UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)
Área de Fisiopatologia

Colecalciferol regula os parâmetros hematológicos e a produção de citocinas pró-inflamatórias renais em camundongos diabéticos e nas células RAW 264.7

Leonardo Mendes Bella

Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Orientador: Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins

São Paulo
2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)
Área de Fisiopatologia

Colecalciferol regula os parâmetros hematológicos e a produção de citocinas pró-inflamatórias renais em camundongos diabéticos e nas células RAW 264.7

Versão corrigida da Tese conforme resolução CoPGr 6018.

Leonardo Mendes Bella

Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Orientador: Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins

São Paulo

2018

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

B434c

BELLA, LEONARDO MENDES
Colecalciferol regula os parâmetros hematológicos e a produção de citocinas pró-inflamatórias renais em camundongos diabéticos e nas células RAW 264.7 / LEONARDO MENDES BELLA. - São Paulo, 2018.
131 p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Orientador: MARTINS, JOILSON DE OLVIEIRA

1. Diabetes Mellitus. 2. Sistema Imune. 3. Vitamina D. I. T. II. MARTINS, JOILSON DE OLVIEIRA, orientador.

Leonardo Mendes Bella

Influência da insulina e da suplementação de colecalciferol em macrófagos no modelo de diabetes *mellitus* experimental

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins
orientador/presidente

Dra. Ana Carolina de Bragança Viciana
1º. examinador

Dr. Cyro Alves de Brito
2º. examinador

Dr. William Tadeu Lara Festuccia
3º. examinador

São Paulo, 07 de dezembro de 2018.

DEDICATÓRIA

Dedico a propagação do conhecimento científico

AGRADECIMENTOS

Ao Deus de Abraão, que me dá forças, que me sustenta e me guarda sempre.

À minha esposa Carolina pela cumplicidade demonstrada diariamente durante todos esses anos.

Aos meus pais, João e Marina e ao meu irmão Gustavo que, mesmo com toda a distância se fazem presentes e torcem pelo meu sucesso.

Á toda minha família, em especial à Tia Marília, Tia Maria de Lourdes, Tia Guta, Tia Marta, Tia Leninha, Tia Esufrásia, Tio Israel, Tia Guta, “Dim”, Tia Marisa, Tia Célia, Tia Vera, Tio Anderson, Tia Marilza, Tio Marino e a todos os primos que, de uma forma direta ou indireta contribuem e torcem por mim.

Às minhas duas avós *(in memorian)* Alzira e Helena que foram para perto de Deus durante esse período da pós.

Aos meus sogros, Marcos e Graça, a minha tia “emprestada” Marilene e à família Bassoli e Azevedo por todo apoio e por terem me acolhido como parte da família.

Ao professor Joilson que, durante os muitos “minutinhos” nesses 5 anos, buscou sempre orientar e ensinar, além de ter aberto as portas do laboratório para o meu ingresso na pós.

A todo laboratório de imunoendocrinologia, pela parceria nos bons e nos maus momentos.

À Sika, à Mari, o Edson, o Irineu, à Claudinha *(in memorian),* à Stephanie e a todos os técnicos e funcionários da FCF, principalmente, do 17 por toda ajuda.

A todos os companheiros de pós, em especial Thaty, Michelle, Fernando, Thaís, Eduardo, obrigado pelos cafés, conversas e ajudas científicas

A todos os docentes, em especial o professor dr. Rildo Volpini pela paciência e pela ajuda com as imunos.

O presente trabalho foi desenvolvido com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq: 301617/2016-3), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP: 2010/02272-0; 2014/05214-1; 2017/11540-7).

RESUMO

BELLA, L.M. **Colecalciferol regula os parâmetros hematológicos e a produção de citocinas pró-inflamatórias renais em camundongos diabéticos e nas células RAW 264.7.** 2018. 108 F. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Os efeitos causados pelo tratamento em conjunto da insulina e do colecalciferol em indivíduos diabéticos não estão completamente elucidados. O presente trabalho avaliou o efeito de ambos os hormônios nos rins, no fígado, no coração e nos parâmetros hematológicos de camundongos machos (C57BL/6) sadios e diabéticos, bem como a ação do colecalciferol (*in vitro*) na resposta imunológica desenvolvida pelas células RAW 264.7 e pelos macrófagos peritoneais (MP) após estímulo com lipopolissacarídeo (LPS). Após dez dias da administração da aloxana (60 mg/kg), animais diabéticos exibiram redução do ganho de peso corporal e hiperglicemia quando comparados aos animais que receberam salina. No sétimo dia do período experimental, foi verificado que animais diabéticos que não receberam nenhum hormônio, em relação aos não diabéticos, exibiram redução do peso corporal, dos níveis de hemoglobina (Hb), hematócrito, hematimetria, insulina, TNF-α e IL-6 (coração) e aumento da glicemia, da relação peso corpóreo/peso rim esquerdo, das concentrações séricas de ureia, creatinina, Fosfatase Alcalina (FAL), Lactato desidrogenase (LDH) e lactato, fator de necrose tumoral (TNF)-α, interleucina (IL)-6 e IL-10 (no rim); o tratamento com insulina (1 UI/300 mg/dL glicemia), em relação aos animais diabéticos não tratados, promoveu aumento do peso corporal, das concentrações séricas de insulina e redução da glicemia, das concentrações séricas de ureia e da razão TNF-α/IL-10 (coração); o tratamento com colecalciferol (800 UI/dia), em relação aos animais diabéticos não tratados, promoveu aumento das concentrações séricas de 25-hidroxicolecalciferol [25(OH)D], Hb, hematócrito, hematimetria, IL-10 (coração) e reduziu IL-6, IL-10, TNF-α e EPO (rim); os animais diabéticos tratados com insulina, em relação aos animais diabéticos suplementados com colecalciferol apresentaram aumento do peso corpóreo, de ureia sérica, IL-6 e TNF-α (coração) e redução da glicemia, das concentrações séricas de lactato, de IL-6, TNF-α, IL-10 e EPO (rim); os animais -que receberam ambos os hormônios, em relação aos animais tratados com insulina, apresentaram aumento sérico de insulina e lactato; os animais diabéticos que receberam ambos os hormônios, em relação aos animais diabéticos tratados com colecalciferol, exibiram aumento sérico de 25(OH)D, de insulina, além da redução das concentrações de IL-10, da razão de TNF-α/IL-10 e TNF-α/IL-6 (coração); animais diabéticos que receberam ambos os hormônios, em relação aos diabéticos não suplementados com colecalciferol, exibiram: aumento de insulina sérica e redução das concentrações séricas de ureia e das razões renal e hepática de TNF-α/IL-6; células RAW 264.7 estimuladas pelo LPS e tratadas com 100 nM colecalciferol exibiram maior expressão da CYP27B1 e redução na liberação de mediadores inflamatórios quando comparadas ao grupo estimulado pelo LPS. Entretanto, não foi observado o mesmo efeito nos MP. Em conjunto, os resultados sugerem que: 1) em animais diabéticos, o colecalciferol pode modular parâmetros hematológicos e que a insulina pode melhorar a função renal, bem como a recuperação do peso corporal; 2) o colecalciferol pode ser metabolizado pelas células RAW 264.7 e modular a resposta imunológica desencadeada pelo LPS.

Palavras-chaves: Vitamina D, células RAW 264.7, Lipopolissacarídeo, Sistema imune, hormônios.

ABSTRACT

BELLA, L.M. Colecalciferol regulates haematological parameters and the production of renal proinflammatory cytokines in diabetic mice and RAW 264.7 cells. **2018. 108 F. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.**

The effects caused by the treatment of insulin and cholecalciferol in diabetic subjects are not completely elucidated. The present study evaluated the effect of both hormones on the kidneys, liver, heart and hematological parameters of healthy and diabetic male mice (C57BL/6), as well as the action of cholecalciferol (*in vitro*) on the immune response developed by the cells RAW 264.7 and peritoneal macrophages (MP) after stimulation with lipopolysaccharide (LPS). After ten days of alloxan administration (60 mg/kg), diabetic animals exhibited a reduction in body weight gain and hyperglycemia when compared to animals that received saline. On the seventh day of the experimental period, it was verified that diabetic animals that did not receive any hormones, in relation to non-diabetics, showed reduction of body weight, hemoglobin (Hb), hematocrit, hematimetry, insulin, TNF-α and IL- 6 (heart) and increased glycemia, body weight / left kidney weight, serum urea, creatinine, Phosphatase Alkaline, lactate dehydrogenase (LDH) and lactate levels, tumor necrosis factor (TNF) interleukin (IL) -6 and IL-10 (in the kidney); diabetic mice treated with insulin (1 IU / 300 mg/dL glycemia) in relation to untreated diabetic animals promoted increased body weight, serum insulin levels and blood glucose lowering, serum urea levels and TNF-α ratio / IL-10 (heart); diabetic animals treated with cholecalciferol (800 IU/day), in relation to untreated diabetic animals, exhibited increased serum levels of 25-hydroxycholecalciferol [25 (OH) D], Hb, hematocrit, hematimetry, IL-10 (heart) and reduced IL-6, IL-10, TNF-α and EPO (kidney);insulin-treated diabetic animals compared to diabetic animals supplemented with cholecalciferol exhibited an increase of body weight, serum urea, IL-6 and TNF-α (heart) and a reduction of glycaemia, serum lactate levels, IL-6, TNF- α, IL-10 and EPO (kidney); animals that received both hormones, compared to animals treated with insulin exhibited an increase of insulin and lactate serum levels; diabetic animals that received both hormones, compared to diabetic animals treated with cholecalciferol, exhibited an increase of 25(OH)D and insulin serum levels, and a reduction of IL-10, TNF-α/IL-10 and TNF-α/IL-6 ratios (heart); diabetic animals that received both hormones, compared to diabetic animals not supplemented with cholecalciferol, exhibited an increase of insulin and reduced urea serum levels and reduced renal and hepatic TNF-α/IL-6 ratios; LPS-stimulated RAW 264.7 cells and treated with 100 nM cholecalciferol exhibited greater CYP27B1 expression and reduced release of inflammatory mediators when compared to the LPS-stimulated group. However, the same effect was not observed in PM. Taken together, the results suggest that: 1) in diabetic animals, cholecalciferol may modulate hematological parameters and that insulin may improve renal function as well as recovery of body weight; 2) cholecalciferol can be metabolized by RAW 264.7 cells and modulate the immune response triggered by LPS.

Keywords: Vitamin D, RAW 264.7 cells, Lipopolysaccharide, Immune system, hormones.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES i
LISTA DE ABREVIATURAS ii
LISTA DE SÍMBOLOS v
1. INTRODUÇÃO 1
1.1. VITAMINA D 1
1.1.1. Síntese da vitamina D **1**
1.1.2. Catabolismo da vitamina D **3**
1.1.3. Receptor de vitamina D **4**
1.2. SISTEMA IMUNOLÓGICO 5
1.2.1. Modulação do sistema imune pela vitamina D **8**
1.3. DIABETES *MELLITUS* 9
1.3.1. Diabetes *mellitus* do tipo 1 ..... **13**
1.3.2. Modelos animais de diabetes *mellitus* **15**
1.3.3. Diabetes *mellitus* e insulina **16**
1.3.4. Relação entre o diabetes *mellitus*, a vitamina D e a insulina **18**
1.4. ERITROPOETINA 19
2. OBJETIVOS 22
3. MATERIAIS E MÉTODOS 24
3.1. PROTOCOLO EXPERIMENTAL 24
3.2. ANIMAIS 24
3.3. INDUÇÃO DO DIABETES *MELLITUS* 25
3.4. DIVISÃO DOS ANIMAIS 25
3.5. SUPLEMENTAÇÃO COM VITAMINA D 25
3.6. TRATAMENTO COM INSULINA 25
3.7. LAVADO PERITONEAL E CULTURA DOS MACRÓFAGOS PERITONEAIS 26
3.8. TRATAMENTO DOS MP E DAS CÉLULAS RAW 264.7 COM COLECALCIFEROL E ESTÍMULO COM LPS 26
3.9. ENSAIO PARA ATIVIDADE DO METABOLISMO MITOCONDRIAL 27
3.10. MONITORAMENTO DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS E HORMONAIS DOS ANIMAIS 27

3.11. EXTRAÇÃO DOS TECIDOS, HISTOLOGIA E IMUNOHISTOQUÍMICA RENAL 28
3.12. QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS POR ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO .. 29
3.13. QUANTIFICAÇÃO DE NO..... 29
3.14. DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL NOS HOMOGENATOS 29
3.15. EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS POR TÉCNICA DE *WESTERN BLOTTING* 30
3.16. ANÁLISE ESTATÍSTICA 31
4. RESULTADOS..... 33
4.1. MONITORAMENTO DO MODELO EXPERIMENTAL DE DIABETES *MELLITUS*..... 33
4.2. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS HORMONAIS SÉRICOS E HEMATOLÓGICOS..... 35
4.3. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS RENAIS 38
4.3.1. Peso dos rins 38
4.3.2. Morfologia e metabolismo da vitamina D no rim 38
4.3.3. Citocinas e hormônios renais 43
4.3.4. Bioquímica renal..... 435
4.4. AVALIAÇÃO DO FÍGADO 46
4.4.1. Bioquímica do fígado 46
4.4.2. Citocinas, EPO e expressão da CYP27A1 no fígado 47
4.5. CORAÇÃO 49
4.6. ATIVIDADE METABÓLICA MITOCONDRIAL 51
4.7. AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE NO E EXPRESSÃO DE INOS 53
4.8. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA ERK1/2..... 54
4.9. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA CYP27A1 E CYP27B1 55
4.10. AVALIAÇÃO DAS CITOCINAS 56
4.11.ATIVIDADE METABÓLICA MITOCONDRIAL E LIBERAÇÃO DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS 57
5. DISCUSSÃO 59
6. CONCLUSÃO 69
7. REFERÊNCIAS..... 71
ANEXOS 87

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Delineamento experimental 24
Figura 2. Variações do peso e da glicemia 34
Figura 3. Hormônios séricos 36
Figura 4. Parâmetros hematológicos 37
Figura 5. Peso dos rins 38
Figura 6. Morfologia renal 39
Figura 7. Imunohistoquímica da CYP27A1 renal 40
Figura 8. Imunohistoquímica da CYP27B1 renal 41
Figura 9. Imunohistoquímica da CYP24A1 renal 42
Figura 10. Expressão do VDR renal 43
Figura 11. Citocinas e hormônios do rim 45
Figura 12. Parâmetros bioquímicos renais 44
Figura 13. Avaliação dos parâmetros hepáticos 46
Figura 14. Citocinas, EPO e CYP27A1 no fígado 48
Figura 15. Citocinas e hormônios no coração. 50
Figura 16. Atividade do metabolismo mitocondrial das células RAW 264.7 52
Figura 17. Liberação de NO e expressão de iNOS pelas células RAW 264.7 53
Figura 18. Expressão da fosfo-ERK1/2 nas células RAW 264.7 54
Figura 19. Expressão da CYP27A1 e CYP27B1 nas células RAW 264.7 55
Figura 20. Concentração das citocinas IL-1β, IL-6, IL-10 e TNF-α liberadas pelas células RAW 264.7 56
Figura 21. Citocinas pró-inflamatórias liberadas pelos macrófagos peritoneais 57

LISTA DE ABREVIATURAS

1,24,25$(OH)_3$D	1α,24,25-trihidroxivitamina D
1,25$(OH)_2$D–26,23–lactona	1,25–dihidroxicolecalciferol–26,23–lactona
1,5-AG	1,5-anidroglucitol
1α,25$(OH)_2D_3$	1α,25-dihidroxivitamina D_3
20(OH)D	20-hidroxivitamina D
24,25$(OH)_2$D	24,25-dihidroxivitamina D
25(OH)D	25-hidroxivitamina D
25(OH)D–26,23–lactona	25–hidroxicolecalciferol–26,23–lactona
7DHC	7–desidrocolesterol
ADA	Associação Americana de Diabetes
ALT	Alanina aminotransferase
ALX	Aloxana
AP	Proteína ativadora
AST	Aspartato aminotransferase
CD	Cluster de diferenciação
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
CYP24A1	Vitamina D-24-hidroxilase
CYP27A1	Vitamina D-25-hidroxilase
CYP27B1	Vitamina D-1α-hidroxilase
CYP450	Complexo Citocromo P 450
DAMP	Padrões associados a danos moleculares
DBP	Proteína Ligante da Vitamina D
DM	Diabetes *mellitus*
DMEM	*Dulbecco's Modified Eagle's*
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
EPO	Eritropetina
ERK	*Extracelular signal–regulated kinases*
FGF	Fator de crescimento de fibroblasto

GLUT	Transportador de Glicose
Hb	Hemoglobina
HbA1c	Hemoglobina glicada
HCM	Hemoglobina corpuscular média
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
IDF	Fundação Internacional do Diabetes
IKK	IκB *kinases*
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico-sintase induzida
IRAK	*Interleukin-1 receptor associated kinase*
JAK	Janus Quinase
LBP	Proteína ligante de lipopolissacarídeo
LDH	Lactato Desidrogenase
LPe	Lavado Peritoneal
LPS	Lipopolissacarídeo
Mal	*MyD88-adapter-like*
MAPK	Proteína kinase ativada por mitógeno
MD	*Myeloid differentiation*
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
MP	Macrófagos Peritoneais
MyD	*Myeloid differentiation primary response gene*
NFAT	Fator nuclear de células T ativadas
NFκB	Fator nuclear kapa B
NO	Óxido Nítrico
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAMP	Padrões moleculares associados a patógenos
PBS	Tampão Salina Fosfato
PI3K	Fosfatidilinositol 3-Quinase
pkA	Proteína quinase A
pkC	Proteína quinase C

PRR	Receptores de reconhecimento de padrões
PTH	Paratormônio
RANK/RANKL	Fator nuclear kapa β/ ligante do receptor do fator nuclear kapa β
RANKL	Ligante do receptor do fator nuclear kapa β
RXR	Receptor retinoide X
SAPK/JNK	*Stress-activated protein kinase/Jun-aminoterminal kinase*
SARM	*Sterile α and HEAT-Armadillo motifs-containing protein*
SBD	Sociedade Brasileira de Diabetes
STAT	Transdutor de sinal e ativador de transcrição
STZ	Estreptozotocina
TAK	*Transforming growth factor-β-activated kinase*
TBS-T	Tampão Tris Salina Tween
TIR	*Toll/interleukin1 receptor*
TIRAP	*Domain-containing adaptor protein*
TLR	Receptores do Tipo Toll
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TRAF	*TNF receptor associated fator*
TRAM	*TRIF-related adaptor molecule*
TRIF	*TIR domain-containing adaptor inducing IFN-β*
UBC	*Ubiquitin-conjugating enzyme*
UEV1A	*Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1 isoform A*
UVB	Ultravioleta B
VCM	Volume corpuscular médio
VDR	Receptor de Vitamina D
VDRE	Elementos de resposta da vitamina D

LISTA DE SÍMBOLOS

:	divido por
<	menor que
>	maior que
°C	graus Celcius
µg	micrograma
µL	microlitro
µm	micrometro
dL	decilitro
g	grama
GL	Gay Lussac
h	hora
Kg	Kilograma
L	Litro
mA	miliAmpère
mg	miligrama
mL	mililitro
mm	milímetro
mm^3	milímetro cúbico
ng	nanograma
nM	nanomolar
nm	nanômetro
pg	picograma
rpm	rotações por minuto
UI	unidades internacionais
v	volt
α	alfa
β	beta
γ	gama

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. VITAMINA D

1.1.1. Síntese da Vitamina D

Vitamina D é uma terminologia utilizada para caracterizar um conjunto de moléculas derivadas do 7–desidrocolesterol (7DHC), que também é conhecido como pró-vitamina D. Embora seja conhecida como vitamina, ela é caracterizada como um hormônio, devido à principal fonte ser a síntese endógena e a regulação fisiológica se assemelhar mais à hormonal do que à nutricional (PEREIRA; ALMEIDA, 2008).

A vitamina D está disponível em duas formas. A vitamina D_2 (9,10-seco(5*Z*,7*E*)-5,7,10(19),22-ergostatetraene-3β-ol ou ergocalciferol) é derivada do ergosterol que está presente nos fungos e nos vegetais. Já a vitamina D_3 (9,10-seco(5*Z*,7*E*)-5,7,10(19)cholestatriene-3β-ol, ou colecalciferol, ou calciol) é derivada do colesterol e está presente nos mamíferos (HOLLIS, 1984; CHEN et al, 2010, PHILLIPS et al, 2012). O ergocalciferol (peso molecular: 396), ao contrário do colecalciferol (peso molecular: 384), possui um grupamento metil ligado ao carbono 24 e uma dupla ligação entre os carbonos 22 e 23.

Nos humanos, a principal forma de obtenção do colecalciferol (correspondente a 80% e 90%) ocorre através da exposição à luz ultravioleta (UV) B (300 - 325 nm). O 7DHC, presente principalmente no tecido cutâneo, é o último intermediário na biossíntese do colesterol através da via de Kandutsch – Russel (SLOMINSKI et al, 2017). Essa molécula é clivada entre os carbonos 9 e 10 pela radiação UVB resultando na formação da 9,10 - secosterol pré-vitamina D_3 (pré - vitamina D_3). Além disso, a pré - vitamina D_3 pode dar origem a três isômeros: o $Lumisterol_3$; o $Tachysterol_3$ (compostos que não possuem efeito sobre o metabolismo do cálcio e do fósforo); e o colecalciferol (HOLICK, 1994; NORVAL et al, 2010; HOLICK, 2008).

O colecalciferol oriundo da ingestão é incorporado aos quilomicrons, que são absorvidos pelo sistema linfático. Já o colecalciferol obtido pela síntese cutânea chega à corrente sanguínea através do leito capilar. Para facilitar o

transporte através da corrente sanguínea, bem como o acesso ao fígado, a vitamina D_3, que é lipossolúvel, liga-se à Proteína Ligante da Vitamina D (DBP - CHRISTAKOS et al, 2016). Segundo Bickle e colaboradores (1984), 10% a 15% da vitamina D circulante podem ser transportadas pela albumina, principal proteína globular plasmática que é sintetizada somente no fígado a uma taxa de 10 a 15 g por dia que pode aumentar até 3 a 4 vezes (BERNARDI et al, 2014). Além disso, menos de 1% das isoformas da vitamina D podem circular livre, ou seja, sem estarem ligadas à albumina ou à DBP (YOUSEFZADEH et al, 2014).

Principal transportadora plasmática da vitamina D e dos seus metabólitos, a DBP pode também se ligar à actina, aos ácidos graxos e agir como um fator quimioatrativo importante no recrutamento de neutrófilos. Essa alfa - globulina, sintetizada predominantemente pelas células do parênquima hepático a uma taxa diária de 10 mg/Kg, apresenta concentração plasmática de 300 - 600 mg/mL e meia vida de 3 dias (SPEECKAERT et al, 2014; CHRISTAKOS et al, 2016).

