UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Estudo da suplementação de vitamina D em modelo experimental de
diabetes mellitus

Leonardo Mendes Bella

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins

São Paulo
2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Estudo da suplementação de vitamina D em modelo experimental de
diabetes mellitus

Versão corrigida da Dissertação conforme resolução CoPGr 6018.
O original encontra-se disponível no Serviço de Pós Graduação da FCF/USP.

Leonardo Mendes Bella

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins

São Paulo
2014

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Bella, Leonardo Mendes
B434e Estudo da suplementação de vitamina D em modelo experimental
de *diabetes mellitus* / Leonardo Mendes Bella. -- São Paulo, 2014.
100p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.
Orientador: Martins, Joilson de Oliveira

1. Vitamina D : Doenças metabólicas 2. Diabetes mellitus I.
T. II. Martins, Joilson de Oliveira, orientador.

616.39 CDD

Leonardo Mendes Bella

Estudo da suplementação de vitamina D em modelo experimental de *diabetes mellitus*

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins
orientador/presidente

Profa. Dra. Rosa Ferreira dos Santos

Prof. Dr. Rildo Aparecido Volpini

São Paulo, 8 de outubro de 2014.

DEDICATÓRIA

Ao Deus de Abraão, pois, sem Ele, nada sou.

AGRADECIMENTOS

Ao Deus de Abraão, por estar constantemente me capacitando, fortalecendo-me e me direcionando durante a jornada.

À Carolina, meu corpo e minha querida noiva, pelo companheirismo, apoio, dedicação, zelo, paciência, carinho e amor demonstrados e comprovados ao longo de mais de uma década. Meu singelo muito obrigado por me deixar fazer parte da sua vida.

Aos meus pais, João e Marina, pelos ensinamentos, carinho, dedicação e apoio indispensáveis.

À minha família, principalmente, ao Gustavo, às minhas avós, ao Tio Israel, à Tia Maria de Lourdes, à Tia Marília, à Tia Marta, à Tia Augusta, à Graça, ao Marcos e à Marilene, que, mesmo estando a quilômetros de distância se fazem sempre presentes.

Ao Eduardo Lima Nolasco, por ter acreditado no meu trabalho, pela indicação ao professor Dr. Joilson, pela paciência, pelas inúmeras contribuições durante o trabalho e na adaptação ao ritmo paulistano e pelos convites para assistir aos jogos do Botafogo.

Ao Dr. Joilson de Oliveira Martins, que me aceitou no seu grupo de pesquisa, acreditou no meu trabalho e tem contribuído para o meu crescimento pessoal e profissional.

À Isis Fieri, IC que demonstrou ser uma profissional de alto nível através do desempenho na execução do presente trabalho.

À Fernanda Peixoto Barbosa Nunes, pelos ensinamentos sobre São Paulo e pelas diversas ajudas.

Ao Fernando Henrique Tessaro Galvão que, juntamente com os demais, auxiliou-me em diversas etapas do trabalho e pela paciência.

À Mariana Cristina Ferreira Silva, pela paciência e por todo o suporte técnico e administrativo que foram fundamentais para o trabalho.

À Sabrina de Souza Ferreira, ao Felipe Beccaria Casagrande, à Paula Regina Knox de Souza, ao Leonardo dos Santos Castellar, à Maria Fernanda Casalechi Rezende e à Thaís Bitencourt de Matos Torres pelos ensinamentos ao longo desse período.

À família imunoendocrinologia, pela paciência, pelas risadas, por ter me aceitado de braços abertos e pela constante ajuda.

À Flávia, Lívia, Fátima, Alexandre, Irineu, Miriam, Jorge, Marinalva, Elaine, Edson, Ana, Edna, Suely e aos demais funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas pelas inúmeras e irrestritas ajudas.

Ao Fábio Seiti Yamada Yoshikawa pela paciência e pelo ensinamento.

À Amanda, pela amizade e pelos eternos *help* no *English field*.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

À FAPESP, ao CNPq, à CAPES e à PROEX pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

A todos os docentes que contribuíram na minha formação e aos professores Jorge Luiz Mello Sampaio, Rosa Ferreira dos Santos e Eliana Hiromi Akamine pelo auxílio na qualificação.

O presente trabalho foi realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) Projeto 2012/23998-4 e do Programa Jovem Pesquisador 2010/02272-0.

RESUMO

BELLA, L.M. **Estudo da vitamina D em modelo experimental de *diabetes mellitus***. 2014. 100 f. Dissertação (Dissertação de Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

O *diabetes mellitus* (DM) é uma doença com prevalência e morbidade elevadas em todo o mundo, sendo que o DM1 é responsável por 5–10% dos casos. A vitamina D, hormônio de ação pleiotrópica, pode melhorar o curso do DM1, embora os mecanismos não estejam completamente elucidados. Dessa forma, ampliar o conhecimento sobre a ação desse hormônio pode auxiliar no prognóstico, bem como na compreensão dos possíveis mecanismos envolvidos na prevenção do DM. Neste trabalho, foram avaliados os efeitos fisiológicos da suplementação de vitamina D (800 UI/dia/sete dias; via oral) em camundongos machos (n=31; linhagem C57BL/6) distribuídos em quatro grupos: Controle + Água (CA; n=9); Controle + Vitamina D (CV; n=9); Diabético + Água (DA; n=6) e Diabético + Vitamina D (DV; n=7). Os camundongos tornados diabéticos (aloxana, 60 mg/Kg, intravenosa), quando comparados aos controles, exibiram redução do peso corporal e concentrações plasmáticas de glicose mais elevadas durante o período experimental de 10 dias (características do estado insulínopênico). Entretanto, a suplementação com vitamina D não alterou essa condição. Camundongos tornados diabéticos, em relação aos controles, exibiram redução do peso corporal ($p<0,05$) e concentrações plasmáticas de glicose ($p<0,001$) mais elevadas durante o período experimental. Animais suplementados com vitamina D apresentaram, em relação aos controles, níveis de 25(OH)D mais elevados (CA vs CV, $p<0,001$; DA vs DV, $p<0,001$). Níveis séricos maiores de ureia (CA vs DA, $p<0,05$; CA vs DV, $p<0,01$; CV vs DA, $p<0,05$; CV vs DV, $p<0,01$) e creatinina (CA vs DA, $p<0,001$; CA vs DV, $p<0,001$; CV vs DA, $p<0,001$; CV vs DV, $p<0,001$), espessamento da cápsula de Bowman, hipertrofia glomerular e destruição de hepatócitos foram observados em camundongos diabéticos em relação aos controles. Entretanto, a suplementação com vitamina D não alterou estas condições. O grupo DA apresentou menor nível sérico de albumina em relação aos grupos CA ($p<0,05$) e CV ($p<0,05$); níveis inferiores de hemoglobina ($p<0,05$) e hematócrito ($p<0,05$) em relação ao grupo DV; e menor leucometria ($p<0,05$) e mononucleares sanguíneos ($p<0,05$) em relação ao grupo CA. Os resultados sugerem que a vitamina D possa influenciar a resposta imunológica em animais diabéticos, modulando hematócrito, hemoglobina, bem como os níveis séricos de albumina.

Palavras-chave: Colecalciferol, 25–hidroxivitamina D, aloxana, sistema imune, hiperglicemia, *diabetes mellitus*.

ABSTRACT

BELLA, L.M. **Study of Vitamin D in experimental diabetes mellitus**. 2014. 100 f. (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Diabetes mellitus (DM) is a disease with high prevalence and morbidity worldwide, and the DM1 is responsible for 5-10% of cases. The vitamin D hormone pleiotropic action, can improve the course of T1DM, although the mechanisms are not fully elucidated. Thus, better understanding the action of this hormone can aid in prognosis as well as in understanding the possible mechanisms involved in the prevention of diabetes. We evaluated the physiological effects of vitamin D (800 IU/day/seven days, v.o.) in male mice (n=31, C57BL/6 strain) divided into four groups: Control + Water (CW, n=9); Control Vitamin D + (CV n=9); Diabetic + Water (DW, n=6) Diabetic + Vitamin D (VD, n=7). The mice induced-diabetes by alloxan (60 mg/kg, i.v.), when compared to controls, exhibited reduced body weight and plasma glucose concentrations were higher during the experimental period of 10 days (features insulinopenic state). However, vitamin D supplementation did not alter this condition. Diabetic mice, compared to controls, exhibited reduced body weight ($p < 0,05$) and plasma glucose concentrations ($p < 0,001$) higher during the trial period. Animals supplemented with vitamin D showed higher levels of 25 (OH) D than controls (CW vs CV, $p < 0,001$; DW vs DV, $p < 0,001$). Higher serum urea (CW vs. DW, $p < 0,05$; CW vs DV, $p < 0,01$; CV vs DA, $p < 0,05$; CV vs DV, $p < 0,01$) and creatinine (CW vs. DW, $p < 0,001$; CW vs DV, $p < 0,001$; CV vs DW, $p < 0,001$; CV vs DV, $p < 0,001$), thickening of Bowman's capsule, glomerular hypertrophy and destruction of hepatocytes were observed in diabetic mice compared to controls. However, vitamin D supplementation did not alter these conditions. The DW group showed lower serum albumin compared to CW ($p < 0,05$) and CV ($p < 0,05$) groups; lower hemoglobin ($p < 0,05$) and hematocrit ($p < 0,05$) compared to the DV group; and lower leukocyte counts compared to CW ($p < 0,05$) and mononuclear blood ($p < 0,05$) compared to the CW group. The results suggest that Vitamin D may influence the immune response in diabetic animals, modulating hematocrit, hemoglobin and serum albumin.

Keywords: Cholecalciferol, 25-hydroxyvitamin D, alloxan, immune system, hyperglycemia, diabetes mellitus.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1–	Diferenças entre as fórmulas estereoquímicas das vitaminas D ₂ e D ₃	1
Figura 2–	Representação esquemática dos processos de síntese, ativação e catabolismo da vitamina D ₃	4
Figura 3–	Protocolo Experimental	19
Figura 4–	Variação de peso	26
Figura 5–	Variação da glicemia.	26
Figura 6–	Avaliação dos níveis séricos de 25-hidroxivitamina D	29
Figura 7–	Avaliação do cálcio sérico	30
Figura 8–	Avaliação do fósforo sérico	30
Figura 9–	Avaliação temporal da glicemia	32
Figura 10–	Avaliação da ureia sérica	35
Figura 11–	Avaliação da creatinina sérica	35
Figura 12–	Tecido renal de camundongo	37
Figura 13–	Avaliação da albumina sérica	39
Figura 14–	Avaliação das proteínas totais séricas	39
Figura 15–	Avaliação da fosfatase alcalina sérica	41
Figura 16–	Avaliação da aspartato aminotransferase sérica	41
Figura 17–	Avaliação da alanina aminotransferase sérica	42
Figura 18–	Tecido hepático de camundongo	43
Figura 19–	Avaliação da hematimetria	46
Figura 20–	Avaliação da hemoglobina	46
Figura 21–	Avaliação do hematócrito	47
Figura 22–	Avaliação do volume corpuscular médio	48
Figura 23–	Avaliação da hemoglobina corpuscular média	48
Figura 24–	Avaliação da concentração de hemoglobina corpuscular média	49
Figura 25–	Avaliação das plaquetas	50
Figura 26–	Avaliação da leucometria	51
Figura 27–	Avaliação dos leucócitos mononucleares do sangue	52
Figura 28–	Avaliação dos leucócitos polimorfonucleares do sangue	52
Figura 29–	Tecido pulmonar de camundongo	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1–	Divisão dos animais segundo suplementação com vitamina D e diabetes	20
Tabela 2–	Divisão dos animais	27
Tabela 3–	Variação de peso durante o tratamento	33
Tabela 4–	Quantificação dos leucócitos pulmonares e peritoneais	54

LISTA DE ABREVIATURAS E FÓRMULAS

$1\alpha,23,25(\text{OH})_3\text{D}_3$	$1\alpha,23,25$ –trihidroxivitamina D_3
$1\alpha,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$	$1\alpha,24,25$ –trihidroxivitamina D_3
$1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	$1\alpha,25$ –diidroxivitamina D_3
$24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	$24,25$ –dihidroxivitamina D_3
$25(\text{OH})\text{D}$	25–hidroxicolecalciferol
7-DHC	7–desidrocolesterol
ADA	<i>American Diabetes Association</i>
ALT	Alanina aminotransferase
APC	Células apresentadoras de antígenos
AST	Aspartato aminotransferase
BB	<i>Biobreading</i>
cAMP	Adenosina monofosfato cíclica
CD8^+	<i>Cluster of differentiation 8</i>
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
CYP	Citocromo P
CYP27B1	Vitamina D_3 – 1α –hidroxilase
DBP	Proteína ligadora de vitamina D
DM	<i>Diabetes mellitus</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
E.P.M.	Erro padrão da média
GC	Guanilato ciclase
H/E	Hematoxilina/Eosina
Hb	Hemoglobina
HCM	Hemoglobina corpuscular média
Htc	Hematócrito
Htm	Hematimetria
IDF	<i>International Diabetes Foundation</i>
IL	Interleucina
INF	<i>Interferon</i>
GLUT	Transportador de glicose

LADA	<i>Diabetes</i> autoimune latente em adultos
LBA	Lavado Broncoalveolar
LPe	Lavado Peritoneal
MA	Macrófagos alveolares
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MHC-II	Complexo de histocompatibilidade de classe II
MP	Macrófagos peritoneais
NK	<i>Natural killer</i>
NOD	Camundongos diabéticos não obesos
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Tampão fosfato salina
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PIK3	Fosfatidilinositol-3-quinase
PKA	Proteína quinase A
PLC	Fosfolipase C
pH	Potencial Hidrogeniônico
ROS	Espécie Reativa de Oxigênio
RXR	Receptor de ácido retinóico
SBD	Sociedade Brasileira de Diabetes
STZ	Estreptozotocina
Th	Linfócito T auxiliar
TLR	Receptores do tipo <i>Toll</i>
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
TRAF	<i>TNF receptor associated factor</i>
Treg	Célula T regulatória
UV	Ultravioleta
VCM	Volume corpuscular médio
VDR	Receptor de vitamina D
VDRE	Elementos resposta da vitamina D
Vs	<i>Versus</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

>	maior que
%	porcento
/	dividido por
±	mais ou menos
μ	mi
μg	micrograma
μL	microlitro
μm	micrometro
dL	decilitro
fL	fentolitro
g	grama
Kg	kilograma
L	litro
mg	miligrama
mL	mililitro
mm	milímetro
mm ³	milímetro cúbico
ng	nanograma
nmol	nanomol
nm	nanômetro
°C	graus celcius
pg	picograma
rpm	rotação por minuto
U	unidade
UI	unidade internacional
x	multiplicado por
XX	vinte
α	alfa
β	beta
γ	gama

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Metabolismo da Vitamina D.....	1
1.2	Vitamina D e o Receptor de Vitamina D.....	4
1.3	Vitamina D em Roedores.....	6
1.4	Hipovitaminose D.....	6
1.5	Sistema Imune.....	8
1.6	Vitamina D e Sistema Imune.....	9
1.7	<i>Diabetes Mellitus</i>	11
1.7.1	<i>Diabetes Experimental</i>.....	13
1.7.2	Ação do Rim e do Fígado no Metabolismo da Glicose.....	14
1.7.3	<i>Diabetes Mellitus 1 e Vitamina D</i>.....	15
2	OBJETIVOS.....	17
2.1	Objetivo Geral.....	17
2.2	Objetivos Específicos.....	17
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1	Protocolo Experimental.....	19
3.2	Animais.....	19
3.3	Indução do <i>Diabetes Mellitus</i>	20
3.4	Suplementação com Vitamina D.....	20
3.5	Coleta Sanguínea e Monitoramento dos Parâmetros Bioquímicos e Hematológicos.....	21
3.6	Lavado Peritoneal e Broncoalveolar.....	21
3.7	Extração dos Tecidos e Análise Histológica.....	22
3.8	Análise Estatística.....	22
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	24
4.1	Caracterização do Modelo de <i>Diabetes Mellitus</i>	24
4.2	Avaliação da Suplementação de Vitamina D.....	28
4.3	Evolução Temporal dos Níveis Glicêmicos e dos Pesos Corporais	31
4.4	Avaliação da Suplementação de Vitamina D nos Rins e no Fígado.....	34
4.5	Avaliação dos Parâmetros Hematológicos.....	44
4.6	Avaliação da Suplementação de Vitamina D nos Leucócitos Pulmonares e Peritoneais.....	53
5	CONCLUSÃO.....	58
	REFERÊNCIAS.....	60
	ANEXOS.....	83

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Metabolismo da Vitamina D

Vitamina D é um termo impreciso que caracteriza um conjunto de moléculas secosteroides derivadas do 7-desidrocolesterol (7-DHC ou pró-vitamina D₃), cujas principais são a vitamina D₂ (calciferol ou ergocalciferol), produzida por fungos e plantas, e a vitamina D₃ (colecalciferol) sintetizada pelos mamíferos. Entretanto, estudos realizados, desde a metade do século XX, demonstraram que o colecalciferol e o ergosterol são pró-hormônios (FELDMAN et al., 2005; SILVA, 2007; PEREIRA; ALMEIDA, 2008), pois os níveis desses metabólitos são regulados por um mecanismo complexo de *feedback*, envolvendo enzimas e receptores, o que sugere uma regulação mais semelhante a dos esteroides do que a dos nutrientes (MARSHALL, 2008; WATERHOUSE et al., 2009). Todavia, essas estruturas ainda são descritas como vitaminas, devido o uso dessa classificação há quase um século (FELDMAN et al., 2005; SILVA, 2007; PEREIRA; ALMEIDA, 2008).

Além da origem diferente, a vitamina D₂ possui a mais que a vitamina D₃ um grupo metil (totalizando 28 átomos de carbono) e uma dupla ligação entre os carbonos 22 e 23 (Figura 1).

Figura 1—Diferenças entre as fórmulas estereoquímicas das vitaminas D₂ e D₃. A vitamina D₂ (ergocalciferol) possui uma dupla ligação entre os átomos de carbono 22 e 23 e um grupamento metil ligado ao carbono 24 a mais que a vitamina D₃ (colecalciferol).

Fonte: Adaptado de CASTRO, 2011.

O colecalciferol e o ergocalciferol podem ser obtidos através da dieta, embora poucos alimentos contenham quantidades substanciais dessas moléculas (CALVO et al., 2005; DOBNIG et al., 2008; PEREIRA; ALMEIDA, 2008; CASTRO, 2011). Como exemplo, pode citar o óleo de fígado de bacalhau, o salmão, a sardinha, a cavala, o atum, o fígado bovino, a gema de ovo e o shiitake (BORRADALE; KIMLIN, 2008; PEREIRA; ALMEIDA, 2008; LOPICCOLO; LIM, 2010). A ingestão desses alimentos consegue satisfazer entre 10 a 20% das necessidades fisiológicas diárias dos seres humanos, sendo a síntese cutânea a principal fonte de vitamina D corporal (HOLICK, 2007 e 2008; PEREIRA; ALMEIDA, 2008).

