

SUPLEMENTAÇÃO COM VITAMINA D ATENUA A RESPOSTA INFLAMATÓRIA AGUDA

Jessica Faggion Pinheiro de Oliveira

Mestre em Biociências e Fisiopatologia, Farmacêutica do Hospital Universitário Regional de Maringá (HURM), Brasil.

Andrieli Cansi

Mestre em Biociências e Fisiopatologia, Farmacêutica do Município de Chapecó (SC), Brasil.

Bruno Ambrósio Rocha

Doutor em Ciências Farmacêuticas, Professor do Departamento de Medicina do Centro Universitário de Adamantina (SP), Brasil.

Ciomar Aparecida Bersani-Amado

Doutora em Farmacologia, Professora Associada Permanente do Departamento de Farmacologia e Terapêutica da UEM, e do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas na Universidade Estadual de Maringá (UEM), Brasil.

Silvana Martins Caparroz-Assef

Doutora em Biologia Celular, Professora Associada Permanente do Departamento de Farmacologia e Terapêutica da UEM, e do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia na Universidade Estadual de Maringá (UEM), Brasil.

RESUMO: Este estudo avaliou os efeitos da suplementação diária de vitamina D na resposta inflamatória aguda em modelo experimental por diferentes agentes flogísticos: carragenina, prostaglandina e dextrana. Os animais (ratos) receberam por via oral (gavagem), dose única de vitamina D ou suplementação diária durante 7, 15 ou 30 dias antes da indução do edema de pata. A suplementação com vitamina D por 15 e 30 dias reduziu significativamente o processo inflamatório induzido por carragenina, o que poderia ser explicado, pelo menos parcialmente, pela redução dos níveis de fator de necrose tumoral α (TNF α). Os resultados indicam que a suplementação de vitamina D pode ser um útil adjuvante terapêutico para o controle do processo inflamatório agudo.

PALAVRAS-CHAVE: Anti-inflamatórios; Colecalciferol; Inflamação; Vitamina d.

VITAMIN D SUPPLEMENTATION ATTENUATES ACUTE INFLAMMATORY RESPONSE

ABSTRACT: This study evaluated the effects of daily vitamin D supplementation on the acute inflammatory response in experimental model by different phlogistic agents: carrageenan, prostaglandin and dextran. Animals (rats) orally received (gavage) a single dose of vitamin D or daily supplementation for 7, 15 or 30 days prior to paw edema induced. Vitamin D supplementation for 15 and 30 days significantly reduced the carrageenan-induced inflammatory process, which could be at least partially explained by the reduction of tumor necrosis factor α levels (TNF α). Results indicate that vitamin D supplementation may be a useful therapeutic adjuvant for controlling the acute inflammatory process.

KEY WORDS: Anti-inflammatories; Cholecalciferol; Inflammation; Vitamin D.

Autor correspondente:

Silvana Martins Caparroz-Assef
smcassef@uem.br

Recebido em: 02/08/2019

Aceito em: 08/02/2020

INTRODUÇÃO

Vitamina D é conhecida por estar envolvida na regulação da homeostase do cálcio, na formação e reabsorção óssea. No entanto, estudos recentes têm relatado os benefícios da vitamina D em diferentes condições clínicas, como diabetes, asma, artrite reumatóide, dermatite atópica e doenças cardiovasculares, entre outras. Esses estudos mostraram que os benefícios da vitamina D vão além do metabolismo do cálcio e da formação óssea, com importante envolvimento no sistema imunológico^{1,2,3}.

Os receptores de vitamina D foram identificados em uma ampla variedade de tecidos, anteriormente não relacionados, como cérebro, coração, pele, intestino, gônadas, próstata, seios, ossos, rins e glândulas paratireóides^{1,2,3}. A enzima microsossomal 1 α -hidroxilase (CYP27B1), pertence à superfamília do citocromo P450, capaz de converter a vitamina D na forma ativa em vários tecidos, aparentemente contribui para estes efeitos⁴.

Alguns estudos *in vitro* evidenciaram que a vitamina D possui atividade imunomoduladora, com participação na produção de citocinas e de componentes relacionados ao processo inflamatório, como fatores de crescimento, óxido nítrico (NO) e metaloproteinases^{3,5,6,7}.

De Castro (2011)³ descreveu uma correlação positiva entre a redução das concentrações séricas de calcidiol (metabólito inativo da vitamina D) e o aumento na produção de células T autorreativas contra tecidos do próprio organismo, e a síntese de interleucinas pró-inflamatórias (IL-12 e Interferon- γ). De acordo com alguns autores, a suplementação com vitamina D₃ parece reduzir a taxa de desenvolvimento de muitas doenças inflamatórias^{8,9}.

O mecanismo pelo qual a vitamina D desempenha papel no processo inflamatório não está completamente elucidado.⁶ Além disso, a maioria dos estudos demonstram os efeitos benéficos desta vitamina no processo inflamatório crônico^{2,5,9,10}, não tendo sido encontrado até o momento, trabalhos que mostram seus efeitos na resposta inflamatória aguda.

Neste estudo, investigamos o efeito da suplementação de vitamina D na resposta inflamatória

aguda experimental induzida por diferentes agentes flogísticos.

METODOLOGIA

ANIMAIS

Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar, pesando entre 200 e 220 g, mantidos sob temperatura controlada (22°C \pm 2°C) e em ciclo claro/escuro (12h/12h), com ração (Nuvilab®) e água *ad libitum*. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no uso de animais da Universidade Estadual de Maringá (CEUA/UEM nº 9504220615).