No fígado, o colecalciferol é metabolizado a 25-hidroxivitamina D [25(OH)D] por algumas isoformas da vitamina D-25-hidroxilase. Essas enzimas pertencem ao complexo citocromo (CYP) 450 e podem ser microssomais (CYP2J2, CYP2J3, CYP2D11, CYP2D25, CYP3A4, CYP2R1) ou mitocondriais (CYP27A1 - SAWADA et al, 2001; GUPTA et al; 2004). Além da atividade 25-hidroxilase, a CYP27A1 pode atuar no metabolismo do colesterol, através da hidroxilação dos carbonos 25, 26 e 27 (SAWADA et al, 2001). A 25(OH)D pode ser metabolizada através de uma via alternativa pela CYP11A. Essa enzima, expressa na epiderme e no soro, atua também na síntese de outros esteroides, como da pregnolona a partir do colesterol. A CYP11A hidroxila a 25(OH)D nos carbonos 20 e 22, culminando na formação dos metabólitos 20-hidroxivitamina D [20(OH)D] e 22-hidroxivitamina D [22(OH)D]. Entretanto, pouco se sabe sobre a atividade biológica de ambos os compostos (LANG; ASPINALL, 2017; SLOMINSKI et al, 2017).

A 25(OH)D pode ser armazenada no tecido adiposo e/ou nos músculos ou entrar na corrente saguínea e se ligar à DBP. A 25(OH)D, metabólito da vitamina D mais abundante no corpo, apresenta meia - vida de 15 dias. Além disso, essa estrutura pode ser considerada o somatório das concentrações de vitamina D obtidas através da ingestão e da síntese corporal. Sendo assim, considera-se que

a 25(OH)D é o marcador biológico mais adequado para indicar a concentração de vitamina D do indivíduo (CASTRO, 2011; HOLICK et al, 2011).

O complexo formado 25(OH)D-DBP é transportado até o rim, principal órgão ativador dessa molécula, onde será filtrado pelos glomérulos (CHRISTAKOS et al, 2016). As células epiteliais renais expressam as proteínas megalina e cubilina que são receptores para DBP. Esse mecanismo de transporte para esteroides, conhecido como sistema endocítico megalina-cubilina, liga-se ao complexo 25(OH)D-DBP para internalizá-lo (NEGRI et al, 2006; ROWLING et al, 2006). No interior celular, a 25(OH)D é dissociada da DBP e migra até a mitocondria do túbulo proximal, onde será metabolizada pela vitamina D-1α-hidroxilase (CYP27B1) à forma biologicamente ativa, conhecida como 1α,25-dihidroxivitamina D_3 [1α,25$(OH)_2D_3$] ou calcitriol (SAHAY et al, 2012; CHRISTAKOS et al, 2016). Uma vez sintetizada, essa estrutura pode interagir com o receptor de vitamina D (VDR) presente na célula ou ser liberada na corrente sanguínea e se ligar à DBP para ser eliminada do corpo (CASTRO, 2011; HOLICK et al, 2011).

1.1.2. Catabolismo da Vitamina D

A síntese dos metabólitos da vitamina D e a inativação dos mesmos são reguladas para evitar intoxicação devido às altas concentrações séricas desse hormônio (ZIMMERMAN, 2001). Esses processos envolvem a inibição da enzima anabólica CYP27B1, a ativação da enzima catabólica vitamina D-24-hidroxilase (CYP24A1), bem como a alteração das concentrações séricas do fator de crescimento de fibroblasto (FGF) 23, do paratôrmonio (PTH), do cálcio e do fósforo (ZIMMERMAN, 2001; HOUGHTON; VIETH, 2006).

A CYP24A1 possui origem mitocondrial e pode agir hidroxilando os carbonos 23 e 24 dos metabólitos da vitamina D. Essa enzima pode hidroxilar a 25(OH)D e a 1,25(OH)D para formar respectivamente, a 24,25-dihidroxivitamina D [24,25$(OH)_2$D] e a 1α,24,25-trihidroxivitamina D [1,24,25$(OH)_3$D], que pode originar o metabólito inativo biliar conhecido como ácido calcitróico [1α-hidroxi-23-carboxi-24,25,26,27-tetranorvitamin D_3] (ZIMMERMAN, 2001). Além disso, a 25(OH)D e a 1,25(OH)D também podem ser oxidadas no carbono 23 para formar, respectivamente, 25-hidroxicolecalciferol-26,23-lactona [25(OH)D-26,23-lactona] e

a 1,25-dihidroxicolecalciferol-26,23-lactona [1,25$(OH)_2$D-26,23-lactona]. Esses compostos podem ser excretados na urina, nas fezes e na bile (AKIYOSHI-SHIBATA et al, 1994; BECKMAN et al, 1996; SAKAKI et al, 2000; CHRISTAKOS et al, 2016).

A elevação de PTH e a hipocalcemia favorecem a produção renal de 1,25$(OH)_2$D através da indução da CYP27B1 e da inibição da CYP24A1. Entretanto, a redução da concentração de PTH, devido à alta concentração sérica de 1,25$(OH)_2$D, pode ocorrer de forma direta através da regulação gênica na glândula paratireoide ou indiretamente devido ao aumento da concentração sérica de cálcio. Além disso, altas concentrações de 1,25$(OH)_2$D podem inibir a atividade da CYP27B1 (CHRISTAKOS et al, 2016). A atividade da CYP24A1 pode ser estimulada pela 1,25$(OH)_2$D e reduzida pelas baixas concentrações de cálcio e PTH (BICKLE, 2014; CHRISTAKOS et al, 2016). O FGF23, produzido predominantemente em osteoblastos e em osteócitos, atua de forma endócrina, ao contrário dos outros FGFs que agem de forma autócrina/parácrina, e reduz as concentrações de 1,25$(OH)_2$D através da estimulação da atividade da CYP24A1. Além disso, o FGF23 reduz a absorção renal através da inibição do co-transporte de sódio-potássio, bem como da redução da absorção intestinal de fosfato pela inibição da CYP27B1 (SAWADA et al, 2001). A Klotho, proteína transmembrana de 130 KDa altamente expressa nos túbulos distais renais, também regula a síntese da 1,25$(OH)_2$D através da inibição da CYP27B1, bem como da estimulação da CYP24A1 (HU et al, 2013; CHRISTAKOS et al, 2016).

1.1.3. Receptor de Vitamina D

A atividade biológica da vitamina D é desencadeada pela interação com o VDR. Esse receptor, também conhecido como NR111 (subfamília de receptores nucleares 1, grupo 1, membro 1), é um fator de transcrição nuclear que pertence à superfamília de receptores nucleares para hormônio esteroides (CHRISTAKOS et al, 2016). O VDR é expresso em muitas células do corpo humano e, de maneira direta ou indireta, participa da regulação de 3% do genoma humano (BOUILLON et al, 2008).

Descrito pela primeira vez por Brumbaugh e Hausseler em 1973, o VDR, na ausência do calcitriol e seus análogos, é mais expresso no citoplasma e, como

os outros receptores nucleares, pode desencadear ações não genômicas, que envolvem o transporte transmembrana de íons (cloreto e cálcio) e a ativação das vias das proteínas quinases A (pkA) e C (pkC), fosfolipase C, fosfatidilinositol-3 kinase (PI3K) e proteína kinase ativada por mitógeno (MAPK - BOUILLON et al, 2008).

Na via genômica, uma vez ativado pelo ligante, o VDR se heterodimeriza com uma das três isoformas dos receptores retinoides X (RXRα, RXRp, RXRγ) para modular os genes alvo da vitamina D (ROCHEL et al, 2000; CHRISTAKOS et al, 2016). O calcitriol e seus análogos aumentam a afinidade do VDR com proteínas que agem como cofatores, atuando como uma ponte entre o complexo VDR-RXR a polimerase II (NAGPAL et al, 2005).

O complexo formado 1,25$(OH)_2$D–VDR–RXR se transloca até o núcleo para se ligar aos elementos de resposta da vitamina D (VDRE), que regulam a resposta gênica da vitamina D de duas formas (ALROY et al, 1995; TAKEUCHI et al, 1995; HARANT et al, 1997). Positivamente, podem regular a síntese da osteopoetina, osteoclacina e do receptor ativador do fator nuclear kapa β/ ligante do receptor do fator nuclear kapa β (RANK/RANKL). Por outro lado, o VDR pode inibir a expressão gênica ao antagonizar a ativação de fatores de transcrição importantes para o desenvolvimento da resposta imunológica, como o fator nuclear de células T ativadas (NFAT) e o fator nuclear kapa B (NFκB - ALROY et al, 1995; TAKEUCHI et al, 1995; HARANT et al, 1997).

1.2. SISTEMA IMUNOLÓGICO

As principais funções do sistema imunológico compreendem proteger o indivíduo contra infecções e promover o reparo dos tecidos (ADEREM, 2003). A regulação desse sistema, principalmente pelo sistema endócrino, tem sido muito estudada (ADORINI; PENNA, 2008). Os macrófagos, células mononucleares de origem hematopoiética, são fundamentais nesses processos. Presentes nos tecidos, os macrófagos podem ser derivados dos monócitos circulantes ou da proliferação local de unidades formadoras de colônias de macrófagos residentes (GORDON; TAYLOR, 2005; ZHANG et al, 2008). A função e a morfologia dessas células são definidas pelo estágio de ativação celular e pelo microambiente tecidual (MOSSER; EDWARDS, 2008). Estudos têm sido realizados com

macrófagos peritoneais (MP) e com células de linhagem, como a RAW 264.7, para melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na regulação celular (BERGHAUS et al, 2010). As alterações genéticas permitem que as células de linhagem se proliferem continuamente em meio de cultura, facilitando a elucidação de mecanismos celulares que envolvem, por exemplo, o reconhecimento de antígenos microbianos (BERGHAUS et al, 2010).

Os macrófagos expressam receptores de reconhecimento de padrões (PRR), como os receptores do tipo toll (TLR) que são importantes no processo de diferenciação entre as partículas próprias e as não próprias, bem como na síntese de citocinas e de quimiocinas. Além disso, esses receptores reconhecem microrganismos através de estímulos oriundos de estruturas intracelulares endógenas e da matriz extracelular (DAMP – padrões associados a danos moleculares), bem como de moléculas exógenas derivadas de vírus, fungos e bactérias (PAMP – padrões moleculares associados a patógenos). O TLR4, primeiro TLR descrito em humanos, é considerado um elo entre os ácidos graxos, a inflamação e a resposta imunológica inata (MEDZHITOV; PRESTON-HURLBURT; JANEWAY, 1997; SHI et al, 2006). Poltorak e colaboradores (1998) demonstraram que o lipopolissacarídeo (LPS), que é um componente da parede celular das bactérias Gram negativas, é um dos agonistas mais importantes do TLR4.

O LPS é uma molécula anfipática composta por ácidos graxos ancorados a um polissacarídeo (RAETZ; WHITFIELD, 2002; OKUDA et al, 2016). Esse lipídeo complexo é constituído por três regiões: uma cadeia lateral de polissacarídeos (antígeno O); uma região do “core” e o principal domínio imunogênico, conhecido como lipídeo A (LEON et al, 2008). No organismo, a proteína ligante de LPS (LBP), proteína de fase aguda produzida no fígado, é uma das principais moléculas que auxiliam no reconhecimento do LPS, formando com o lipídeo A um complexo de alta afinidade (SCHUMANN et al, 1990). A ligação com a LBP facilita que o LPS seja transferido para o cluster de diferenciação (CD)14 que, em conjunto com *myeloid differentiation* (MD) 2, auxilia na transferência do LPS para o TLR4 (PÅLSSON-MCDERMOTT; O'NEILL, 2004).

Após o reconhecimento do LPS, independente da ligação prévia à LBP, o TLR4 apresenta modificações em sua conformação que permitem o recrutamento

intracelular das proteínas que apresentam domínios *Toll/interleukin1 receptor* (TIR). Esse domínio é fundamental para o sinal de transdução, uma vez que mutações pontuais no TIR podem prejudicar a resposta do TLR4 ao LPS (KOZICZAK-HOLBRO et al, 2008). Existem cinco proteínas adaptadoras ao domínio TIR: *myeloid differentiation primary response gene* (MyD) 88; *TIR domain-containing adaptor protein* (TIRAP), também conhecida como *MyD88-adapter-like* (Mal); *TIR domain-containing adaptor inducing IFN-β* (TRIF); *TRIF-related adaptor molecule* (TRAM) e *sterile α and HEAT-Armadillo motifs-containing protein* (SARM - LU et al, 2008).

A ativação da MyD88 recruta e ativa a proteína quinase *interleukin-1 receptor associated kinase* (IRAK) 4 que irá recrutar, ativar e degradar IRAK1. Esse processo culmina na ativação do *TNF receptor associated fator* (TRAF) 6. TRAF 6 se complexa com *ubiquitin-conjugating enzyme* (UBC)13 e *ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1 isoform A* (UEV1A) para ativar o *transforming growth factor-β-activated kinase* (TAK)1, que ativa as vias das IκB *kinases* (IKK), bem como da MAPK (LU et al, 2008; KOZICZAK-HOLBRO et al, 2008; ZANONI et al, 2011).

As IKKα, IKKβ e IKKγ complexam e fosforilam a IκB. Esse processo culmina na translocação do NF-kB, importante para a síntese de citocinas pró-inflamatórias e outros mediadores imunológicos (LU et al, 2008). As MAPK representam um grupo importante de proteínas que atuam no crescimento, na diferenciação celular, bem como na produção de citocinas. As três principais representantes desse grupo são: a proteína kinase ativada por mitógeno (p38 MAPK) ou p38; *extracelular signal–regulated kinases* (ERK1/2), ou p42 e p44 e a *stress-activated protein kinase/Jun-aminoterminal kinase* (SAPK/JNK - LI et al, 2013; SHI et al, 2015). A ativação das MAPK estimula a atividade de transcrição do NF-kB, bem como do proteína ativadora *(*AP*)1,* culminando na produção de vários mediadores imunológicos, como as citocinas (ANGEL; SZABOWSKI; SCHORPP-KISTNER, 2001; LU et al, 2008; YOUN et al, 2013).

As citocinas são pequenas proteínas solúveis que auxiliam na comunicação entre as células. Uma das maneiras de regular a resposta imunológica, bem como a comunicação entre as imunidades inata ou adaptativa, é a modulação da produção e da liberação de citocinas. Macrófagos, monócitos,

fibroblastos e células endoteliais, por exemplo, ao serem estimulados por agentes inflamatórios produzem citocinas, como fator de necrose tumoral (TNF)-α, interleucina (IL)-1β, IL-6, IL-8 e IL-12. Além disso, os macrófagos podem liberar prostaglandinas, quimiocinas e leucotrienos que, em conjunto com as citocinas, podem aumentar a permeabilidade vascular, bem como o recrutamento de células imunológicas (ARANGO DUQUE, DESCOTEAUX; 2014).

A relação entre as MAPK e a óxido nítrico-sintase induzida (iNOS) tem sido demonstrada (CHAN & RICHES, 2001). A iNOS é uma enzima que não é expressa de forma constitutiva, sendo necessário o estímulo com citocinas e endotoxinas, como o LPS. A iNOS pode ser expressa em plaquetas, miócitos, hepatócitos, condrócitos, células endoteliais, linfócitos T, neutrófilos e macrófagos (DUSSE et al, 2003).

A iNOS oxida a L-arginina em citrulina, culminando na produção do óxido nítrico (NO), que auxilia na regulação de diversos processos, como a comunicação neuronal, vasodilatação, morte celular, inibição da agregação plaquetaria, bem como na resposta imunológica contra microrganismos (CHAN; RICHES, 2001; JOO et al, 2014).

Nesse sentido, a modulação na produção e na liberação de citocinas e outros mediadores pró-inflamatórios, como o NO, é um importante mecanismo para melhor compreender a resposta imune no curso de diversas doenças, como no diabetes *mellitus* (DM).

1.2.1. Modulação do sistema imune pela vitamina D

A ação clássica da vitamina D é regular o metabolismo ósseo. Entretanto, a expressão ubíqua do VDR e da CYP27B1 contribui para a vitamina D atuar de maneira pleiotrópica (HOLICK et al, 2011). Estudos demonstram que a relação entre esse hormônio e o sistema imune pode influenciar o curso de diversos processos fisiológicos e patológicos (KHOO et al, 2011; TAKIISHI et al, 2014). Muitos desses trabalhos foram desenvolvidos em modelos animais e em células derivadas de humanos que foram submetidos a concentrações de 1α,25$(OH)_2$D superiores à fisiológica (LANG; ASPINALL, 2017).

A vitamina D pode agir nas respostas imunes inata e adaptativa (BIZZARO et al, 2017). Ambos os processos podem ser regulados não somente pela via

endócrina, mas também de forma parácrina e intrácrina (LANG; ASPINALL, 2017). Um dos efeitos da imunomodulação da vitamina D é corroborada pela melhora do quadro infeccioso e clínico de pacientes acometidos pela tuberculose após o tratamento com esse hormônio. A expressão do VDR pelos macrófagos, bem como a conversão endógena da 25(OH)D em 1,25$(OH)_2$D pela CYP27B1 favorecem a ação desse hormônio nas células imunes. Esses fatores contribuem para o aumento da síntese e da liberação de peptídeos e das proteínas antimicrobianas (catalecidina e β-defensina), de espécies reativas de oxigênio, da modulação da expressão da iNOS, da apresentação de antígenos e da autofagia (KUNDU et al, 2014; BIZZARO et al, 2017; DANKERS et al, 2017; LANG; ASPINALL, 2017). Além disso, de acordo com Bizzaro e colaboradores (2017), a deficiência de vitamina D pode prejudicar a resposta imunológica devido à redução da maturação dos macrófagos, da expressão da enzima fosfatase ácida, bem como da produção de peróxido de hidrogênio.

Embora as citocinas sejam importantes na regulação da resposta imune, o desequilíbrio da produção pode ser prejudicial ao indivíduo (PARRILLO, 1993). Nesse sentido o estudo de agentes que modulam esse processo é fundamental (ZHANG et al, 2012). Em monócitos, a vitamina D pode atuar como um agente anti-inflamatório. A ativação dessas células na presença de 1,25$(OH)_2$D favorece a redução da liberação de TNF-α, IL-1α e IL-6, bem como o aumento de IL-10 (BIZZARO et al, 2017). No estudo de Zhang e colaboradores (2012) monócitos de derivados de humanos pré-tratados com 1,25$(OH)_2$D exibiram redução na expressão da fosfo-p38, bem como redução na liberação de TNF-α e IL-6.

Outro fator que pode contribuir para a redução dessas citocinas segundo Sanchez-Niño e colaboradores (2012) é a inibição do NFκB. Além disso, a produção de 1,25$(OH)_2$D pelos macrófagos pode ser favorecida pela indução da CYP27B1 por interferon ou LPS (CHRISTAKOS et al, 2016).

1.3. DIABETES *MELLITUS*

A terminologia "diabetes" é derivada da palavra grega antiga "*diabainen*" ("passar") e indica o fluxo excessivo de urina através do rim. Mais tarde foi acrescido o termo "*mellitus*" ("doce") para diferenciar esta condição de outras que produzem excesso de urina “não doce” (revisto por ZACCARDI et al, 2016).

O DM é, segundo as diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD), um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos cuja hiperglicemia, principal característica comum, é resultante de defeitos da ação e/ou secreção da insulina (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) e a Associação Americana de Diabetes (ADA), a classificação do DM é baseada na etiologia. Nesse sentido, o DM é subdividido em: DM tipo 1 (DM1), DM tipo 2 (DM2), outros tipos específicos de DM e DM gestacional. Além disso, indivíduos que apresentam glicemia superior aos valores de referência, mas abaixo dos valores indicados para diagnosticar o DM, bem como tolerância à glicose diminuída são classificados como pré - diabéticos. Embora essas duas condições não sejam entidades clínicas, ambas são consideradas fatores de risco para o DM, bem como para as doenças cardiovasculares (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017).

De acordo com a SBD (2017), a confirmação do diagnóstico do DM é realizado através da repetição dos exames alterados (preferencialmente utilizando a mesma técnica do exame anterior) em uma segunda amostra de sangue. O diagnóstico laboratorial é fundamentado em três critérios a partir dos valores glicêmicos.

1º Glicemia casual (aferida a qualquer hora do dia, independente do horário das refeições) igual ou maior a 200 mg/dL acompanhada de poliúria, polidipsia e perda ponderal;

2º Glicemia de jejum (período entre 10 e16h) igual ou superior a 126 mg/dL (7 mmol/L). A repetição do teste em outro dia deve ser realizada para confirmação do diagnóstico caso haja pequenas elevações da glicemia;

3º Glicemia igual ou superior a 200 mg/dL após 2 h da sobrecarga de 75 g de glicose.

Ao contrário das variações glicêmicas que ocorrem durante o dia devido à ingestão de alimentos e a prática de atividades físicas, a concentração de hemoglobina glicada (HbA1c) permanece praticamente estável com o tempo. Em indivíduos saudáveis, ou seja, que não apresentem anemia, uremia, hemoglobinopatias ou outras condições que alterem o metabolismo das hemácias, o tempo de meia-vida é 100 a 120 dias com uma taxa de remoção

diária de 1% (LIPPI; TARGHER, 2010; JELKMANN, 2016; SOCIEDADE BRASILEIRA DO DIABETES, 2017). Além disso, a glicemia das últimas 8 a 12 semanas é diretamente proporcional à concentração da HbA1c. Sendo assim, a ADA em 2009 propôs a utilização da HbA1c como critério de diagnóstico e de monitoramento do DM. De acordo com as modificações realizadas em 2010, o indivíduo pode ser diagnosticado com DM ao apresentar concentração de HbA1c igual ou superior a 6,5%. Além disso, indivíduos cujas concentrações de HbA1c estejam entre 6% e 6,4% apresentam alto risco de evoluir para o DM, sugerindo que esse parâmetro seja um importante preditor de risco para a doença (SOCIEDADE BRASILEIRA DO DIABETES, 2017). Esse resultado precisa ser confirmado em outra coleta exceto se o indivíduo apresentar os sintomas clássicos do DM ou glicemia aleatória igual ou superior a 200mg/dL (SACKS, 2007; COMITÊ INTERNACIONAL DE ESPECIALISTAS, 2009; SOCIDADE BRASILEIRA DO DIABETES, 2017). Além disso, outros parâmetros séricos que podem ser utilizados no acompanhamento dos indivíduos diabéticos são a glicemia pós - prandial, a albumina glicada, a frutosamina, e o 1,5-anidroglucitol. Entretanto, nenhum deles é validado para o diagnóstico laboratorial do DM (SOCIDADE BRASILEIRA DO DIABETES, 2017).

Uma das grandes dificuldades para utilizar a glicemia pós - prandial como uma ferramenta de diagnóstica é estabelecer valores de referencia adequados. Além disso, a variabilidade da concentração de albumina glicada podem se correlacionar com algumas complicações do DM, como as renais, por exemplo. Entretanto, em relação à concentração de HbA1c, essa correlação é variável (SOCIDADE BRASILEIRA DO DIABETES, 2017).

