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.

Agradecimentos

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 solicitamente.

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. *S. aureus* e seus mecanismos de escape 13

1.4. Resposta Imune Inata e seus mecanismos efetores contra *S. aureus* 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 *S. aureus* 43
- Killing assay 44
- Hydrogen Peroxide Production (H_2O_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 *S. aureus* strains 47
- Vitamin D action on neutrophil bactericidal activity against *S. aureus* 48
- Hydrogen peroxide (H_2O_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-dehidrocolesterol (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-dehidrocolesterol (ou provitamina D), presente na membrana plasmática de queratinócitos na epiderme, sofre fotoconversão para originar a pré-vitamina D_3 (7). Essa, por sua vez, sofre um rearranjo estrutural causado por temperatura e se transforma em vitamina D_3 (Colecalciferol), a qual é biologicamente inativa. Mediante ligação com proteína transportadora de vitamina D (DBP), a vitamina D_3 é transportada sistemicamente até o fígado, onde é hidroxilada no metabólito 25-hidroxivitamina D_3 [$25(OH)D_3$] pela ação de enzimas do citocromo-P450 (CYPs) como CYP2R1(25-hidroxilase), CYP27A1 e CYP2D25. Embora inativo, o metabólito [$25(OH)D_3$] 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 [$25(OH)D_3$] 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 [$1,25(OH)_2D_3$] ou calcitriol, o metabólito ativo da vitamina D (1,2,4,5,8).

Para exercer sua função biológica, o metabólito [$1,25(OH)_2D_3$] 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-κB) (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 [$1,25(OH)_2D_3$] e o paratormônio (PTH) são os responsáveis pela reabsorção intestinal do cálcio, regulando todos 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 [$25(OH)D_3$] em [$1,25(OH)_2D_3$] 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 todos 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 processo 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$(OH)_2D_3$] 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 Ciclooxigenase-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 (H_2O_2) 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-β2 (defβ2) 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), $CD4^{+}$, $IL\text{-}10^{+}$ 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 $[1,25(OH)_2D_3]$ 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 $[1,25(OH)_2D_3]$. Embora haja o aumento na síntese de $[1,25(OH)_2D_3]$,

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$(OH)_2D_3$] 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$(OH)_2D_3$] 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.

Nos últimos anos, a deficiência de vitamina D vem sendo considerada um problema de escala mundial em decorrência da mudança de hábitos da população, como a permanência por longos períodos em locais fechados e a diminuição da exposição solar, além do uso de protetor solar para conter as elevadas taxas de câncer de pele (42). Apesar disso, já foi demonstrado que a utilização de protetor solar não interfere nos níveis de produção da vitamina D (43).

Pesquisas indicam que a deficiência de vitamina D tem uma prevalência elevada, podendo afetar aproximadamente 90% da população, dependendo da área global em que a avaliação foi realizada (6,44). Em um estudo conduzido no Brasil com 603 voluntários saudáveis, foi identificada uma prevalência de 77,4% de indivíduos insuficientes de vitamina D (45). Apesar de existir um consenso sobre o metabólito 25(OH)D_3 ser o que melhor se adequa para se definirem os níveis séricos de vitamina D, os valores de referência para classificação do status dos indivíduos ainda é controverso. Os valores para a classificação dos pacientes em deficientes, insuficientes ou suficientes diferem nas principais sociedades.

A Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM) descreve que níveis séricos maiores que 30ng/mL são considerados adequados para o benefício ósseo, porém deve-se levar em consideração dados como idade, obesidade, osteoporose, fraturas, entre outros (6). O *Vitamin D Council*, organização sem fins lucrativos dos Estados Unidos declara que valores menores que 30ng/mL são considerados deficientes, entre 31 e 39ng/mL insuficientes e entre 40 e 80ng/mL valores suficientes de vitamina D (46). Já Pludowski et al. 2013 (47) descreveram as recomendações da Europa Central, onde níveis séricos menores que 20ng/mL são considerados deficientes, de 20 a 30ng/mL insuficientes e de 30 a 50ng/mL níveis adequados de vitamina D.

Uma das principais doenças ósseas relacionadas à deficiência de vitamina D é a osteomalácia. Essa patologia é caracterizada pelo risco aumentado de fraturas por toda a vida, além de hipocalcemia e hipofostatemia, baixos níveis de 25(OH)D3 e elevados níveis de PTH. Como a vitamina D é responsável pela reabsorção de cálcio e fósforo, pacientes com essa doença possuem dificuldades na mineralização óssea, ocasionando elevado risco de fraturas (48).

Em relação ao diabetes mellitus, o receptor VDR já foi identificado em células pancreáticas e em tecidos influenciados por insulina (49). Além disso, Alkhatatbeh et al. (2018) (50) identificaram que pacientes diabéticos com nível glicêmico controlado possuíam maiores níveis séricos de vitamina D em comparação com aqueles indivíduos com níveis glicêmicos descontrolados. Ainda, pacientes com níveis suficientes de vitamina D exibiram baixos níveis de hemoglobina A1c (HbA1c), uma medida de controle glicêmico importante para avaliar complicações vasculares, demonstrando que uma possível suplementação de vitamina D pode melhorar as medidas de controle glicêmico.

Quando relacionada ao câncer, um estudo retrospectivo realizado em 2016 demonstrou que pacientes com deficiência de vitamina D (<20ng/mL) tinham maiores riscos de terem estágios mais avançados de melanoma e morrer durante o *follow-up* do que aqueles que tinham níveis séricos maiores que 20ng/mL. Os autores ainda identificaram que aqueles pacientes com melanoma metastático e baixos níveis de vitamina D que não foram capazes de elevar seus níveis séricos tiveram piores prognósticos quando comparados com aqueles que tiveram elevação nos níveis de vitamina D (51). A ação da vitamina D durante o câncer pode estar relacionada com suas funções durante a regulação do ciclo celular, pelo aumento

da expressão de inibidores de quinase dependentes de ciclina p27 e p21, da indução de apoptose, de seus efeitos anti-inflamatórios, entre outros (52).

Em relação a doenças autoimunes, Handono et al. (2013) (53) identificaram menores níveis de vitamina D em pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico em comparação com controles saudáveis, com taxa de 71% de hipovitaminose entre os pacientes com Lúpus. Houve também uma correlação positiva entre níveis de vitamina D e a redução da capacidade migratória das células Treg. Estudos relatam que níveis séricos de vitamina D são mais baixos em pacientes, embora a suplementação oral de vitamina D não seja recomendada para esses pacientes, uma vez que foi demonstrado que não impacte no desenvolvimento da psoríase (54,55).

Dentre as doenças infecciosas, destacam-se HIV, hepatite B, mononucleose, aspergilose, tuberculose, infecções causadas por *Pseudomonas aeruginosa (P. aeruginosa),* além daquelas causadas pelo *S. aureus,* entre outras. Em relação ao HIV, estudos demonstraram que a deficiência de vitamina D pode contribuir para a progressão do HIV por meio de sua ação moduladora no sistema imune, por modular negativamente o sistema imune adaptativo (56).

Em um estudo de 2016, foi demonstrado que 100µg/mL foram capazes de induzir um efeito fungicida direto contra *Candida albicans (C. albicans)*, possivelmente devido a lipossolubilidade da vitamina D, levando a desintegração da membrana (57). Quando relacionadas a infecções bacterianas, Nouari et al. (2016) (58) identificaram que o tratamento de macrófagos com [$1,25(OH)_2D_3$] e infectados com *P. aeruginosa* induziu um aumento na produção de óxido nítrico (NO) comparado com macrófagos não tratados. Entretanto, os autores não identificaram diferença estatisticamente significativa nos níveis de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) produzidos por macrófagos tratados com a forma ativa da vitamina D e

desafiados com *P. aeruginosa*. Além disso, foi demonstrado que macrófagos tratados com vitamina D e não desafiados tiveram aumento nos níveis de IL-10 e diminuição em IL-1β, enquanto que os infectados e tratados, apresentaram diminuição nos níveis de IL-10 e aumento nos níveis de IL-1β. Tanto fagocitose quanto atividade bactericida tiveram suas taxas aumentadas após o tratamento com vitamina D, demonstrando um potencial papel da vitamina D na prevenção contra infecções por *P. aeruginosa*. Já em relação a infecções por *M. tuberculosis*, Zeng et al. (2015) (59) demonstraram, em um estudo de meta-análise, que níveis séricos menores que 25ng/mL estavam correlacionados com elevado risco de desenvolvimento de tuberculose ativa.

Pesquisas que relacionaram a deficiência de vitamina D com infecções por *S. aureus* demonstraram que pacientes infectados com *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) tinham níveis mais baixos de vitamina D em comparação àqueles com infecção não MRSA, embora os autores não tenham assumido se deficiência é um resultado da infecção ou pode contribuir para o risco de infecção por MRSA (60). Além disso, Wang et al. (2015) (61) descreveram que crianças com deficiência ou insuficiência de vitamina D apresentavam alto risco de infecção recorrente de pele e tecidos moles por *S. aureus*.

Em relação a suplementação com vitamina D, Slow et al. (2014) (62) demonstraram que a administração de vitamina D por 18 meses aumentou os níveis de [25-(OH)D] nos pacientes em tratamento em comparação ao grupo placebo, mas não reduziu o porte nasal de *S. aureus* naqueles pacientes classificados como infecção persistente. Corroborando esses dados, a suplementação diária com vitamina D por 12 meses não reduziu a infecção por MRSA em pacientes portadores persistentes em relação ao grupo placebo, conforme descrito por Björkhem-Bergman et al. (2018) (63). Em contraste, Udompataikul et al. (2015) (64)

descreveram que uma suplementação oral com Vitamina D reduziu a colonização da pele por *S. aureus* em pacientes com dermatite atópica, levando a uma melhora nos desfechos clínicos. Outro estudo realizado por Björkhem-Bergman et al. (2018) (65) demonstrou que os níveis do carreador de vitamina D, DBP, não foram alterados nos indivíduos portadores de infecção persistente por MRSA ao longo de seis meses, tanto nos indivíduos suplementados com vitamina D quanto naqueles que receberam placebo.

1.3. *S. aureus* e seus mecanismos de escape

O *S. aureus* é uma bactéria Gram-positiva geralmente encontrada na pele e narina de pessoas saudáveis, sendo considerada tanto um comensal quanto um patógeno humano. Em um estudo realizado em 2018, foi demonstrado que a prevalência de colonização por cepas resistentes a meticilina (MRSA) em uma comunidade na cidade de São Paulo é de apenas 2,3% (66), embora artigos demonstrem que a colonização assintomática e persistente da narina é de aproximadamente 30% (67).

É considerada um patógeno oportunista associado a infecções hospitalares e à diversas patologias como endocardite, bacteremia, infecções osteoarticulares, de pele e tecidos moles, dentre outras. As principais taxas de bacteremia ocorrem nos estágios iniciais da vida, com uma queda da taxa de infecção na fase adulta e um aumento gradual com o avanço da idade (68). As infecções por *S. aureus* têm se tornado relevantes para a população humana em virtude do aumento da prevalência de cepas resistentes aos fármacos antibacterianos, principalmente devido a inapropriada prática de automedicação (69), dificultando, dessa maneira, o tratamento e contribuindo para a busca de métodos alternativos para combater

este agente patogênico. Além disso, essa bactéria conta com um potente conjunto de fatores de virulência que contribuem para o escape da resposta imune do hospedeiro.

Entre os fatores de virulência estão as toxinas (enterotoxinas, α e β toxinas), fatores associados à adesão às células do hospedeiro (proteínas de ligação à fibronectina, proteínas de aderência extracelular), superantígenos, além de proteínas e enzimas (coagulases, hidrolases, proteases), os quais podem agir através de ligação aos fatores de coagulação, colágeno, P-selectina, conferindo à bactéria a capacidade de interferir na resposta do hospedeiro. Dentre as possibilidades de escape da resposta imune estão a resistência ao estresse oxidativo, alteração do processo de quimiotaxia, lise de neutrófilos, bloqueio do seu processo de rolamento, inativação do sistema complemento, degradação de imunoglobulinas, resistência à catelicidina, alteração na taxa de fagocitose, inativação de espécies reativas de oxigênio, entre outros (70). A resistência à catelicidina ocorre por meio de alguns fatores de virulência como a aureolisina, a qual age clivando e inativando o peptídeo ativo LL-37 (71). Essa resistência é especialmente importante, uma vez que a catelicidina é um dos principais peptídeos antimicrobianos induzidos pela forma ativa da vitamina D.

Outro fator de virulência é a proteína A, uma proteína envolvida na evasão da fagocitose por sua ligação à porção Fc de anticorpos, impedindo a opsonização, sendo também associada à liberação de Redes Extracelulares de Neutrófilos (NETs). Em um estudo realizado em 2018, foi sugerido que além impedir a fagocitose, a proteína A poderia estimular a formação de NETs a fim de levar os neutrófilos envolvidos na resposta à morte, induzindo o processo de NETose, do qual as bactérias poderiam escapar devido à produção de nucleases (72).

Além dos já descritos fatores de virulência, o *S. aureus* tem a capacidade de produzir biofilme, um importante fator associado à severidade das doenças causadas por essa bactéria.

As infecções associadas ao biofilme geralmente são crônicas e persistentes devido a habilidade de se aderir e persistir em tecidos do hospedeiro ou em implantes médicos, resistindo aos principais tipos de tratamento e à resposta imune (73). O biofilme é descrito como uma comunidade multicelular séssil agregada por uma matriz extracelular composta por carboidrato, DNA extracelular e proteínas, as quais se ligam em fatores do hospedeiro como fibronectina e colágeno para permitir a adesão (73,74). Esse mecanismo de ação da bactéria pode conferir sua evasão da resposta imune possivelmente através da dificuldade de penetração de leucócitos no biofilme e diminuição da capacidade de fagocitose, um processo denominado “fagocitose frustrada”.

Em um estudo realizado em 2002, Leid et al. (75) demonstraram que, sob condições semelhantes as fisiológicas, leucócitos foram capazes de se aderirem e penetrarem no biofilme formado por *S. aureus,* embora essas células não tenham sido capazes de fagocitar e matar as bactérias agregadas ao biofilme, apenas aquelas que estavam isoladas.

1.4. Resposta Imune Inata e seus mecanismos efetores contra *S. aureus*

Apesar dos inúmeros fatores de virulência, o sistema imune inato desempenha papel crucial no combate à infecção por *S. aureus*. A imunidade inata é considerada a primeira linha de defesa do organismo contra os mais diversos tipos de microrganismos. É composta por inúmeras células, dentre elas, as que possuem função de defesa para impedirem infecções, agindo via reconhecimento de Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs) por Receptores de Reconhecimento de Padrões (PRRs), como por exemplo receptores Toll-Like (TLRs), produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio, citocinas e peptídeos antimicrobianos e pela resposta das células fagocíticas como macrófagos e neutrófilos (76).

Os PRRs estão presentes na membrana celular, nuclear, e no citoplasma das células, sendo expressos por diversos tipos celulares, entre eles neutrófilos, macrófagos, células dendríticas e epiteliais. Entre os principais PRRs estão os TLRs, os quais estão presentes tanto na superfície quanto em membranas intracelulares, sendo capazes de reconhecerem diferentes microrganismos em diferentes localizações (77,78). Uma vez reconhecidos os PAMPs, ocorre a ativação de vias de sinalização, levando a expressão de genes responsáveis por produtos envolvidos na resposta inflamatória, incluindo a produção de citocinas como TNF, IL-1 e IFN, quimiocinas e moléculas de adesão endotelial por neutrófilos e macrófagos. Além dos processos de quimiotaxia e adesão neutrofílica ao endotélio para posterior migração para o tecido alvo, ocorre liberação mais mediadores pró-inflamatórios no intuito de dar continuidade ao processo de resposta imune. Para evitar respostas inflamatórias exacerbadas, ocorre liberação de citocinas anti-inflamatórias como IL-10, promovendo assim um equilíbrio na resposta imune do hospedeiro e evitando potenciais danos teciduais causados por respostas descontroladas (79).

Outros PRRs incluem os receptores semelhantes a NOD (NLR), os quais agem via formação de inflamassomos; receptores de carboidratos, como o receptor de manose e os receptores de dectinas; e os receptores *scavengers* (80). Os principais peptídeos antimicrobianos são defensinas, catelicidinas, calprotectina, mieloperoxidase, entre outros, os quais podem ter ação tóxica direta no microrganismo ou através da ativação de outras células envolvidas na resposta imune (78). As principais citocinas envolvidas na resposta inflamatória são TNF, IL-1, IL-6, IFN, entre outras, levando a ativação das células associadas à resposta do hospedeiro frente ao agente agressor e induzindo células endoteliais a expressarem moléculas de adesão, tais como P-selectina e E-selectina em sua superfície e a produzirem quimiocinas (77,78). Os neutrófilos presentes na corrente sanguínea ligam-se a

essas moléculas e respondem às quimiocinas, recrutando mais células para o sítio de infecção. Devido à força de cisalhamento do fluxo sanguíneo, ocorre o processo de rolamento pela parede do vaso sanguíneo próximo ao sítio da infecção, seguida de sua adesão estável ao endotélio mediada por ação de integrinas e migração para o tecido alvo por entre as junções entre as células endoteliais, em um processo conhecido como diapedese, para então realizar sua função (81).

Em relação ao *S. aureus*, o mais importante PRR envolvido na ativação da resposta imune é o TLR-2, podendo fazer dímeros com TLR-1 ou TLR-6. Entretanto, outros receptores também podem ser associados ao reconhecimento de *S. aureus*, como os receptores NOD, NOD2 e NLRP3 (82). Componentes da membrana de *S. aureus* como lipoproteínas (LPPs) são importantes PAMPs reconhecidos por TLR-2, levando a ativação da via de sinalização celular via MyD88, com consequente translocação de NF-κB para o núcleo e expressão de genes de citocinas pró-inflamatórias envolvidas na resposta imune do hospedeiro. Já ácido lipoteicóico (LTA) e peptideoglicano (PGN) também são podem ser reconhecidos por TLR-2, embora existam resultados conflitantes na literatura sobre esse reconhecimento (83,84).

Um importante mecanismo de ação das células da resposta imune inata é a fagocitose. Esse processo pode ocorrer de duas maneiras, seja por reconhecimento de PAMPs por PRRs ou por opsonização dos patógenos (componentes do sistema complemento, imunoglobulinas, os quais se ligam a superfície do patógeno para permitir reconhecimento via receptores das células fagocíticas como Fcy e receptor de complemento 3 – CR3) (85). Quando em contato com o patógeno, as células fagocíticas são capazes de emitir prolongamentos de sua membrana plasmática (pseudópodes) e englobar o microrganismo em vesículas intracelulares conhecidas como fagossomos. Inicialmente, os fagossomos se ligam a endossomos iniciais,

adquirindo suas propriedades como o pH levemente ácido. Posteriormente, ligam-se aos endossomos tardios, onde o ambiente fica mais ácido e enriquecido de proteases e proteínas associadas as membranas dos lisossomos (LAMPs). Por fim, ocorre a fusão com lisossomos, dando origem ao fagolisossomo, estrutura com ambiente altamente ácido na qual ocorrerá a morte do patógeno por meio de mecanismos dependentes e independentes de oxigênio e nitrogênio. A acidificação do microambiente ocorre pela ação de v-ATPases, criando um ambiente hostil que limita o crescimento microbiano e favorece a ação de enzimas que necessitam do pH baixo para exercerem suas funções (85,86).

Além da acidificação do ambiente, as células fagocíticas podem se utilizar de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs) para exercerem suas funções e assim eliminar os patógenos. Os mecanismos dependentes de oxigênio são exercidos via enzima NADPH oxidase, a qual é responsável pela produção de ânions superóxido (O_2-) em células ativadas. O O2- sofre dismutação quando ligado à água, levando à formação de derivados tóxicos de oxigênio, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH-). A H_2O_2 também pode ser catalisada pela ação da enzima mieloperoxidase, gerando um potente oxidante, o ácido hipocloroso (HOCl), considerado como um dos principais mediadores de morte de patógenos por mecanismos dependentes de oxigênio (87,88). Já os mecanismos dependentes de nitrogênio ocorrem pela ação da óxido nítrico sintase (NOS2). EROs e ERNs agem sinergicamente para gerar efeitos altamente tóxicos, inativando proteínas e levando a danos no DNA dos microrganismos, prejudicando, dessa maneira, seu metabolismo e inibindo seu crescimento (85).

Por fim, para auxiliar no processo de fagocitose, as células contam com a presença de uma variedade de peptídeos antimicrobianos como lactoferrina, lisozimas, defensinas e

catelicidinas, entre outros, que podem exercer tanto efeitos bacteriostáticos quanto bactericidas. Esses agem principalmente pela permeabilização de membrana, privação nutricional, entre outros mecanismos para induzir a morte do patógeno (85).

Em um estudo realizado em 2016 (89), foi demonstrado que monócitos de indivíduos neonatais saudáveis e nascidos com sepse tiveram sua capacidade fagocítica reduzida em comparação aos indivíduos adultos quando expostos a *S. aureus* e *Escherichia coli (E. coli)*. Já a capacidade fagocítica de *S. aureus* pelos neutrófilos foi mais alta, embora ainda tenha se demonstrado reduzida nos neonatais em comparação com os adultos. Ademais, foi demonstrado um aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias como IL-8, IL-6 e IL-1β nos neonatais com sepse, além da elevada produção de H_2O_2 após a fagocitose de *E. coli e S. aureus*, em níveis semelhantes aos adultos. Outro estudo demonstrou que neutrófilos e monócitos de pacientes sépticos, após desafio com *S. aureus* e *P. aeruginosa*, apresentaram aumento na produção de EROs e NO, demonstrando que *S. aureus* tem a capacidade de induzir um aumento nos níveis tanto de EROS quanto de NO (90).

