraquítico. A vitamina D foi então isolada e identificada a partir da epiderme de porco e descobriu-se que vitamina D animal originava-se do 7-deidrocolesterol (7-DHC). A vitamina originária de fungos e vegetais foi denominada de vitamina D₂ (ergocalciferol) e a originária da pele suína e humana, de Vitamina D₃ (colecalciferol) (Holick, 2005).

1.2 Aspectos gerais da vitamina D

A VitD foi inicialmente identificada como uma vitamina tradicional, ou seja, uma substância essencial que o organismo não produz e que é obtida somente a partir da dieta. Porém, a VitD pode ser produzida pelo organismo por reações fotossintéticas quando a epiderme é exposta aos raios UV . Sendo assim, a VitD é um hormônio secosteróide originário do colesterol, importante em vários processos fisiológicos como controle do metabolismo, funções imunológicas, crescimento e diferenciação celular (Holick, 1999; Calberg & Molnar, 2012).

A VitD é uma substância pleiotrópica, o que significa que a sua ação está além da homeostase do metabolismo ósseo e mineral. Estudos sugerem que a deficiência de VitD está relacionada ao aumento de risco de doenças autoimunes, cardiovasculares, infecções e câncer (Bikle, 2014; Morris, 2014).

Apesar da reconhecida importância da VitD nos processos fisiológicos e patológicos, a deficiência de VitD é uma pandemia mundial importante (Berridge, 2015). Mais de um bilhão de pessoas no mundo possuem deficiência de VitD (Holick & Chen, 2008). Durante muitos anos, a concentração de VitD era definida simplesmente pela presença ou ausência de raquitismo ou osteomalacia (Hewison, 2012). Atualmente a concentração da VitD é determinada pela dosagem total da 25(OH)D (25-hidroxi-vitamina D) sérica (Holick, 2007), mas ainda não há consenso acerca da concentração ótima. Alguns especialistas denominam deficiência de VitD quando concentrações séricas de 25(OH)D, também conhecida como calcidiol, são menores que 50 nmol/L (20 ng/mL) (Holick et al., 2011). Já outros defendem que níveis ótimos de 25(OH)D são aqueles acima de 75 nmol/L (30 ng/mL) (LeBlanc et al., 2015). Atualmente a concentração da VitD é determinada pela dosagem total da 25(OH)D sérica (Holick, 2007). Alguns dos fatores de risco para o desenvolvimento da deficiência de VitD são ter hiperpigmentação (Holick, 2007), baixa ingestão de VitD (Forrest & Stuhldreher, 2011), pouca exposição a raios ultravioleta (Kannan & Lim, 2014) e obesidade (Samuel & Borrel, 2014). Outros estudos associam a deficiência de VitD também à idade avançada, sedentarismo (Millen et al., 2010) e ser do sexo feminino (Forrest & Stuhldreher, 2011)

A maioria dos alimentos naturais possuem pequenas quantidades de VitD. O óleo de peixe é uma fonte razoável da vitamina (2-5 µg/100 g) enquanto que os cogumelos possuem maiores quantidade (30-100 µg/100 g) (Holick, 2007). Os ovos e a carne possuem quantidades muito pequenas desta vitamina e a suplementação de alguns alimentos como os cereais, margarina e leite, varia entre os países (Jenab et al., 2010). Alimentos de origem animal são fontes de VitD₃, produzidos endogenamente a partir do 7-DHC presente na pele. Os alimentos de origem vegetal são fontes da VitD₂. O metabolismo e ação das vitaminas D de origem animal ou vegetal são muito semelhantes nos seres humanos (Holick et al., 2008). A maior fonte de VitD é através da exposição solar e esse processo é detalhado no item seguinte.

1.3 Metabolismo da vitamina D

Após a conversão fotoquímica do 7-DHC pelos raios UVB em VitD₃, ou após a absorção intestinal da VitD₂ ou VitD₃, ela se liga à proteína ligante de VitD (DBP) e é transportada até o fígado onde é hidroxilada pela enzima 25-hidroxilase (CYP2R1) no carbono 25 (C-25) para gerar a 25(OH)D (Shinkyō et al., 2004; Girgis et al., 2013). A 25(OH)D é a forma circulante da VitD mais abundante na corrente sanguínea e a sua concentração reflete o *status* da VitD ativa no indivíduo (Lehmann et al., 2001). A 25(OH)D então é transportada até os rins e é transformada na forma ativa da VitD, (1,25(OH)₂D), também conhecida como calcitriol, pela enzima 1 α -hidroxilase (CYP27B1) (Mason et al, 2011).

Tanto a 1,25(OH)₂D quanto a 25(OH)D sofrem catabolismo. O calcitriol é catabolizado pela enzima 24-hidroxilase (CYP24A1) e transformado em 1,24,25(OH)₃D (ácido calcitróico) (Mason et al, 2011). A 25(OH)D é convertida em metabólitos polares e excretada na bile. A inativação metabólica da 25(OH)D é aumentada quando há baixa ingestão ou absorção de cálcio e altos níveis séricos do hormônio da paratireoide e calcitriol (Figura 1) (Davies et al., 1997).

As células do sistema imune expressam as enzimas necessárias para a metabolização da vitamina D, com exceção dos neutrófilos que não expressam CYP27B1 funcional (Chun et al., 2014). Em relação aos monócitos, a ativação do receptor *toll like* (TLR) induz a produção de CYP27B1. A ativação do TLR também é capaz de inibir a atividade desta enzima sugerindo que 25(OH)D controla os níveis intracelulares de 1,25(OH)D (Liu et al., 2006). A ação do CYP24A1 é ausente ou bloqueada nestas células (Ren et al., 2005). Em relação às células dendríticas (DCs), Karthaus e colaboradores (2014) demonstraram que DCs murina expressam CYP27B1 e CYP24A1. Após estimular as DCs com calcidiol ou calcitriol, observaram aumento da expressão de VDR. O calcidiol aumentou a expressão de CYP27B1 e aumentou a metabolização do 25(OH) em 1,25(OH)D. No entanto, o calcidiol e o calcitriol induziram baixos níveis de expressão de CYP24A1.

Quanto aos linfócitos T, os mesmos também expressam CYP27B1 (Kongsbak et al., 2014). No entanto, a capacidade de converter 25(OH) em 1,25(OH)D em uma concentração suficiente para ativar os elementos responsivos da vitamina D (VDRE) é controversa. Jeffery e colaboradores (2012) demonstraram que linfócitos T

humano ativados *in vitro*, não expressam níveis suficientes de CYP27B1 para produzir uma concentração de 1,25 (OH)D suficiente para ativar os VDRE. A 25(OH) afeta a resposta dos linfócitos T quando a APC está presente e tem sido sugerido que a APC secretaria uma concentração suficiente de 1,25(OH)D localmente que agiria nos linfócitos T. Já Kongsbak e colaboradores (2014), demonstraram que os linfócitos T humanos ativados expressam CYP27B1 capaz de converter 25(OH)D em concentrações suficientes para ativar os VDRE. Os linfócitos B também expressam CYP27B1 e CYP24A1 (Di Rosa et al., 2011). A expressão de CYP27B1 é observada em linfócitos B *naïve* e é aumentada após ativação celular. Já a expressão de CYP24A1 não é detectada em linfócito B *naïve* ou ativada, aumentando somente após o tratamento com calcitriol (Chen et al., 2007).

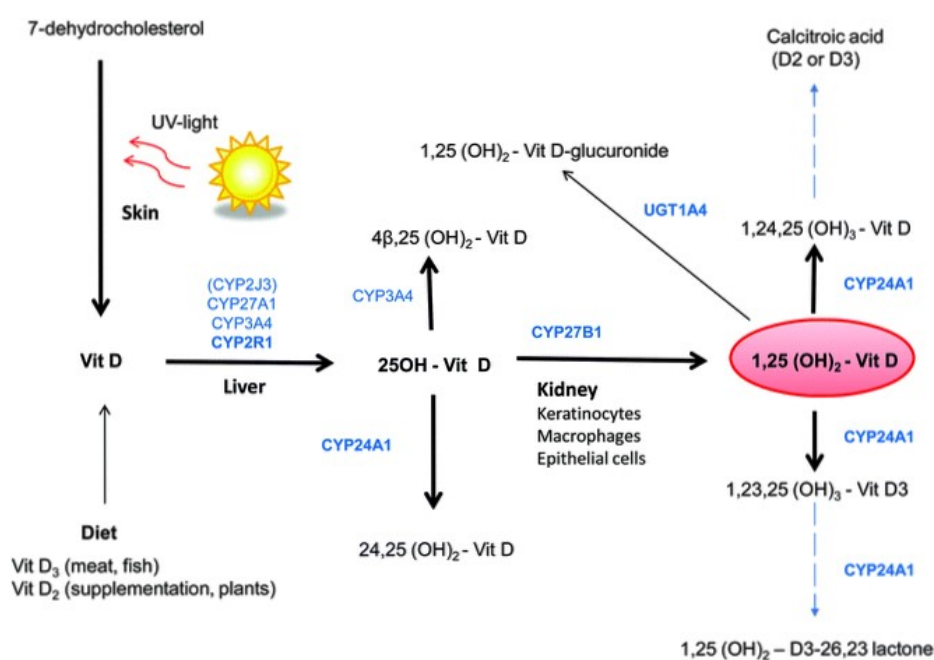


Fig. 1. Enzimas envolvidas na síntese, ativação e degradação da vitamina D. CYP2R1 e CYP27B1 são as principais enzimas responsáveis pela transformação da vitamina D em sua forma ativa. A CYP24A1 é a enzima responsável pela degradação da vitamina D (Lindh et al., 2012).

1.4 Receptores da Vitamina D

A VitD exerce sua função biológica através da ligação altamente específica com o receptor da VitD (VDR) (Haussler et al., 2013). O VDR é um membro da família de receptores esteroides que regula a transcrição genética (Carlberg & Campbell, 2013). As ações genômicas da VitD são mediadas pela ligação do VDR nuclear com o receptor retinoide X (RXR) que permite a ativação ou supressão da transcrição genética dos alvos da VitD denominados elementos responsivos da VitD (VDRE) (Christakos et al., 2016). O efeito ativador ou supressor da VitD é dependente da ligação com coativadores ou correpressores o que determinará modulação da transcrição genética (Haussler et al., 2013).

A VitD também age de forma não genômica. As ações não genômicas são rápidas e não são dependentes de transcrição. Essas ações são mediadas por um VDR de membrana que é encontrado em cavéolas (frações da membrana plasmática ricas em caveolinas) e estão relacionadas a ativação de moléculas sinalizadoras (fosfolipase A, fosfolipase C), mensageiros secundários (íons Ca^{++} , trifosfato) e abertura de canais de íons de cálcio e cloro (Deeb et al., 2007; Hii & Ferrante, 2016). Os tipos de receptores da VitD estão ilustrados na figura 2.

O VDR é expresso em todas as células do sistema imune principalmente após estimulação (Bikle, 2009; Szymczak & Pawliczak, 2015). Os monócitos/macrófagos e DCs expressam VDR após ativação dos TLR (Liu et al., 2006). A expressão de VDR nuclear está descrita em linfócitos T e B. A expressão de VDR em linfócitos *naive* é baixa e aumenta após ativação e proliferação destas células. O VDR permite a modulação de aproximadamente 500 genes que influenciam na diferenciação e proliferação da resposta imune adaptativa (Mahon et al., 2003; Chen et al., 2007).

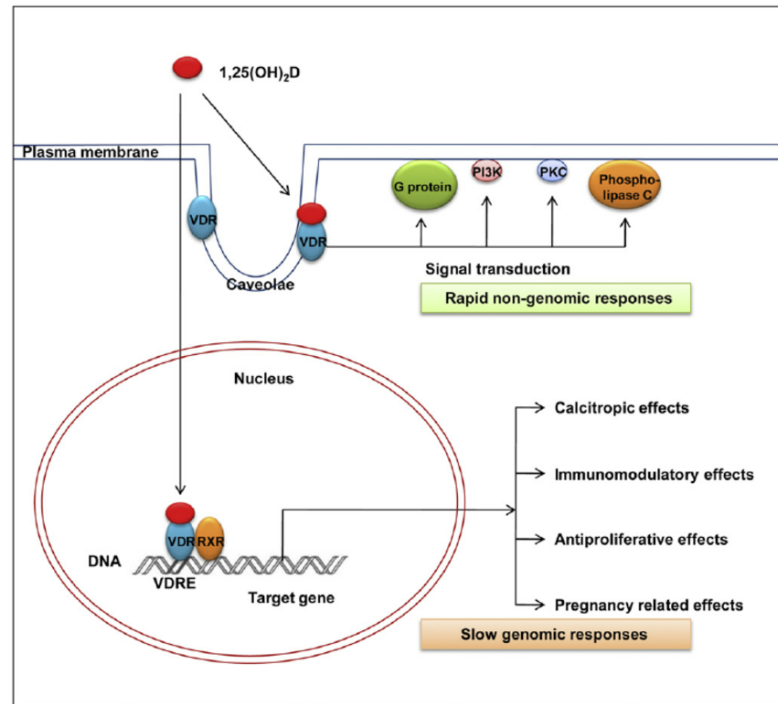


Figura 2. Tipos de receptores da vitamina D, ações genômicas e não genômicas (Shin et al., 2010).

1.5 Vitamina D e hipercalcemia

Altas concentrações de VitD (hipervitaminose D) estão associadas a uma calcificação arterial generalizada, especialmente em associação com fatores de risco tais como a aterosclerose, diabetes e doença renal crônica (Ivanovski et al., 2009; Bas et al., 2006). Isso ocorre porque a VitD aumenta a absorção de cálcio intestinal pela regulação da expressão de genes transportadores transcelulares de cálcio como TRPV6 (*Transient Receptor Potential V member 6*) e a calbindina D9k induzindo a hipercalcemia (Lieben et al., 2010).

A hipercalcemia induz sintomas neurológicos como depressão, confusão e coma. O sistema gastrointestinal também é afetado apresentando constipação, anorexia, náuseas e vômito. A poliúria é comum e quando associada com os problemas gastrointestinais pode levar a desidratação severa. Outras alterações da hipercalcemia incluem arritmia, hipertensão e aumento da taxa de repolarização cardíaca os quais constituem fatores de risco para parada cardíaca (Nussbaum, 1993; Shane & Irani, 1999). Existe alta incidência de hipercalcemia em pacientes com hiperparatireoidismo secundário, psoríase e osteoporose que necessitam do tratamento com VitD (Sprague et al., 2003; Sunyecz, 2008; Kamangar et al., 2011). Por isto, há mais de 25 anos análogos da VitD são desenvolvidos com o intuito de substituírem o calcitriol sem o efeito colateral da hipercalcemia (Leysens et al., 2014). Os análogos serão abordados mais adiante no item 1.10.

1.6 Vitamina D e peso corporal

Estudos *in vivo* em modelos experimentais e *in vitro* com culturas celulares indicam a importância da VitD no metabolismo energético. Camundongos nocautes para VDR possuem grande gasto de energia, aumento da oxidação de ácidos graxos e um fenótipo mais magro quando comparados com os animais controle (Narvaez et al., 2009; Wong et al., 2009). Por outro lado, a expressão de VDR humano em adipócitos de animais transgênicos, resulta na supressão do gasto de energia e da oxidação de ácidos graxos o que determina um fenótipo obeso (Wong et al., 2011).