INDUÇÃO DO EDEMA DE PATA

Os animais receberam injeção intradérmica na pata posterior esquerda de 100 μ L dos seguintes agentes flogísticos dissolvidos em salina 0,9%: carragenina (Cg; 200 μ g/pata), prostaglandina E₂ (PGE₂; 0,1 μ g/mL) ou dextrana (Dx; 300 μ g/pata). O mesmo volume de salina 0,9% foi administrado na pata posterior direita. O volume de ambas as patas foi determinado por pletismografia digital na 1^a, 2^a e 4^a hora após a injeção de Cg e PGE₂; e 30, 60, 120 e 240 minutos após a injeção de Dx¹⁴. O aumento do volume final da pata (μ L x 10) foi calculado subtraindo o volume da pata injetada com salina (pata controle) do volume da pata injetada com o agente flogístico.

TRATAMENTO DOS ANIMAIS

A vitamina D₃ (colecalférol - Zhejiang Garden Biochemical High-tech Co.; Lote no C201412011A-3) foi diluída em suspensão de carboximetilcelulose (CMC - 91%) + azeite de oliva (9%). A opção por esta combinação no veículo foi por ser inócua e facilitar a dissolução da vitamina D₃. Os animais foram tratados, por via oral (gavagem), com vitamina D₃ nas doses de 0,5 mg/Kg (~ 4.000 UI) ou 1 mg/Kg de peso corporal (~8.000 UI). Os animais foram distribuídos aleatoriamente nos seguintes grupos:

- **grupo I** (Cg; controle) – (n=7)
- **grupo II** (PGE₂ only; controle) – (n=7)
- **grupo III** (Dx only; controle) – (n=7)
- **grupo IV** (dose única oral com 1 mg/kg de vitamina D 1h antes da indução do edema de pata por Cg [Cg + Vit D_{1.0} - SD]) – (n=7)
- **grupo V** (suplementação diária com 1 mg/kg de vitamina D por 7 dias antes da indução do edema de pata por Cg [Cg + Vit D_{1.0} - 7d]) – (n=7)
- **grupo VI** (suplementação diária com 1 mg/kg de vitamina D por 15 dias antes da indução do edema de pata por Cg [Cg + Vit D_{1.0} - 15d]) – (n=7)
- **grupo VII** (suplementação diária com 1 mg/kg de vitamina D por 30 dias antes da indução do edema de pata por Cg [Cg + Vit D_{1.0} - 30d]) – (n=7)
- **grupo VIII** (suplementação diária com 0,5 mg/kg de vitamina D por 15 dias antes da indução do edema de pata por Cg [Cg + Vit D_{0.5} - 15d]) – (n=7)
- **grupo IX** (suplementação diária com 0,5 mg/kg de vitamina D por 30 dias antes da indução do edema de pata por Cg [Cg + Vit D_{0.5} - 30d]) – (n=7)
- **grupo X** (suplementação diária com 1 mg/kg de vitamina D por 15 dias antes da indução do edema de pata por PGE₂ [PGE₂ + VitD_{1.0} - 15d]) – (n=7)
- **grupo XI** (suplementação diária com 1 mg/kg de vitamina D por 15 dias antes da indução do edema de pata por Dx [Dx + VitD_{1.0} - 15d]) – (n=7)

Adicionalmente, grupos de animais foram tratados por via oral com os fármacos de referência Naproxeno Sigma-Aldrich® (NPX; 3 mg/Kg (n=5) e Cipro-Heptadina Sigma-Aldrich® (Ci-Hep - 10 mg/Kg (n=5), 1 hora antes da indução do edema; e com o veículo (CMC + azeite de oliva) por 30 dias.

PREPARAÇÃO DO TECIDO PLANTAR

Na 4ª hora após o edema da pata induzido por carragenina, os animais foram sacrificados com isoflurano 5% + CO₂ por via inalatória. O tecido plantar da pata injetada com o agente flogístico foi removido e colocado em um microtubo de centrífuga, contendo 0,5 ml de solução salina tamponada com fosfato (PBS) 4 mM, pH 5,4. A amostra foi então homogeneizada e centrifugada a

6000 x g a 4°C por 20 min. O sobrenadante foi utilizado para as análises abaixo.

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE

A atividade da myeloperoxidase (MPO) foi determinada no sobrenadante do homogenato do tecido plantar de acordo com a técnica descrita por Rocha et al. (2014)¹². Uma alíquota (10 µL) do sobrenadante foi colocada em triplicata em uma microplaca de 96 cavidades e adicionado solução de PBS 50 mM (pH 6,0) contendo 0,19 mg/mL de cloridrato de O-dianidina e 0,0005% de H₂O₂. A reação foi interrompida com solução de acetato de sódio 1,46 M (pH= 3,0) e a atividade da MPO foi determinada pela técnica de ponto final por meio da medida de absorbância no comprimento de onda de 460 nm.

DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE NITRITO

A concentração de nitrito (NO) foi determinada pelo Método de Griess¹³, o qual determina indiretamente a concentração de NO nas amostras de tecido. Os sobrenadantes obtidos dos tecidos plantares (50 µL) foram colocados em triplicata em uma microplaca de 96 cavidades e a seguir foi adicionado solução de Griess em temperatura ambiente. Após 10 minutos, a leitura foi realizada em leitor de imunoenensaio enzimático (ELISA) em 550 nm. As concentrações de NO foram calculadas a partir de uma curva padrão de nitrito de sódio e os resultados foram expressos em µM/mL.

DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO FATOR DE NECROSE TUMORAL α

As concentrações do Fator de Necrose Tumoral α (TNF-α) foram determinadas no sobrenadante do homogenato do tecido plantar (100 µL) por espectrofotometria utilizando a técnica de ELISA, seguindo as recomendações do fabricante (Rat TNF-α Platinum Elisa 96 test, Ebioscience®).

AVALIAÇÃO DA EVOLUÇÃO PONDERAL

A evolução ponderal dos animais foi avaliada em dias alternados durante o período de suplementação com vitamina D. Neste experimento os animais foram distribuídos aleatoriamente em grupo normal (sem tratamento), grupo veículo (tratado com veículo (CMC + azeite de oliva), e os grupos que receberam suplementação de vitamina D (1 mg/Kg) por 30 dias.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

O software Statistic 8.0 (StatSoft®, Palo Alto, CA, USA) foi utilizado para a análise estatística. Os dados do edema da pata foram examinados quanto a suposições de normalidade (Teste de Shapiro-Wilk) e homoscedasticidade (Teste de Levene). Como os dados seguiram a distribuição normal (Teste de Shapiro-Wilk) e a homoscedasticidade (Teste de Levene), utilizamos a Análise de Variância de Medidas Repetidas (para edema de pata) e one-way ANOVA (para testes de MPO, NO e TNF α). Se um efeito no grupo foi encontrado, o Teste de Tukey-Kramer foi usado para distinção entre os grupos. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

RESULTADOS

SUPLEMENTAÇÃO COM VITAMINA D REDUZIU O EDEMA DE PATA INDUZIDO PELA CARRAGENINA

A injeção intradérmica de carragenina provocou um aumento significativo do volume da pata injetada de ratos do grupo Cg na 1^a, 2^a e 4^a hora após a aplicação do agente flogístico ($22,7 \pm 1,7$ ($p < 0,01$), $40,9 \pm 3,3$ ($p < 0,01$), $59,3 \pm 3,5$ ($p < 0,01$), respectivamente). O tratamento com o veículo (CMC + azeite de oliva) por 30 dias não modificou o desenvolvimento da resposta inflamatória ($26,3 \pm 3,2$, $42,8 \pm 3,2$, $62,4 \pm 2,7$, respectivamente).

O tratamento com uma dose única de vitamina D (1 mg/kg) 1h antes da indução da resposta inflamatória não afetou o desenvolvimento do edema de pata em

nenhum dos períodos avaliados (Cg + VitD_{1,0} - DU: $23,9 \pm 2,3$ ($p = 1,00$), $44,4 \pm 2,3$ ($p = 1,00$) e $55,9 \pm 4,5$ ($p = 0,99$), respectivamente) em comparação com o grupo Cg. Da mesma forma, a suplementação diária com vitamina D (1mg/kg) por 7 dias não afetou significativamente a evolução do edema de pata nos mesmos períodos de avaliação (Cg + VitD_{1,0} - 7d: $18,5 \pm 1,2$ ($p = 0,99$), $38,8 \pm 2,5$ ($p = 1,00$) e $55,8 \pm 2,3$ ($p = 0,99$), respectivamente).

A suplementação diária com vitamina D (1 mg/kg) por 15 dias reduziu significativamente o edema na 1^a, 2^a e 4^a hora (Cg + VitD_{1,0} - 15d: $13,6 \pm 1,1$ ($p < 0,05$), $27,9 \pm 1,7$ ($p < 0,05$) e $41,2 \pm 1,7$ ($p < 0,01$), respectivamente). A suplementação diária com vitamina D (1 mg/kg) por 30 dias também reduziu significativamente o desenvolvimento do edema (Cg + VitD_{1,0} - 30d: $12,9 \pm 1,8$ ($p < 0,05$), $32,2 \pm 1,5$ ($p < 0,05$) e $45,8 \pm 1,9$ ($p < 0,01$), respectivamente). O tratamento com NPX reduziu significativamente o edema de pata apenas na 4^a hora ($p < 0,01$) (Figura 1A).

Considerando o efeito inibitório da vitamina D (1 mg/Kg) na evolução do edema de pata induzido pela carragenina após suplementação por 15 e 30 dias, foram realizados outros experimentos para avaliar a efetividade de uma menor dose de vitamina D (0,5 mg/Kg). Os resultados mostraram que neste esquema de tratamento não houve redução significativa na evolução do edema em nenhum dos períodos avaliados (Figura 1B).