No entanto, Guerra et al. (2016) (88) descreveram que o fator de virulência de *S. aureus* SaeR/S, envolvido na evasão da morte de *S. aureus* por neutrófilos, induz uma diminuição na produção de H_2O_2 e HOCl por essas células em resposta ao desafio com a bactéria *in vitro*, resultando na sobrevivência do *S. aureus*. Já Kremserova et al. (2018) (91) demonstraram que neutrófilos humanos pré-sensibilizados com LPS que continham *S. aureus* viáveis no interior de seus fagossomos foram capazes de produzir IL-1β, enquanto que aqueles que continham *S. aureus* mortos ou opsonizados com zimozan liberaram IL-1β em níveis semelhantes aos neutrófilos não estimulados. A produção ocorreu via receptor com proteína serina/treonina quinase 3 (RIPK3) e independente de ativação de inflamassomo e caspase-1. Recentemente,

Berends et al. (2019) (92) identificaram que um importante fator de virulência de *S. aureus* envolvido na formação de poros na membrana das células imunes, a leucocidina AB (LukAB) foi envolvida tanto na morte de neutrófilos quanto de células dendríticas, independentemente do tempo de infecção ou da quantidade de inóculo.

Como primeira linha de combate a microrganismos, os neutrófilos, além de sua capacidade fagocítica após o recrutamento para o sítio de infecção em resposta a citocinas e quimiocinas, também podem agir através da liberação de seu conteúdo granular, os quais possuem proteínas e enzimas com atividades microbicidas. Os grânulos primários ou azurófilos são caracterizados pela ampla presença de peptídeos antimicrobianos, como mieloperoxidase (MPO), defensinas, lisozimas, elastase, catepsina G, entre outros. Grânulos secundários e terciários contêm proteínas importantes para o extravasamento e migração de neutrófilos e proteínas com efeito antimicrobiano, como lactoferrina, colagenase e gelatinase, os quais permitem que neutrófilos cheguem ao sítio de infecção e comecem a resposta antimicrobiana (86,93).

As vesículas secretoras, presentes nas células maduras e compostas por integrinas e outras proteínas associadas ao recrutamento neutrofílico e à fagocitose, como integrina Mac-1 e quimiocinas e receptores de citocinas como o CXCR2 (*C-X-C motif chemokine receptor 2*), são também importantes fatores, sendo que a liberação de seus conteúdos resulta num aumento de receptores quimiotáticos e integrinas na superfície dos neutrófilos, permitindo a aderência firme ao endotélio e entrada no sítio de inflamação. Um novo tipo de grânulo foi descrito recentemente caracterizado por conter ficolina-1, um membro da via das lectinas do sistema complemento, entretanto informações sobre seu conteúdo, degranulação e função são pouco conhecidos (93).

A liberação do conteúdo dos grânulos neutrofílicos deve ser um processo bem regulado, sendo o cálcio um fator muito importante para essa liberação em todos os tipos de grânulos, sendo que as vesículas secretórias são as primeiras a liberarem seu conteúdo, seguidas dos grânulos terciários, secundários e finalmente os primários ou azurofílicos (94). Em algumas patologias como a sepse e doenças autoimunes, a degranulação pode ocorrer de maneira descontrolada, sistemicamente e não apenas no sítio de infecção, levando a danos teciduais em múltiplos órgãos e possivelmente morte (93).

Além de mecanismos intracelulares, as células fagocíticas possuem a capacidade de combater patógenos extracelularmente via um mecanismo denominado Extracellular Traps (ETs), o qual foi descrito pela primeira vez em neutrófilos humanos desafiados com *S. aureus* por Brinkmann et al. (2004) (95). ETs são redes liberadas para o meio extracelular após a ativação celular e compostas por conteúdos granulares e nucleares, como histonas e cromatina descondensada no intuito de eliminar os patógenos através de seu conteúdo microbicida ou de aprisioná-lo temporariamente para permitir o recrutamento de outras células do sistema imune, as quais poderão contribuir para a morte do microrganismo.

1.5. Neutrófilos e Rede Extracelulares de Neutrófilos (NETs)

Redes Extracelulares de Neutrófilos (NETs) são estruturas formadas por fibras com diâmetro entre 15 e 17nm e domínios globulares de aproximadamente 25nm, compondo um material frágil não circundado por membranas (95), liberadas por neutrófilos e que, além de cromatina descondensada e histonas, possuem componentes dos grânulos primários, como elastase, mieloperoxidase, catepsina G, grânulos secundários e terciários (95).

Elastase e mieloperoxidase possuem importante papel na descondensação do DNA pela degradação das ligações das histonas (localizadas no núcleo), permitindo assim elas também participem do processo de formação de NETs. Durante o processo de NETose, a elastase migra para o núcleo e promove a degradação de histonas como a H1 e H4, promovendo a descondensação da cromatina (96). Já a mieloperoxidase, assim como EROS, são necessários para a liberação de elastase dos grânulos durante a liberação das ETs (97). Estudos demonstraram que neutrófilos de indivíduos deficientes na produção de mieloperoxidase e indivíduos portadores de doença granulomatosa crônica (CGD), os quais têm atividade da NADPH oxidase deficiente, apresentaram ausência da migração de elastase para o núcleo, mantendo-se no interior dos grânulos, demonstrando a importância do EROS nesse processo (97).

Primeiramente, o processo de NETose foi descrito como um processo de morte celular, a qual ocorria de maneira distinta de outros processos como necrose e apoptose (95,98). Em um estudo realizado em 2007, Fuchs et al. (98) demonstraram que, durante a Netose, a membrana nuclear é rompida, fato que não ocorre durante a Necrose. Já em comparação com Apoptose, na NETose não ocorre fragmentação do DNA e nem exposição de fosfatidilserina, passos importantes durante a morte celular por Apoptose.

Além de neutrófilos, macrófagos, monócitos, eosinófilos, basófilos e mastócitos também foram descritos como capazes de liberar essas redes para o meio extracelular (99–101) na tentativa de controlar a infecção e eliminar o agente patogênico. Uma vez liberadas, as ETs são responsáveis por aprisionar o microrganismo e assim evitar a disseminação do patógeno na tentativa de auxiliar o desfecho da infecção ou mesmo por eliminar o patógeno através dos inúmeros componentes microbicidas presentes nessas redes (102,103).

Diversos estímulos já foram descritos como potenciais indutores de ETs, entre eles IL-8, forbol miristato acetato (PMA), LPS, entre outros (95). O PMA age pela ativação da enzima NADPH oxidase, induzindo a produção de EROS, essenciais para a ativação da célula e consequente liberação de ETs. EROS foram associados com a formação dessas redes, uma vez que pessoas com deficiência na enzima NADPH oxidase, como os pacientes portadores de CGD, apresentavam capacidade de atividade microbicida reduzida, e incapazes de liberar NETs quando em contato com *Aspergillus nidulans (A. nidulans)*, sendo essa capacidade recuperada após terapia gênica dos pacientes (104). Além desses, foi identificada uma grande variedade de microrganismos capazes de induzir a formação de ETs, entre eles bactérias Gram-positivas e negativas, vírus, fungos e protozoários (95,103,105,106). Entretanto, alguns agentes patogênicos possuem mecanismos de evasão dessas redes como é o caso de *S. aureus*, *M. tuberculosis* e *Aspergillus fumigatus (A. fumigatus)* (102,107,108), fazendo com que as ETs possuam apenas o papel de aprisionamento temporário.

Diversos artigos descrevem a ação das ETs em resposta ao *S. aureus*. Brinkmann et al. (2004) (95) descreveram pela primeira vez que essa bactéria era capaz de induzir a formação de NETs em neutrófilos humanos. Fuchs et al. (2007) (98) identificaram que o processo de liberação de redes para o meio extracelular em resposta ao PMA e *S. aureus* envolvia a morte da célula em questão. Diversas alterações morfológicas, tanto no núcleo quanto no citoplasma foram observadas em diferentes períodos, entre elas a perda da característica lobular do núcleo, descondensação da cromatina, com posterior degradação da membrana nuclear e junção com o conteúdo granular no citoplasma, já disperso. Por fim, poros na membrana celular permitiam a liberação desse material e a morte do neutrófilo ocorria. Entretanto, em 2010, Pilsczek et al. (109) demonstraram que esse mecanismo de defesa não necessariamente dependia da morte do neutrófilo envolvido. Yipp et al. (2013) (110) identificaram que a

NETose é um mecanismo de defesa celular que pode ser classificado em NETose vital ou NETose suicida. A NETose vital caracteriza-se pela liberação do conteúdo das NETs e ainda permite que o neutrófilo seja capaz de exercer suas funções. Esse mecanismo ocorre através da formação de vesículas na membrana nuclear e a consequente liberação das mesmas para o meio extracelular, sem que ocorra a morte da célula envolvida. Outra maneira de ocorrer a NETose vital foi descrita por Yousefi et al. (111), em 2009, os quais demonstraram que cerca de 80% de neutrófilos pré-estimulados com fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e posteriormente ativados com LPS ou fator do sistema complemento C5a, foram capazes de liberar NETs, com DNA de origem mitocondrial. Já a NETose suicida é aquela em que necessariamente ocorre a morte da célula envolvida, como anteriormente descrito por Fuchs et al. (2007) (98).

Como o *S. aureus* possui uma variedade de fatores de virulência, já foi descrito que essa bactéria conta com mecanismos de escape dessas redes, dificultando a resposta do hospedeiro durante o processo infeccioso. Em um estudo realizado por Berends et al. (2010) (107), foi demonstrado que *S. aureus* é capaz de degradar NETs geradas após ativação com PMA via expressão de nuclease, tornando a bactéria resistente à morte extracelular causada pelas NETs. Outro estudo demonstrou que leucocidinas liberadas por *S. aureus* podem levar neutrófilos a morte, sendo que esse processo de morte é acelerado a partir da ação conjunta das leucocidinas PVL e HlgAB, liberadas durante a formação de biofilme. Além disso, essas leucocidinas associadas ao biofilme são responsáveis por induzir a liberação de NETs e que, mesmo após o contato dos neutrófilos com as bactérias, ainda existiam bactérias viáveis na formação do biofilme, indicando que o *S. aureus* pode evadir-se da atividade bactericida oriundas das proteínas com capacidade antimicrobiana presente nas NETs (112).

O papel das NETs não se restringe a seus efeitos benéficos ao hospedeiro, atuando de maneira significativa no combate aos mais diversos tipos de infecção. Diversos trabalhos vêm identificando a presença dessas estruturas em outras condições humanas e correlacionando-as com as mais diversas patologias. Em um estudo realizado em 2018, foi demonstrado que neutrófilos de 53.57% de pacientes com câncer cervical foram capazes de formar NETs espontâneas antes de receber tratamento, porém, essa capacidade variou bastante após radioterapia (66.67%) sozinha ou acrescida de outros tratamentos quimioterápicos como ftorafur (50%) e cisplatina (37.50%) após avaliação do sangue dos pacientes. Houve também a detecção de liberação de ETs por basófilos (113). J

á em doenças autoimunes como a psoríase, foi identificado o aumento de neutrófilos liberando NETs no sangue periférico de pacientes com psoríase em comparação aos indivíduos saudáveis (114). Além disso, os autores demonstraram que a incubação de neutrófilos com soro de pacientes com psoríase induziu um aumento na capacidade de indução de NETs, além correlacionarem a quantidade de NETs formadas com a severidade da doença. Ainda, foi observado que pacientes com psoríase apresentam NETs em suas lesões, o que foi confirmado pelas técnicas de HE (Hematoxilina e Eosina) e microscopia confocal, com marcação de DNA, elastase e histona (114).

Em relação ao processo de trombose, a redução do fluxo sanguíneo induz um estado de hipóxia, induzindo uma ativação do endotélio com consequente liberação do fator von Willebrand o que por sua vez leva ao recrutamento de plaquetas e neutrófilos. As plaquetas presentes são capazes de induzir a liberação de NETs, as quais servem de suporte para adesão e agregação de mais plaquetas, eritrócitos e fibrina, proporcionando a estabilização e formação de mais trombos (115,116). Além disso, foi demonstrado que histonas, um dos

componentes das NETs, são capazes de induzir ativação plaquetária, podendo consequentemente agravar o processo trombótico (115). Quando relacionado a patologias gestacionais como a pré-eclâmpsia, foi demonstrado que micro-debris originados da placenta e outros fatores como IL-8 levam a ativação de neutrófilos, com consequente liberação de NETs, as quais ocupam grande parte do espaço interviloso da placenta (117,118). Outro processo importante que ocorre durante a pré-eclâmpsia é a hipóxia. A presença das NETs no espaço interviloso pode dificultar ainda mais a reperfusão, aumentando o grau de hipóxia e estresse oxidativo, sendo, portanto, a presença das NETs associada a essa patologia (117). Por fim, o processo de NETose também já foi correlacionado com diabetes mellitus. Em um estudo realizado em 2015, os autores demonstraram que neutrófilos de indivíduos saudáveis incubados com altas concentrações de glicose (25mM), na presença ou ausência de PMA, tiveram um aumento na produção de NETs em comparação com concentrações menores de glicose (5mM). Além disso, foi identificado um aumento nos níveis circulantes de componentes das NETs como elastase e DNA dupla fita em soro de pacientes com diabetes tipo 2 em comparação com indivíduos controle, comprovando o fato de que o processo de NETose é associado à hiperglicemia encontrada nos pacientes com diabetes tipo 2 (119).

Algumas drogas já tiveram sua ação relacionada à liberação de ETs. Antibióticos como a fosfomicina, drogas imunossupressoras como a ciclosporina A, drogas anti-inflamatórias, mucolíticas e cardiovasculares e suplementos vitamínicos foram descritos como potenciais indutores ou redutores do processo de NETose (120–122). A vitamina D é um exemplo de suplemento vitamínico que também já teve seu papel relacionado à liberação de ETs, ampliando assim sua relação com o sistema imune. Handono et al. (2014) (123) identificaram que o tratamento de neutrófilos de pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico pode reduzir o dano tecidual causado pela NETose através da diminuição da externalização de elastase

durante o processo de NETose. Já Agraz-Cibrian et al. (2019) (124) demonstraram que o tratamento de neutrófilos com a forma ativa da vitamina D induziu a liberação de estruturas semelhantes às NETs, além do aumento da expressão de mRNA de produtos associados às proteínas das NETs como elastase e PAD4 (*protein arginine deiminase 4*) e de TLR7 e IFN-α, correlacionando o papel da vitamina D com a possibilidade de evitar a disseminação de patógenos.

Assim, considerando a atuação da vitamina D no sistema imune e os potenciais benefícios no combate a infecções, torna-se extremamente interessante verificar se a vitamina D pode modular os mecanismos efetores intra e extracelulares de neutrófilos humanos contra o *S. aureus*, contribuindo, dessa maneira, ao combate à infecções, especialmente aquelas causadas por microrganismos resistentes aos principais tratamentos.

2. Referências

1. Norman AW. From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health. Am J Clin Nutr. 2008 Aug 1;88(2):491S-499S.
2. Christakos S, Dhawan P, Verstuyf A, Verlinden L, Carmeliet G. Vitamin D: Metabolism, Molecular Mechanism of Action, and Pleiotropic Effects. Physiol Rev. 2016 Jan;96(1):365–408.
3. Holick MF. Vitamin D: A millenium perspective: Vitamin D. J Cell Biochem. 2003 Feb 1;88(2):296–307.
4. Lin R. Crosstalk between Vitamin D Metabolism, VDR Signalling, and Innate Immunity. BioMed Res Int. 2016;2016:1–5.
5. Holick MF. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. Am J Clin Nutr. 2004 Dec 1;80(6):1678S-1688S.
6. Maeda SS, Borba VZC, Camargo MBR, Silva DMW, Borges JLC, Bandeira F, et al. Recommendations of the Brazilian Society of Endocrinology and Metabology (SBEM) for the diagnosis and treatment of hypovitaminosis D. Arq Bras Endocrinol Metabol. 2014 Jul;58(5):411–33.
7. Slominski A, Zjawiony J, Wortsman J, Semak I, Stewart J, Pisarchik A, et al. A novel pathway for sequential transformation of 7-dehydrocholesterol and expression of the P450scc system in mammalian skin: P450scc in the skin. Eur J Biochem. 2004 Oct 20;271(21):4178–88.
8. Wolpowitz D, Gilchrest BA. The vitamin D questions: How much do you need and how should you get it? J Am Acad Dermatol. 2006 Feb;54(2):301–17.
9. Hossein-nezhad A, Spira A, Holick MF. Influence of Vitamin D Status and Vitamin D3 Supplementation on Genome Wide Expression of White Blood Cells: A Randomized Double-Blind Clinical Trial. PLoS ONE. 2013 Mar 20;8(3):e58725.
10. Haussler MR, Jurutka PW, Mizwicki M, Norman AW. Vitamin D receptor (VDR)-mediated actions of 1α,25(OH)2vitamin D3: Genomic and non-genomic mechanisms. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2011 Aug;25(4):543–59.
11. Piotrowska A, Wierzbicka J, Żmijewski MA. Vitamin D in the skin physiology and pathology. Acta Biochim Pol. 2016;63(1):17–29.
12. Pike JW, Meyer MB, Lee S-M, Onal M, Benkusky NA. The vitamin D receptor: contemporary genomic approaches reveal new basic and translational insights. J Clin Invest. 2017 Feb 27;127(4):1146–54.
13. Boonstra A, Barrat FJ, Crain C, Heath VL, Savelkoul HFJ, O'Garra A. 1 ,25-Dihydroxyvitamin D3 Has a Direct Effect on Naive CD4+ T Cells to Enhance the Development of Th2 Cells. J Immunol. 2001 Nov 1;167(9):4974–80.
14. Christakos S. Recent advances in our understanding of 1,25-dihydroxyvitamin D3 regulation of intestinal calcium absorption. Arch Biochem Biophys. 2012 Jul;523(1):73–6.
15. Veldurthy V, Wei R, Oz L, Dhawan P, Jeon YH, Christakos S. Vitamin D, calcium homeostasis and aging. Bone Res [Internet]. 2016 Dec [cited 2018 Nov 1];4:16041. Available from: http://www.nature.com/articles/boneres201641
16. Morris HA. Vitamin D Activities for Health Outcomes. Ann Lab Med. 2014;34(3):181-6.
17. Holick MF. Vitamin D Status: Measurement, Interpretation, and Clinical Application. Ann Epidemiol. 2009 Feb;19(2):73–8.
18. Battault S, Whiting SJ, Peltier SL, Sadrin S, Gerber G, Maixent JM. Vitamin D metabolism, functions and needs: from science to health claims. Eur J Nutr. 2013 Mar;52(2):429–41.
19. Prietl B, Treiber G, Pieber T, Amrein K. Vitamin D and Immune Function. Nutrients. 2013 Jul 5;5(7):2502–21.
20. Umar M, Sastry K, Chouchane A. Role of Vitamin D Beyond the Skeletal Function: A Review of the Molecular and Clinical Studies. Int J Mol Sci. 2018 May 30;19(6). pii: E1618.
21. Wang QM, Jones JB, Studzinski GP. Cyclin-dependent kinase inhibitor p27 as a mediator of the G1-S phase block induced by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in HL60 cells. Cancer Res. 1996 Jan 15;56(2):264–7.

22. Moffatt KA, Johannes WU, Hedlund TE, Miller GJ. Growth inhibitory effects of 1alpha, 25-dihydroxyvitamin D(3) are mediated by increased levels of p21 in the prostatic carcinoma cell line ALVA-31. Cancer Res. 2001 Oct 1;61(19):7122–9.
23. Abe E, Miyaura C, Sakagami H, Takeda M, Konno K, Yamazaki T, et al. Differentiation of mouse myeloid leukemia cells induced by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3. Proc Natl Acad Sci U S A. 1981 Aug;78(8):4990–4.
24. Ma Y, Yu W-D, Hidalgo AA, Luo W, Delansorne R, Johnson CS, et al. Inecalcitol, an analog of $1,25D_3$, displays enhanced antitumor activity through the induction of apoptosis in a squamous cell carcinoma model system. Cell Cycle. 2013 Mar;12(5):743–52.
25. Provvedini DM, Tsoukas CD, Deftos LJ, Manolagas SC. 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptors in human leukocytes. Science. 1983 Sep 16;221(4616):1181–3.
26. Baeke F, Takiishi T, Korf H, Gysemans C, Mathieu C. Vitamin D: modulator of the immune system. Curr Opin Pharmacol. 2010 Aug;10(4):482–96.
27. Kreutz M, Andreesen R, Krause SW, Szabo A, Ritz E, Reichel H. 1,25-dihydroxyvitamin D3 production and vitamin D3 receptor expression are developmentally regulated during differentiation of human monocytes into macrophages. Blood. 1993 Aug 15;82(4):1300–7.
28. Hewison M, Freeman L, Hughes SV, Evans KN, Bland R, Eliopoulos AG, et al. Differential regulation of vitamin D receptor and its ligand in human monocyte-derived dendritic cells. J Immunol Baltim Md 1950. 2003 Jun 1;170(11):5382–90.
29. 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 D3 in the immune system. J Steroid Biochem Mol Biol. 2010 Jul;121(1–2):221–7.
30. Liu PT. Toll-Like Receptor Triggering of a Vitamin D-Mediated Human Antimicrobial Response. Science. 2006 Mar 24;311(5768):1770–3.
31. Schauber J, Dorschner RA, Yamasaki K, Brouha B, Gallo RL. Control of the innate epithelial antimicrobial response is cell-type specific and dependent on relevant microenvironmental stimuli. Immunology. 2006 Jun 6;118(4):509-19.
32. Gombart AF, Borregaard N, Koeffler HP. Human cathelicidin antimicrobial peptide (CAMP) gene is a direct target of the vitamin D receptor and is strongly up-regulated in myeloid cells by 1,25-dihydroxyvitamin D_3. FASEB J. 2005 Jul;19(9):1067–77.
33. Hirsch D, Archer FE, Joshi-Kale M, Vetrano AM, Weinberger B. Decreased Anti-Inflammatory Responses to Vitamin D in Neonatal Neutrophils. Mediators Inflamm. 2011;2011:1–7.
34. Vidyarani M, Selvaraj P, Jawahar MS, Narayanan PR. 1, 25 Dihydroxyvitamin D3 modulated cytokine response in pulmonary tuberculosis. Cytokine. 2007 Nov;40(2):128–34.
35. Rockett KA, Brookes R, Udalova I, Vidal V, Hill AV, Kwiatkowski D. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 induces nitric oxide synthase and suppresses growth of Mycobacterium tuberculosis in a human macrophage-like cell line. Infect Immun. 1998 Nov;66(11):5314–21.
36. Wang T-T, Nestel FP, Bourdeau V, Nagai Y, Wang Q, Liao J, et al. Cutting edge: 1,25-dihydroxyvitamin D3 is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression. J Immunol. 2004 Sep 1;173(5):2909–12.
37. Xie Z, Chen J, Zheng C, Wu J, Cheng Y, Zhu S, et al. 1,25-dihydroxyvitamin D_3 -induced dendritic cells suppress experimental autoimmune encephalomyelitis by increasing proportions of the regulatory lymphocytes and reducing T helper type 1 and type 17 cells. Immunology. 2017 Nov;152(3):414–24.
38. Piemonti L, Monti P, Sironi M, Fraticelli P, Leone BE, Dal Cin E, et al. Vitamin D3 affects differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells. J Immunol. 2000 May 1;164(9):4443–51.
39. Jeffery LE, Burke F, Mura M, Zheng Y, Qureshi OS, Hewison M, et al. 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. 2009 Nov 1;183(9):5458–67.

