

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 28/02/2021.



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

Amanda Manoel Della Coletta

Ação da Vitamina D sobre mecanismos bactericidas de neutrófilos humanos desafiados com diferentes cepas de *Staphylococcus aureus*

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Luciane Alarcão Dias-Melicio

Coorientadora: Profa. Dra. Thaís Graziela Donegá França

Botucatu

2019

Amanda Manoel Della Coletta

Ação da Vitamina D sobre mecanismos bactericidas de neutrófilos humanos desafiados com diferentes cepas de *Staphylococcus aureus*

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Luciane Alarcão Dias-Melicio

Coorientadora: Profa. Dra. Thaís Graziela Donegá França

Botucatu

2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: LUCIANA PIZZANI-CRB 8/6772

Coletta, Amanda Manoel Della.

Ação da vitamina D sobre mecanismos bactericidas de neutrófilos humanos desafiados com diferentes cepas de *Staphylococcus aureus* / Amanda Manoel Della Coletta. - Botucatu, 2019

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Luciane Alarcão Dias-Melicio

Coorientador: Thaís Graziela Donegá França

Capes: 40105008

1. Neutrófilos. 2. Sistema imunológico. 3. *Staphylococcus aureus*. 4. Vitamina D.

Palavras-chave: Mecanismos bactericidas; Neutrófilos; Sistema imune inato; *Staphylococcus aureus*; Vitamina D.

Trabalho realizado no Laboratório de Imunopatologia e Agentes Infecciosos (LIAI) – Unidade de Pesquisa Experimental (Unipex) - Faculdade de Medicina, UNESP – Botucatu, com auxílio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha família, as vezes mais próxima, as vezes mais distante, mas que a todo momento me deu suporte e segurança para seguir em busca de meus sonhos.

Aos meus pais, Luiz Antônio e Silvana, por estarem ao meu lado nos melhores e piores momentos, me mostrando o quão importante é acreditar na minha capacidade, mesmo diante das adversidades.

Às minhas irmãs, Isabela e Renata, por estarem comigo sempre e me ensinarem a dimensão do amor.

Amo vocês.

Agradecimientos

Agradeço a Deus, por cada obstáculo em meu caminho o qual eu tive forças para lutar. Por me dar oportunidades de aprender com erros e acertos e nunca desistir.

À minha orientadora professora Luciane Alarcão Dias-Melicio, por todos os anos de convivência, sempre tão harmoniosa e respeitosa. Por ser uma companheira, com a qual partilhei momentos felizes e tristes, mas sempre tendo a certeza de que você estaria ao meu lado me incentivando e dando forças para continuar. Obrigada pela confiança, pelo respeito e, acima de tudo, pela amizade, que levarei para o resto da vida.

À minha coorientadora, Thaís, por partilhar tantos ensinamentos e compreender minhas inseguranças e dificuldades, estando sempre disposta a ajudar.

À toda minha família, em especial meus pais e irmãs. Obrigada pela educação e empenho em sempre me fazer seguir em frente, muitas vezes deixando seus sonhos de lado para que eu pudesse seguir os meus. Em especial à Renata, meu anjo na terra, obrigada por me ensinar a viver cada momento e a amar incondicionalmente. Você me inspira a ser uma pessoa melhor.

Aos meus amigos do coração e de longa data, Juliana (Balsa), Cristiane (Dofa) e Marina (Hemacea), André (Qualy) e Carla (Caldo), obrigada por existirem na minha vida. Vocês me dão segurança e paz, me dão a certeza que os terei como amigos irmãos para o resto da vida. Obrigada por proporcionarem tantos momentos de diversão e companheirismo, por serem meu porto seguro.

Às minhas irmãs, Bianca (Peks) e Raíza. Obrigada por me mostrarem que a distância não importa quando o sentimento é tão intenso e verdadeiro como nossa amizade. Obrigada por serem minhas irmãs de alma, amigas e confidentes.