O ergocalciferol é produzido a partir do ergosterol, presente em fungos e vegetais, através da incidência dos raios ultravioletas (UV) B (290–315nm – HOLICK, 2007; OLIVEIRA, 2010). Em mamíferos, o início da síntese fotoquímica endógena da vitamina D₃ ocorre nas camadas mais profundas da epiderme (estratos espinhoso e basal). Os queratinócitos são expostos à radiação solar UVB, que cliva a ligação entre os carbonos 9 e 10 da pró-vitamina D₃ (7-DHC) e abre o anel B do ciclopentanoperidrofenantreno para formar a pré-vitamina D₃, uma forma inativa da vitamina D (Calciol – Figura 2). Após a síntese cutânea, ocorre isomerização térmica (37°C) da pré-vitamina D₃, presente entre as cadeias polares e os ácidos graxos da membrana celular dos queratinócitos, em vitamina D₃ (HOLICK et al., 1980; MACLAUGHLIN et al., 1982; BIKLE et al., 1989; TIAN et al., 1994; CASTRO, 2011; ROIDER et al., 2013). Embora essa molécula seja lipossolúvel, assim como os precursores e derivados do colecalciferol e do ergocalciferol, há incompatibilidade estereoquímica entre a mesma e as estruturas plasmáticas e a membrana celular. Dessa forma, a vitamina D₃ é secretada no meio extracelular. Como é produzida em uma região pouco vascularizada, acredita-se que ocorra difusão dessa estrutura da epiderme até o leito capilar dérmico. Ao entrar na circulação sanguínea, a vitamina D₃ se liga a uma alfa (α)₁-globulina, a Proteína Ligante da Vitamina D (DBP), que a transporta até o fígado. Nesse órgão, a ação da 25-hidroxilase produz o 25-hidroxicolecalciferol [25(OH)D], conhecido como 25-hidroxivitamina D ou calcidiol. Essa hidroxilação do carbono 25 pode ser realizada por várias isoformas hepáticas que pertencem ao complexo Citocromo (CYP) 450: CYP27A1 (mitocondrial), CYP2J2/3, CYP2DII, CYP2D25, CYP3A4 e CYP2R1 (microsossomais). A 25(OH)D, ligada à DBP entra na corrente sanguínea para ser transportada até o rim, principal órgão ativador dessa molécula. No tecido renal é metabolizada em 1α,25-

dihidroxitamina D_3 [$1\alpha,25(OH)_2D_3$] pela enzima vitamina D_3 - 1α -hidroxilase (CYP27B1). Esse metabólito, conhecido como $1\alpha,25$ -dihidroxicolecalciferol ou calcitriol, é a forma biologicamente ativa da vitamina D_3 (NORMAN; HENRY, 1974; HADDAD et al., 1993; TIAN et al., 1994; CHENG et al., 2003 e 2004; GUPTA et al., 2004; HOLICK, 2004 e 2008; PROSSER; JONES, 2004; YAMASAKI et al., 2004;PREMAOR; FURLANETTO, 2006; PEREIRA; ALMEIDA, 2008; GODAR et al., 2012).

O catabolismo da vitamina D_3 ocorre através da 24-hidroxilase (CYP24A1–Figura 2). Essa enzima mitocondrial está presente em maiores quantidades nos rins e no intestino, sendo expressa também em queratinócitos, fibroblastos, linfócitos, e macrófagos (ZIEROLD et al., 2003, CASTRO, 2011). A 24-hidroxilase atua na cadeia carbônica lateral da $25(OH)D$ e da $1\alpha,25(OH)_2D_3$ através de duas vias catabólicas. A primeira está relacionada à hidroxilação do carbono 23 do calcitriol. Essa reação produz a $1\alpha,23,25$ -trihidroxitamina D_3 [$1\alpha,23,25-(OH)_3D_3$] que é oxidada a $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D_3 -26,23-lactona. A segunda via é ativada através da hidroxilação do carbono 24 das moléculas de $25(OH)D$ e $1\alpha,25(OH)_2D_3$ para produzir, respectivamente, $24,25$ -dihidroxitamina D_3 [$24,25(OH)_2D_3$] e $1\alpha,24,25$ -trihidroxitamina D_3 [$1\alpha,24,25(OH)_3D_3$]. Esta é oxidada a ácido calcitroico, cuja excreção ocorre através dos sais biliares (HOLICK et al., 1973; YAMADA et al., 1984; REDDY; TSERNG, 1989; AKIYOSHI-SHIBATA et al., 1994; BECKMAN et al., 1996; SAKAKI et al., 2000; PROSSER; JONES, 2004; KAUFMANN et al., 2011; JONES et al., 2013).

Figura 2—Representação esquemática dos processos de síntese, ativação e catabolismo da vitamina D₃. O 7-desidrocolesterol, presente nos queratinócitos, absorve radiação UVB para sintetizar a pré-vitamina D₃ que, após isomerização térmica, forma a vitamina D₃ (colecalfiferol). No fígado ocorre hidroxilação no carbono 25 e formação da 25-hidroxivitamina D [25(OH)D], através da ação das isoformas enzimáticas do Citocromo P450 (CYP450) da 25-hidroxilase. A ação renal da 1α-hidroxilase (CYP27B1) gera o metabólito ativo da vitamina D₃: 1α,25(OH)₂D₃. O catabolismo da vitamina D₃ é proveniente da ação do CYP24A1 que pode gerar a 24,25 (OH)₂ D₃, a 1α ,25 (OH)₂ D₃–26,23–lactona bem como o ácido calcitrico.

Fonte: Adaptado de PROSSER; JONES, 2004.

1.2 Vitamina D e o Receptor de Vitamina D

O receptor de vitamina D (VDR), descrito pela primeira vez por Brumbaugh e Haussler em 1973, é um fator de transcrição nuclear que pertence à superfamília de receptores nucleares para hormônios esteroides (NISHII; OKANO, 2001; FELDMAN et al., 2005; CARRILLO-LÓPEZ et al., 2009; SCHUCH, 2011).

Para exercer sua atividade biológica, a 1α,25(OH)₂D₃ se liga à DBP presente no sangue, penetra a membrana celular e se liga ao VDR. O complexo formado interage com o receptor de ácido retinóico (RXR) e forma heterodímeros que atuam sobre as regiões promotoras de genes-alvos, denominadas elementos resposta da vitamina D (VDRE). Dessa forma, inicia-se uma cascata de interações moleculares que regulam a transcrição bem como a supressão de genes específicos (MATHIEU,

2005; NORMAN, 2008; CARRILLO-LÓPEZ et al., 2009; OLIVEIRA, 2010; SCHUCH, 2011). Essa via de ativação é denominada resposta genômica da vitamina D. Estima-se que esse processo envolva de 0,5 a 5% de todo genoma humano (NORMAN, 2008; HOLICK, 2008; YU; CANTORNA, 2011; ZHANG; HO, 2011).

O VDR também apresenta respostas não genômicas, que ocorrem através da interação da $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ com o VDR localizado em invaginações das membranas celulares ricas em esfingolipídios e colesterol (REVELLI et al.; 1998; HUHTAKANGAS et al., 2004). A ligação da $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ a esses receptores pode desencadear diversas respostas, tais como: ativação das vias guanilato ciclase (GC), fosfatidilinositol-3-quinase (PIK3 – MASSHEIMER et al., 1994), Adenosina monofosfato cíclica (cAMP), *mitogen-activated protein kinase* (MAPK – FELDMAN et al., 2005); proteína quinase (PK)A e fosfolipase C (PLC – NORMAN, 2006); abertura dos canais de cálcio e cloro dependentes de voltagem (ZANELLO; NORMAN, 1997; NORMAN et al., 2006) e mobilização de cálcio do retículo sarcoplasmático (LE MELLAY et al., 1997; NORMAN et al., 2006). Esses mecanismos são descritos nos processos de migração das células musculares lisas do endotélio, na rápida absorção de cálcio pelo epitélio duodenal e na exocitose de insulina pelas células beta (β) do pâncreas (NORMAN et al., 2006).

O VDR e a enzima 1α -hidroxilase são expressos em diversas células, como: mamárias, prostáticas, neurônios, adipócitos, enterócitos, musculares e do sistema imune. Essas células são capazes de sintetizar a $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ e, consequentemente, responder a esse hormônio através de seus respectivos VDR. Dessa forma, ocorrem as ações intrácina, parácina e endócrina da vitamina D (BINDERUP, 1992; WALTERS, 1992; MILLER; PORTALLE, 1999; MATHIEU, 2005; HEWISON et al., 2007; NORMAN, 2008; PETERLIK; CROSS, 2009; VERHAVE; SIEGERT, 2010; SCHUCH, 2011).

1.3 Vitamina D em Roedores

Os dados presentes na literatura, sobre o metabolismo da vitamina D em roedores, são limitados e podem divergir entre as linhagens. Os primeiros estudos de Halloran (1979) e colaboradores indicam que os metabólitos circulantes, incluindo 25(OH)D, são sintetizados em ratos recém-nascidos.

Bolton e colaboradores (2013) avaliaram os níveis séricos de 25(OH)D em camundongos machos e fêmeas das linhagens C57BL/6 e Biozzi (idade média de 3–4 semanas). Em ambas as comparações, eles verificaram que as fêmeas, em relação aos machos, possuem níveis séricos desse hormônio mais elevados. Na linhagem C57BL/6, os valores encontrados foram $74,7 \pm 1,8$ nmol/L (machos) e $87,2 \pm 2,0$ nmol/L (fêmeas). Na linhagem Biozzi, os camundongos machos e fêmeas apresentaram, respectivamente, $54,2 \pm 3,2$ nmol/L e $63,3 \pm 4,8$ nmol/L de 25(OH)D. Entretanto, Brouwer-Brolsma e colaboradores (2014) verificaram que camundongos machos (C57BL/6j RJ), após 24 meses de idade, apresentavam níveis séricos de 25(OH)D inferiores a 50 nmol/L.

1.4 Hipovitaminose D

A hipovitaminose D é descrita na literatura como um problema clínico de proporções globais. Embora se estime que um bilhão de pessoas em todo o mundo sejam acometidas por essa comorbidade, muitos casos não são diagnosticados nem tratados adequadamente, ocasionando uma epidemia oculta (JAMES, 2008; DAWSON-HUGHES et al., 2010; OLIVEIRA, 2010).

A 25(OH)D pode ser considerada o marcador mais adequado dos estoques fisiológicos de vitamina D, pois sua concentração sérica, que é aproximadamente mil vezes a da $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, indica o somatório da produção biológica proveniente da exposição solar e da dieta. Além disso, a 25(OH)D possui meia vida sérica de 2–3 semanas, enquanto a da $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ é de 6 horas (MOSEKILD, 2005; HOLICK, 2009; OLIVEIRA, 2010; DONKENA; FELDMAN et al., 2011; YOUNG, 2011).

A classificação referente à normalidade dos níveis séricos da 25(OH)D ainda é discutida na literatura. Entretanto, segundo as diretrizes da sociedade americana de endocrinologia, há insuficiência de vitamina D quando os níveis séricos de 25(OH)D estiverem entre 21–29 ng/mL ($52,5$ – $72,5$ nmol/L). Indivíduos com deficiência desse

hormônio apresentam níveis séricos inferiores a 20 ng/mL (50 nmol/L). Os valores são geralmente expressos em nmol/L ou ng/mL (1 ng/mL corresponde a 2,496 nmol/mL – Holick et al., 2011).

Segundo SIM e colaboradores (2010), a deficiência de vitamina D pode elevar o risco de anemia, reduzir os níveis de hemoglobina e elevar a demanda fisiológica de substâncias que estimulam a eritropoiese.

O processo de envelhecimento cutâneo diminui a produção de vitamina D, devido à redução 7-DHC. Holick e colaboradores (1989), ao exporem jovens (20–30 anos) e idosos (62–80 anos) à mesma intensidade de raios solares ultravioletas, demonstraram que a população idosa consegue sintetizar apenas 20% da quantidade produzida pelos jovens. Segundo Bandeira e colaboradores (2003), a deficiência de vitamina D aumenta significativamente com a idade, sendo 30% nas mulheres entre 50 e 60 anos de idade e mais de 80% nas mulheres com idade superior a 80 anos.

Nos Estados Unidos (EUA) a deficiência hormonal é de 36% em adultos jovens e 42% em mulheres negras entre os 15 e os 29 anos (ADEGHATE et al., 2006). Estudos realizados no Brasil demonstram que a prevalência de baixos níveis de 25(OH)D é de 60% nos adolescentes, 40% a 58% entre adultos jovens, e 42% a 83% em idosos (PREMAOR et al., 2008). Peters e colaboradores (2009), durante o outono de 2006, diagnosticaram prevalência de hipovitaminose D em 60% dos adolescentes saudáveis, com idade entre 16 a 20 anos, moradores da zona rural do estado de São Paulo. Já na capital, os idosos saudáveis apresentaram prevalência de 43,8%, aumentando para 71,2% quando se tratava de institucionalizados (SARAIVA et al., 2007).

Uma possível explicação para essa situação está na maioria dos habitantes de centros urbanos desenvolvidos não se exporem por tempo suficiente à luz solar para produzir quantidades adequadas de vitamina D (HOLICK, 2006a). A exposição insuficiente ao sol, localização geográfica, cor da pele, índice de massa corporal, estação do ano e o uso de protetor solar são fatores que interferem nos níveis de 25(OH)D (PREMAOR et al., 2008; CHRISTENSEN et al., 2010; OLIVEIRA, 2010; HOLICK et al., 2011). Além disso, a disponibilidade desse hormônio em alimentos é pequena e a sua suplementação não é realizada de modo universal e adequada (HOLICK, 2006a; VIET, 2006).

Muitos trabalhos científicos associam os baixos níveis desse hormônio ao aumento de infecções, neoplasias, síndromes metabólicas, doenças cardiovasculares, bem como ao aumento da mortalidade global (ARNSON et al., 2007; TIMONEN et al., 2007; LAAKSI et al., 2007; DOBNIG et al., 2008; CANTORNA, 2010; KAMEN; TANGPRICHA, 2010; OLIVEIRA, 2010).

A relação entre a vitamina D e as doenças autoimunes também tem sido demonstrada. Esclerose múltipla e doenças inflamatórias intestinais são mais frequentes em países do hemisfério norte, onde a incidência de luz solar e, conseqüentemente, os níveis de 25(OH)D são menores (VAGIANOS et al., 2007; RAGHUWANSHI; JOSHI; CHRISTAKOS, 2008; SHAPIRA; AGMON-LEVIN; SHOENFELD, 2010). Além disso, o agravamento dessas doenças é maior durante o inverno, estação do ano cujos níveis de 25(OH)D são menores (SHOENFELD; AMITAL; SHOENFELD, 2009).

1.5 Sistema Imune

O sistema imunológico protege o indivíduo contra infecções através das respostas inata (natural) e/ou adaptativa (adquirida). A resposta adaptativa é dividida em imunidade humoral e celular e envolve respostas antigênicas mediadas por células T, células B e células de memória (COQUERELLE; MOSER, 2010; IWASAKI, MEDZHITOV, 2010; AKIRA, 2011; KURODA, COBAN; ISHII, 2013; PETERSEN; SMITH, 2013). A imunidade humoral envolve a eliminação de microrganismos através de anticorpos produzidos pelos linfócitos B. Entretanto, a imunidade celular, mediada pelas células T CD8⁺, atua contra patógenos intracelulares e células tumorais (AKIRA, 2010).

A imunidade inata é uma resposta contra infecções e lesões teciduais, que envolve componentes moleculares (complemento, proteínas de fase aguda e citocinas), células que liberam mediadores inflamatórios (basófilos, mastócitos e eosinófilos), células *natural Killer* (NK) e fagócitos (neutrófilos monócitos e macrófagos—DELVES; ROITT, 2000; AKIRA, 2010; BACCALA et al., 2009; THEOFILOPOULOS et al., 2011).

Os macrófagos teciduais são células hematopoiéticas especializadas que podem ser derivadas de monócitos ou da proliferação local de unidades formadoras de colônias de macrófagos residentes (GORDON; TAYLOR, 2005; STRAUSS-AYALI;

CONRAD; MOSSER, 2007; ZHANG; GONÇALVES; MOSSER, 2008). Embora essas células se distribuam por diferentes tecidos do corpo e possam agir na homeostase, na remodelação tecidual e na defesa contra partículas estranhas e microrganismos, a morfologia e a função são determinadas pelo estágio de ativação celular e o microambiente tecidual (TAKAHASHI, 2000; GORDON; TAYLOR, 2005; LAMBRECHT, 2006; MOSSER; EDWARDS, 2008). Com isso, os macrófagos podem participar das respostas inata, através da fagocitose, e adaptativa, agindo como uma célula apresentadora de antígenos (APC) para iniciar as respostas das células T (PEISER; GORDON, 2001; PEISER; MUKHOPADHYAY, 2002; ADEREM, 2003).

No pulmão, os macrófagos alveolares (MA) são as principais células livres, que residem nos espaços aéreos distais, envolvidas na proteção do trato respiratório inferior contra bactérias e partículas inaladas. Essas células exercem diversas funções, como fagocitose, apresentação de antígenos e produção de citocinas, fatores de crescimento e enzimas (FELS; COHN, 1986; LAPLANTE; LEMAIRE, 1990; HAUSCHILDT; KLEINE, 1995; CHEUNG; HALSEY; SPEERT, 2000; FÉREOL et al., 2006; NATHAN, 2008; MOSSER; EDWARDS, 2008; SUNAHARA; MARTINS, 2012). Além disso, apresentam também alta mobilidade, facilitando a ação no interior dos brônquios bem como a migração para tecidos inflamados (LAPLANTE; LEMAIRE, 1990; FÉREOL et al., 2006).

No interior da cavidade peritoneal, os macrófagos peritoneais (MP) também são as principais células de proteção. Na presença de lesão peritoneal, eles produzem citocinas, como *Transforming Growth Factor* (TGF) β , fator de necrose tumoral (TNF) e *Platelet-derived growth factor* (PDGF), para estimular a remodelação da região afetada através da proliferação de fibroblastos (SUASSUNA et al., 1994; TOPLEY; MACKENZIE; WILLIAMS, 1996; NAGY; JACKMAN, 1998).

1.6 Vitamina D e o Sistema Imune

A principal função da vitamina D é regular os níveis séricos de cálcio e fósforo (HOLICK, 2006b, 2007). Entretanto, a regulação do sistema imune por esse hormônio tem sido demonstrada em estudos *in vitro* e *in vivo* (KHOO et al., 2011). A $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ influencia a maturação, o crescimento, a diferenciação, a apoptose, a adesão celular, a produção/inibição de citocinas, a expressão de potentes peptídeos antimicrobianos em diferentes células imunes, bem como a ampliação do potencial

oxidativo dos macrófagos (STAEVA-VIEIRA; FREEDMAN, 2002; VAN; MATHIEU, 2005; HOLICK, 2007; ALVAREZ-RODRIGUEZ et al., 2012). Esses fatores têm sido relacionados à expressão de VDR nas células do sistema imunológico (ALVAREZ-RODRIGUEZ et al., 2012).

A $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ age na resposta imunológica mediada por linfócitos B, induzindo apoptose e inibindo sua proliferação. Além disso, reduz a geração de células B de memória, a diferenciação em plasmócitos e a produção de imunoglobulinas (ADORINI; PENNA, 2008).

Nas células dendríticas, o calcitriol inibe o desenvolvimento celular e diminui a capacidade de apresentar antígeno ao reduzir a expressão do complexo de histocompatibilidade de classe (MHC) II e das moléculas coestimuladoras CD40, CD80, CD86, bem como a produção de interleucina (IL)12, sendo essa última fundamental para o desenvolvimento dos linfócitos auxiliares (Th)1 (D'AMBROSIO et al., 1998; MATHIEU, 2005; ADORINI ; PENNA, 2008; HART; GORMAN; FINLAY-JONES, 2011). Além disso, foi demonstrado que a $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ estimula a produção de IL-10 nessas células (ADORINI ; PENNA, 2008; BAEKE et al., 2008).