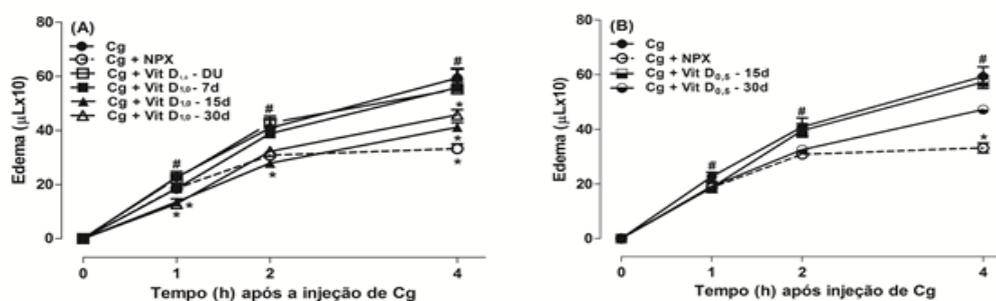


Figura 1. Efeito da vitamina D (A) administrada por via oral em dose única de 1mg/kg (Cg + Vit D1.0 - DU) ou suplementada diariamente por 7, 15 e 30 dias com 1 mg/kg (Cg + Vit D1.0 - 7d, 15d e 30d); e (B) suplementado diariamente por 15 e 30 dias com 0,5 mg/kg (Cg + Vit D0,5 - 15d e 30d) no desenvolvimento de edema de pata induzido por carragenina (Cg) em ratos Wistar. Cg- animais controles não tratados que receberam carragenina. O grupo controle positivo foi tratado com naproxeno oral na dose de 3mg/kg (Cg + NPX). Os dados são expressos como média do volume da pata \pm EPM 1, 2 e 4 h após a injeção de Cg. # $p < 0,05$ em comparação à 1ª, 2ª e 4ª horas após indução do edema de pata; * $p < 0,05$ comparado com o grupo Cg (Análise de Variância de Medidas Repetidas seguida pelo Teste de Tukey - software Statistic 8.0 - StatSoft®).

Não foram encontradas diferenças significativas na inibição do edema de pata entre os grupos que receberam suplementação diária com vitamina D (1 mg/kg) por 15 e 30 dias. Assim, adotamos o período de suplementação por 15 dias para avaliar os efeitos da vitamina D nos experimentos subsequentes.

SUPLEMENTAÇÃO COM VITAMINA D NÃO MODIFICOU O EDEMA DE PATA INDUZIDO POR PGE₂

A injeção intraplantar de PGE₂ induz uma intensa resposta inflamatória local na 1ª hora após a aplicação do agente flogístico, com intensidade máxima na 4ª hora. A suplementação com vitamina D (1 mg/Kg) não modificou a evolução da resposta inflamatória nos períodos avaliados (PGE₂ + Vit D_{1,0}: 49.7 \pm 1.5 (p=0.99), 57.7 \pm 1.7 (p=1.00), e 69.4 \pm 1.3 (p=0.97), respectivamente) quando comparada ao grupo que não recebeu suplementação (PGE₂: 43.9 \pm 3.4, 54.1 \pm 3.5, e 63.6 \pm 3.1, respectivamente). O tratamento com naproxeno (NPX) reduziu significativamente o desenvolvimento do edema em todos os períodos avaliados (PGE₂ + NPX: 19.5 \pm 1.4 (p<0.01), 31.4 \pm 1.2 (p<0.01), e 41.8 \pm 1.3 (p<0.01), respectivamente; Figura 2A).

SUPLEMENTAÇÃO COM VITAMINA D NÃO MODIFICOU O EDEMA DE PATA INDUZIDO POR DEXTRANA

O edema de pata induzido por dextrana se caracteriza por apresentar intensidade máxima de edema na 1ª hora após a aplicação do agente flogístico, ocorrendo através da liberação dos mediadores serotonina e

histamina¹⁴. A suplementação com vitamina D (1 mg/Kg) por 15 dias não alterou a evolução da resposta inflamatória (Dx + Vit D_{1,0}: 177.4 \pm 8.8 (p=1.00), 224.2 \pm 10.0 (p=0.99), 195.6 \pm 14.7 (p=1.00), e 171.2 \pm 11.1 (p=0.98) aos 30, 60, 120, e 240 min., respectivamente), quando comparada ao grupo que não recebeu suplementação com Vit D (Dx: 183,70 \pm 9,01; 229,70 \pm 5,90; 216,70 \pm 3,17; 198,20 \pm 3,61). O tratamento com cipro-heptadina (Ci-Hep) reduziu significativamente a evolução do edema em todos os períodos avaliados (Dx + Ci-Hep: 52.60 \pm 10.28 (p<0.01), 54.60 \pm 12.93 (p<0.01), 56.60 \pm 15.61 (p<0.01), e 57.40 \pm 14.20 (p<0.01), respectivamente; Figura 2B)

Considerando que a suplementação com vitamina D (1 mg/Kg), por 15 e 30 dias, inibiu significativamente o edema de pata induzido pela carragenina, foram realizados ensaios com o objetivo de investigar algum mecanismo envolvido neste efeito. Para tal foram avaliadas a atividade da enzima MPO e as concentrações de NO e TNF- α em amostras do tecido plantar dos animais.