Sergeev (2009) demonstrou que a VitD ativa aumentou a apoptose de adipócitos através do aumento intracelular de cálcio. Esse fenômeno também foi observado em camundongos suplementados com cálcio e VitD (Sergeev & Song, 2014). Kong e Li (2006) demonstraram que a VitD inibe a diferenciação de pré-adipócitos de camundongo 3T3-L1 e diminui a indução de genes relacionados ao desenvolvimento dos adipócitos (C/EBP- α , PPAR- γ e lipase lipoproteica). No entanto, no tecido humano, a VitD promove a diferenciação de pré-adipócitos pelo aumento de marcadores adipogênicos e aumento de acúmulo de lipídios (Narvaez et al., 2013). Já Menendez e colaboradores (2001) demonstraram que a VitD inibe a produção *in vitro* de leptina, hormônio responsável pelo controle da ingestão de alimentos, por adipócitos de indivíduos saudáveis.

A VitD também pode atuar no metabolismo energético através da ativação do VDR localizado no cérebro. Sisley e colaboradores (2016) injetaram VitD na região central do cérebro de ratos e observaram que os animais ingeriram menos ração e apresentaram maior perda de peso.

1.7 Ação da Vitamina D nos monócitos/macrófagos

Os monócitos e os macrófagos são cruciais no sistema imune inato sendo capazes de reconhecer padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs) de vários agentes infecciosos através de receptores de reconhecimento de patógenos (PRRs) como os receptores *toll like*. O papel imunológico da VitD foi descoberto após a constatação de que esta vitamina induzia uma atividade anti-microbiana *in vitro* em monócitos infectados com *Mycobacterium tuberculosis*. A ativação de TLR aumenta a expressão de VDR e outros genes relacionados ao VDR como o peptídeo antimicrobiano catelicidina (Liu et al., 2006). A VitD também está associada à produção de defensina β -4 humana (DEFB4A). A catelicidina e a DEFB4A promovem permeabilização da membrana celular do microrganismo seguida da fusão do vacúolo fagocítico com os lisossomos (Ganz, 2003). A eficácia da eliminação do microrganismo está relacionada com a concentração local dessas duas proteínas antimicrobianas (Hewison, 2011). No entanto, ao mesmo tempo que a VitD promove atividade antimicrobiana nas células mieloides, ela também inibe a expressão de TLR2 e TLR4 o que determina menor resposta aos PAMPs. Sadeghi e colaboradores (2009) sugerem que essa inibição seja para prevenir excessiva ativação de TLR e inflamação em estágios tardios da infecção. A VitD promove a diferenciação dos monócitos em macrófagos. A deficiência da vitamina, no entanto, diminui a maturação dos macrófagos, o nível de expressão de MHC II, de enzimas lisossomais e secreção de H_2O_2 , moléculas essenciais na função antimicrobiana (Koeffler, 1985; Abu-Amer & Bar-Shavit, 1993). O efeito da VitD na indução da catelicidina e consequente efeito microbicida está ilustrado na figura 3.

A VitD também reduz em monócitos a expressão de moléculas co-estimuladoras como CD40, CD80 e CD86 e a expressão das citocinas inflamatórias IL-1, IL-6, TNF- α , IL-8, e IL-12 (Giulietti et al., 2007; Almerighi et al., 2009).

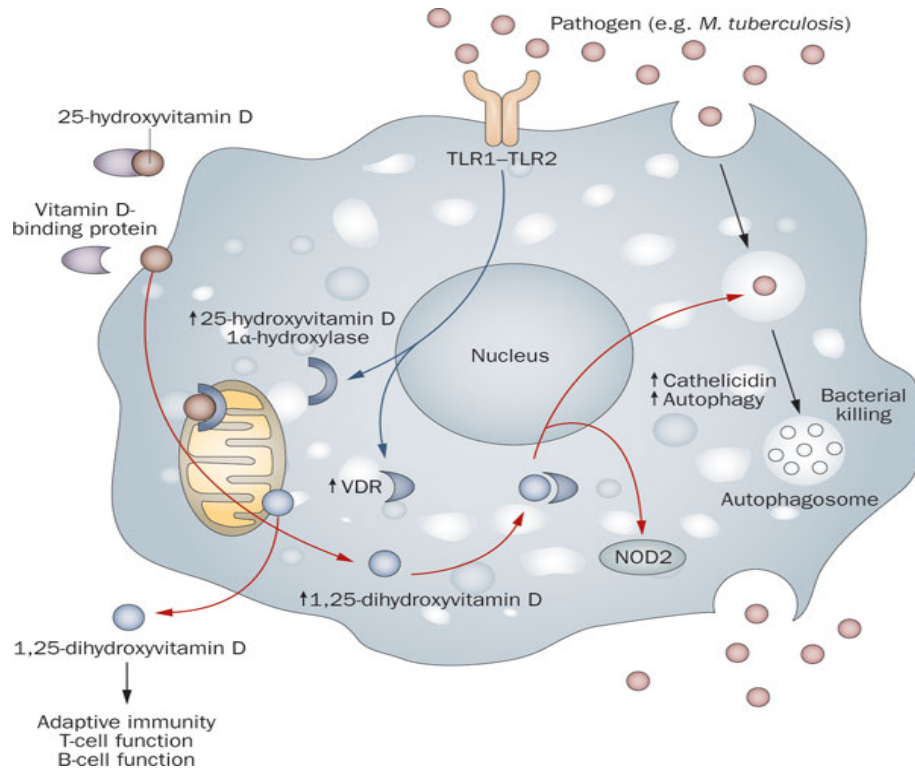


Fig. 3. Indução de expressão de catelicidina pela vitamina D e morte bacteriana no monócito (Hewison, 2011).

1.8 Ação da Vitamina D nas células dendríticas

As DCs são células apresentadoras de antígeno que estabelecem uma conexão entre a imunidade inata e a adaptativa. O mecanismo molecular da ação da VitD nas DCs envolve a diminuição da expressão de MHC II e das moléculas co-estimuladoras CD40, CD80, CD86 e o aumento na produção de citocina anti-inflamatória IL-10 (Takeda et al., 2010; Zhang et al., 2012). A VitD também diminui a produção de IL-12p40 através da ligação do VDR-RXR com o NF- κ B no sítio promotor da IL-12 (D'Ambrosio et al., 1998). A diminuição da produção de IL-12 e TNF- α pelas DCs inibe indiretamente a resposta Th1 e Th17 e promove a diferenciação de células T reguladoras (Tregs) (Penna et al., 2007; Bartels et al., 2010). Esses efeitos tornam as DCs tolerogênicas diminuindo a apresentação do antígeno e a ativação ou reativação dos linfócitos T (van Halteren et al., 2002).

O tratamento com a VitD também induz o aumento de ILT3 (*Immunoglobulin like transcript 3*) em DCs. ILT3 é um receptor inibidor que quando ativado por seu ligantes resulta na inibição intracelular da cascata de sinalização mantendo a DC imatura. Pacientes com psoríase submetidos a tratamento tópico com VitD apresentam expressão aumentada de ILT3 nas DCs junto com redução do escore das lesões (Penna et al., 2005). Além disso, DCs tratadas com VitD possuem aumento da expressão da molécula PD-L1 (*Programmed death-ligand 1*) que está associada com a supressão de linfócitos T (Unger et al., 2009). O efeito da VitD nas DCs e consequente efeito nos linfócitos T está ilustrado na figura 4.

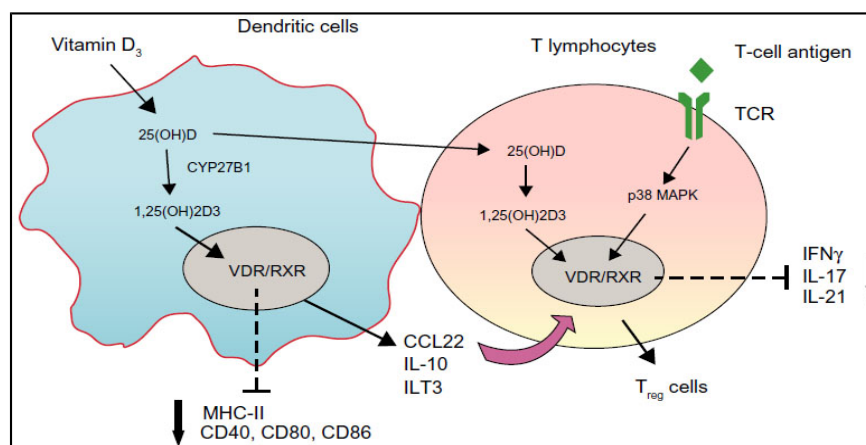


Fig. 4. Representação esquemática da ação da vitamina D nas células dendríticas e linfócitos T (Yin & Agrawal, 2014).

1.9 Ação da Vitamina D nos linfócitos T e B

Os efeitos imunomoduladores da VitD sobre os linfócitos T têm sido amplamente descritos na literatura. Desde 1983 sabe-se que a VitD inibe a proliferação de linfócitos T e a secreção de citocinas após a estimulação com mitógenos. (Provvedini et al., 1983). A VitD é capaz de inibir diretamente a transcrição de IL-2 e de IFN- γ em células Th1 e estudos mais recentes mostram que também é capaz de inibir a síntese de IL-17 pelos linfócitos Th17 (Palmer et al., 2011).

A eficácia do tratamento com VitD em modelos experimentais de doenças mediadas por células T tem sido relatada. Células Th1 e Th17 estão envolvidas com encefalomielite autoimune experimental (EAE), doença inflamatória intestinal e diabetes mellitus tipo I. O tratamento *in vivo* com VitD suprime o desenvolvimento e a progressão dessas doenças (Cantorna et al., 2000; Zella et al., 2003; Froicu & Cantorna., 2006). O mecanismo de supressão dessas doenças autoimunes pela vitamina está associado com inibição da produção de IL-17 e IFN- γ , promoção da síntese de IL-10 e indução de Tregs (Cantorna et al., 2015).

Seus efeitos nos linfócitos Th2 são controversos. Alguns estudos demonstram que a VitD inibe a transcrição de IL-4 e IL-5 e outros indicam que estimula a produção destas citocinas em células murinas e humanas (Boonstra et al, 2001; Staeva-Vieira & Freedman et al., 2002, Sloka et al., 2011; Waddell et al., 2015). Gorman e colaboradores (2007) demonstraram que a VitD possui a capacidade de induzir Treg indiretamente, ou seja, através de DCs tolerogênicas ou pela ação direta da VitD no linfócito T na promoção de Tregs Foxp3⁺ produtora de IL-10 e aumento de receptor inibidor de ativação celular CTLA-4.

A maioria dos estudos visando esclarecer os mecanismos básicos da VitD e do VDR são realizados com linfócitos T oriundos de modelos animais. Neste caso os linfócitos T se originam de diferentes órgãos linfoides. Por outro lado, a maioria dos trabalhos com linfócitos T humanos são feitos com células mononucleares do sangue periférico (PBMC). Apesar disto, os efeitos observados em linfócitos T humanos e murinos são similares. Por exemplo, linfócitos T humanos e murinos expressam VDR 48-72 horas após a ativação com VitD (Kongsbak et al.,2014). Além disso, a VitD induz *in vitro* função e produção semelhante de CYP27B1 tanto em

linfócitos T murinos quanto linfócitos T humanos (Cantorna et al., 2015). O efeito da VitD nas DCs e nos linfócitos T encontra-se esquematizado na figura 4.

Como os linfócitos T, os linfócitos B ativos expressam VDR (Hewison, 2011). A VitD pode inibir indiretamente a ação dos linfócitos B através da diminuição da resposta dos linfócitos T ou inibição da produção de citocinas por monócitos/macrófagos (Müller et al., 2011). A VitD também possui ação direta nos linfócitos B e inibe a geração de plasmócitos e de linfócitos B de memória, além de induzir a apoptose de células produtoras de imunoglobulinas (Baeke et al, 2010). Esse controle da ativação e proliferação de linfócitos B é clinicamente importante nas doenças autoimunes mediadas por linfócitos B (Priehl et al., 2013). Pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES), doença autoimune caracterizada por uma elevada produção de auto-anticorpos, possuem baixas concentrações séricas de 25(OH). Embora as causas do LES sejam desconhecidas, estudos demonstram que a depleção terapêutica dos linfócitos B reduziu a patogênese da doença. Portanto, a VitD poderia contribuir na manutenção da homeostase dos linfócitos B e a sua deficiência contribuiria na hiperatividade destes linfócitos no LES (Chen et al.,2007).

1.10 Análogos da Vitamina D

Após a descoberta de que o calcitriol em doses supra-fisiológicas poderia estimular a diferenciação de células leucêmicas promielocíticas em macrófagos maduros e inibir a proliferação de células do melanoma, foram iniciadas pesquisas para o desenvolvimento de análogos da VitD, pois o efeito hipercalcêmico da VitD em grandes concentrações dificulta sua aplicação clínica. A molécula da VitD é muito flexível e sua estrutura pode ser modificada para a obtenção de análogos com propriedades biológicas alteradas. As modificações químicas podem ser realizadas no anel A, anel B, região central CD ou na cadeia lateral sendo que todas as alterações têm como objetivos minimizar os efeitos calcêmicos e manter ou aumentar os efeitos imunomoduladores da VitD (Christakos et al, 2016). As possíveis modificações na estrutura da VitD para produzir análogos estão representadas na figura 6A.

Alguns análogos da vitamina D já são aprovados para uso clínico como, por exemplo, no tratamento de psoríase (tacalcitol, calcipotriol) e osteoporose (eldecalcitol) (Leyssens et al., 2014). Um dos análogos sintéticos mais utilizados atualmente é o paricalcitol (1,25-(OH)₂-19-nor-VitD₂). Este análogo sintético de terceira geração da VitD₂ foi inicialmente desenvolvido para minimizar os efeitos colaterais do tratamento do hiperparatireoidismo secundário (Cheng et al., 2012).

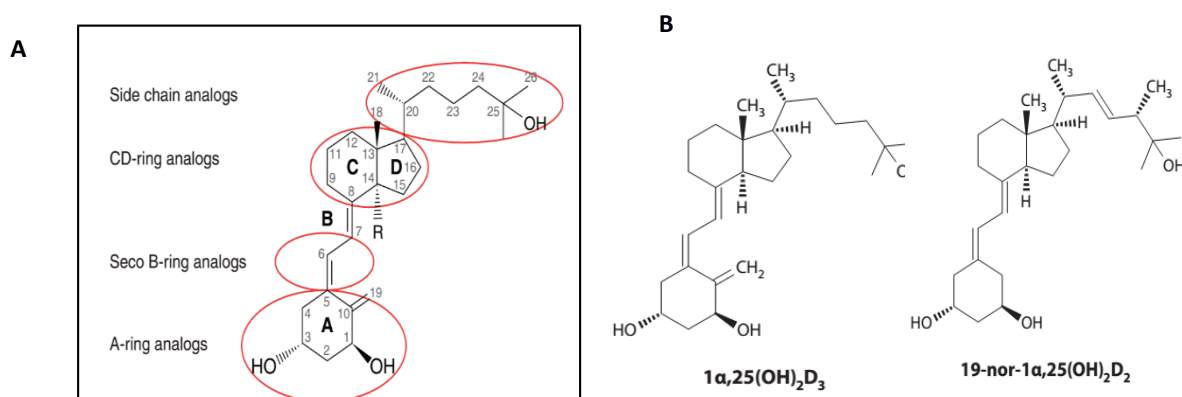


Fig.5. (A) Estrutura química da vitamina D e possíveis modificações em análogos (Christakos et al, 2016). (B) Estrutura química da vitamina D e do paricalcitol (Leyssens et al, 2014).

Inicialmente era utilizado o calcitriol no tratamento desta patologia. Porém, um dos principais problemas associados com o calcitriol é o aumento do cálcio e do fósforo sérico o que leva a limitar as doses da VitD no tratamento da doença. A partir

de então foram obtidos ativadores seletivos de VDR, ou seja, análogos da VitD que possuem mais afinidade pela glândula da paratireoide do que pelo intestino e pelos ossos (Slatopolsky et al., 2003; Cai, 2016). Modelos animais indicam que o paricalcitol é dez vezes menos hipercalcêmico e hiperfosfatêmico que o calcitriol. Esse análogo induz a diminuição da expressão de proteínas envolvidas no transporte entérico do cálcio e não aumenta a expressão de VDR intestinal (Brown et al., 2002; Slatopolsky et al., 2003).