A $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ pode estimular a proliferação de monócitos *in vitro*. Além disso, pode elevar, em monócitos e macrófagos, a quimiotaxia, a capacidade fagocítica bem como a produção de IL-1 e catelicidinas (XU et al., 1993; HOLICK, 2007; MORA; IWATA; ANDRIAN, 2008). Estudos demonstram que o aumento da expressão de VDR e 1α -hidroxilase em macrófagos e células dendríticas permite essas células se autorregulem, bem como controlarem as células imunológicas vizinhas (HART et al., 2011).

Nas células T ativas há também aumento da expressão de VDR bem como de 1α -hidroxilase, o que facilita a interação do receptor com a $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (BAEKE et al., 2010). Esse mecanismo reduz a produção de *Interferon* gama (INF γ), IL-2, IL-6, IL-17, IL-22 e IL-23. Entretanto, esse hormônio aumenta a produção de IL-4, IL-5, IL-10 (BOONSTRA et al., 2001; BARRAT et al., 2002; PENNA et al., 2006; CHEN et al., 2007; DANIEL et al., 2008; MORA et al., 2008; BAEKE et al., 2010). Dessa forma, há inibição/redução do desenvolvimento de linfócitos proinflamatórios Th1 e Th17, bem como elevação da proliferação de Th2 e das células T reguladoras (*Treg* – PENNA et al., 2000; GORMAN et al., 2007; DANIEL et al., 2008; BAEKE et al., 2010; SUN, 2010; VON ESSEN, 2010; KHOO; CHAI; KOENEN, 2011; SIGMUNSDOTTIR, 2011; STERLING et al., 2012).

1.7 *Diabetes Mellitus*

A Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD, 2012-2013) recomenda a classificação proposta pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e pela *American Diabetes Association* (ADA) que caracteriza *Diabetes Mellitus* (DM) como um grupo de doenças metabólicas resultantes de defeitos na secreção e/ou ação de insulina, causando, principalmente, hiperglicemia (ADA, 2012).

As complicações do DM incluem retinopatia, nefropatia (pode culminar em insuficiência renal) e neuropatia periférica (úlceras nos pés—ADA, 2012).

A disfunção insulínica interfere no metabolismo dos carboidratos, lipídeos e proteínas, gerando hiperglicemia. Esse quadro é responsável pelos principais sintomas relatados pelos pacientes diabéticos: poliúria, polidipsia, emagrecimento, polifagia e visão turva (ADA, 2012).

A classificação do DM, segundo a ADA (2012), inclui quatro classes: DM1, DM tipo 2 (DM2), outros tipos específicos de DM e DM gestacional.

De acordo com as estimativas da *International Diabetes Foundation* (IDF), mais de 382 milhões de pessoas no mundo são diabéticas, sendo que o DM2, classe mais prevalente, é responsável por 300 milhões de casos (IDF, 2013). Indivíduos sedentários, obesos e com histórico familiar positivo para DM2 possuem maior probabilidade de desenvolver a doença (ZIMMET; ALBERTI; SHAW, 2001; TAKIISHI et al, 2010).

Os mecanismos exatos que desenvolvem o DM2 ainda são desconhecidos, embora obesidade, hábitos alimentares, sedentarismo e fatores genéticos estejam envolvidos. A combinação da resistência insulínica com a resposta compensatória inadequada à secreção desse hormônio causa hiperglicemia, o que favorece o acometimento de órgãos e tecidos. Entretanto, os sintomas oriundos dessas complicações podem permanecer ausentes nos paciente durante um longo período (ADA, 2012).

O DM1, presente em 5%–10% dos casos (OMS, 2013), geralmente acomete crianças e adolescentes. Entretanto, o DM1 pode se manifestar em adultos de forma lenta e progressiva, o que caracteriza o diabetes autoimune latente em adultos (LADA—TAKIISHI et al, 2010).

O DM1 é um distúrbio autoimune, cujas destruições das células β do pâncreas e insulite resultam na perda lenta e progressiva da secreção de insulina e,

consequentemente, em distúrbios metabólicos e alterações teciduais. Entretanto, os mecanismos pelos quais a autoimunidade é gerada precisam ser mais elucidados (LA TORRE, LERNMARK; 2010; OLIVEIRA, 2010; ATKINSON et al., 2011; ATKINSON, 2012; HASSAN et al., 2012; SBD, 2012-2013). O mimetismo molecular, a expressão defeituosa do MHC nas células do sistema imune, bem como a quebra da tolerância central e/ou periférica são alguns mecanismos utilizados para tentar explicar o desenvolvimento da autoimunidade contra as células β (BLUESTONE, 2010; ATKINSON et al., 2011).

O processo inicial do DM1 ocorre com a apresentação de autoantígenos específicos das células β do pâncreas pelas APC através das moléculas do MHC de classe II, às células T auxiliares $CD4^+$ (Th0). Macrófagos e células dendríticas secretam IL-12 que promove a diferenciação das células Th0 em células Th1, estimulando-as a secretar IFN γ e IL-2. Essas citocinas induzem a migração das células T citotóxicas $CD8^+$, específicas contra os autoantígenos das células β . Associadas ao MHC de classe I, as células citotóxicas matam as células alvo, através de apoptose mediada por Fas e liberação de granzima e perforina. Além disso, o IFN γ estimula macrófagos em repouso a liberar outras citocinas como IL- 1β , TNF α e radicais livres, tóxicos para células β (KUKREJA; MACLAREN, 1999; ICHINOSE; KAWASAKI; EGUCHI, 2007; MAHON; SOSENKO; RAFKIN-MERVIS, 2009; OLIVEIRA, 2010).

1.7.1 *Diabetes Experimental*

Os modelos animais experimentais são amplamente utilizados no estudo dos mecanismos envolvidos no curso das doenças. No DM, eles são divididos em espontâneo e quimicamente induzidos (REES; ALCOLADO, 2005).

O DM espontâneo é usado para estudar os defeitos imunológicos e a predisposição genética envolvidos no DM1. Os modelos mais utilizados são o rato BB (*Biobreading*) e o NOD (LEITER; HERRATH, 2004; REES; ALCOLADO, 2005).

O DM induzido pode ser obtido através da administração de substâncias, como a aloxana e a estreptozotocina (STZ), que promovem a destruição das células β do pâncreas (SZKUDELSKI, 2001; REES; ALCOLADO, 2005).

A STZ, nas concentrações de 160 a 250 mg/kg, danifica o material genético das células β . Dessa forma, há inibição da biossíntese e da secreção de insulina. Em doses menores (40mg/kg) pode produzir insulite pancreática (RAYAT et al., 2000; REES; ALCOLADO, 2005).

A aloxana é uma droga hidrofílica, cuja meia-vida é 90 segundos em pH neutro à 37°C, foi descrita pela primeira vez em 1818 por Brugnatelli, Dunn, Sheehan e McLethie (1943). Ao estudarem o efeito da sua administração em coelhos, eles observaram necrose das ilhotas pancreáticas, o que possibilitou o uso dessa droga para estabelecer um modelo animal de DM dependente de insulina (DUNN; McLETHIE, 1943; LENZEN; MUNDAY, 1991; SZKUDELSKI, 2001).

A dose de administração depende da via (peritoneal, subcutânea e intravenosa), da espécie e do quadro nutricional do animal (SZKUDELSKI, 2001).

Após a administração, a droga é transportada do sangue para o interior da célula através do transportador de glicose (GLUT) 2. No citosol, a aloxana prejudica a liberação da insulina induzida pela glicose através da inibição da glucoquinase (hexoquinase IV), uma das principais enzimas que favorecem a regulação da glicemia nas células β . Além disso, induz a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), culminando na necrose seletiva das células β , bem como a dependência de insulina (GORUS et al., 1982; LENZEN, 2008; WEAVER et al., 1978).

1.7.2 Ação do Rim e do Fígado no Metabolismo da Glicose

Os níveis plasmáticos de glicose, rigidamente controlados para suprir a demanda energética do cérebro, são regulados através da combinação de fatores que contribuem para aumentá-los (ingestão e absorção intestinal de carboidratos) ou diminuí-los (utilização pelos tecidos periféricos, perda através dos túbulos renais e remoção hepática). Fígado, rim, músculo esquelético e intestino são os principais órgãos envolvidos no processo (NORDLIE; ARION, 1964; NORDLIE; FOSTER, 1999; SAUERWEIN; SCHOLS, 2002).

A glicose-6-fosfato, responsável por regular a última etapa enzimática comum aos processos de glicogenólise (formação de glicose a partir da quebra do glicogênio) e gliconeogenese (formação de glicose a partir de aminoácidos ou ácidos graxos), é expressa apenas nos rins, fígado e intestino (SAUERWEIN; SCHOLS, 2002).

A ação renal na homeostase glicêmica, descrita pela primeira vez na década de 1930 (BERGMAN; DRURY, 1938), pode ocorrer através de três mecanismos. O primeiro envolve a liberação de glicose para a circulação via gliconeogênese. O segundo está relacionado à absorção de glicose para manutenção da demanda energética. Por último, a glicose é reabsorvida do filtrado glomerular para sangue para conservar os átomos de carbono (GERICH, 2010).

O fígado é a principal fonte de glicose corpórea em jejum. A manutenção do processo ocorre através da captação (glicogênese, ou seja, formação de glicogênio a partir de moléculas de glicose) e da liberação (gliconeogênese e glicogenólise) de glicose (SAUERWEIN; NORDLIE; FOSTER; LANGE, 1999; SCHOLS, 2002). Dessa forma, alterações renais e hepáticas provenientes do DM podem comprometer o metabolismo da glicose, bem como o da vitamina D (BAQUER, GUPTA; RAJU, 1998; HOLICK, 2004).

1.7.3 *Diabetes Mellitus 1* e Vitamina D

A relação entre o DM e a vitamina D tem sido demonstrada em humanos e animais. Devido às propriedades imunomoduladoras da vitamina D e seus análogos, estudos sugerem que essas moléculas possam ser agentes potenciais utilizados na prevenção, bem como na cura do DM1 (MATHIEU et al., 1994; DECALLONNE et al., 2005). Mathieu e colaboradores (1994) demonstraram, em camundongos diabéticos não obesos (NOD), que a administração de $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, ao longo da vida, pode prevenir o desenvolvimento de diabetes e insulite. Esse efeito estaria associado à redução de células T efetoras, bem como à indução de células Treg (GREGORI et al., 2002). Embora o tratamento tenha mostrado resultado positivo, hipocalcemia e remodelação óssea foram observadas (MATHIEU et al., 1994). Ao analisar o efeito da administração de $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ em ratos wistar tornados diabéticos (estreptozotocina, 60mg/kg), Del Pino-Montes e colaboradores (2004) observaram que houve restauração da densidade mineral óssea dos animais tratados em relação aos controles. Além disso, Hypponen e colaboradores (2001) demonstraram que humanos, ao ingerirem 2000 UI de vitamina D durante o primeiro ano de vida, podem ter o risco reduzido de desenvolver DM1.

A influência da vitamina D no curso do DM 1, embora não esteja completamente elucidada, tem sido atribuída a interação com o VDR. Esse mecanismo agiria nas vias de sinalização responsáveis pela autotolerância, culminando na redução da capacidade de apresentação de antígenos pelas APC (PENNA; ADORINI, 2000) e no aumento das células Treg, bem como das células Th2 (DRIVER et al., 2011).

Sendo assim, ampliar o conhecimento sobre a ação desse hormônio no DM1 pode auxiliar no prognóstico, bem como na compreensão dos possíveis mecanismos envolvidos na prevenção do DM.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar o efeito da suplementação de vitamina D em camundongos saudáveis e diabéticos.

2.2 Objetivos Específicos

- a) Avaliar a celularidade no lavado peritoneal (LPe) e no lavado broncoalveolar (LBA);
- b) Avaliar os níveis séricos de 25(OH), cálcio e fósforo;
- c) Avaliar os marcadores renais e hepáticos, através da dosagem sérica de: fosfatase alcalina, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), ureia, creatinina, albumina, proteínas totais;
- d) Avaliar os parâmetros hematológicos: hematimetria (Htm), leucometria, hematócrito (Htc), hemoglobina (Hb), plaquetas, volume corpuscular médio (VCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e hemoglobina corpuscular média (HCM);
- e) Avaliar a morfologia renal, hepática e pulmonar.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3 METODOLOGIA

3.1 Protocolo Experimental

Figura 3. Protocolo experimental.

3.2 Animais

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (CEUA/FCF/389–anexo). Foram utilizados camundongos machos da linhagem C57BL/6, com peso médio inicial de 25 gramas e idade de, aproximadamente, 9 semanas. Os animais foram fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Nesse mesmo local, os camundongos foram acondicionados em gaiolas coletivas, contendo no máximo cinco roedores, com ciclo artificial claro/escuro de 12 horas, a temperatura ambiente constante de 22°C. Os suprimentos de água e alimento ficaram disponíveis todo o tempo.

3.3 Indução do *Diabetes Mellitus*

Para indução do DM1, os animais foram submetidos a jejum de 12 horas. A aloxana (60 mg/kg), dissolvida em 100 µL solução salina fisiológica, foi administrada por via endovenosa. Os animais controles receberam volume equivalente de solução salina, pela mesma via. A glicemia foi determinada através de um monitor de glicose (Accu-Check Active–Roche Diagnosis®), utilizando-se amostras de sangue obtidas da extremidade da cauda dos animais. Somente animais com glicemia superior a 300 mg/dL (16,6 mM) foram utilizados nos grupos diabéticos (SPILLER, 2012).

3.4 Suplementação com Vitamina D

Os animais foram distribuídos em quatro grupos: Controle + Água (CA); Controle + Vitamina D (CV); Diabético + Água (DA) e Diabético + Vitamina D (DV) como descrito na Tabela 1. A suplementação com 800 UI de vitamina D (Sanofi Aventis, São Paulo) ou água foi por via oral (4 gotas), durante 7 dias. A última dose foi administrada 24 horas antes dos experimentos para reduzir as alterações endócrinas provenientes da manipulação do animal durante a administração oral do hormônio (modificado GEORGE et al, 2012 e KIKUTA et al., 2013).

Tabela 1–Divisão dos animais segundo suplementação com vitamina D e diabetes.

Grupos de Animais	Suplementação	Quantidade de Animais
Controle + Água (CA)	Água	9
Diabético + Água (DA)	Água-	6
Controle + Vitamina D (CV)	Vitamina D800 UI	9
Diabético + Vitamina D (DV)	Vitamina D800 UI	7
	Total	31

3.5 Coleta Sanguínea e Monitoramento dos Parâmetros Bioquímicos e Hematológicos

Os animais foram anestesiados através da administração intraperitoneal de uma solução composta por cloridrato de ketamina (Dopalen[®], Ceva, Br-50 mg/kg) e cloridrato de xilazina (Dopalen[®], Ceva, Br-50 mg/kg).

Após anestesia, o sangue, utilizado nas análises hematológicas e bioquímicas, foi coletado através de punção intracardiaca.

Uma amostra composta por 0,5 mL de sangue, acrescida de 10 µL de solução (10%) de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), foi utilizada para analisar os parâmetros hematológicos: Htm, leucometria, Htc, Hb, plaquetas, VCM, CHCM e HCM. Todas as análises foram realizadas através de analisador automático (ABCvet[®]).

O restante do sangue coletado foi acondicionado em tubo isento de anticoagulante. A amostra foi centrifugada, 1500 rotações por minuto (rpm) durante 10 minutos, para obtenção do soro que foi utilizado, pelo analisador automático (LabMax 240[®]), na análise dos seguintes parâmetros bioquímicos: cálcio iônico, fósforo, proteínas totais, albumina, AST, ALT, fosfatase alcalina, ureia e creatinina. A 25(OH)D foi analisada através da técnica de *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA–Euroimmune[™]). Amostras de sangue periférico, coletadas da cauda do animal, foram utilizadas para a determinação da glicemia (monitor de glicose Accu–Check Active–Roche Diagnosis[®]) durante o período experimental.

3.6 Lavado Peritoneal e Broncoalveolar

A pele da região abdominal foi removida para injetar 5 mL de tampão fosfato salina, pH 7.4 (PBS), na cavidade peritoneal. O abdômen foi massageado e as amostras de LPe foram coletadas.

Na coleta do LBA, os pulmões foram lavados com 5mL (5 infusões de 1 mL) de PBS, utilizando-se tubo de polietileno de 1 mm de diâmetro, inserido na traqueia. Após a coleta, o material (LPe e LBA) foi centrifugado (1500 rpm, 10 min, 4°C) e as células ressuspensas em PBS (NUNES et al., 2007; MARTINS et al., 2008).

Para contagem do número total de células no LPe e LBA, à 20 µL de suspensão celular, foram adicionados 20 µL de cristal violeta a 0,5% (dissolvido em 30% de

ácido acético). Os valores foram obtidos através da contagem em câmara de Neubauer (NUNES et al., 2007; MARTINS et al., 2008).

Na contagem diferencial, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* celular foi ressuspensionado em 1 mL de PBS. Foram adicionados em cada lâmina 200 µL dessa suspensão. As amostras foram centrifugadas a rotação de 500 rpm durante 5 minutos. A contagem diferencial foi realizada por microscopia óptica após coloração com Hema 3 (Bioch. Sci. Inc., NJ, E.U.A – NUNES et al., 2007; MARTINS et al., 2008).

3.7 Extração dos Tecidos e Análises Histológicas

Rim, fígado e pulmão foram extraídos e, posteriormente, fixados em solução de formaldeído (10%).

Os tecidos, fixados em Bouin (aproximadamente 8 horas), foram desidratados em etanol, utilizando-se concentrações crescentes (70% a 100%), diafanizados em xilol e incluídos em parafina. Os cortes transversais (5 µm de espessura), obtidos após a inclusão, foram corados com hematoxilina e eosina (H/E).

Após a coloração, o material foi novamente desidratado, diafanizado e montado com Entellan® (entre lâmina e lamínula), para obter um preparado permanente. As lâminas contendo os tecidos foram observadas e fotografadas em microscópio de luz Nikon Eclipse 80i com o auxílio do programa de imagem NIS-Elements AR.

3.8 Análise Estatística

Os resultados, representados por média $\pm$ erro padrão da média (e.p.m.), foram avaliados pela análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de múltiplas comparações de Tukey-Kramer. Os dados foram processados e analisados através do programa GraphPad InStat 3. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

O presente estudo analisou a influência da suplementação de vitamina D no modelo experimental de DM1.

Estudos prévios demonstraram que a vitamina D possui ação pleiotrópica (VERSTUYF et al., 2010), influenciando no curso fisiopatológico das doenças autoimunes (AGMON-LEVIN et al., 2013).

A relação entre a vitamina D e o DM1, embora muitos pesquisadores a caracterizem como benéfica, ainda não é totalmente elucidada (AGMON-LEVIN et al., 2013). Além disso, sabe-se que as alterações metabólicas oriundas da disfunção da ação e da secreção da insulina pode influenciar o curso do diabetes (OLIVEIRA; BRAGA; FERNANDES, 2013).

Considerando os fatores supracitados, o estudo foi direcionado para avaliar e compreender o efeito da suplementação de vitamina D na fisiopatologia do DM 1.

4.1 Caracterização do Modelo de *Diabetes Mellitus*

O modelo de diabetes induzido por aloxana tem sido utilizado pelo nosso grupo como um modelo animal de diabetes insulino-dependente. O diabetes experimental pode ser induzido em animais através da administração de drogas que destroem seletivamente as células β pancreáticas. Os agentes diabetogênicos mais comuns são aloxana e estreptozotocina, que agem nas ilhotas pancreáticas através da produção de ROS (SZKUDELSKI, 2001; REES, ALCOLADO; 2005).