À Luisa, minha amiga de sempre e pra sempre. Obrigada por nunca desistir da gente, por estar ao meu lado, mesmo às vezes distante, nesses longos, mas nem tão longos assim, 20 anos de amizade. Você me ensina que devemos aproveitar cada segundo da vida, a rir nos momentos tristes e a chorar nos alegres. Simplesmente obrigada por ser você.

À Marcela (Teteia), obrigada por ser a amiga que o handebol me deu para a vida. Obrigada por estar sempre disposta a ajudar, me escutar, puxar minha orelha e ser tão especial na minha vida, mesmo que longe fisicamente. Obrigada por todo o carinho e os momentos divertidos nas aventuras do mundo do handebol.

À Tatiana Bachiega, por continuar a ser uma irmã mais velha, me escutando nas minhas crises e me incentivando a ser melhor a cada dia. Obrigada por acreditar em mim e por partilhar todo o seu conhecimento comigo, inclusive nos momentos científico-culinários.

Aos colegas de laboratório Luciana, Taiane, Ana Teresa, Tatiana, Yohan, Kaio, Ana Laura e Larissa, por todo empenho em ajudar e confiança. Obrigada pela convivência em todos esses anos, sempre buscando a melhor oportunidade para aprender e partilhar experiências, além é claro dos momentos de descontração. E à vizinha, Nathália, que sempre esteve por perto, me ajudando e me incentivando a seguir em busca do meu caminho. À Lari, obrigada pela confiança em mim depositada, fazendo com que não fosse mais uma relação de trabalho e sim uma amizade. Em especial, à Tai, por me desafiar a ser melhor sempre, por partilhar conquistas e frustrações e me dar forças para continuar em busca de meus sonhos.

Ao professor Valdecir Farias Ximenes, da Unesp de Bauru, por me receber em seu laboratório e me ajudar sempre tão solícitamente.

À professora Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha, por permitir que eu frequentasse seu laboratório e me receber tão prontamente. Aos colegas do Laboratório de Bacteriologia, por me ensinarem com tanta prontidão, dedicação e atenção de sempre.

À professora Márcia Guimarães da Silva e seus alunos, pela sempre boa vizinhança e oportunidade de sempre aprender a cada dia.

Ao professor Ramon Kaneno e Graziela, pela oportunidade de realizar meu projeto e me atender, sempre tão prontamente.

Aos funcionários do Centro de Microscopia do Instituto de Biociências de Botucatu e aos funcionários da Unidade de Pesquisa Experimental (Unipex), da Faculdade de Medicina de Botucatu, por me proporcionarem sempre as melhores oportunidades.

Aos doadores de sangue, por serem sempre tão pacientes e permitirem que meu trabalho fosse realizado da melhor maneira possível e a todos, que de alguma maneira, contribuíram para a realização desse projeto.

Ao Programa de Pós-Graduação em Patologia e à coordenadora Professora Doutora Márcia Guimarães da Silva, por todo aprendizado e ensinamento.

À Vânia Soler, secretária do Programa de Pós-Graduação em Patologia, por me salvar em tantos momentos, me atender tão prontamente e sempre com tanta dedicação e carinho pelo que faz.

Ao CNPq (140332/2015-4) pela bolsa concedida.

...” Uma fé genuína na preciosidade da vida. Sinto que tudo em mim se reorganiza, silenciosamente, o tempo todo. Que isso tem mais a ver com o meu olhar, com a natureza das sementes que rego, do que eu possa perceber. Minha expectativa, tantas vezes ansiosa, de que as coisas sejam diferentes, dá lugar à certeza tranquila de que, naquele momento, tudo está onde pode estar. Em vez de sofrer pelas modificações que ainda não consigo, eu me sinto grata pelas mudanças que já realizei. E relaxo...

...Plenitude não é extensão nem permanência: é quando a vida cabe no instante presente, sem aperto, e a gente desfruta o conforto de não sentir falta de nada.”