A dosagem da frutosamina pode ser indicada para mensurar a glicação das proteínas séricas, cuja principal é a albumina. A frutosamina pode ser uma alternativa à dosagem de HbA1c em indivíduos acometidos por hemoglobinopatias e/ou anemias. Entretanto, a relação entre as concentrações séricas da frutosamina e o desenvolvimento das complicações oriundas do DM não está bem estabelecida como a relação com a concentração de HbA1c (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017).

A concentração de 1,5-anidroglucitol (1,5-AG), embora não seja rotineiramente solicitado pelos médicos, tem sido considerado um índice de

labilidade do controle da glicemia, do tempo de exposição do indivíduo à hiperglicemia, bem como da hiperglicemia pós-prandial. A reabsorção do 1,5-AG ocorre nos túbulos renais e pode ser inibida pela glicose de forma competitiva. O aumento da filtração glomerular da glicose oriundo da hiperglicemia reduz a reabsorção tubular do 1,5-AG, culminando no aumento da excreção renal e na redução da concentração sérica do mesmo. Dessa forma, a redução das concentrações séricas de 1,5-AG pode culminar no aumento da glicosúria e da duração da hiperglicemia (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017).

O comprometimento do controle glicêmico favorece a manifestação da tétrade sintomatológica clássica presente nos indivíduos diabéticos: polifagia, polidipsia, poliúria e perda ou redução no ganho ponderal (ATKINSON; EISENBARTH; MICHELS, 2014; SOCIDADE BRASILEIRA DO DIABETES, 2017). Além disso, o DM também pode ser considerado uma das causas mais comuns de amputações não traumáticas de membros inferiores, bem como de cegueira irreversível e de doença renal crônica (SOUZA et al, 2012).

As complicações oriundas do DM podem ser divididas em agudas e crônicas. No primeiro grupo estão a hipoglicemia, a cetoacidose diabética, o estado hiperosmolar hiperglicêmico, o coma diabético hiperglicêmico, as convulsões ou perda de consciência e as infecções. No segundo grupo estão a nefropatia, neuropatia, retinopatia, doença arterial coronariana (que pode culminar em angina ou infarto do miocárdio), a encefalopatia diabética e o pé diabético (FUNDAÇÃO INTERNACIONAL DO DIABETES, 2017).

O DM é um dos principais responsáveis pelo aumento mundial da morbidade e da mortalidade (PARCHWANI; UPADHYAH, 2012). Estima-se que 415 milhões de pessoas sejam acometidas pelo DM e que, segundo a Fundação Internacional do Diabetes (IDF - 2017), esse número aumente para 471 milhões em 2035 e para 642 milhões em 2040. De acordo com Souza e colaboradores (2012), as complicações causadas pelo DM podem ser responsáveis, direta ou indiretamente, por aproximadamente 4 milhões de mortes por ano, representando 9% da mortalidade mundial. O IDF (2017) estima que mais de 8,8% dos adultos são acometidos pelo DM. A natureza crônica, as gravidades das complicações e as estratégias utilizadas para realizar o monitoramento e o controle da evolução da doença fazem com que o DM seja oneroso para os indivíduos e suas

respectivas famílias e para o sistema de saúde (SOCIDADE BRASILEIRA DO DIABETES, 2017).

Dependendo da prevalência e do grau de complexidade do tratamento disponível, um país pode gastar diretamente com indivíduos acometidos pelo DM em torno de 2,5% - 15% do orçamento anual destinado à saúde. Nos Estados Unidos da América, estima-se que os custos relativos à saúde de um indivíduo acometido pelo DM sejam entre duas a três vezes maiores quando comparados aos custos relacionados a um indivíduo sem a doença (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017). Os gastos (em dólares) relacionados à saúde dos indivíduos diabéticos em 2017 foram U$ 377,3 bilhões na América do Norte e o Caribe; U$ 166 bilhões na Europa e 29,3 bilhões nas Américas do Sul e Central (FUNDAÇÃO INTERNACIONAL DO DIABETES, 2017).

1.3.1. Diabetes *mellitus* tipo 1

O DM1, embora possa ser diagnosticado em qualquer fase da vida, é mais prevalente entre as crianças e os jovens (idade inferior a 19 anos), sendo que, em adultos jovens pode afetar igualmente homens e mulheres (FUNDAÇÃO INTERNACIONAL DO DIABETES, 2017). Segundo os dados apresentados pela IDF (2017), estima-se que, no ano de 2016 em todo o mundo, existiam 1.106.200 pessoas com idade inferior a 20 anos diagnosticadas com DM1, sendo que, aproximadamente, um quarto (28,4%) vivia na Europa e um quinto (21,5%) na América do Norte e Caribe. Além disso, a projeção de crescimento anual global é 3%, principalmente entre indivíduos com idade inferior a 15 anos (FUNDAÇÃO INTERNACIONAL DO DIABETES, 2017). De acordo com a IDF (2017), estima-se que 30 mil brasileiros sejam acometidos pelo DM1, sendo que o Brasil ocupa a terceira posição na prevalência mundial. Devido às manifestações iniciais serem mais características, os estudos de incidência do DM1 são mais comuns em relação aos outros grupos do DM (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017). A incidência é variável, sendo maior em países escandinavos e europeus de alta latitude (como os países do Reino Unido) e quase nula na China e no Japão. Essa diferença pode ser atribuída a fatores genéticos e ambientais (DIAZ-VALENCIA et al, 2015; KATSAROU et al, 2017).

A patogênese do DM1 é multifacetada, sendo composta por fatores genéticos, ambientais e autoimunes (KRISHNA et al, 2015). Forma presente em aproximadamente 5% a 10% dos casos de DM, o DM1 é uma consequência da destruição das células beta pancreáticas sem aparente comprometimento das células alfa (secretoras de glucagon), delta (secretoras de somatostatina) e PP (secretoras do polipeptídico pancreático). A redução da massa de células beta pancreáticas pode ser variável, bem como a presença de lesões oriundas da insulite, uma das principais características do DM1, sugerindo que esses processos sejam regulados por diversos fatores. Outra característica histopatológica relevante, além do infiltrado linfocitário nas ilhotas pancreáticas, é o aumento da expressão do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I pelas células endócrinas, sugerindo que infecções virais das células beta podem contribuir para o curso do DM1 (CHRISTOFFERSSON et al, 2016).

O DM1 pode ser subdividido em duas categorias. O tipo 1A ou autoimune, presente em 90% dos casos, é caracterizado pela destruição imunomediada das células beta com presença de autoanticorpos anti-ilhotas ou contra antígenos específicos das ilhotas, como os anticorpos anti-insulina, antidescarboxilase do ácido glutâmico, antitirosina-fosfatase e antitransportador de zinco 8. Já o tipo 1B ou idiopático é caracterizado pela ausência de marcadores de autoimunidade contra as células beta, bem como pela ausência de associação com os haplótipos do sistema antígeno leucocitário humano (HLA). Estes indivíduos apresentam insulinopenia constante e são propensos a cetoacidose, embora não haja evidências de autoimunidade contra as células B. Em ambas as manifestações do DM1, há redução lenta e gradual da produção e secreção de insulina, culminando em hiperglicemia (HASSAN et al, 2012; ATKINSON et al, 2014; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017).

Alguns indivíduos com DM1 podem evoluir com cetoacidose como uma das primeiras manifestações da doença. Além disso, outros indivíduos podem cursar, sob uma situação de estresse ou de um quadro infeccioso, com discreta hiperglicemia que pode evoluir para um quadro de hiperglicemia crônico e/ou cetoacidose (ASSOCIAÇÃO AMERICANA DO DIABETES, 2017). Além disso, o DM pode cursar com complicações renais, prejudicando diretamente o metabolismo de hormônios, como a insulina (SAMPANIS, 2008) e a vitamina D

(HOLICK et al, 2011), bem como causar distúrbios hematológicos, como a anemia (THOMAS et al, 2004) e as disfunções leucocitárias (DELAMAIRE et al, 1997).

A prevenção primária do DM1 não apresenta uma base que possa ser aplicável a todas as populações. As práticas mais aceitas são fundamentadas na imunomodulação e consistem na estimulação do aleitamento materno, bem como em evitar o consumo de leite de vaca durante os três primeiros meses de vida (SOCIDADE BRASILEIRA DO DIABETES, 2017).

1.3.2. Modelos animais de diabetes *mellitus*

Em modelos animais, a administração de substâncias que destruam seletivamente as células beta pancreáticas, como a estreptozotocina (STZ) e a aloxana (ALX), tem sido utilizada para melhor compreender os efeitos gerados pelo comprometimento do metabolismo da insulina no DM1 e no DM2 (LENZEN, 2008; WU; YAN, 2015; ZHAI et al, 2015). Entretanto, poucos estudos comparam os efeitos tóxicos causados por ambas as drogas nos modelos *in vitro* e no sistema imune dos animais (ZHAI et al, 2015).

A citotoxicidade causada por esses dois análogos da glicose é desenvolvida por mecanismos diferentes. Ambos entram na célula pelo transportador de glicose (GLUT) 2 e causam necrose das células beta pancreáticas (ZHAI et al, 2015).

A ALX (2,4,5,6-tetraoxipirimidina; 5,6-dioxiuracil) é um derivado pirimidínico, hidrofílico, cuja meia vida-vida é 90 segundos. Embora essa droga tenha sido descrita pela primeira vez por Brugnatelli em 1818, as propriedades diabetogênicas foram descobertas anos mais tarde através do estudo de Dunn e colaboradores (1943), que demonstrou a presença de necrose no pâncreas dos coelhos que receberam ALX (SZKUDELSKI, 2001).

A dose de administração é variável, pois é dependente da via (peritoneal, intravenosa e subcutânea), bem como da espécie e do quadro nutricional do animal (SZKUDELSKI, 2001). Uma vez administrada, a ALX entra nas células beta, onde ocorrerá a formação de espécies reativas de oxigênio e radicais livres que irão agir no DNA dessas células (SZKUDELSKI, 2001; NICOLAU et al, 2015).

A STZ (2-deoxi-2-(3-(metil-3-nitrosoureido)-D-glucopiranose), antibiótico sintetizado pelo *Streptomycetes achromogenes,* pode ser utilizada para induzir o

DM1 ou o DM2 dependendo do protocolo experimental utilizado. A dose, a via, bem como o número de administrações é variável (SZKUDELSKI, 2001; NICOLAU et al, 2015). Uma vez no interior celular, a STZ alquila o DNA, provocando uma série de reações químicas que irão culminar na produção de radicais livres e espécies reativas de oxigênio. Essas substâncias prejudicam o metabolismo mitocondrial bem como a sobrevivência da célula beta (SZKUDELSKI, 2001).

1.3.3. Diabetes *mellitus* e insulina

A insulina foi o primeiro hormônio peptídico descoberto (em 1922 por Frederick Banting e Charles Best, ganhadores do prêmio Nobel de medicina em 1923) e o primeiro cuja sequência primária de aminoácidos foi identificada (em 1955 por Ryle e colaboradores - BANTING, BEST, 1922; RYLE et al, 1955; SHABANPOOR et al, 2009).

A síntese desse hormônio é iniciada através da pré-pró-insulina (peso molecular: 12 KDa) nos ribossomos do retículo endoplasmático rugoso das células beta do pâncreas. No aparelho de Golgi, esse precursor é submetido a uma clivagem proteolítica, originando a pró-insulina (peso molecular: 9 KDa), que é formada por 86 aminoácidos dispostos em uma única cadeia polipeptídica contendo três ligações de cistina intracadeia. Antes de ser secretada pelo pâncreas, a pró-insulina é clivada em duas estruturas. A primeira é o peptídeo C que, embora não apresente função biológica descrita, é secretado em proporção equimolar a insulina e pode servir como um indicador endógeno da secreção da mesma. A segunda é a insulina (peso molecular: 6 KDa), hormônio constituído por uma sequência de 51 aminoácidos organizados em duas cadeias, cadeia A (21 aminoácidos) e cadeia B (30 aminoácidos), ligadas por duas pontes dissulfídicas derivadas dos resíduos de cisteína (A7-B7 e A20-B19 - SHABANPOOR et al, 2009; WEISS et al, 2014; NICOLAU et al, 2015).

A ação mais conhecida da insulina é a regulação do metabolismo da glicose (CHAMBERLAIN et al, 2016). Outros efeitos associados a esse hormônio incluem a regulação da expressão gênica, do metabolismo dos lipídios, das proteínas, bem como do crescimento, do desenvolvimento e da sobrevivência celular (SOCIEDADE BRASILEIRA DO DIABETES, 2017). A secreção basal de

insulina contribui para a manutenção do estado anabólico dos indivíduos, devido controlar a glicemia, o catabolismo proteico, bem como a lipólise e a formação de corpos cetônicos (MATHIEU et al, 2017).

O processo de liberação de insulina pelas células beta do pâncreas é regulado através da nutrição, de hormônios e do sistema nervoso (GEORGE; MCCRIMMON, 2013). A secreção de insulina, em resposta ao aumento da glicemia, estimula a captação de glicose muscular, a síntese de glicogênio, bem como a inibição da gliconeogênese e da glicogenólise hepáticas. Dessa forma, há redução dos níveis glicêmicos, bem como da síntese e da liberação de insulina pelas células beta (DEFRONZO, 2009; SOCIEDADE BRASILEIRA DO DIABETES, 2017; MATHIEU et al, 2017).

As deficiências na ação e/ou na secreção hormonal desencadeiam os distúrbios metabólicos presentes nos indivíduos diabéticos, como aumento da glicogenólise, da produção de glicose hepática, do estresse oxidativo mediado pela hiperglicemia, da disfunção das células endoteliais, da lipólise periférica e da degradação das proteínas, além de interferir na regulação de outros hormônios (GEORGE, MCCRIMMON, 2013; CHAMBERLAIN et al, 2016; NDISANG et al, 2017).

A administração da insulina ocorre através da via parenteral, devido à instabilidade da molécula quando administrada pela via oral. No corpo, a insulina é absorvida para a corrente sanguínea, chegando às células, onde se liga aos receptores de insulina para exercer a atividade biológica. A degradação ocorre no fígado e nos rins (DEFRONZO, 2009). A administração de insulina nos indivíduos acometidos pelo DM1 auxiliou a reduzir a morbidade e a mortalidade decorrentes das complicações da doença. Entretanto, em 2017 a estimativa da expctativa de vida dos indivíduos acometidos pelo DM1 foi 12 anos menor em relação à expectativa de vida média da população mundial (HUO et al, 2016; COPENHAVER; HOFFMAN, 2017). Esse panorama pode ser mais grave em regiões cuja oferta dos serviços de saúde e o acesso à insulina são restritos (FUNDAÇÃO INTERNACIONAL DO DIABETES, 2017).

Apesar da reposição hormonal e do monitoramento dos níveis glicêmicos contínuos, a normalização da concentração da HbA1c (inferiores a 5,7%) nem

sempre são alcançados, o que pode indicar um pior prognóstico para o indivíduo diabético (EHLERS, 2016).

1.3.4. Relação entre o diabetes *mellitus*, a vitamina D e a insulina

Poucos estudos demonstram como a insulina e a vitamina D em conjunto podem influenciar na evolução dessas complicações no DM (TIITTANEN et al, 2006; SIM et al, 2010). Estima-se que a prevalência da deficiência de vitamina D em indivíduos acometidos pelo DM1 seja de 15% a 90,6% (AJABRI et al, 2010). Estudos demonstram que a vitamina D é importante para prevenir a morte celular em transplantes de células beta, bem como aumentar a produção de insulina pelas mesmas (NORMAN et al, 1980; CHIU et al, 2004). Esse efeito tem sido atribuído à expressão do VDR e da vitamina D-1α-hidroxilase pelas células beta (DANKERS et al, 2017). Além disso, a expressão do VDR pelos linfócitos T e B favorece a ação da vitamina D na produção e na liberação das citocinas Th1/Th2, como interferon gama e IL-2, bem como a proliferação dessas células (ARSON et al, 2007; ANTICO et al, 2012).

A deficiência da vitamina D poderia resultar na redução da expressão do receptor de insulina, contribuindo para o desenvolvimento da resistência à insulina. Além disso, a elevação da calcemia em indivíduos com deficiência de vitamiana D pode também contribuir para a resistência à insulina, reduzindo também a atividade do GLUT 4 (BERRIDGE, 2017).

Nosso grupo observou que camundongos C57BL/6J tornados diabéticos através da administração de ALX suplementados com 800 UI de colecalciferol durante sete dias exibiram aumento na hemoglobina (Hb), no hematócrito e na leucometria em relação aos animais diabéticos não suplementados (BELLA et al, 2017). Takiishi e colaboradores (2014) demonstraram que camundongos diabéticos não obesos (NOD) suplementados com a mesma dose de colecalciferol, durante 32 semanas, exibiram menor incidência do DM quando comparados aos animais controles. Além disso, Gabbay e colaboradores (2012) demonstraram através de um estudo prospectivo, randomizado e duplo-cego, que a administração concomitante de colecalciferol e insulina podem reduzir a destruição das células beta pancreáticas em indivíduos com DM1.

Embora a suplementação da vitamina D seja amplamente usada na clínica, poucos estudos demonstram os efeitos desse hormônio no curso do DM1 em animais e humanos. Além disso, há uma grande variedade de protocolos utilizados, tanto na prática clínica quanto na experimentação (HOLICK et al, 2011; TAKIISHI et al, 2014).

1.4. ERITROPOETINA

Os rins apresentam papel fundamental na excreção de metabólitos, na regulação da pressão sanguínea e na síntese de hormônios, como a eritropoetina (EPO) e a 1α,25$(OH)_2D_3$ (SAHAY et al, 2012). A EPO, inicialmente denominada como hemopoietina por Carnot e DeFlandre (1906), é um hormônio glicoproteico (peso molecular de 34,4 KDa) formado por uma cadeia única de 165 aminoácidos ligada a quatro cadeias glicosiladas (JELKMANN, 2011; MAIESE, 2015).

Em condições fisiológicas normais, a EPO pode apresentar concentração plasmática de 10^{-11} mol/L. A produção de aproximadamente 90% da EPO é realizada pelos fibroblastos e pelas células peritubulares intersticiais renais do córtex (SAHAY et al, 2012). O fígado, o baço, o coração e a medula também produzem esse hormônio para regular a angiogênese e a viabilidade locais (DAME et al, 2000; JELKMANN, 2016).

A produção de EPO renal é influenciada por fatores que alteram a concentração de oxigênio no sangue, como anemias e hipóxia. A Hb, que representa 95% do conteúdo proteico dos eritrócitos, liga-se ao oxigênio para transportá-lo dos pulmões aos tecidos. Dessa forma, a redução da concentração de Hb pode aumentar exponencialmente a síntese de EPO (ZHANG et al, 2014). Em indivíduos acometidos por anemias, para elevar a massa eritrocitária bem como a concentração de Hb, a concentração de EPO sintetizada pode ser até mil vezes em relação à concentração desse hormônio produzida pelos indivíduos não anêmicos (JELKMANN, 2016).

Para exercer a atividade biológica, a EPO se liga ao receptor de EPO culminando na fosforilação do próprio receptor, da proteína Janus Quinase (JAK) 2 e das vias do transdutor de sinal e ativador de transcrição (STAT) do tipo 5, da PI3K/AKT, da MAPK e da PKC (LACOMBE; MAYEUX, 1999). Dessa forma, a EPO regula a produção das hemácias, a manutenção da concentração de Hb,

bem como a diferenciação e proliferação dos precursores eritroides da medula óssea (JELKMANN, 2011).

A hiperglicemia presente em indivíduos acometidos pelo DM pode induzir estresse oxidativo. Esse processo pode causar alterações na membrana dos eritrócitos e consequentemente, nos níveis de Hb e de EPO favorecendo as complicações oriundas do DM (MATOUG et al, 2012). Em indivíduos acometidos pelo DM, o aumento da concentração de EPO proporcionou melhora da função cardíaca, da cognição, bem como da redução da fadiga. Além disso, em modelos experimentais de DM, o aumento da EPO reduziu a glicemia bem como auxiliou na manutenção da atividade mitocondrial e do metabolismo energético (MAIESE, 2015). Sendo assim, a elucidação de mecanismos e agentes que possam reduzir esse processo em indivíduos acometidos pelo DM é fundamental.

A ação da vitamina D na produção de EPO tem sido demonstrada (AUCELLA et al, 2003; ZHOU et al, 2010). Além disso, o papel imunomodulatório da vitamina D tem sido atribuído à ação do calcitriol, forma ativa desse hormônio (HOLICK et al, 2011). Como a via de ativação da vitamina D envolve diversos órgãos, como o fígado e os rins, e a CYP27B1 e o VDR são expressos ubiquamente, diversas células podem fazer a conversão intracelular da 25(OH)D em calcitriol (HOLICK et al, 2011). Entretanto, pouco se sabe sobre o papel de outros metabólitos da vitamina D, como o colecalciferol, na resposta imunológica gerada por macrófagos estimulados pelo LPS bem como no curso do DM.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Avaliar os efeitos *in vivo* da suplementação de colecalciferol e do tratamento com insulina em camundongos sadios e diabéticos, bem como a variação na concentração de citocinas *in vitro* promovida pelo colecalciferol em MP e células RAW 264.7 estimulados com LPS.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

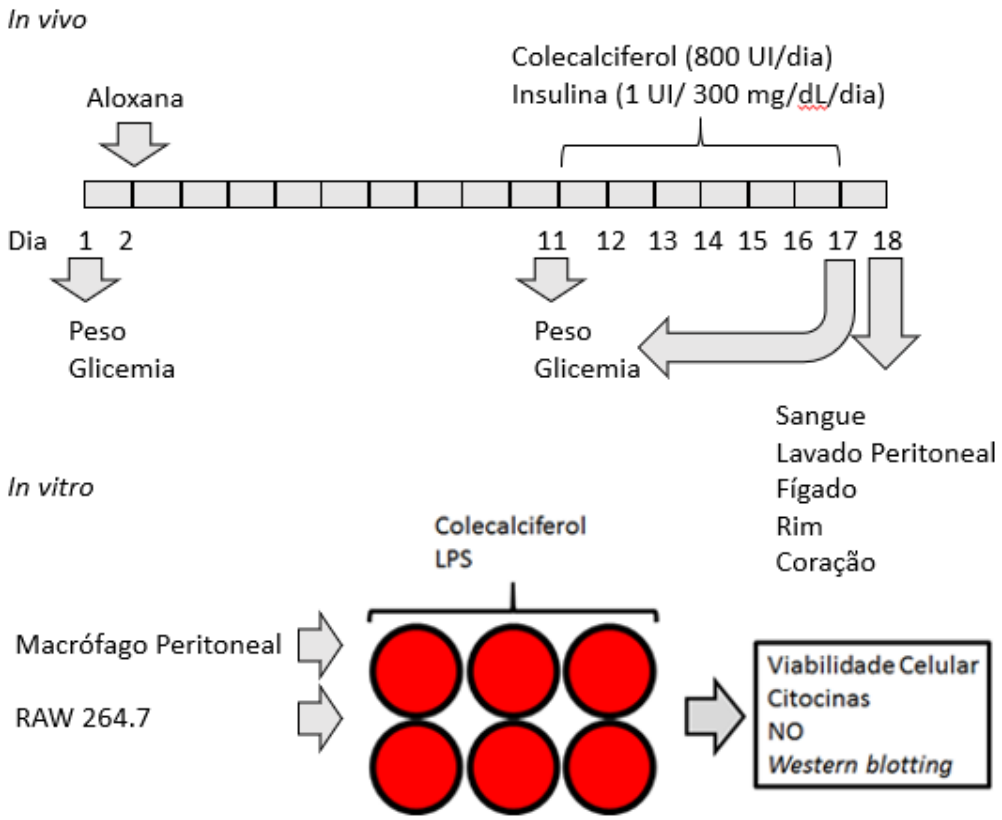


Figura 1. Delineamento experimental. Abreviações: LPS: Lipopolissacarídeo; NO: Óxido Nítrico;

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/464 – Anexo I). Foram utilizados camundongos machos da linhagem C57BL/6J, com peso médio inicial de 27 gramas e idade de, aproximadamente, 10 semanas. Os animais, fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, foram mantidos no biotério, acondicionados em gaiolas coletivas com iglu, contendo no máximo três e cinco animais diabéticos e sadios, respectivamente, com ciclo artificial claro/escuro de 12 horas, a uma temperatura ambiente constante de 22ºC. A água e o alimento estavam disponíveis todo o tempo.