Embora estudos demonstrem que a aloxana seja metabolizada pelo fígado, os hepatócitos são resistentes à ação das ROS (MALAISSE et al., 1982; TIEDGE et al., 1997; SZKUDELSKI, 2001). A nefrotoxicidade pode ocorrer devido à administração de altas doses dessa droga (LENZEN et al., 1996). Entretanto, Song e colaboradores (2007) demonstraram que camundongos machos Balb/c não desenvolvem nefropatia diabética no período de oito semanas após a injeção intraperitoneal de aloxana (200mg/Kg).

A STZ apresenta toxicidade aos linfócitos do baço e do timo (GAULTON et al., 1985). Além disso, estudos indicam que ela pode

interferir nos parâmetros hematológicos (OYEDEMI et al., 2011; COLAK et al., 2012). Dessa forma, acredita-se que a aloxana possa ser a droga diabetogênica mais apropriada para o presente trabalho.

No presente estudo, os animais foram submetidos à pesagem e à aferição da glicemia no dia anterior e dez dias após a administração endovenosa de 100 μ L de solução de aloxana (60 mg/Kg) ou 100 μ L de solução fisiológica (animais controle). Após dez dias, o grupo controle apresentou ganho de peso corporal (Figura 4), bem como normoglicemia (Figura 5). Entretanto, os animais tornados diabéticos apresentaram características do estado insulínopênico: perda de peso corporal e hiperglicemia.

A redução do peso corporal nos camundongos tornados diabéticos, em relação aos controles ($p < 0,05$), pode ser explicada através da hiperglicemia crônica. Nessas condições, há elevação da lipólise e da degradação oxidativa de aminoácidos, o que aumenta o gasto energético tecidual e, conseqüentemente, eleva a perda de peso corporal (OLIVEIRA; BRAGA; FERNANDES, 2013).

A hiperglicemia presente nos camundongos tornados diabéticos, em relação aos controles ($p < 0,001$), pode ser atribuída à redução na secreção de insulina, devido à destruição das células β do pâncreas pela ação da aloxana. Esse processo culmina na redução do influxo de glicose nos tecidos periféricos, bem como na elevação da glicogenólise e da gliconeogênese (OLIVEIRA; BRAGA; FERNANDES, 2013).

Figura 4. Variação de peso. O peso foi aferido um dia antes e dez dias após as administrações de salina (controle) e aloxana (diabético). Os valores representam a média $\pm$ e.p.m. O n representa o número de animais utilizados em cada grupo. * $p < 0,05$ obtido através da comparação com os respectivos valores no grupo controle.

Figura 5. Variação da glicemia. A glicemia foi aferida, através do monitor de glicose (Accu-Check Active-Roche Diagnosis®), um dia antes e dez dias após as administrações de salina (controle) e aloxana (diabético). Os valores representam a média $\pm$ e.p.m. O n representa o número de animais utilizados em cada grupo. *** $p < 0,001$ obtido através da comparação com os respectivos valores no grupo controle.

Após caracterizar os animais como controle e diabético, os camundongos foram divididos em subgrupos: Controle + Água (CA); Controle + Vitamina D (CV); Diabético + Água (DA) e Diabético + Vitamina D (DV) para a caracterização do modelo de suplementação de vitamina D (800UI/dia; sete dias; via oral) no diabetes (Tabela 2).

Tabela 2–Divisão dos animais.

Grupos	Animais
Controle + Água (CA)	9
Controle + Vitamina D (CV)	9
Diabético + Água (DA)	6
Diabético + Vitamina D (DV)	7
Total	31

Os animais foram divididos em subgrupos conforme o peso, a glicemia e o tempo de suplementação com vitamina D ou água (grupo controle).

4.2 Avaliação da suplementação da vitamina D

A vitamina D, embora descrita como uma substância cuja ação é pleiotrópica, é principalmente associada ao metabolismo do cálcio e do fósforo (HOLICK, 2004; DRIVER et al., 2011). Tanaka e DeLuca (1973), ao analisarem o efeito da suplementação de fósforo em ratos, observaram correlação inversa entre os níveis séricos de fósforo e a síntese de $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Heaney (2005) demonstrou que a eficiência da absorção de cálcio está relacionada aos níveis séricos de $25(\text{OH})\text{D}$.

O excesso ou a escassez hormonal podem ser prejudiciais à saúde. A hipovitaminose D pode culminar em hipocalcemia, hipofosfatemia, osteomalácia em crianças e fraturas em adultos (HOLICK, 2006b). A hipervitaminose D pode ser consequência da administração excessiva de vitamina D. As manifestações clínicas mais frequentes são a hipercalcemia, hiperfosfatemia e lesão renal aguda (HATHCOCH et al., 2007; BANSAL et al., 2014). Sendo assim, foram avaliados os níveis séricos da $25(\text{OH})\text{D}$ (Figura 6), do cálcio (Figura 7) e do fósforo (Figura 8).

A elevação dos níveis séricos de $25(\text{OH})\text{D}$ nos animais suplementados com vitamina D (grupos CV e DV), em relação aos seus respectivos controles (CA vs CV, $p < 0,001$; DA vs DV, $p < 0,001$), pode indicar êxito na escolha da via bem como da técnica de suplementação.

Indivíduos com DM podem apresentar hipovitaminose D. Esse quadro seria desenvolvido como consequência da ingestão e/ou síntese insuficientes de vitamina D (RAZZAGHY-AZAR; SHAKIBA, 2010). Além disso, a microangiopatia intestinal e a lesão renal podem prejudicar, respectivamente, a absorção intestinal bem como a conversão renal da $25(\text{OH})\text{D}$ em $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (SKÁLOVÁ, 2005; DEVARAJ et al., 2011;). Entretanto, os camundongos do grupo DA apresentaram níveis de $25(\text{OH})\text{D}$ semelhantes aos do grupo CA.

Figura 6. Avaliação dos níveis séricos de 25-hidroxivitamina D. Os níveis séricos de 25-hidroxivitamina D [25(OH)D–ng/mL] foram obtidos pela técnica de ELISA (Euroimmun®). O n representa o número de amostras, que foram analisadas em duplicata. Os valores expressam a média $\pm$ e.p.m. Controle + Água (CA), Controle + Vitamina D (CV), Diabéticos + Água (DA) e Diabéticos + Vitamina D (DV). $^{\alpha}p<0,001$ obtido através da comparação entre os grupos CA vs CV. $^{\beta}p<0,001$ obtido através da comparação entre os grupos DA vs DV.

A comparação entre os níveis séricos de cálcio e fósforo dos camundongos suplementados com vitamina D (CV e DV) e seus respectivos controles (CA e DA) não apresentou diferença estatisticamente significativa. Segundo VOJTKOVÁ e colaboradores (2012), a manutenção na concentração sérica dos íons pode ter ocorrido através de mecanismos compensatórios.

Figura 7. Avaliação do cálcio sérico. A determinação do cálcio sérico (mg/dL) foi realizada por meio de analisador bioquímico (Labmax 240®). Os valores expressam a média $\pm$ e.p.m. O n representa o número de animais utilizados em cada grupo. Controle + Água (CA), Controle + Vitamina D (CV), Diabéticos + Água (DA) e Diabéticos + Vitamina D (DV).

Figura 8. Avaliação do fósforo sérico. A determinação do fósforo sérico (mg/dL) foi realizada por meio de analisador bioquímico (Labmax 240®). Os valores expressam a média $\pm$ e.p.m. O n representa o número de animais utilizados em cada grupo. Controle + Água (CA), Controle + Vitamina D (CV), Diabéticos + Água (DA) e Diabéticos + Vitamina D (DV).

4.3 Evolução Temporal dos Níveis Glicêmicos e dos Pesos Corporais

O aumento do risco dos pacientes diabéticos desenvolverem as complicações da doença tem sido atribuído à oscilação dos níveis glicêmicos, bem como à hiperglicemia crônica (PELEG et al., 2007; CZERWONIUK et al., 2011; COLAK et al., 2012). O *Diabetes Control and Complication Trial* (DCCT–1993) demonstrou que o controle da hiperglicemia, nos pacientes com DM1, reduziu o risco de desenvolvimento e/ou progressão das complicações oriundas do DM, bem como a mortalidade e a morbidade ocasionadas pelas complicações cardiovasculares. Além disso, o controle glicêmico rigoroso pode reduzir a proteinúria, bem como o desenvolvimento de lesão renal (RICHARD; NISSON; ROSENQUIST, 1993).

A relação entre a glicemia e a vitamina D, embora não esteja completamente elucidada, também tem sido demonstrada. Os principais mecanismos envolvidos no processo estão associados à prevenção da morte das células β , que pode ocorrer através da modulação da resposta imunológica (RIACHY et al., 2006, DRIVER et al., 2011), à produção e à sensibilidade à insulina, que podem ocorrer através da regulação do influxo celular de cálcio, nas células β e nas células do tecido periférico, e do estímulo da expressão de receptores de insulina (NORMAN et al., 1980; CHIU et al., 2004; MITRI et al., 2007). Em camundongos nocaute para VDR, Zeitz e colaboradores (2003) observaram hiperglicemia e baixos níveis de insulina.

Alguns trabalhos, como o de Mathieu e colaboradores (2001) e de Gysemans e colaboradores (2008), não observaram a influência da vitamina D no curso do DM.

No presente estudo, a glicemia foi aferida no primeiro, quarto e sétimo dia de suplementação com vitamina D (Figura 9). Ao comparar a evolução glicêmica entre grupos suplementados com esse hormônio (grupos CV e DV) e seus respectivos controles (grupos CA e DA), não foram encontradas diferenças. A controvérsia entre os resultados obtidos em nosso estudo e os descritos na literatura pode ser atribuída ao uso de diferentes protocolos de suplementação hormonal, tanto em humanos

quanto animais, bem como a variabilidade genética existente entre as populações e as linhagens estudadas.

Figura 9. Avaliação temporal da glicemia. A glicemia foi aferida através do monitor de glicose (Accu-Check Active-Roche Diagnosis®). Os valores representam a média $\pm$ e.p.m. O n representa o número de animais em cada grupo. Controle + Água (CA), Controle + Vitamina D (CV), Diabéticos + Água (DA) e Diabéticos + Vitamina D (DV).

Estudos sugerem o envolvimento da vitamina D na regulação do peso corporal, devido à presença de estruturas fundamentais no metabolismo desse hormônio nas células do tecido adiposo (LI et al., 2008; NARVAEZ et al., 2009; OCHS-BALCOM et al., 2011). A perda de peso corporal tem sido associada aos efeitos do cálcio, que são potencializados pela vitamina D. O aumento da disponibilidade do cálcio favorece a oxidação das gorduras, promove a apoptose dos adipócitos, além de reduzir a absorção de lipídeos devida à formação de moléculas insolúveis no intestino que, posteriormente são excretadas nas fezes (MELANSON et al., 2005; JACOBSEN et al., 2005; ZHU et al., 2013). Entretanto, Mathieu e colaboradores (1994) não observaram diferenças estatisticamente significativas ao compararem o ganho de peso corporal e a calcemia em camundongos NOD tratados com vitamina D (5µg/Kg, intraperitoneal) com animais controles. No presente estudo, ao comparar a variação entre os pesos corporais aferidos no primeiro e no sétimo dia de suplementação com vitamina D (Tabela 3), também não foram observadas diferenças entre os animais suplementados (grupos CV e DV) e os seus respectivos controles (grupos CA e DA).

Tabela 3—Variação do peso durante o tratamento

Grupo	Variação de peso (g)
CA (n=9)	0,3±0,3
CV (n=9)	0,1±0,3
DA (n=6)	-1,1±0,9
DV (n=7)	-1,3±1,0

Os valores representam a variação de peso médio ± e.p.m. O n representa o número de animais em cada grupo. Controle + Água (CA), Controle + Vitamina D (CV), Diabéticos + Água (DA) e Diabéticos + Vitamina D (DV).

4.4 Avaliação da Suplementação de Vitamina D nos Rins e no Fígado

O comprometimento da fisiologia hepática e/ou renal interfere diretamente no metabolismo da vitamina D, pois esses órgãos são sítios de ativação desse hormônio (HOLICK, 2004).

A lesão renal, caracterizada por anormalidades estruturais e funcionais, pode ocorrer em pacientes diabéticos (ADA, 2012). O diagnóstico é realizado através da elevação sérica de produtos oriundos do metabolismo do nitrogênio, como ureia e creatina e pela redução do volume urinário (BELLOMO et al., 2004).

O comprometimento dos rins pode reduzir a síntese de $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$ bem como a síntese de Hb, culminando em anemia (HOLICK, 2004; RITZ; HAXSEN, 2005). Além disso, a hipóxia tecidual, causada pela redução na oferta de oxigênio devido à redução da Hb, pode agravar lesão e fibrose intersticial renal (MEHDI; TOTO, 2009).

Nesse sentido, o presente estudo avaliou os níveis séricos de ureia (Figura 10), creatinina (Figura 11), bem como a histologia renal (Figura 12 – H/E).

A elevação dos níveis séricos de ureia (CA vs DA, $p < 0,05$; CA vs DV, $p < 0,01$; CV vs DA, $p < 0,05$; CV vs DV, $p < 0,01$) e creatinina (CA vs DA, $p < 0,001$; CA vs DV, $p < 0,001$; CV vs DA, $p < 0,001$; CV vs DV, $p < 0,001$) nos animais diabéticos, em relação aos níveis dos camundongos controles, pode indicar que os animais diabéticos apresentaram comprometimento renal. Nos indivíduos hígidos, essas substâncias são excretadas normalmente pelos rins. Entretanto, na presença de acometimento renal, como na nefropatia diabética, a eliminação se torna prejudicada, culminando na elevação sérica de ambas (DABLA, 2010). Além disso, Payne e colaboradores (2010) demonstraram que a deficiência de vitamina D pode favorecer a elevação desses parâmetros em pacientes diabéticos. Entretanto, no presente estudo, a suplementação com vitamina D não interferiu nos níveis séricos de ureia e creatinina dos animais sadios e diabéticos.

Figura 10. Variação da ureia sérica. A determinação da ureia sérica (mg/dL) foi realizada por meio de analisador bioquímico (Labmax 240®). Os valores expressam a média $\pm$ e.p.m. O n representa o número de animais utilizados em cada grupo. Controle + Água (CA), Controle + Vitamina D (CV), Diabéticos + Água (D) e Diabéticos + Vitamina D (DV). $^{\alpha}p<0,05$ obtido através da comparação entre os grupos DA vs CA. $^{\mu}p<0,01$ obtido através da comparação entre os grupos DV vs CA. $^{\gamma}p<0,01$ obtido através da comparação entre os grupos DA vs CA. $^{\beta}p<0,05$ obtido através da comparação entre os grupos DV vs CV.

Figura 11. Variação da creatinina sérica. A determinação da ureia creatinina (mg/dL) foi realizada por meio de analisador bioquímico (Labmax 240®). Os valores expressam a média $\pm$ e.p.m. O n representa o número de animais utilizados em cada grupo. Controle + Água (CA), Controle + Vitamina D (CV), Diabéticos + Água (D) e Diabéticos + Vitamina D (DV). $^{\alpha}p<0,001$ obtido através da comparação entre grupos DA vs CA. $^{\beta}p<0,001$ obtido através da comparação entre grupos DV vs CA. $^{\gamma}p<0,001$ obtido através da comparação entre grupos DA vs CA. $^{\mu}p<0,001$ obtido através da comparação entre grupos DV vs CV.

Na análise histológica dos tecidos renais, os animais diabéticos apresentaram, em relação aos sadios, espessamento da cápsula de Bowman.

A patogênese da nefropatia diabética, embora não seja completamente elucidada, tem sido atribuída à glicosilação não enzimática, que culmina no espessamento da cápsula de Bowman, bem como na hipertrofia glomerular (MADER et al., 2013).

A vitamina D, através das propriedades anti-inflamatórias e imunomoduladoras (KHOO et al., 2011), poderia reduzir os efeitos do diabetes na fisiologia renal. Além disso, estudos em animais demonstraram que a vitamina D poderia reduzir a glomeruloesclerose, hipertrofia glomerular e fibrose intersticial (MAKIBAYASHI et al., 2001; TAN, LI, LIU; 2007;) Entretanto, não foram observadas diferenças entre a histologia renal dos animais suplementados (grupos CV e DV) e seus respectivos controles (grupos CA e DA).

Figura 12. Tecido renal de camundongos. Fotomicrografia do tecido renal de animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais. CA1, CA2 e CA3—tecido renal de animal controle (CA); CV1, CV2 e CV3—tecido renal de animal controle suplementado com vitamina D (CV); DA1, DA2 e DA3—tecido renal de animal diabético (DA); DV1, DV2 e DV3—tecido renal de animal diabético suplementado com vitamina D (DV). Os animais com diabetes apresentaram espessamento da cápsula de Bowman (C). Presença de Glomérulo (G); Glomérulo Hipertrofiado (GH), Glomérulo Normal (GN—barras CA1, CV1, DA1 e DV1= 100µm; CA2, CV2, DA2 e DV2 = 50µm; CA3, CV3, DA3 e DV3 = 10µm). Coloração: H/E.

A redução dos níveis séricos de albumina, principal proteína sérica, bem como dos níveis de proteínas totais, tem sido associada a distúrbios hepáticos e renais, hipovolemia e choque séptico (BLACK et al., 1977; GROSSMAN; YAP; SHAFRITZ, 1977, ZERN et al., 1984; ARROYO; COLMENERO, 2003; PENCKOFER et al., 2008). Além disso, Bikle e colaboradores (1986) demonstraram que, devido à vitamina D também ser transportada pela albumina através da circulação sanguínea, a redução nos níveis dessa proteína poderia ser prejudicial ao metabolismo desse hormônio.

Nesse sentido, a comparação entre os níveis séricos de albumina (Figura 13) demonstrou que os camundongos do grupo DA apresentaram níveis inferiores em relação aos grupos CA (CA vs DA, $p < 0,05$) e CV (CV vs DA, $p < 0,05$). Em pacientes diabéticos com distúrbios renais isso pode ocorrer devido o aumento da excreção renal (GROSS et al., 2005).

Nos camundongos diabéticos, a vitamina D melhorou os níveis de albumina, embora não demonstrasse diferença estatisticamente significativa. Yonemura e colaboradores (2000), ao correlacionarem os níveis séricos de albumina e 25(OH)D em pacientes com doença renal crônica, verificaram que a suplementação de vitamina D elevou os níveis séricos dessa proteína em pacientes com hipovitaminose D. Entre os camundongos saudáveis, a suplementação não interferiu nesse parâmetro.

A análise entre os níveis séricos de proteínas totais (Figura 14) nos grupos suplementados com vitamina D (CV e DV) e seus respectivos controles (CA e DA) não apresentou diferença estatística significativa.

Figura 13. Avaliação da albumina sérica. A determinação da albumina sérica (g/dL) foi realizada por meio de analisador bioquímico (Labmax 240®). Os valores expressam a média $\pm$ e.p.m. O n representa o número de animais utilizados em cada grupo. Controle + Água (CA), Controle + Vitamina D (CV), Diabéticos + Água (DA) e Diabéticos + Vitamina D (DV). * $p < 0,05$ obtido através da comparação entre grupos CA vs DA. § $p < 0,05$ obtido através da comparação entre grupos DA vs CV.

Figura 14. Avaliação das proteínas totais sérica. A determinação das proteínas totais séricas (g/dL) foi realizada por meio de analisador bioquímico (Labmax 240®). Os valores expressam a média $\pm$ e.p.m. O n representa o número de animais utilizados em cada grupo. Controle + Água (CA), Controle + Vitamina D (CV), Diabéticos + Água (DA) e Diabéticos + Vitamina D (DV).