Ana Jácomo

Resumo

Resumo

Recentemente, a deficiência de vitamina D vem se tornando um problema de abrangência mundial em virtude de hábitos rotineiros da população, como o trabalho por períodos prolongados em ambientes fechados e diminuição da exposição solar. Trabalhos recentes demonstram que a vitamina D age não somente na homeostase do cálcio, mas também na regulação do sistema imune. Diante da multiplicidade de funções dessa vitamina, sua deficiência tem sido associada ao risco de desenvolvimento de uma série de doenças, entre elas doenças infecciosas como as causadas por *S. aureus*. As infecções por essa bactéria têm trazido expressiva preocupação para a população humana em decorrência do aumento da prevalência de cepas resistentes aos fármacos antibacterianos, dificultando, dessa maneira, o tratamento e contribuindo para a busca de métodos alternativos para combater esse tipo de infecção. Além disso, o *S. aureus* conta com um potente arsenal de fatores de virulência que contribuem para a evasão da resposta imune do hospedeiro. Nesse contexto, torna-se importante avaliar se a vitamina D pode modular os efeitos bactericidas de neutrófilos humanos através de mecanismos intra e extracelulares, favorecendo, portanto, o combate a infecções, especialmente aquelas causadas por microrganismos resistentes aos principais tratamentos. Dessa maneira, nós demonstramos que neutrófilos tratados com vitamina D e desafiados com duas cepas de *S. aureus* tiveram um aumento nas taxas de fagocitose e atividade bactericida dependentes da cepa estudada, contribuindo para as propriedades antimicrobianas dos neutrófilos. Além disso, identificamos que indivíduos com níveis séricos de vitamina D deficientes/insuficientes estavam correlacionados com menor liberação de NETs e taxa de fagocitose; enquanto indivíduos com níveis séricos de vitamina D suficientes foram correlacionados com maior liberação de NETs, taxa de fagocitose intermediária e atividade bactericida. Portanto, a vitamina D pode modular a resposta imune inata contra *S. aureus* principalmente por aumento de taxas fagocíticas e atividade bactericida.

Palavras-chave: Atividade Bactericida, Fagocitose, Vitamina D, *Staphylococcus aureus*, Redes Extracelulares de Neutrófilos (NETs).

Abstract

Abstract

In the last years, vitamin D deficiency has become a worldwide problem due to routine population habits, such as prolonged work indoors and increased use of sunscreen/decreased sun exposure in attempt to avoid high rates of skin cancer. Recent studies demonstrated that vitamin D acts not only on calcium homeostasis, but also on the regulation and function of the immune system. Facing the countless functions of vitamin D, its deficiency has been associated with the risk of development of many diseases, including infectious diseases such as those caused by *S. aureus*. Infections caused by these bacteria have brought significant concern to the human population due to the increased prevalence of strains resistant to antibiotics, thus making it difficult to treat and contributing to the search for alternative methods to combat this type of infection. In addition, *S. aureus* have a variety of virulence factors, which confer the ability to evade host immune responses. In this context, it is important to evaluate whether vitamin D can modulate the bactericidal effects of human neutrophils through intra- and extracellular mechanisms, such as phagocytosis, bacterial killing and release of Neutrophil Extracellular Traps (NETs), thus contributing to the response against infections, especially those caused by microorganisms resistant to the main treatments. Thus, we demonstrated that neutrophils treated with Vitamin D and challenged with two strains of *S. aureus* had an increase in phagocytic rates and bactericidal activity in a dependence of the strain, contributing to neutrophil antimicrobial properties. Besides, we identified that individuals with deficient/insufficient vitamin D serum levels were correlated with lower NETs release and phagocytosis rate; while individuals with sufficient vitamin D serum levels were correlated with higher NETs release, intermediate phagocytosis rate and bactericidal activity. Then, Vitamin D could modulate the innate immune response against *S. aureus* mainly by phagocytic rates and bactericidal activity. Further studies are needed to better understand the complex capacity of Vitamin D on modulation of the innate immune response.

Key-words: Bactericidal Activity, Phagocytosis, Vitamin D, *Staphylococcus aureus*, Neutrophil Extracellular Traps (NETs).