3.3. INDUÇÃO DO DIABETES *MELLITUS*

Para induzir DM1, os animais foram mantidos em jejum por 12 horas. A ALX (60 mg/kg) foi dissolvida em 100 µL de solução salina fisiológica e administrada (dose única) por via endovenosa. Animais controle receberam volume de solução salina equivalente, pela mesma via. A glicemia foi determinada através do monitor de glicose (Accu-Check Active-Roche Diagnosis®), utilizando amostras de sangue obtidas da extremidade da cauda dos animais. Os animais que exibiram glicemia igual ou maior a 300 mg/dL (16,6 mM) foram utilizados nos grupos diabéticos (BELLA et al, 2017).

3.4. DIVISÃO DOS ANIMAIS

Os animais foram divididos em seis grupos, conforme a Tabela abaixo:

Tabela 1–Divisão dos animais segundo suplementação com vitamina D e administração da ALX.

Grupos de Animais	Aloxana	Colecalciferol	Insulina
Controle	**-**	**-**	**-**
Controle+Vitamina D	**-**	**+**	**-**
Diabético	**+**	**-**	**-**
Diabético+Insulina	**+**	**-**	**+**
Diabético+Vitamina D	**+**	**+**	**-**
Diabético+Vitamina D+Insulina	**+**	**+**	**+**

3.5. SUPLEMENTAÇÃO COM VITAMINA D

Os animais foram suplementados com 800 UI de vitamina D (Sanofi Aventis, São Paulo) ou água foi por via oral, durante sete dias (BELLA et al, 2017).

3.6. TRATAMENTO COM INSULINA

Animais diabéticos e controle receberam dose única (1UI para cada 300 mg/dL de glicemia) de insulina NPH, por via subcutânea, no período da tarde (6 p.m.) durante os sete dias anteriores ao experimento. Os níveis glicêmicos foram determinados antes e após o tratamento com insulina (modificado ANJOS-VALLOTA, et al, 2006; SPILLER et al 2012).

3.7. LAVADO PERITONEAL E CULTURA DOS MACRÓFAGOS PERITONEAIS

Após 10 dias da administração da ALX, os animais foram eutanasiados utlizando uma solução composta de cloridrato de cetamina (270mg/kg) e cloridrato de xilasina (30mg/kg – BELLA et al, 2017). Após a anestesia, a pele da região abdominal foi removida para posterior injeção de 5 mL de tampão salina fosfatado (PBS), pH 7.4, na cavidade peritoneal. O abdômen foi massageado e as amostras de lavado peritoneal (LPe) foram coletadas (BELLA et al, 2017). Após a coleta, o material foi centrifugado (500 g, 10 min, 4ºC) e as células ressuspensas em meio 1640 RPMI (TESSARO et al, 2017).

Para contagem do número total de células no LPe, foram a adicionados 20 μl de cristal violeta a 0,5% (dissolvido em 30% de ácido acético) a 20 μL de suspensão celular. O número de células contado em câmara de Neubauer (SCHWAN et al, 2000).

3.8. TRATAMENTO DOS MP E DAS CÉLULAS RAW 264.7 COM COLECALCIFEROL E ESTÍMULO COM LPS

Os MP e as células RAW 264.7 foram incubadas em estufa a 37ºC, 5% CO_2, por 12 horas em meio 1640 RPMI e *Dulbecco's Modified Eagle's* (DMEM), respectivamente, suplementado com 0,1 mM de glicose, 10% de soro fetal bovino, 100 U/mL de penicilina, 100 μg/mL de estreptomicina e 2 mM de glutamina (KIM et al, 2016).

O LPS foi pesado e solubilizado em meio de cultura para uma solução com concentração final de 1mg/mL. Em seguida, essa solução foi diluída pelo método de diluição seriada até a solução de uso cuja concentração é 100 ng/mL. O colecalciferol foi pesado e solubilizado em etanol anidro (Merck) para uma solução de 32,4 mg/mL. Em seguida, essa solução foi diluída em meio de cultura pelo método de diluição seriada até obter as seguintes concentrações das soluções de trabalho:1 nM, 10 nM e 100 nM (modificado CHANG et al, 2004).

Em placas de 60 mm de diâmetro (*Corning* Costar, *Corning*, Nova Iorque), foram plaqueados $5x10^5$ MP/poço. Os macrófagos de camundongos sadios e diabéticos foram divididos em quatro grupos: controle; colecalciferol (Sigma, Saint Louis, Missouri, EUA) 100 nM; LPS (Sigma, Saint Louis, Missouri, EUA); e

colecalciferol e LPS, durante 6h e 24h. Após esse período, os sobrenadantes foram coletados para dosagem das citocinas IL-6 e TNF-α (modificado SOUDI et al, 2013).

As Células RAW 264.7 foram plaqueadas em placas (*Corning*Costar, *Corning*, Nova Iorque) de 12 poços ($2x10^6$ células/poço). As células foram coletadas após 1h, para análise da p-ERK1/2, e 24h, para análise das enzimas iNOS, CYP27B1 e CYP27A1 com o auxílio da solução de lise RIPA. $5x10^5$ células/poço foram plaqueadas em placas de 12 poços. Após 3h, 6h, 12h e 24h, os sobrenadantes das culturas foram coletados para dosagem das citocinas (IL-1β, IL-6, IL-10 e TNF-α) e do NO (modificado ZHU et al, 2013).

3.9. ENSAIO PARA ATIVIDADE DO METABOLISMO MITOCONDRIAL

Em uma placa de 96 poços, $4x10^4$ células foram pipetadas por poço e mantidas em estufa 37°C e 5% de CO_2 por 16 horas para adesão. As células foram lavadas com PBS morno. A viabilidade celular foi avaliada após 1, 3, 6, 12, 24, 48 e 72 horas após os tratamentos. Após o período de tratamento, 100 µl da solução de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo tetrazólico- 0,5 mg/mL) foi adicionada em cada poço com posterior incubação de3 horas. O sobrenadante foi retirado, os cristais foram solubilizados com dimetilsulfóxido (DMSO) e a leitura foi realizada em leitor de placas a 540 nm. Os valores apresentados são em relação a porcentagem do controle (LOMBARDO et al, 2007).

3.10. MONITORAMENTO DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS E HORMONAIS DOS ANIMAIS

Depois de anestesiados, os animais foram submetidos à punção cardíaca para obtenção do sangue utilizado para realização das análises bioquímicas e hematológicas. Para análise dos parâmetros hematológicos (leucometria total, hematimetria, Hb, hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), volume corpuscular médio (VCM), e plaquetas) através do analisador ABCvet®, foram coletadas amostras de sangue total em 10% de EDTA.

Para análise sérica dos parâmetros bioquímicos cálcio total, ureia, creatinina, fosfatase alcalina (FAL), alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), albumina, lactato, lactato desidrogenase (LDH) e

hormonais 25(OH)D, EPO e insulina, foi coletado sangue isento de anticoagulante. Para obtenção do soro, a amostra foi centrifugada a 1500 RPM durante 10 minutos.

Os parâmetros bioquímicos foram obtidos através do analisador automático (LabMax 240®). As concentrações hormonais foram obtidas através do Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA). Para insulina (ng/mL) foi utilizando o *Rat Insulin Enzyme Immunoassay Kit* (SPIbio, Massy Cedex, França), para EPO (pg/mL) o kit da R&D Systems Inc. (Mineapolis, MN, EUA) e para 25(OH)D (ng/mL) o kit da MyBioSource® (San Diego, EUA).

3.11. EXTRAÇÃO DOS TECIDOS, HISTOLOGIA E IMUNOHISTOQUÍMICA RENAL

O rim esquerdo, o fígado e o coração foram extraídos. Posteriormente, os órgãos foram macerados em 1 mL de tampão RIPA e centrifugados a 10000 RPM durante 10 minutos. Os sobrenadantes foram armazenados a -80ºC para posterior dosagem das citocinas e dos hormônios.

O rim direito foi utilizado para realização da imunohistoquímica e da análise histológica. Para a histologia, o tecido foi fixado em Bouin (aproximadamente 12 horas), foram desidratado 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.

Para realizar as análises imunohistoquímicas, o rim foi cortado em seções parafinizadas com 4 µm de espessura e foram silanizadas com uma solução de silano a 2%.A desparafinização dos cortes foi realizada em três banhos de xilol durante 5 minutos cada. Posteriormente, os tecidos foram submetidos a um banho durante 5 minutos nas soluções alcoólicas de álcool absoluto, 80 °GL e a 70 °GL. Em seguida os cortes foram submetidos a um banho de água destilada por 5 minutos para finalizar a hidratação. Os anticorpos primários, CYP25A1, CYP24A1 e CYP27B1 (Abcam, Cambridge, MA), foram incubados conforme especificação descrita pelo fabricante. A coloração apresentada foi obtida pela reação entre o 3,3-diaminobenzidine (Sigma, St. Louis, MO) e o peróxido de hidrogênio. A contra - coloração foi realizada pela hematoxilina de Harris (GONÇALVES et al, 2014).

Para analisar os escores renais nos cortes histológicos e a imunorreação, foram observados 10 a 15 campos por tecido. As imagens foram obtidas através de microscopia (Axioskop 40; Carl Zeiss) acoplada à câmera digital e posteriormente analisadas através do *software* (ZEN, Carl Zeiss, Munich, Germany).

3.12. QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS POR ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO

A dosagem de citocinas pró-inflamatórias (IL-1β, IL-6 e TNF-α) e anti - inflamatória (IL-4, IL-10 e IL-12) foi realizada em sobrenadantes de culturas de células RAW 264.7, bem como de MP e nos homogenatos de fígado, rim e coração através de ELISA, utilizando-se kits comerciais (R&D Systems, Inc., Mineapolis, MN, USA). A densidade óptica das amostras foi avaliada 450nm e 540nm, imediatamente após o bloqueio da reação. Em seguida, foi realizada a diferença entre as absorbâncias para o cálculo da curva padrão e das concentrações (pg/mL) das citocinas.

3.13. QUANTIFICAÇÃO DE NO

O NO, produzido pelas células, é decomposto em nitritos e nitratos. A quantificação de nitrito é realizada pelo método colorimétrico conhecido como reação de Griess (GRANGER et al, 1996). Após os períodos de incubação de 3h, 6h, 12h e 24h, os sobrenadantes das culturas foram coletados. Na placa de 96 poços, foram adicionados, por poço, 50µL de sobrenadante e 50µL do reagente de Griess, composta por: *N-1-(Naphtyl) ethylenediaminedihydrochloride* 0,1% (Sigma, Saint Louis, Missouri, EUA), sulfanilamida 1% (Sigma, Saint Louis, Missouri, EUA) e solução de ácido fosfórico 5%. Para a curva padrão foram utilizadas diluições seriadas (3,125µM, 6,25µM, 12,5µM, 25µM, 50µM, 100µM, 200µM) de nitrito de sódio (Sigma, Saint Louis, Missouri, EUA). A leitura foi realizada em 540nm.

3.14. DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL NOS HOMOGENATOS

Para a quantificação de proteína total das amostras foi utilizado o kit BCA (bicinchoninic acid, Pierce, Rockford, IL, USA). A leitura foi realizada a 562 nm, comparando-se com curva-padrão de albumina.

3.15. EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS POR TÉCNICA DE *WESTERN BLOTTING*

A proteína intracelular p-ERK1/2 (*cell signaling;* 1:1000) e a expressão das enzimas iNOS (Sigma-aldrich; 1:5000), CYP27B1 (Abcam*;* 1:1000) e CYP27A1 (Abcam*;* 1:1000) nas células RAW 264.7. A expressão da CYP27A1 (Abcam*;* 1:1000) foi analisada no fígado e a expressão do VDR (Abcam*;* 1:1000) foi analisada no fígado e no rim. A expressão dos mesmos foi analisada em relação à β-actina (Sigma-aldrich; 1:20000) e ao GAPDH (Sigma-aldrich; 1:40000). Como anticorpo secundário foi utilizado anti-rabbit IgG foram utilizados como anticorpos secundários. Os ensaios foram realizados por eletroforese em gel de policrilamida a 10% na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 1%, conforme orientação do fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). As amostras foram diluídas em tampão Tris-HCl 62,5 M, contendo glicerol 10%; SDS 2%; β-mercaptoetanol 5% e azul de bromofenol 0,001%. Estas foram incubadas em banho seco (95ºC/5min). Alíquotas de 30 µg de proteína foram aplicadas no gel de policrilamida-SDS. A separação das proteínas ocorreu em cuba de eletroforese (tampão de corrida: Tris 25 mM; glicina 192 mM; SDS 0,5%) a 125 V por aproximadamente 180 minutos. Solução padrão de proteínas foi usada como referência do peso molecular (*Spectra Multicolor Broad Range ProteinLadder – ThermoScientific*). As proteínas do gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose utilizando-se o tampão de transferência (Tris 25 mM; glicina 192 mM; SDS 0,1%; metanol 20%), a 60mA /gel durante 60 minutos. Para minimizar as ligações específicas, a membrana de nitrocelulose foi incubada em solução de leite desnatado (5%) em tampão Tris-salina (TBS) durante 1 hora. Posteriormente, a membrana foi lava 3 vezes/5min. Em seguida, essa membrana foi incubada, sob agitação e à temperatura ambiente, com anticorpos primário (15-18 horas/ 2–8 ºC) e secundário (β-actina: 1 hora; GAPDH: 12 horas; temperatura ambiente) conforme as especificações de cada fabricante. A cada etapa de incubação a membrana foi lavada com TBS-T por 3 vezes/5 min. A revelação foi realizada utilizando ECL (enhanced chemiluminescence – ECL; Amersham, Arlington Heights, IL). As densidades relativas das bandas serão determinadas por meio de análise densitométrica utilizando o *software Image Studio* Lite Versão 5.2.

3.16. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram avaliados por teste t pareado, análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de múltiplas comparações de Tukey-Kramer ou teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. Considerando-se significativo $p < 0,05$.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. MONITORAMENTO DO MODELO EXPERIMENTAL DE DIABETES *MELLITUS*

A indução do diabetes químico através da administração endovenosa de ALX tem sido utilizada pelo nosso grupo como um modelo animal de DM1 (BELLA et al, 2017). Indivíduos e animais no estado insulinopênico podem apresentar redução no ganho do peso corporal e da hiperglicemia (BELLA et al, 2017; SBD, 2016). No presente estudo, os camundongos C57BL/6J foram submetidos à pesagem e à aferição de glicemia no dia anterior e dez dias após a administração endovenosa de 100 µL de solução de ALX (60mg/Kg) ou 100 µL de solução fisiológica (animais não diabéticos). Após dez dias, os animais que receberam ALX, quando comparados aos animais controle, exibiram redução no ganho de peso corporal (Fig.2A) bem como hiperglicemia (Fig.2B).

Estudos têm demonstrado que há relação entre vitamina D e as variações na glicemia e no ganho de peso corporal ocorridas no DM, embora o mecanismo não esteja completamente elucidado e os resultados sejam conflitantes (LI et al., 2008; DRIVER et al., 2011). Assim, o peso (Fig. 2C) e a glicemia (Fig. 2E), bem como as variações desses parâmetros (Figs. 2D e 2F) obtidas entre o primeiro e o sétimo (último) dia de suplementação com colecalciferol e tratamento com insulina, foram analisadas. O grupo diabético tratado com insulina apresentou maior ganho de peso corporal em relação aos animais diabéticos e aos animais diabéticos suplementados com vitamina D. O grupo diabético tratado com insulina e suplementado com colecalciferol exibiu maior variação do ganho de peso corporal quando comparado aos animais diabéticos que receberam apenas colecalciferol. Os animais diabéticos tratados com insulina exibiram redução na glicemia quando comparados aos animais diabéticos e aos animais diabéticos suplementados com vitamina D.

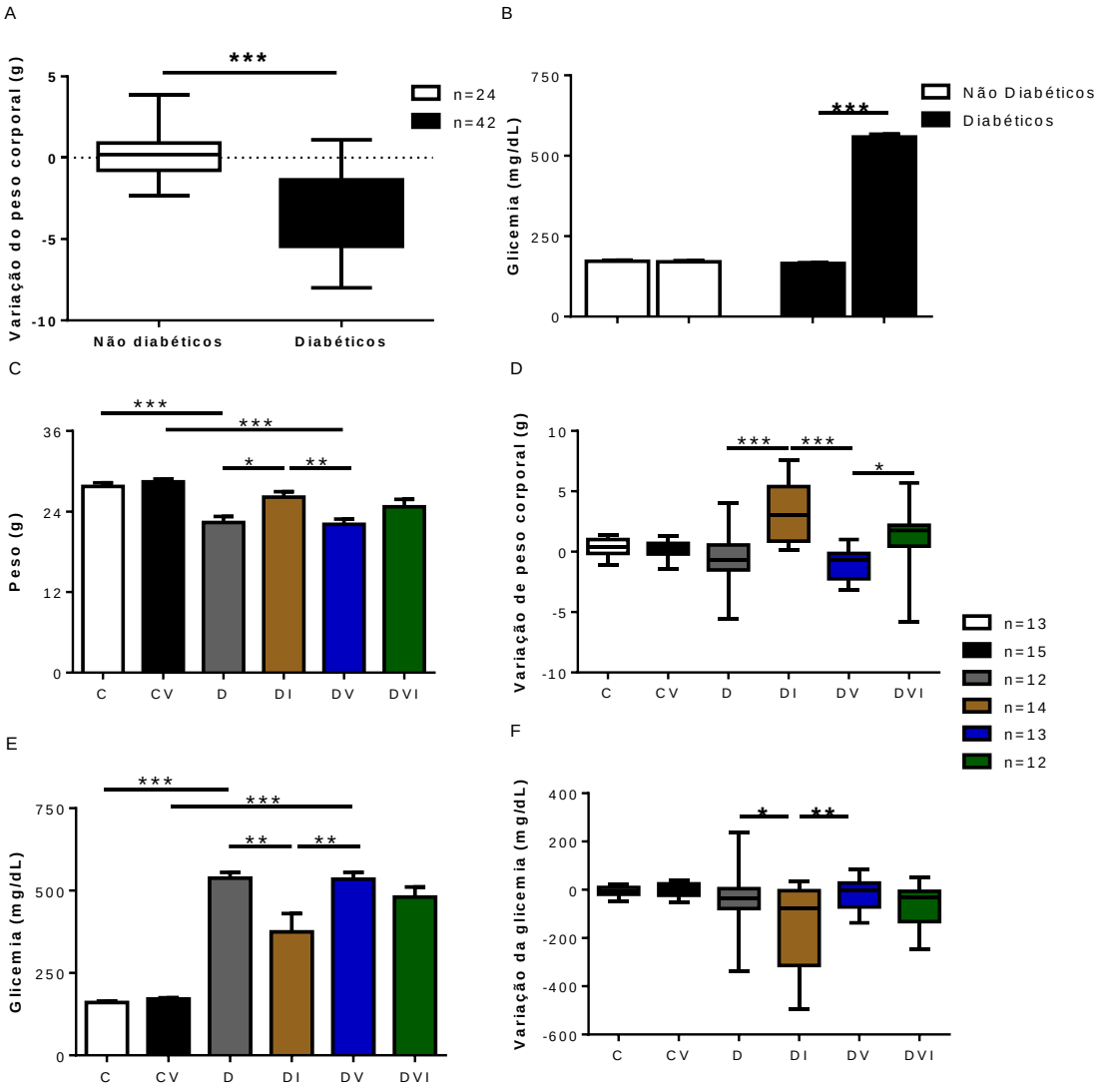


Figura 2. Variações do peso e da glicemia. A variação do peso corporal (A) e a glicemia (B) se referem às aferições realizadas no dia anterior e ao décimo dia após as administrações de salina (controle) e aloxana (diabético). O peso corporal (C) e a glicemia (E) foram aferidos no sétimo dia de suplementação com vitamina D e tratamento com insulina. A variação de peso (D) e de glicemia (F) são referentes à diferença entre o primeiro e o sétimo (último) dia de suplementação com vitamina D e tratamento com insulina. O n representa o número de animais em cada grupo. Os valores dos gráficos B, C e E estão representados como média ± EPM. C: Controle; CV: Controle + Vitamina D; D: Diabético; DI: Diabético + Insulina; DV: Diabético + Vitamina D; DVI: Diabético + Vitamina D + Insulina. Os valores dos gráficos A, D e F estão representados como mediana e desvio interquartílico. * p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

4.2. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS HORMONAIS SÉRICOS E HEMATOLÓGICOS

As complicações decorrentes do curso do DM podem alterar o metabolismo dos eritrócitos e consequentemente os níveis séricos de EPO (MATOUG et al, 2012; COLAK et al., 2014). Nesse sentido, foram avaliadas as concentrações séricas de 25(OH)D (Fig. 3A), insulina (Fig. 3B) e EPO (Fig. 3C). Os animais suplementados com colecalciferol exibiram aumento das concentrações séricas desse hormônio em relação aos seus respectivos controles não suplementados. Entretanto, a concentração de 25(OH)D dos animais diabéticos que receberam ambos os hormônios foram semelhantes aos dos animais diabéticos. Os animais diabéticos tratados com insulina apresentaram maiores níveis séricos desse hormônio quando comparados aos animais diabéticos. Os animais que receberam ambos os hormônios apresentaram maior elevação de insulina sérica em relação aos demais grupos diabéticos. Em relação às concentrações de EPO não foram observadas diferenças significativas.

Em relação aos parâmetros hematológicos, foram avaliados a leucometria (Fig. 4A), hematimetria (Fig. 4B), Hb (Fig. 4C), hematócrito (Fig. 4D), VCM (4E), HCM (4F) e CHCM (4G). Em relação aos animais não diabéticos, o grupo diabético apresentou menores valores de Hb, hematimetria e hematócrito. A suplementação com vitamina D aumentou esses parâmetros nos animais diabéticos. Em relação aos demais parâmetros, não foram observadas diferenças significativas.