40. Joshi S, Pantalena L-C, Liu XK, Gaffen SL, Liu H, Rohowsky-Kochan C, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 Ameliorates Th17 Autoimmunity via Transcriptional Modulation of Interleukin-17A. Mol Cell Biol. 2011 Sep 1;31(17):3653–69.
41. Lemire JM, Adams JS, Sakai R, Jordan SC. 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 suppresses proliferation and immunoglobulin production by normal human peripheral blood mononuclear cells. J Clin Invest. 1984 Aug 1;74(2):657–61.
42. Hoel DG, Berwick M, de Gruijl FR, Holick MF. The risks and benefits of sun exposure 2016. Dermatoendocrinol. 2016 Jan;8(1):e1248325.
43. Pereira LA, Luz FB, Carneiro CMM de O, Xavier R, Kanaan S, Miot HA. Evaluation of vitamin D plasma levels after mild exposure to the sun with photoprotection. An. Bras. Dermatol. 2019; v. 94, p.56-61.
44. on behalf of the IOF Committee of Scientific Advisors (CSA) Nutrition Working Group, Mithal A, Wahl DA, Bonjour J-P, Burckhardt P, Dawson-Hughes B, et al. Global vitamin D status and determinants of hypovitaminosis D. Osteoporos Int. 2009 Nov;20(11):1807–20.
45. Unger MD, Cuppari L, Titan SM, Magalhães MCT, Sassaki AL, dos Reis LM, et al. Vitamin D status in a sunny country: Where has the sun gone? Clin Nutr. 2010 Dec;29(6):784–8.
46. Vitamin D Council [Internet]. [cited 2019 Jan 19]. Available from: https://www.vitamindcouncil.org/
47. Płudowski P, Karczmarewicz E, Bayer M, Carter G, Chlebna-Sokół D, Czech-Kowalska J, et al. Practical guidelines for the supplementation of vitamin D and the treatment of deficits in Central Europe - recommended vitamin D intakes in the general population and groups at risk of vitamin D deficiency. Endokrynol Pol. 2013;64(4):319–27.
48. Bhan A, Rao AD, Rao DS. Osteomalacia as a Result of Vitamin D Deficiency. Endocrinol Metab Clin North Am. 2010 Jun;39(2):321–31.
49. Grammatiki M, Rapti E, Karras S, Ajjan RA, Kotsa K. Vitamin D and diabetes mellitus: Causal or casual association? Rev Endocr Metab Disord. 2017 Jun;18(2):227–41.
50. Alkhatatbeh M, Abdul-Razzak K. Association between serum 25-hydroxyvitamin D, hemoglobin A1c and fasting blood glucose levels in adults with diabetes mellitus. Biomed Rep [Internet]. 2018 Oct 17 [cited 2019 Jan 12];9(6):523-530.Available from: http://www.spandidos-publications.com/10.3892/br.2018.1159
51. Timerman D, McEnery-Stonelake M, Joyce CJ, Nambudiri VE, Hodi FS, Claus EB, et al. Vitamin D deficiency is associated with a worse prognosis in metastatic melanoma. Oncotarget [Internet]. 2017 Jan 24 [cited 2019 Jan 12]; 8(4):6873-82. Available from: http://www.oncotarget.com/fulltext/14316
52. Feldman D, Krishnan AV, Swami S, Giovannucci E, Feldman BJ. The role of vitamin D in reducing cancer risk and progression. Nat Rev Cancer. 2014 May;14(5):342–57.
53. Handono K, Marisa D, Kalim H. Association between the low levels of vitamin D and Treg function in systemic lupus erythematosus patients. Acta Medica Indones. 2013 Jan;45(1):26–31.
54. Zuccotti E, Oliveri M, Girometta C, Ratto D, Di Iorio C, Occhinegro A, et al. Nutritional strategies for psoriasis: current scientific evidence in clinical trials. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2018 Dec;22(23):8537–51.
55. Ford AR, Siegel M, Bagel J, Cordoro KM, Garg A, Gottlieb A, et al. Dietary Recommendations for Adults With Psoriasis or Psoriatic Arthritis From the Medical Board of the National Psoriasis Foundation: A Systematic Review. JAMA Dermatol. 2018 Aug 1;154(8):934.
56. Jiménez-Sousa MÁ, Martínez I, Medrano LM, Fernández-Rodríguez A, Resino S. Vitamin D in Human Immunodeficiency Virus Infection: Influence on Immunity and Disease. Front Immunol [Internet]. 2018 Mar 12 [cited 2018 Nov 1];9:458. Available from: http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.00458/full
57. Bouzid D, Merzouki S, Bachiri M, Ailane SE, Zerroug MM. Vitamin D 3 a new drug against *Candida albicans.* J Mycol Médicale. 2017 Mar;27(1):79–82.

58. Nouari W, Ysmail-Dahlouk L, Aribi M. Vitamin D3 enhances bactericidal activity of macrophage against *Pseudomonas aeruginosa*. Int Immunopharmacol. 2016 Jan;30:94–101.
59. Zeng J, Wu G, Yang W, Gu X, Liang W, Yao Y, et al. A Serum Vitamin D Level <25nmol/L Pose High Tuberculosis Risk: A Meta-Analysis. PLOS ONE. 2015 May 4;10(5):e0126014.
60. Thomason J, Rentsch C, Stenehjem EA, Hidron AI, Rimland D. Association between vitamin D deficiency and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. Infection. 2015 Dec;43(6):715–22.
61. Wang JW, Hogan PG, Hunstad DA, Fritz SA. Vitamin D Sufficiency and *Staphylococcus Aureus* Infection in Children: Pediatr Infect Dis J. 2015 May;34(5):544–5.
62. Slow S, Priest PC, Chambers ST, Stewart AW, Jennings LC, Florkowski CM, et al. Effect of vitamin D3 supplementation on *Staphylococcus aureus* nasal carriage: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial in healthy adults. Clin Microbiol Infect. 2014 May;20(5):453–8.
63. Björkhem-Bergman L, Missailidis C, Karlsson-Valik J, Tammelin A, Ekström L, Bottai M, et al. Vitamin D supplementation to persistent carriers of MRSA—a randomized and placebo-controlled clinical trial. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2018 Sep;37(9):1735–44.
64. Udompataikul M, Huajai S, Chalermchai T, Taweechotipatr M, Kamanamool N. The Effects of Oral Vitamin D Supplement on Atopic Dermatitis: A Clinical Trial with *Staphylococcus aureus* Colonization Determination. J Med Assoc Thai. 2015 Oct;98 Suppl 9:S23-30.
65. Björkhem-Bergman L, Torefalk E, Ekström L, Bergman P. Vitamin D binding protein is not affected by high-dose vitamin D supplementation: a post hoc analysis of a randomised, placebo-controlled study. BMC Res Notes [Internet]. 2018 Dec [cited 2019 Jan 12];11(1):619. Available from: https://bmcresnotes.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13104-018-3725-7
66. Bes TM, Martins RR, Perdigão L, Mongelos D, Moreno L, Moreno A, et al. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in individuals from the community in the city of Sao Paulo, Brazil. Rev Inst Med Trop São Paulo [Internet]. 2018 Oct 22 [cited 2019 Jan 12];60:e58. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46652018005000232&lng=en&tlng=en
67. Sakr A, Brégeon F, Mège J-L, Rolain J-M, Blin O. *Staphylococcus aureus* Nasal Colonization: An Update on Mechanisms, Epidemiology, Risk Factors, and Subsequent Infections. Front Microbiol [Internet]. 2018 Oct 8 [cited 2019 Jan 12];9:2419. Available from: https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.02419/full
68. Tong SYC, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG. *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. Clin Microbiol Rev. 2015 Jul;28(3):603–61.
69. Bennadi D. Self-medication: A current challenge. J Basic Clin Pharm. 2014;5(1):19-23.
70. Zecconi A, Scali F. *Staphylococcus aureus* virulence factors in evasion from innate immune defenses in human and animal diseases. Immunol Lett. 2013 Feb;150(1–2):12–22.
71. Sieprawska-Lupa M, Mydel P, Krawczyk K, Wojcik K, Puklo M, Lupa B, et al. Degradation of Human Antimicrobial Peptide LL-37 by *Staphylococcus aureus*-Derived Proteinases. Antimicrob Agents Chemother. 2004 Dec 1;48(12):4673–9.
72. Hoppenbrouwers T, Sultan AR, Abraham TE, Lemmens-den Toom NA, Hansenová Maňásková S, van Cappellen WA, et al. Staphylococcal Protein A Is a Key Factor in Neutrophil Extracellular Traps Formation. Front Immunol [Internet]. 2018 Feb 5 [cited 2018 Nov 1];9:165. Available from: http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.00165/full
73. Lister JL, Horswill AR. *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal. Front Cell Infect Microbiol [Internet]. 2014 Dec 23 [cited 2019 Jan 12];4:178. Available from: http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2014.00178/abstract
74. Moormeier DE, Bose JL, Horswill AR, Bayles KW. Temporal and Stochastic Control of *Staphylococcus aureus* Biofilm Development. mBio [Internet]. 2014 Oct 14 [cited 2019 Jan 12];5(5):e01341-14. Available from: http://mbio.asm.org/cgi/doi/10.1128/mBio.01341-14

75. Leid JG, Shirtliff ME, Costerton JW, Stoodley P. Human leukocytes adhere to, penetrate, and respond to *Staphylococcus aureus* biofilms. Infect Immun. 2002 Nov;70(11):6339–45.
76. Komatsuzawa H, Ouhara K, Yamada S, Fujiwara T, Sayama K, Hashimoto K, et al. Innate defences against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection. J Pathol. 2006 Jan;208(2):249–60.
77. Takeuchi O, Akira S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. Cell. 2010 Mar;140(6):805–20.
78. Teng T-S, Ji A, Ji X-Y, Li Y-Z. Neutrophils and Immunity: From Bactericidal Action to Being Conquered. J Immunol Res. 2017;2017:1–14.
79. Cicchese JM, Evans S, Hult C, Joslyn LR, Wessler T, Millar JA, et al. Dynamic balance of pro- and anti-inflammatory signals controls disease and limits pathology. Immunol Rev. 2018 Sep;285(1):147–67.
80. Amarante-Mendes GP, Adjemian S, Branco LM, Zanetti LC, Weinlich R, Bortoluci KR. Pattern Recognition Receptors and the Host Cell Death Molecular Machinery. Front Immunol [Internet]. 2018 Oct 16 [cited 2019 Jan 22]; 9:2379. Available from: https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.02379/full
81. Guerra FE, Borgogna TR, Patel DM, Sward EW, Voyich JM. Epic Immune Battles of History: Neutrophils vs. *Staphylococcus aureus*. Front Cell Infect Microbiol [Internet]. 2017 Jun 30 [cited 2019 Jan 12];7:286. Available from: http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2017.00286/full
82. Johannessen M, Sollid JE, Hanssen A-M. Host- and microbe determinants that may influence the success of S. aureus colonization. Front Cell Infect Microbiol [Internet]. 2012 [cited 2019 Jan 26];2:56. Available from: http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2012.00056/abstract
83. Pietrocola G, Arciola CR, Rindi S, Di Poto A, Missineo A, Montanaro L, et al. Toll-Like Receptors (TLRs) in Innate Immune Defense Against *Staphylococcus Aureus*. Int J Artif Organs. 2011 Sep;34(9):799–810.
84. Dziarski R, Gupta D. *Staphylococcus aureus* Peptidoglycan Is a Toll-Like Receptor 2 Activator: a Reevaluation. Infect Immun. 2005 Aug 1;73(8):5212–6.
85. Flannagan RS, Cosío G, Grinstein S. Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. Nat Rev Microbiol. 2009 May;7(5):355–66.
86. Mayadas TN, Cullere X, Lowell CA. The Multifaceted Functions of Neutrophils. Annu Rev Pathol Mech Dis. 2014 Jan 24;9(1):181–218.
87. Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. Blood. 1998 Nov 1;92(9):3007–17.
88. Guerra FE, Addison CB, de Jong NWM, Azzolino J, Pallister KB, van Strijp J (A. G., et al. *Staphylococcus aureus* SaeR/S-regulated factors reduce human neutrophil reactive oxygen species production. J Leukoc Biol. 2016 Nov;100(5):1005–10.
89. Silveira-Lessa AL, Quinello C, Lima L, Redondo ACC, Ceccon MEJR, Carneiro-Sampaio M, et al. TLR expression, phagocytosis and oxidative burst in healthy and septic newborns in response to Gram-negative and Gram-positive rods. Hum Immunol. 2016 Oct;77(10):972–80.
90. Santos SS, Brunialti MKC, Rigato O, Machado FR, Silva E, Salomao R. Generation of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species by Neutrophils and Monocytes From Septic Patients and Association With Outcomes: Shock. 2012 Jul;38(1):18–23.
91. Kremserova S, Nauseef WM. *Staphylococcus aureus* promotes receptor-interacting protein kinase 3- and protease-dependent production of IL-1β in human neutrophils. J Leukoc Biol [Internet]. 2018 Dec 13 [cited 2019 Jan 12]; Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/JLB.4HI0918-346R
92. Berends ETM, Zheng X, Zwack EE, Ménager MM, Cammer M, Shopsin B, et al. *Staphylococcus aureus* Impairs the Function of and Kills Human Dendritic Cells via the LukAB Toxin. Freitag NE, editor. mBio [Internet]. 2019 Jan 2 [cited 2019 Jan 12];10(1). pii: e01918-18. Available from: http://mbio.asm.org/lookup/doi/10.1128/mBio.01918-18

93. Yin C, Heit B. Armed for destruction: formation, function and trafficking of neutrophil granules. Cell Tissue Res. 2018 Mar;371(3):455–71.
94. Faurschou M, Borregaard N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. Microbes Infect. 2003 Nov;5(14):1317–27.
95. Brinkmann V. Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. Science. 2004 Mar 5;303(5663):1532–5.
96. Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A, Zychlinsky A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. J Cell Biol. 2010 Nov 1;191(3):677–91.
97. Metzler KD, Goosmann C, Lubojemska A, Zychlinsky A, Papayannopoulos V. A Myeloperoxidase-Containing Complex Regulates Neutrophil Elastase Release and Actin Dynamics during NETosis. Cell Rep. 2014 Aug;8(3):883–96.
98. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. J Cell Biol. 2007 Jan 15;176(2):231–41.
99. Campillo-Navarro M, Leyva-Paredes K, Donis-Maturano L, González-Jiménez M, Paredes-Vivas Y, Cerbulo-Vázquez A, et al. *Listeria monocytogenes* induces mast cell extracellular traps. Immunobiology. 2017 Feb;222(2):432–9.
100. Ueki S, Konno Y, Takeda M, Moritoki Y, Hirokawa M, Matsuwaki Y, et al. Eosinophil extracellular trap cell death–derived DNA traps: Their presence in secretions and functional attributes. J Allergy Clin Immunol. 2016 Jan;137(1):258–67.
101. Yousefi S, Morshed M, Amini P, Stojkov D, Simon D, von Gunten S, et al. Basophils exhibit antibacterial activity through extracellular trap formation. Allergy. 2015 Sep;70(9):1184–8.
102. McCormick A, Heesemann L, Wagener J, Marcos V, Hartl D, Loeffler J, et al. NETs formed by human neutrophils inhibit growth of the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus.* Microbes Infect. 2010 Nov;12(12–13):928–36.
103. Urban CF, Reichard U, Brinkmann V, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. Cell Microbiol. 2006 Apr;8(4):668–76.
104. Bianchi M, Hakkim A, Brinkmann V, Siler U, Seger RA, Zychlinsky A, et al. Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis. Blood. 2009 Sep 24;114(13):2619–22.
105. Baker VS, Imade GE, Molta NB, Tawde P, Pam SD, Obadofin MO, et al. Cytokine-associated neutrophil extracellular traps and antinuclear antibodies in *Plasmodium falciparum* infected children under six years of age. Malar J. 2008;7(1):41.
106. Narasaraju T, Yang E, Samy RP, Ng HH, Poh WP, Liew A-A, et al. Excessive Neutrophils and Neutrophil Extracellular Traps Contribute to Acute Lung Injury of Influenza Pneumonitis. Am J Pathol. 2011 Jul;179(1):199–210.
107. Berends ETM, Horswill AR, Haste NM, Monestier M, Nizet V, von Köckritz-Blickwede M. Nuclease Expression by *Staphylococcus aureus* Facilitates Escape from Neutrophil Extracellular Traps. J Innate Immun. 2010;2(6):576–86.
108. Ramos-Kichik V, Mondragón-Flores R, Mondragón-Castelán M, Gonzalez-Pozos S, Muñiz-Hernandez S, Rojas-Espinosa O, et al. Neutrophil extracellular traps are induced by *Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis. 2009 Jan;89(1):29–37.
109. Pilsczek FH, Salina D, Poon KKH, Fahey C, Yipp BG, Sibley CD, et al. A Novel Mechanism of Rapid Nuclear Neutrophil Extracellular Trap Formation in Response to *Staphylococcus aureus*. J Immunol. 2010 Dec 15;185(12):7413–25.
110. Yipp BG, Kubes P. NETosis: how vital is it? Blood. 2013 Oct 17;122(16):2784–94.
111. Yousefi S, Mihalache C, Kozlowski E, Schmid I, Simon HU. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. Cell Death Differ. 2009 Nov;16(11):1438–44.
112. Bhattacharya M, Berends ETM, Chan R, Schwab E, Roy S, Sen CK, et al. *Staphylococcus aureus* biofilms release leukocidins to elicit extracellular trap formation and evade neutrophil-mediated killing. Proc Natl Acad Sci. 2018 Jul 10;115(28):7416–21.

113. Fomenko Y, Kolesnikova Y, Beynikova I, Muravlyova L, Sirota V, Bakirova R. Influence of Combined Therapy on Generation of Neutrophil Extracellular Traps in Patients with Cervical Cancer. Open Access Maced J Med Sci. 2018 Nov 20;6(11):2097–100.
114. Hu SC-S, Yu H-S, Yen F-L, Lin C-L, Chen G-S, Lan C-CE. Neutrophil extracellular trap formation is increased in psoriasis and induces human β-defensin-2 production in epidermal keratinocytes. Sci Rep [Internet]. 2016 Nov [cited 2019 Jan 12];6:31119. Available from: http://www.nature.com/articles/srep31119
115. Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, Schatzberg D, Monestier M, Myers DD, et al. Extracellular DNA traps promote thrombosis. Proc Natl Acad Sci. 2010 Sep 7;107(36):15880–5.
116. Brinkmann V. Neutrophil Extracellular Traps in the Second Decade. J Innate Immun. 2018;10(5–6):414–21.
117. Gupta AK, Hasler P, Holzgreve W, Hahn S. Neutrophil NETs: a novel contributor to preeclampsia-associated placental hypoxia? Semin Immunopathol. 2007 May 24;29(2):163–7.
118. Hahn S, Giaglis S, Hoesli I, Hasler P. Neutrophil NETs in reproduction: from infertility to preeclampsia and the possibility of fetal loss. Front Immunol [Internet]. 2012 [cited 2019 Jan 23];3:362. Available from: http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2012.00362/abstract
119. Menegazzo L, Ciciliot S, Poncina N, Mazzucato M, Persano M, Bonora B, et al. NETosis is induced by high glucose and associated with type 2 diabetes. Acta Diabetol. 2015 Jun;52(3):497–503.
120. Gupta AK, Giaglis S, Hasler P, Hahn S. Efficient Neutrophil Extracellular Trap Induction Requires Mobilization of Both Intracellular and Extracellular Calcium Pools and Is Modulated by Cyclosporine A. Palaniyar N, editor. PLoS ONE. 2014 May 12;9(5):e97088.
121. Shen F, Tang X, Cheng W, Wang Y, Wang C, Shi X, et al. Fosfomycin enhances phagocyte-mediated killing of *Staphylococcus aureus* by extracellular traps and reactive oxygen species. Sci Rep [Internet]. 2016 May [cited 2018 Nov 1];6:19262. Available from: http://www.nature.com/articles/srep19262
122. Zawrotniak M, Kozik A, Rapala-Kozik M. Selected mucolytic, anti-inflammatory and cardiovascular drugs change the ability of neutrophils to form extracellular traps (NETs). Acta Biochim Pol. 2015;62(3):465–73.
123. Handono K, Sidarta YO, Pradana BA, Nugroho RA, Hartono IA, Kalim H, et al. Vitamin D prevents endothelial damage induced by increased neutrophil extracellular traps formation in patients with systemic lupus erythematosus. Acta Medica Indones. 2014 Jul;46(3):189–98.
124. Agraz-Cibrian JM, Giraldo DM, Urcuqui-Inchima S. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 induces formation of neutrophil extracellular trap-like structures and modulates the transcription of genes whose products are neutrophil extracellular trap-associated proteins: A pilot study. Steroids. 2019 Jan;141:14–22.

Capítulo II

Artigo Científico

Manuscrito redigido de acordo com as normas da Revista Plos One

Manuscript
Effect of vitamin D upon intra and extracellular bactericidal mechanisms from human neutrophils against *Staphylococcus aureus:* role on bactericidal activity, phagocytosis and Neutrophil Extracellular Traps (NETs)

Amanda Manoel Della Coletta[1], Taiane Priscila Gardizani[1], Tatiana Cristina Figueira[1], Yohan Ricci Zonta[1], Kaio Shu Tsyr Yu[1], Larissa Carvalho[1], Thaís Graziela Donegá França[2], Graziela Gorete Romagnoli[2], Valdecir Farias Ximenes[3], Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha[2], Helio Amante Miot[4], Luciane Alarcão Dias-Melicio[1,5]*

1 São Paulo State University (Unesp), Medical School of Botucatu, Laboratory of Immunopathology and Infectious Agents - LIAI, UNIPEX - Experimental Research Unity, Sector 5, Botucatu/SP - Brazil;
2 São Paulo State University (Unesp), Institute of Biosciences, Department of Microbiology and Immunology, Botucatu/SP – Brazil.
3 São Paulo State University (Unesp), School of Sciences, Department of Chemistry, Bauru/SP-Brazil.
4 São Paulo State University (Unesp), Medical School of Botucatu, Department of Dermatology and Radiotherapy, Botucatu/SP – Brazil
5 São Paulo State University (UNESP), Medical School of Botucatu, Department of Pathology, Botucatu/SP – Brazil.