Sumário

Capítulo I	1
1. Revisão Bibliográfica.....	2
1.1. Vitamina D e sua potencial ação imunomoduladora em neutrófilos	2
1.2. Deficiência de vitamina D e sua correlação com diferentes doenças	8
1.3. <i>S. aureus</i> e seus mecanismos de escape	13
1.4. Resposta Imune Inata e seus mecanismos efetores contra <i>S. aureus</i>	15
1.5. Neutrófilos e Rede Extracelulares de Neutrófilos (NETs)	21
2. Referências	28
Capítulo II	35
Manuscript	36
ABSTRACT	37
INTRODUCTION.....	38
EXPERIMENTAL PROCEDURES	41
– Casuistics	41
– Neutrophil isolation	41
– Vitamin D treatment	42
– Bacterial strains and culture conditions.....	42
– Phagocytosis of <i>S. aureus</i>	43
– Killing assay	44
– Hydrogen Peroxide Production (H ₂ O ₂).....	44
– Nitric Oxide Production (NO).....	45
– Immunofluorescence for Neutrophil Extracellular Traps (NETs) visualization.....	45
– Neutrophil Extracellular Traps (NETs) by scanning electron microscopy	46
– Neutrophil Extracellular Traps (NETs) quantification	46
– Statistical analysis	47
RESULTS.....	47
– Phagocytosis rate of <i>S. aureus</i> strains	47
– Vitamin D action on neutrophil bactericidal activity against <i>S. aureus</i>	48
– Hydrogen peroxide (H ₂ O ₂) Production.....	49
– Nitric Oxide (NO) Production.....	49
– Visualization of NETs components by Immunofluorescence	50
– NETs identification by scanning electron microscopy	50
– NETs quantification.....	51
– Serum 25(OH)D ₃ levels and analysis of perceptual map from multiple correspondence	51

DISCUSSION	52
REFERENCES.....	59
FIGURES.....	63
Conclusão	74
Anexos.....	76

Capítulo 1
Revisão Bibliográfica

1. Revisão Bibliográfica

1.1. Vitamina D e sua potencial ação imunomoduladora em neutrófilos

A vitamina D é um hormônio secosteróide produzido fotoquimicamente na pele a partir do componente 7-deidrocolesterol (1,2). Sendo a forma de obtenção mais significativa, cerca de 90% da vitamina D obtida provém de exposição solar cutânea espontânea, a qual é influenciada pela estação climática, altitude e latitude (3,4). Ainda que em menor quantidade, pode também ser obtida pela dieta, oriunda de alimentos ricos em vitamina D como óleo de fígado de bacalhau, peixes como salmão e atum, cogumelos irradiados, entre outros (5,6). A obtenção de vitamina D via dieta depende da política de suplementação de cada país, sendo que alguns países como Estados Unidos e Canadá beneficiam-se dessa suplementação para reduzir as taxas de deficiência de vitamina D na população (4).

Após a exposição solar (espectro de raios UVB – 290-320nm), o 7-deidrocolesterol (ou provitamina D), presente na membrana plasmática de queratinócitos na epiderme, sofre fotoconversão para originar a pré-vitamina D₃ (7). Essa, por sua vez, sofre um rearranjo estrutural causado por temperatura e se transforma em vitamina D₃ (Colecalciferol), a qual é biologicamente inativa. Mediante ligação com proteína transportadora de vitamina D (DBP), a vitamina D₃ é transportada sistemicamente até o fígado, onde é hidroxilada no metabólito 25-hidroxivitamina D₃ [25(OH)D₃] pela ação de enzimas do citocromo-P450 (CYPs) como CYP2R1(25-hidroxilase), CYP27A1 e CYP2D25. Embora inativo, o metabólito [25(OH)D₃] é considerado a principal forma circulante de vitamina D, tem uma meia-vida de aproximadamente duas semanas e reflete ingestão e produção cutânea recentes, sendo, portanto, utilizado para determinar os níveis séricos de vitamina D. Por fim, o [25(OH)D₃] é

novamente transportado sistemicamente ligado ao DBP para o rim, onde, através da ação da CYP27B1 mitocondrial (1- α hidroxilase), é hidroxilado em 1,25 dihidroxivitamina D₃ [1,25(OH)₂D₃] ou calcitriol, o metabólito ativo da vitamina D (1,2,4,5,8).