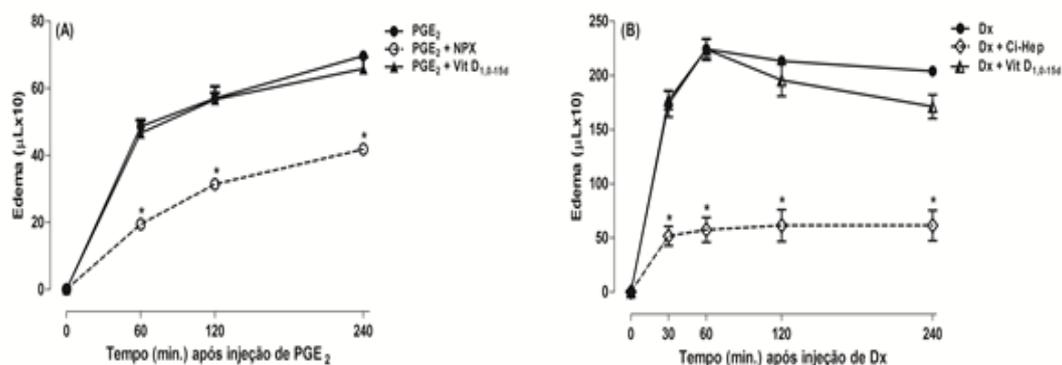


Figura 2. Efeito da vitamina D (Vit D-1mg/Kg) sobre o desenvolvimento do edema de pata induzido pela injeção intradérmica de prostaglandina E₂ (PGE₂) (A), e dextrana (Dx) (B) em ratos Wistar. Os animais receberam suplementação com Vit D via oral, diariamente por 15 dias, previamente a injeção do agente flogístico. Grupos PGE₂ e Dx: animais não receberam suplementação prévia. Naproxeno (NPX - 3mg/Kg) (A) e Cipro-heptadina (Ci-Hep - 10 mg/Kg) (B) foram utilizados como fármacos de referência. Os dados estão expressos como médio do volume de pata ± EPM. #p < 0.05 comparado 1a, 2a, e 4a hora após indução do edema de pata; *p < 0.05, comparado com o grupo Cg (Análise de Variância de Medidas Repetidas seguida pelo Teste de Tukey - Statistic 8.0 software - StatSoft®).

SUPLEMENTAÇÃO COM VITAMINA D NÃO MODIFICOU A ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE

A injeção intradérmica de carragenina aumentou significativamente a atividade da mieloperoxidase (MPO) (250% de aumento). A suplementação com vitamina D (1mg/kg) por 15 e 30 dias ou NPX não afetaram significativamente a atividade da MPO (Figura 3).

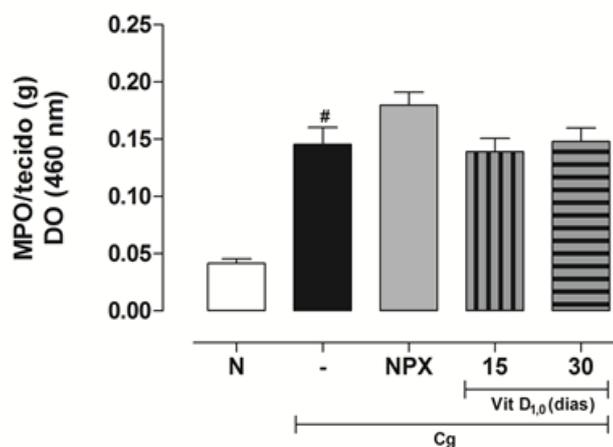


Figura 3. Efeito da suplementação com vitamina D (1mg/Kg) sobre a atividade da enzima mieloperoxidase em amostras do tecido plantar de ratos Wistar. Os animais receberam suplementação com Vit D, via oral, por 15 ou 30 dias previamente à indução do edema de pata. Grupo controle (Cg), animais que não receberam tratamento. Grupo controle positivo animais tratados por via oral com naproxeno (NPX-3mg/Kg). Os resultados representam a média da absorbância ± E.P.M. (MPO/mg de tecido), 4 horas após a injeção de carragenina. #p < 0.05, comparado com grupo normal (one-way ANOVA seguido pelo Teste de Tukey).

SUPLEMENTAÇÃO COM VITAMINA D NÃO MODIFICOU A CONCENTRAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO

A suplementação com vitamina D (1mg/kg) por 15 ou 30 dias não afetou significativamente as concentrações de NO em comparação com o grupo Cg. O tratamento com NPX reduziu significativamente as concentrações de NO (p < 0,05) (Figura 4).

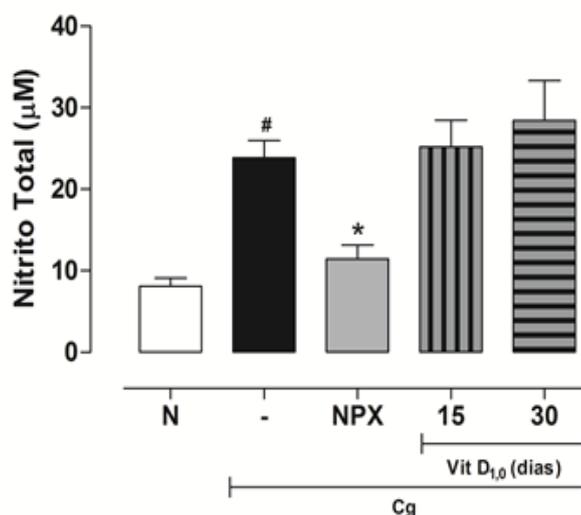


Figura 4. Efeito da suplementação com vitamina D (1mg/Kg) por 15 e 30 dias sobre a concentração de nitrito total no tecido plantar de ratos Wistar. Os animais receberam suplementação oral com Vitamina D por 15 ou 30 dias previamente à indução do edema de pata. Grupo normal (N) e carragenina (Cg) não receberam tratamento. Grupo NPX foi tratado por via oral com naproxeno (NPX-3mg/Kg). Os dados representam a média da concentração de nitrito \pm E.P.M., 4 horas após a injeção de carragenina. # $p < 0.05$, comparado com grupo normal; * $p < 0.05$, comparado com o grupo carragenina (one-way ANOVA seguido pelo Teste de Tukey).