No âmbito imunológico, Sochorová e colaboradores (2009) compararam, *in vitro*, os efeitos imunorreguladores do calcitriol e do paricalcitol em DCs originadas de monócitos humanos. Observaram que o paricalcitol possui a mesma atividade imunomoduladora do calcitriol como diminuição de produção de IL-12 por DCs, diminuição de diferenciação dos monócitos em DCs e menor ativação de linfócitos T. O paricalcitol também reduz a produção de TNF- α e IL-8 por monócitos estimulados por LPS *in vitro* (Eleftheriadis et al., 2009). Donate-Correa e colaboradores (2014) demonstraram que o paricalcitol reduziu as concentrações séricas de TNF- α e IL-6 e aumentou os níveis de IL-10 no soro de pacientes com doença renal crônica. Outro estudo, *in vitro*, com PBMC de pacientes com doença renal crônica mostrou queda significativa nos níveis de IL-1 β , IL-17, IL-6, TNF- α e IFN- γ 24 horas após uma única dose de paricalcitol (Santoro et al., 2015).

1.11 Efeitos imunorreguladores da Vitamina D em camundongos C57BL/6 e DBA/1J

Estudos indicam que a administração de VitD em camundongos C57BL/6 determina várias alterações no sistema imunológico. O tratamento destes animais com VitD diminui a produção de TNF- α , IL-1, IL-12 e IFN- γ . Este tratamento também diminui a diferenciação, ativação e o nível de maturação de DCs esplênicas. Esta ação supressora da VitD foi associada a aumento tanto na produção de IL-10 quanto no percentual de Treg (Froicu & Cantorna, 2007; He et al., 2014).

O possível efeito modulador da administração da VitD em camundongos DBA/1J não foi avaliado até o momento. Existe um único trabalho publicado por Cantorna (1998) no qual foi demonstrado que a VitD é capaz de inibir a progressão da artrite experimental. Entretanto, neste trabalho não foram avaliados parâmetros relacionados com a produção de citocinas e com a quantidade de DCs e Tregs.

Existem na literatura relatos indicando uma ação diferencial da vitamina D em diferentes linhagens de camundongos. Um estudo recente de Malley e colaboradores (2013) demonstrou que camundongos BALB/c são resistentes ao efeito imunossupressor dos raios UV em comparação com camundongos C57BL/6. O estudo mostrou que os camundongos C57BL/6 irradiados com UVB tiveram menor reação ao teste de hipersensibilidade, ao contrário dos camundongos BALB/c que não demonstraram nenhuma alteração neste teste após a irradiação. Estes resultados indicam que o background genético do camundongo pode influenciar a imunomodulação pela vitamina D.

Outro fator importante a se considerar é a presença de diferenças no sistema imune entre as linhagens de camundongos. O DBA/1J, utilizado neste trabalho, por exemplo, possui uma deficiência no componente C5 do complemento por mutação que promove maior susceptibilidade a alguns tipos de infecção como *Bacillus anthracis*, *Aspergillus fumigatus*, e *Candida albicans* comparativamente aos camundongos C57BL/6 os quais possuem C5 intacto (Sellers et al., 2012).

Racional

2. Racional

Nosso grupo de pesquisa vem investigando dois modelos de doenças inflamatórias: encefalite autoimune experimental (EAE) e artrite reumatoide experimental (AR). Investigamos principalmente o efeito tolerogênico desta vitamina quando associada com autoantígenos específicos, ou seja, com MOG (glicoproteína da mielina do oligodendrócito) e colágeno que são moléculas próprias associadas ao sistema nervoso central (SNC) e articulação, respectivamente. O efeito da associação entre MOG e VitD na EAE foi significativo tanto em termos profiláticos quanto terapêuticos (Chiuso-Minicucci et al., 2015; Mimura et al., 2016). A VitD também foi tolerogênica no modelo de artrite (Ishikawa et al., 2016), entretanto este efeito foi mais discreto do que na EAE. Considerando que estes dois modelos são induzidos por imunização ativa em linhagens distintas de camundongos, hipotetizamos que o efeito da VitD poderá depender, entre outros fatores, da linhagem de camundongo utilizada. Neste cenário resolvemos testar e comparar o efeito da VitD em duas linhagens de camundongos: C57BL/6, que é utilizado para indução de EAE e DBA/1J que está sendo empregado atualmente para a indução de artrite. Também investigamos se o paricalcitol, que é um análogo da VitD, determina efeito imunomodulador semelhante ao desta vitamina.

Referências

3. Referências

- Abu-Amer Y, Bar-Shavit Z. Impaired bone marrow-derived macrophage differentiation in vitamin D deficiency. *Cell Immunol.* 1993;151(2):356-68.
- Almerighi C, Sinistro A, Cavazza A, Ciaprini C, Rocchi G, Bergamini A. 1 alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits CD40L-induced pro-inflammatory and immunomodulatory activity in Human Monocytes. *Cytokine.* 2009;45(3):190-7.
- Baeke F, Korf H, Overbergh L, van Etten E, Verstuyf A, Gysemans C, et al. Human T lymphocytes are direct targets of 1,25-dihydroxyvitamin D-3 in the immune system. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology.* 2010;121(1-2):221-7.
- Bartels LE, Hvas CL, Agnholt J, Dahlerup JF, Agger R. Human dendritic cell antigen presentation and chemotaxis are inhibited by intrinsic 25-hydroxy vitamin D activation. *International Immunopharmacology.* 2010;10(8):922-8.
- Bas A, Lopez I, Perez J, Rodriguez M, Aguilera-Tejero E. Reversibility of calcitriol-induced medial artery calcification in rats with intact renal function. *J Bone Miner Res.* 2006;21(3):484-90.
- Berridge MJ. Vitamin D cell signalling in health and disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2015;460(1):53-71.
- Bikle D. Nonclassic actions of vitamin D. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(1):26-34.
- Bikle D. Vitamin D Metabolism, Mechanism of Action, and Clinical Applications. *Chemistry & Biology.* 2014;21(3):319-29.
- Boonstra A, Barrat FJ, Crain C, Heath VL, Savelkoul HFJ, O'Garra A. 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 has a direct effect on naive CD4(+) T cells to enhance the development of Th2 cells. *Journal of Immunology.* 2001;167(9):4974-80.
- Brown AJ, Finch J, Slatopolsky E. Differential effects of 19-nor-1,25-dihydroxyvitamin D-2 and 1,25-dihydroxyvitamin D-3 on intestinal calcium and phosphate transport. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine.* 2002;139(5):279-84.
- Cai P, Tang X, Qin W, Ji L, Li Z. Comparison between paricalcitol and active non-selective vitamin D receptor activator for secondary hyperparathyroidism in chronic kidney disease: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Int Urol Nephrol.* 2016;48(4):571-84.

- Cantorna MT, Hayes CE, DeLuca HF. 1,25-dihydroxycholecalciferol inhibits the progression of arthritis in murine models of human arthritis. *Journal of Nutrition*. 1998;128(1):68-72.
- Cantorna MT, Munsick C, Bemiss C, Mahon BD. 1,25-dihydroxycholecalciferol prevents and ameliorates symptoms of experimental murine inflammatory bowel disease. *Journal of Nutrition*. 2000;130(11):2648-52.
- Cantorna MT, Snyder L, Lin Y-D, Yang L. Vitamin D and 1,25(OH)(2)D Regulation of T cells. *Nutrients*. 2015;7(4):3011-21.
- Carlberg C, Campbell MJ. Vitamin D receptor signaling mechanisms: integrated actions of a well-defined transcription factor. *Steroids*. 2013;78(2):127-36
- Carlberg C, Molnar F. Current Status of Vitamin D Signaling and Its Therapeutic Applications. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2012;12(6):528-47.
- Chen S, Sims GP, Chen XX, Gu YY, Lipsky PE. Modulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on human B cell differentiation. *J Immunol*. 2007;179(3):1634-47.
- Cheng J, Zhang W, Zhang X, Li X, Chen J. Efficacy and Safety of Paricalcitol Therapy for Chronic Kidney Disease: A Meta-Analysis. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 2012;7(3):391-400.
- Chiuso-Minicucci F, Watanabe Ishikawa LL, Nishiyama Mimura LA, de Campos Fraga-Silva TF, Donega Franca TG, Fernanda Goncalves Zorzella-Pezavento S, et al. Treatment with Vitamin D/MOG Association Suppresses Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Plos One*. 2015;10(5).
- Christakos S, Dhawan P, Verstuyf A, Verlinden L, Carmeliet G. Vitamin D: Metabolism, Molecular Mechanism of Action, and Pleiotropic Effects. *Physiol Rev*. 2016;96(1):365-408.
- Chun RF, Liu PT, Modlin RL, Adams JS, Hewison M. Impact of vitamin D on immune function: lessons learned from genome-wide analysis. *Front Physiol*. 2014;5:151.
- D'Ambrosio D, Cippitelli M, Cocciolo MG, et al. Inhibition of IL-12 production by 1,25-dihydroxyvitamin D3. Involvement of NF-kappaB downregulation in transcriptional repression of the p40 gene. *Journal of Clinical Investigation*. 1998;101(1):252-262.
- Davies M, Heys SE, Selby PL, Berry JL, Mawer EB. Increased catabolism of 25-hydroxyvitamin D in patients with partial gastrectomy and elevated 1,25-

- dihydroxyvitamin D levels. Implications for metabolic bone disease. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1997;82(1):209-12.
- Deeb KK, Trump DL, Johnson CS. Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(9):684-700.
- DeLuca HF. History of the discovery of vitamin D and its active metabolites. *Bonekey Rep*. 2014;3:479.
- Di Rosa M, Malaguarnera M, Nicoletti F, Malaguarnera L. Vitamin D3: a helpful immuno-modulator. *Immunology*. 2011;134(2):123-39.
- Donate-Correa J, Dominguez-Pimentel V, Muros-de-Fuentes M, Mora-Fernandez C, Martin-Nunez E, Cazana-Perez V, et al. Beneficial Effects of Selective Vitamin D Receptor Activation by Paricalcitol in Chronic Kidney Disease. *Current Drug Targets*. 2014;15(7):703-9.
- Eleftheriadis T, Antoniadi G, Liakopoulos V, Galaktidou G. The Effect of Paricalcitol on Osteoprotegerin Production by Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Journal of Rheumatology*. 2009;36(4):856-7.
- Forrest KYZ, Stuhldreher WL. Prevalence and correlates of vitamin D deficiency in US adults. *Nutrition Research*. 2011;31(1):48-54.
- Froicu M, Cantorna MT. Increased sensitivity of Vitamin D receptor deficient mice to local and systemic lipopolysaccharide administration alpha. *Journal of Immunology*. 2006;176:S3-S.
- Froicu M, Cantorna MT. Vitamin D and the vitamin D receptor are critical for control of the innate immune response to colonic injury. *Bmc Immunology*. 2007;8.
- Ganz T. Defensins: Antimicrobial peptides of innate immunity. *Nature Reviews Immunology*. 2003;3(9):710-20.
- Girgis CM, Clifton-Bligh RJ, Hamrick MW, Holick MF, Gunton JE. The Roles of Vitamin D in Skeletal Muscle: Form, Function, and Metabolism. *Endocrine Reviews*. 2013;34(1):33-83.
- Giulietti A, van Etten E, Overbergh L, Stoffels K, Bouillon R, Mathieu C. Monocytes from type 2 diabetic patients have a pro-inflammatory profile. 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) works as anti-inflammatory. *Diabetes Res Clin Pract*. 2007;77(1):47-57.
- Gorman S, Kuritzky LA, Judge MA, Dixon KM, McGlade JP, Mason RS, et al. Topically applied 1,25-dihydroxyvitamin D3 enhances the suppressive activity

- of CD4+CD25+ cells in the draining lymph nodes. *J Immunol*. 2007;179(9):6273-83.
- Haussler MR, Whitfield GK, Kaneko I, Haussler CA, Hsieh D, Hsieh JC, et al. Molecular mechanisms of vitamin D action. *Calcif Tissue Int*. 2013;92(2):77-98.
- He XY, Yan J, Zhu XT, Wang QH, Pang W, Qi ZM, et al. Vitamin D Inhibits the Occurrence of Experimental Cerebral Malaria in Mice by Suppressing the Host Inflammatory Response. *Journal of Immunology*. 2014;193(3):1314-23.
- Hewison M. Antibacterial effects of vitamin D. *Nat Rev Endocrinol*. 2011;7(6):337-45.
- Hewison M. Vitamin D and immune function: Autocrine, paracrine or endocrine? *Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation*. 2012;72:92-102.
- Hii CS, Ferrante A. The Non-Genomic Actions of Vitamin D. *Nutrients*. 2016;8(3):135.
- Holick MF, Biancuzzo RM, Chen TC, Klein EK, Young A, Bibuld D, et al. Vitamin D2 is as effective as vitamin D3 in maintaining circulating concentrations of 25-hydroxyvitamin D. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(3):677-81.
- Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, et al. Evaluation, Treatment, and Prevention of Vitamin D Deficiency: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2011;96(7):1911-30.
- Holick MF, Chen TC. Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2008;87(4):1080S-6S.
- Holick MF. Biologic effects of light: Historical and new perspectives. *Biologic Effects of Light 1998*. 1999:11-32.
- Holick MF. Environmental factors that influence the cutaneous production of vitamin D. *Am J Clin Nutr*. 1995;61(3 Suppl):638S-45S.
- Holick MF. Resurrection of vitamin D deficiency and rickets. *Journal of Clinical Investigation*. 2006;116(8):2062-72.
- Holick MF. The influence of vitamin D on bone health across the life cycle. *Journal of Nutrition*. 2005;135(11):2726S-7S.
- Holick MF. Vitamin D deficiency pandemic: The healthful benefits of the d-lightful vitamin D. *Calcified Tissue International*. 2007;80:S16-S.
- Ishikawa LL, Colavite PM, Fraga-Silva TF, Mimura LA, França TG, Zorzella-Pezavento SF, et al. Systemic Administration of Proteoglycan Protects BALB/c

- Retired Breeder Mice from Experimental Arthritis. *J Immunol Res.* 2016;2016:676513
- Ivanovski O, Nikolov IG, Joki N, Caudrillier A, Phan O, Mentaverri R, et al. The calcimimetic R-568 retards uremia-enhanced vascular calcification and atherosclerosis in apolipoprotein E deficient (apoE^{-/-}) mice. *Atherosclerosis.* 2009;205(1):55-62.
- Jenab M, Bueno-de-Mesquita HB, Ferrari P, van Duijnhoven FJB, Norat T, Pischon T, et al. Association between pre-diagnostic circulating vitamin D concentration and risk of colorectal cancer in European populations: a nested case-control study. *British Medical Journal.* 2010;340.
- Jeffery LE, Wood AM, Qureshi OS, Hou TZ, Gardner D, Briggs Z, et al. Availability of 25-hydroxyvitamin D(3) to APCs controls the balance between regulatory and inflammatory T cell responses. *J Immunol.* 2012;189(11):5155-64.
- Kamangar F, Isip L, Bhutani T, Dennis M, Heller MM, Lee ES, et al. How psoriasis patients perceive, obtain, and use biologic agents: Survey from an academic medical center. *J Dermatolog Treat.* 2013;24(1):13-2
- Kannan S, Lim HW. Photoprotection and vitamin D: a review. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2014;30(2-3):137-45.
- Karthus N, van Spriel AB, Looman MW, Chen S, Spilgies LM, Lieben L, et al. Vitamin D controls murine and human plasmacytoid dendritic cell function. *J Invest Dermatol.* 2014;134(5):1255-64.
- Koeffler HP. Vitamin D: myeloid differentiation and proliferation. *Haematol Blood Transfus.* 1985;29:409-17.
- Kong J, Li YC. Molecular mechanism of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ inhibition of adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006;290(5):E916-24.
- Kongsbak M, von Essen MR, Levring T, Schjerling P, Woetmann A, Odum N, et al. Vitamin D-binding protein controls T cell responses to vitamin D. *Bmc Immunology.* 2014;15.
- LeBlanc ES, Zakher B, Daeges M, Pappas M, Chou R. Screening for Vitamin D Deficiency: A Systematic Review for the US Preventive Services Task Force. *Annals of Internal Medicine.* 2015;162(2):109-+.
- Lehmann B, Genehr T, Knuschke P, Pietzsch J, Meurer M. UVB-induced conversion of 7-dehydrocholesterol to 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D-3 in an in vitro