A atividade enzimática é um parâmetro que pode ser utilizado para determinar os efeitos hepatotóxicos oriundos da administração de compostos em animais (AKANJI; NGAHA, 1989; ADESOKAN; AKANJI, 2004; ADESOKAN; OYEWOLE; TURAY, 2009). As transaminases (ALT e AST) são citosólicas enquanto a fosfatase alcalina está ligada a membrana celular dos hepatócitos. A elevação dessas proteínas, presentes em altas concentrações no fígado, pode ser observada nas lesões nesse órgão (NGAHA, 1981; ADESOKAN; OYEWOLE; TURAY, 2009). Além disso, o aumento dos níveis séricos de fosfatase alcalina, na ausência de distúrbios hepáticos e insuficiência de 25(OH)D, pode indicar comprometimento na fisiologia óssea. (MCKENNA et al., 1985). Em indivíduos diabéticos, o excesso de ácidos graxos livres e de ROS, pode culminar na destruição dos hepatócitos, bem como na elevação das transaminases séricas (HARRIS, 2005, PALMA et al., 2014).

Nesse sentido, foram analisados os níveis séricos de fosfatase alcalina (Figura 15), AST (Figura 16) e ALT (Figura 17), bem como a histologia (H/E) do fígado (figura 18). A comparação entre os níveis séricos dessas enzimas nos animais suplementados (grupos CV e DV) e seus respectivos controles (grupos CA e DA) não apresentou diferença estatisticamente significativa. Além disso, a análise histológica do fígado demonstrou que os animais diabéticos apresentam destruição de hepatócitos próximo aos vasos sanguíneos.

Figura 15. Avaliação da fosfatase alcalina sérica. A determinação da fosfatase alcalina sérica (U/L) foi realizada por meio de analisador bioquímico (Labmax 240®). Os valores expressam a média $\pm$ e.p.m. O n representa o número de animais utilizados em cada grupo. Controle + Água (CA), Controle + Vitamina D (CV), Diabéticos + Água (DA) e Diabéticos + Vitamina D (DV).

Figura 16. Avaliação da aspartato aminotransferase sérica. A determinação da aspartato aminotransferase sérica (AST–U/L) foi realizada por meio de analisador bioquímico (Labmax 240®). Os valores expressam a média $\pm$ e.p.m. O n representa o número de animais utilizados em cada grupo. Controle + Água (CA), Controle + Vitamina D (CV), Diabéticos + Água (DA) e Diabéticos + Vitamina D (DV).

Figura 17. Avaliação da alanina aminotransferase sérica. A determinação da alanina aminotransferase sérica (ALT–U/L) foi realizada por meio de analisador bioquímico (Labmax 240®). Os valores expressam a média $\pm$ e.p.m (erro padrão da média). O n representa o número de animais utilizados em cada grupo. Controle + Água (CA), Controle + Vitamina D (CV), Diabéticos + Água (DA) e Diabéticos + Vitamina D (DV).

Figura 18. Tecido hepático de camundongos. Fotomicrografia do tecido hepático de animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais. CA1, CA2 e CA3—tecido hepático de animal controle (CA); CV1, CV2 e CV3—tecido hepático de animal controle suplementado com vitamina D (CV); DA1, DA2 e DA3—tecido hepático de animal diabético (DA); DV1, DV2 e DV3—tecido hepático de animal diabético suplementado com vitamina D (DV). Os animais com diabetes apresentaram destruição de hepatócitos (D) próximo aos vasos. Presença de Sinusóides (S). (barras CA1, CV1, DA1 e DV1= 100µm; CA2, CV2, DA2 e DV2 = 50µm; CA3, CV3, DA3 e DV3 = 10µm). Coloração: H/E.

4.5 Avaliação dos Parâmetros Hematológicos

As alterações nos parâmetros hematológicos podem ocorrer em humanos e animais com DM 1 (LAM; WULFF, 2011; OGIMOTO et al., 2011; COLAK et al., 2012). Estudos em animais, utilizando o modelo experimental de DM 1 induzido por STZ, demonstram que há diferença entre os parâmetros hematológicos (leucometria total, Htm, Htc, Hb, VCM, HCM, CHCM e plaquetas) dos animais tornados diabéticos em relação aos mesmos parâmetros dos controles (OYEDEMI et al., 2011; COLAK et al., 2012). Além disso, a relação entre a vitamina D e a eritropoiese também tem sido relatada, embora o mecanismo não esteja completamente esclarecido (REICHEL; KOEFFLER; NORMAN, 1989; NORMAN, 2006; SIM et al., 2010). Nesse sentido, após o sétimo dia de suplementação com vitamina D, foi coletado sangue total dos animais controle e diabéticos para análise dos mesmos parâmetros.

No presente estudo não foi observada diferença estatisticamente significativa entre a Htm (Figura 19) a Hb (Figura 20) dos animais suplementados com vitamina D (CV e DV) e seus respectivos controles (CA e DA). Entretanto, dos quatro grupos analisados, os animais do grupo DA e DV apresentaram, respectivamente, os menores e os maiores níveis de Htm e Hb (DA vs DV; $p < 0,05$). O aumento do estresse oxidativo presente no DM1 pode ter elevado a fragilidade osmótica dos eritrócitos, através da alteração na composição dos lipídeos da membrana, que culminou na redução do volume da célula, bem como a fluidez da membrana. Dessa forma, os eritrócitos podem ser sequestrados e aprisionados na microcirculação do sistema retículo-endotelial com mais facilidade (RITZ; HAXSEN, 2005; COLAK et al., 2012). Todavia, a suplementação de vitamina D pareceu restaurar o quadro.

Figura 19. Avaliação da hematimetria. Os níveis de hematimetria (nº de células x 10⁶/mm³), obtidos 17 dias após a administração da aloxana, foram mensurados por meio de contador hematológico (ABCvet®). Os valores expressam a média ± e.p.m. O n representa o número de animais utilizados em cada grupo. Controle + Água (CA), Controle + Vitamina D (CV), Diabéticos + Água (DA) e Diabéticos + Vitamina D (DV).

Figura 20. Avaliação da hemoglobina. Os níveis de hemoglobina (g/dL), obtidos 17 dias após a administração da aloxana, foram mensurados por meio de contador hematológico (ABCvet®). Os valores expressam a média ± e.p.m. O n representa o número de animais utilizados em cada grupo. Controle + Água (CA), Controle + Vitamina D (CV), Diabéticos + Água (DA) e Diabéticos + Vitamina D (DV). *p<0,05 obtido através da comparação entre os grupos DA vs DV.

A redução do número de eritrócitos apresenta correlação positiva com o Htc (HARRIS et al., 2002; ÇELIK et al., 2011; COLAK et al., 2012). No presente estudo não foram observadas diferenças entre os Htc dos camundongos dos grupos CA e CV. Entretanto, a comparação entre os Htc dos grupos DA e DV demonstrou que, além da diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), a suplementação com vitamina D foi capaz de normalizar este parâmetro em relação aos controles (Figura 21).

Figura 21. Avaliação do hematócrito. Os níveis do hematócrito (VCM x número de hemácias/10—%), obtidos 17 dias após a administração da aloxana, foram mensurados por meio de contador hematológico (ABCvet®). Os valores expressam a média $\pm$ e.p.m. O n representa o número animais em cada grupo. Controle + Água (CA), Controle + Vitamina D (CV), Diabéticos + Água (DA) e Diabéticos + Vitamina D (DV). * $p < 0,05$ obtido através da comparação entre os grupos DA vs DV.

Segundo Bösing e colaboradores (2012), os níveis séricos de HCM e VCM podem influenciar na Hb e no Htc. Entretanto, ao comparar os níveis de VCM (Figura 22), HCM (Figura 23) e CHCM (Figura 24) entre os camundongos suplementados com vitamina D (CV e DV) e seus respectivos controles (CA e DA), não foram observadas diferenças.

Figura 22. Avaliação do Volume Corpuscular Médio. Os níveis do volume corpuscular médio (hematócrito x 10/número de hemácias–VCM–fL), obtidos 17 dias após a administração da aloxana, foram mensurados por meio de contador hematológico (ABCvet®). Os valores expressam a média $\pm$ e.p.m. O n representa o número de animais utilizados em cada grupo. Controle + Água (CA), Controle + Vitamina D (CV), Diabéticos + Água (DA) e Diabéticos + Vitamina D (DV).

Figura 23. Avaliação da Hemoglobina Corpuscular Média. Os níveis séricos da hemoglobina corpuscular média (10 x Hemoglobina/Hemácia–HCM–pg), obtidos 17 dias após a administração da aloxana, foram mensurados por meio de contador hematológico (ABCvet®). Os valores expressam a média $\pm$ e.p.m. O n representa o número de animais utilizados em cada grupo. Controle + Água (CA), Controle + Vitamina D (CV), Diabéticos + Água (DA) e Diabéticos + Vitamina D (DV).

Figura 24. Avaliação da Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média. Os níveis da concentração de hemoglobina corpuscular média ($100 \times \text{Hemoglobina/Hematócrito} - \text{CHCM} - \text{g/dL}$), obtidos 17 dias após a administração da aloxana, foram mensurados por meio de contador hematológico (ABCvet®). Os valores expressam a média $\pm$ e.p.m. O n representa o número de animais utilizados em cada grupo. Controle + Água (CA), Controle + Vitamina D (CV), Diabéticos + Água (DA) e Diabéticos + Vitamina D (DV).

O DM tem sido descrito como um fator que favorece a trombose, devido aumento o aumento da reatividade das plaquetas (KOLTAL et al., 2006). No presente estudo, os animais do grupo DA apresentaram os maiores níveis de plaquetas em relação aos demais grupos (Figura 25). Esse fenômeno tem sido atribuído à hiperglicemia, à hipertrigliceremia (SCHNEIDER, 2009) e à alteração da ação e/ou secreção da insulina. Este hormônio, além da ação hipoglicemiante, tem sido descrito como um antagonista de substâncias, como o colágeno, o fosfato de adenosina, o fator de ativação plaquetário e a epinefrina, que favorecem a ação das plaquetas (WESTERBACKA et al., 2002; SONALI et al., 2011).

A comparação entre os níveis plaquetários, dos animais suplementados com vitamina D (CV e DV) e seus respectivos controles (CA e DA), não demonstrou diferença estatisticamente significativa. Todavia, os grupos CV e DV apresentaram os menores níveis de plaquetas, em relação aos grupos CA e DA. O VDR, presente nos megacariócitos (células precursoras das plaquetas), permite que a $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$ regule o fluxo de cálcio celular e, conseqüentemente, a megacariopoese, a ativação plaquetária e a apoptose (SILVAGNO et al., 2010).

Figura 25. Avaliação das plaquetas. Os níveis séricos de plaquetas (n° de elementos celulares $\times 10^3/\text{mm}^3$), obtidos 17 dias após a administração da aloxana, foram mensurados por meio de contador hematológico (ABCvet®). Os valores expressam a média $\pm$ e.p.m. O n representa o número de animais utilizados em cada grupo. Controle + Água (CA), Controle + Vitamina D (CV), Diabéticos + Água (DA) e Diabéticos + Vitamina D (DV).

O maior risco de infecções em pacientes com DM tem sido atribuído ao comprometimento da resposta imunológica que culmina na redução da capacidade fagocítica e da migração leucocitária (PELEG et al., 2007; CASQUEIRO; CASQUEIRO; ALVES, 2012).

No presente estudo, os camundongos do grupo DA (Figura 26) apresentaram, em relação aos do grupo CA, menos leucócitos no sangue ($p < 0,05$), menos mononucleares (Figura 27– $p < 0,05$) e polimorfonucleares (Figura 28). No estado de hiperglicemia crônica, a ação antimicrobiana dos leucócitos é menor devido a inibição da glicose–6–fosfato, culminando na redução da diapedese, bem como no aumento da apoptose de polimorfonucleares (PELEG et al., 2007). Além disso, Collison e colaboradores (2002) demonstraram que o excesso de produtos finais da glicosilação também está envolvido no processo.

Figura 26. Avaliação da leucometria. A leucometria (nº de leucócitos $\times 10^3/\text{mm}^3$), obtida 17 dias após a administração da aloxana, foi mensurada por meio de contador hematológico (ABCvet®). Os valores expressam a média $\pm$ e.p.m. O n representa o número de animais utilizados em cada grupo. Controle + Água (CA), Controle + Vitamina D (CV), Diabéticos + Água (DA) e Diabéticos + Vitamina D (DV). $p < 0,05$ obtido através da comparação entre os grupos CA vs DA.

Figura 27. Avaliação dos leucócitos mononucleares do sangue. A quantificação dos leucócitos mononucleares (n° de leucócitos mononucleares x 10³/mm³) foi realizada por microscopia óptica. Os valores expressam a média ± e.p.m. O n representa o número de animais utilizados em cada grupo. Controle + Água (CA), Controle + Vitamina D (CV), Diabéticos + Água (DA) e Diabéticos + Vitamina D (DV). *p<0,05 obtido através da comparação entre os grupos CA vs DA.

Figura 28. Avaliação dos leucócitos polimorfonucleares do sangue. A quantificação de leucócitos polimorfonucleares (n° de leucócitos polimorfonucleares x 10³/mm³) foi realizada por microscopia óptica. Os valores expressam a média ± e.p.m. O n representa o número de animais utilizados em cada grupo. Controle + Água (CA), Controle + Vitamina D (CV), Diabéticos + Água (DA) e Diabéticos + Vitamina D (DV).

4.6 Avaliação da Suplementação de Vitamina D nos Leucócitos Pulmonares e Peritoneais

A função principal do pulmão é a hematose. Entretanto, devido o contato com o ambiente externo ao corpo e ser altamente vascularizado, esse órgão possui um importante papel na defesa imunológica (DOERSCHUK, 2001).

A cavidade peritoneal também participa desse processo através da ação dos macrófagos presentes na mesma, bem como no recrutamento de células mononucleares (macrófagos e linfócitos) e leucócitos polimorfonucleares (LI et al., 1998).

Nesse sentido, os leucócitos e seus subgrupos (mononucleares e polimorfonucleares) presentes em ambos os sítios foram quantificados (Tabela 4). Além disso, a histologia pulmonar (Figura 29– H/E) também foi analisada.

Em ambos os locais, a comparação dos três parâmetros, entre os animais suplementados com vitamina D (grupos CV e DV) e seus respectivos controles (grupos CA e DA), não demonstrou diferenças. Entretanto, os camundongos diabéticos parecem apresentar mais mononucleares do que os demais grupos.

A suplementação com vitamina D não influenciou na histologia pulmonar dos camundongos diabéticos e sadios.

Tabela 4—Quantificação dos leucócitos pulmonares e peritoneais

Sítio	Grupo	Leucócitos (10^6 células/mL)		
		Total	Mononucleares	Polimorfonucleares
Peritônio	CA (n=9)	1,12 $\pm$ 0,28	1,11 $\pm$ 0,01	0,01 $\pm$ 0,01
	CV (n=8)	1,53 $\pm$ 0,28	1,49 $\pm$ 0,01	0,05 $\pm$ 0,01
	DA (n=6)	1,76 $\pm$ 0,34	1,73 $\pm$ 0,01	0,03 $\pm$ 0,01
	DV (n=7)	0,89 $\pm$ 0,21	0,86 $\pm$ 0,01	0,03 $\pm$ 0,01
Pulmão	CA (n=5)	0,45 $\pm$ 0,17	0,44 $\pm$ 0,01	0,01 $\pm$ 0,01
	CV (n=4)	0,45 $\pm$ 0,15	0,45 $\pm$ 0,15	0
	DA (n=3)	1,49 $\pm$ 0,40	1,48 $\pm$ 0,39	0,01 $\pm$ 0,01
	DV (n=3)	0,22 $\pm$ 0,07	0,22 $\pm$ 0,07	0

Os valores representam a variação de peso médio $\pm$ e.p.m. O n representa o número de animais em cada grupo. Controle + Água (CA), Controle + Vitamina D (CV), Diabéticos + Água (DA) e Diabéticos + Vitamina D (DV).

Figura 29. Tecido pulmonar de camundongos. Fotomicrografia do tecido pulmonar de animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais. CA1, CA2 e CA3—tecido pulmonar de animal controle (CA); CV1, CV2 e CV3—tecido pulmonar de animal controle suplementado com vitamina D (CV); DA1, DA2 e DA3—tecido pulmonar de animal diabético (DA); DV1, DV2 e DV3—tecido pulmonar de animal diabético suplementado com vitamina D (DV). Há preservação tecidual em todos os grupos. Não foi observada a presença de infiltrado de leucócitos. Presença de brônquios (B), bronquíolos (Br), Alvéolos pulmonares (A). (barras CA1, CV1, DA1 e DV1= 100µm; CA2, CV2, DA2 e DV2 = 50µm; CA3, CV3, DA3 e DV3 = 10µm). Coloração: H/E.

Em resumo, observou-se, no modelo experimental de DM 1 induzido por aloxana, após sete dias de suplementação com vitamina D (800UI), que: a) animais suplementados com vitamina D, apresentaram, em relação aos seus respectivos controles, níveis séricos de 25(OH)D mais elevados; b) animais diabéticos, comparados aos controles, apresentaram elevação sérica de ureia e creatinina, além de espessamento da cápsula de Bowman e hipertrofia glomerular; menores níveis séricos de albumina e discreta alteração nos hepatócitos (podendo indicar início de lesão tecidual); menos leucócitos e células mononucleares sanguíneas (o que pode indicar um comprometimento do sistema imunológico). Entretanto, esses efeitos não foram revertidos pela suplementação de vitamina D; c) animais diabéticos apresentaram hematócrito e níveis séricos de albumina inferiores aos controles. Além disso, a suplementação com vitamina D dos animais diabéticos restaurou ambos os parâmetros; d) a comparação dos parâmetros peso, glicemia, cálcio, fósforo, proteínas totais, fosfatase alcalina, AST, ALT hematimetria, VCM, CHCM, HCM plaquetometria, contagem celular total e específica dos lavados peritoneal e broncoalveolar e análise morfológica do tecido pulmonar, não apresentou alterações em relação aos grupos diabético e controles.

5 CONCLUSÃO

5 CONCLUSÃO

Em conjunto, os resultados obtidos neste modelo de suplementação de vitamina D, durante sete dias, sugerem que esse hormônio possui um efeito pleiotrópico, podendo exercer efeitos benéficos em relação à hipoalbuminemia, leucopenia e anemia presente em muitos indivíduos diabéticos.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ADEGHATE, E.; SCHATTNER, S.; DUNN, E. An Update on the Etiology and Epidemiology of Diabetes Mellitus. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v.1084, p.1–29, 2006.

ADEREM, A. Phagocytosis and the inflammatory response. **The Journal of Infectious Diseases**. v.187 s.2, s.340–345, 2003.

ADESOKAN, A.A.; AKANJI, M.A. Effect of administration of aqueous extract of *Enantia chlorantha* on the activities of some enzymes in the small intestine of rats. **Nigerian Journal of Biochemistry and Molecular Biology**. v.18, p.103–105, 2004.

ADESOKAN, A.A.; OYEWOLE, O.I.; TURAY, B.M.S. Kidney and Liver Function Parameters in Alloxan-Induced Diabetic Rats Treated with Aloe Barbadensis Juice Extract. **Sierra Leone Journal of Biomedical Research**. v.1, n.1, p. 33–37, 2009.

ADORINI, L.; PENNA, G. Control of autoimmune diseases by the vitamin D endocrine system. **Nature Clinical Practice Rheumatology**. v.4, p.404–412, 2008.