Short title: Effect of vitamin D on human neutrophils effector mechanisms against *Staphylococcus aureus*

Funding: This work was suported by CNPq PhD fellowship (AMDC - 140332/2015-4). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

*** E-mail: dias.melicio@unesp.br**

Manuscript written according to PLOS ONE Submission Guidelines

ABSTRACT

Vitamin D deficiency has become extremely relevant worldwide in the last years, mainly due to populations behavior changes, such as reduced sun exposure and insufficient vitamin intake in the diet. Vitamin D role in maintenance of calcium homeostasis is already established, and now, studies have focused on vitamin D role on the regulation and function of the immune system. Its deficiency has been associated with several diseases such as bone diseases, cancer, diabetes mellitus, autoimmune and infectious diseases such as those caused by *Staphylococcus aureus (S. aureus)*. Innate immune system plays a major role against *S. aureus* infections through response mediated by pattern recognition receptors (PRRs), reactive oxygen species (ROS), cytokines and antimicrobial peptides production, and the response of phagocytic cells such as macrophages and neutrophils by intra and extracellular mechanisms. In this manner, the aims of this study were to evaluate the role of Vitamin D upon the intra and extracellular effector mechanisms of human neutrophils against different strains of *S. aureus*. In this context, 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 through 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).

INTRODUCTION

In the past decades, vitamin D deficiency has become extremely relevant worldwide, mainly due to populations behavior changes, such as reduced sun exposure and protection to avoid elevated skin cancer rates (1). Although there are conflict data about 25-hydroxyvitamin D (25(OH) vitamin D) states, serum levels lower than 20ng/mL are considered as deficiency (2). Vitamin D is produced in the skin upon a photochemical conversion of 7-dehydrocholesterol, which is present in the epidermis, in Vitamin D_3 (Cholecalciferol) after ultraviolet radiation exposure or by an alternative pathway of vitamin D intake through the diet (3,4). To have biological function, Vitamin D_3 should be transformed in the liver to $25(OH)D_3$ (25-hydroxycholecalciferol) and then in $1\alpha,25(OH)_2D_3$ (1,25-dihidroxicholecalciferol - calcitriol) in the kidney. Then, the secosteroid hormone ($1\alpha,25(OH)_2D_3$) should be systemic transported to distal organs and bind to a nuclear or membrane receptor (VDR) to generate a biological response via transcriptional gene regulation, possibly having a role in apoptosis, cell cycling and proliferation (3,5).

Vitamin D is already known for its role in maintenance of calcium homeostasis, being responsible for intestinal calcium absorption and its deficiency is associated with decreased bone density and increased risk of fracture (6,7). Besides that, in the past decade, studies have focused on the role of vitamin D to the regulation and function of the immune system.

Previous studies have described the presence of Vitamin D receptor (VDR) in B and activated T cells ($CD4^+$ and $CD8^+$), macrophages, dendritic cells and neutrophils. In addition, Vitamin D is recognized as an enhancer of the antimicrobial activities of innate immune cells such as neutrophils, monocytes and macrophages, promoting an increase in antimicrobial substances such as cathelicidin, in phagocytosis and chemotactic response in macrophages (8–10). However, Vitamin D suppressed TLR2 and TLR4 expression in a time and dose-

dependent manner in monocytes, consequently diminishing Tumor Necrosis Factor-Alpha (TNF-α) levels after challenge of the cells with lipopolysaccharide (LPS) and lipoteichoic acid (LTA) (11). Vitamin D also decreased the production of Interleukin-12p40 (IL-12p40) and Interferon-gamma (IFN-γ) by peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from health donors and pulmonary tuberculosis patients after challenge with culture filtrate antigen (CFA) of *Mycobacterium tuberculosis (M. tuberculosis)* (12). Moreover, Hirsch et al. (2011) (13) have demonstrated that treatment of adult and neonatal neutrophils with LPS and 1,25-vit D_3 increased VDR expression in adult cells but had no significant effect on neonatal neutrophils. The treatment also enhanced 5-lipoxygenase (5-LOX), diminished Cyclooxygenase-2 (COX-2) gene expression and altered cytokine production by decreasing significantly macrophage inflammatory protein-1β (MIP-1β) and vascular endothelial growth factor (VEGF) and reducing Interleukin-8 (IL-8). Furthermore, Vitamin D did not affect hydrogen peroxide (H_2O_2) production in adult or in neonatal neutrophils.

In addition, activation of VDR signaling pathways inhibited dendritic cells maturation, cytokine production such as IL-12 and IL-23, which are responsible for driven the immune response to a Th1 and Th17 pattern, respectively and increased IL-10 and MIP-3α production, a chemokine implied in the recruitment of T regulatory (Tregs) cells expressing trafficking chemokine receptors (CCR-4) (8). Expression of Th1 cytokines were also inhibited by Vitamin D *in vitro* while expression of Th2 cytokines were increased, driving the adaptative immune response to an anti-inflammatory profile (14,15).

Given the variety of vitamin D functions, its deficiency has been associated with several diseases such as bone diseases, cancer, diabetes mellitus, autoimmune and infectious diseases (16–20). Among the infectious diseases, there are those caused by *S. aureus,* a Gram-positive bacterium considered both human commensal and responsible for a high range of

pathologies, including since superficial skin infections to invasive diseases such as osteoarticular infections, endocarditis, bacteremia and sepsis (21,22). *S. aureus* infections have become relevant to human population due to the increased prevalence of antibiotic resistant strains after uncontrolled self-medication (23), thus hampering treatment and contributing to the search for alternative methods to combat this pathogen. Some studies related the deficiency of Vitamin D with *S. aureus* infections, demonstrating that Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) infected patients had lower levels of vitamin D in comparison to those with non-MRSA infection, although the authors did not assume if the deficiency is a result of the infection or it could contribute to the risk of MRSA infection (24). Moreover, Wang et al. (2015) (25) described that children with deficiency or insufficiency of vitamin D were at high risk of recurrent skin and soft tissues infection with *S. aureus*.

Despite the innumerous virulence factors, innate immune system plays a major role against *S. aureus* infections through response mediated by pattern recognition receptors (PRRs), reactive oxygen species (ROS), cytokines and antimicrobial peptides production, and the response of phagocytic cells such as macrophages and neutrophils (26). In addition to intracellular mechanisms such as phagocytosis, phagocytic cells have the ability to combat this pathogen extracellularly by releasing Extracellular Traps (ETs), a structure also called NETs when released by neutrophils (27).

Facing the action of vitamin D upon the immune system and the possible benefits combating infections, it became interesting to analyze the role of vitamin D in improving microbicidal mechanisms of human neutrophils against *S. aureus*. In this manner, the aims of this study were to evaluate the effect of Vitamin D on human neutrophils against different

strains of *S. aureus* by evaluating intra and extracellular effector mechanisms of the cells, therefore possibly contributing to fight infections, especially those of difficult treatment.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

- **Casuistics**

Neutrophils were obtained from 40mL of peripheral blood after venipuncture of healthy volunteers, between male and female ranging from 21 to 43 years old without vitamin D supplementation. All subjects were asked to sign a consent form and were informed of the research goals and those who have taken, in the past 30 days, any type of anti-inflammatory, antibiotic or who have reported fever were excluded. The study was conducted according to the principles expressed in the Declaration of Helsinki and was approved by the Research Ethics Committee of Medical School of Botucatu, UNESP – São Paulo State University (CAAE: 65645517.6.0000.5411; protocol: 020537/2017). The subjects were also evaluated for serum 25(OH)D_3 levels, considering levels below 20ng/mL as deficiency/insufficiency and above as sufficiency, measured by Vitalis Laboratório de Análises Clínicas, Botucatu, SP, Brazil.

- **Neutrophil isolation**

After peripheral blood collection in vacutainer tubes containing heparin, neutrophils were isolated by a density gradient centrifugation (Histopaque® 1119g/mL and Histopaque® 1083g/mL - Sigma-Aldrich - St. Louis, Missouri, USA) at 405g (1500rpm) for 30 minutes (room temperature). Erythrocytes were lised with a hypotonic solution (NaCl 0.1%) and neutrophil

viability was assessed with trypan blue dye exclusion (95% viability). Cell cultures were then resuspended in RPMI 1640 medium supplemented with 10% of calf serum (Cultilab – Campinas, São Paulo, BRA and Sigma Aldrich, respectively) and adjusted for $2x10^6$ cells/mL before all procedures.

- **Vitamin D treatment**

Isolated neutrophils, as previously described, were treated with two concentrations of the active form of Vitamin D: 1nmol/L and 50nmol/L (Paricalcitol – Zemplar®, Abbott – Chicago, Ilinóis, USA) for 30 minutes before bacterial challenge. As control group, neutrophils were incubated without Vitamin D.

- **Bacterial strains and culture conditions**

Two strains of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) were used during the experiments: *Staphylococcus aureus subsp. aureus* (ATCC® 43300-MINI-PACK™), a methicillin resistant strain (MRSA) and non-toxin producer (TOX-); and *S. aureus* H2386-06, isolated from hemoculture and a high biofilm producer. Strains were cultivated in brain heart infusion agar (BD - Franklin Lakes, New Jersey, USA) and incubated at 37°C for 24 hours. Isolated colonies were settled into brain heart broth and incubated in the same conditions. Bacteria were then collected by centrifugation, washed and resuspended in saline solution (0.9%) at a concentration of approximately 10^7 CFU/mL obtained after adjustment to OD_{520} of 0.2, comparison with 0.5 McFarland Standard and observation of bacterial colony forming units

(CFU) after serial dilution. Bacterial cultures were adjusted for a multiplicity of infection (MOI) of 10 (1:10 cell/bacteria ratio).

- **Phagocytosis of *S. aureus***

In attempt to analyze phagocytosis rate of *S. aureus* by neutrophils, FITC-labeled *S. aureus* strains were incubated for two hours at a MOI of 10 with $2x10^6$ cells/mL neutrophils previously treated with Vitamin D. FITC-labeled bacteria were prepared by incubating approximately $2x10^7$ CFU/mL bacteria with FITC (1:1000 in phosphate-buffered saline - PBS) in a shaker for 30 minutes at 37ºC in the dark. Bacteria were then washed with PBS and resuspended in PBS to a final volume of 1mL. After challenge, supernatants were collected, centrifugated and neutrophils were initially stained with APC-Cy7.7 anti CD-16 antibody (BioLegend - San Diego, Califórnia, USA) to stablish the analysis gate prior to culture fixation with Isoton + 2% paraformaldehyde (PFA). To distinguish intra and extracellular bacteria, 0.5% trypan blue was used to quench fluorescence for 10 minutes, in the dark with 75rpm. Phagocytosis rate was determined using flow cytometry FACSCanto II model with the FACSDiva software and FLOWJo software, from Microbiology and Immunology Department of the Botucatu Biosciences Institute, UNESP. The standard acquisition was set to 5.000 events and neutrophils were gated based in size (Forward-Scattered – FSC), granularity (Side-Scattered – SSC) and fluorescence parameters.

- **Killing assay**

Neutrophil cultures (2x10^6 cells/mL) previously treated or not with Vitamin D were challenged with *S. aureus* (both strains) at a MOI of 10 for 2 hours in 5% of CO_2 at 37°C. As a control, bacterial cultures were settled at 96-well bottom plate at the same conditions. After incubation, cocultures were collected and wells were washed with cold distilled water in a serial dilution to a final volume of 500µL in attempt to lyse neutrophils. Finally, 100µL of the serial dilution, both experimental and control cultures, were plated to Petri dishes containing BHI agar in quadruplicates and incubated at 37ºC. Colony forming units (CFUs) were counted after 24 hours and bactericidal activity was calculated by the following formula:

% bactericidal activity = [1- (experimental cultures CFU mean / control cultures mean)] x100

- **Hydrogen Peroxide Production (H_2O_2)**

After treatment of neutrophils with Vitamin D and challenge with *S. aureus* strains for two hours, the 96-well bottom plate was centrifugated at 405g (1500rpm) for ten minutes and supernatants were removed. 100µL of phenol red solution (140mM of NaCl; 10mM phosphate buffer pH 7; 5.5mM dextrose; 0,56mM phenol red; 0.01mg/mL horseradish peroxidase type II (Sigma Aldrich)) were added to each well, both experimental cultures, blank and standard curve. After one hour of incubation at 37°C in 5% of CO_2, 10µL of NaOH 1N was added to interrupt the reaction. Absorbance was read at a spectrophotometry with 620nm filter and results were expressed in nanomoles comparing to a standard curve for each assay (8 to 0.25 nM of H_2O_2).

- **Nitric Oxide Production (NO)**

Nitric oxide (NO) production was measured through nitrite production (NO^{-2}) by Griess method (28). Supernatants collected from neutrophils treated with Vitamin D and challenged with *S. aureus* were settled in a 96-well bottom plate (100µL) with 100µL of Griess solution (1% sulfanilamide (Sigma–Aldrich), diluted in 5% of H3PO4, and 0.1% N-(1 Naphthyl) ethyl-enediamine (NEED – Sigma–Aldrich). After 30 minutes of incubation at room temperature in the dark, NO production was determined by absorbance measurement in a spectrophotometry with 540nm filter and results were expressed in micromoles comparing to a standard curve for each assay (200 to 1.5 mM of $NaNO_2$).

- **Immunofluorescence for Neutrophil Extracellular Traps (NETs) visualization**

Isolated neutrophils from healthy volunteers were adhered on coverslips treated with Poly-L-Lysine 0, 01% (Sigma-Aldrich) in 24-well bottom plates for 2 hours. After adherence, cells were treated or not with Vitamin D and challenged with both strains of *S. aureus* for two hours at 37°C in 5% of CO_2. Some cultures were treated with PMA (Sigma Aldrich), as a positive control. Cocultures were then fixed with PBS+BSA (bovine serum albumin) +PFA 2% and incubated with PBS+BSA 2% (nonspecific binding block) for 30 minutes. Anti-neutrophil elastase (Calbiochem – Merck Millipore - Burlington, Massachusetts, USA) and anti-histone H1 (Merck Millipore) primary antibodies were added to the coverslips for 1 hour a 37ºC. Cultures were washed for 3 times with PBS and incubated with anti-rabbit-FITC (Millipore) and anti-mouse-Texas red (Calbiochem – Merck Millipore) secondary antibodies for elastase and histone visualization. Slides were mounted with mounting medium for fluorescence with DAPI (Vectashield-Vector Labs, Burlingame, California, USA). Confocal images were taken in a Leica

TCS SP8 Confocal Microscope (Leica Microsystems), from Confocal Microscopy Laboratory of UNIPEX - Experimental Research Unity, Sector 5, Medical School of Botucatu, Unesp.

- **Neutrophil Extracellular Traps (NETs) by scanning electron microscopy**

Neutrophils cultures ($2x10^6$ cells/mL) underwent a 2 hours period of adherence on coverslips treated with Poly-L-Lysine 0, 01% (Sigma-Aldrich) in 24-well bottom plates before treatment with Vitamin D and bacterial challenge (MOI of 10) or activation with PMA. Some cultures were treated with DNAse (100U/mL– Thermo Fisher Scientific - Waltham, Massachusetts, USA) as a negative control. After 2 hours of challenge, supernatants were removed, and cultures were fixed with 2.5% of glutaraldehyde for scanning electron microscopy analysis at CME (Electron Microscopy Center – Institute of Bioscience — UNESP— Botucatu), as previously described (29).

- **Neutrophil Extracellular Traps (NETs) quantification**

Supernatants of neutrophils cultures treated with Vitamin D and challenged with *S. aureus* were collected for NETs quantification by Quant-iT™ PicoGreen® kit (Invitrogen - Carlsbad, Califórnia, USA) according to the manufacturer's instructions and described previously (30). Some cultures were treated with PMA or DNAse, as positive and negative controls respectively. Briefly, an anti-elastase (15µg/mL) antibody was used to coat a 96-well flat-bottom plate overnight at 4ºC. Supernatants were then settled to the plate and the extracellular DNA bounded to elastase, a NET constituent, was measured with Quant-iT™

PicoGreen® kit. Samples were analyzed by fluorescence intensity and concentrations were calculated comparing to a standard curve.

- **Statistical analysis**

All data were tested for normality with Shapiro-Wilk normality test. Phagocytosis rate and bactericidal activity were analyzed by Repeated Measures ANOVA followed by Tukey's post-hoc test. NETs quantification, H_2O_2 and NO productions were analyzed with Friedman's test followed by post-hoc Dunn's test. Vitamin D serum levels were analyzed by Unpaired t test. All data were analyzed using GraphPad Prism 5.01 Software (Graphpad Software Inc., CA, USA) with a significance p value set at $p<0.05$. The relation between vitamin D serum levels and the other variables included in this study was analyzed by multiple correspondence analysis, where the spatial proximity of categories represents the association among them. The software used in this analysis was IBM SPSS 25 and the significance p was set as $p\leq0.05$.

RESULTS

- **Phagocytosis rate of *S. aureus* strains**

To quantify phagocytosis rate and to evaluate the effect of vitamin D on this mechanism, FITC-labeled *S. aureus* were incubated with neutrophils treated or not with Vitamin D and fluorescence measured by flow cytometry. Neutrophils were gated based in size and granularity and using CD16 parameters. To distinguish intra and extracellular bacteria, trypan blue was added to the cultures in attempt to quench fluorescence of extracellular

bacteria. **Figure 1** demonstrates that 50nmol/L of vitamin D was able to increase the phagocytosis in cocultures challenged with H2386-06 strain in comparison to cultures treated with 1nmol/L of vitamin D, observed by the median fluorescence intensity (MFI) (p= 0.0289) **(fig. 1B)**, while this effect was not detected in cocultures challenged with ATCC43300 strain and treated with vitamin D **(fig. 1A).** In addition, MFI of neutrophils challenged with H2386-06 was slight higher in comparison to cultures challenged with ATCC43300. **Figures 1 C and D** show histograms of a representative experiment for FITC labeled *S. aureus* ATCC43300 and H2386-06, respectively and quenching with Trypan Blue.

- **Vitamin D action on neutrophil bactericidal activity against *S. aureus***

In attempt to verify if vitamin D could also interfere on neutrophil killing of *S. aureus*, neutrophils cultures were treated with Vitamin D and challenged with both strains of *S. aureus* (MOI=10) for 2 hours. Cells treated with lower dose of vitamin D and challenged with ATCC43300 strain showed a decrease in bacterial activity of cells **(fig. 2A)**. However, vitamin D (50nmol/L) was able to induce a higher bactericidal activity of PMNs against ATCC43300 strain (p= 0.0312) when compared to the lower dose **(fig.2A)**. There were no significant differences between both Vitamin D concentrations used in cultures challenged with H2386-06 strain **(fig. 2B)**. It was also observed a slight decrease in bactericidal activity from control cultures (PMN+ H2386-06) and cocultures treated with 50nmol/L of vitamin D **(fig. 2B)**.

- **Hydrogen peroxide (H_2O_2) Production**

To analyze H_2O_2 production, neutrophils were incubated with both concentrations of Vitamin D and *S. aureus* strains for 2 hours, as previously described. It was observed that vitamin D alone was not able to induce H_2O_2 production by neutrophils **(fig. 3A)**. However, ATCC43300 strain was able to induce a higher H_2O_2 production in comparison to non-treated cells or those treated with Vitamin D alone ($p<0.0001$) **(fig. 3A)**. Besides, *S. aureus* strain H2386-06 did not induce H_2O_2 production in comparison to cells treated with vitamin D or non-treated ($p=0.5408$) **(fig. 3B)**. Although there was no statistical significance, cultures treated with 1nmol/L and challenged with ATCC43300 had a slight increase in H_2O_2 production in comparison to cultures treated with 50nmol/L and challenged with ATCC43300 **(fig. 3A)**, showing that Vitamin D might modulate this production by neutrophils against *S. aureus*, especially in less virulent bacteria (ATCC43300).

- **Nitric Oxide (NO) Production**

As another defense mechanism, NO production was analyzed after neutrophils treatment with Vitamin D for 30 minutes and challenge with *S. aureus* strains for 2 hours. Our data demonstrated that vitamin D treatment alone was not able to induce NO production by neutrophils. Neutrophils challenge with ATCC43300**(fig. 4A)** or H2386-06 **(fig. 4B)** increased significantly NO production in comparison to non-treated cells and neutrophils treated with both Vitamin D concentrations without challenge, demonstrating that Vitamin D might not participate of nitric oxide production by neutrophils ($p<0.0001$).

- **Visualization of NETs components by Immunofluorescence**

In attempt to verify extracellular mechanisms of neutrophils treated with vitamin D and challenged with both strains of *S. aureus* for 2 hours as previously described. Cultures were then fixed and incubated with anti-elastase and anti-histone primary antibodies followed by anti-rabbit-FITC and anti-mouse-Texas red secondary antibodies for elastase and histone visualization, respectively. DNA was stained with DAPI, demonstrating then NETs main components. Overlay of the three images showed the colocalization of the stains, confirming NETs presence in our images. It was not identified NETs structures on non-treated neutrophils cultures **(fig. 5 I.)**, whereas cultures activated with PMA demonstrated NETs formation, as expected, since PMA was used as a positive control **(fig. 5 II.)**. Both strains were able to induce NETs release in the presence or absence of vitamin D (both doses), which was observed after overlay of the three stains by confocal microscopy **(fig. 6 I. to VI.)**.