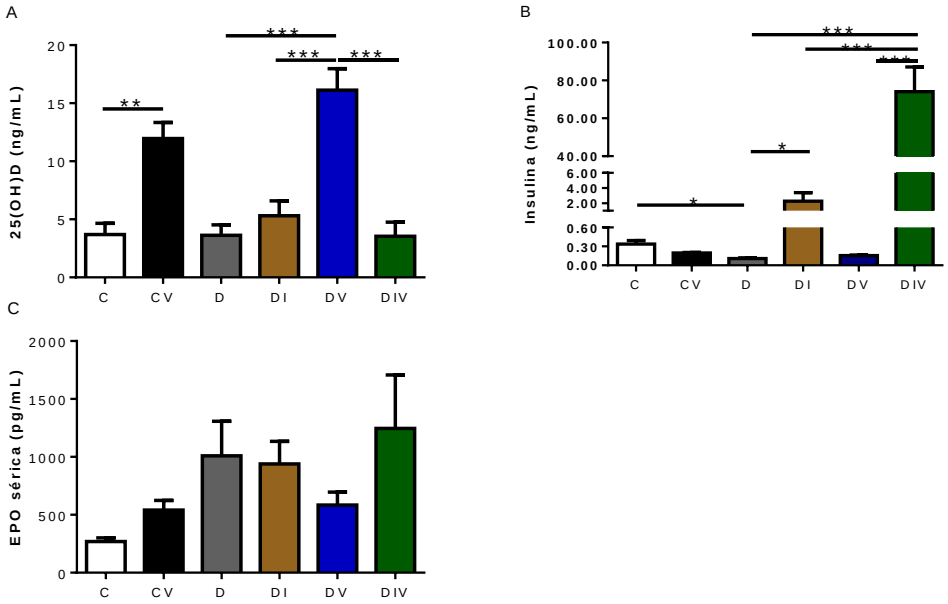


Figura 3. Hormônios séricos. (A) 25(OH)D (ng/mL); (B) Insulina (ng/mL); (C) EPO (pg/mL). Os valores representam a média ± EPM de 5 animais por grupo. Abreviações: C: Controle; CV: Controle + Vitamina D; D: Diabético; DI: Diabético + Insulina; DV: Diabético + Vitamina D; DVI: Diabético + Vitamina D + Insulina; 25(OH)D: 25-hidoxivitamina D; EPO: Eritropoetina. * p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

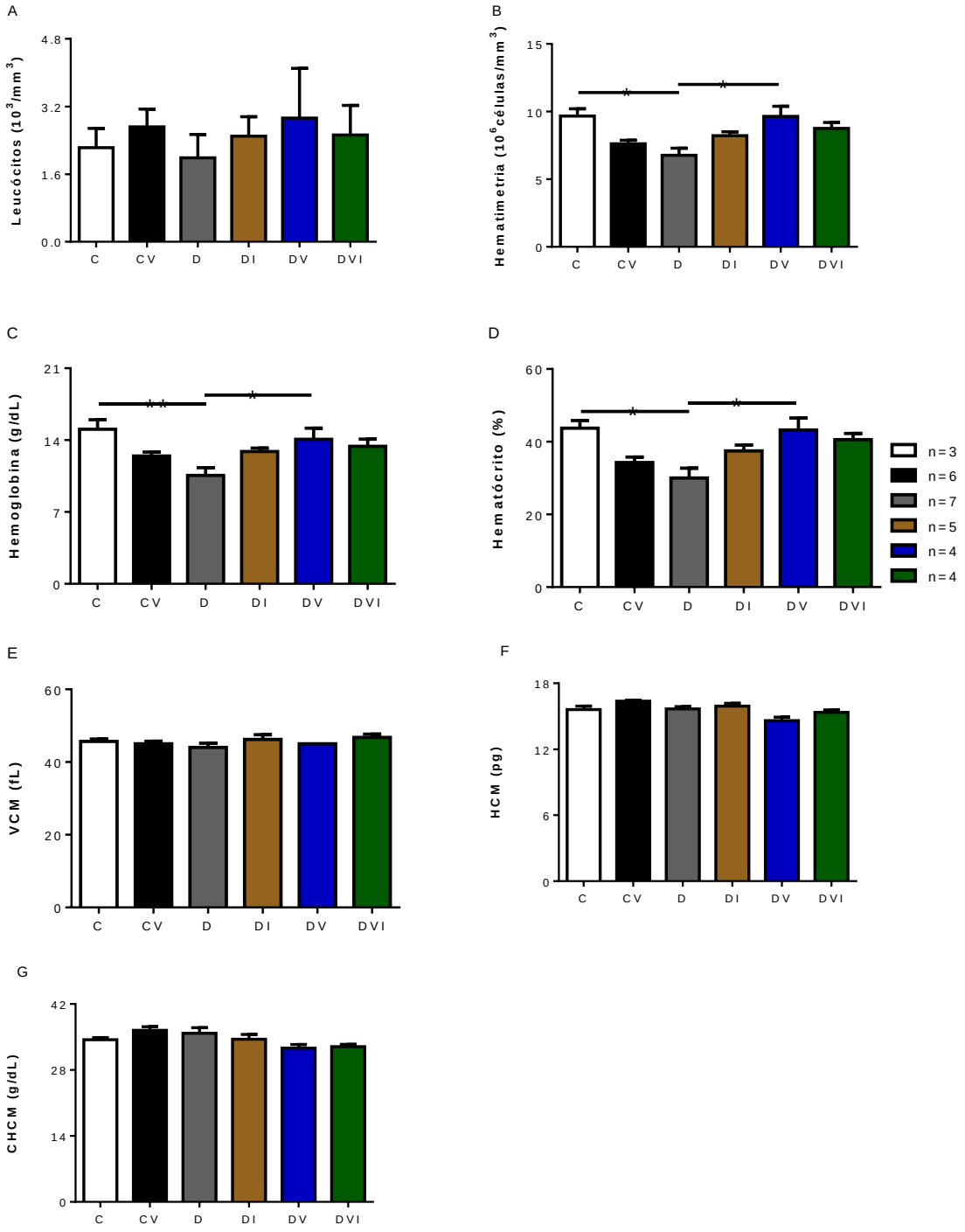


Figura 4. Parâmetros hematológicos. Os parâmetros hematológicos avaliados foram: (A) leucócitos; (B) hematimetria (10^6 células/mm^3); (C) hemoglobina (g/dL); (D) hematócrito (%); (E) VCM (fL), (F) HCM (pg) e (G) CHCM (g/dL). O n representa o número de animais por grupo. Os valores representam a média ± EPM. Abreviações: C: Controle; CV: Controle + Vitamina D; D: Diabético; DI: Diabético + Insulina; DV: Diabético + Vitamina D; DVI: Diabético + Vitamina D + Insulina. VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média. * $p<0,05$; ** $p<0,01$.

4.3. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS RENAIS

4.3.1. Peso dos rins

Ao analisar os pesos dos rins esquerdos (Fig. 5A) dos animais não foram observadas diferenças entre os grupos. Entretanto, ao comparar a relação entre o peso renal e o peso corporal (Fig. 5B), os animais diabéticos apresentaram valores maiores em relação aos animais não diabéticos.

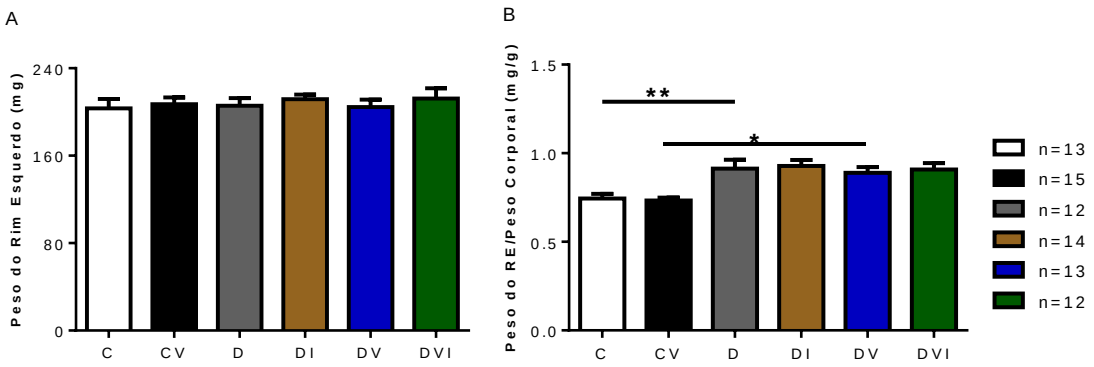


Figura 5. Peso dos rins. O n representa o número de animais por grupo. Os valores representam a média ± EPM. Abreviações: C: Controle; CV: Controle + Vitamina D; D: Diabético; DI: Diabético + Insulina; DV: Diabético + Vitamina D; DVI: Diabético + Vitamina D + Insulina; RE: Rim esquerdo. * p<0,05; **p<0,01.

4.3.2. Morfologia e metabolismo da vitamina D no rim

O DM pode cursar com complicações renais, prejudicando diretamente o metabolismo do indivíduo (SAMPANIS, 2008). Ao analisar a morfologia renal (Fig. 6), não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas.

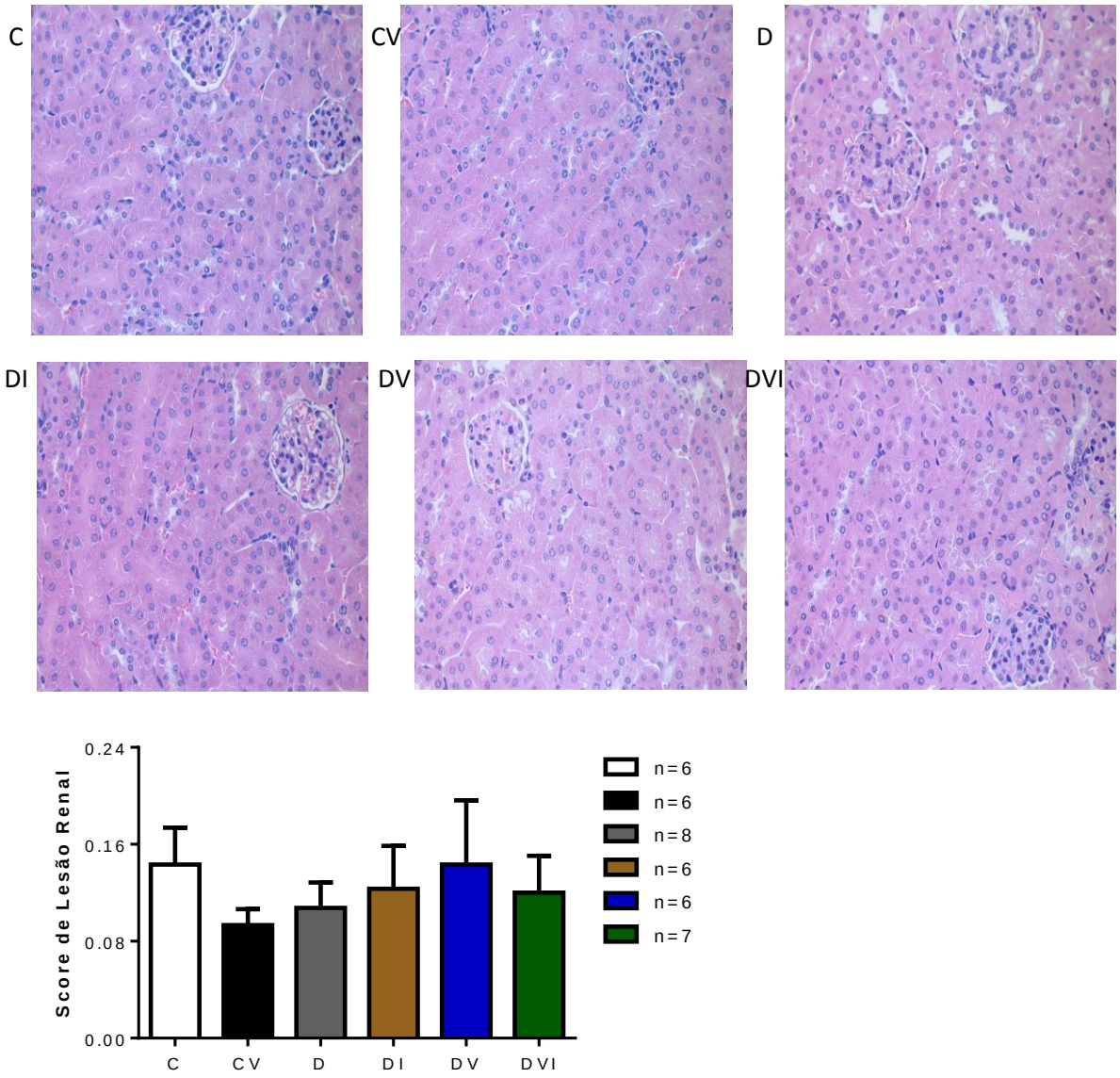


Figura 6. Morfologia renal. O n representa o número de animais por grupo. Os valores representam a média ± EPM. Abreviações: C: Controle; CV: Controle + Vitamina D; D: Diabético; DI: Diabético + Insulina; DV: Diabético + Vitamina D; DVI: Diabético + Vitamina D + Insulina.

O rim é o principal órgão que metaboliza a 25(OH)D em 1,25(OH)$_2$D (HOLICK et al, 2011). Sendo assim, foram analisadas as expressões das enzimas CYP27A1 (Fig. 7), CYP27B1 (Fig. 8), CYP24A1 (Fig. 9), bem como do VDR (Fig. 10). Os animais não diabéticos que receberam colecalciferol exibiram aumento na expressão do VDR em relação aos animais controles. Entretanto, nos animais diabéticos o colecalciferol não alterou a expressão desse receptor. Em relação à análise da expressão das hidroxilases não foram observadas diferenças entre os grupos.

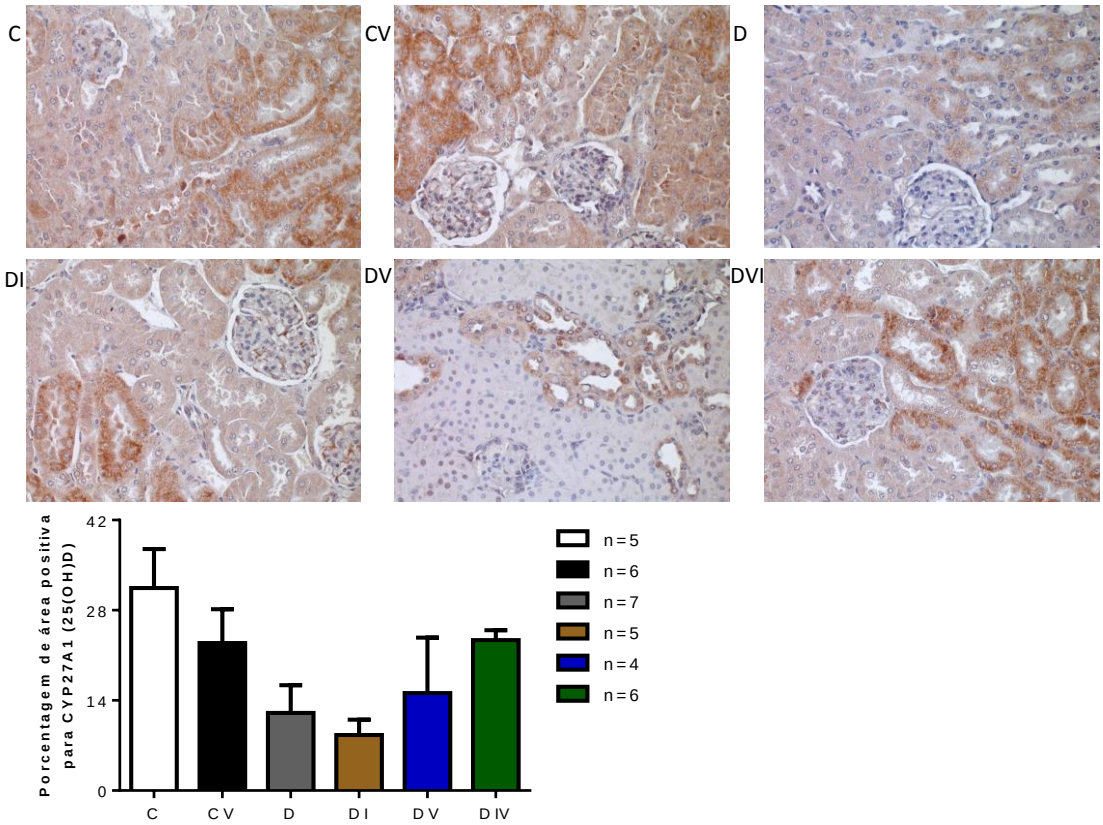


Figura 7. Imunohistoquímica da CYP27A1 renal. A região positiva para expressão da enzima está representada em marrom. O n representa o número de animais por grupo. Os valores representam a média ± EPM. Abreviações: C: Controle; CV: Controle + Vitamina D; D: Diabético; DI: Diabético + Insulina; DV: Diabético + Vitamina D; DVI: Diabético + Vitamina D + Insulina.

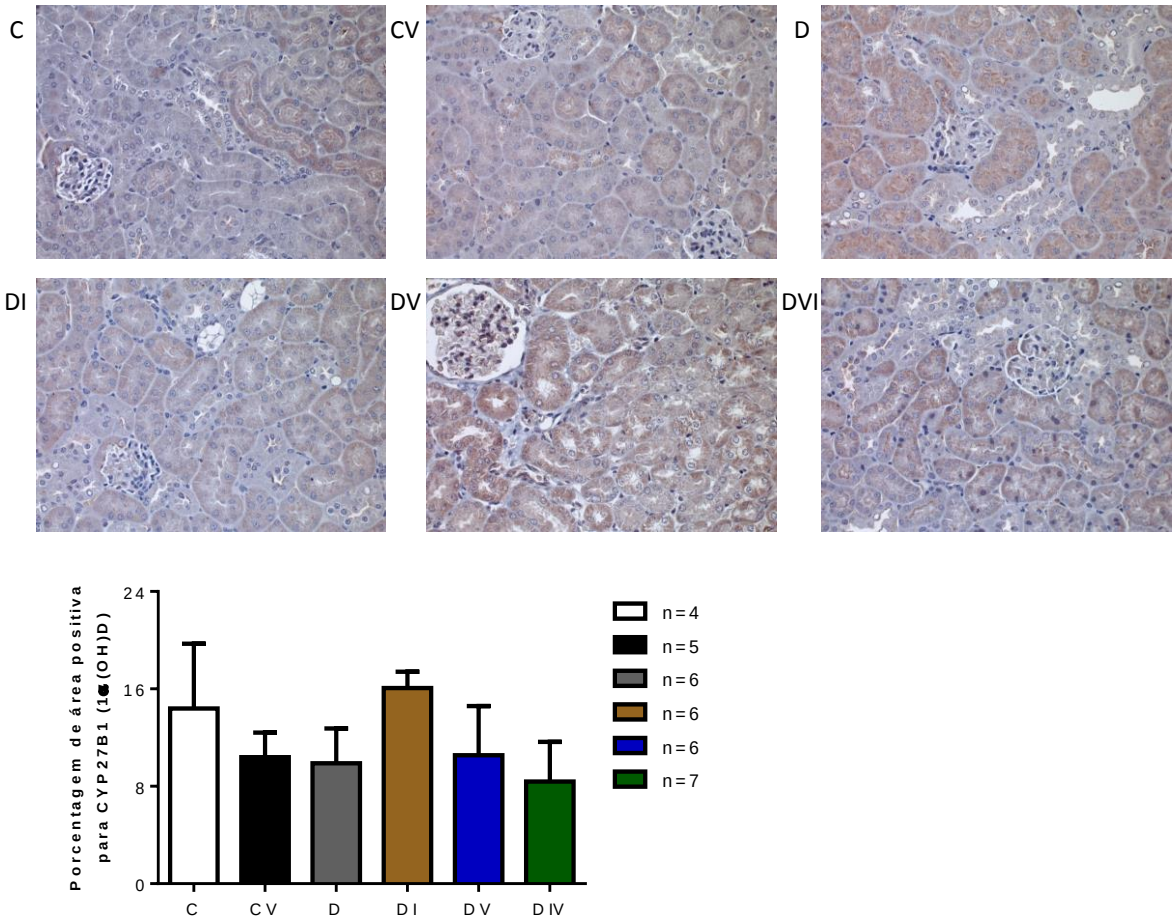


Figura 8. Imunohistoquímica da CYP27B1. A região positiva para expressão da enzima está representada em marrom. O n representa o número de animais por grupo. Os valores representam a média ± EPM. Abreviações: C: Controle; CV: Controle + Vitamina D; D: Diabético; DI: Diabético + Insulina; DV: Diabético + Vitamina D; DVI: Diabético + Vitamina D + Insulina.

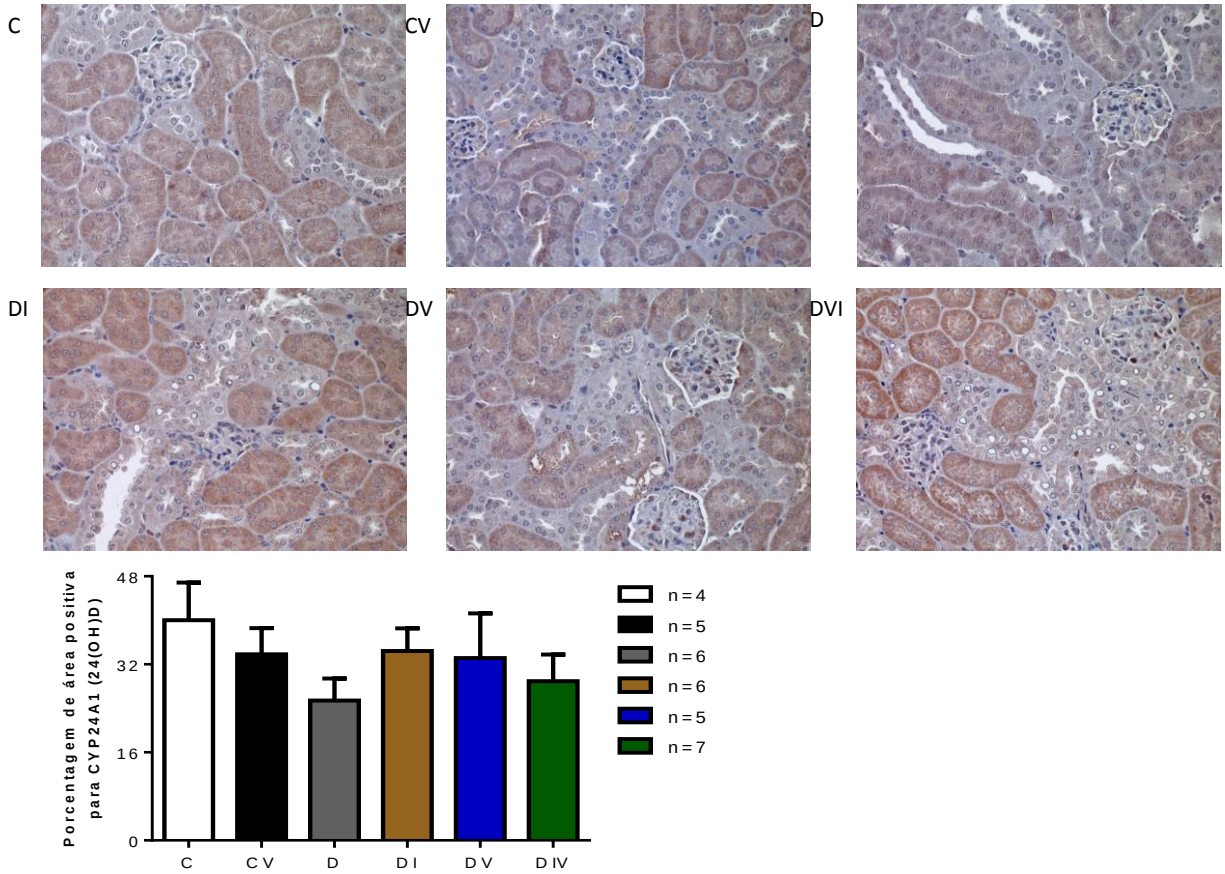


Figura 9. Imunohistoquímica da CYP24A1. A região positiva para expressão da enzima está representada em marrom. O n representa o número de animais por grupo. Os valores representam a média ± EPM. Abreviações: C: Controle; CV: Controle + Vitamina D; D: Diabético; DI: Diabético + Insulina; DV: Diabético + Vitamina D; DVI: Diabético + Vitamina D + Insulina.