- human skin equivalent model. *Journal of Investigative Dermatology*. 2001;117(5):1179-85.
- Leyssens C, Verlinden L, Verstuyf A. The future of vitamin D analogs. *Frontiers in Physiology*. 2014;5.
- Lieben L, Benn BS, Ajibade D, Stockmans I, Moermans K, Hediger MA, et al. Trpv6 mediates intestinal calcium absorption during calcium restriction and contributes to bone homeostasis. *Bone*. 2010;47(2):301-8.
- Lindh JD, Bjorkhem-Bergman L, Eliasson E. Vitamin D and drug-metabolising enzymes. *Photochemical & Photobiological Sciences*. 2012;11(12):1797-801.
- Liu PT, Stenger S, Li H, Wenzel L, Tan BH, Krutzik SR, et al. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science*. 2006;311(5768):1770-3.
- Mahon BD, Wittke A, Weaver V, Cantorna MT. The targets of vitamin D depend on the differentiation and activation status of CD4 positive T cells. *J Cell Biochem*. 2003;89(5):922-32.
- Malley RC, Muller HK, Norval M, Woods GM. Dietary vitamin D alters the response of the skin to UVB-irradiation depending on the genetic background of the mice. *Photochem Photobiol Sci*. 2013;12(3):536-45.
- Mason RS, Sequeira VB, Gordon-Thomson C. Vitamin D: the light side of sunshine. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2011;65(9):986-93.
- Menendez C, Lage M, Peino R, Baldelli R, Concheiro P, Diéguez C, et al. Retinoic acid and vitamin D(3) powerfully inhibit in vitro leptin secretion by human adipose tissue. *J Endocrinol*. 2001;170(2):425-31.
- Millen AE, Wactawski-Wende J, Pettinger M, Melamed ML, Tylavsky FA, Liu S, et al. Predictors of serum 25-hydroxyvitamin D concentrations among postmenopausal women: the Women's Health Initiative Calcium plus Vitamin D Clinical Trial. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2010;91(5):1324-35.
- Mimura LA, Chiuso-Minicucci F, Fraga-Silva TF, Zorzella-Pezavento SF, França TG, Ishikawa LL, et al. Association of myelin peptide with vitamin D prevents autoimmune encephalomyelitis development. *Neuroscience*. 2016;317:130-40.
- Morris HA. Vitamin D Activities for Health Outcomes. *Annals of Laboratory Medicine*. 2014;34(3):181-6.

- Müller K, Heilmann C, Poulsen LK, Barington T, Bendtzen K. The role of monocytes and T cells in 1,25-dihydroxyvitamin D₃ mediated inhibition of B cell function in vitro. *Immunopharmacology*. 1991;21(2):121-8.
- Narvaez CJ, Matthews D, Broun E, Chan M, Welsh J. Lean phenotype and resistance to diet-induced obesity in vitamin D receptor knockout mice correlates with induction of uncoupling protein-1 in white adipose tissue. *Endocrinology*. 2009;150(2):651-61.
- Narvaez CJ, Simmons KM, Brunton J, Salinero A, Chittur SV, Welsh JE. Induction of STEAP4 correlates with 1,25-dihydroxyvitamin D₃ stimulation of adipogenesis in mesenchymal progenitor cells derived from human adipose tissue. *J Cell Physiol*. 2013;228(10):2024-36.
- Norman AW. The History of the Discovery of Vitamin D and Its Daughter Steroid Hormone. *Annals of Nutrition and Metabolism*. 2012;61(3):199-206.
- Nussbaum SR. Pathophysiology and management of severe hypercalcemia. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 1993;22(2):343-62.
- Palmer MT, Lee YK, Maynard CL, Oliver JR, Bikle DD, Jetten AM, et al. Lineage-specific Effects of 1,25-Dihydroxyvitamin D-3 on the Development of Effector CD4 T Cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2011;286(2):997-1004.
- Penna G, Amuchastegui S, Giarratana N, Daniel KC, Vulcano M, Sozzani S, et al. 1,25-dihydroxyvitamin D-3 selectively modulates tolerogenic properties in myeloid but not plasmacytoid dendritic cells. *Journal of Immunology*. 2007;178(1):145-53.
- Penna G, Roncari A, Amuchastegui S, Daniel KC, Berti E, Colonna M, et al. Expression of the inhibitory receptor ILT3 on dendritic cells is dispensable for induction of CD4(+)Foxp3(+) regulatory T cells by 1,25-dihydroxyvitamin D-3. *Blood*. 2005;106(10):3490-7.
- Priehl B, Treiber G, Pieber TR, Amrein K. Vitamin D and immune function. *Nutrients*. 2013;5(7):2502-21.
- Provvedini DM, Tsoukas CD, Deftos LJ, Manolagas SC. 1,25-DIHYDROXYVITAMIN D₃ RECEPTORS IN HUMAN-LEUKOCYTES. *Science*. 1983;221(4616):1181-2.
- Rajakumar K. Vitamin D, cod-liver oil, sunlight, and rickets: A historical perspective. *Pediatrics*. 2003;112(2):E132-E5.

- Ren S, Nguyen L, Wu S, Encinas C, Adams JS, Hewison M. Alternative splicing of vitamin D-24-hydroxylase: a novel mechanism for the regulation of extrarenal 1,25-dihydroxyvitamin D synthesis. *J Biol Chem*. 2005;280(21):20604-11.
- Sadeghi K, Wessner B, Laggner U, Ploder M, Tamandl D, Friedl J, et al. Vitamin D3 down-regulates monocyte TLR expression and triggers hyporesponsiveness to pathogen-associated molecular patterns. *Eur J Immunol*. 2006;36(2):361-70.
- Samuel L, Borrell LN. The effect of body mass index on adequacy of serum 25-hydroxyvitamin D levels in US adults: the National Health and Nutrition Examination Survey 2001 to 2006. *Annals of Epidemiology*. 2014;24(10):781-4.
- Santoro D, Lucisano S, Gagliostro G, Alibrandi A, Ientile R, Bellinghieri G, et al. Vitamin D Receptor Polymorphism in Chronic Kidney Disease Patients With Complicated Cardiovascular Disease. *Journal of Renal Nutrition*. 2015;25(2):187-93.
- Sellers RS, Clifford CB, Treuting PM, Brayton C. Immunological variation between inbred laboratory mouse strains: points to consider in phenotyping genetically immunomodified mice. *Vet Pathol*. 2012;49(1):32-43.
- Sergeev IN. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 induces Ca²⁺-mediated apoptosis in adipocytes via activation of calpain and caspase-12. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;384(1):18-21.
- Sergeev, IN, Song Q. High vitamin D and calcium intakes reduce diet-induced obesity in mice by increasing adipose tissue apoptosis. *Molecular Nutrition Food Research*. 2014; 58(6): 1342–1348
- Shane E, Irani D. Hypercalcemia: pathogenesis, clinical manifestations, differential diagnosis, and management. *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*, Favus MJ (ed.). Philadelphia: Lippincott, Williams &Wilkins (1999); 183-87.
- Shin JS, Choi MY, Longtine MS, Nelson DM. Vitamin D effects on pregnancy and the placenta. *Placenta*. 2010;31(12):1027-34.
- Shinkyō R, Sakaki T, Kamakura M, Ohta M, Inouye K. Metabolism of vitamin D by human microsomal CYP2R1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2004;324(1):451-7.
- Sisley SR, Arble DM, Chambers AP, Gutierrez-Aguilar R, He Y, Xu Y, et al. "Hypothalamic Vitamin D Improves Glucose Homeostasis and Reduces Weight". *Diabetes*. 2016.

- Slatopolsky E, Finch J, Brown A. New vitamin D analogs. *Kidney Int Suppl.* 2003(85):S83-7.
- Sloka S, Silva C, Wang J, Yong VW. Predominance of Th2 polarization by vitamin D through a STAT6-dependent mechanism. *J Neuroinflammation.* 2011;8:56.
- Sochorová K, Budinský V, Rozková D, Tobiasová Z, Dusilová-Sulková S, Spísek R, et al. Paricalcitol (19-nor-1,25-dihydroxyvitamin D₂) and calcitriol (1,25-dihydroxyvitamin D₃) exert potent immunomodulatory effects on dendritic cells and inhibit induction of antigen-specific T cells. *Clin Immunol.* 2009;133(1):69-77.
- Sprague SM, Llach F, Amdahl M, Taccetta C, Battle D. Paricalcitol versus calcitriol in the treatment of secondary hyperparathyroidism. *Kidney Int.* 2003;63(4):1483-90.
- Staeva-Vieira TP, Freedman LP. 1,25-dihydroxyvitamin D-3 inhibits IFN-gamma and IL-4 levels during in vitro polarization of primary murine CD4(+) T cells. *Journal of Immunology.* 2002;168(3):1181-9.
- Szymczak I, Pawliczak R. The active metabolite of vitamin D as a potential immunomodulator. *Scand J Immunol.* 2015.
- Sunycz JA. The use of calcium and vitamin D in the management of osteoporosis. *Ther Clin Risk Manag.* 2008;4(4):827-36.
- Takeda M, Yamashita T, Sasaki N, Nakajima K, Kita T, Shinohara M, et al. Oral administration of an active form of vitamin D₃ (calcitriol) decreases atherosclerosis in mice by inducing regulatory T cells and immature dendritic cells with tolerogenic functions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30(12):2495-503.
- Unger WJ, Laban S, Kleijwegt FS, van der Slik AR, Roep BO. Induction of Treg by monocyte-derived DC modulated by vitamin D-3 or dexamethasone: Differential role for PD-L1. *European Journal of Immunology.* 2009;39(11):3147-59.
- van Halteren AGS, van Etten E, de Jong EC, Bouillon R, Roep BO, Mathieu C. Redirection of human autoreactive T-cells upon interaction with dendritic cells modulated by TX527, an analog of 1,25 dihydroxyvitamin D-3. *Diabetes.* 2002;51(7):2119-25.

- Waddell A, Zhao J, Cantorna MT. NKT cells can help mediate the protective effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *Int Immunol*. 2015;27(5):237-44.
- Wong KE, Kong J, Zhang W, Szeto FL, Ye H, Deb DK, et al. Targeted expression of human vitamin D receptor in adipocytes decreases energy expenditure and induces obesity in mice. *J Biol Chem*. 2011;286(39):33804-10.
- Wong KE, Szeto FL, Zhang W, Ye H, Kong J, Zhang Z, et al. Involvement of the vitamin D receptor in energy metabolism: regulation of uncoupling proteins. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009;296(4):E820-8.
- Yin K, Agrawal DK. Vitamin D and inflammatory diseases. *J Inflamm Res*. 2014;7:69-87.
- Zella JB, McCary LC, DeLuca HF. Oral administration of 1,25-dihydroxyvitamin D-3 completely protects NOD mice from insulin-dependent diabetes mellitus. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2003;417(1):77-80.
- Zhang Y, Leung DY, Richers BN, Liu Y, Remigio LK, Riches DW, et al. Vitamin D inhibits monocyte/macrophage proinflammatory cytokine production by targeting MAPK phosphatase-1. *J Immunol*. 2012;188(5):2127-35.

Objetivos

4. Objetivos

4.1 Objetivo geral

Avaliar e comparar os efeitos imunomoduladores da VitD e do paricalcitol em camundongos C57BL/6 e DBA/1J.

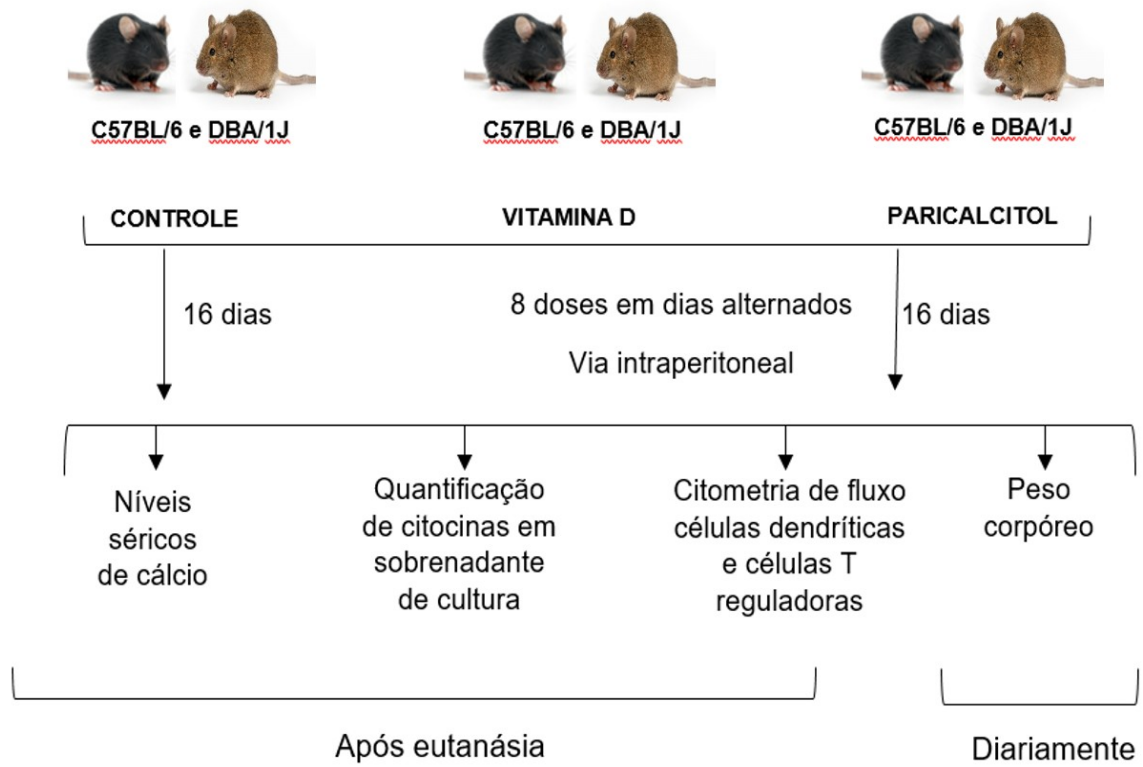
4.2 Objetivos específicos

- I. Avaliar e comparar o efeito da administração da VitD e do paricalcitol nos níveis séricos de cálcio e no peso corporal;
- II. Avaliar e comparar o efeito da administração da VitD e paricalcitol na produção de citocinas pró e anti-inflamatórias;
- III. Avaliar e comparar os efeitos da administração da VitD e do paricalcitol no grau de maturação das células dendríticas e no percentual de linfócitos T reguladores.