- **NETs identification by scanning electron microscopy**

To corroborate immunofluorescence findings, scanning electron microscopy was used to identify NETs release *in vitro* after neutrophils treatment with Vitamin D and challenge with *S. aureus* strains **(Figs. 7 and 9 respectively)**. Neutrophils treated with Vitamin D and challenged with both strains of *S. aureus* were able to induce NETs release in attempt to entrap the bacteria. Treatment of cultures with Vitamin D seemed not to alter NETs release in both concentrations. Incubation with DNAse and challenge with both *S. aureus* strains showed NETs degradation **(Figs. 8 and 10, respectively)**, confirming that the main component of these structures was DNA.

- **NETs quantification**

To confirm if there were differences in NETs release after neutrophil treatment with Vitamin D and challenge with *S. aureus* strains, NETs quantification was done by analyzing elastase-DNA complex, two of NETs main components. PMA was used as a positive control of NETs release (data not shown). Cultures treated with DNAse demonstrated, as expected, a decrease in NETs levels. *S. aureus* ATCC43300 strain showed increased NETs concentration, which was not influenced by any dose of vitamin D (p=0.0086). Whereas *S. aureus* H2386-06 strain exhibited similar levels of NETs in comparison to ATCC43300, with a slight decrease when cultures were treated with both doses of vitamin D (1nmol/L and 50nmol/L) (p=0.2968) **(fig. 11)**, showing a difference response in a dependence of the strain.

- **Serum 25(OH)D_3 levels and analysis of perceptual map from multiple correspondence**

In attempt to verify vitamin D status of the studied group, the volunteers underwent measurement of 25(OH)D_3 levels. Between all subjects evaluated, we observed 57% of sufficiency (29.30 ± 3.093) and 43% of deficiency (16.55 ± 1.029) (p=0.0050) **(fig 12)**. Although our data have demonstrated that *in vitro* supplementation of neutrophils with vitamin D did not have a statistical association with NETs release, **figure 13** shows that subjects classified as sufficient levels of vitamin D (>20ng/mL) were correlated with higher levels of NETs release in comparison to those classified as deficient/insufficient (<20ng/mL), that were correlated with lower levels of NETs release. In addition, sufficient vitamin D donors might be correlated with intermediate rates of phagocytosis (MFI rates), while deficient/insufficient donors were correlated with lower phagocytosis rate Corroborating our *in vitro* data, both strains used in this study appeared to have different interactions with the host cells, once it was observed

opposite response mainly through phagocytosis rate, bactericidal activity levels, NO and H_2O_2 production. *S. aureus* ATCC43300 were correlated with intermediate phagocytosis rate, higher levels of H_2O_2 and NO and higher bactericidal activity, while *S. aureus* H2386-06 were correlated with higher phagocytosis rate and lower levels of H_2O_2 and NO and bactericidal activity **(fig 13)**.

These data were analyzed by a perceptual map from multiple correspondence, where the spacial proximity among the categories included in the study represents an association between them.

DISCUSSION

Several works have reported vitamin D action upon both innate and adaptative immune system, especially in infectious diseases (2,31–33). In relation to *S. aureus*, Udompataikul et al. (2015) (34) described that an oral supplementation with Vitamin D reduced *S. aureus* skin colonization in atopic dermatitis patients, leading to an improvement in clinical outcomes. In contrast, Björkhem-Bergman et al. (2018) (35) demonstrated that supplementation with Vitamin D for 12 months did not affect MRSA carriage, as also seen by Slow et al. (2014) (36), which did not find a reduction in *S. aureus* nasal carriage in persistent infected patients, remaining controversial Vitamin D role during *S. aureus* infection.

In this study, we showed that higher dose of Vitamin D increased the phagocytosis rate of neutrophils challenged with H2386-06 strain when MFI was analyzed. Besides, the phagocytosis MFI were higher in cocultures challenged with H2386-06 strain, demonstrating differences between two strains in the interaction with neutrophils with elevated phagocytosis rate of the more virulent strain (H2386-06). Nouari et al. (2016) (37) identified

that macrophage treated with vitamin D and challenged with *Pseudomonas aeruginosa (P. aeruginosa)* had an increase in phagocytosis rate and bactericidal activity, corroborating our results that vitamin D could modulate these mechanisms. Shymanskyy et al. (2016) (38) also demonstrated that rats treated with prednisolone had an impaired immune response of neutrophils and monocytes, with decreased phagocytosis activity. When rats were treated with prednisolone and Vitamin D concomitant, the phagocytosis rate was partially restored, demonstrating that Vitamin D could reestablish the immune response.

The effect of vitamin D upon bactericidal activity of neutrophils against *S. aureus* showed a restoration of *S. aureus* ATCC43300 killing by neutrophils at concentration of 50nmol/L in comparison to the lower dose (1nmol/L). Concentration of 1nmol/L seemed to have no effect on bactericidal activity when neutrophils were challenged with *S. aureus* ATCC43300. Similarly, vitamin D treatment of cultures challenged with *S. aureus* H2386-06 strain seemed to induce no changes in bactericidal activity compared to control. van der Does et al. (2014) (39) demonstrated that there was an increase in *S. aureus* killing by dendritic cells that were differentiated in the presence of Vitamin D and phenylbutyrate, conferring to these cells an enhancement in antimicrobial properties, mainly through enhancement of cathelicidin and ROS. Another study identified that the treatment of keratinocytes and monocyte with the active form of vitamin D led to an induction of cathelicidin expression, increasing the microbicidal activity against *S. aureus* (10). Moreover, Subramanian et al. (2017) (40) described that treatment of human neutrophils with Vitamin D enhanced *Streptococcus pneumoniae* killing by expression of cathelicidin LL-37 and defensins such as HNP1–3 (Human neutrophil alpha-defensins 3).

In relation to H_2O_2 production, we demonstrated that although there were no statistical significances, vitamin D might modulate neutrophils response against *S. aureus*

ATCC43300. Vitamin D treatment induced a slight increase in H_2O_2 production by neutrophils after challenge with this strain and treatment with a dose of 1nmol/L, whereas 50nmol/L induced similar levels to cultures only challenged with ATCC43300. ATCC43300 was able to induce high amounts of H_2O_2, in contrast to H2386-06 strain, which did not influence this production. Studies demonstrated that vitamin D role during ROS production and oxidative stress remains controversial. Onwuneme et al. (2016) (41) pretreated neutrophils and monocytes from adults, term neonates and preterm infants with Vitamin D and incubated with LPS. The authors showed that Vitamin D increased significantly reactive oxygen intermediates production by neutrophils in term neonates and preterm children and in term neonatal monocytes. Shymanskyy et al. (2016) (38) also demonstrated that peripheral blood mononuclear cells from rats treated with prednisolone had an increase in ROS production in comparison to control group. It was also observed an antagonist effect of vitamin D in ROS production induced by prednisolone when rats were treated concomitantly with prednisolone and vitamin D. The authors also showed that ROS production was unaltered in bone marrow cells after treatment with prednisolone and this production was slightly enhanced in the group treated with prednisolone and vitamin D. In contrast, Fels et al. (1987) (42) described that treatment with Vitamin D did not enhance H_2O_2 production after PMA activation of alveolar macrophages from normal and sarcoid patients. Corroborating with that, Hirsch et al. (2011) (13) showed that H_2O_2 levels were not regulated by Vitamin D treatment of adult and neonatal neutrophils after activation with PMA.

Our data of NO production demonstrated that both strains were able to increase NO levels in comparison to non-treated neutrophils or treated with the two concentrations of Vitamin D, whereas treatment with Vitamin D did not change NO levels, demonstrating that NO might not be modulated by Vitamin D. Corroborating with our results of NO production

induced by the bacteria, a previous study observed the induction in NO production by *S. aureus* (43). Increasing in NO levels was already demonstrated by Siswanto et al. (2015) (44) after stimulation of human monocytes with *Mycobacterium tuberculosis (M. tuberculosis*) DNA. Cells stimulated also showed an increase in VDR mRNA expression and enhancement of cathelicidin. Another study showed that a cell line (HL-60) with macrophagic characteristics was able to produce NO in response to the active form of vitamin D, inducing suppression of *M. tuberculosis* growth, through a mechanism dependent on NO (45). In contrast, Xu et al. (2015) (46) showed that mice pretreated with Vitamin D had renal NO production inhibited in LPS-induced acute kidney injury, demonstrating that Vitamin D treatment could attenuate oxidative stress injury and corroborating the fact that this vitamin could modulate NO production.

When analyzing neutrophil extracellular responses, we demonstrated that neutrophils challenged with both strains of *S. aureus* were able to release NETs. Scanning electron microscopy demonstrated that *S. aureus* induced NETs release in the presence or absence of Vitamin D. Our results of NETs quantification demonstrated that although there was no statistical significance, vitamin D appeared to induce a biological decrease in NETs levels when neutrophils were challenged with *S. aureus* H2386-06 strain, even though it seemed not to modulate NETs release. Brinkmann et al. (2004) (27) described for the first time that this bacterium was able to induce NETs formation by human neutrophils, and that NETs was involved in the killing of the bacteria. Fuchs et al. (2007) (47) have identified that NETs release in response to PMA and *S. aureus* implied neutrophil death. However, in 2010, Pilsczek et al. (48) demonstrated that this defense mechanism not necessarily requires cell death. Our data corroborates previous studies involving NETs formation after *S. aureus* challenge (27,49). Immunofluorescence also demonstrated NETs formation by analysing of the main

components, such as elastase, histone and DNA, which was also showed in other studies (50,51). Since *S. aureus* have a variety of virulence factors, escaping mechanisms from NETs have already been described, making it difficult to host response during the infectious process (52,53).

One virulence factor is Protein A, a protein involved in phagocytosis evasion and associated with NETs release. Hoppenbrouwers et al. (2018) (51) suggested that beyond evading phagocytosis, Protein A from *S. aureus* could elicit NETs formation in order to eliminate neutrophils by inducing NETosis and from which bacteria could escape by producing nucleases. Some drugs already had your action related to ETs release. Antibiotics such as Fosfomycin, immunosuppressive drugs such as Cyclosporine A, anti-inflammatory drugs and vitamin supplements were described as potential inductors or reducers of NETosis process (49,54,55). Until now, there are few studies relating NETs and Vitamin D. Handono et al. (2014) (56) described that neutrophils from patients with systemic lupus erythematosus and hypovitamin D, treated with vitamin D, reduced elastase externalization during NETs release, which could cause a decrease in endothelial damage by reducing NETs activity. In contrast, Agraz-Cibrian et al. (2019) (57) demonstrated that the treatment of neutrophils with the active form of vitamin D induced the release of structures similar to NETs, in addition to increased mRNA expression of TLR7 and IFN-α and products associated with NETs proteins such as elastase and PAD4 (protein arginine deiminase 4), correlating the role of vitamin D with the possibility of avoiding the spread of pathogens. These studies showed a possible important involvement of Vitamin D in NETs mechanism.

Our results also demonstrated that among all subjects included in the study, there was 43% of deficiency. A study conducted in Brazil showed a prevalence of 77.4% of individuals

with hypovitaminosis, considering levels <30ng/mL as hypovitaminosis (58). Another study demonstrated that the prevalence of vitamin D deficiency was 46% in females and 30% in males, with the reference value for vitamin D deficiency set as <20 ng/mL (59). This prevalence may diverge due to the variation of the reference values to classify the status of the individuals. According to Pludowski et al. 2013 (60), the Central Europe recommends that serum levels below than 20ng/mL are considered deficient and from 30 to 50ng/mL adequate levels of vitamin D, whereas, the Brazilian Society of Endocrinology and Metabolism (SBEM) reports that serum levels greater than 30ng/mL are considered adequate for bone benefit, but age, obesity, osteoporosis, fractures, and others may influence this result (61).

In our data, we used a cut-off value of 20ng/mL, which was indicated in the evaluation, being able to identify by perceptual map from multiple correspondence analysis, the spacial distance among the variables such as vitamin D serum levels, bacterial strain, NETs release, phagocytosis rates, bactericidal activity, H_2O_2 and NO productions. Our results showed the spatial proximity between sufficient vitamin D serum levels, higher NETs release and intermediate phagocytosis rate, while deficient/insufficient vitamin D serum levels were correlated with lower NETs release and lower phagocytosis rate. The spatial distance among *S. aureus* ATCC43300 was correlated with intermediate phagocytosis rate, higher levels of H_2O_2 and NO and higher bactericidal activity, while the analyses of *S. aureus* H2386-06 identified a correlation with higher phagocytosis rate and lower levels of H_2O_2, NO and bactericidal activity, that confirm our results.

Evaluating our results about phagocytosis rate, bactericidal activity, H_2O_2 production and NETs release, it seemed that vitamin D could modulate the response to each bacterial strain, once it was observed different pattern of response to each bacterium. However, other

effector mechanisms such as cathelicidin production, the possible receptors involved in each bacterial recognition, and the specific escape mechanisms of each bacteria might be studied to better understand our results. This bacterium has a powerful set of virulence factors that contribute to the escape of host immune response. Among the virulence factors are toxins (enterotoxins, α and β toxins), factors associated with adhesion to host cells (fibronectin binding proteins, elastin binding proteins, extracellular adhesion proteins), as well as proteins and enzymes (coagulases, hydrolases, proteases) that confer the ability to interfere with host response by resistance to oxidative stress, neutrophil lysis, inactivation of the complement system, degradation of immunoglobulins, resistance to cathelicidin, alteration in phagocytosis rate, among others (62). In addition, *S. aureus* has the ability to produce biofilm, an important factor associated with the severity of the diseases caused by this bacterium. Biofilm presence is generally associated with chronic and persistent infections, due to the capacity of adherence and persistence in host tissues or medical implants, resisting to many types of treatments and the immune response (63).

In conclusion, our data demonstrated that Vitamin D could modulate the response of human neutrophils to *S. aureus*, especially by increasing phagocytic rates and bactericidal activity in a dependence of the strain. Further studies are needed to better understand the complex capacity of Vitamin D on modulation of the innate immune response.

REFERENCES

1. Hoel DG, Berwick M, de Gruijl FR, Holick MF. The risks and benefits of sun exposure 2016. Dermatoendocrinol. 2016 Jan;8(1):e1248325.
2. Mut Surmeli D, Surmeli ZG, Bahsi R, Turgut T, Selvi Oztorun H, Atmis V, et al. Vitamin D deficiency and risk of Helicobacter pylori infection in older adults: a cross-sectional study. Aging Clin Exp Res [Internet]. 2018 Sep 28 [cited 2018 Nov 1]; Available from: http://link.springer.com/10.1007/s40520-018-1039-1
3. Norman AW. From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health. Am J Clin Nutr. 2008 Aug 1;88(2):491S-499S.
4. Christakos S, Dhawan P, Verstuyf A, Verlinden L, Carmeliet G. Vitamin D: Metabolism, Molecular Mechanism of Action, and Pleiotropic Effects. Physiol Rev. 2016 Jan;96(1):365–408.
5. Hossein-nezhad A, Spira A, Holick MF. Influence of Vitamin D Status and Vitamin D3 Supplementation on Genome Wide Expression of White Blood Cells: A Randomized Double-Blind Clinical Trial. PLoS ONE. 2013 Mar 20;8(3):e58725.
6. Wolpowitz D, Gilchrest BA. The vitamin D questions: How much do you need and how should you get it? J Am Acad Dermatol. 2006 Feb;54(2):301–17.
7. Veldurthy V, Wei R, Oz L, Dhawan P, Jeon YH, Christakos S. Vitamin D, calcium homeostasis and aging. Bone Res [Internet]. 2016 Dec [cited 2018 Nov 1];4: 16041. eCollection 2016. Available from: http://www.nature.com/articles/boneres201641
8. Baeke F, Takiishi T, Korf H, Gysemans C, Mathieu C. Vitamin D: modulator of the immune system. Curr Opin Pharmacol. 2010 Aug;10(4):482–96.
9. Liu PT. Toll-Like Receptor Triggering of a Vitamin D-Mediated Human Antimicrobial Response. Science. 2006 Mar 24;311(5768):1770–3.
10. Schauber J, Dorschner RA, Yamasaki K, Brouha B, Gallo RL. Control of the innate epithelial antimicrobial response is cell-type specific and dependent on relevant microenvironmental stimuli. Immunology. 2006 Jun 6; 118(4):509-19.
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 Feb;36(2):361–70.
12. Vidyarani M, Selvaraj P, Jawahar MS, Narayanan PR. 1, 25 Dihydroxyvitamin D3 modulated cytokine response in pulmonary tuberculosis. Cytokine. 2007 Nov;40(2):128–34.
13. Hirsch D, Archer FE, Joshi-Kale M, Vetrano AM, Weinberger B. Decreased Anti-Inflammatory Responses to Vitamin D in Neonatal Neutrophils. Mediators Inflamm. 2011;2011: 598345, 1–7.
14. Boonstra A, Barrat FJ, Crain C, Heath VL, Savelkoul HFJ, O'Garra A. 1 ,25-Dihydroxyvitamin D3 Has a Direct Effect on Naive CD4+ T Cells to Enhance the Development of Th2 Cells. J Immunol. 2001 Nov 1;167(9):4974–80.
15. 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 [Internet]. 2014 Apr 21 [cited 2018 Nov 1];5: :151. Available from: http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2014.00151/abstract
16. Bhan A, Rao AD, Rao DS. Osteomalacia as a Result of Vitamin D Deficiency. Endocrinol Metab Clin North Am. 2010 Jun;39(2):321–31.
17. Grammatiki M, Rapti E, Karras S, Ajjan RA, Kotsa K. Vitamin D and diabetes mellitus: Causal or casual association? Rev Endocr Metab Disord. 2017 Jun;18(2):227–41.
18. Gupta D, Vashi PG, Trukova K, Lis CG, Lammersfeld CA. Prevalence of serum vitamin D deficiency and insufficiency in cancer: Review of the epidemiological literature. Exp Ther Med. 2011;2(2):181–93.
19. Dall'Ara F, Cutolo M, Andreoli L, Tincani A, Paolino S. Vitamin D and systemic lupus erythematous: a review of immunological and clinical aspects. Clin Exp Rheumatol. 2018 Feb;36(1):153–62.

20. Mansueto P, Seidita A, Vitale G, Gangemi S, Iaria C, Cascio A. Vitamin D Deficiency in HIV Infection: Not Only a Bone Disorder. BioMed Res Int. 2015;2015: 735615, 1–18.
21. Tong SYC, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG. *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. Clin Microbiol Rev. 2015 Jul;28(3):603–61.
22. O'Keeffe KM, Wilk MM, Leech JM, Murphy AG, Laabei M, Monk IR, et al. Manipulation of Autophagy in Phagocytes Facilitates *Staphylococcus aureus* Bloodstream Infection. Infect Immun. 2015 Sep;83(9):3445–57.
23. Bennadi D. Self-medication: A current challenge. J Basic Clin Pharm. 2014;5(1):19-23.
24. Thomason J, Rentsch C, Stenehjem EA, Hidron AI, Rimland D. Association between vitamin D deficiency and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. Infection. 2015 Dec;43(6):715–22.
25. Wang JW, Hogan PG, Hunstad DA, Fritz SA. Vitamin D Sufficiency and *Staphylococcus Aureus* Infection in Children. Pediatr Infect Dis J. 2015 May;34(5):544–5.
26. Komatsuzawa H, Ouhara K, Yamada S, Fujiwara T, Sayama K, Hashimoto K, et al. Innate defences against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection. J Pathol. 2006 Jan;208(2):249–60.
27. Brinkmann V. Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. Science. 2004 Mar 5;303(5663):1532–5.
28. Bordon-Graciani AP, Dias-Melicio LA, Acorci-Valério MJ, Araujo JP, Soares AMV de C. High expression of human monocyte iNOS mRNA induced by *Paracoccidioides brasiliensis* is not associated with increase in NO production. Microbes Infect. 2012 Oct;14(12):1049–53.
29. Della Coletta AM, Bachiega TF, de Quaglia e Silva JC, Soares ÂMV de C, De Faveri J, Marques SA, et al. Neutrophil Extracellular Traps Identification in Tegumentary Lesions of Patients with Paracoccidioidomycosis and Different Patterns of NETs Generation *In Vitro*. PLoS Negl Trop Dis. 2015 Sep 1;9(9):e0004037.
30. Czaikoski PG, Mota JMSC, Nascimento DC, Sônego F, Castanheira FV e S, Melo PH, et al. Neutrophil Extracellular Traps Induce Organ Damage during Experimental and Clinical Sepsis. PLOS ONE. 2016 Feb 5;11(2):e0148142.
31. Gois P, Ferreira D, Olenski S, Seguro A. Vitamin D and Infectious Diseases: Simple Bystander or Contributing Factor? Nutrients. 2017 Jun 24;9(7): pii: E651.
32. Jiménez-Sousa MÁ, Martínez I, Medrano LM, Fernández-Rodríguez A, Resino S. Vitamin D in Human Immunodeficiency Virus Infection: Influence on Immunity and Disease. Front Immunol [Internet]. 2018 Mar 12 [cited 2018 Nov 1];9:458. Available from: http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.00458/full
33. Dai J, Liang Y, Li H, Zhou W, Wang B, Gong A, et al. Vitamin D enhances resistance to aspergillus fumigatus in mice via inhibition of excessive autophagy. Am J Transl Res. 2018;10(2):381–91.
34. Udompataikul M, Huajai S, Chalermchai T, Taweechotipatr M, Kamanamool N. The Effects of Oral Vitamin D Supplement on Atopic Dermatitis: A Clinical Trial with *Staphylococcus aureus* Colonization Determination. J Med Assoc Thai. 2015 Oct;98 Suppl 9:S23-30.
35. Björkhem-Bergman L, Missailidis C, Karlsson-Valik J, Tammelin A, Ekström L, Bottai M, et al. Vitamin D supplementation to persistent carriers of MRSA—a randomized and placebo-controlled clinical trial. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2018 Sep;37(9):1735–44. doi: 10.1007/s10096-018-3306-7.
36. Slow S, Priest PC, Chambers ST, Stewart AW, Jennings LC, Florkowski CM, et al. Effect of vitamin D3 supplementation on *Staphylococcus aureus* nasal carriage: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial in healthy adults. Clin Microbiol Infect. 2014 May;20(5):453–8.
37. Nouari W, Ysmail-Dahlouk L, Aribi M. Vitamin D3 enhances bactericidal activity of macrophage against *Pseudomonas aeruginosa.* Int Immunopharmacol. 2016 Jan;30:94–101.
38. Shymanskyy IO, Lisakovska OO, Mazanova AO, Riasniy VM, Veliky MM. Effects of vitamin D3 and vitamin E on prednisolone-induced alterations of phagocyte function. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2016 Apr;20(7):1379–83.