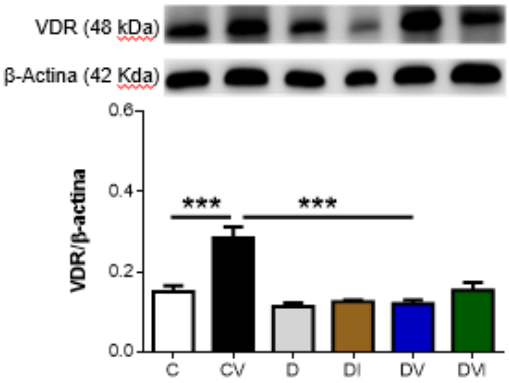


Figura 10. Expressão do VDR renal. Os valores representam a média ± EPM de 3 animais por grupo. Abreviações: C: Controle; CV: Controle + Vitamina D; D: Diabético; DI: Diabético + Insulina; DV: Diabético + Vitamina D; DVI: Diabético + Vitamina D + Insulina; VDR: Receptor de Vitamina D.

4.3.3. Citocinas e hormônios renais

Os animais diabéticos, relação aos animais não diabéticos, apresentaram maiores concentrações de TNF-α (Fig.11A), IL-6 (Fig.11B) e IL-10 (Fig.11C). Além disso, entre os animais diabéticos, a suplementação com colecalciferol reduziu os níveis dessas citocinas. Em relação à produção de EPO (Fig. 11F), os animais suplementados com colecalciferol exibiram menores níveis quando comparados aos animais diabéticos tratados com insulina e aos animais diabéticos que não receberam nenhum hormônio. Em relação à 25(OH)D, os animais diabéticos que receberam ambos os hormônios apresentaram maiores concentrações quando comparados aos animais controles.

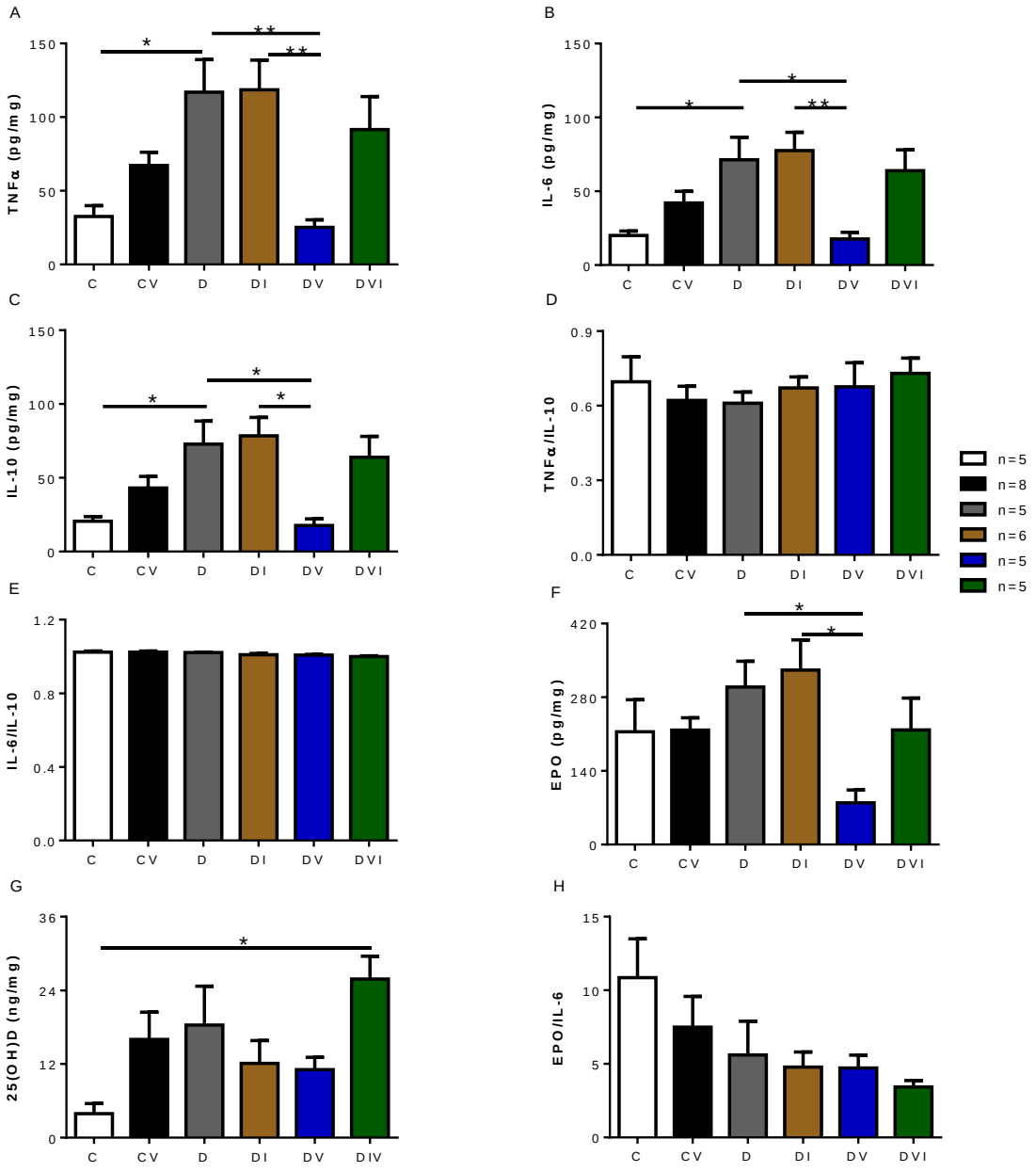


Figura 11. Citocinas e hormônios no rim. O n representa o número de animais por grupo. Os valores representam a média ± EPM. Abreviações: 25(OH)D: 25-hidroxivitamina D; C: Controle; CV: Controle + Vitamina D; D: Diabético; DI: Diabético + Insulina; DV: Diabético + Vitamina D; DVI: Diabético + Vitamina D + Insulina; EPO: Eritropoetina; IL: Interleucina; TNF: Fator de necrose tumoral. * p<0,05.

4.3.4. Bioquímica renal

O calcitriol é um dos principais reguladores das concentrações corpóreas de cálcio (VELDURTHY et al, 2016). Além disso, em indivíduos acometidos por complicações renais podem apresentar alterações nas concentrações de cálcio (SPIEGEL; BRADY, 2012). A avaliação da função renal pode ser realizada através da concentração sérica de marcadores como ureia e creatinina (PANDYA et al, 2016). A suplementação com colecalciferol não alterou as concentrações de cálcio nos animais em relação aos seus respectivos controles (Fig. 12A). Os animais diabéticos apresentaram maiores concentrações de ureia (Fig. 12B) e creatinina (Fig. 12C) em relação aos animais não diabéticos. Os animais tratados com insulina e os animais que receberam ambos os hormônios apresentaram níveis de ureia semelhante ao dos animais não diabéticos. Em relação à taxa de ureia/creatinina (Fig. 12D) não foram verificadas diferenças estatísticas entre os grupos.

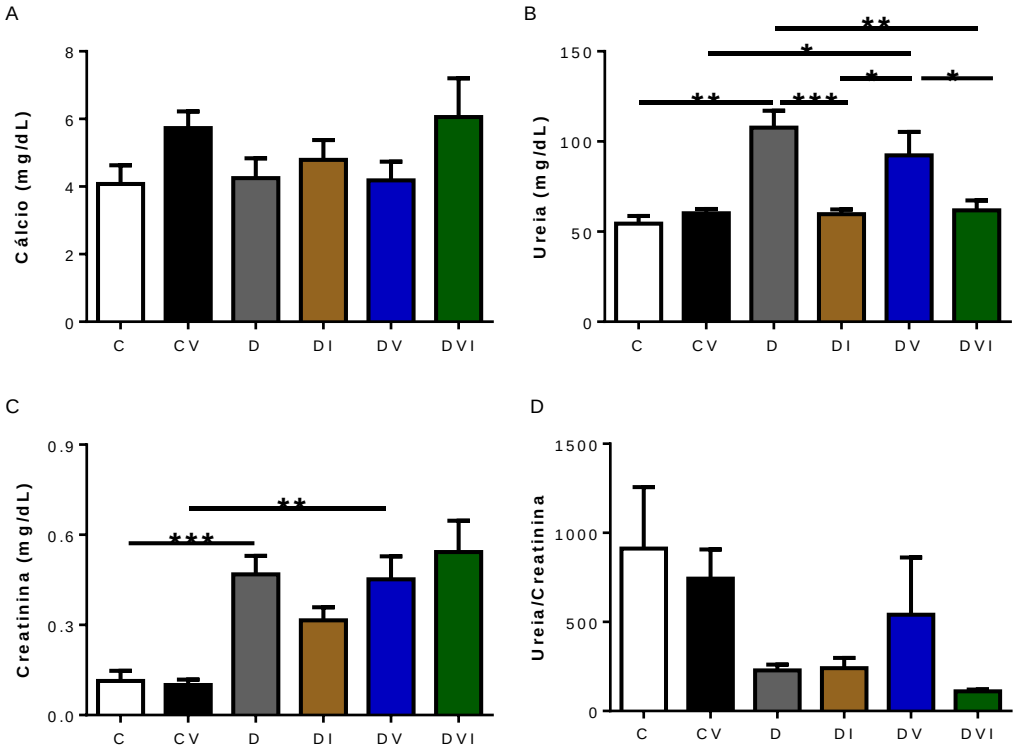


Figura 12. Parâmetros bioquímicos renais. Foram utilizados de 3 a 7 animais por grupo. Os valores representam a média ± EPM. Abreviações: C: Controle; CV: Controle + Vitamina D; D: Diabético; DI: Diabético + Insulina; DV: Diabético + Vitamina D.

4.4. AVALIAÇÃO DO FÍGADO

4.4.1. Bioquímica do fígado

O curso do DM pode comprometer vários órgãos, como o fígado (MAIESE, 2015). As variações das concentrações séricas das enzimas AST (Fig.13A), ALT (Fig.13B) a FAL (Fig.13D) e a LDH (Fig.13F), bem como da albumina (Fig.13E) podem indicar alterações hepáticas (GOWDA et al, 2009; KOTOH el al, 2009; SHARMA et al, 2014). Além disso, a relação entre AST/ALT (Fig.13C) apresenta mais utilidade clínica do que a avaliação isolada dessas enzimas (GOWDA et al, 2009). Os animais diabéticos, em relação aos animais não diabéticos, apresentaram aumento nas concentrações séricas de FAL. Em relação aos demais parâmetros não foram observadas diferenças significativas.

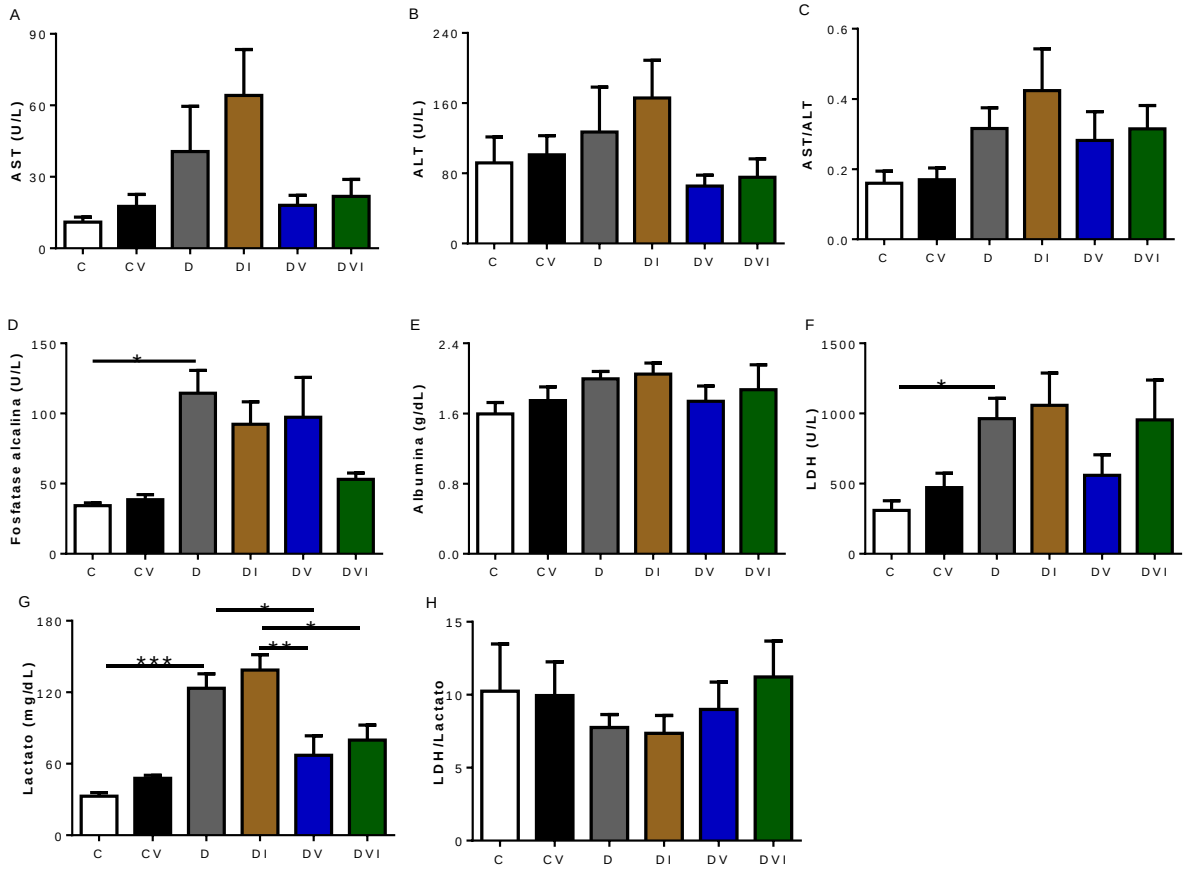


Figura 12. Avaliação dos parâmetros hepáticos. Foram utilizados de 4 a 7 animais por grupo. Os valores representam a média ± EPM. Abreviações: ALT: Alanina aminotransferase; AST: Aspartato aminotransferase; C: Controle; CV: Controle + Vitamina D; D: Diabético; DI: Diabético + Insulina; DV: Diabético + Vitamina D; DVI: Diabético + Vitamina D + Insulina; LDH: Lactato Desidrogenase. * p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

4.4.2. Citocinas, EPO e expressão da CYP27A1 no fígado

O fígado é o principal órgão que metaboliza o colecalciferol em 25(OH)D (SAWADA et al, 2001; GUPTA et al; 2004). Dessa forma, analisamos a expressão da CYP27A1 (Fig.14J). Entretanto, não foram observadas diferenças entre os grupos.

Em relação à análise das citocinas produzidas pelo fígado (Fig.14), ao comparar animais que receberam suplementação de colecalciferol, os animais não diabéticos apresentaram maiores concentrações de IL-4 (Fig.14D) em relação aos animais diabéticos. Entre os animais diabéticos, os animais que receberam ambos os hormônios apresentaram menor relação de TNF-α/IL-6 quando comparados aos animais controle (Fig.14F). As análises dos demais parâmetros não apresentaram diferenças significativas.

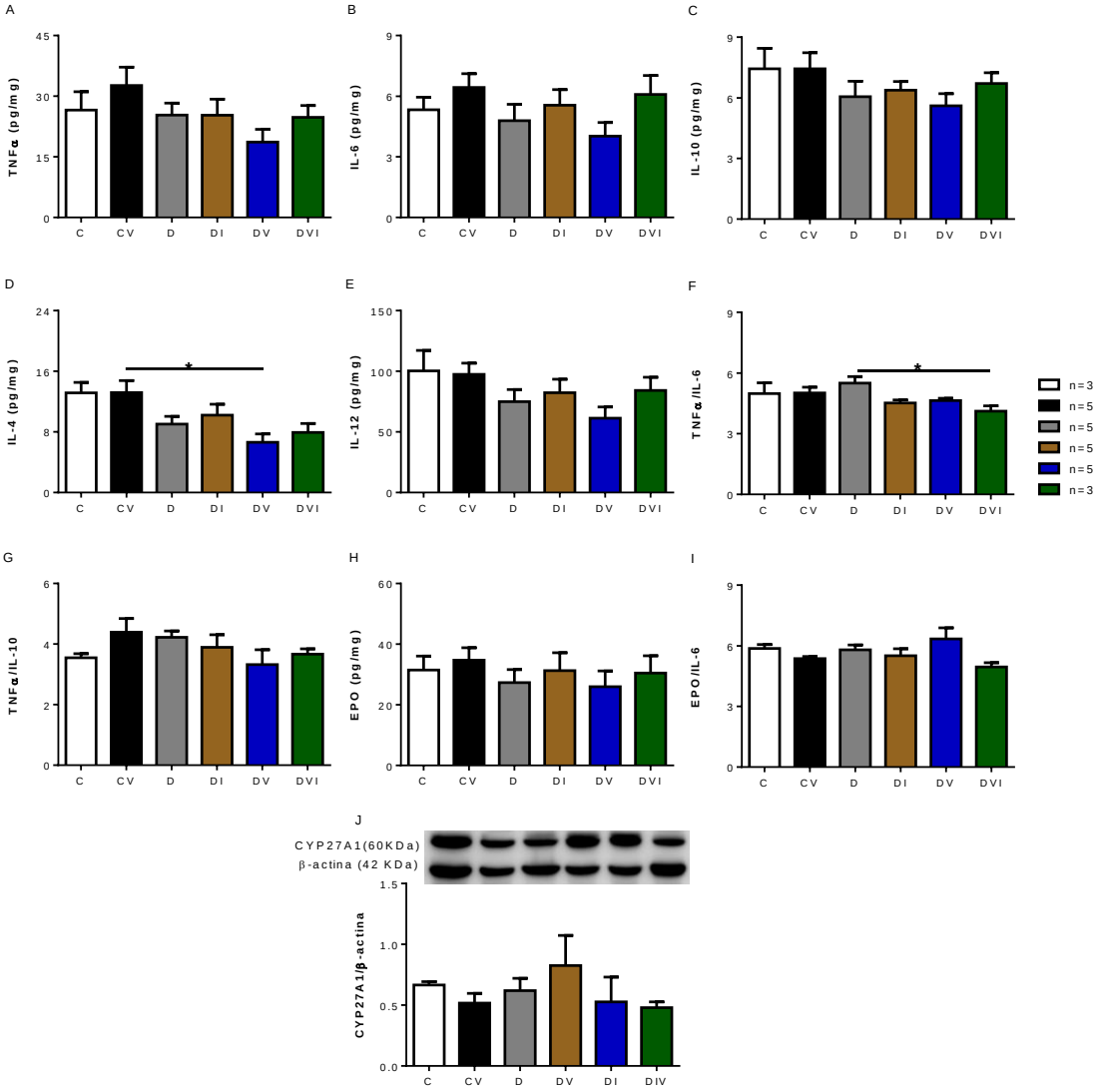


Figura 13. Citocinas, EPO e CYP27A1 no fígado. O n representa o número de animais por grupo. Para a expressão da CYP27A1 foram utilizados 3 animais por grupo. Os valores representam a média ± EPM. Abreviações: C: Controle; CV: Controle + Vitamina D; CYP27A1: 25-hidrosilase; D: Diabético; DI: Diabético + Insulina; DV: Diabético + Vitamina D; DVI: Diabético + Vitamina D + Insulina; EPO: Eritropoetina; IL: Interleucina; TNF: Fator de necrose tumoral. * $p<0,05$.

4.5. CORAÇÃO

Ao analisar as citocinas produzidas no coração os animais não diabéticos apresentaram maiores concentrações de IL-6 (Fig.15B) em relação aos animais não diabéticos suplementados com colecalciferol e aos animais diabéticos que não receberam nenhum hormônio. Os animais diabéticos apresentaram menores concentrações de TNF-α (Fig.15A) e maior razão TNF-α/IL-6 (Fig.15F) em relação aos animais não diabéticos. Entre os animais diabéticos, os animais suplementados com colecalciferol exibiram maiores concentrações de IL-10 (Fig.15C) em relação aos demais grupos. Os animais diabéticos que receberam ambos os hormônios exibiram menores concentrações de TNF-α, IL-10, bem como as razões de TNF-α/IL-6 e TNF-α/IL-10 em relação aos animais diabéticos suplementados com colecalciferol.

Os animais diabéticos que receberam insulina apresentaram menores concentrações de IL-6 em relação aos animais diabéticos e menor razão TNF-α/IL-6 em relação aos animais diabéticos que não receberam nenhum hormônio. Além disso, a suplementação com insulina aumentou a razão EPO/IL-6 em relação animais que não receberam nenhum hormônio e os animais que receberam colecalciferol. As análises das concentrações de IL-4 (Fig.15D), IL-12 (Fig.15E) e EPO (Fig.15H) não apresentaram diferenças significativas.