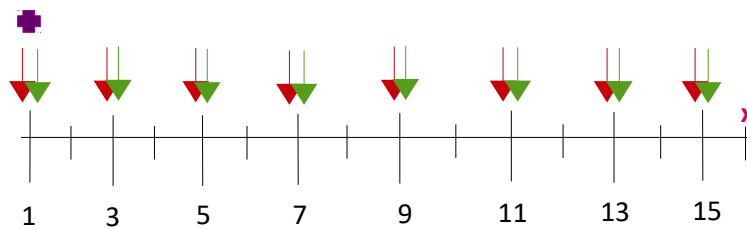
Protocoles expérimentaux

5. Protocolos experimentais

5.1 Protocolo experimental geral



5.2 Protocolo de administração de Vitamina D e paricalcitol



✚ Início do tratamento

▼ Tratamento com vitamina D

ou

▼ Tratamento com paricalcitol

x Eutanásia

Resultados e discussão

6. Resultados e discussão

Os resultados e discussão dos dados obtidos encontram-se apresentados na forma de artigo científico.

- **Artigo científico**

C57BL/6 and DBA/1J mice differ in their response to vitamin D and paricalcitol supplementation (artigo submetido na revista *International Immunopharmacology*).

Artigo científico

7. Artigo científico

Elsevier Editorial System(tm) for International Immunopharmacology
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: C57BL/6 and DBA/1J mice differ in their response to vitamin D and paricalcitol supplementation

Article Type: Full length article

Keywords: Vitamin D; paricalcitol; immunomodulation; cytokines; C57BL/6; DBA/1J.

Corresponding Author: Dr. Sofia Fernanda Gonçalves Zorzella-Pezavento, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: Universidade Estadual Paulista - UNESP

First Author: Aline P Missio

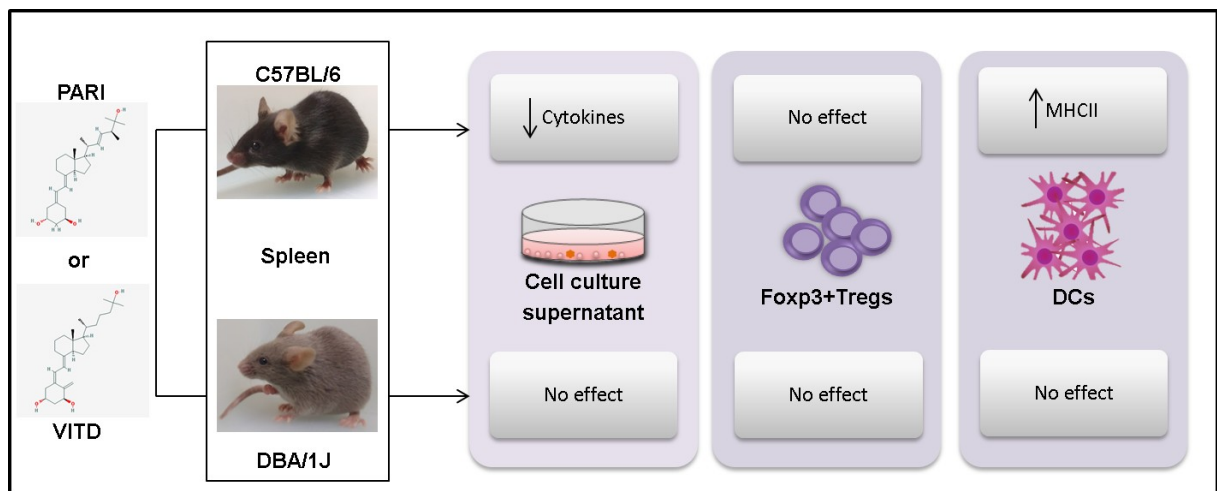
Order of Authors: Aline P Missio; Thais Fernanda C Fraga-Silva; Larissa Lumi W Ishikawa; Luiza Ayumi N Mimura; Thais Graziela D França; Alexandrina Sartori; Sofia Fernanda Gonçalves Zorzella-Pezavento, Ph.D.

Abstract: Active vitamin D3 (VitD) has a relevant role in many body functions, including effects on innate and specific immunity. However, as VitD deficiency already reached epidemic proportions worldwide, its supplementation has been used in various diseases. Different mice strains have been widely employed to investigate VitD immunomodulatory properties. In this work, we compared the effect of VitD and paricalcitol supplementation in C57BL/6 and DBA/1J. These two mice strains were treated with 0.1 µg of VitD or paricalcitol, every other day, during 15 days. Body weight was assessed daily and blood and spleen cells were collected 24 hours after the last dose. In the C57BL/6 strain, VitD decreased body weight and cytokine production by the spleen. It also increased serum calcium concentration and the level of MHCII expression in CD11c+ dendritic cells. Paricalcitol did not affect body weight and serum calcium levels but it decreased cytokine production in this strain. Except body weight that was downregulated by VitD, the other parameters were not altered by VitD or paricalcitol in the DBA/1J strain. An increased dose of VitD decreased body weight, downregulated IL-2, IFN-γ and IL-5 production by spleen cells but did not affect the other cytokines neither the expression of MHC II and CD86 in dendritic cells in DBA/1J mice. A same higher dose of paricalcitol significantly increased TNF-α but had no other significant effects. Together, these results show that C57BL/6 and DBA/1J mice strains differ in their response to VitD and paricalcitol supplementation, being DBA/1J more resistant to their effects.

Highlights

- C57BL/6 and DBA/1J mice strains present differential response to vitamin D and paricalcitol supplementation
- Cytokine production was highly down-modulated by vitamin D and paricalcitol in C57BL/6 mice
- DBA/1J mice require higher VitD dose than C57BL/6 ones to be slightly immunomodulated

Graphical Abstract



Title page**C57BL/6 and DBA/1J mice differ in their response to vitamin D and paricalcitol supplementation**

A.P. Missio, T.F.C. Fraga-Silva, L.L.W. Ishikawa, L.A.N. Mimura, T.G.D. França, A. Sartori, S.F.G. Zorzella-Pezavento*

Department of Microbiology and Immunology, Institute of Biosciences of Botucatu, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brazil.

*Corresponding author: Sofia Fernanda Gonçalves Zorzella-Pezavento, PhD; phone number: +55 14 38800415; fax number: +55 14 38153744; e-mail: szorzella@yahoo.com.br.

Abstract

Active vitamin D₃ (VitD) has a relevant role in many body functions, including effects on innate and specific immunity. However, as VitD deficiency already reached epidemic proportions worldwide, its supplementation has been used in various diseases. Different mice strains have been widely employed to investigate VitD immunomodulatory properties. In this work, we compared the effect of VitD and paricalcitol supplementation in C57BL/6 and DBA/1J. These two mice strains were treated with 0.1 µg of VitD or paricalcitol, every other day, during 15 days. Body weight was assessed daily and blood and spleen cells were collected 24 hours after the last dose. In the C57BL/6 strain, VitD decreased body weight and cytokine production by the spleen. It also increased serum calcium concentration and the level of MHCII expression in CD11c⁺ dendritic cells. Paricalcitol did not affect body weight and serum calcium levels but it decreased cytokine production in this strain. Except body weight that was downregulated by VitD, the other parameters were not altered by VitD or paricalcitol in the DBA/1J strain. An increased dose of VitD decreased body weight, downregulated IL-2, IFN-γ and IL-5 production by spleen cells but did not affect the other cytokines neither the expression of MHC II and CD86 in dendritic cells in DBA/1J mice. A same higher dose of paricalcitol significantly increased TNF-α but had no other significant effects. Together, these results show that C57BL/6 and DBA/1J mice strains differ in their response to VitD and paricalcitol supplementation, being DBA/1J more resistant to their effects.

Keywords: Vitamin D, paricalcitol, immunomodulation, cytokines, C57BL/6, DBA/1J.

1. Introduction

Vitamin D (VitD) is a fat-soluble vitamin that can be obtained from the diet but that is mainly originated in the skin by the conversion of 7-dehydrocholesterol after UV light stimulation. Its role in calcium metabolism, bone growth and prevention of rickets and osteomalacia has been known for over two hundred years (Holick, 2006). However, nowadays it is well established that VitD also contributes to a variety of other biological actions, including control of cell proliferation and differentiation in many tissues. The majority of these activities is mediated through VitD binding to the nuclear VitD receptor (VDR) (Kato, 2000). Both innate and adaptive immune responses are also modulated by VitD. It is well established that VitD enhances some mechanisms involved in protection against pathogens whereas it simultaneously triggers immunosuppressive pathways that restrain prolonged and deleterious inflammatory reactions in the body (Trochoutsou et al., 2015).

VitD deficiency has been considered a public health problem worldwide (Douros et al., 2015) and its association with a plethora of diseases, as allergic conditions (Douros et al., 2015), chronic diseases (Weisshof & Chermesh, 2015), cardiovascular disease (Pilz et al., 2016), diabetes (Altieri et al., 2016) and autoimmune inflammatory disease such as lupus erythematosus (Watad et al., 2016) and multiple sclerosis (Simon et al., 2012) has been recently reinforced. VitD supplementation is considered a simple, safe and inexpensive procedure to restore its suitable levels in these pathological conditions. However, the administration of a given VitD dose has been associated with a high variable level of this substance in the blood (Aloia et al., 2008). Many factors can contribute to this variable response to VitD supplementation such as obesity status (Blum et al., 2008), polymorphism in VitD binding protein and also in the VDR (Uitterlinden et al., 2004). The baseline methylation levels of CYP2R1 and CYP24A1, which are enzymes involved in VitD metabolism, could also affect the response to VitD supplementation (Zhou et al., 2014). The prevailing calcemic activity of $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 has precluded its widespread use in many pathologies. VitD analogues devoid of this and other side effects were therefore synthesized for human application. Paricalcitol is a VitD analogue marketed by Abbott Laboratories under the trade name Zemplar[®]. It is indicated for treatment of secondary hyperparathyroidism associated with chronic renal failure (Večerić-Haler et al., 2016.). Some paricalcitol immunomodulatory activities were already validated. For example, this substance impaired differentiation of immature dendritic cells significantly decreasing their ability to induce T cell proliferation in response to antigen stimulation (Sochorová et al., 2009).

Considering that supplementation with VitD or paricalcitol has the potential to be used as an adjunct therapy for many inflammatory diseases but that individuals could respond differently, we compared the effect of VitD and paricalcitol supplementation in two inbred mice strains, C57BL/6 and DBA/1J.

2. Materials and Methods

2.1. Experimental design

C57BL/6 and DBA/1J mice were injected with 0.1 µg of VitD or paricalcitol every other day during 15 days. Mice injected only with the vehicle were used as controls. Body weight was daily assessed. One day after the last dose the animals were euthanized and the following parameters were analyzed in the spleen: cytokine production by cell cultures *in vitro* stimulated with concanavalin A (ConA), percentage of Foxp3⁺ regulatory T cells (Tregs) and percentage of CD11c⁺MHCII⁺CD86⁺ dendritic cells (DCs). The median of the fluorescence intensity (MFI) corresponding to major histocompatibility complex class II (MHCII) and CD86 expression were also evaluated. Blood samples were used to assess calcium levels. A second set of similar experiments was performed to evaluate the effect of a higher concentration of VitD and paricalcitol in DBA/1J mice. The experimental design and the chemical structures of VitD and paricalcitol are depicted at figure 1.

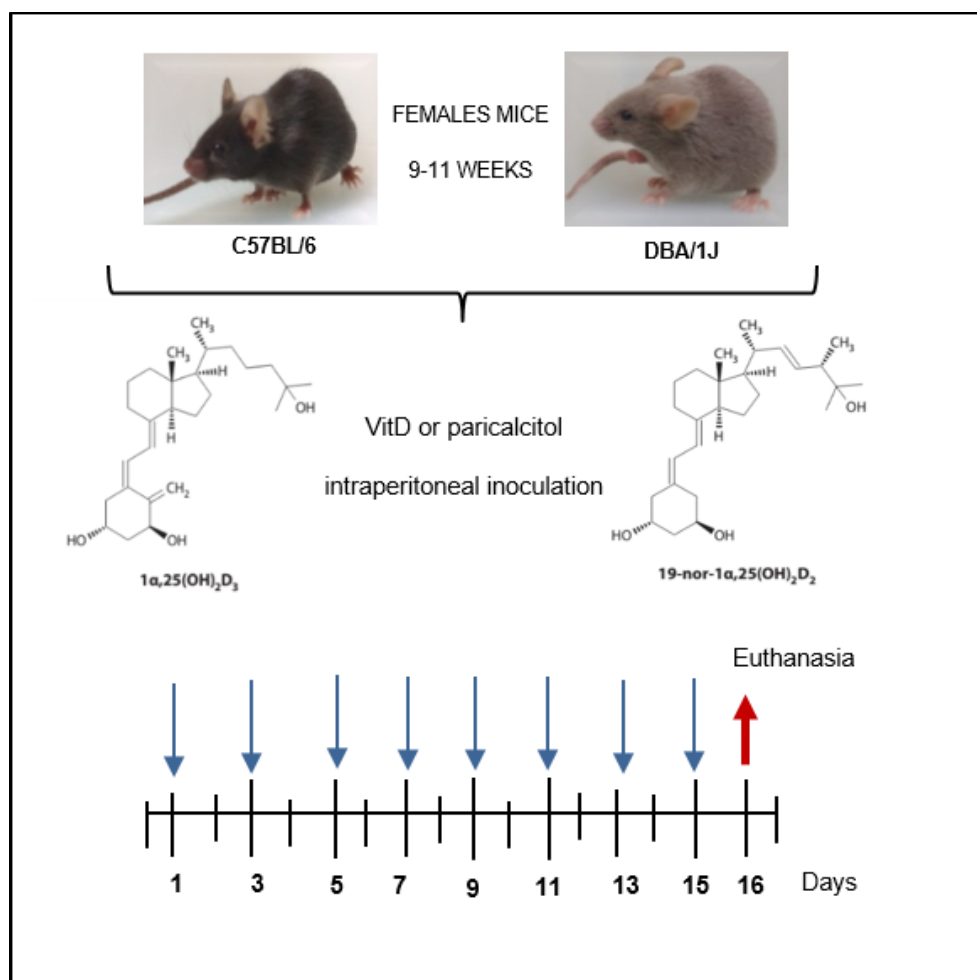


Figure 1: Summary of the experimental design. Comparative molecular structures of vitamin D and paricalcitol and the timeline illustration of the treatment.

2.2. Animals

Female C57BL/6 mice were purchased from University of São Paulo (USP, Ribeirão Preto, SP, Brazil) and female DBA/1J mice were from our own animal facility. Both strains aged between 9 and 11 weeks with comparable weights when tested. The animals received sterilized food and water *ad libitum*. They were handled according to the rules established by the Ethics Committee for Animal Experimentation - Institute of Biosciences of Botucatu (Protocol number 815).

2.3. Drugs

Vitamin D (1α,25-dihydroxyvitamin D₃) was purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) and paricalcitol (Zemplar®) was purchased from Abbott Laboratories (Milan, Italy). The following monoclonal antibodies were used in flow cytometric assays: PerCP-labeled anti-mouse CD3 (clone

145-2C11); FITC-labeled anti-mouse CD4 (clone GK1.5); APC-labeled anti-mouse CD25 (clone PC61.5); PerCP-labeled anti-mouse F4/80 (clone BM8); FITC-labeled anti-mouse CD11c (clone N418); APC-labeled anti-mouse MHCII (clone M5/114.15.2); PE-labeled anti-mouse CD86 (clone G11). A forkhead box P3 (Foxp3) PE Staining Set was also used for intracellular staining. All reagents for flow cytometric assays were purchased from eBioscience (San Diego, CA, USA).

2.4. Determination of calcium levels

Calcium levels were analyzed using Cálcio Arsenazo III commercial kit (Bioclin, Belo Horizonte, MG, Brazil), according to manufacturer's instruction.