39. van der Does AM, Kenne E, Koppelaar E, Agerberth B, Lindbom L. Vitamin D_3 and phenylbutyrate promote development of a human dendritic cell subset displaying enhanced antimicrobial properties. J Leukoc Biol. 2014 Jun;95(6):883–91.
40. Subramanian K, Bergman P, Henriques-Normark B. Vitamin D Promotes Pneumococcal Killing and Modulates Inflammatory Responses in Primary Human Neutrophils. J Innate Immun. 2017;9(4):375–86.
41. Onwuneme C, Blanco A, O'Neill A, Watson B, Molloy EJ. Vitamin D enhances reactive oxygen intermediates production in phagocytic cells in term and preterm infants. Pediatr Res. 2016 Apr;79(4):654–61.
42. Fels AO, Nathan CF, Cohn ZA. Hydrogen peroxide release by alveolar macrophages from sarcoid patients and by alveolar macrophages from normals after exposure to recombinant interferons alpha A, beta, and gamma and 1,25-dihydroxyvitamin D3. J Clin Invest. 1987 Aug;80(2):381–6.
43. Santos SS, Brunialti MKC, Rigato O, Machado FR, Silva E, Salomao R. Generation of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species by Neutrophils and Monocytes From Septic Patients and Association With Outcomes. Shock. 2012 Jul;38(1):18–23.
44. Siswanto S, Zuhriyah L, Handono K, Fitri LE, Prawiro SR. *Mycobacterium tuberculosis* DNA Increases Vitamin D Receptor mRNA Expression and the Production of Nitric Oxide and Cathelicidin in Human Monocytes. Malays J Med Sci.2015 Jun;22(3):18–24.
45. Rockett KA, Brookes R, Udalova I, Vidal V, Hill AV, Kwiatkowski D. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 induces nitric oxide synthase and suppresses growth of *Mycobacterium tuberculosis* in a human macrophage-like cell line. Infect Immun. 1998 Nov;66(11):5314–21.
46. Xu S, Chen Y-H, Tan Z-X, Xie D-D, Zhang C, Xia M-Z, et al. Vitamin D3 pretreatment alleviates renal oxidative stress in lipopolysaccharide-induced acute kidney injury. J Steroid Biochem Mol Biol. 2015 Aug;152:133–41.
47. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. J Cell Biol. 2007 Jan 15;176(2):231–41.
48. Pilsczek FH, Salina D, Poon KKH, Fahey C, Yipp BG, Sibley CD, et al. A Novel Mechanism of Rapid Nuclear Neutrophil Extracellular Trap Formation in Response to *Staphylococcus aureus*. J Immunol. 2010 Dec 15;185(12):7413–25.
49. Shen F, Tang X, Cheng W, Wang Y, Wang C, Shi X, et al. Fosfomycin enhances phagocyte-mediated killing of *Staphylococcus aureus* by extracellular traps and reactive oxygen species. Sci Rep [Internet]. 2016 May [cited 2018 Nov 1];6:19262. Available from: http://www.nature.com/articles/srep19262
50. Wan T, Zhao Y, Fan F, Hu R, Jin X. Dexamethasone Inhibits *S. aureus*-Induced Neutrophil Extracellular Pathogen-Killing Mechanism, Possibly through Toll-Like Receptor Regulation. Front Immunol [Internet]. 2017 Feb 9 [cited 2018 Nov 1];8:60. Available from: http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2017.00060/full
51. Hoppenbrouwers T, Sultan AR, Abraham TE, Lemmens-den Toom NA, Hansenová Maňásková S, van Cappellen WA, et al. Staphylococcal Protein A Is a Key Factor in Neutrophil Extracellular Traps Formation. Front Immunol [Internet]. 2018 Feb 5 [cited 2018 Nov 1];9:165. Available from: http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.00165/full
52. Berends ETM, Horswill AR, Haste NM, Monestier M, Nizet V, von Köckritz-Blickwede M. Nuclease Expression by *Staphylococcus aureus* Facilitates Escape from Neutrophil Extracellular Traps. J Innate Immun. 2010;2(6):576–86.
53. Eisenbeis J, Saffarzadeh M, Peisker H, Jung P, Thewes N, Preissner KT, et al. The *Staphylococcus aureus* Extracellular Adherence Protein Eap Is a DNA Binding Protein Capable of Blocking Neutrophil Extracellular Trap Formation. Front Cell Infect Microbiol [Internet]. 2018 Jul 9 [cited 2018 Nov 1];8:235. Available from: https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2018.00235/full
54. Gupta AK, Giaglis S, Hasler P, Hahn S. Efficient Neutrophil Extracellular Trap Induction Requires Mobilization of Both Intracellular and Extracellular Calcium Pools and Is Modulated by Cyclosporine A. PLoS ONE. 2014 May 12;9(5):e97088.

55. Zawrotniak M, Kozik A, Rapala-Kozik M. Selected mucolytic, anti-inflammatory and cardiovascular drugs change the ability of neutrophils to form extracellular traps (NETs). Acta Biochim Pol. 2015;62(3):465–73.
56. Handono K, Sidarta YO, Pradana BA, Nugroho RA, Hartono IA, Kalim H, et al. Vitamin D prevents endothelial damage induced by increased neutrophil extracellular traps formation in patients with systemic lupus erythematosus. Acta Medica Indones. 2014 Jul;46(3):189–98.
57. Agraz-Cibrian JM, Giraldo DM, Urcuqui-Inchima S. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 induces formation of neutrophil extracellular trap-like structures and modulates the transcription of genes whose products are neutrophil extracellular trap-associated proteins: A pilot study. Steroids. 2019 Jan;141:14–22.
58. Unger MD, Cuppari L, Titan SM, Magalhães MCT, Sassaki AL, dos Reis LM, et al. Vitamin D status in a sunny country: Where has the sun gone? Clin Nutr. 2010 Dec;29(6):784–8.
59. Lu H-K, Zhang Z, Ke Y-H, He J-W, Fu W-Z, Zhang C-Q, et al. High Prevalence of Vitamin D Insufficiency in China: Relationship with the Levels of Parathyroid Hormone and Markers of Bone Turnover. PLoS ONE. 2012 Nov 8;7(11):e47264.
60. Płudowski P, Karczmarewicz E, Bayer M, Carter G, Chlebna-Sokół D, Czech-Kowalska J, et al. Practical guidelines for the supplementation of vitamin D and the treatment of deficits in Central Europe - recommended vitamin D intakes in the general population and groups at risk of vitamin D deficiency. Endokrynol Pol. 2013;64(4):319–27.
61. Maeda SS, Borba VZC, Camargo MBR, Silva DMW, Borges JLC, Bandeira F, et al. Recommendations of the Brazilian Society of Endocrinology and Metabology (SBEM) for the diagnosis and treatment of hypovitaminosis D. Arq Bras Endocrinol Metabol. 2014 Jul;58(5):411–33.
62. Zecconi A, Scali F. *Staphylococcus aureus* virulence factors in evasion from innate immune defenses in human and animal diseases. Immunol Lett. 2013 Feb;150(1–2):12–22.
63. Lister JL, Horswill AR. *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal. Front Cell Infect Microbiol [Internet]. 2014 Dec 23 [cited 2019 Jan 12];4:178. Available from: http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2014.00178/abstract

FIGURES

- **Figure 1**

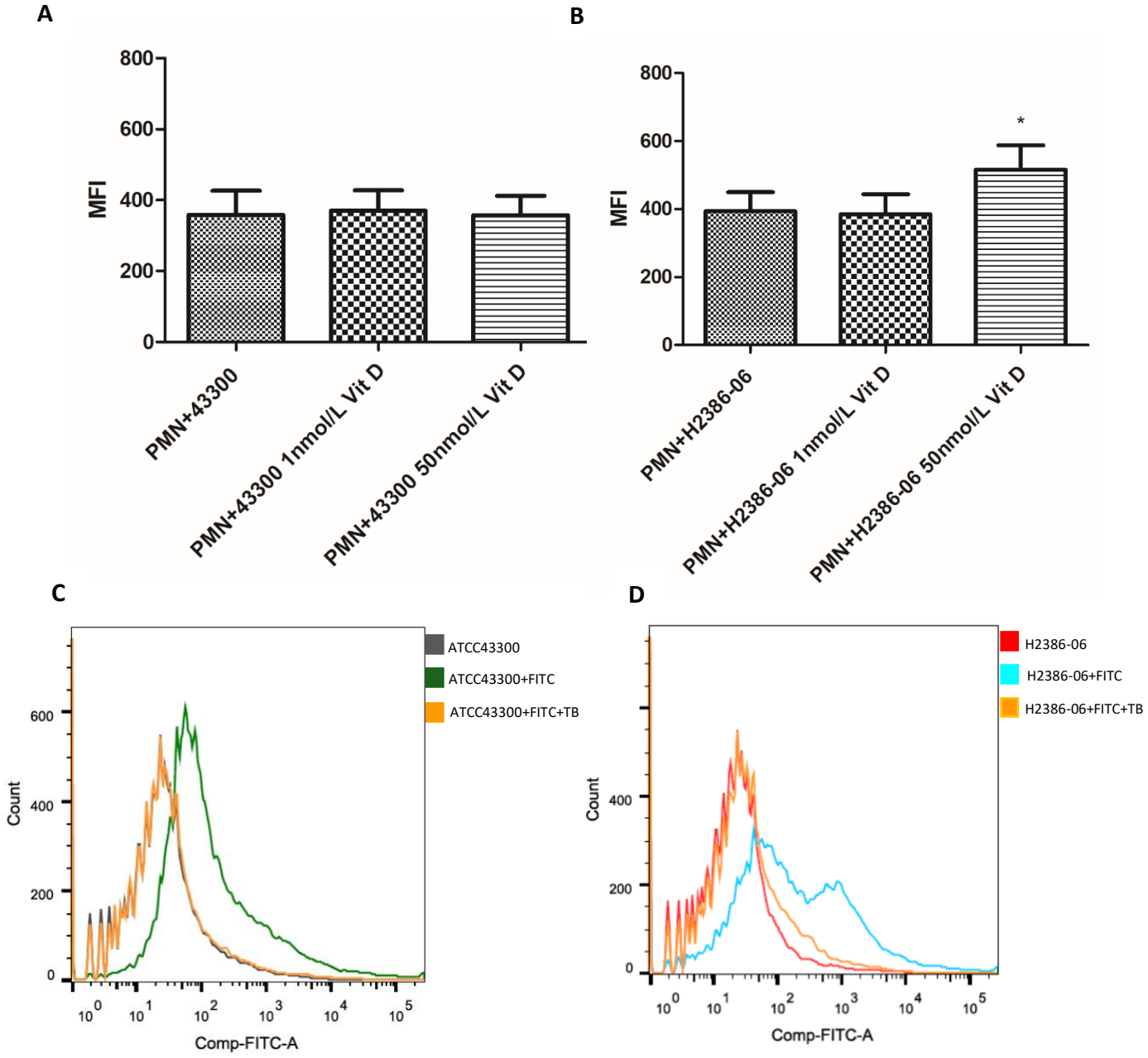

Figure 1: Phagocytosis rate of *S. aureus* by human neutrophils. Human neutrophils (PMNs) were treated for 30 minutes with 1nmol/L or 50nmol/L of Vitamin D and challenged with two strains of FITC-labeled *S. aureus* ATCC43300 (A) and H2386-06 (B) for 2 hours at a MOI of 10. Phagocytosis was analyzed by median fluorescence intensity (MFI) and trypan blue was used to distinguish intra and extracellular bacteria. Phagocytosis rate was determined using flow cytometry and neutrophils were gated based in size (Forward-Scattered – FSC), granularity (Side-Scattered – SSC) and fluorescence parameters. (n=11) (Repeated Measures ANOVA test followed by Tukey's Multiple Comparison Test) (* PMN+H2386-06 1nmol/L Vit D vs PMN+H2386-06 50nmol/L Vit D, p= 0.0289). C and D are histograms of a representative experiment for FITC labeled *S. aureus* ATCC43300 (C) and H2386-06 (D), respectively and quenching with Trypan Blue (TB).

- **Figure 2**

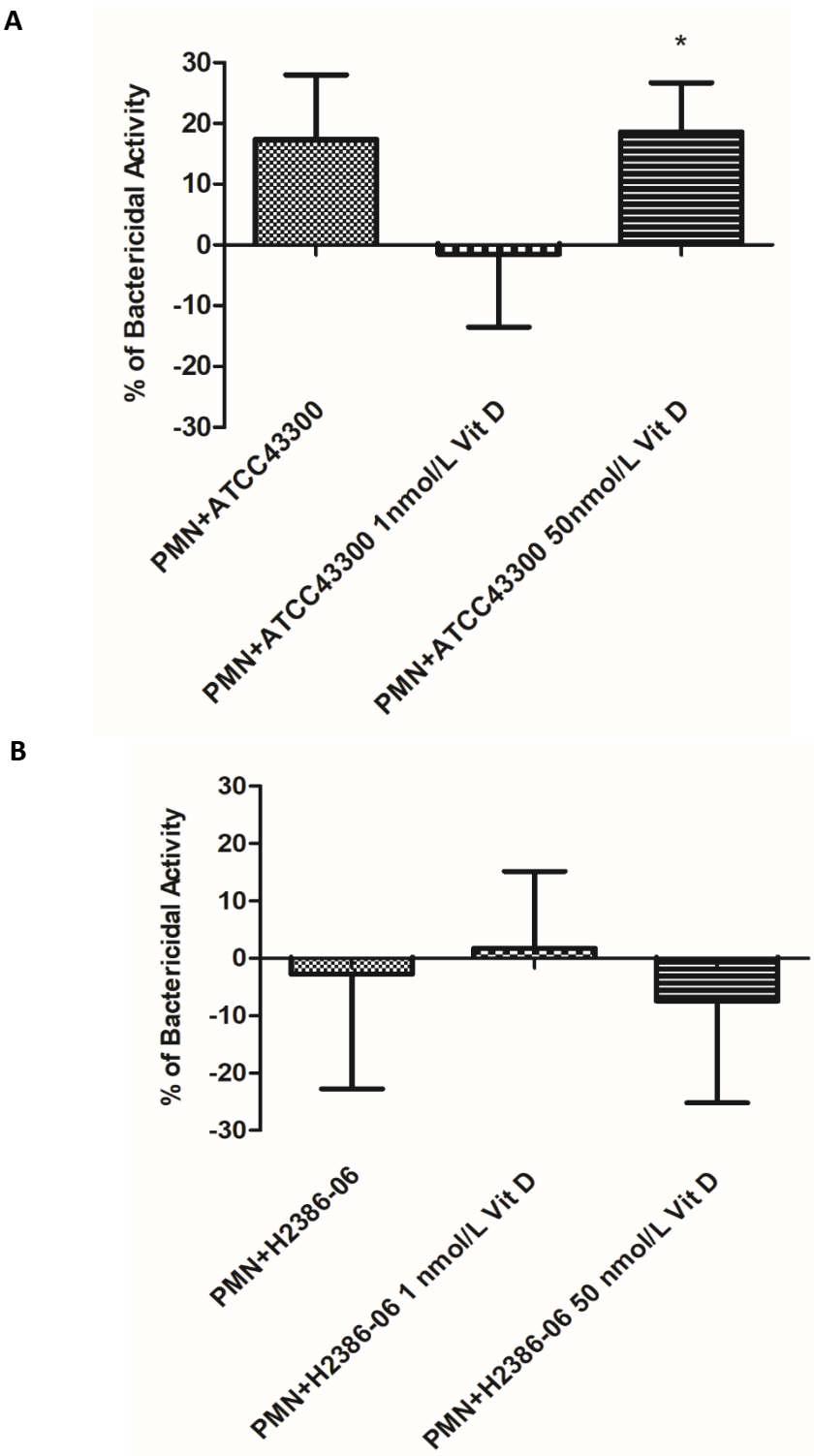

Figure 2: Neutrophil killing of *S. aureus*. Human neutrophils (PMNs) were treated for 30 minutes with 1nmol/L or 50nmol/L of Vitamin D and challenged with two strains of *S. aureus* ATCC43300 (A) and H2386-06 (B) for 2 hours at a MOI of 10 for analysis of the % of bactericidal activity by Colony Forming Units (CFUs) count (n=11). (Repeated Measures ANOVA test followed by Tukey's Multiple Comparison Test). (* PMN+ATCC43300 1nmol/L Vit D vs PMN+ATCC43300 50nmol/L Vit D, p= 0.0312).

- **Figure 3**

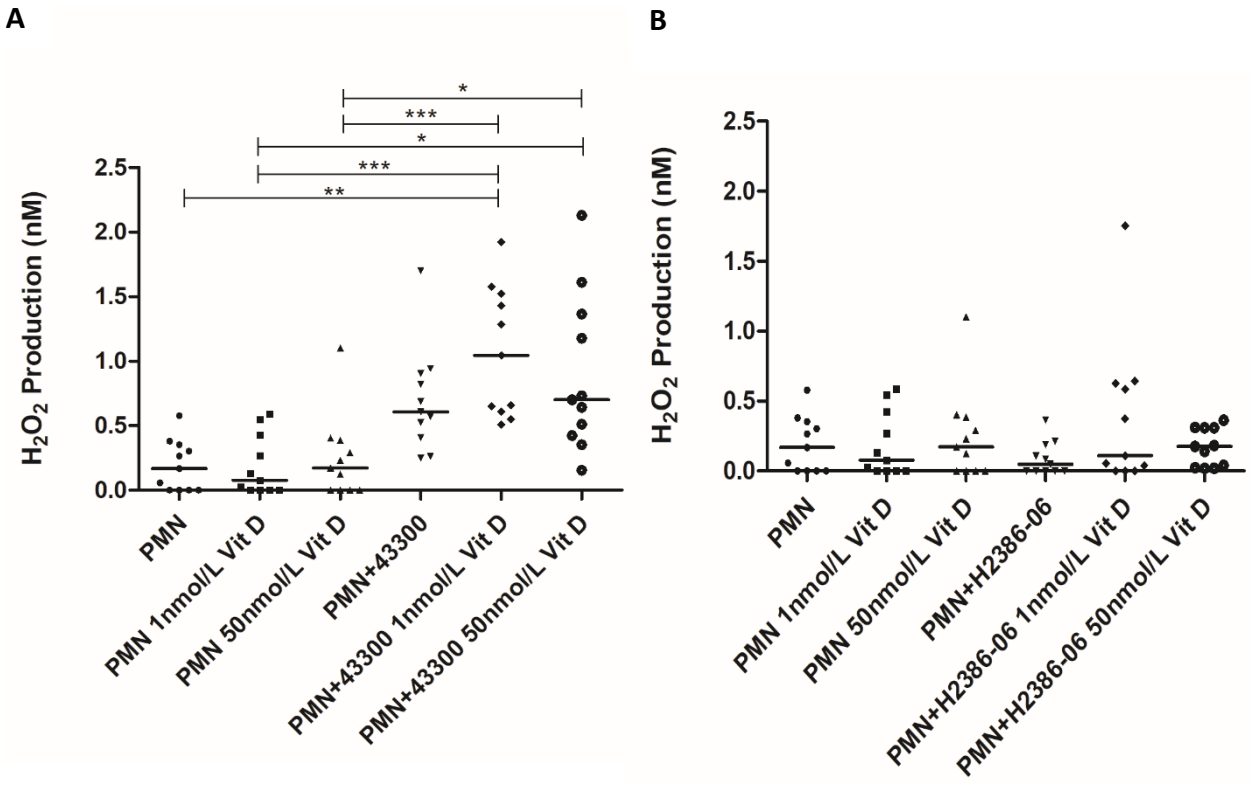

Figure 3: Hydrogen Peroxide (H_2O_2) Production. Human neutrophils (PMNs) were treated for 30 minutes with 1nmol/L or 50nmol/L of Vitamin D and challenged with two strains of *S. aureus* ATCC43300 (A) and H2386-06 (B) for 2 hours at a MOI of 10 for analysis of hydrogen peroxide (H_2O_2) production (nM). (n= 11) (Friedman test followed by Dunn's Multiple Comparison Test, $p<0.0001$).

- **Figure 4**

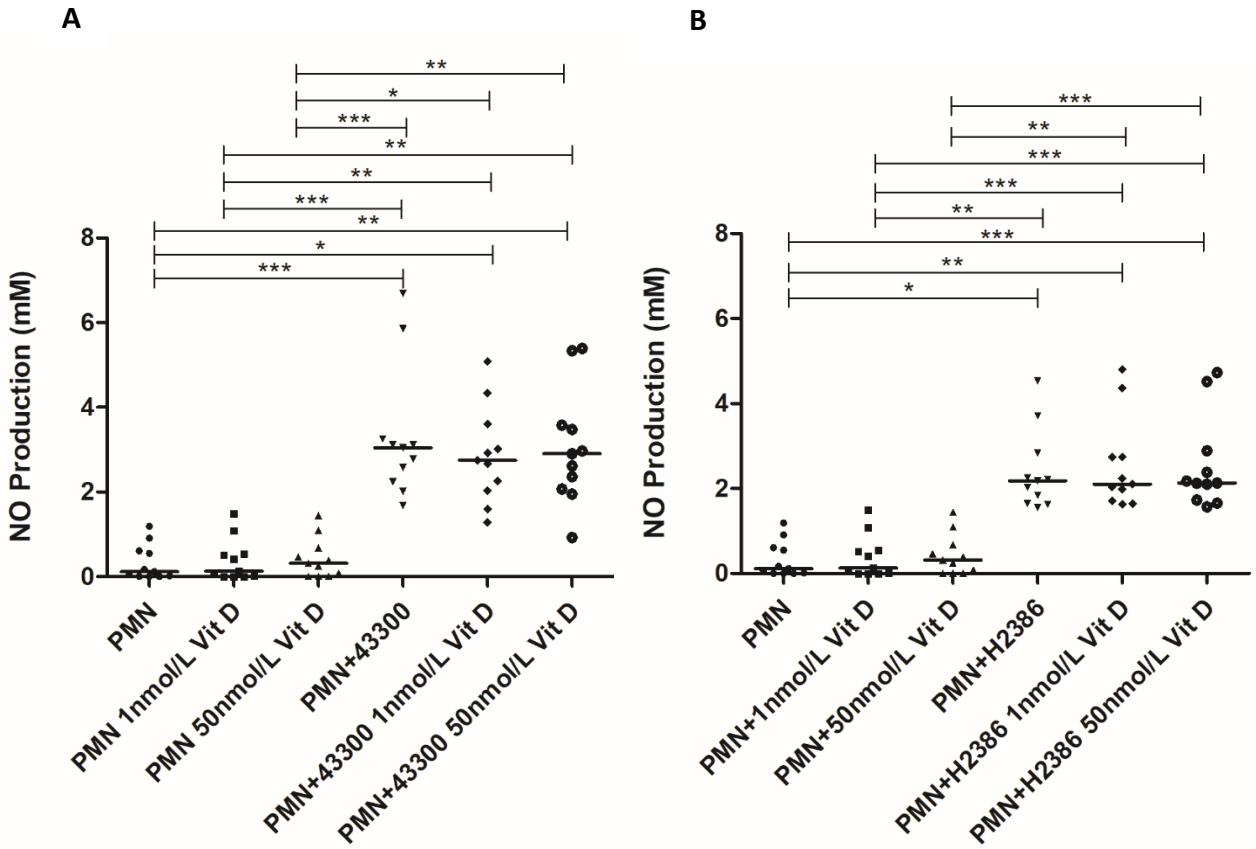

Figure 4: Oxide Nitric (NO) Production. Human neutrophils (PMNs) were treated for 30 minutes with 1nmol/L or 50nmol/L of Vitamin D and challenged with two strains of *S. aureus* ATCC43300 (A) and H2386-06 (B) for 2 hours at a MOI of 10 for analysis of oxide nitric (NO) production (mM). (n=11) (Friedman test followed by Dunn's Multiple Comparison Test, $p<0.0001$).