Para exercer sua função biológica, o metabólito [1,25(OH)₂D₃] deve ser transportado a órgãos alvo distais e se ligar ao receptor de vitamina D (VDR), presente em uma variedade de células, podendo ter efeito na proliferação, diferenciação e controle do ciclo celular, apoptose e produção de catelicidina, renina e insulina (9). O complexo de ligação do metabólito ativo da vitamina D no receptor VDR e seu co-receptor retinóico X (RXR) pode regular a transcrição de cerca de 3000 genes no genoma humano (10). Além de tecidos envolvidos no metabolismo do cálcio, o receptor VDR já teve sua presença descrita em outros tipos celulares como queratinócitos, fibroblastos, células do sistema imune entre outros, demonstrando que a vitamina D pode exercer uma variedade de funções que vão desde a homeostase óssea até efeito neuroprotetor (11,12). A vitamina D age via ligação a seu receptor VDR, o qual pode atuar como um fator de transcrição agindo pela ligação a sequências de nucleotídeos específicos no DNA conhecidos como elementos responsivos à vitamina D (VDREs). Pode também modular a transcrição gênica, afetando a atividade de fatores de transcrição, como fator nuclear de células T ativadas (NF-AT) e fator nuclear kappa B (NF- κ B) (13).

A principal e mais bem descrita função da vitamina D é na regulação da homeostase do cálcio e do fósforo. Além da presença do receptor VDR em todos os segmentos do intestino, o metabólito ativo da vitamina D [1,25(OH)₂D₃] e o paratormônio (PTH) são os responsáveis pela reabsorção intestinal do cálcio, regulando todas as etapas do processo de transporte celular do cálcio (14,15). Preservando níveis de cálcio, a vitamina D permite que os osteoblastos tenham íons suficientes para mineralizar a matriz de colágeno e dessa maneira,

prevenir as consequências de deficiência de vitamina D como o raquitismo na infância e osteomalácia em adultos, além de osteoporose e fraturas em idosos (8,16). Ao detectar-se níveis plasmáticos baixos de cálcio, a vitamina D é responsável por estimular a liberação de cálcio e fósforo dos ossos, mas também inibir a deposição mineral óssea. Níveis plasmáticos de vitamina D, cálcio e fósforo adequados, levam a conversão de $[25(\text{OH})\text{D}_3]$ em $[1,25(\text{OH})_2\text{D}_3]$ por osteoblastos e osteócitos para aumentar os níveis de cálcio e fósforo no tecido ósseo e assim melhorar a resistência óssea (16).

Nos últimos anos, os estudos têm buscado identificar outras ações da vitamina D no organismo, expandindo as avaliações das ações da vitamina no funcionamento e regulação de outros sistemas. Os principais indícios dessas múltiplas funções, conhecidas como funções não-clássicas, ocorrem pela presença do receptor VDR e da enzima 1- α hidroxilase em diversos tipos celulares. Esses, por sua vez, não estão relacionados com o metabolismo ósseo e homeostase do cálcio, como as células do sistema imune, do pâncreas, intestino entre outros, expandindo, dessa maneira, a produção e ação da vitamina para outros locais além do rim, o principal responsável pela conversão do metabólito ativo da vitamina D (17–19). Entre as principais funções não-clássicas estão a regulação da proliferação e diferenciação celular, controle do ciclo celular, apoptose e regulação do sistema imune (9,20).

Em relação ao controle do ciclo celular, a vitamina D é responsável por parar o ciclo na transição entre G0 e G1, induzindo a expressão de inibidores de quinase dependentes de ciclina como o p27 e exercendo um efeito antiproliferativo em células HL60 e também o p21, responsável por desacelerar o ciclo celular de linhagem celular de carcinoma prostático (Alva-31) (20–22). Já em relação a diferenciação celular, Abe et al. (1981) (23) identificaram que o metabólito ativo da vitamina D é capaz de induzir a diferenciação de células leucêmicas

mielóides em macrófagos, provocando alterações morfológicas, adesão celular e indução de atividade fagocítica, demonstrando a capacidade da vitamina D em modular a diferenciação de células da medula óssea. Ma et al. 2013 (24) demonstraram a ação da vitamina D na apoptose através da ação do inecalcitol, um análogo da forma ativa da vitamina D, o qual suprimiu, *in vitro*, a proliferação de células de um modelo murino de carcinoma de células escamosas, além da ativação de caspases 8, 10 e 3 e redução dos inibidores de apoptose proteína inibidora de apoptose 1 (c-IAP1) e proteína inibidora de apoptose ligada ao cromossomo X (XIAP).