SUPLEMENTAÇÃO COM VITAMINA D REDUZ A CONCENTRAÇÃO DE TNF- α

A suplementação diária com vitamina D por 15 e 30 dias reduziu significativamente as concentrações de TNF- α (inibição de 11% em ambos os grupos de animais; Figura 5).

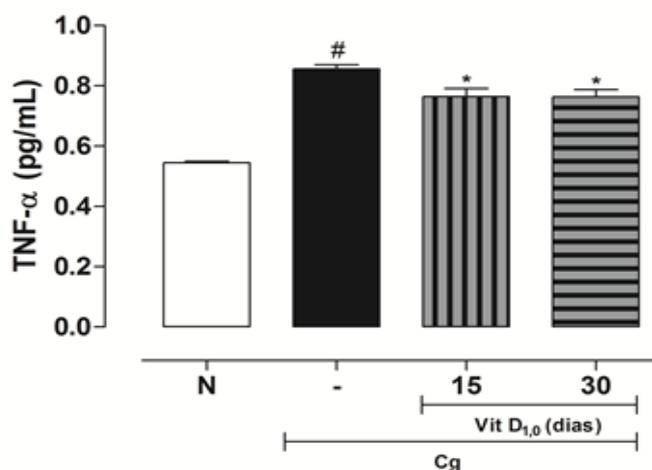


Figura 5. Determinação dos níveis de TNF- α no sobrenadante do tecido plantar 4 horas após injeção intraplantar de carragenina. Os animais receberam suplementação oral diária com Vitamina D (1mg/Kg) por 15 ou 30 dias. Grupo normal (N) e carragenina (Cg) não receberam tratamento. Os resultados estão expressos em média \pm E.P.M. * $p < 0.05$, comparado com grupo Cg; # $p < 0.05$, comparado com grupo normal (one-way ANOVA seguido pelo Teste de Tukey).

DISCUSSÃO

O presente estudo investigou o efeito da suplementação de vitamina D na resposta inflamatória aguda usando diferentes protocolos de tratamento (dose única 1 h antes da indução de edema ou suplementação por 7, 15 ou 30 dias antes da indução de edema). A suplementação de vitamina D (1 mg/kg) por 15 e 30 dias atenua o desenvolvimento da resposta inflamatória no modelo de edema de pata induzido por carragenina.

A resposta inflamatória induzida pela carragenina é caracterizada por inflamação aguda, com formação de edema e intensa infiltração de leucócitos no local da lesão. Essa resposta inflamatória está associada à produção de mediadores inflamatórios que participam dos fenômenos vasculares e celulares. É um dos modelos mais utilizados no estudo da inflamação aguda, dor inflamatória e atividade anti-inflamatória de diferentes compostos¹⁷.

Entre os mediadores envolvidos na resposta inflamatória induzida pela carragenina, a prostaglandina desempenha um papel fundamental no desenvolvimento e manutenção do processo. No entanto, em nosso estudo, a vitamina D não exerceu efeito inibitório direto no modelo de edema induzido por prostaglandina. Portanto, sugerimos que o efeito anti-inflamatório observado possa estar relacionado às ações da vitamina D na produção ou liberação de prostaglandinas. Esta hipótese foi apoiada por Moreno et al. (2005)¹⁸, os quais mostraram que a vitamina D inibia a expressão da ciclooxigenase 2 (COX-2) e aumentava o catabolismo da prostaglandina.

Esta investigação também demonstrou que o efeito inibitório da vitamina D na resposta inflamatória não parece estar relacionado à liberação de histamina. A suplementação de vitamina D não influenciou o desenvolvimento de edema induzido por dextrana, sugerindo que a vitamina D não afeta a liberação desses mediadores a partir da degranulação de mastócitos. De acordo com Yip et al. (2014)¹⁹, a vitamina D causa uma modesta redução na liberação de histamina (in vitro e in vivo), e apenas uma somatória dos efeitos da vitamina D em diferentes mediadores poderia resultar em uma resposta anti-inflamatória efetiva.

A suplementação com vitamina D (1 mg/kg) por 15 e 30 dias inibiu significativamente o edema de pata

induzido por carragenina. Para elucidar o mecanismo envolvido no efeito antiedematogênico observado, foi avaliado o recrutamento de leucócitos (atividade da MPO) e mediadores inflamatórios (NO e TNF- α) em amostras de tecido plantar. A mieloperoxidase é uma enzima proteolítica encontrada nos grânulos azurófilos de neutrófilos, cuja atividade indica indiretamente o recrutamento de leucócitos para o local da inflamação¹⁵. O óxido nítrico por sua vez, desempenha um papel importante no processo inflamatório agudo, promovendo intenso recrutamento celular e contribuindo para o aumento da permeabilidade vascular com extravasamento de líquidos e proteínas para tecidos inflamados¹⁶. O TNF- α também é um importante mediador pró-inflamatório com função determinante no edema de pata induzido por carragenina.

Embora alguns autores tenham demonstrado que a suplementação com vitamina D reduza significativamente a atividade da MPO e as concentrações de NO^{20,21}, não encontramos alterações significativas desses marcadores inflamatórios em nossa investigação, sugerindo que os mesmos não estejam envolvidos no efeito anti-inflamatório da vitamina D observado neste modelo experimental.