- **Figure 5**

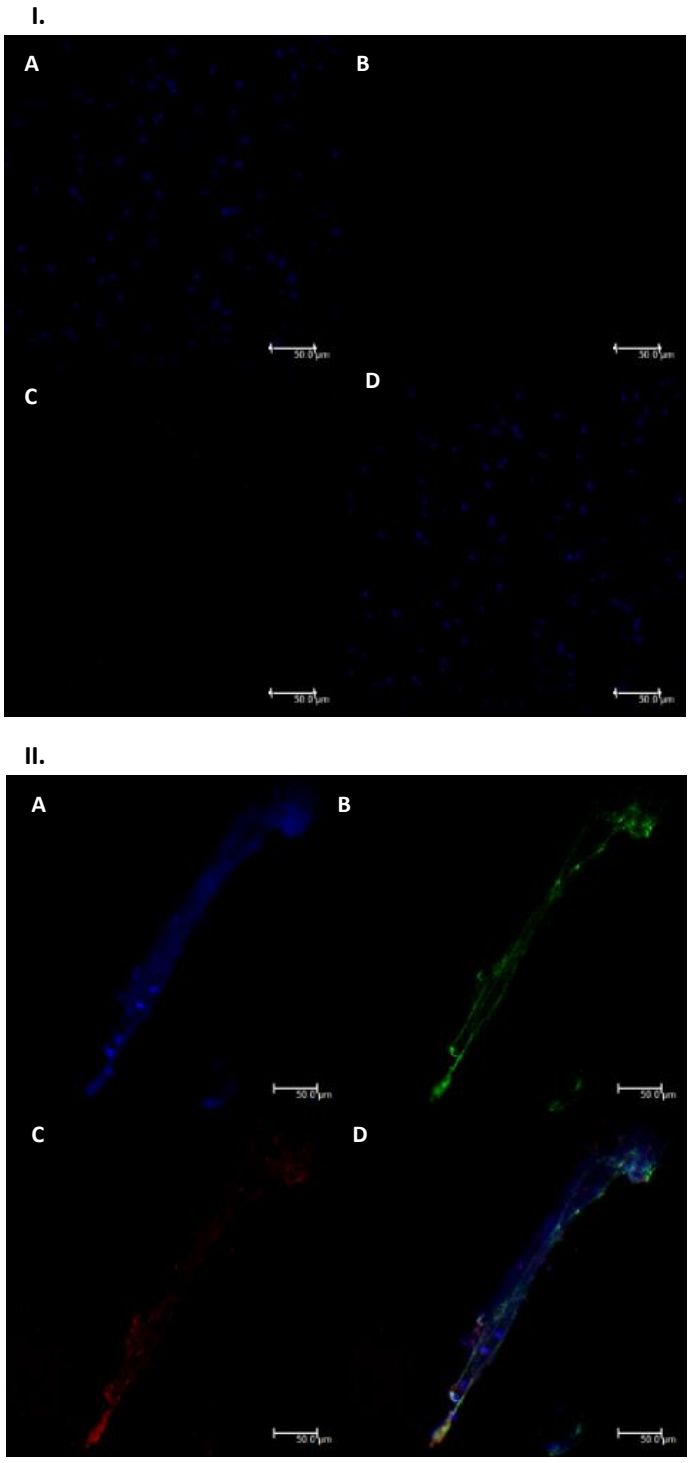

Figure 5: Confocal Microscopy of NETs components. Human neutrophils ($2x10^6$ cell/mL) (PMNs) were activated with PMA or challenged with *S. aureus* ATCC43300 or H2386-06 for 2 hours at a MOI of 10. Cultures were fixed, and NETs components were stained with DAPI for DNA (A) and labeled with anti-elastase followed by FITC conjugated secondary antibody (B) and anti-histone followed by Texas-Red conjugated secondary antibody (C) and the overlay of the three stains (D). (I.) non-treated PMNs (40x, scale bar 50µm), (II.) PMNs activated with PMA (40x, scale bar 50µm).

- **Figure 6**

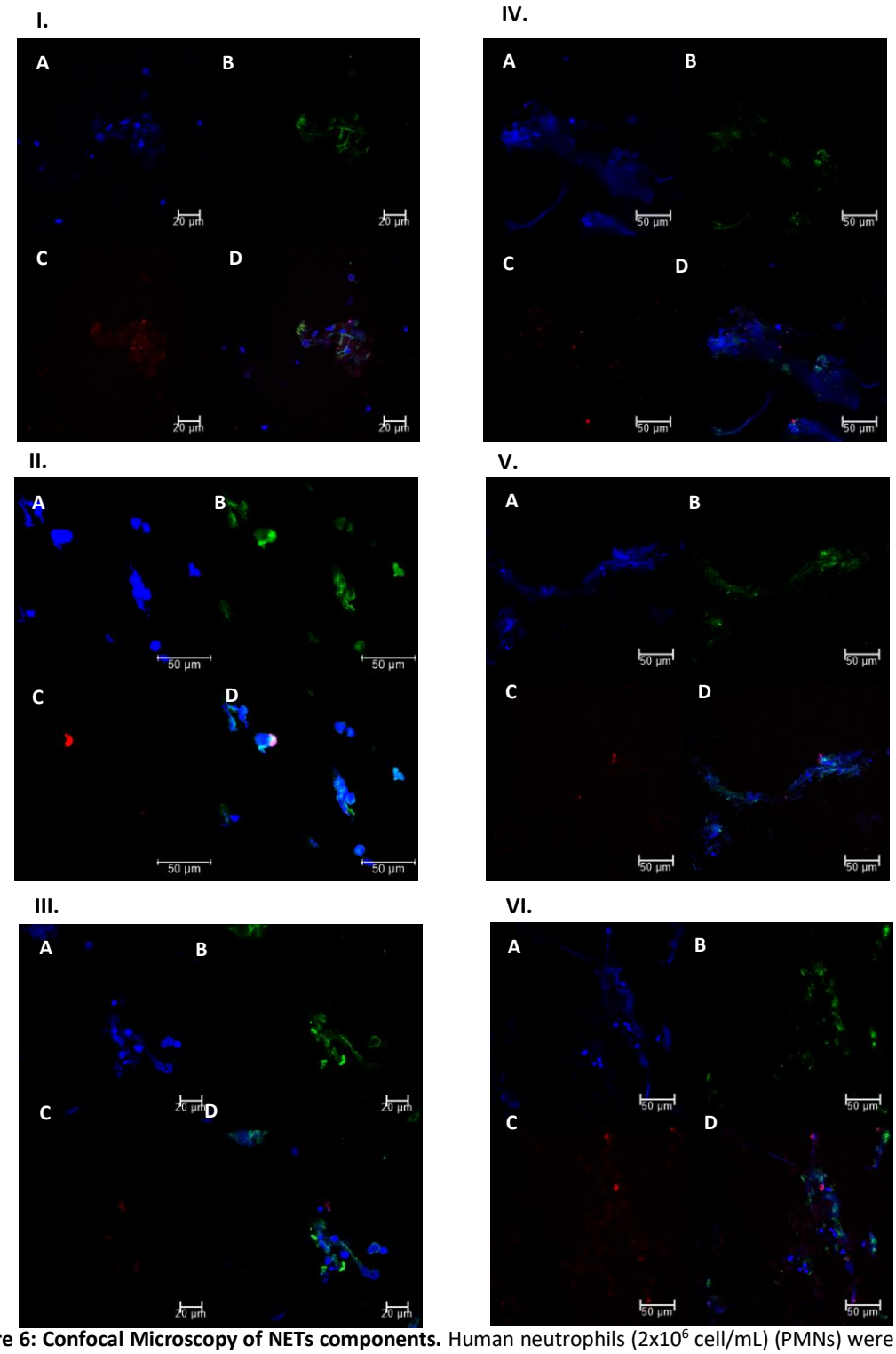

Figure 6: Confocal Microscopy of NETs components. Human neutrophils ($2x10^6$ cell/mL) (PMNs) were activated with PMA or challenged with *S. aureus* ATCC43300 or H2386-06 for 2 hours at a MOI of 10. Cultures were fixed, and NETs components were stained with DAPI for DNA (A) and labeled with anti-elastase followed by FITC conjugated secondary antibody (B) and anti-histone followed by Texas-Red conjugated secondary antibody (C) and the overlay of the three stains (D). (I.) PMNs challenged with *S. aureus* ATCC43300 (63x, scale bar 20 µm), (II.) PMNs treated with 1nmol/L of vitamin D and challenged with *S. aureus* ATCC43300 (40x, zoom 1.53, scale bar 50µm), (III.) PMNs treated with 50nmol/L of vitamin D and challenged with *S. aureus* ATCC43300 (63x, scale bar 20 µm), (IV.) PMNs challenged with *S. aureus* H2386-06 (40x, scale bar 50µm), (V.) PMNs treated with 1nmol/L of vitamin D and challenged with *S. aureus* H2386-06 (40x, scale bar 50µm), (VI.) PMNs treated with 50nmol/L of vitamin D and challenged with *S. aureus* H2386-06 (40x, scale bar 50µm).

- **Figure 7**

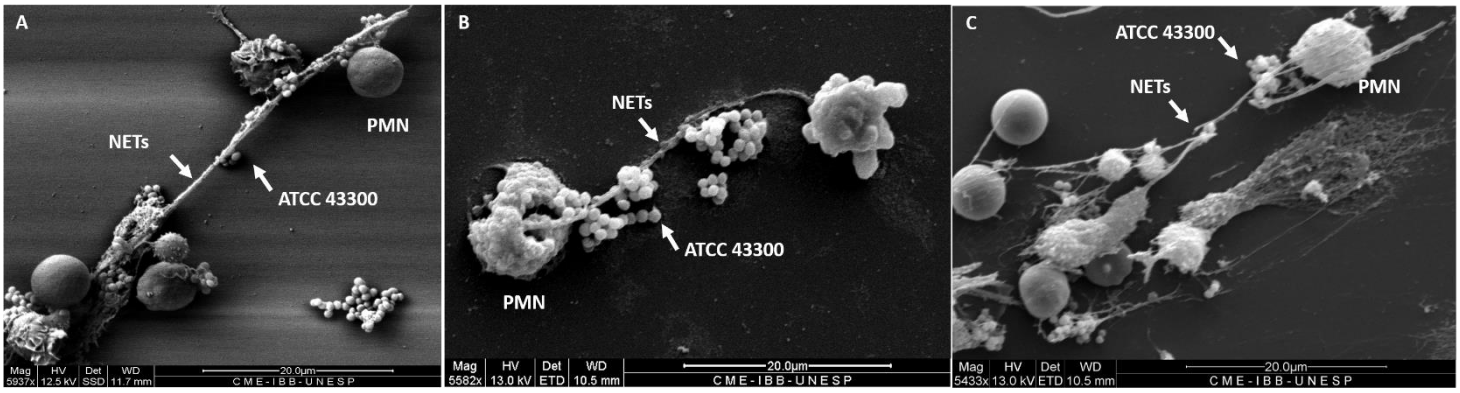

Figure 7: Scanning Electron Microscopy of NETs. Human neutrophils (PMNs) were treated with Vitamin D (1nmol/L and 50nmol/L) and challenged with *S. aureus* ATCC43300 for 2 hours at a MOI of 10. Cultures were fixed, and NETs release was observed by scanning electron microscopy. (A) Non-treated PMNs challenged with *S. aureus* ATCC43300 (MOI = 10), (B) PMNs treated with 1nmol/L of Vitamin D and challenged with *S. aureus* ATCC43300 (MOI = 10), (C) PMNs treated with 50nmol/L of Vitamin D and challenged with *S. aureus* ATCC43300 (MOI = 10).

- **Figure 8**

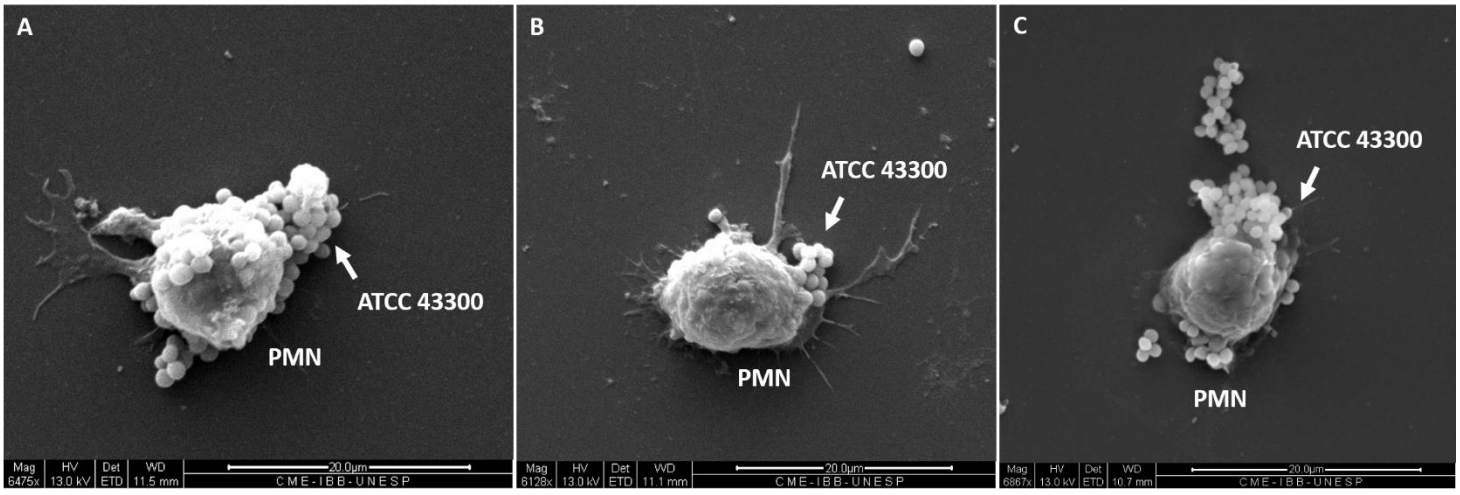

Figure 8: Scanning Electron Microscopy of NETs. Human neutrophils (PMNs) were treated with Vitamin D (1nmol/L and 50nmol/L) and DNAse (100U/mL) and challenged with *S. aureus* ATCC43300 for 2 hours at a MOI of 10. Cultures were fixed, and NETs release was observed by scanning electron microscopy. (A) Non-treated PMNs treated with DNAse and challenged with *S. aureus* ATCC43300 (MOI = 10), (B) PMNs treated with 1nmol/L of Vitamin D and DNAse and challenged with *S. aureus* ATCC43300 (MOI = 10), (C) PMNs treated with 50nmol/L of Vitamin D and DNAse and challenged with *S. aureus* ATCC43300 (MOI = 10).

- **Figure 9**

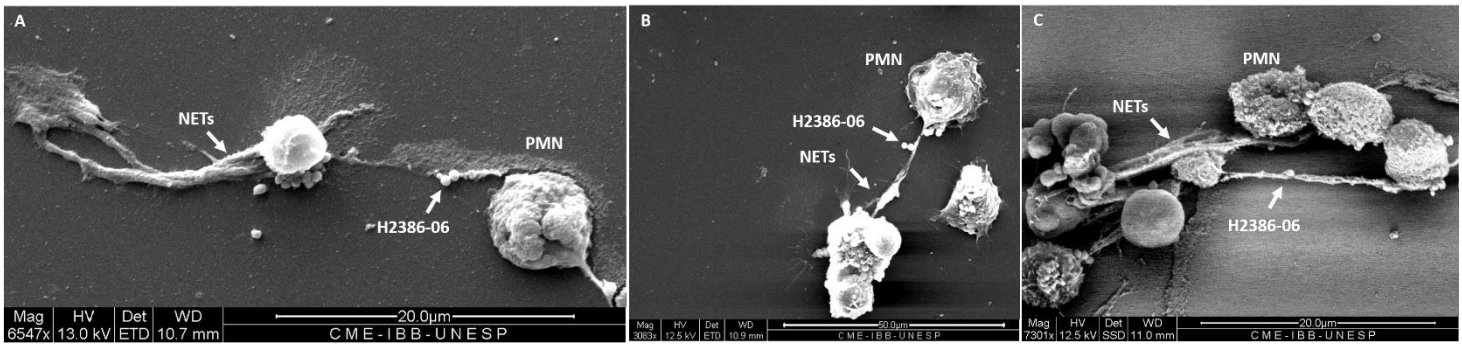

Figure 9: Scanning Electron Microscopy of NETs. Human neutrophils (PMNs) were treated with Vitamin D (1nmol/L and 50nmol/L) and challenged with *S. aureus* H2386-06 for 2 hours at a MOI of 10. Cultures were fixed, and NETs release was observed by scanning electron microscopy. (A) Non-treated PMNs challenged with *S. aureus* H2386-06 (MOI = 10), (B) PMNs treated with 1nmol/L of Vitamin D and challenged with *S. aureus* H2386-06 (MOI = 10), (C) PMNs treated with 50nmol/L of Vitamin D and challenged with *S. aureus* H2386-06 (MOI = 10).

- **Figure 10**

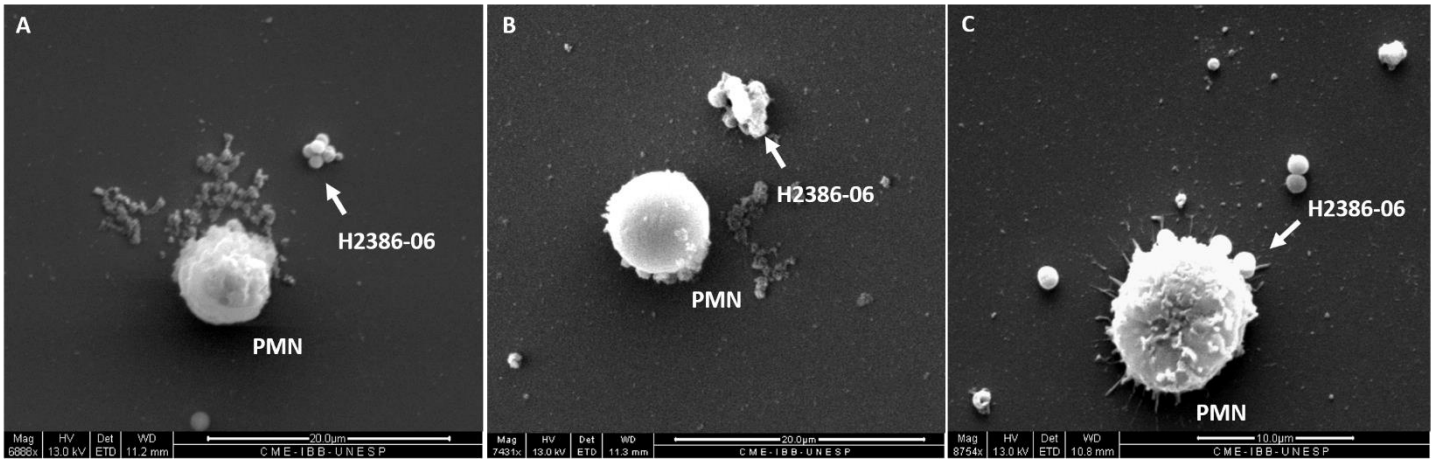

Figure 10: Scanning Electron Microscopy of NETs. Human neutrophils (PMNs) were treated with Vitamin D (1nmol/L and 50nmol/L) and DNAse (100U/mL) and challenged with *S. aureus* H2386-06 for 2 hours at a MOI of 10. Cultures were fixed, and NETs release was observed by scanning electron microscopy. (A) Non-treated PMNs treated with DNAse and challenged with *S. aureus* H2386-06 (MOI = 10), (B) PMNs treated with 1nmol/L of Vitamin D and DNAse and challenged with *S. aureus* H2386-06 (MOI = 10), (C) PMNs treated with 50nmol/L of Vitamin D and DNAse and challenged with *S. aureus* H2386-06 (MOI = 10).