AKANJI, M.A.; NGAHA, E.O. Effect of repeated administration of Berenil on urinary enzyme excretion with corresponding tissue pattern in rats. **Pharmacology & Toxicology**. v.64, p.272–279, 1989.

AKIRA, S. Innate immunity and adjuvants. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**. v.366, p.2748–2755, 2011.

AKIYOSHI-SHIBATA, M.; SAKAKI, T.; OHYAMA, Y.; NOSHIRO, M.; OKUDA, K.; YABUSAKI, Y. Further oxidation of hydroxycalcidiol by calcidiol 24-hydroxylase. A study with the mature enzyme expressed in *Escherichia coli*. **European Journal of Biochemistry**. v.224, p.335–343, 1994.

ALVAREZ-RODRIGUEZ, L.; LOPEZ-HOYOS, M.; GARCIA-UNZUETA, M.; AMADO, J.A.; CACHO, P. M.; MARTINEZ-TABOADA, V. M. Age and low levels of circulating vitamin D are associated with impaired innate immune function. **Journal of Leukocyte Biology**. v.91, p. 829–838, 2012.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of medical care in diabetes – 2012. **Diabetes Care**. v.35, s.1, p.S11–S63, 2012.

AGMON-LEVIN, N.; THEODOR, E.; SEGAL, R.M.; SHOENFELD, Y. Vitamin D in systemic and organ-specific autoimmune diseases. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**. v.45, n.2, p.256–266, 2013.

ARNSON, Y.; AMITAL, H.; SHOENFELD, Y. Vitamin D and autoimmunity: new aetiological and therapeutic considerations. **Annals of the Rheumatologic Diseases**. v.66, p.1137–1142, 2007.

ATKINSON, M.A. The Pathogenesis and Natural History of Type 1 Diabetes. **Cold Spring Harb Perspect in Medicine**. v.2, p.1–18, 2012.

ATKINSON, M.A.; BLUESTONE, J.A.; EISENBARTH, G.S.; HEBROK, M.; HEROLD, K.C.; ACCILI, D.; PIETROPAOLO, M.; ARVAN, P.R.; VON HERRATH, M.; MARKEL, D.S. How does type 1 diabetes develop? The notion of homicide orb-cell suicide revisited. **Diabetes**. v.60, p.1370–1379, 2011.

BACCALA, R.; GONZALEZ-QUINTIAL, R.; LAWSON, B.R.; STERN, M.E.; KONO, D.H.; BEUTLER, B.; THEOFILOPOULOS, A.N. Sensors of the innate immune system: their mode of action. **Nature Reviews Rheumatology**. v.11, n.8, p.448–456, 2009.

BAEKE, F.; KORF, H.; OVERBERGH, L.; VAN ETEN, E.; VERSTUYF, A.; GYSEMANS, C.; MATHIEU, C. Human T lymphocytes are direct targets of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in the immune system. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**. v.121, p.221–227, 2010.

BANDEIRA, F.; BANDEIRA, C.; FREESE, E. Occult vitamin D deficiency and its relationship with bone mineral density among postmenopausal women in Recife, Brazil. **Journal of Bone and Mineral Research**. v.18, n.2, s.407, 2003.

BANSAL, R.K.; TYAGI, P.; SHARMA, P.; SINGLA, V.; BANSAL, V.A.N.; KUMAR, A.; ARORA, A. Iatrogenic hypervitaminosis D as an unusual cause of persistent vomiting: a case report. **Journal of Medical Case Reports**. v.8, n.74, p.1–4, 2014.

BAQUER, N.Z.; GUPTA, D.; RAJU, J. Regulation of metabolic pathways in liver and kidney during experimental diabetes: effects of antidiabetic compounds. **Indian Journal of Clinical Biochemist**. v. 13, n.2, p.63–80, 1998.

BARRAT, F.J.; CUA, D.J.; BOONSTRA, A.; RICHARDS, D.F.; CRAIN, C.; SVELKOU, H.F.; DE WAAL-MALEFYT, R.; COFFMAN, R.L.; HAWRYLOWICZ, C.M.; O'GARRA, A. In vitro generation of interleukin 10–producing regulatory CD4⁺ T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)–and Th2-inducing cytokines. **The Journal of Experimental Medicine**. v.195, n.5, p.603–616, 2002.

BECKMAN, M.J.; TADIKONDA, P.; WERNER, E.; PRAHL, J.; YAMADA, S.; DELUCA, H.F. Human 25-hydroxyvitamin D₃-24-hydroxylase, a multicatalytic enzyme. **Biochemistry**. v.35, p.8465–8472, 1996.

BELLOMO, R.; RONCO, C.; KELLUM, J.A.; MEHTA, R.L.; PALEVSKY, P.; THE ACUTE DIALYSIS QUALITY INITIATIVE WORKGROUP. Acute renal failure—definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the second international consensus conference of the Acute Dialysis Quality Initiative Group. **Critical Care**. v.8, n.4, p.R204–R212, 2004.

BERGMAN, H.; DRURY, D.R. The relationship of kidney function to the glucose utilization of the extra abdominal tissues. **American Journal of Physiology**. v.124, p.279–284, 1938.

BIKLE, D.D.; GEE, E.; HALLORAN, B.; KOWALSKI, M.A.; RYZEN, E.; HADDAD, J.G. Assessment of the free fraction of 25-hydroxyvitamin D in serum and its regulation by albumin and the vitamin D-binding protein. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**. v.63, n.4, p.954–959, 1986.

BIKLE D.D.; PILLAI, S.; GEE, E.; HINCENBERGS, M. Regulation of 1,25-dihydroxyvitamin D production in human keratinocytes by interferongamma. **Endocrinology**. v.124, p.655–660, 1989.

BINDERUP, L. Immunological properties of vitamin D analogues and metabolites. **Biochemical Pharmacology**. v.43, p.1885–1892, 1992.

BLACK, M.; BIEMPICA, L.; GOLDFISCHER, S.; ARIAS, I.M.; GROSSMAN, S. Effect of chronic renal failure in rats on structure and function of the hepatic endoplasmic reticulum. **Experimental and Molecular Pathology**. v.27, p.377–391, 1977.

BLUESTONE, J.A.; HEROLD, K.; EISENBARTH, G. Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. **Nature**. v.464, p.1293–1300, 2010.

BOONSTRA, A.; BARRAT, F.J.; CRAIN, C.; HEATH, V.L.; SAVELKOUL, H.F.; O'GARRA, A. 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ has a direct effect on naive CD4 T cells to enhance the development of Th2 cells. **The Journal of Immunology**. v.167, p.4974–4980, 2001.

BOLTON, C.; GATES, J.; GIOVANNONI, G. Serum levels of 25-hydroxy vitamin D in normal Biozzi and C57BL/6 mice and during the course of chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis (CR EAE). **Inflammation Research**. v.62, n.7, p.659–667, 2013.

BORRADALE, D.; KIMLIN, M. Vitamin D in health and disease: an insight into traditional functions and new roles for the 'sunshinevitamin'. **Nutrition Research Reviews**. v. 22, n.2:118-136, 2008.

BROUWER-BROLSMA, E.M.; SCHUURMAN, T.; DE GROOT, L.C.; FESKENS, E.J.; LUTE C, NANINCK E.F.; ARNDT S.S.; VAN DER STAAY, F.J.; BRAVENBOER, N.; KOROSI, A.; STEEGENGA, W.T. No role for vitamin D or a moderate fat diet in aging induced cognitive decline and emotional reactivity in C57BL/6 mice. **Behavioural Brain Research**. v.267, p.133–143, 2014.

CALVO, M.S.; WHITING, S.J.; BARTON, C.N. Vitamin D intake: a global perspective of current status. **Journal of Nutrition**. v. 135, p. 310–316, 2005.

CANTORNA, M.T. Mechanisms underlying the effect of vitamin D on the immune system. **Proceedings of the Nutrition Society**. v.69, p.286–289, 2010.

CARRILLO-LÓPEZ, N.; FERNÁNDEZ-MARTÍN, J. L.; CANNATA-ANDÍA, J.B. The role of calcium, calcitriol and its receptors in parathyroid regulation. **Nefrología**.v.29, n.2, p.103–108, 2009.

CASTRO, L.C.G. O sistema endocrinológico da vitamina D. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**. v.55, n.8, p.566–575, 2011.

CASQUEIRO, J.; CASQUEIRO, J.; ALVES, C. Infections in patients with diabetes mellitus: A review of pathogenesis. **Indian Journal of Endocrinology and Metabolism**. v.16, s.1, p.27-36, 2012.

ÇELİK, G.; YÖNTEM, M.; BILGE, M.; CILO, M.; ÜNALDI, M. The relationship between the antioxidant system and anaemia in haemodialysis patients. **The Journal of International Medical Research**. v.39, n.5, p.1954–1960, 2011.

CHENG, J.B.; MOTOLA, D.L.; MANGELSDORF, D.J.; RUSSELL, D.W. De-orphanization of cytochrome P4502R1: a microsomal vitamin D 25-hydroxylase. **The Journal. of Biological. Chemistry**. v.278, p.38084–38093, 2003.

CHEN, S.; SIMS, G.P.; CHEN, X.X.; GU, Y.Y.; CHEN, S.; LIPSKY, P.E. Modulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on human B cell differentiation. **The Journal of Immunology**. v.179, n.3, p.1634–1647, 2007.

CHENG, J.B.; LEVINE, M.A.; BELL, N.H.; MANGELSDORF, D.J.; RUSSELL, D.W. Genetic evidence that the human CYP2R1 enzyme is a key vitamin D 25-hydroxylase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v.101, p.7711–7715, 2004.

CHEUNG, D.O.; HALSEY, K.; SPEERT, D.P. Role of pulmonary alveolar macrophages in defense of the lung against *Pseudomonas aeruginosa*. **Infection and Immunity**. v.68, n.8, p.4585-4592, 2000.

CHIU, K.C.; CHU, A.; GO, V.L.; SAAD, M.F. Hypovitaminosis D is associated with insulin resistance and beta cell dysfunction. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v.79, n.5, p.820–825, 2004.

CHRISTENSEN, M. H.; LIEN, E. A.; HUSTAD, S.; ALMAS, B. Seasonal and age-related differences in serum 25-hydroxyvitamin D, 1,25-dihydroxyvitamin D and parathyroid hormone in patients from Western Norway. **Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation**. v.70, p.281–286, 2010.

COLAK, S.; GEYIKOGLU, F.; ASLAN, A.; DENIZ, G.Y. Effects of lichen extracts on haematological parameters of rats with experimental insulin-dependent diabetes mellitus. **Toxicology and Industrial Health**. p.1–11, 2012.

COLLISON, K.S.; PARHAR, R.S.; SALEH, S.S.; MEYER, B.F.; KWAASI, A.A.; HAMMAMI, M.M.; SCHMIDT, A.M.; STERN D.M.; AL-MOHANNA, F.A. RAGE-mediated neutrophil dysfunction is evoked by advanced glycation end products (AGEs). **Journal of Leucocyte Biology**. v.71, n.3, p.433–444, 2002.

COQUERELLE, C.; MOSER, M. DC subsets in positive and negative regulation of immunity. **Immunology Reviews**. v.234, p.317–334, 2010.

CZERWONIUK, D.; FENDLER, W.; WALENCIAK, L.; MLYNARSKI, W. GlyCulator: a glycemic variability calculation tool for continuous glucose monitoring data. **Journal Diabetes Science Technology**. v.5, n.2, p.447–451, 2011.

D'AMBROSIO, D.; CIPPITELLI, M.; COCCIOLO M.G.; MAZZEO, D.; DI LUCIA, P.; LANG, R.; SINIGAGLIA, F.; PANINA-BORDIGNON, P. Inhibition of IL-12 production by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. Involvement of NF-kappaB downregulation in transcriptional repression of the p40 gene. **The Journal of Clinical Investigation**. v.101, n.1, p.252-262, 1998.

DABLA, P.K. Renal function in diabetic nephropathy. **World Journal of Diabetes**. v.1, n.2, p. 48–56, 2010.

DANIEL, C.; SARTORY, N.A.; ZAHN, N.; RADEKE, H.H.; STEIN, J.M. Immune modulatory treatment of trinitrobenzene sulfonic acid colitis with calcitriol is associated with a change of a T helper (Th) 1/Th17 to a Th2 and regulatory T cell profile. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v.324, n.1, p.23–33, 2008.

DAWSON-HUGHES, B.; MITHAL, A.; BONJOUR, J. P.; BOONEN, S.; BURCKHARDT, P. IOF position statement: vitamin d recommendations for older adults. **Osteoporosis International**. v. 21, p. 1151–1154, 2010.

DECALLONNE, B.; VAN ETEN, E.; OVERBERGH, L.; VALCKX, D.; BOUILLON, R.; MATHIEU, C. 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ restores thymocyte apoptosis sensitivity in non-obese diabetic (NOD) mice through dendritic cells. **Journal of Autoimmunity**. v.24, n.4, p.281–289, 2005.

DELVES, P.J.; ROITT I.M. The immune system. First of two parts. **The New England Journal of Medicine**. v.343, n.1, p.37–49, 2000.

DEL PINO-MONTES, J.; BENITO, G.E.; FERNANDEZ-SALAZAR, M.P.; COVEÑAS, R.; CALVO, J.J.; BOUILLON, R.; QUESADA, J.M. Calcitriol improves streptozotocin-induced diabetes and recovers bone mineral density in diabetic rats. **Calcified Tissue International**. v.75, n.6, p.526–532, 2004.

DEVARAJ, S.; YUN, J.M.; DUNCAN-STALEY, C.R.; JIALAL, I. Low vitamin d levels correlate with the proinflammatory state in type 1 diabetic subjects with and without micro-vascular complications. **American Journal of Clinical Pathology**. v.135, n.3, p.429–433, 2011.

DOBNIG, H.; PILZ, S.; SCHARNAGL, H.; RENNER, W.; SEELHORST, U.; WELLNITZ, B.; KINKELDEI, J.; BOEHM, B.O.; WEIHRAUCH, G.; MAERZ, W. Independent association of low serum 25-hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D levels with all-cause and cardiovascular mortality. **Archives of Internal Medicine**. v.168, p.1340–1349, 2008.

DOERSCHUK, C.M. Mechanisms of leukocyte sequestration in inflamed lungs. **Microcirculation**. v.8, n.2, p.71–88, 2001.

DONKENA, K.; YOUNG, C. Vitamin D, sunlight and cancer risk. **Advances in Preventive Medicine**. v. 2011, p. 1-13, 2011.

DRIVER, J.P.; LAMONT, D.J.; GYSEMANS, C.; MATHIEU, C.; SERREZE, D.V. Calcium insufficiency accelerates type 1 diabetes in vitamin D receptor-deficient nonobese diabetic (NOD) mice. **Endocrinology**. v.152, n.12, p.4620–4629, 2011.

DUNN, J. S.; McLETCHE, N. G. B. Experimental alloxan diabetes in the rat. **Lancet**. v.245, p.384–387, 1943.

DUSSO, A.S.; BROWN, A.J.; SLATOPOLSKY, E. Vitamin D. **American Journal of Physiology – Renal Physiology**. v.289, p.8–28, 2005.

FELDMAN, D; PIKE, J.W.; ADAMS, J. **Vitamin D**. 3.ed. Londres: Academic Press Elsevier, 2011.

FELDMAN, D.; PIKE, J.W.; GLORIEUX, F.H. **Vitamin D**. 2.ed. San Diego: Elsevier Academic Press; 2005.

FELS, A.O.S.; COHN, Z.A. The alveolar macrophage. **Journal of Applied Physiology**. v. 60, p. 353–369, 1986.

FÉRÉOL S.; FODIL, R.; LABAT, B.; GALIACY, S.; LAURENT, V.M.; LOUIS, B.; ISABEY, D.; PLANUS, E. Sensitivity of alveolar macrophages to substrate mechanical and adhesive properties. **Cell Motility and the Cytoskeleton**. v. 63, n.6, p.321–340, 2006.

GAULTON, G. N.; SCHWARTZ, J. L.; EARDLEY, D. D. Assessment of the diabetogenic drugs alloxan and streptozotocin as model for the study of immune defects in diabetic mice. **Diabetologia**. v.28, p.769-775, 1985.

GEORGE, N. KUMAR, T.P.; ANTONY, S.; JAYANARAYANAN, S.; PAULOSE, C.S. Effect of vitamin D₃ in reducing metabolic and oxidative stress in the liver of streptozotocin-induced diabetic rats. **British Journal of Nutrition**. v.108, p.1410–1418, 2012.

GERICH, J.E. Role of the kidney in normal glucose homeostasis and in the hyperglycaemia of diabetes mellitus: therapeutic implications. **Diabetic Medicine**. v.27, p.136–142, 2010.

GODAR, D.E.; POPE, S.J.; GRANT, W.B.; HOLICK M.F. Solar UV Doses of Young Americans and Vitamin D₃ Production. **Environmental Health Perspectives**. v. 20, n.1, p.139–143, 2012.

GORDON, S.; TAYLOR, P.R. Monocyte and macrophage heterogeneity. **Nature Reviews Immunology**. v.5, p.953–964, 2005.

GORUS, F. K.;MALAISSE, W. J.; PIPELEERS, D. G. Selective uptake of alloxan by pancreatic B-cells.**Biochemical Journal**. v.208, p.513–515, 1982.

GREGORI, S.; GIARRATANA, N.; SMIROLDI, S.; USKOKOVIC, M.; ADORINI L. 1alpha,25-dihydroxyvitamin D₃ analog enhances regulatory T-cells and arrests autoimmune diabetes in NOD mice. **Diabetes**. v.51, n.5, p.1367–1374, 2002.

GUPTA, R.P.; HOLLIS, B.W.; PATEL, S.B.; PATRICK, K.S.; BEL, L N.H. CYP3A4 is a human microsomal vitamin D 25-hydroxylase. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**. v.19, p.680–688, 2004.

GROSS, J.L.; AZEVEDO, MJ.; SIVEIRO, S.P.; CANANI, L.H.; CARAMORI, M.L.; ZELMANOVITZ, T. Diabetic Nephropathy: Diagnosis, Prevention, and Treatment. **Diabetes Care**. v.28,n.1, p.164-176, 2005

GROSSMAN, S. B.; YAP, S.H.; SHAFRITZ, D.A. Influence of chronic renal failure on protein synthesis and albumin metabolism in rat liver. **The Journal of Clinical Investigation**. v.59, p.869-878, 1977.

GYSEMANS, C.; VAN ETEN, E.; OVERBERGH, L.; GIULIETTI, A.; EELEN, G.; WAER, M.; VERSTUYF, A.; BOUILLON, R.; MATHIEU, C. Unaltered diabetes presentation in NOD mice lacking the vitamin D receptor. **Diabetes**. v.57, n.1, p.269–275, 2008.

HADDAD, J.G.; MATSUOKA, L.Y.; HOLLIS, B.W.; HU, Y.Z.; WORTSMAN, J. Human plasma transport of vitamin D after its endogenous synthesis. **The Journal of Clinical Investigation**. v.91, p.2552–2555, 1993.

HALLORAN, B.P.; BARTHELL, E.N.; DELUCA, H.F. Vitamin D metabolism during pregnancy and lactation in the rat. **Proceedings of National Academy of Sciences USA**. v.76, n.11, p.5549–5553, 1979.

HARRIS, E.H. Elevated liver function tests in type 2 diabetes. **Clinical Diabetes**. v.23, p.115–119, 2005.