No entanto, nossa investigação demonstrou que o efeito inibitório da vitamina D pode estar relacionado à redução das concentrações de TNF- α . Estudos anteriores relatam que a vitamina D reduz as concentrações desta citocina nos modelos de inflamação in vivo e in vitro^{22, 23}. Outros autores também mostraram que o efeito anti-inflamatório da vitamina D parece não estar relacionado apenas à sua capacidade de reduzir as concentrações de citocinas pró-inflamatórias (interferon- γ , IL-6, IL-12 e TNF- α), mas também em aumentar as concentrações de citocinas anti-inflamatórias (IL-4 e IL-10)²²; as quais não foram determinadas nesta investigação. A vitamina D parece agir inibindo a ativação do NF- κ B, responsável por ativar vias e mecanismos distintos que promovem a geração de citocinas pró-inflamatórias, de fatores antiapoptóticos, e de enzimas responsáveis pela origem de mediadores pró-inflamatórios^{8,24}.

É importante ressaltar que até o momento não existe na literatura um protocolo de tratamento definido para a utilização da vitamina D nas diferentes doenças.

Entretanto é consenso que as doses empregadas nestas condições são superiores às utilizadas para manutenção óssea, as quais podem variar de 400 a 800 UI/dia⁴. Alguns autores mostraram os benefícios da suplementação com vitamina D em várias doenças, com doses que variaram de 400 UI/dia a 40.000 UI/semana^{25,26}. Esses resultados corroboram com os encontrados neste estudo, ou seja, apenas a suplementação com vitamina D 8.000 UI/dia inibiu o desenvolvimento da resposta inflamatória.

A administração diária de vitamina D em altas doses não parece resultar em efeitos adversos. De acordo com Garland et al. (2011)²⁷, doses diárias de até 40.000 UI não induzem toxicidade. Nossos resultados confirmam esses achados. A suplementação com 8.000 UI/dia não alterou a função hepática e renal, o perfil lipídico e a glicemia dos animais suplementados (dados não mostrados).

Os animais suplementados com vitamina D apresentaram menor ganho de peso quando comparado aos animais não tratados, e tais resultados não estão relacionados à menor ingestão de ração, uma vez que não foi verificada diferença significativa entre o consumo alimentar destes grupos (dados não mostrados). Tais resultados corroboram com os achados de Farhangi et al. (2017)²⁸, os quais também mostraram que a suplementação de vitamina D não altera a ingestão de ração. De acordo com Sun e Zemel (2008)²⁹ e Blum et al. (2008)³⁰, o uso prolongado de vitamina D atua na regulação da lipólise e na morte de adipócitos, diminuindo a massa gorda, o que poderia explicar nossos resultados. No entanto, os mecanismos pelos quais a vitamina D interfere no processo não foi completamente elucidado até o momento, e não foi objetivo deste estudo.

CONCLUSÃO

No conjunto os resultados mostraram que a suplementação de vitamina D apresenta um efeito inibitório sobre o desenvolvimento da resposta inflamatória aguda induzida por carragenina, e que este efeito deve-se, pelo menos parcialmente, à redução das concentrações de TNF- α . No entanto, não podemos descartar um possível efeito da suplementação sobre a produção/liberação de outros mediadores inflamatórios.

Nossos achados indicam que a suplementação de vitamina D pode ser um benefício às alternativas terapêuticas para o controle do processo inflamatório.

CONCLUSION

Altogether, the present results showed that vitamin D supplementation had an inhibitory effect on the development of the acute inflammatory response that was induced by carrageenan, and this effect was at least partially attributable to the reduction of TNF- α concentration. However, we cannot rule out other possible effects on the production/release of other inflammatory mediators. Our findings indicate that vitamin D supplementation may be a therapeutic alternative for controlling the inflammatory process.

REFERENCES

1. Jones BJ, Twomey PJ. Issues with vitamin D in routine clinical practice. *Rheumatol*. 2008; 47: 1267-68.
2. Amson Y, Amital H, Shoenfeld Y. Vitamin D and autoimmunity: new etiological and therapeutic considerations. *Ann Rheum Dis*. 2017; 66: 1137-42.
3. De Castro LCG. O sistema endocrinológico vitamina D. *Arq. Bras. Endocrinol Metab* 2011; 55: 566-75.
4. Lichtenstein A, Ferreira-Júnior M, Sales MM, Aguiar FBD, Fonseca LAM, Sumita NM, et al. Vitamin D: Non-skeletal actions and rational use. *Rev. Ass. Med. Bras*. 2013; 59: 495-506.
5. Marques CDL, Dantas AT, Fragoso TS, Duarte ALBP. The importance of vitamin D levels in autoimmune diseases. *Rev Bras Reumatol* 2010; 50: 67-80.
6. Zhang Y, Leung DYM, Richers BN, Liu Y, Remigio LK, Riches DW, et al. Vitamin D Inhibits Monocyte/Macrophage Pro-inflammatory Cytokine Production by Targeting Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphatase 1. *J. Immunol*. 2012; 188: 2127-35.
7. Inda Filho AJ, Melamed ML. Vitamin D and kidney disease: what we know and what we do not know. *J Bras Nefrol*. 2013; 35: 323-31.
8. Wang Q, He Y, Shen Y, Zhang Q, Chen D, Zuo C, et al. Vitamin D Inhibits COX-2 Expression and Inflammatory Response by Targeting Thioesterase