2.5. Assessment of cytokine production by ELISA

One day after the last VitD and paricalcitol doses, the animals were euthanized and the spleens removed in aseptic conditions. Spleens were disrupted and the cells adjusted to a 5×10^6 cells/ml concentration. These cells were cultured in complete RPMI medium (supplemented with 10% of fetal calf serum and 2 mM of L-glutamine), in the presence of 20 $\mu\text{g/ml}$ of ConA. Cytokine levels were evaluated 48h later by enzyme-linked immunosorbent assay in culture supernatants using IL-2, IL-5, IFN- γ and IL-10 OptEIA Sets (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) and IL-6, IL-17, TNF- α (R&D System, Minneapolis, MN, USA) according to the manufacturer's instructions.

2.6. Assessment of regulatory and dendritic cells by flow cytometry

Spleen cells were collected and were lysed with buffer containing NH_4Cl . For Tregs analysis, cells were incubated with 0.2 μg of anti-CD3, 0.5 μg of anti-CD4 and 0.25 μg of anti-CD25 for 30 minutes at 4°C. The cells were washed and prepared for intracellular staining. Foxp3 transcription factor was detected according to manufacturer's instructions. For DCs analysis, splenic cells were incubated with X μg of anti-F4/80, 0.25 μg of anti-CD11c, 0.03 μg of anti-MHCII and 0.125 μg of anti-CD86 for 30 min at 4°C. The cells were then washed, resuspended in flow cytometry buffer and fixed in 1% paraformaldehyde solution. The cells were analyzed by flow cytometry using FACSCanto II (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) for data acquisition and FlowJo software (TreeStar, Ashland, OR, USA) for Tregs and DCs analyses.

2.7. Statistical analysis

Results were expressed as mean \pm standard deviation or median with interquartile ranges (25-75%). Comparisons between groups were made by One-way ANOVA followed by Tukey's test for parametric variables and by Kruskal-Wallis followed by Dunn's test for non-parametric ones. Statistical analysis was performed using SigmaPlot 12.0 software (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA) and $p < 0.05$ was considered significant. Prism 6.0 software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) was used for graphics.

3. Results

3.1. VitD decreases body weight in C57BL/6 and DBA/1J

As lower levels of VitD have been described in overweight or obese individuals (Shanmugalingam et al., 2014), we initially evaluated the effect of supplementation with 0.1 μg on body weight. Both mice strains started to lose weight between 6 and 8 days after VitD treatment, that is, after 3 to 4 doses as illustrated in figure 2A and 2B. This effect was more pronounced in the C57BL/6 strain. As predicted by paricalcitol properties, this analogue did not affect body weight in none of the mice strains.

3.2. VitD causes hypercalcemia in C57BL/6 but not in DBA/1J

The active form of vitamin D plays a major role in maintaining calcium and phosphate homeostasis. However, supplementation with elevated VitD doses can provoke hypercalcemia (Ferronato et al., 2015). To check if the supplementation protocol was altering calcium concentration, this element was quantified in serum samples. As displayed in figure 2D, VitD increased calcium levels in C57BL/6 but not in DBA/1J animals. Paricalcitol administration did not trigger this effect in any of these strains.

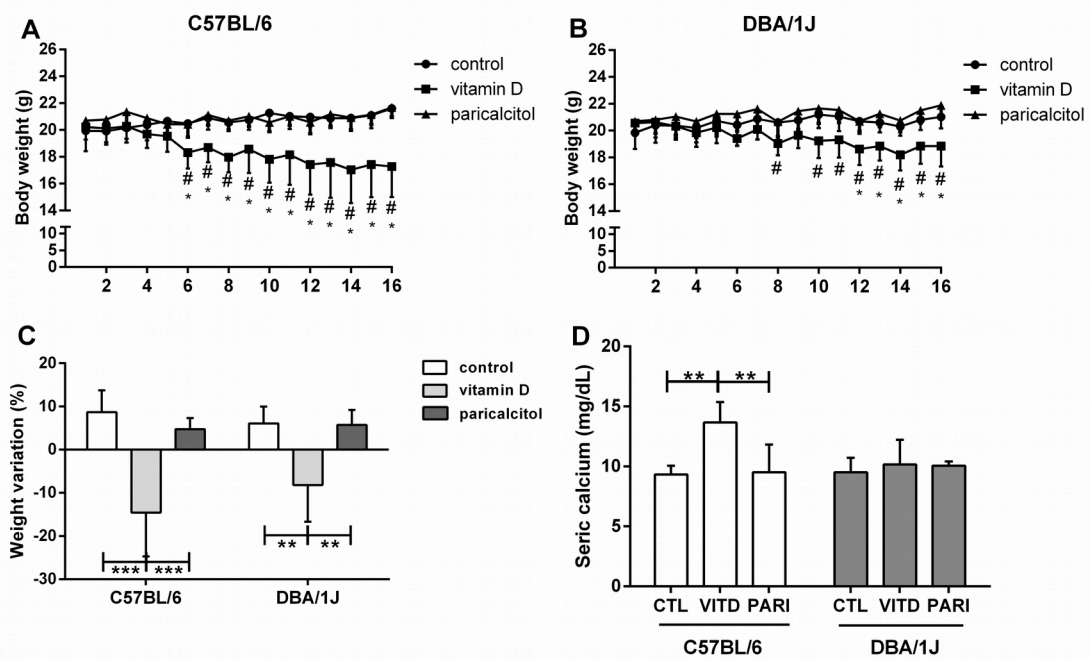


Figure 2: Effect of vitamin D and paricalcitol on body weight and serum calcium levels of C57BL/6 and DBA/1J mice. C57BL/6 and DBA/1J mice were intraperitoneally injected with 0.1 μ g of VitD or paricalcitol during 15 alternated days. C57BL/6 body weight (A), DBA/1J body weight (B), weight variation (C) and serum calcium (D). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ represent the statistical difference among the groups. Results were expressed as mean \pm SD of three to six animals per group.

3.3. VitD and paricalcitol downmodulate pro-inflammatory cytokine production only in C57BL/6

Pro-inflammatory cytokines are major mediators of a variety of human diseases, including autoimmune pathologies and chronic inflammatory states (Moudgil et al., 2011), contributing to their initiation and development. A great deal of attention has been focused in substances able to downregulate cytokine production. The adopted short protocol of VitD supplementation was able to significantly downmodulate the production of IL-6, TNF- α , IFN- γ , IL-2 and IL-17 production in C57BL/6 mice (figures 3A, 3B, 3C, 3D and 3E, respectively). Paricalcitol triggered a similar but not so pronounced downmodulatory effect. Neither VitD nor paricalcitol were able to affect the production of these cytokines in DBA/1J

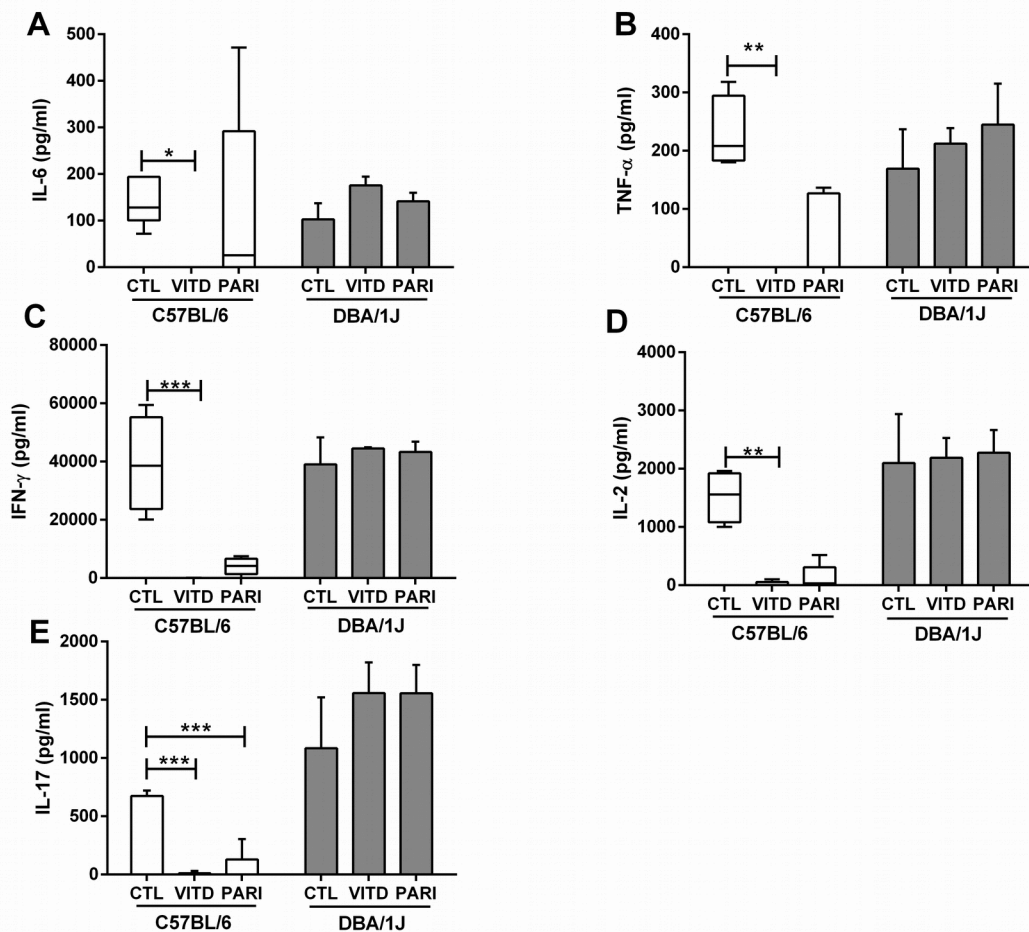


Figure 3: Effect of vitamin D and paricalcitol on pro-inflammatory cytokine production by C57BL/6 and DBA/1J mice. C57BL/6 and DBA/1J mice were intraperitoneally injected with 0.1 μ g of VitD or paricalcitol during 15 alternated days. IL-6 (A), TNF- α (B), IFN- γ (C), IL-2 (D) and IL-17 (E) were measured in spleen cell cultures stimulated with ConA. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ represent the statistical difference among the groups. Results were expressed as mean \pm SD (column) or medians and interquartile range (25–75%, box) of three to six animals per group.

3.4. VitD and paricalcitol downmodulate IL-5 and IL-10 production only in C57BL/6 mice

One way to regulate cytokine production by Th1 and Th17 cells is the triggering of a counter-regulation mechanism mediated by anti-inflammatory cytokines such as IL-5 and IL-10. However, as shown in figure 4, these two cytokines were also significantly down-modulated in C57BL/6 mice by both, VitD and paricalcitol. Again, no effect was detected in these cytokines when spleen cells from DBA/1J were tested.

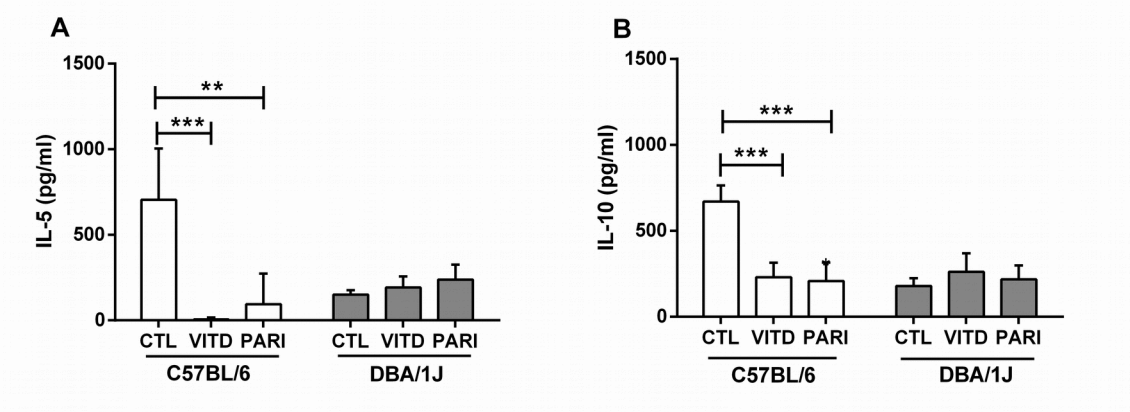


Figure 4: Effect of vitamin D and paricalcitol on anti-inflammatory cytokine production by C57BL/6 and DBA/1J mice. C57BL/6 and DBA/1J mice were intraperitoneally injected with 0.1 μ g of VitD or paricalcitol during 15 alternated days. IL-5 (A) and IL-10 (B) were measured in spleen cell cultures stimulated with ConA. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ represent the statistical difference among the groups. Results were expressed as mean \pm SD of three to six animals per group.

3.5. Effect of vitamin D and paricalcitol in the percentage of Tregs

It is well established that VitD increases the proportion of Tregs by direct and indirect mechanisms, decreasing, therefore, the unwanted immune response that can cause diseases (Chambers & Hawrylowicz, 2011; Hewison et al., 2012). Both mice strains presented similar percentages of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells in the spleen, under normal conditions. As demonstrated in figure 5E and 5F, the percentage of these cells was not altered by any of these substances in these two strains.

3.6. Effect of VitD and paricalcitol in CD11c⁺MHCII⁺CD86⁺ DCs

Dendritic cells, that are considered the most potent antigen-presenting cells (APCs), express nuclear receptors for VitD and are one of its main targets (Pederson et al., 2011). In this investigation, we observed that the percentage of these APCs was significantly higher in C57BL/6 mice in state conditions as shown in figure 5A. They also behaved differently under the effect of VitD. Cells from C57BL/6 expressed significantly higher levels of MHCII, whereas DBA/1J MHCII expression was not affected (figure 5C). CD86 levels were not altered in any of these strains by VitD or paricalcitol (figure 5D).