HARRIS, A.G.; SINITSINA, I.; MESSMER, K. Validation of OPS imaging for microvascular measurements during isovolumic hemodilution and low hematocrits. **American Journal of Physiology—Heart**. v.282, n.4, p.1502–1509, 2002.

HATHCOCH, J.N.; GLAO, A.; VIETH, R.; HAENY, R. Risk assessment for vitamin D. **American Journal of Clinical Nutrition**. v.85, n.1, p.6–18, 2007.

HAUSCHILDT, S.; KLEINE, B. Bacterial stimulators of macrophages. **International Review of Cytology**. v.161, p.263–331, 1995.

HASSAN, G.A.; SLIEM, H.A.; ELLETHY, A.T.; SALAMA, M.E. Role of immune system modulation in prevention of type 1 diabetes mellitus. **Indian Journal of Endocrinology and Metabolism**. v.16, n.6, p.904–909, 2012.

HEANEY, R.P. Vitamin D: Role in the calcium economy. em: **Vitamin D**. 2.ed. San Diego: Elsevier Academic Press; 2005.

HEWISON, M.; BURKE, F.; EVANS, K.N.; LAMMAS, D.A.; SANSOM, D.M.; LIU, P.; MODLIN, R.L.; ADAMS, J.S. Extra-renal 25-hydroxyvitamin D₃-1 α hydroxylase in human health and disease. **The Journal of Steroid Biochemistry Molecular Biology**. v.103, n.3-5, p.316-321, 2007.

HOLICK, M.F. Vitamin D deficiency. **The New England Journal of Medicine**. v.357, p.266–281, 2007.

HOLICK, M. F. Vitamin D: its role in cancer prevention and treatment. **Progress in Biophysics & Molecular Biology**. v.92, p.49-59, 2006a.

HOLICK, M.F. Sunlight and Vitamin D for Bone Health and Prevention of Autoimmune Diseases, Cancers and Cardiovascular Disease. **American Journal of Clinical Nutrition**. v.80, p.1678–1688, 2004.

HOLICK, M.F. Resurrection of vitamin D deficiency and rickets. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 116, p. 2062 – 2072, 2006b

HOLICK, M.F. Vitamin D status: Measurement, interpretation and clinical application. **Annals of Epidemiology**. v.19, n.2, p.73–78, 2009.

HOLICK, M.F. Vitamin D: a D-Lightful health perspective. **Nutrition Reviews**. v.66, S182-194, 2008.

HOLICK, M.F.; KLEINER-BOSSALLER, A.; SCHNOES, H. K.; KASTEN, P. M.; BOYLE, I.T.; DELUCA, H.F. 1,24,25-Trihydroxyvitamin D, a metabolite of vitamin D₃ effective on intestine. **The Journal of Biological Chemistry**. v.243, n.19, p.6691–6696, 1973.

HOLICK, M. F.; BINKLEY, N. C.; BISCHOFF-FERRARI, H. A.; GORDON, C. M.; HANLEY, D. A. *et al.* Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**. v.96, s.7, p.1911–1930, 2011.

HOLICK, M.F.; MACLAUGHLIN, J.A.; CLARK, M.B.; HOLICK, S.A.; POTTS, J.T. JR.; ANDERSON, R.R.; *et al.* Photosynthesis of pre-vitamin D₃ in human skin and the physiological consequences. **Science**. v.210, p.203-205, 1980.

HOLICK, M. F.; MATSUOKA, L.Y.; WORTSMAN, J. Age, vitamin D, and solar ultraviolet radiation. **Lancet**. v. 4, p.1104-1105, 1989.

HUHTAKANGAS, J.A.; OLIVERA, C.J.; BISHOP, J.E.; ZANELLO, L.P.; NORMAN, A.W. The vitamin D receptor is present in caveolae-enriched plasma membranes and binds 1,25(OH)₂-vitamin D₃ in vivo and in vitro. **Molecular Endocrinology**. v.18, p.2660-2671, 2004.

HYPPONEN, E.; LAARA, E.; REUNANEN, A.; JARVELIN, M.R.; VIRTANEN, S.M. Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes: a birthcohort study. **Lancet**. v.358, p.1500–1503, 2001.

ICHINOSE, K.; KAWASAKI, E.; EGUCHI, K. Recent advancement of understanding pathogenesis of type 1 diabetes and potential relevance to diabetic nephropathy. **American Journal Nephrology**. v. 27, p. 554-564, 2007.

INTERNATIONAL DIABETES FOUNDATION. **IDF Diabetes atlas**. 6^a edição, 2013. Disponível em: <<http://www.diabetesatlas.org>>. Acesso em: 17 jun, 2014.

IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. **Science**. v.327, p. 291–295, 2010.

JACOBSEN, R.; LORENZEN, J.K.; TOUBRO, S.; KROG-MIKKELSEN, I.; ASTRUP, A. Effect of short-term high dietary calcium intake on 24-h energy expenditure, fat oxidation, and fecal fat excretion. **International Journal of Obesity**. v.29, n.3, p.292–301, 2005.

JAMES, W. P. 22nd Marabou Symposium: the changing faces of vitamin D. **Nature Reviews**. v. 66, n.5, p.286-290, 2008.

JINDAL, S.; GUPTA, S.; GUPTA, R.; KAKKAR, A.; SINGH, H.V.; GUPTA, K.; SINGH, S. Platelet indices in diabetes mellitus: indicators of diabetic microvascular complications. **Hematology**. v.16, n.2, p.86–89, 2011.

JONES, G.; PROSSER, D.E.; KAUFMANN, M. CYTOCHROME P450-MEDIATED METABOLISM OF VITAMIN D. **Journal of Lipid Research**. v.54, n.4, p.1–56, 2013.

KAMEN, D.L.; TANGPRICHA, V. Vitamin D and molecular actions on the immune system: modulation of innate and autoimmunity. **Journal of Molecular Medicine**. v.88, p.441–450, 2010.

KAUFMANN, M. PROSSER, D.E.; JONES, G. Bioengineering Anabolic Vitamin D-25-Hydroxylase Activity into the Human Vitamin D Catabolic Enzyme, Cytochrome P450 CYP24A1, by a V391L Mutation. **The Journal of Biological Chemistry**. v.286, n.33, p.28729-28737, 2011.

KHOO, A. L.; JOOSTEN, I.; MICHELS, M.; WOESTENENK, R.; PREIJERS, F.; HE, X. H.; NETEA, M. G.; VAN DER VEN, A. J. A. M.; KOENEN, H. J. P. M. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ inhibits proliferation but not the suppressive function of regulatory T cells in the absence of antigen-presenting cells. **Immunology**. v.134, p.459–468, 2011.

KIKUTA, J.; KAWAMURA, S.; OKIJI, F.; SHIRAZAKI, M.; SAKAI, S.; SAITO H.; ISHII, M. Sphingosine-1-phosphate-mediated osteoclast precursor monocyte migration is a critical point of control in antibone-resorptive action of active vitamin D. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v.110, n.17, p.7009–7013, 2013.

KOLTAI, K.; FEHER, G.; KESMARKY, G.; KESZTHELYI, Z.; CZOPF, L.; TOTH, K. The effect of blood glucose levels on hemorheological parameters, platelet activation and aggregation in oral glucose tolerance tests. **Clinical Hemorheology and Microcirculation**. v.35, n.4, p.517–525, 2006.

KUKREJA, A.; MACLAREN, N.K. **Autoimmunity and diabetes**. v.84, p.4371-4318, 1999.

KURODA, E.; COBAN, C.; ISHII, K.J. Particulate Adjuvant and Innate Immunity: Past Achievements, Present Findings, and Future Prospects. **International Reviews of Immunology**. v.32, n.2, p.209–220, 2013.

LA TORRE, D.; LERNMARK, A. Immunology of β -cell destruction. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. v.654, p. 537– 583, 2010.

LAAKSI, I.; RUOHOLA, J. P.; TUOHIMAA, P.; AUVINEN, A.; HAATAJA, R.; PIHLAJAMA "KI, H.; YIKOMI, T. An association of serum vitamin D concentrations < 40 nmol/L with acute respiratory tract infection in young Finnish men. **American Journal of Clinical Nutrition**. v.86, p.714–717, 2007.

LAM, J.; WULFF, H. The Lymphocyte potassium channels Kv1.3 and KCa3.1 as targets for immunosuppression. **Drug Development Research**. v.72 n.7, p.573–584, 2011.

LAMBRECHT, B.N. Alveolar macrophage in the driver's seat. **Immunity**. v.24, n.4, p.366–368.

LAPLANTE, C.; LEMAIRE, I. Interactions between alveolar macrophage subpopulations modulate their migratory function. **American Journal of Pathology**. v.136, n.1, p.199–206.

LEITER, E.H.; HERRATH, M.V. Animal models have little to teach us about Type 1 diabetes: 2. In opposition to this proposal. **Diabetologia**. v.47, p.1657–1660, 2004.

LE MELLAY, V.; GROSSE, B.; LIEBERHERR, M. Phospholipase C beta and membrane action of calcitriol and estradiol. **Journal of Biological Chemistry**. v. 272, p.11902–11907, 1997.

LENZEN, S.The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes.**Diabetologia**, v. 51, p. 216–226, 2008.

LENZEN, S.; MUNDAY, R. Thiol-group reactivity, hydrophilicity and stability of alloxan, its reduction products and its *N*-methyl derivatives and a comparison with ninhydrin.**Biochemical Pharmacology**. v.42, p.1385–1391, 1991.

LI, F.K.; DAVENPORT, A.; ROBSON, R.L.; LOETSCHER, P.; ROTHLEIN, R.; WILLIAMS, J.D.; TOPLEY, N. Leukocyte migration across human peritoneal mesothelial cells is dependent on directed chemokine secretion and ICAM-1 expression. **Kidney International**. .v.54, n.6, p.2170–2183, 1998.

LI, J.; BYRNE, M.E.; CHANG, E.; JIANG, Y.; DONKIN, S.S.; BUHMAN, K.K.; BURGESS, J.R.; TEEGARDEN, D. 1Alpha,25-dihydroxyvitamin D hydroxylase in adipocytes. **The .Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**. v.112, p.122–126, 2008.

LOPICCOLO, M.C.; LIM, H.W. Vitamin D in health and disease. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**. v.26, p.224–229, 2010.

MACLAUGHLIN, J.A.; ANDERSON, R.R.; HOLICK, M.F. Spectral character of sunlight modulates photosynthesis of previtamin D₃ and its photoisomers in human skin. **Science**. v. 216, p.1001–1003, 1982.

MADER, J.R.; RESCH, Z.T.; MCLEAN, G.R.; MIKKELSEN, J.H.; OXVIG, C.; MARLER, R.J.; CONOVER, C.A. Mice deficient in PAPP-A show resistance to the development of diabetic nephropathy. **Journal of Endocrinology**. v.219, n.1, p.51–58, 2013.

MAHON, J.L.; SOSENKO, J.M.; RAFKIN-MERVIS, L. The TrialNet natural history study of the development of type 1 diabetes: Objectives, design, and initial results. **Pediatric Diabetes**. v. 10, p.97-104, 2009.

MAKIBAYASHI, K.; TATEMATSU, M.; HIRATA, M.; FUKUSHIMA, N.; KUSANO, K.; OHASHI, S.; ABE, H.; KUZE, K.; FUKATSU, A.; KITA, T.; DOI, T. A vitamin D analog ameliorates glomerular injury on rat glomerulonephritis. **The American Journal of Pathology**. v.158, n.5, p.1733–1741, 2001.

MALAISSE, W.J. Alloxan toxicity to the pancreatic B-cell. **Biochemical Pharmacology**. v.31, p.3527-3534, 1982.

MARTINS, J.O.; FERRACINI, M.; RAVANELLI, N.; LANDGRAF, R.G.; JANCAR, S. Insulin inhibits LPS-induced signaling pathways in alveolar macrophages. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 21, p. 297-304, 2008.

MASSHEIMER, V.; BOLAND, R.; DE BOLAND, A.R. Rapid 1,25(OH)₂-vitamin D₃ stimulation of calcium uptake by rat intestinal cells involves a dihydropyridine-sensitive cAMPdependent pathway. **Cellular Signaling**. v.6, p. 299–304, 1994.

MATHIEU, C.; GYSEMANS, C.; GIULIETTI, A.; BOUILLON, R. Vitamin D and diabetes. **Diabetologia**. v.48, p.1247–1257, 2005.

MATHIEU, C.; VAN ETEN, E.; GYSEMANS, C.; DECALLONNE, B.; KATO, S.; LAUREYS, J.; DEPOVERE, J.; VALCKX, D.; VERSTUYF, A.; BOUILLON, R. In vitro and in vivo analysis of the immune system of vitamin D receptor knockout mice. **Journal of Bone Mineral Research**. v.16, n.11, p.2057–2065, 2001.

MATHIEU C, WAER M, LAUREYS J, RUTGEERTS O, BOUILLON R. Prevention of autoimmune diabetes in NOD mice by 1,25 dihydroxyvitamin D₃. **Diabetologia**. v.37, p.552-558, 1994.

MEHDI, U.; TOTO, R.D.; Anemia, Diabetes, and Chronic Kidney Disease. **Diabetes Care**. v.32, n. 7, p.1320–1326, 2009

MELANSON, E.L.; DONAHOO, W.T.; DONG, F.; IDA, T.; ZEMEL, M.B. Effect of low- and high-calcium dairy-based diets on macronutrient oxidation in humans. **Obesity Research**. v.13, n.12, p.2102–2112, 2005.

MCKENNA, M.J.; FREANEY R.; MEADE, A.; MULDOWNNEY, F.P. Hypovitaminosis D and elevated serum alkaline phosphatase in elderly Irish people. **American Journal of Clinical Nutrition**. v.41, n.1, p.101 – 109, 1985.

MILLER, W.A.; PORTALLE, A.A. Genetic disorders of vitamin D biosynthesis. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**. v.28, n.4, p.825–840, 1999.

MORA, J.R.; IWATA, M.; VON ANDRIAN, U. H. Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage. **Nature Reviews Immunology**. v. 8, p. 685-698, 2008.

MOSEKILDE, L. Vitamin D and the Elderly. **Clinical Endocrinology**. v.62, n.3, p.265–281, 2005.

MOSSER, D.M. EDWARDS, J.P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature Reviews Immunology**. v.8, n.12, p.958–969, 2008.

NAGY, J.A.; JACKMAN, R.W. Anatomy and Physiology of the Peritoneal Membrane. **Seminars in Dialysis**. v.11, n1, p49–56, 1998.

NATHAN, C. Metchnikoff's legacy in 2008. **Nature Immunology**. v.9, p695–698, (2008).

NARVAEZ, C.J.; MATTHEWS, D.; BROUN, E.; CHAN, M.; WELSH, J. Lean phenotype and resistance to diet-induced obesity in vitamin D receptor knockout mice correlates with induction of uncoupling protein-1 in white adipose tissue. **Endocrinology**. v.150, p.651–661, 2009.

NGAHA, E.O. Renal effects of potassium dichromate in the rat: composition of urinary excretion with corresponding tissue pattern. **General Pharmacology**. v.12, p.291-358, 1981.

NISHII, Y.; OKANO, T. History of the development of new vitamin D analogs: Studies on 22-oxacalcitriol (OCT) and 2beta-(3-hydroxypropoxy) calcitriol (ED-71). **Steroids**. v. 66, p. 137–144, 2001.

NORDLIE, R.C.; ARION, W.J.; LANGE, A.J. Evidence for the common identity of glucose-6-phosphatase, inorganic pyrophosphatase, and pyrophosphate-glucose phosphotransferase. **The Journal of Biological Chemistry**. v.239, p.1680–1685, 1964.

NORDLIE, R.C.; FOSTER, J.D. Regulation of glucose production by the liver. **Annual Review of Nutrition**. v.19, p.379–406, 1999.

NORMAN, A.W.; HENRY, H. 1,25-Dihydroxycholecalciferol: a hormonally active form of vitamin D₃. **Recent Progress in Hormone Research**. v.30, p. 431-479, 1974.

NORMAN, A.W. Minireview: vitamin D receptor: new assignments for an already busy receptor. **Endocrinology**. v.147, p.5542-5548, 2006.

NORMAN, A.W. From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health. **American Journal of Clinical Nutrition**. v. 88, n. 2, p. 491S-499S, 2008.

NORMAN, A.W.; FRANKEL, J.B.; HELDT, A.M.; GRODSKY, G.M. Vitamin D deficiency inhibits pancreatic secretion of insulin. **Science**. v. 209, n.4458, p.823–825, 1980.

NUNES, F. P. B.; SAMPAIO, S. C.; SANTORO, M. L.; SOUZA-e-SILVA, M. C. C. S. Long-lasting anti-inflammatory properties of *Crotalus durissus terrificus* snake venom in mice. **Toxicon**, v. 49, p. 1090-1098, 2007.

OCHS-BALCOM, H.M.; CHENNAMANENI, R.; MILLEN, A.E.; SHIELDS, P.G.; MARIAN, C.; TREVISAN, M.; FREUDENHEIM, J.L.. Vitamin D receptor gene polymorphisms are associated with adiposity phenotypes. **American Journal of Clinical Nutrition**. v.93, p.5–10, 2011.

OGIMOTO, M.; ANZAI, K.; TAKENOSHITA, H.; KOGAWA, K.; AKEHI, Y.; YOSHIDA, R.; NAKANO, M.; YOSHIDA, K.; ONO, J. Criteria for early identification of aceruloplasminemia. **Internal Medicine**. v.50, n.13, p.1415–1418, 2011.

OLIVEIRA, G.O.; BRAGA, C.P.; FERNANDES, A.A. Improvement of biochemical parameters in type 1 diabetic rats after the roots aqueous extract of yacon [*Smallanthus sonchifolius* (Poepp.& Endl.)] treatment. **Food and Chemical Toxicology**. v.59, p.256–260, 2013.

OLIVEIRA, N.M.P. **Papel da Vitamina D na susceptibilidade para a diabetes mellitus tipo 1**. 2010. 66f.. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina) - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade da Beira Interior, Covilhã, 2010.

OMS. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Diabetes 2013: Fact Sheet, 312**. Disponível em:

<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/index.html>>.

Acessado em 08 de janeiro de 2014.

OYEDEMI, S.O.; ADEWUSI, E.A.; AIYEGORO, O.A.; AKINPELU, D.A. Antidiabetic and haematological effect of aqueous extract of stem bark of *Azelia africana* (Smith) on streptozotocin-induced diabetic Wistar rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. v.1, n.5, p.353–358, 2011.

PALMA, H.E.; WOLKMER, P.; GALLIO, M.; CORRÊA, M.M.; SCHMATZ, R.; THOMÉ, G.R.; PEREIRA, L.B.; CASTRO, V.S.; PEREIRA, A.B.; BUENO, A.; DE OLIVEIRA, L.S.; ROSOLEN, D.; MANN, T.R.; DE CECCO, B.S.; GRAÇA, D.L.; LOPES, S.T.; MAZZANTI, C.M. Oxidative stress parameters in blood, liver, and kidney of diabetic rats treated with curcumin and/or insulin. **Molecular and Cellular Biochemistry**. v.386, p.199–210, 2014.

PEISER, L.; GORDON, S. The function of scavenger receptors expressed by macrophages and their role in the regulation of inflammation. **Microbes and Infection**. v.3, p149–159, 2001.

PEISER, L.; MUKHOPADHYAY, S.; GORDON, S. Scavenger receptors in innate immunity. **Current Opinion in Immunology**. v.14, p.123–128, 2002.

PELEG, A.Y.; WEERARATHNA, T.; MCCARTHY, J.S.; DAVIS, T.M. Common infections in diabetes: Pathogenesis, management and relationship to glycaemic control. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**. v.23, n.1, p.3-13, 2007.