A vitamina D também já foi descrita como uma importante reguladora do sistema imune, tanto inato quanto adaptativo, sendo sua ação primeiramente evidenciada pela presença do receptor VDR em quase todas as células, entre elas neutrófilos, macrófagos, células dendríticas e linfócitos ativados T CD4⁺ e T CD8⁺ (25,26). Além disso, a expressão do receptor VDR é diminuída com a diferenciação de monócitos em macrófagos ou células dendríticas, tornando-as menos sensíveis à vitamina D (27,28). Em contraste, a expressão do receptor é aumentada após a ativação de linfócitos T, sendo que linfócitos T *naive* possuem baixos níveis de VDR (29).

Em relação ao sistema imune inato, vários artigos demonstram que a vitamina D pode ter ação em processos cruciais como fagocitose, expressão de produtos antimicrobianos, atividade quimiotática, entre outros. Liu et al. (2006) (30) demonstraram que a ativação de receptores Toll Like 2/1 (TLRs 2/1) em monócitos e macrófagos humanos com lipopeptídeo derivado de *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) (TLR2/1L) aumenta a expressão do receptor de vitamina D (VDR) e da 1- α hidroxilase, induzindo a produção de catelicidina, um peptídeo antimicrobiano, e consequentemente aumentando a morte de *M. tuberculosis*.

Outro estudo identificou a indução da expressão de catelicidina por queratinócitos e monócitos após tratamento com a forma ativa da vitamina D, aumentando a atividade microbicida contra *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (31). Já Gombart et al. 2005 (32) demonstraram que o tratamento de queratinócitos imortalizados, células de câncer de cólon, macrófagos derivados da medula óssea e células da medula óssea de indivíduos saudáveis e pacientes com leucemia mieloide aguda, com a forma ativa da vitamina D e análogos induziram um aumento na expressão gênica do peptídeo antimicrobiano de catelicidina humana (CAMP).

Hirsch et al. (2011) (33) identificaram que o tratamento de neutrófilos de indivíduos adultos e neonatais com lipopolissacarídeo (LPS) e [1,25(OH)₂D₃] aumentaram a expressão de VDR em células dos indivíduos adultos, mas não teve efeito significativo nos neutrófilos dos neonatais. O tratamento também aumentou 5 Lipoxigenase (5-LOX), diminuiu a expressão gênica da Ciclooxygenase-2 (COX-2) e diminuiu significativamente a produção de mediadores tais como proteína inflamatória de macrófagos-1β (MIP-1β), fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e interleucina-8 (IL-8). Além disso, a vitamina D não afetou a produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) por neutrófilos de adultos e neonatais. A vitamina D também diminuiu a produção de interleucina-12p40 (IL-12p40) e interferon-gama (IFN-γ) pelas células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de doadores saudáveis e pacientes com tuberculose após desafio com antígeno de filtrado de cultura (CFA) de *M. tuberculosis* (34). Já Rockett et al. (1998) (35) demonstraram que uma linhagem celular HL-60, com características macrofágicas, foi capaz de produzir óxido nítrico (NO) em resposta ao estímulo com a forma ativa da vitamina D, induzindo supressão do crescimento de *M. tuberculosis*, por mecanismo dependente de NO. Por fim, Wang et al. (2004) (36) identificaram que a forma ativa da vitamina D pode agir como um regulador de atividade antimicrobianas pela indução

da expressão gênica e atividade de genes codificadores de antimicrobianos como o peptídeo antimicrobiano catelicidina (CAMP) e defensina- β 2 (def β 2) através dos elementos responsivos a vitamina D (VDREs). Assim, esses estudos demonstram que a vitamina D tem um importante papel na regulação do sistema imune inato.