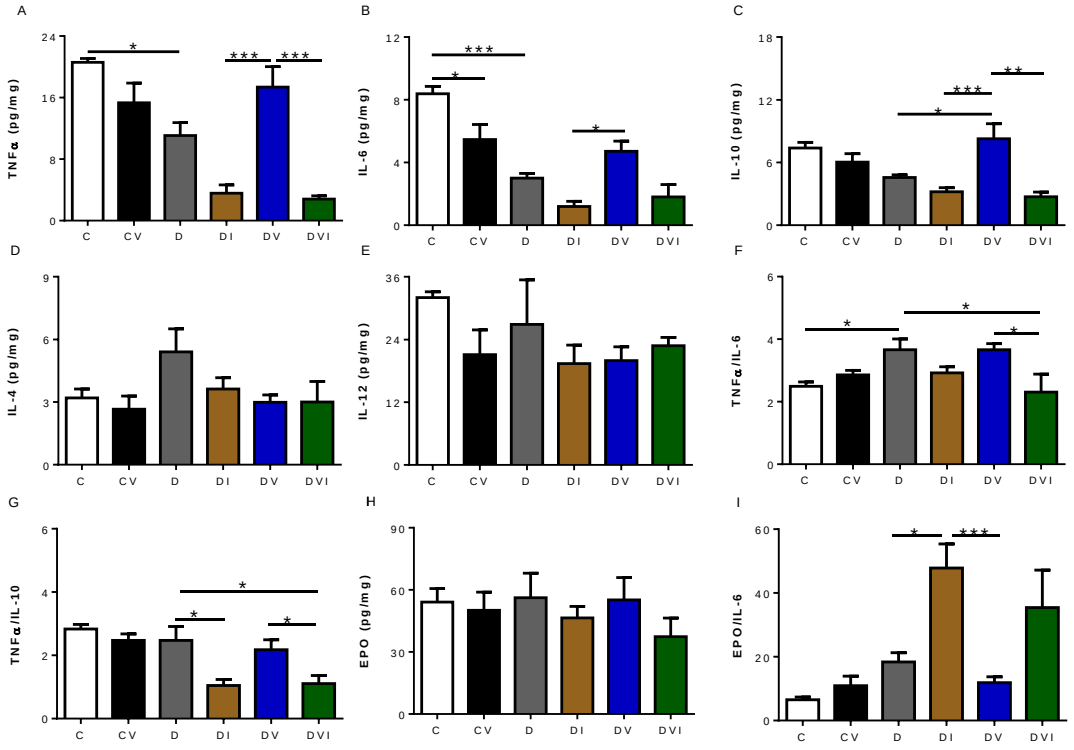


Figura 14 Citocinas e hormônios no coração. Foram utilizados de 4 a 7 animais por grupo. Os valores representam a média ± EPM. C: Controle; CV: Controle + Vitamina D; D: Diabético; DI: Diabético + Insulina; DV: Diabético + Vitamina D; DVI: Diabético + Vitamina D + Insulina; EPO: Eritropetina; IL: Interleucina; TNF: Fator de necrose tumoral. * p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

4.6. ATIVIDADE METABÓLICA MITOCONDRIAL

As taxas de metabolismo mitocondrial das células RAW 264.7 foram avaliadas pela técnica do MTT após 1, 3, 6, 12, 24, 48 e 72 horas (Fig.16) de tratamento com colecalciferol e estímulo com LPS. Ao comparar os grupos estimulados com LPS, tratados ou não com colecalciferol, com seus respectivos controles, não foram verificadas diferenças após 1, 3 e 6 horas. Entretanto, após 12 horas, as células estimuladas com LPS exibiram maior viabilidade celular quando comparadas às células do grupo controle. O grupo tratado com 100 nM de colecalciferol apresentou a maior viabilidade celular entre os grupos não estimulados com LPS. As células estimuladas com 1 nM e 10n M de colecalciferol apresentaram menor viabilidade celular quando comparados às células do grupo controle. Além disso, os grupos tratados com 1 nM e 10 nM e estimulados com LPS apresentaram maior viabilidade celular quando comparados aos seus respectivos controles. Após 24, 48 e 72 horas, os grupos estimulados com LPS, tratados ou não com colecalciferol, exibiram menor viabilidade celular quando comparados aos respectivos controles não estimulados com LPS.

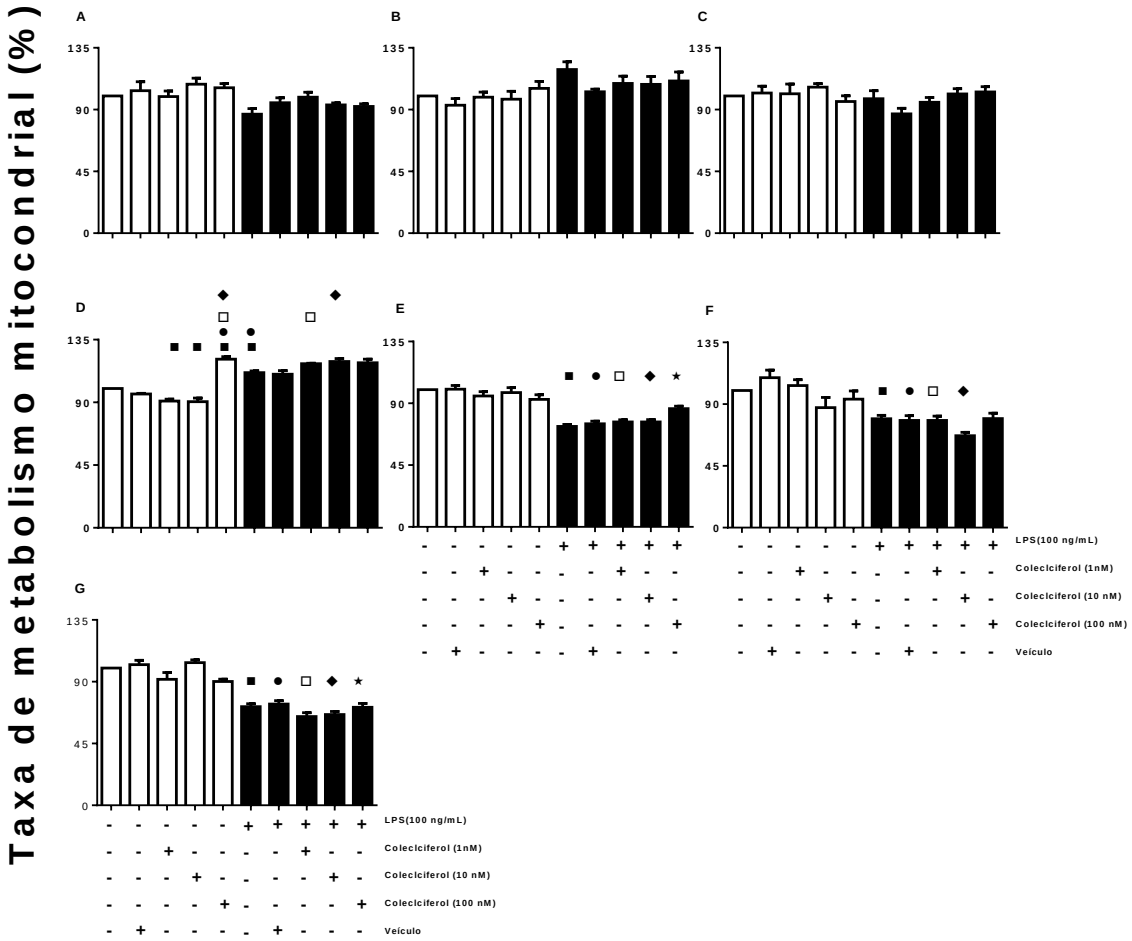


Figura 15. Atividade do metabolismo mitocondrial das células RAW 264.7. As células foram tratadas por 1 (A), 3 (B), 6 (C), 12 (D), 24 (E), 48 (F) e 72 horas (G) com colecalciferol (1 nM, 10 nM e 100 nM) e concomitantemente estimuladas com LPS (100 ng/mL) para avaliação da + viabilidade celular pela técnica de MTT. Foram utilizados n= 4-8 por grupo. Os valores representam a média ± EPM.

■ Comparação com o grupo controle;
● Comparação com o grupo tratado com veículo;
□ Comparação com o grupo tratado com 1 nM de colecalciferol;
◆ Comparação com o grupo tratado com 10 nM de colecalciferol;
★ Comparação com o grupo tratado com 100 nM de colecalciferol;

4.7. AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE NO E EXORESSÃO DE INOS

A produção de NO pelas células imunes envolve a expressão da iNOS que é dependente de estímulos como citocinas pró-inflamatórias e endotoxinas, como o LPS (DUSSE et al, 2003). Essa expressão é lenta e não ocorre em condições fisiológicas (CHAN & RICHES, 2001). No presente trabalho, a expressão da iNOS (Figs.17A) foi analisada após 24 horas de estímulo com LPS. Além disso, a concentração de NO (Fig.17B) foi mensurada após 3, 6, 12 e 24 horas de estímulo com LPS. As células estimuladas pelo LPS e tratadas com colecalciferol exibiram metade das concentrações de NO (após 12 e 24 horas), bem como redução (aproximadamente 50%) da expressão de iNOS (após 24 horas), quando comparadas às células estimuladas pelo LPS.

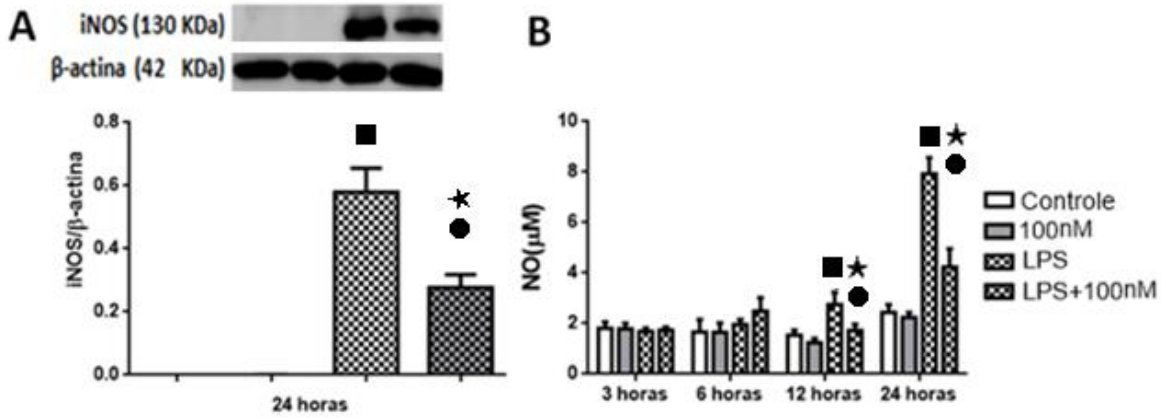


Figura 16. Liberação de NO e expressão de iNOS pelas células RAW 264.7. A expressão de iNOS (A) foi verificada após 24 horas de ensaio. As concentrações de NO (B) foram quantificadas após 3, 6, 12 e 24 horas. Foram utilizados n= 6 por grupo. Os valores representam a média ± EPM. Gel representativo de 8 géis. O gel completo está disponível nos apêndices.

■Comparação com o grupo controle (grupo 1); p<0,001;
★Comparação com o grupo tratado com 100 nM de colecalciferol (grupo 2); p<0,001;
●Comparação com o grupo estimulado pelo LPS (grupo 3); p<0,001.

4.8. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA ERK1/2

As MAPK são proteínas intracelulares importantes no processo de síntese de citocinas (LI et al., 2013). Nesse sentido, foi avaliado o efeito do colecalciferol na expressão da ERK1/2 (Fig.18A) após 1h de ensaio. As células tratadas com 100nM de colecalciferol e estimuladas pelo LPS exibiram redução na expressão da p42 (Fig.18B) e da p44 (Fig.18C) em comparação às células estimuladas pelo LPS. Entretanto, o tratamento das células com 1nM e 10nM de colecalciferol não promoveram o mesmo efeito.

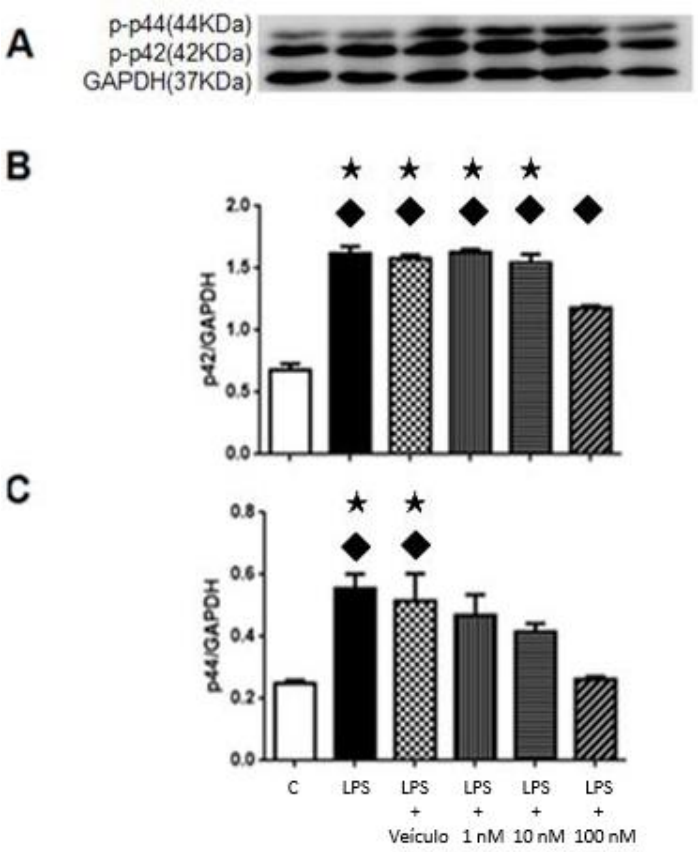


Figura 17. Expressão da fosfo-ERK1/2 nas células RAW 264.7. A expressão da ERK1/2 (A) e a expressão relativa ao GAPDH (B) foram verificadas após 1h horas de ensaio. Foram utilizados n= 4 por grupo. Os valores representam a média ± EPM. Gel representativo de 8 géis. O gel completo está disponível nos apêndices. C: Controle; LPS: Lipopolissacarídeo.

★ Comparação com o grupo controle (grupo 1);
◆ Comparação com o grupo estimulado com LPS e tratado com 100nM de colecalciferol (grupo 6).

4.9. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA CYP27A1 E CYP27B1

As enzimas CYP27A1 e CYP27B1 são fundamentais para ativação do colecalciferol (HOLICK et al., 2011). A análise da expressão da CYP27A1 (Fig.19A) não demonstrou diferença entre os grupos. Entretanto, o estímulo com LPS aumentou a expressão da CYP27B1 (Fig.19B), em relação ao grupo controle. Além disso, o grupo estimulado pelo LPS e tratado com 100 nM de colecalciferol apresentou aumento da expressão da CYP27B1 em relação aos demais grupos.

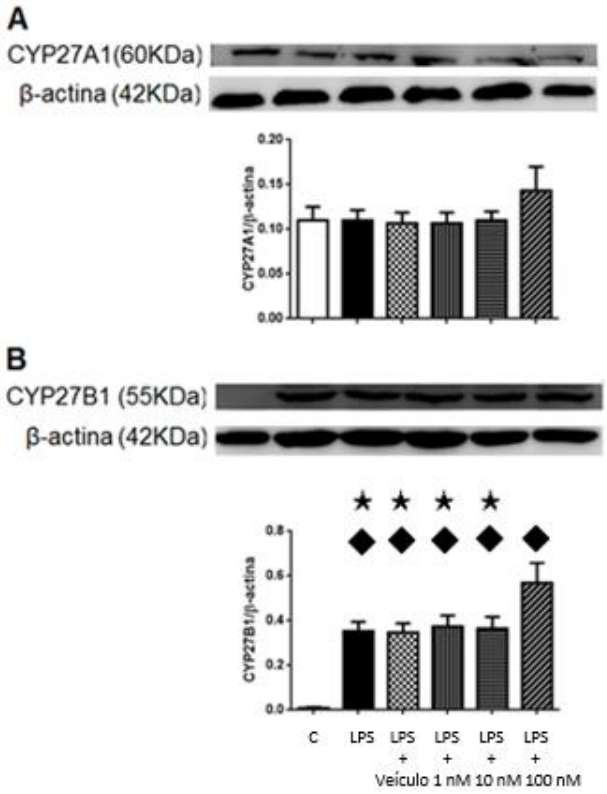


Figura 18. Expressão da CYP27A1 e CYP27B1 nas células RAW 264.7. As expressões da CYP27A1 (A) e da CYP27B1 (B) foram verificadas após 24 horas de ensaio. Géis representativos de 3 (CYP27A1) e de 4 (CYP27B1) géis. Os géis completos estão disponíveis nos apêndices. Os valores representam a média ± EPM. C: Controle; LPS: Lipopolissacarídeo.

★Comparação com o grupo controle (grupo 1);
◆Comparação com o grupo estimulado com LPS e tratado com 100 nM de colecalciferol (grupo 6).

4.10. AVALIAÇÃO DAS CITOCINAS

As citocinas são proteínas solúveis produzidas por muitas células imunológicas para coordenar as respostas imunes. Os macrófagos, ao serem estimulados pelo LPS produzem TNF-α, IL-6, IL-1β e IL-10 (Fig.20). No presente trabalho, as concentrações dessas citocinas foram avaliadas após 3, 6, 12 e 24 horas de ensaio. Entre as células estimuladas pelo LPS, as células tratadas com colecalciferol 100 nM, em relação ao respectivo controle, exibiram menor liberação de TNF-α (após 3 e 6 horas), IL-6 (após 3, 6 e 24 horas), IL-1β (após 24 horas) e IL-10 (após 12 e 24 horas).

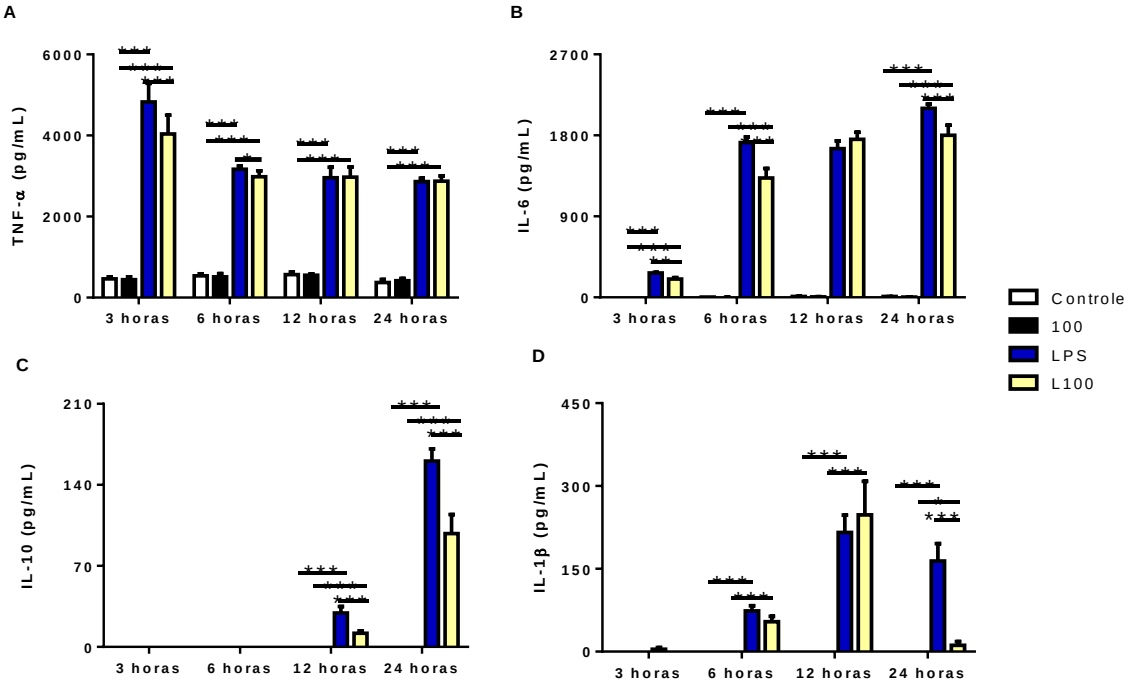


Figura 19. Concentração das citocinas IL-1β, IL-6, IL-10 e TNF-α liberadas pelas células RAW 264.7. A concentração das citocinas TNF-α (A), IL-6 (B), IL1-β (C), IL-10 (D) após 3, 6, 12 e 24 horas de ensaio. Foram utilizados n=6. Os valores representam a média ± EPM. Abreviações: IL: Interleucina; TNF: Fator de necrose tumoral.

■ Comparação com o grupo controle (grupo 1); p<0,001;
✶ Comparação com o grupo tratado com 100 nM de colecalciferol (grupo 2); p<0,001;
● Comparação com o grupo estimulado pelo LPS (grupo 3); p<0,001.

4.11. ATIVIDADE METABÓLICA MITOCONDRIAL E LIBERAÇÃO DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS

A liberação de TNF-α e IL-6 pelos MP (Fig.21) foi avaliada. Entre os MP diabéticos e não diabéticos, o estímulo com LPS promoveu maior liberação de ambas as citocinas em relação aos grupos não tratados. Entretanto, o tratamento com 100 nM de colecalciferol concomitante ao estímulo com LPS não promoveu alterações nas concentrações dessas citocinas, bem como na viabilidade celular.

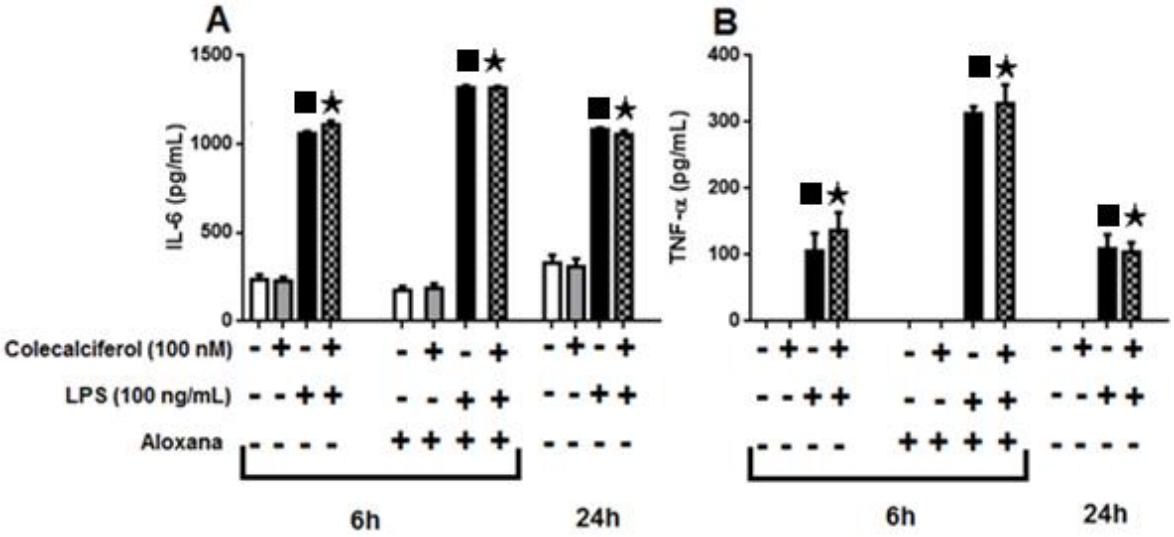


Figura 20. Citocinas pró-inflamatórias liberadas pelos macrófagos peritoneais. Os MP de animais não diabéticos e diabéticos foram estimulados com LPS (100 ng/mL) e tratados com colecalciferol (100 nM). As citocinas IL-6 (A) e TNF-α (B) foram avaliadas após 6 e 24 horas. Foram utilizados n= 3-6 por grupo. Os valores representam a média ± EPM. Abreviações: IL: Interleucina; TNF: Fator de necrose tumoral.