PENCKOFER, S.; KOUBA, J.; WALLIS, D.E.; EMANUELE, M.A. Vitamin D and diabetes: let the sunshine in. **The Diabetes Educator**. v.34, n.6, p.939-944, 2008.

PENNA, G.; ADORINI, L. 1α , 25-dihydroxyvitamin D3 inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation. **The Journal of Immunology**. v.164, p.2405–2411, 2000.

PENNA, G.; AMUCHASTEGUI, S.; COSSETTI, C.; AQUILANO, F.; MARIANI, R.; SANVITO, F.; DOGLIONI, C.; ADORINI, L. Treatment of experimental autoimmune prostatitis in nonobese diabetic mice by the vitamin D receptor agonist elocalcitol. **The Journal of Immunology**. v.177, n.12, p.8504–8511, 2006.

PEREIRA, F.; ALMEIDA, M.D.V. Vitamina d: uma verdadeira Hormona. **Nutricias**. v.8, p.42-47, 2008.

PETERS, B. S. M.; SANTOS, L. C.; FISBERG, M.; WOOD, R.J.; MARTINI, L. A. Prevalence of Vitamin D Insufficiency in Brazilian Adolescents. **Annals of Nutrition and Metabolism**. v.54, p.15–21, 2009.

PETERLIK, M.; CROSS, H.S. Vitamin D and calcium insufficiency-related chronic diseases: molecular and cellular pathophysiology. **European Journal of Clinical Nutrition**. v. 63, n.12, p.1377-1386, 2009.

PETERSEN, H.J.; SMITH, A.M. The Role of the Innate Immune System in Granulomatous Disorders. **Frontiers in Immunology**. v. 4, p. 120, 2013.

PREMAOR, M.O.; FURLANETTO, T.W. Hipovitaminose D em Adultos: Entendendo Melhor a Apresentação de Uma Velha Doença. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**. v. 50, n.1, p.25 – 37, 2006.

MITRI, J.; MURARU, M.D.; PITTAS, A.G. Vitamin D and type 2 diabetes: a systematic review. **European Journal of Clinical Nutrition**. v.65, n.9, p.1005–1015, 2011.

PREMAOR, M.O.; PALUDO, P.; MANICA, D.; PALUDO, A.P.; ROSSATTO, E.R.; SCALCO, R. Hypovitaminosis D and secondary hyperparathyroidism in resident physicians of general hospital in Southern Brazil. **Journal of Endocrinological Investigation**. v.31, n.11, p.991-995, 2008.

PROSSER, D.E.; JONES, G. Enzymes involved in the activation and inactivation of vitamin D. **Trends in Biochemical Sciences**. v. 29, p. 664–673, 2004.

RAGHUWANSHI, A.; JOSHI, S. S.; CHRISTAKOS, S. Vitamin D and multiple sclerosis. **Journal of Cellular Biochemistry**. v.105, p.338–343, 2008.

RAYAT, G.R.; SINGH, B.; KORBUTT, G.S.; RAJOTTE, R.V. Single injection of insulin delays the recurrence of diabetes in syngeneic islet transplanted diabetic NOD mice. **Transplantation**. v.70, n.6, p.976–785, 2000.

RAZZAGHY-AZAR, M.; SHAKIBA, M. Assessment of vitamin D status in healthy children and adolescents living in Tehran and its relation to iPTH, gender, weight and height. **Annals of Human Biology**. v.37, n.5, p.692–701, 2010.

REES, D.A.; ALCOLADO, J.C. Animal models of diabetes mellitus. **Diabetic Medicine**. v.22, n.4, p.359–370, 2005.

REICHEL, H.; KOEFFLER, H.P.; NORMAN, A.W. The role of the vitamin D endocrine system in health and disease. **The New England Journal of Medicine**. v.320, p.980–991, 1989.

REVELLI A.; MASSOBRIO M.; TESARIK J. Nongenomic effects of 1,25 dihydroxyvitamin D₃. **Trends in Endocrinology & Metabolism**. v 9, p. 419–427, 1998.

REDDY, G.S.; TSERNG, K.Y. Calcitroic acid, end product of renal metabolism of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ through C-24 oxidation pathway. **Biochemistry**. v. 28, n. 4, p.1763-9, 1989.

RIACHY, R.; VANDEWALLE, B.; MOERMAN, E.; BELAICH, S.; LUKOWIAK, B.; GMYR, V.; MUHARRAM, G.; KERR CONTE, J.; PATTOU, F. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ protects human pancreatic islets against cytokine-induced apoptosis via down-regulation of the Fas receptor. **Apoptosis**. v.11, n.2, p.151–159, 2006.

RICHARD, P.; NISSON, B.Y.; ROSENQUIST, V. The effect of long term intensified insulin treatment on the development of microvascular complications of diabetes mellitus. **The New England Journal of Medicine**. v.329, n.5, p.304–311, 1993.

RITZ, E.; HAXSEN, V. Diabetic nephropathy and anaemia. **European Journal of Clinical Investigation**. v.35, s.3, p.66–74, 2005.

ROIDER, E.; RUZICKA, T.; SCHAUBER, J. Vitamin D, the Cutaneous Barrier, Antimicrobial Peptides and Allergies: Is There a Link? **Allergy Asthma & Immunology Research**. v. 5, n.3, p.119-128, 2013.

SAKAKI, T.; SAWADA, N.; KOMAI, K.; YAMADA, S.; YAMAMOTO, K.; OHYAMA, Y.; INOUE, K. Dual metabolic pathway of 25-hydroxyvitamin D₃ catalyzed by human CYP24. **European Journal of Biochemistry**. v. 267, p.6158-6165, 2000.

SAUERWEIN, H.P.; SCHOLS, A.M.W.J. Glucose metabolism in chronic lung disease. **Clinical Nutrition**. v. 21, n.5, p.367–371, 2002.

SARAIVA, G. L.; CENDOROGLO, M. S.; RAMOS, L. R.; ARAUJO, L. M.; VIEIRA, J. G.; MAEDA, S. S.; BORBA, V. Z. C.; KUNII, I.; HAYASHI, L. F.; LAZARETTI-CASTRO, M. Prevalence of vitamin D deficiency, insufficiency and secondary hyperparathyroidism in the elderly inpatients and living in the community of the city of Sao Paulo, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**. v.51, n.3, p.437-442, 2007.

SCHNEIDER, D.J. Factors contributing to increased platelet reactivity in people with diabetes. **Diabetes Care**. v.32, n.4, p.525–527, 2009.

SCHUCH, N.J. **Relação entre a concentração sérica da vitamina D, polimorfismo do gene VDR e síndrome metabólica em indivíduos adultos**. 2011. 109 f.. (Tese de Doutorado em Ciências) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

SHAPIRA, Y.; AGMON-LEVIN, N.; SHOENFELD, Y. Geoepidemiology of autoimmune rheumatic diseases. **Nature Review Rheumatology**. v.6, p.468–476, 2010.

SHOENFELD, N.; AMITAL, H.; SHOENFELD, Y. The effect of melanism and vitamin D synthesis on the incidence of autoimmune disease. **Nature Clinical Practice Rheumatology**. v.5, p.99–105, 2009.

SIGMUNDSDOTTIR, H. From the bench to the clinic: New aspects on immunoregulation by vitamin D analogs. **Dermato-endocrinology**. v.3, n. 3, p. 187–192, 2011.

SILVA, J.M. Brief history of rickets and of the discovery of vitamin D. **Acta Reumatológica Portuguesa**. v. 32, n. 3, p 205-229, 2007.

SILVAGNO, F.; DE VIVO, E.; ATTANASIO, A.; GALLO, V.; MAZZUCCO, G.; PESCARMONA, G. Mitochondrial localization of vitamin D receptor in human platelets and differentiated megakaryocytes. **Plos One**. v.5, n.1, e8670, 2010.

SIM, J.J.; LAC, P.T.; LIU, I.L.A.; MEGUERDITCHIAN, S.O.; KUMAR, V.A.; KUJUBU, D.A.; RASGON, S.A. Vitamin D deficiency and anemia: a cross-sectional study. **Annals of Hematology**. v.89, n.5, p. 447–452, 2010.

SKÁLOVÁ, S. The diagnostic role of urinary n-acetyl-beta-D-glucosaminidase (nag) activity in the detection of renal tubular impairment. **Acta Medica (hradec Kralove)**. v48, n.2, p.75–80.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes. São Paulo, SP, 2012-2013.

SOLIMAN, A.T.; ELDABBAGH, M.; ELAWWA, A.; SALEEM, W. Does Vitamin D therapy affect hematological indices in adolescents with vitamin D deficiency? **Indian Journal of Endocrinology & Metabolism**. v. 16, n. 4, p. 659 – 660, 2012.

SONG, F.; QI, X.; CHEN, W.; JIA, W.; YAO, P.; NUSSLER, A.K.; SUN, X.; LIU, L. Effect of Momordica grosvenori on oxidative stress pathways in renal mitochondria of normal and alloxan-induced diabetic mice. Involvement of heme oxygenase-1. **European Journal of Nutrition**. v.46, n.2, p.61-69, 2007.

SPILLER, F; CARLOS, D; SOUTO, F. O; de FREITAS, A; SOARES, F. S; VIEIRA, S. M; PAULA, F. J; ALVES-FILHO, J. C; CUNHA, F. Q. α 1-Acid Glycoprotein decreases neutrophil migration and increases susceptibility to sepsis in diabetic mice. **Diabetes**. v.61, p.1584–1591. 2012.

STRAUSS-AYALI, D.; CONRAD, S.M.; MOSSER, D.M. Monocyte subpopulations and their differentiation patterns during infection. **Journal of Leukocyte Biology**. v.82, p.244–252, 2007.

SUASSUNA, J.H.R.; DAS NEVES, F.C.; HARTLEY, R.B.; OGG, C.S.; CAMERON, J.S. Immunohistochemical studies of the peritoneal membrane and infiltrating cells in normal subjects and in patients on CAPD. **Kidney International**. v.46, p.443–454, 1994.

SUNAHARA, K.K.; MARTINS, J.O. Alveolar macrophage in diabetes: friends or foes? **Journal Leukocyte Biology**. v.91, n.6, p.871–876, 2012.

SUNAHARA, K. K. S; SANOMIYA, P; MARTINS, J. O. Briefs on insulin and innate immune response. **Cellular Physiology and Biochemistry**. v. 29, p. 01–08, 2012.

SZKUDELSKI, T.; The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas. **Physiological research**. v.50, p.536-546, 2001.

TAKAHASHI, K. Development and differentiation of macrophages and related cells: historical review and current concepts. **Journal of Clinical and Experimental Hematopathology**. v. 41, p.1–33, 2000.

TAKIISHI, T.; GYSEMANS, C.; BOUILLON, R.; MATHIEU, C. Vitamin D and Diabetes. **Endocrinology Metabolism Clinics of North America**. v. 39, n.2, p.419–446.

TAN,X.; LI, Y.; LIU, Y. Therapeutic role and potential mechanisms of active vitamin D in renal interstitial fibrosis. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**. v.103, p. 491–496, 2007.

TANAKA, Y.; DELUCA, H.F. The control of 25-hydroxyvitamin D metabolism by inorganic phosphorus. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v.154, n.2, p.566–574, 1973.

THE DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL RESEARCH GROUP. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. **The New England Journal of Medicine**. v.329, n.14, p.977–986, 1993.

THEOFILOPOULOS, A.N.; KONO, D.H.; BEUTLER, B.; BACCALA, R.; Intracellular nucleic acid sensors and autoimmunity. **Journal of Interferon & Cytokine Research**. v.11, n.12, p.867–886, 2011.

TIAN, X.Q.; CHEN, T.C.; LU, Z.; SHAO, Q.;HOLICK, M.F. Characterization of the translocation process of vitamin D3 from the skin into the circulation. **Endocrinology**. v.135, p. 655–661, 1994.

TIEDGE, M.; LORTZ. S.; DRINKGERN. J.; LENZEN. S. Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. **Diabetes**. v.46, p.1733-1742, 1997.

TIMONEN, T.; NA"YHA", S.; KOSKELA, T.; PUKKALA, E. Are sunlight deprivation and influenza epidemics associated with the onset of acute leukemia? **Haematologica**. v.92, p.1553–1556, 2007.

TOPLEY, N.; MACKENZIE, R.K.; WILLIAMS, J.D. Macrophages and mesothelial cells in bacterial peritonitis. **Immunobiology**. v.195, p.563–573, 1996

UEMATSU, S.; AKIR, S. Toll-like receptors and innate immunity. **Journal of Molecular Medicine**. v.84, p.712-725, 2006.

VAGIANOS, K.; BECTOR, S.; MCCONNELL, J.; BERNSTEIN, C. N. Nutrition assessment of patients with inflammatory bowel disease. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**. v.31, p.311–319, 2007.

VAN ETEN, E.; MATHIEU, C. Immunoregulation by 1,25-dihydroxyvitamin D₃: basic concepts. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**. v.97, n.1-2, p.93-101, 2005.

VENERANDO, B.; FIORILLI, A.; CROCI, G.; TRINGALI, C.; GOI, G.; MAZZANTI, L.; CURATOLA, G.; SEGALINI, G.; MASSACCESI, L.; LOMBARDO, A.; TETTAMANTI, G. Acidic and neutral sialidase in the erythrocyte membrane of type 2 diabetic patients. **Blood**. v.99, n.3, p.1064–1070, 2002.

VERHAVE, G.; SIEGERT, C.E. Role of vitamin D in cardiovascular disease. **The Netherlands Journal of Medicine**. v.68, n.3, p.113-118, 2010.

VERSTUYF, A.; CARMELIET, G.; BOUILLON, R.; MATHIEU, C. Vitamin D: a pleiotropic hormone. **Kidney International**. v.78, n.2, p.140–145, 2010.

VIET, H. R. What is the optimal vitamin D status for health? **Progress in Biophysics & Molecular Biology**. v.92, p.26-32, 2006.

WALTERS, M.R. Newly identified actions of the vitamin D endocrine system. **Endocrine Reviews**. v. 13, p.719–764, 1992.

VOJTKOVÁ, J.; CILJAKOVÁ, M.; VOJAROVÁ, L.; JANÍKOVÁ, K.; MICHNOVÁ, Z.; SAGIOVÁ, V. Hypovitaminosis D in children with type 1 diabetes mellitus and its influence on biochemical and densitometric parameters. **Acta Medica (Hradec Kralove)**. v.55, n.1, p.18–22, 2012.

WATERHOUSE, J.C.; PEREZ, T.H.; ALBERT, P.J. Reversing bacteria-induced vitamin D receptor dysfunction is key to autoimmune disease. **Annals of the New York Academy of Science**. v.1173, p.757–765, 2009.

WEAVER, D. C.; McDANIEL, M. L.; LACY, P. E. Alloxan uptake by isolated rat islets of Langerhans. **Endocrinology**, v. 102, p. 1847–1855, 1978.

WHITE, J.H. Vitamin D Signaling, Infectious Diseases and Regulation of Innate Immunity. **Infection and immunity**. 2008, v. 76, n.9, p. 3837-3843, 2008.

WESTERBACKA, J, YKI-JÄRVINEN, H.; TURPEINEN, A.; RISSANEN, A.; VEHKAVAARA, S.; SYRJÄLÄ, M.; LASSILA, R. Inhibition of platelet-collagen interaction: an in vivo action of insulin abolished by insulin resistance in obesity. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**. v.22, n.1, p.167–172, 2002.

XU, H.; SORURI, A.; GIESELER, R.K.; PETERS, J.H. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ exerts opposing effects to IL-4 on MHC class-II antigen expression, accessory activity, and phagocytosis of human monocytes. **Scandinavian Journal of Immunology**. v. 38, n. 6, p. 535-540, 1993.

YAMADA, S.; NAKAYAMA, K.; TAKAYAMA, H.; SHINKI, T.; TAKASAKI, Y.; SUDA, T. Isolation, identification, and metabolism of (23S,25R)-25-hydroxyvitamin D₃ 26,23-lactol. A biosynthetic precursor of (23S, 25R)-25-hydroxyvitamin D₃ 26,23-lactone. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 259, p.884-889, 1984.

YAMASAKI, T.; IZUMI, S.; IDE, H.; OHYAMA, Y. Identification of a novel rat microsomal vitamin D₃25-hydroxylase. **The Journal. of Biological. Chemistry**. v. 279, p. 22848–22856, 2004.

YONEMURA, K.; FUJIMOTO, T.; FUJIGAKI, Y.; HISHIDA, A. Vitamin D deficiency is implicated in reduced serum albumin concentrations in patients with end-stage renal disease. **American Journal of Kidney Diseases**. v.36, n.2, p.337–344, 2000.

YU. S.; CANTORNA, M.T. Epigenetic reduction in invariant NKT cells following in utero vitamin D deficiency in mice. **Journal of Immunology**. v. 186, n.3, p.1384–90, 2011.

ZANELLO, L.; NORMAN, A.W. Stimulation by 1,25(OH)₂- vitamin D₃ of whole cell chloride currents in osteoblastic ROS 17/2.8 cells: a structure-function study. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 272, p. 22617–22622, 1997.

ZEITZ, U; WEBER, K.; SOEGIARTO, D.W.; WOLF, E.; BALLING, R.; ERBEN, R.G.. Impaired insulin secretory capacity in mice lacking a functional vitamin D receptor. **FASEB Journal**. v.17, n.3, p.509–511, 2003.

ZERN, M.A.; YAP, S.H.; STRAIR, R.K.; KAYSEN, G.A.; SHAFRITZ, D. A. Effects of chronic renal failure on protein synthesis and albumin messenger ribonucleic acid in rat liver. **The Journal of Clinical Investigation**. v.73, n.4, p.1167–1174, 1984.

ZHANG, X; GONÇALVES, R.; MOSSER, D.M. The Isolation and Characterization of Murine Macrophage. **Current Protocols in Immunology**. c. 14, u. 14.1, 2008

ZHANG, X.; HO, S.M. Epigenetics meets endocrinology. **Journal of Molecular Endocrinology**. v.46, n. 1, p.R11–32, 2011.

ZHU, W.; CAI, D.; WANG, Y.; LIN, N.; HU, Q.; QI, Y.; MA, S.; AMARASEKARA, S. Calcium plus vitamin D₃ supplementation facilitated fat loss in overweight and obese college students with very-low calcium consumption: a randomized controlled trial. **Nutrition Journal**. v.12, p. 1-8, 2013.

ZIEROLD, C.; MINGS, J.A.; DELUCA, H.F. Regulation of 25-hydroxyvitamin D₃-24-hydroxylase mRNA by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and parathyroid hormone. **Journal of Cell Biochemistry**. v. 88, n. 2, p. 234-237, 2003.

ZIMMET, P.; ALBERTI, K.G.; SHAW, J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. **Nature**. v.414, n.6865 p.782–787, 2001.

ANEXOS

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Ofício CEUA/FCF 332013

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo CERTIFICA que o projeto de pesquisa **"Influência da vitamina D na expressão de receptores (VDR E TLR), no sistema imune e nas células β pancreáticas"** (Protocolo CEUA/FCF/389), submetido pelo(a) **Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins**, foi APROVADO em reunião de 5 de novembro de 2012, por estar de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Certifica, também, que, em 11 de março de 2013, foi aprovada a inclusão do(a) aluno(a) **Leonardo Mendes Bella** como pesquisador(a) responsável.

São Paulo, 13 de março de 2013.

Profa. Dra. Vladi Olga Consiglieri
Vice-Coordenadora da CEUA/FCF/USP