- **Figure 11**

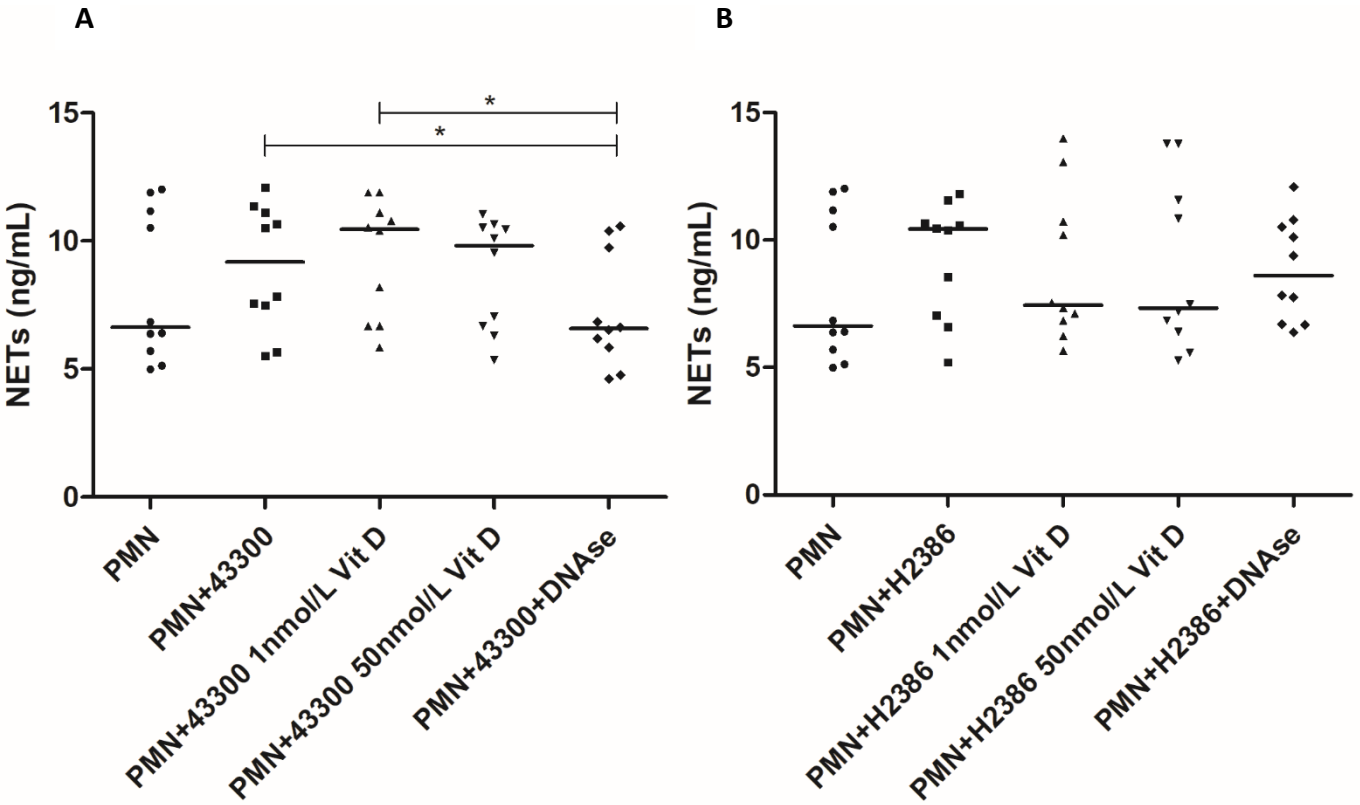

Figure 11: NETs quantification. Human neutrophils (PMNs) were treated for 30 minutes with 1nmol/L or 50nmol/L of Vitamin D and challenged with two strains of *S. aureus* ATCC43300 (A) and H2386-06 (B) for 2 hours at a MOI of 10. Supernatants were collected and the complex elastase-DNA was quantified by Picogreen dsDNA kit (n=10) (Friedman test followed by Dunn's Multiple Comparison Test, p= 0.0086).

- **Figure 12**

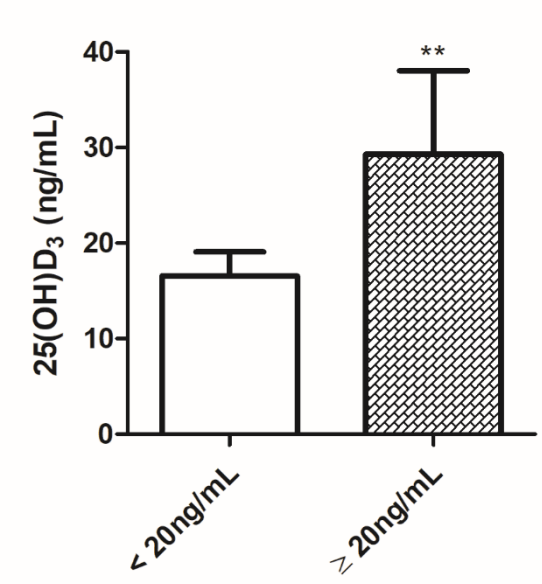

Figure 12: 25(OH)D_3 serum levels: Measurement of 25(OH)D_3 serum levels of healthy volunteers included in the study, considering levels below 20ng/mL as deficiency/insufficiency and above as sufficiency. Sufficiency (29.30 ± 3.093) and deficiency/insufficiency (16.55 ± 1.029) (Unpaired t test, p=0.0050).

- **Figure 13**

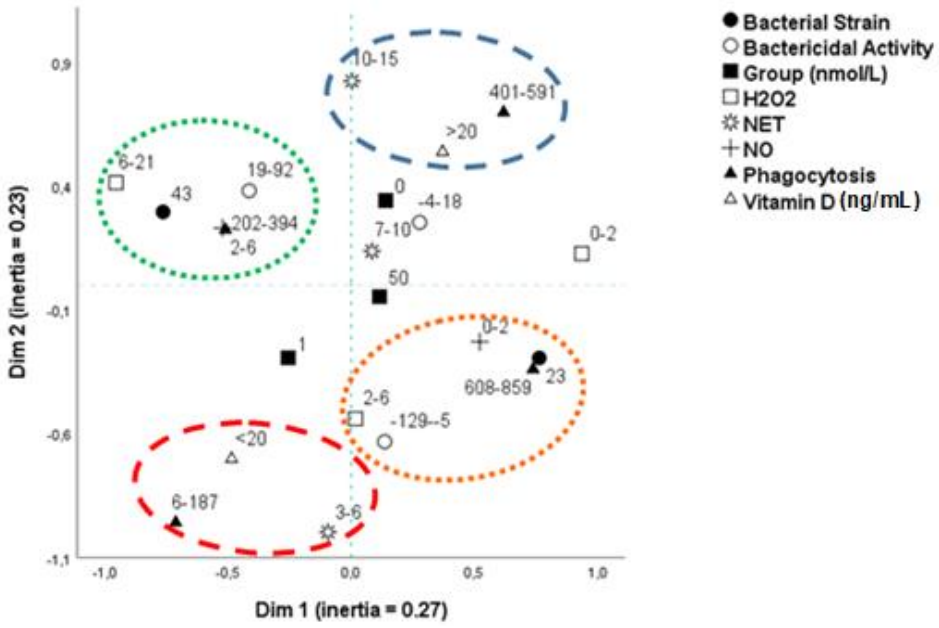

Figure 13: Perceptual map from multiple correspondence analyses: Multiple correspondence analysis of the variables of the study for vitamin D serum levels, bacterial strain, NETs release, phagocytosis rates, bactericidal activity, H_2O_2 and NO productions. Blue elliptical area shows the spatial proximity among sufficient vitamin D serum levels and higher NETs release and intermediate phagocytosis rate. Red elliptical area shows the spatial distance among deficient/insufficient vitamin D serum levels and lower NETs release and phagocytosis rate. Green elliptical area shows the spatial distance among *S. aureus* ATCC43300 and intermediate phagocytosis rate, higher levels of H202 and NO and higher bactericidal activity. Orange elliptical area shows the spatial distance among *S. aureus* H2386-06 and higher phagocytosis rate and lower levels of H_2O_2 and NO and bactericidal activity. Significance level was set as $p \leq 0.05$.

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.

Anexos

UNESP -FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

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

Pesquisador: Amanda Manoel Della Coletta

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 65645517.6.0000.5411

Instituição Proponente: Departamento de Patologia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.996.879

Apresentação do Projeto:

A deficiência de vitamina D vem se tornando um problema mundial em virtude de hábitos da população,como o trabalho por períodos prolongados em ambientes fechados e o aumento do uso de protetor solar/ 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 através de inúmeros mecanismos. Diante disso 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 são preocupantes pelo aumento da prevalência de cepas resistentes a antibióticos, dificultando,o tratamento e contribuindo para a busca de métodos alternativos para combater esse tipo de infecção.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar o papel da vitamina D nos efeitos bactericidas de neutrófilos por meio de mecanismos intracelulares como a fagocitose e extracelulares como a liberação de Neutrophil Extracellular Traps (NETs), em resposta a diferentes cepas de S. aureus.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:coleta de sangue periférico, podendo ocorrer um pequeno hematoma ou mesmo um leve

Endereço: Chácara Butignolli , s/n
Bairro: Rubião Junior **CEP:** 18.618-970
UF: SP **Município:** BOTUCATU
Telefone: (14)3880-1608 **E-mail:** capellup@fmb.unesp.br

incômodo no local de inserção da agulha.
Benefícios:possível contribuição para o combate à infecções de difícil tratamento através de métodos alternativos como a suplementação com vitamina D.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de projeto de doutorado orientado pela Profa. Luciane Alarcão Dias Melicio a ser desenvolvido no Departamento de Patologia e na UNIPEX.
Serão avaliadas amostras de sangue periférico de 20 indivíduos saudáveis, maiores de 18
anos, funcionários da UNESP, campus de Botucatu, que não estejam sob a responsabilidade do professor responsável pelo projeto, após aceite e assinatura do TCLE.
Serão excluídos indivíduos que tenham tomado, nos últimos 30 dias, qualquer tipo de anti-inflamatório, antibiótico ou que tenham referido febre.
Serão coletados de cada individuo 40 ml de sangue periférico por punção venosa para isolamento e cultura de neutrófilos (tecnica descrita no projeto). Os neutrófilos isolados serão tratados com diferentes doses de vitamna D (1-10-50nmol/L). O grupo controle será os neutrofilos não tratados com vitamina D.
Diferentes cepas de S. aureus serão utilizadas para o desafio bacterianao entre elas a não produtora de biofilme(referencia internacional) e a produtora de biofilme (isolado de hemocultura). As linhagens serão semeadas em diferentes caldo de cultura. A avaliação da taxa de fagocitose será realizada pelo Núcleo de Tecnologia Digital em Patologia.
Também serao avaliadas: a atividade bactericida de neutrófilos tratados com vitamina D e desafiados com S. aureus pela contagem de UFC; avaliação da produção de Peróxido de Hidrogênio (H2O2) com sobrenadantes de culturas de neutrófilos tratados com vitamina D e desafiados com S.aureus; avaliação da produção de Óxido Nítrico (NO) pela quantificação da produção de nitrito(NO-2) pela reação colorimétrica de Griess; Visualização dos efeitos da vitamina D na liberação de NETs por Microscopia Confocal e Microscopia de varredura.

O cronograma se iniciará em 03/04/2017 com termino previsto para 28/02/2019.

O orçamento financeiro é de 9000 reais. Sera utilizado material de consumo remanescente de projetos anteriores conduzidos no laboratório. O valor do orçamento será coberto pelo auxílio bancada da bolsa CNPq Processo 140332/2015-4.

TCLE foi redigido na forma de convite, com linguagem aceitavel, explicativo.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos de apresentação obrigatória foram anexados:

Termo de anuência do EAP

Folha de rosto assinada pelo diretor da FMB

Autorização da UNIPEX

TCLE

O projeto já havia sido submetido ao CEP, ficou com pendencias e retorna para nova analise.Pendencias apontadas:

- Inicialmente os autores haviam incluidos 20 alunos da UNESP sem a concordancia dos conselhos de cursos (sem especificar curso) e funcionarios. Foi solicitado que especificassem quem seriam esses alunos e solicitassem autorização do conselho de curso. Os autores retiraram os alunos e deixaram apenas 20 funcionarios. Sem pendencias.

- Havia anuencia da UNIPEX mas não havia explicação se o sangue seria estocado ou armazenado num biorrepositório. Os autores informaram que não haverá biorrepositório, que o sangue será processado na UNIPEX após à coleta, para isolamento das células e realização das culturas que serão utilizadas nos experimentos. Não haverá armazenamento e o sangue que não for utilizado será descartado. Pendência atendida.

- TCLE: trocar o termo coloração arroxeada por mancha arroxeada (trocado); incluir a coleta de 40 ml de sangue e justificar (40 ml incluidos e a justificativa é que esse é o volume necessário para conseguir número suficiente de células de interesse para realização do projeto); incluir um paragrafo constando que o sangue sera estocado na UNIPEX e que será utilizado na sua integralidade (os autores incluiram esse paragrafo informando que o sangue será processado na UNIPEX e que não haverá armazenamento de sangue e que o mesmo será utilizado na sua integralidade). Pendencias atendidas

Recomendações:

Sem recomendação

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Considero o projeto aprovado, sem necessidade de envio a CONEP.

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto de pesquisa APROVADO, deliberado em reunião ORDINÁRIA do CEP de 03/04/2017, sem necessidade de envio à CONEP.

Solicitamos aos pesquisadores que após a execução do projeto em questão, seja enviado para análise o respectivo "Relatório Final de Atividades", o qual deverá ser enviado via Plataforma Brasil na forma de "NOTIFICAÇÃO".

OBS: LEMBRAMOS QUE A PRESENTE PESQUISA SOMENTE PODERÁ SER INICIADA APÓS DIA 03/04/2017 – DATA DA APROVAÇÃO DO CEP.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_859390.pdf	13/03/2017 10:01:54		Aceito
Outros	Carta_resposta_pendencias_Amanda_MDC.pdf	13/03/2017 10:01:26	Amanda Manoel Della Coletta	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Amanda_MDC.pdf	10/03/2017 14:53:14	Amanda Manoel Della Coletta	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Amanda_MDC.pdf	10/03/2017 14:27:50	Amanda Manoel Della Coletta	Aceito
Outros	Documento_anuencia_institucional_Amanda_MDC.pdf	06/03/2017 14:12:22	Amanda Manoel Della Coletta	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_351_Amanda_MDC.pdf	24/02/2017 10:16:34	Amanda Manoel Della Coletta	Aceito
Outros	Declaracao_relatorio.pdf	08/02/2017 10:48:45	Amanda Manoel Della Coletta	Aceito
Outros	Resolucao_466.pdf	08/02/2017 10:46:26	Amanda Manoel Della Coletta	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_UNIPEX.pdf	08/02/2017 10:45:19	Amanda Manoel Della Coletta	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

BOTUCATU, 03 de Abril de 2017

Assinado por:
SILVANA ANDREA MOLINA LIMA
(Coordenador)

Endereço: Chácara Butignolli , s/n
Bairro: Rubião Junior **CEP:** 18.618-970
UF: SP **Município:** BOTUCATU
Telefone: (14)3880-1608 **E-mail:** capellup@fmb.unesp.br

UNESP -FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

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

Pesquisador: Amanda Manoel Della Coletta

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 65645517.6.0000.5411

Instituição Proponente: Departamento de Patologia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.499.970

Apresentação do Projeto:

Projeto já submetido e aprovado por este Comitê através da Plataforma Brasil (CAAE: 65645517.6.0000.5411; Número do Comprovante: 020537/2017)

Parecer consubstanciado número 1.996.879

Os autores solicitam a inclusão do recrutamento de alunos da Graduação e Pós-Graduação do Instituto de Biociências (IBB) e da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) para doação voluntária de sangue para o projeto.

Objetivo da Pesquisa:

Ver parecer consubstanciado número 1.996.879

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Ver parecer consubstanciado número 1.996.879

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Ver parecer consubstanciado número 1.996.879

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os autores solicitam a inclusão de alunos para doação voluntaria de sangue dos seguintes cursos:

Ciências Biológicas: manifestação favorável do Conselho de Curso de Ciencias Biológicas

Ciências Biomédicas: manifestação favorável do conselho de curso

Endereço: Chácara Butignolli , s/n
Bairro: Rubião Junior **CEP:** 18.618-970
UF: SP **Município:** BOTUCATU
Telefone: (14)3880-1609 **E-mail:** cep@fmb.unesp.br

Nutrição (IBB): manifestação favorável do conselho de curso

Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada (IBB):manifestação favorável do conselho de PG

Pós Graduação em Doenças Tropicais:manifestação favorável do conselho de PG

Pós Graduação Fisiopatologia em Clínica Médica:manifestação favorável do conselho de PG

Pós Graduação em Patologia: manifestação favorável do conselho de PG

TCLE: ja aprovado sem necessidade de alterações.

Recomendações:

Considero a solicitação de inclusão de alunos de curso de graduação e pós graduação aceita. sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto aprovado, sem necessidade de envio a CONEP.

Considerações Finais a critério do CEP:

Conforme deliberação do Colegiado em reunião ordinária do Comitê de Ética em Pesquisa da FMB/UNESP, realizada em 05 de fevereiro de 2018, o documento enviado na forma de "Emenda", encontra-se APROVADO, sem necessidade de envio à CONEP.

Atenciosamente,

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1054104_E1.pdf	14/12/2017 09:45:18		Aceito
Outros	Carta_solicitacao_inclusao_recrutamento_voluntario_de_alunos_projeto_Doc_Amanda_MDC.pdf	14/12/2017 09:39:02	Amanda Manoel Della Coletta	Aceito
Outros	Carta_resposta_pendencias_Amanda_MDC.pdf	13/03/2017 10:01:26	Amanda Manoel Della Coletta	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Amanda_MDC.pdf	10/03/2017 14:53:14	Amanda Manoel Della Coletta	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura	Projeto_Amanda_MDC.pdf	10/03/2017 14:27:50	Amanda Manoel Della Coletta	Aceito

Endereço: Chácara Butignolli , s/n
Bairro: Rubião Junior **CEP:** 18.618-970
UF: SP **Município:** BOTUCATU
Telefone: (14)3880-1609 **E-mail:** cep@fmb.unesp.br

UNESP -FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU

Continuação do Parecer: 2.499.970

Investigador	Projeto_Amanda_MDC.pdf	10/03/2017 14:27:50	Amanda Manoel Della Coletta	Aceito
Outros	Documento_anuencia_institucional_Amanda_MDC.pdf	06/03/2017 14:12:22	Amanda Manoel Della Coletta	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_351_Amanda_MDC.pdf	24/02/2017 10:16:34	Amanda Manoel Della Coletta	Aceito
Outros	Declaracao_relatorio.pdf	08/02/2017 10:48:45	Amanda Manoel Della Coletta	Aceito
Outros	Resolucao_466.pdf	08/02/2017 10:46:26	Amanda Manoel Della Coletta	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_UNIPEX.pdf	08/02/2017 10:45:19	Amanda Manoel Della Coletta	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

BOTUCATU, 19 de Fevereiro de 2018

Assinado por:
SILVANA ANDREA MOLINA LIMA
(Coordenador)

Endereço: Chácara Butignolli , s/n
Bairro: Rubião Junior **CEP:** 18.618-970
UF: SP **Município:** BOTUCATU
Telefone: (14)3880-1609 **E-mail:** cep@fmb.unesp.br

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(TERMINOLOGIA OBRIGATÓRIA EM ATENDIMENTO A RESOLUÇÃO 466/12-CNS-MS)

O senhor (a) está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa chamada **"Ação da Vitamina D sobre mecanismos bactericidas de neutrófilos humanos desafiados com diferentes cepas de *Staphylococcus aureus*"**, que pretende estudar o efeito da vitamina D em neutrófilos humanos desafiados com a bactéria *Staphylococcus aureus (S. aureus)*.

A pesquisa consta da coleta de 40 mL de sangue de voluntários saudáveis, realizada uma única vez, e esse volume é necessário para se conseguir número suficiente de células de interesse para realização do projeto. Os riscos e o desconforto da coleta são mínimos e de total responsabilidade da pesquisadora. O indivíduo poderá sentir um leve incômodo durante a coleta e posteriormente pode ser que apareça um pequeno hematoma (mancha roxa) no local. A coleta de sangue é a mesma que se realiza em laboratório de análises clínicas, sendo muito segura. O sangue coletado será processado na UNIPEX (Unidade de Pesquisa Experimental) da Faculdade de Medicina de Botucatu e será utilizado em sua integralidade para realização das culturas celulares que serão utilizadas no desenvolvimento da pesquisa. O material colhido e seus derivados serão descartados após o término da pesquisa.

Esta pesquisa pretende compreender a ação da vitamina D em neutrófilos, que são células do sistema imunológico em resposta a infecção pela bactéria *Staphylococcus aureus*, sendo a vitamina um possível método auxiliar no combate a infecções de difícil tratamento.

Caso o senhor (a) não queira participar da pesquisa, informo que não haverá nenhuma interferência em futuros procedimentos no âmbito da Faculdade de Medicina de Botucatu. O senhor (a) poderá retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa sem nenhum prejuízo.

É garantido o total sigilo de seus dados relatados nesta pesquisa.

Este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será elaborado em 2 vias de igual teor, o qual 01 via será entregue ao Senhor (a) devidamente rubricada, e a outra via será arquivada e mantida pelos pesquisadores por um período de 5 anos após o término da pesquisa. Fique ciente de que sua participação neste estudo é voluntária e que mesmo após ter dado seu consentimento para participar da pesquisa, você poderá retirá-lo a qualquer momento.

Qualquer dúvida adicional você poderá entrar em contrato com o Comitê de Ética em Pesquisa através dos telefones (14) 3880-1608 ou 3880-1609 que funciona de 2ª a 6ª feira das 8.00 às 11.30 e das 14.00 às 17horas, na Chácara Butignolli s/nº em Rubião Júnior – Botucatu - São Paulo. Os dados de localização dos pesquisadores estão abaixo descritos.

Após terem sido sanadas todas minhas dúvidas a respeito deste estudo, CONCORDO EM PARTICIPAR de forma voluntária, estando ciente que todos os meus dados estarão resguardados através do sigilo que os pesquisadores se comprometeram. Estou ciente que os resultados desse estudo poderão ser publicados em revistas científicas, sem, no entanto, que minha identidade seja revelada.

CONCORDO EM PARTICIPAR DA PESQUISA

Botucatu, _____ de _____ de 201____

Nome completo: _____
RG:_____

Assinatura: _____

_____
Pesquisadora: Amanda Manoel Della Coletta
Laboratório de Imunopatologia e Agentes Infecciosos
Unipex - Bloco 5
Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP
Telefone: (14) 3880-1750 / Celular: (14) 98152-7194
E-mail: amdcoletta@gmail.com

_____
Orientadora: Prof.ª Dr.ª Luciane Alarcão Dias-Melicio
Departamento de Patologia
Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP
Telefone: (14) 3880-1592
E-mail: ladiasmelicio@fmb.unesp.br