Quando é relacionada ao sistema imune adaptativo, a vitamina D exerce função via expressão de seu receptor (VDR) em linfócitos T e B, além de células apresentadoras de antígeno, as quais funcionam como ponte entre o sistema imune inato e adaptativo (26). Em um estudo realizado em 2017 (37), foi demonstrado que a incubação com vitamina D induziu um perfil de células dendríticas com capacidade tolerogênica via diminuição da expressão de MHC de classe II e CD86. Essas células foram transferidas para camundongos com encefalite autoimune experimental (EAE), exibindo uma melhora no quadro clínico, acompanhado da diminuição do infiltrado inflamatório na medula espinhal dos camundongos. Além disso, as células foram capazes de inibir o recrutamento de células Th1 e Th17 para a medula espinhal e aumentar a proporção de células T reguladoras (Treg), CD4⁺, IL-10⁺ T e B reguladoras (Breg) nos órgãos imunes periféricos, atenuando, dessa maneira os sintomas da EAE. Outro estudo demonstrou que a incubação de monócitos com [1,25(OH)₂D₃] inibiu a diferenciação e maturação das células dendríticas em importantes células apresentadoras de antígeno, apresentando expressão elevada de receptor de manose (MR), CD32, moléculas envolvidas na captura de antígenos e no aumento da capacidade endocítica, além de CD14 e MHC de classe I, enquanto que MHC de classe II, CD40 e CD86 estavam diminuídas (38).

Além disso, Hewison et al. (2003) (28) identificaram que células dendríticas apresentavam um aumento na expressão de mRNA de 1- α hidroxilase, com consequente capacidade de sintetizar [1,25(OH)₂D₃]. Embora haja o aumento na síntese de [1,25(OH)₂D₃],

com a diferenciação das células dendríticas a partir de monócitos, ocorre uma diminuição na expressão do receptor VDR, demonstrando uma possível função autorreguladora limitando uma reação imune não desejada. Em relação aos linfócitos T, o tratamento com vitamina D induziu uma polarização para um perfil anti-inflamatório (Th2), com aumento na frequência de células produtoras de IL-4 (Th2) e diminuição nas células produtoras de IFN- γ (Th1), levando ao aumento da expressão do fator de transcrição GATA-3 e das citocinas IL-4, IL-5, e IL-10 (13).

Já Jeffery et al. (2009) (39) demonstraram que [1,25(OH) $_2$ D $_3$] pode agir diretamente sobre as células T CD4+, diminuindo a produção de citocinas como IFN- γ , IL-17 e IL-21. Além disso, foi identificado que a presença da forma ativa da vitamina D acrescida de IL-2 levaram a uma elevada expressão de FOXP3 e antígeno-4 associado ao linfócito T citotóxico (CTLA-4), adquirindo características de células Treg, com potente ação imunossupressora. Em relação às células Th17, Joshi et al. (2011) (40) observaram que o tratamento com vitamina D induziu uma diminuição nos níveis de mRNA de IL-17 e IL-17 e IL-22 e aumento de IL-10, através do bloqueio do fator de transcrição fator nuclear para células T ativadas (NFAT) e indução de FoxP3, diminuindo a paralisia e progressão da EAE. Por fim, foi identificado que [1,25(OH) $_2$ D $_3$] teve efeito inibitório na síntese de DNA e produção de imunoglobulinas IgG e IgM células mononucleares ativadas *in vitro* (41).

1.2. Deficiência de vitamina D e sua correlação com diferentes doenças

Diante da variedade de funções da vitamina D, sua deficiência tem sido associada ao risco de desenvolvimento de uma série de doenças como as doenças ósseas, diabetes mellitus, determinados tipos de câncer, doenças autoimunes e infecciosas.

Conclusão

Desse modo, concluímos que a vitamina D pode modular a resposta de neutrófilos humanos desafiados com *S. aureus*, especialmente através do aumento das taxas fagocíticas e atividade bactericida, de maneira dependente da cepa estudada.