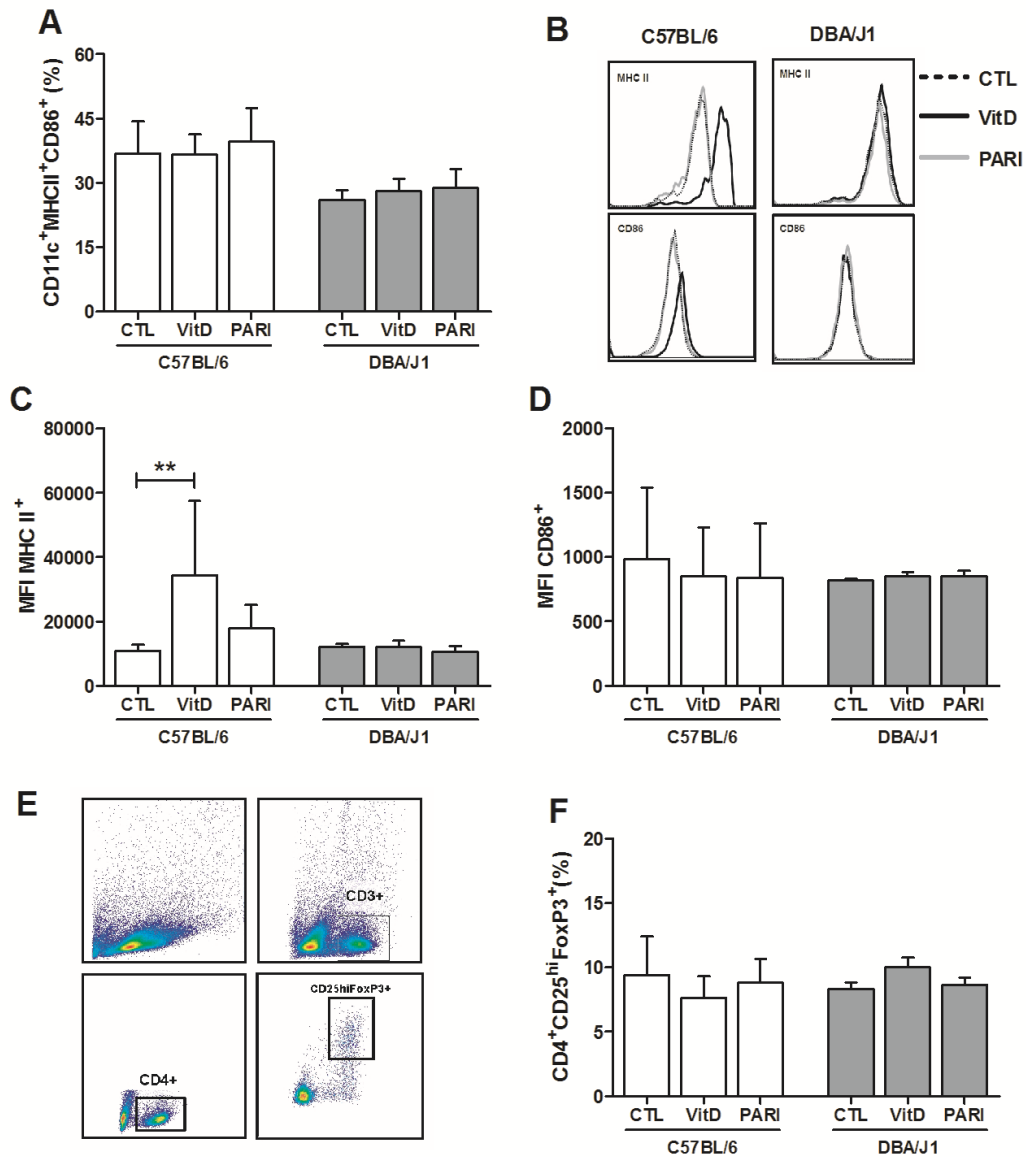


Figure 5: Effect of vitamin D and paricalcitol on Tregs and DCs from C57BL/6 and DBA/1J mice.

C57BL/6 and DBA/1J mice were intraperitoneally injected with 0.1 μ g of VitD or paricalcitol during 15 alternated days. Percentage of CD11c⁺MHCII⁺CD86⁺ in 500.000 acquired events (A), histogram of MFI MHCII⁺ and CD86⁺ (B), MFI MHCII⁺ (C), MFI CD86⁺ (D), gate strategy for CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ (E) and percentage of CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ in 100.000 acquired events (F). **p < 0.01 and ***p < 0.001 represent the statistical difference among the groups. Results were expressed as mean \pm SD of three to six animals per group.

3.7. DBA/1J mice require higher VitD dose than C57BL/6 to be slightly immunomodulated

The results of higher doses of VitD and paricalcitol on DBA/1J mice are summarized in figure 6. Treatment with 8 doses, at alternate days, with 0.2 µg of VitD or paricalcitol triggered some alterations in DBA/1J mice. Similarly to C57BL/6 treated with 0.1 µg of VitD they produced less IL-2, IFN-γ and IL-5. Differently from C57BL/6, the levels of TNF-α, IL-6, IL-17 and IL-10 were not affected by VitD. Paricalcitol decreased IFN-γ but not the other cytokines. It also significantly increased TNF-α production. Both Tregs and DCs were not affected by higher doses of VitD and paricalcitol.

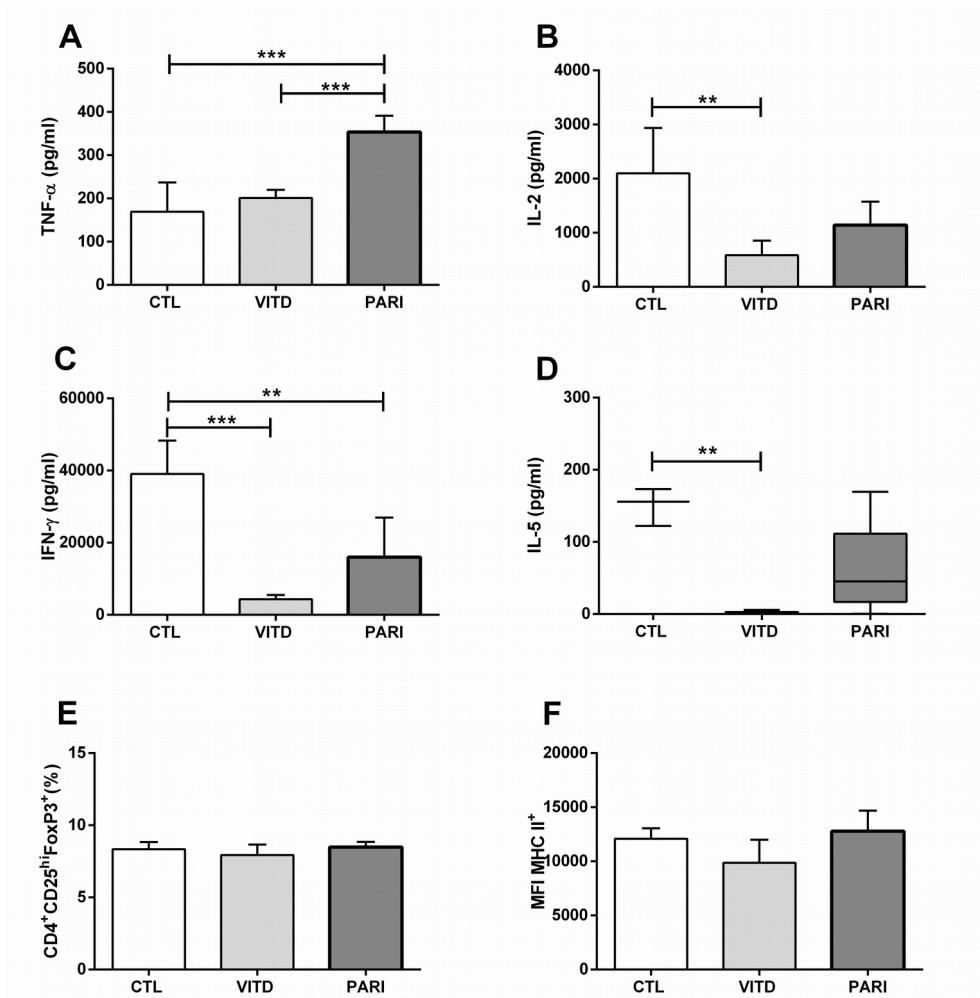


Figure 6: Effect of higher vitamin D and paricalcitol doses on DBA/1J mice. C57BL/6 and DBA/1J mice were intraperitoneally injected with 0.2 µg of VitD or paricalcitol during 15 alternated days. TNF-α (A), IL-2 (B), IFN-γ (C), IL-5 (D), CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ in 100.000 acquired events (E), MFI MHCII⁺ (F) **p < 0.01 and ***p < 0.001 represent the statistical difference among the groups. Results were expressed as mean ± SD (column) or medians and interquartile range (25–75%, box) of four to five animals per group.

4. Discussion

It is well accepted that VitD deficiency already reached epidemic proportion worldwide. Consequently, a lot of effort has been done to investigate its adequate supplementation to restore immune homeostasis in, for example, autoimmune pathologies (Agmon-Levin et al., 2013; Arnson et al., 2007), inflammatory bowel disease (Hlavaty et al, 2015) and allergy (Muehleisen & Gallo, 2013) among many other affections influenced by VitD levels. As VitD regulates over a thousand genes in the human genome and its mechanism of action is influenced by genetic and epigenetic modifications (Christopher, 2016), the adequate amounts of VitD to be prescribed will probably differ depending upon individual characteristics and the disease itself. In this scenario, we compared the immunomodulatory ability of VitD in two mice strains. The effect of paricalcitol, that is a selective VitD analogue originally prescribed for the treatment of secondary hyperparathyroidism associated with chronic kidney disease, was concomitantly evaluated.

The initial supplementation of both strains was done with 0.1 µg of VitD or paricalcitol in alternate days during 15 days, as was previously described by Lemire and Archer (1991) and recently adopted by our research group (Chiuso-Minicucci et al., 2015; Mimura et al., 2016). VitD, but not paricalcitol, significantly decreased the body weight of both strains. Regarding VitD effect on C57BL/6 mice this result is similar to our previous findings (Chiuso-Minicucci et al., 2015; Mimura et al., 2016) and is also supported by other literature reports (Marcotorchino et al., 2014). This relationship between VitD levels and body weight, mainly considering obesity control, has been the focus of much investigation (Sergeev, 2015). The exact mechanism by which VitD controls body weight is not elucidated. One possibility is the inhibition of the adipogenesis as described by Wood (2008). Recent data also indicate that VitD can act directly in the hypothalamus determining an accentuated body reduction by lowering food consumption (Sisley et al., 2016).

As expected, VitD, but not paricalcitol, determined hypercalcemia in C57BL/6 mice. This is certainly interesting because the rationale for designing VitD analogues is exactly to prepare derivatives whose selective activity is directed towards the desired tissue or function. In this sense, paricalcitol and other non-calcemic analogues have received considerable attention over the last decade due to their effective parathyroid suppression whilst avoiding undesirable low bone turnover (Steddon et al., 2001). These differential effects of VitD and paricalcitol on body weight and calcium levels in C57BL/6 could be addressed from two distinct therapeutic perspectives. From a toxic point of view this would

mean that paricalcitol is safer than VitD because it would not cause hypercalcemia neither body weight loss. However, in cases where body weight loss is desired, as for example, in diabetes and atherosclerosis (Stokic et al., 2015; Siadat et al., 2012), paricalcitol would not be indicated. Differently from C57BL/6, serum calcium levels in DBA/1J animals were not affected by VitD.

Results concerning cytokine production revealed a striking difference between these two strains. Spleen cell cultures from C57BL/6 mice previously supplemented with VitD, produced significantly lower levels of pro-inflammatory cytokines upon *in vitro* stimulation with ConA. Similar findings were already reported by our research group (Chiuso-Minicucci et al., 2015; Mimura et al., 2016) and other researchers (Kankova et al., 1991; He et al., 2014). A similar effect has also been described in cell cultures derived from patients undergoing hemodialysis (Navarro-González, 2013). However, the ability of cells from DBA/1J to produce pro-inflammatory cytokines was not affected by the same VitD supplementation protocol. Regarding that VitD is increasingly being indicated to regulate immune response in a series of autoimmune pathologies (Marinho et al., 2016, Goldsmith, 2015), a variable response could be also expected from patients.

A comparable downmodulatory effect of paricalcitol was expected and supported by literature findings as demonstrated by reduced inflammation in experimental models of peritoneal fibrosis (González-Mateo et al., 2014) and renal ischemia-reperfusion injury (Hwang et al., 2013). Our results showed that paricalcitol had a similar, even though not so accentuated, immunomodulatory effect in C57BL/6 mice.

To test if downmodulation of pro-inflammatory cytokines was associated to a higher production of anti-inflammatory cytokines, we checked the levels of IL-5 and IL-10 in spleen cell cultures. However, their production was also highly decreased in C57BL/6 mice treated by both VitD and paricalcitol. The effect of VitD on anti-inflammatory cytokines is controversial. Similarly to our findings, Bemiss et al., 2002, demonstrated that *in vitro* addition of VitD significantly reduced IL-10 production. Conversely, other reports showed increased production of these cytokines in the presence of VitD supplementation (Áivo et al., 2015; Barker et al., 2015). In addition to differences related to the protocols and the different mice strains, these contrasting findings could be related to the state of activation and differentiation of the tested cells as reported by Mahon et al. (2003) and Cantorna et al. (2015). It is also possible, due to the absence of a specific antigen in our experimental design, that VitD is mediating only a direct effect, that is, decreasing the genetic transcription of cytokine genes as

already described for IL-2, IL-17 and IL-10 producing T cells (Matilainen et al., 2010; Hayes et al., 2015). In our opinion, these are probably fully differentiated memory T cells. Surprisingly, DBA/1J mice treated by the same protocol did not show any alteration in the production of these same mediators. No differences in gender, age or weight could explain this controversial effect because these parameters were the same in both strains.

Most of the beneficial effects of VitD in inflammatory pathologies have been attributed to its modulatory effects over DCs and Tregs (Takiishi et al., 2013; Gordon et al., 2014). In this sense, the concomitant presence of more immature DCs (expressing lower levels of MHCII and CD86) and higher levels of Foxp3⁺ Tregs were expected. However, none of these alterations were observed. We even detected a significantly elevated level of MHCII expression in cells from C57BL/6 mice. The fact that cytokines were highly down-modulated by VitD in C57BL/6 mice without a simultaneous alteration in DCs phenotype or percentage of Tregs suggests that these are two phenomena that can occur independently. VitD can act in specific immunity by indirect (maintaining DCs in an immature state) or direct pathway (downregulating cytokine gene transcription). In this scenario, and also considering that no antigen was included to promote activation and migration of DCs, it is possible that VitD is affecting only the direct pathway. Regarding this and considering that IL-2 and VitD have direct synergistic effects on activated T cells that are able to promote the development of Tregs (Jeffery et al., 2009), we could think that the profound inhibitory effect of VitD on IL-2 levels blocked Treg expansion. As VitD is being administrated by intraperitoneal route, we do not exclude the possibility that alterations in DCs and Tregs are being preferentially determined in mesenteric lymph nodes. By employing oral administration of calcitriol in an atherosclerosis model, Takeda et al. (2010) observed a decrease in CD86⁺ DCs and an increase in Foxp3⁺ Tregs in both spleen and mesenteric lymph nodes.

To investigate if the almost total absence of effects of VitD or paricalcitol on DBA/1J mice was due to an insufficient dose, these animals were treated with 0.2 µg of VitD or paricalcitol, during 15 alternate days. This higher supplementation was really able to impact cytokine production in DBA/1J mice. Similar to the effect of 0.1 µg of VitD in C57BL/6 mice, the higher dose of VitD down-modulated IL-2, IFN-γ and IL-5 but did not affect IL-6, IL-17 and IL-10 production. The comparative analysis of TNF-α production by both strains showed interesting results. 0.1 µg of VitD or paricalcitol downregulated TNF-α production in C57BL/6 but not in DBA/1J. In fact, the higher dose of paricalcitol, but not VitD, significantly increased TNF-α production. This finding deserves special attention because

this mediator plays a central role in inflammation, affecting cell proliferation, activation, migration, survival and death (Bradley, 2008).

To the best of our knowledge, this is the first demonstration that C57BL/6 and DBA/1J mice differ in their response to VitD supplementation. DBA/1J strain is more resistant to VitD effects and even showed a different profile of immunomodulation. A similar higher resistance to anti-inflammatory therapy was already described in DBA/1J mice treated with methotrexate and it is attributed to genetic factors (Delano et al., 2005). The existence of a similar variability in response to VitD or paricalcitol supplementation in human beings certainly deserves a careful investigation.

5. Funding

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), process number 302710/2013-2.

6. Conflict of interest statement

None of the authors has a financial relationship with a commercial entity that has an interest in the subject of this manuscript.

7. References

Agmon-Levin, N., E. Theodor, R. M. Segal, and Y. Shoenfeld. 2013. "Vitamin D in systemic and organ-specific autoimmune diseases." *Clin Rev Allergy Immunol* 45 (2):256-66. doi: 10.1007/s12016-012-8342-y.

Äivo, J., A. Hänninen, J. Ilonen, and M. Soilu-Hänninen. 2015. "Vitamin D3 administration to MS patients leads to increased serum levels of latency activated peptide (LAP) of TGF-beta." *J Neuroimmunol* 280:12-5. doi: 10.1016/j.jneuroim.2015.01.005.