- Superfamily Member 4. *J Biol Chem.* 2014; 289: 11681-694.
9. Kruit A, Zanen P. The association between vitamin D and C-reactive protein levels in patients with inflammatory and non-inflammatory diseases. *Ann Clin Biochem.* 2016; 49: 534-37.
 10. Baeke F, Takiishi T, Korf H, Gysemans C, Mathieu C. Vitamin D: modulator of the immune system. *Curr Opin Pharmacol.* 2010; 10: 482-46.
 11. Allah ESHA., Ahmed MA, Mola AFA. Comparative study of the effect of verapamil and vitamin D on iron overload-induced oxidative stress and cardiac structural changes in adult male rats. *Pathophysiology.* 2014; 21: 293-300.
 12. Rocha BA, Gonçalves OH, Leimann FV, Rebecca ES, Silva-Buzanello RA, Araújo PHH, et al. Curcumin encapsulated in poly-L-lactic acid improves its anti-inflammatory efficacy in vivo. *Adv. Med. Plant Res.* 2014; 2: 62-73.
 13. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.*
 14. Van Wauwe JP, Gossens JG. Arabinogalactan and dextran-induced ear inflammation in mice: differential inhibition by H1-antihistaminases, 5-HT-serotonin antagonist and lipoxygenase blockers. *Agents Actions.* 1989; 28: 78-82.
 15. Meotti FC. Processos Redox na Resposta Inflamatória. <http://www2.iq.usp.br/docente/flaviam/>, 2016 (accessed 21 October 2017).
 16. Moncada SRMJ, Palmer RML, Higgs E. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 1991; 43: 109-42.
 17. Iwata M, Suzuki S, Asai Y, Inoue T, Takagi K. Involvement of nitric oxide in a rat model of carrageenin-induced pleurisy. *Mediators Inflamm.* 2010; doi:10.1155/2010/682879.
 18. Moreno J, Krishnan AV, Swami S, Nonn L, Peehl DM, Feldman D. Regulation of prostaglandin metabolism by calcitriol attenuates growth stimulation in prostate cancer cells. *Cancer Res.* 2005; 65: 7917-25.
 19. Yip KH, Kolesnikoff N, Yu C, Hauschild N, Taing H, Biggs L, et al. Mechanisms of vitamin D 3 metabolite repression of IgE-dependent mast cell activation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2014; 133: 1356-64.
 20. Güreş B, Karakoç A, Bektaşođlu PK, Kertmen H, Kanat MA, Arıkök AT, et al. Comparative effects of vitamin D and methylprednisolone against ischemia/reperfusion injury of rabbit spinal cords. *Eur. J. Pharmacol.* 2017; 813: 50-60.
 21. Lisakovska O, Shymanskyi I, Mazanova A, Khomenko A, Veliky M. Vitamin D3 protects against prednisolone-induced liver injury associated with the impairment of the hepatic NF-κB/iNOS/NO pathway. *Biochem. Cell Biol.* 2016; 95: 213-22.
 22. Wang Q, Li H, Xie H, Fu M, Guo B, Ding Y, Yu H. 25-hydroxyvitamin D3 attenuates experimental periodontitis through downregulation of TLR4 and JAK1/STAT3 signaling in diabetic mice. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2013; 135: 43-50.
 23. Jiang J, Shi D, Zhou XQ, Yin L, Feng L, Jiang WD, et al. Vitamin D inhibits lipopolysaccharide induced inflammatory response potentially through the Toll like receptor 4 signalling pathway in the intestine and enterocytes of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). *Br. J. Nut.* 2015; 114: 1560-68.
 24. De Souza WN, Norde MM, Oki E, Rogero MM, Marchioni DM, Fisberg RM, et al. Association between 25-hydroxyvitamin D and inflammatory biomarker levels in a cross-sectional population-based study, São Paulo, Brazil. *Nutr. Res.* 2016; 36: 1-8.
 25. Beilfuss J, Berg V, Sneve M, Jorde R, Kamycheva E. Effects of a 1-year supplementation with cholecalciferol on interleukin-6, tumor necrosis factor-alpha and insulin resistance in overweight and obese subjects. *Cytokine.* 2012; 60: 870-74.
 26. Chen N, Wan Z, Han SF, Li BY, Zhang ZL, Qin LQ. Effect of vitamin D supplementation on the level of circulating high-sensitivity C-reactive protein: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutrients.* 2014; 6: 2206-16.
 27. Garland CF, French CB, Baggerly LL, Heaney RP. Vitamin D supplement doses and serum 25-hydroxyvitamin D in the range associated with cancer prevention. *Anticancer Res.* 2011; 31: 607-11.
 28. Farhangi MA, Mesgari-Abbasi M, Hajiluiian G. Adipose Tissue Inflammation and Oxidative Stress: the

- Ameliorative Effects of Vitamin D. *Inflammation*. 2017; 40: 1688-97.
29. Sun X, Zemel MB. 1 alpha, 25 Dihydroxyvitamin D and corticosteroid regulate adipocyte nuclear vitamin D receptor. *Int. J. Obes*. 2008; 32: 1305-11.
30. M. Blum, G. Dolnikowski, E. Seyoum, S.S. Harris, S.L. Booth, J. Peterson, B. Dawson-Hughes, Vitamin D₃ in fat tissue. *Endocrine*. 2008; 33: 90-4.