Aloia, J. F., M. Patel, R. Dimaano, M. Li-Ng, S. A. Talwar, M. Mikhail, S. Pollack, and J. K. Yeh. 2008. "Vitamin D intake to attain a desired serum 25-hydroxyvitamin D concentration." *Am J Clin Nutr* 87 (6):1952-8.

- Altieri, B., W. B. Grant, S. D. Casa, F. Orio, A. Pontecorvi, A. Colao, G. Sarno, and G. Muscogiuri. 2016. "Vitamin D and pancreas: the role of sunshine vitamin in the pathogenesis of Diabetes Mellitus and Pancreatic Cancer." *Crit Rev Food Sci Nutr*:0. doi: 10.1080/10408398.2015.1136922.
- Amson, Y., H. Amital, and Y. Shoenfeld. 2007. "Vitamin D and autoimmunity: new aetiological and therapeutic considerations." *Ann Rheum Dis* 66 (9):1137-42. doi: 10.1136/ard.2007.069831.
- Barker, T., V. E. Rogers, M. Levy, J. Templeton, H. Goldfine, E. D. Schneider, B. M. Dixon, V. T. Henriksen, and L. K. Weaver. 2015. "Supplemental vitamin D increases serum cytokines in those with initially low 25-hydroxyvitamin D: a randomized, double blind, placebo-controlled study." *Cytokine* 71 (2):132-8. doi: 10.1016/j.cyto.2014.09.012.
- Bemiss, C. J., B. D. Mahon, A. Henry, V. Weaver, and M. T. Cantorna. 2002. "Interleukin-2 is one of the targets of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in the immune system." *Arch Biochem Biophys* 402 (2):249-54. doi: 10.1016/S0003-9861(02)00082-6.
- Blum, M., G. Dolnikowski, E. Seyoum, S. S. Harris, S. L. Booth, J. Peterson, E. Saltzman, and B. Dawson-Hughes. 2008. "Vitamin D(3) in fat tissue." *Endocrine* 33 (1):90-4. doi: 10.1007/s12020-008-9051-4.
- Bradley, J. R. 2008. "TNF-mediated inflammatory disease." *J Pathol* 214 (2):149-60. doi: 10.1002/path.2287.
- Cantorna, M. T., L. Snyder, Y. D. Lin, and L. Yang. 2015. "Vitamin D and 1,25(OH)₂D regulation of T cells." *Nutrients* 7 (4):3011-21. doi: 10.3390/nu7043011.
- Chiuso-Minicucci, F., L. L. Ishikawa, L. A. Mimura, T. F. Fraga-Silva, T. G. França, S. F. Zorzella-Pezavento, C. Marques, M. R. Ikoma, and A. Sartori. 2015. "Treatment with Vitamin D/MOG Association Suppresses Experimental Autoimmune Encephalomyelitis." *PLoS One* 10 (5):e0125836. doi: 10.1371/journal.pone.0125836.
- Christopher, K. B. 2016. "Vitamin D and critical illness outcomes." *Curr Opin Crit Care* 22 (4):332-8. doi: 10.1097/MCC.0000000000000328.

- Delano, D. L., M. C. Montesinos, A. Desai, T. Wilder, P. Fernandez, P. D'Eustachio, T. Wiltshire, and B. N. Cronstein. 2005. "Genetically based resistance to the antiinflammatory effects of methotrexate in the air-pouch model of acute inflammation." *Arthritis Rheum* 52 (8):2567-75. doi: 10.1002/art.21208.
- Douros, K., I. Loukou, B. Boutopoulou, and S. Fouzas. 2015. "Does Vitamin D Deficiency Epidemic Parallel with Allergy and Asthma Epidemic?" *Mini Rev Med Chem* 15 (12):967-73.
- Goldsmith, J. R. 2015. "Vitamin D as an Immunomodulator: Risks with Deficiencies and Benefits of Supplementation." *Healthcare (Basel)* 3 (2):219-32. doi: 10.3390/healthcare3020219.
- González-Mateo, G. T., V. Fernández-Míllara, T. Bellón, G. Liappas, M. Ruiz-Ortega, M. López-Cabrera, R. Selgas, and L. S. Aroeira. 2014. "Paricalcitol reduces peritoneal fibrosis in mice through the activation of regulatory T cells and reduction in IL-17 production." *PLoS One* 9 (10):e108477. doi: 10.1371/journal.pone.0108477.
- Gordon, J. R., Y. Ma, L. Churchman, S. A. Gordon, and W. Dawicki. 2014. "Regulatory dendritic cells for immunotherapy in immunologic diseases." *Front Immunol* 5:7. doi: 10.3389/fimmu.2014.00007.
- He, X., J. Yan, X. Zhu, Q. Wang, W. Pang, Z. Qi, M. Wang, E. Luo, D. M. Parker, M. T. Cantorna, L. Cui and Y. Cao. 2014. "Vitamin D inhibits the occurrence of experimental cerebral malaria in mice by suppressing the host inflammatory response." *J Immunol* 193:1314-1323. doi: 10.4049/jimmunol.1400089.
- Hlavaty, T., A. Krajcovicova, and J. Payer. 2015. "Vitamin D therapy in inflammatory bowel diseases: who, in what form, and how much?" *J Crohns Colitis* 9 (2):198-209.
- Holick, M. F. 2006. "Resurrection of vitamin D deficiency and rickets." *J Clin Invest* 116 (8):2062-72. doi: 10.1172/JCI29449.
- Hwang, H. S., K. J. Yang, K. C. Park, H. S. Choi, S. H. Kim, S. Y. Hong, B. H. Jeon, Y. K. Chang, C. W. Park, S. Y. Kim, S. J. Lee, and C. W. Yang. 2013. "Pretreatment with paricalcitol attenuates inflammation in ischemia-reperfusion injury via the up-regulation of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2." *Nephrol Dial Transplant* 28 (5):1156-66. doi: 10.1093/ndt/gfs540.
- Jeffery, L. E., F. Burke, M. Mura, Y. Zheng, O. S. Qureshi, M. Hewison, L. S. Walker, D. A. Lammas, K. Raza, and D. M. Sansom. 2009. "1,25-Dihydroxyvitamin D3 and IL-2 combine to inhibit T cell

production of inflammatory cytokines and promote development of regulatory T cells expressing CTLA-4 and FoxP3." *J Immunol* 183 (9):5458-67. doi: 10.4049/jimmunol.0803217.

Kankova, M., W. Luini, M. Pedrazzoni, F. Riganti, M. Sironi, B. Bottazzi, A. Mantovani and A. Vecchi. 1991. "Impairment of cytokine production in mice fed a vitamin D3-deficient diet." *Immunology* 73:466-471.

Kato, S. 2000. "Molecular mechanism of transcriptional control by nuclear vitamin receptors." *Br J Nutr* 84 Suppl 2:S229-33.

Lemire, J. M., and D. C. Archer. 1991a. "1,25-dihydroxyvitamin D3 prevents the in vivo induction of murine experimental autoimmune encephalomyelitis." *J Clin Invest* 87 (3):1103-7. doi: 10.1172/JCI115072.

Lemire, J. M., and D. C. Archer. 1991b. "1,25-dihydroxyvitamin D3 prevents the in vivo induction of murine experimental autoimmune encephalomyelitis." *J Clin Invest* 87 (3):1103-7. doi: 10.1172/JCI115072.

Mahon, B. D., A. Wittke, V. Weaver, and M. T. Cantorna. 2003. "The targets of vitamin D depend on the differentiation and activation status of CD4 positive T cells." *J Cell Biochem* 89 (5):922-32. doi: 10.1002/jcb.10580.

Marcotorchino, J., F. Tourniaire, J. Astier, E. Karkeni, M. Canault, M. J. Amiot, D. Bendahan, M. Bernard, J. C. Martin, B. Giannesini, and J. F. Landrier. 2014. "Vitamin D protects against diet-induced obesity by enhancing fatty acid oxidation." *J Nutr Biochem* 25 (10):1077-83. doi: 10.1016/j.jnutbio.2014.05.010.

Marinho, A., C. Carvalho, D. Boleixa, A. Bettencourt, B. Leal, J. Guimarães, E. Neves, J. C. Oliveira, I. Almeida, F. Farinha, P. P. Costa, C. Vasconcelos, and B. M. Silva. 2016. "Vitamin D supplementation effects on FoxP3 expression in T cells and FoxP3(+)/IL-17A ratio and clinical course in systemic lupus erythematosus patients: a study in a Portuguese cohort." *Immunol Res*. doi: 10.1007/s12026-016-8829-3.

Mimura, L. A., F. Chiuso-Minicucci, T. F. Fraga-Silva, S. F. Zorzella-Pezavento, T. G. França, L. L. Ishikawa, M. Penitenti, M. R. Ikoma, and A. Sartori. 2016. "Association of myelin peptide with vitamin

D prevents autoimmune encephalomyelitis development." *Neuroscience* 317:130-40. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.12.053.

Muehleisen, B., and R. L. Gallo. 2013. "Vitamin D in allergic disease: shedding light on a complex problem." *J Allergy Clin Immunol* 131 (2):324-9. doi: 10.1016/j.jaci.2012.12.1562.

Navarro-González, J. F., J. Donate-Correa, M. L. Méndez, M. M. de Fuentes, J. García-Pérez, and C. Mora-Fernández. 2013. "Anti-inflammatory profile of paricalcitol in hemodialysis patients: a prospective, open-label, pilot study." *J Clin Pharmacol* 53 (4):421-6. doi: 10.1002/jcph.19.

Pilz, S., N. Verheyen, M. R. Gröbler, A. Tomaschitz, and W. März. 2016. "Vitamin D and cardiovascular disease prevention." *Nat Rev Cardiol* 13 (7):404-17. doi: 10.1038/nrcardio.2016.73.

Sergeev, I. N. 2015. "Vitamin D-Cellular Ca(2+) link to obesity and diabetes." *J Steroid Biochem Mol Biol*. doi: 10.1016/j.jsbmb.2015.11.008.

Shanmugalingam, T., D. Crawley, C. Bosco, J. Melvin, S. Rohrmann, S. Chowdhury, L. Holmberg and M. Van Hemelrijck. 2014. "Obesity and cancer: the role of vitamin D." *BMC Cancer* 14:712. doi: 10.1186/1471-2407-14-712.

Siadat, Z. D., K. Kiani, M. Sadeghi, A. S. Shariat, Z. Farajzadegan, and M. Kheirmand. 2012. "Association of vitamin D deficiency and coronary artery disease with cardiovascular risk factors." *J Res Med Sci* 17 (11):1052-5.

Simon, K. C., K. L. Munger, and A. Ascherio. 2012. "Vitamin D and multiple sclerosis: epidemiology, immunology, and genetics." *Curr Opin Neurol* 25 (3):246-51. doi: 10.1097/WCO.0b013e3283533a7e.

Sisley, S. R., D. M. Arble, A. P. Chambers, R. Gutierrez-Aguilar, Y. He, Y. Xu, D. Gardner, D. D. Moore, R. J. Seeley, and D. A. Sandoval. 2016. "Hypothalamic Vitamin D Improves Glucose Homeostasis and Reduces Weight." *Diabetes*. doi: 10.2337/db16-0309.

Sochorová, K., V. Budinský, D. Rozková, Z. Tobiasová, S. Dusilová-Sulková, R. Spísek, and J. Bartůnková. 2009. "Paricalcitol (19-nor-1,25-dihydroxyvitamin D₂) and calcitriol (1,25-dihydroxyvitamin D₃) exert potent immunomodulatory effects on dendritic cells and inhibit induction of antigen-specific T cells." *Clin Immunol* 133 (1):69-77. doi: 10.1016/j.clim.2009.06.011.

- Steddon, S. J., N. J. Schroeder, and J. Cunningham. 2001. "Vitamin D analogues: how do they differ and what is their clinical role?" *Nephrol Dial Transplant* 16 (10):1965-7
- Stokić, E., A. Kupusinac, D. Tomic-Nagic, D. Smiljenic, B. Kovacev-Zaviscic, B. Srdic-Galic, S. Soskic, and E. R. Isenovic. 2015. "Vitamin D and Dysfunctional Adipose Tissue in Obesity." *Angiology* 66 (7):613-8. doi: 10.1177/0003319714543512.
- Takeda, M., T. Yamashita, N. Sasaki, K. Nakajima, T. Kita, M. Shinohara, T. Ishida, and K. Hirata. 2010. "Oral administration of an active form of vitamin D3 (calcitriol) decreases atherosclerosis in mice by inducing regulatory T cells and immature dendritic cells with tolerogenic functions." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30 (12):2495-503. doi: 10.1161/ATVBAHA.110.215459.
- Takiishi, T., T. Van Belle, C. Gysemans, and C. Mathieu. 2013. "Effects of vitamin D on antigen-specific and non-antigen-specific immune modulation: relevance for type 1 diabetes." *Pediatr Diabetes* 14 (2):81-9. doi: 10.1111/j.1399-5448.2012.00923.x.
- Trochoutsou, A. I., V. Kloukina, K. Samitas, and G. Xanthou. 2015. "Vitamin-D in the Immune System: Genomic and Non-Genomic Actions." *Mini Rev Med Chem* 15 (11):953-63.
- Uitterlinden, A. G., Y. Fang, J. B. van Meurs, H. van Leeuwen, and H. A. Pols. 2004. "Vitamin D receptor gene polymorphisms in relation to Vitamin D related disease states." *J Steroid Biochem Mol Biol* 89-90 (1-5):187-93. doi: 10.1016/j.jsbmb.2004.03.083.
- Večerić-Haler, Ž, K. Romozi, M. Antonič, M. Benedik, J. B. Ponikvar, R. Ponikvar, and B. Knap. 2016. "Comparison of the Pharmacological Effects of Paricalcitol Versus Calcitriol on Secondary Hyperparathyroidism in the Dialysis Population." *Ther Apher Dial* 20 (3):261-6. doi: 10.1111/1744-9987.12434.
- Watad, A., S. G. Neumann, A. Soriano, H. Amital, and Y. Shoenfeld. 2016. "Vitamin D and Systemic Lupus Erythematosus: Myth or Reality?" *Isr Med Assoc J* 18 (3-4):177-82.
- Weisshof, R., and I. Chermesh. 2015. "Micronutrient deficiencies in inflammatory bowel disease." *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 18 (6):576-81. doi: 10.1097/MCO.0000000000000226.
- Wood, R. J. 2008. "Vitamin D and adipogenesis: new molecular insights." *Nutr Rev* 66 (1):40-6. doi: 10.1111/j.1753-4887.2007.00004.x.

Zhou, Y., L. J. Zhao, X. Xu, A. Ye, D. Travers-Gustafson, B. Zhou, H. W. Wang, W. Zhang, L. Lee Hamm, H. W. Deng, R. R. Recker, and J. M. Lappe. 2014. "DNA methylation levels of CYP2R1 and CYP24A1 predict vitamin D response variation." *J Steroid Biochem Mol Biol* 144:207-214. doi: 10.1016/j.jsbmb.2013.10.004.

Anesco

4. Anexo

4.1 Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



Certificado

Certificamos que o projeto intitulado "Comparação do Efeito Imunomodulador da Vitamina D e do Paricalcitol em Camundongos C57BL/6 e DBA/1J", Protocolo nº **815-CEUA**, sob a responsabilidade de **Alexandrina Sartori**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 9 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS** (CEUA), nesta data.

Vigência do Projeto:	Início: 29/2/2016	Término: 28/2/2017
Espécie/linhagem:	Camundongo C57BL/6 e DBA/1J	
Nº de animais:	72	
Peso:	20g	Idade: 9-11 semanas
Sexo:	Fêmea	
Origem	Biotério de animais isogênicos da USP de Ribeirão Preto/SP	

Botucatu, 16 de fevereiro de 2016.


Prof. Adj. Wellerson Rodrigo Scarano
Presidente da CEUA