■ Comparação com o grupo controle (grupo 1); p<0,001;

★ Comparação com o grupo tratado com 100 nM de colecalciferol (grupo 2); p<0,001.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

O presente estudo analisou a influência da insulina e da suplementação de colecalciferol no modelo experimental de DM1, bem como a ação do colecalciferol em células RAW 264.7 e em macrófagos peritoneais estimulados pelo LPS. Foi verificado que, em animais diabéticos, a insulina promoveu aumento do peso corporal e reduziu os níveis as concentrações séricas de ureia e da razão TNF-α/IL-10 (coração). Já o colecalciferol promoveu aumento dos parâmetros hematimétricos, bem como redução dos das concentrações de TNF-α, IL-6, IL-10 e EPO nos rins. Em relação às células RAW 264.7, foi verificado que o colecalciferol foi metabolizado pelas hidroxilases e reduziu a expressão da p-erk1/2 e da iNOS, bem como a liberação de NO, TNF-α, IL-6, IL-10 e IL-1β.

A destruição seletiva das células beta pancreáticas induzida por substâncias diabetogênicas tem sido utilizada como modelo animal de DM por diversos grupos de pesquisa, sendo as substâncias mais comuns a ALX e a STZ (SZKUDELSKI; 2001). Nosso grupo tem utilizado o modelo de diabetes induzido por ALX, devido à STZ apresentar toxicidade aos linfócitos presentes no baço e no timo (GAULTON et al, 1985; LENZEN, 2008; DIAB et al 2015), bem como interferir nos parâmetros hematológicos (COLAK et al., 2014). Dessa forma, acredita-se que o uso da ALX para indução do DM seja mais apropriado para o presente estudo.

A insulina é um hormônio peptídico cuja principal função fisiológica é regular a glicemia (ATKINSON et al, 2014). A carência na produção de insulina endógena culmina em hiperglicemia e, consequentemente, contribui para a manifestação dos principais sintomas presentes no DM: polifagia, polidipsia, poliúria, bem como redução do ganho de peso corporal (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017). Quando crônica, a hiperglicemia é um dos principais fatores que favorecem o comprometimento de diversos órgãos, como rins, fígado, coração, olhos, bem como do sistema vascular (DONG; WOO, 2001). Assim, o controle da glicemia no DM, bem como a melhor compreensão do efeito da insulina, seja pela administração de insulina exógena combinada ou não a outros agentes hipoglicemiantes tem sido uma importante estratégia para

prevenção das complicações clínicas (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017).

No presente estudo, os animais foram submetidos à pesagem e à aferição da glicemia um dia antes e dez dias após a administração de ALX. Após esse período experimental, os animais do grupo controle exibiram ganho de peso corporal, bem como normoglicemia. Entretanto, os animais tornados diabéticos exibiram redução do peso corporal e hiperglicemia, caracterizando o estado insulinopênico (BELLA et al., 2017). A hiperglicemia crônica pode elevar a lipólise e degradar aminoácidos, aumentando o gasto energético dos tecidos, o que explica a perda de peso corporal nos animais diabéticos (OLIVEIRA et al, 2013; CHAMBERLAIN et al., 2016).

Um dos benefícios da insulinoterapia em indivíduos diabéticos, além da redução dos níveis glicêmicos, é a recuperação do ganho de peso. Os prováveis mecanismos estão relacionados à redução do catabolismo proteico, culminando no aumento da massa magra, bem como na redução da síntese de glicose hepática e da gluconeogênese (JACOB et al., 2006). Embora mais estudos sejam necessários, sugere-se que exista relação entre a variação de peso e a vitamina D devido à presença de proteínas fundamentais no metabolismo desse hormônio nas células do tecido adiposo (MATHIEU et al., 1994; LI et al., 2008; NARVAEZ et al., 2009; OCHS-BALCOM et al., 2011). A redução do peso corpóreo tem sido atribuída à ação do cálcio potencializada pela vitamina D. A elevação da disponibilidade do cálcio facilita a oxidação das gorduras, culminando em apoptose dos adipócitos, bem como na redução da absorção lipídica no intestino (MELANSON et al., 2005; JACOBSEN et al., 2005; ZHU et al., 2013). O efeito da vitamina D como um agente que regula a glicemia também tem sido descrito, embora o mecanismo não esteja completamente elucidado (KOSTOGLOU - ATHANASSIOU et al., 2013; TAKIISHI et al., 2014). Sugere-se que a vitamina D possa regular a glicemia através da secreção de insulina, devido às células beta pancreáticas expressarem o VDR, a 1α-hidroxilase, bem como apresentarem VDRE na região promotora do gene de insulina humano (ALVAREZ; ASHRAF, 2010). Além disso, de acordo com Takiishi e colaboradores (2014), a administração de 800UI/dia de vitamina D pode reduzir a incidência do DM, bem como a hiperglicemia em camundongos NOD. Nesse sentido, o peso e a glicemia

foram aferidos no primeiro e no sétimo dia de suplementação com vitamina D e de tratamento com insulina.

Os animais diabéticos que receberam insulina exibiram elevação no ganho de peso corporal quando comparados aos demais grupos diabéticos. Além disso, os animais diabéticos que receberam ambos os hormônios apresentaram aumento no ganho de peso corporal quando comparados aos animais diabéticos suplementados com colecalciferol, bem como menor ganho de peso corporal, quando comparados aos animais que receberam apenas insulina. Assim, os resultados podem sugerir que o colecalciferol reduziu o ganho de peso corporal promovido pela insulina em camundongos diabéticos. Em relação à variação da glicemia, os animais diabéticos tratados com insulina exibiram redução na glicemia quando comparados aos animais diabéticos não tratados. Entretanto, o tratamento dos animais diabéticos com colecalciferol ou com ambos os hormônios não influenciou as concentrações desse parâmetro.

O efeito provocado pela administração de colecalciferol e insulina em animais e humanos ainda é pouco conhecido. Estudos demonstram que camundongos e coelhos que apesentam deficiência nas concentrações de 25(OH)D apresentam deficiência na secreção de insulina e a suplementação com esse hormônio normalizou a mesma (ALVAREZ; ASHRAF, 2010). Em outro estudo, camundongos C57BL/6J machos tornados diabéticos através da administração de STZ e tratados com calcitriol (5µg/Kg) apresentaram elevação nas concentrações séricas de insulina quando comparados aos animais diabéticos não tratados (WANG et al, 2016). Além disso, Calle e colaboradores (2008) trataram ratos não diabéticos e tornados diabéticos (através da administração de STZ) com 1,25$(OH)_2$D (150 UI/Kg, ou 3,75 µg/Kg), uma vez por dia durante quinze dias, e verificaram que não houve alteração na hiperglicemia, hipoinsulinemia e glicosúria. No presente estudo, a suplementação com colecalciferol também não alterou as concentrações séricas de insulina. Entretanto, o grupo diabético que recebeu ambos os hormônios, em relação aos diabéticos que não receberam hormônios, apresentou elevação da insulina sem alteração das concentrações de 25(OH)D. Além disso, os animais suplementados com ambos os hormônios exibiram níveis de insulina 40 vezes maiores quando comparados aos animais diabéticos que receberam apenas insulina. O tratamento

com ambos os hormônios pode ter aumentado o metabolismo do colecalciferol, favorecendo o aumento da insulina sérica através do aumento da secreção da mesma pelas células beta remanescentes. Além disso, pode ter ocorrido redução do metabolismo da insulina. Assim, esses dois fatores podem ter contribuído para a elevação dessa insulina nesses animais.

Os distúrbios hematológicos são possíveis complicações que podem ocorrer na evolução do DM, provavelmente pela hiperglicemia crônica (THOMAS et al., 2011; COLAK et al., 2014). A anemia, por exemplo, é um problema de saúde mundial e um fator de risco independente para elevar a morbidade e mortalidade, principalmente em indivíduos com doenças crônicas (COLAK et al., 2014). Uma das estratégias para avaliar a anemia, muito comum em indivíduos com DM1, é a avaliação da concentração sérica de hemoglobina (COLAK et al., 2014). Recentemente, nosso grupo observou que camundongos diabéticos suplementados com 800UI/dia de colecalciferol, quando comparados aos camundongos diabéticos, exibiram aumento na hemoglobina, na hematimetria e no hematócrito (BELLA et al, 2017). Uma possível justificativa para esses resultados seria a interação da vitamina D com o VDR presente nas células da medula óssea (ZHOU; LEBOFF; GLOWACKI, 2010). Outro possível mecanismo seria a redução sistêmica da produção de citocinas pela vitamina D, que reduziria a inflamação presente nas doenças crônicas e, consequentemente, a anemia (SIM et al., 2010). Alguns estudos também demonstram que a vitamina D pode favorecer a síntese de EPO (AUCELLA et al, 2003; ZHOU et al, 2010). A elevação da produção da EPO, consequentemente, pode levar ao aumento da síntese de Hb e de eritrócitos, o que melhoraria o quadro de anemia (JELKMANN, 2016). Além disso, pouco se sabe sobre a influência da insulina nos parâmetros hematológicos. No presente estudo, foram avaliados a hematimetria, hemoglobina, hematócrito, leucócitos, VCM, HCM, CHCM e EPO (no soro, nos rins, no fígado e no coração). Os animais diabéticos apresentaram redução dos níveis de Hb, hematócrito e hematimetria quando comparados aos animais não diabéticos. Entre os animais diabéticos, a suplementação com colecalciferol aumentou os níveis Hb, hematócrito e hematimetria. O tratamento com insulina não promoveu alteração nesses parâmetros. Além disso, não foram observadas diferenças entre as concentrações de EPO no soro, no fígado e no coração.

Entretanto, ao analisar a síntese de EPO renal foi verificado que os animais diabéticos que receberam colecalciferol apresentaram redução na concentração desse hormônio em relação aos animais diabéticos e em relação aos animais tratados com insulina. Essa alteração dos níveis de EPO poderia ser uma consequência ao aumento dos níveis da Hb, do hematócrito e da hematimetria.

Os rins podem apresentar alterações fisiopatológicas durante o curso do DM, podendo prejudicar o metabolismo de muitas moléculas, como a vitamina D e a EPO (SINGH et al, 2009). Além disso, o aumento da massa, bem como do volume podem indicar disfunção de um órgão (MOLINA; DIMAIO, 2012). Nesse sentido, foram avaliados os pesos dos rins esquerdos, bem como a razão entre o peso do rim esquerdo e o peso corpóreo. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os pesos renais. Entretanto, os animais diabéticos, em relação aos respectivos controles não diabéticos, apresentaram maiores razões entre o peso do rim e o peso corpóreo. Isso pode ter ocorrido devido à redução do peso corpóreo dos animais causado pelas complicações metabólicas oriundas do DM.

A análise morfológica, bem como as concentrações de ureia e creatinina podem indicar alterações renais (GOWDA et al, 2010). No presente trabalho não foram observadas alterações morfológicas. Esses dados condizem com os achados de Franzén e colaboradores (2011), que, após 10 semanas de administração de ALX, não encontraram diferenças morfológicas entre os rins de camundongos C57BL/6 diabéticos e não diabéticos. Entretanto, as altas concentrações séricas de ureia e de creatinina em animais diabéticos podem indicar comprometimento da função renal (AMARTEY et al, 2015).

As hidroxilases e o VDR são importantes no metabolismo da vitamina D. O rim, principal órgão envolvido nesse processo, expressa enzimas que apresentam atividade anabólica e catabólica da vitamina D. Alterações renais poderiam interferir na atividade dessas enzimas, prejudicando o metabolismo da vitamina D (HOLICK et al, 2011). Além disso, a CYP27A1 pode atuar também no metabolismo do colesterol (BABIKER et al, 1997). No presente trabalho, foram avaliadas as expressões das isoformas renais CPY27A1, CPY27B1 e CPY24A1, bem como do VDR. Em relação à expressão das enzimas, e não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos. Entretanto, a expressão da CPY27A1 renal pode sugerir que o rim atue no processo de conversão do

colecalciferol a 25(OH)D, o que facilitaria o metabolismo da vitamina D em indivíduos acometidos por algum distúrbio hepático que interfira na expressão das 25-hidroxilases, bem como no metabolismo do colesterol. Em relação à expressão do VDR, apenas os animais não diabéticos que receberam suplementação com o colecalciferol exibiram aumento da mesma. Sendo assim, objetivando investigar uma possível alteração da função renal nos animais diabéticos, o presente estudo analisou as concentrações séricas de ureia e creatinina. As elevações das concentrações séricas desses parâmetros podem indicar piora da função excretora renal (PANDYA et al, 2016). O tratamento com colecalciferol não alterou os níveis desses parâmetros séricos. Entretanto, o tratamento dos animais diabéticos com insulina, sozinho ou na presença do colecalciferol, reduziu as concentrações séricas de ureia, indicando um efeito protetor renal da insulina.

As citocinas são importantes moléculas no processo de comunicação célula a célula. Embora sejam mais conhecidas pela modulação do sistema imunológico, elas também desempenham ação em processos importantes, como o reparo tecidual, a vasodilatação e a divisão celular (DINARELLO et al, 2007). O processo inflamatório durante o curso do DM é um fenômeno que tem sido estudado (ALEXANDRAKI et al, 2008). Nesse sentido, a modulação do balanço de citocinas pró e anti-inflamatórias é uma importante estratégia no curso da inflamação. No presente trabalho, o aumento das concentrações de TNFα e IL-6 no rim dos animais diabéticos em relação ao rim dos animais não diabéticos, pode indicar um quadro inflamatório nesse tecido, sendo melhorado pela suplementação de colecalciferol.

O fígado é um órgão importante no metabolismo da glicose bem como da vitamina D (DEFRONZO, 2009; HOLICK et al, 2011). No presente trabalho, os animais diabéticos apresentaram maiores concentrações de FAL, LDH e lactato em relação aos animais não diabéticos. Além disso, a suplementação com o colecalciferol dos animais diabéticos reduziu as concentrações de lactato em relação aos animais diabéticos. Como o fígado é o principal órgão que converte o colecalciferol em 25(OH)D através da ação das 25-hidroxilases, a expressão da CYP27A1, umas das isoformas dessas hidroxilases, foi avaliada. Entretanto, não foram verificadas diferenças significativas entre os grupos. O aumento da

concentração de 25(OH)D pode ser explicado por uma provável ação das outras isoformas hepáticas.

O coração é outro órgão que pode ser acometido pelas complicações do DM (DEFRONZO, 2009). Os animais diabéticos, quando comparados aos controles, presentaram menores concentrações de IL-6 e TNF-α. Além disso, a suplementação com colecalciferol aumentou as concentrações de IL-10 em relação aos demais grupos diabéticos. Uma possível explicação estaria na ação da vitamina D na produção, bem como na liberação desses mediadores químicos.

Os macrófagos são importantes células imunológicas que podem atuar na defesa contra microrganismos, bem como no curso do DM (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017) O estágio, a viabilidade e o metabolismo celular podem influenciar no desempenho dessas células durante a resposta imune. Li e colaboradores (2015) verificaram que o estímulo pelo LPS durante 24 horas reduz a viabilidade das células RAW 264.7, quando comparadas às células não estimuladas. No presente trabalho, o tratamento das células com o veículo (etanol anidro) da vitamina D não alterou a viabilidade das células estimuladas ou não pelo LPS, o que demonstra que o volume utilizado não causa toxicidade. As células estimuladas pelo LPS durante 1, 3 e 6 horas apresentaram viabilidade semelhante às células não estimuladas. Entretanto, em 12 horas, as células tratadas com colecalciferol 100 nM exibiram maior viabilidade celular quando comparadas aos demais grupos não estimulados pelo LPS. Entre os grupos estimulados pelo LPS, as células tratadas com 100 nM de colecalciferol durante 48 horas, exibiram viabilidade semelhante às células estimuladas pelo LPS apenas. Já o tratamento dos MP com 100 nM de colecalciferol, independente do estimulo pelo LPS, não alterou a viabilidade celular quando comparada aos respectivos grupos controles.

Os efeitos pleiotrópicos da vitamina D têm sido atribuídos à expressão do VDR e da CYP27B1 em diversas células (ADAMS et al., 2014). Estudos demonstram que a CYP27A1, uma das isoformas da 25-hidroxilase presente principalmente nas células hepáticas, também pode estar expressa em outras células. Entretanto, pouco se sabe sobre a regulação da mesma em macrófagos (QUINN et al., 2005). A ação da CYP27A1 sobre o colecalciferol promove a conversão em 25(OH)D que posteriormente será convertido pela CYP27B1 em

calcitriol, forma ativa da vitamina D (SAKAKI et al., 2005). Assim, a expressão dessas enzimas pelos macrófagos sugere que o calcitriol seja sintetizado de forma intracrina, podendo regular, dessa forma, as respostas inata e adaptativa (ADAMS et al., 2009). ADAMS e colaboradores (2009) demonstraram que o LPS aumenta a expressão de CYP27B1 em monócitos, em comparação às células controles. Nesse sentido, a expressão dessas enzimas foi avaliada. A expressão da CYP27A1 foi detectada em todos os grupos e o estímulo com LPS, bem como o tratamento com colecalciferol não influenciaram na mesma. Em relação à CYP27B1, não foi detectada a expressão dessa enzima nas células do grupo controle. Todos os grupos que foram estimulados pelo LPS exibiram aumento da expressão da CYP27B1 em comparação às células controle. Além disso, o tratamento com 100 nM de colecalciferol concomitante ao estímulo pelo LPS promoveu aumento da expressão da CYP27B1 em relação aos demais grupos. Assim, esses resultados podem sugerir que a CYP27A1 é expressa em condições basais, não sendo influenciada pelo estímulo de LPS e nem pelo tratamento com colecalciferol, ao contrário da CYP27B1.

A modulação da atividade das células imunológicas pode ser uma estratégia terapêutica no curso das doenças autoimunes, bem como para melhora da efetividade da resposta imune. A secreção de mediadores pró-inflamatórios, como TNF-α, IL-1β, IL-6 e NO, está envolvida diretamente com as vias de sinalização celular e pode modular as respostas inflamatórias agudas e crônicas (LEE et al., 2016).

O TNF-α, uma das primeiras citocinas a ser liberada durante um processo infeccioso, é um importante regulador da fase aguda da resposta imune, pois age estimulando a liberação de outras citocinas (IL-1β IL-6 e IL-10), bem como no recrutamento e na ativação de macrófagos (ARANGO DUQUE; DESCOTEAUX, 2014; KALLIOLIAS; IVASHKIV, 2016).

A ação da vitamina D em macrófagos e monócitos como um agente modulador da resposta imune desencadeada pelo LPS tem sido muito estudada. Zhang e colaboradores (2012) demonstraram que monócitos e macrófagos estimulados pelo LPS e tratados com 25(OH)D e 1α,25$(OH)_2D_3$ exibiram menor liberação de TNF-α e IL-6. Du e colaboradores (2009) observaram que monócitos provenientes de indivíduos com DM1, após 48h do tratamento com 100 nM de

1α,25$(OH)_2D_3$ e posterior estímulo com LPS (100ng/mL) durante 3 horas, exibiram menor liberação de IL-1β e TNF-α. No presente trabalho, as células estimuladas pelo LPS e tratadas com 100 nM de colecalciferol durante 3 horas exibiram redução nas concentrações de TNF-α,IL-1β e IL-6 quando comparados às células estimuladas pelo LPS. Após 24 horas, as células estimuladas pelo LPS e tratadas com 100 nM de colecalciferol exibiram níveis de IL-1β e IL-6, IL-10 e NO inferiores aos níveis das células estimuladas pelo LPS. Entretanto, em relação aos níveis de TNF-α, não foram observadas diferenças entre as células tratadas com 100 nM de colecalciferol e seus respectivos controles, podendo indicar que o efeito desse hormônio nas células RAW 264.7 é seletivo e dependente do tempo.

A iNOS e as MAPK estão envolvidas, respectivamente, na síntese de NO e de citocinas pró-inflamatórias (LEE et al., 2016). A inibição da ERK1/2 e da iNOS culmina na redução da liberação das citocinas e NO, respectivamente. Esses dados demonstram que o tratamento com 100 nM de colecalciferol das células RAW 264.7 estimuladas pelo LPS reduziu a expressão da ERK1/2 e da iNOS.

O colecalciferol entra na célula, onde é metabolizado pelas enzimas CYP27A1 e CYP27B1 em calcitriol, forma ativa da vitamina D. Essa molécula se liga ao VDR, formando um complexo com RXR. Este transloca até o núcleo onde interagirá com o VDRE, culminando na redução da síntese de proteínas, como as citocinas. Outro mecanismo importante na redução das citocinas é a inibição da translocação nuclear do NF-kB. A interação VDR-NF-kB não é detectável, o que sugere que a mesma seja muito fraca. Nesse sentido, o provável mecanismo é a inibição da translocação do NF-kB para o núcleo através da ligação do VDR à IKKβ (CHEN et al., 2013). Além disso, a ativação da ERK1/2 pode culminar na ativação da via das IKK (CHEN; LIN, 2001). Além disso, Jones e colaboradores (2007) demonstraram que a produção de iNOS em células RAW 264.7 pode ser induzida pela via das IKK.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Em conjunto, os resultados indicam que, em animais diabéticos, a suplementação com colecalciferol pode aumentar os níveis séricos de 25(OH)D, os níveis de Hb, hematócrito, hematimetria, IL-10 (no coração), além de reduzir o TNF-α (no rim). Além disso, o tratamento de animais diabéticos com insulina pode aumentar o peso corporal, as concentrações séricas de insulina, além de reduzir a glicemia, os níveis séricos de ureia, bem como a razão TNF-α/IL-10 (no coração). Já nas células RAW 264.7 o colecalciferol apresenta efeito anti-inflamatório.

REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

ADAMS, J.S.; RAFISON, B.; WITZEL, S.; REYES, R.E.; SHIEH, A.; CHUN, R. ZAVALA, K.; HEWISON, M.; LIU, P.T. Regulation of the extrarenal CYP27B1-hydroxylase.**J Steroid BiochemMol Biol.** v.144, p.22-7, 2014.

ADAMS, J.S.; REN, S.; LIU, P.T.; CHUN, R.F.; LAGISHETTY, V.; GOMBART, A.F.; BORREGAARD, N.; MODLIN, R.L.; HEWISON, M. Vitamin D-directed rheostatic regulation of monocyte antibacterial responses. **J Immunol.** v.182, n.7, p.4289-95, 2009.

ADEREM, A. Phagocytosis and the inflammatory response. **J Infect Dis.** v.187, s.2, s:340-45, 2003.

ADORINI, L.; PENNA, G. Control of autoimmune diseases by the vitamin D endocrine system. **Nat Clin Pract Rheumatol.** v.4, p.404-12, 2008.

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*. **Eur J Biochem.** v.224, n.2, p.335–43, 1994.

ALEXANDRAKI, K.I.; PIPERI, C.; ZIAKAS, P.D.; APOSTOLOPOULOS, N.V.; MAKRILAKIS, K.; SYRIOU, V.; DIAMANTI-KANDARAKIS, E.; KALTSAS, G.; KALOFOUTIS, A. Cytokine secretion in long-standing diabetes mellitus type 1 and 2: associations with low-grade systemic inflammation. **J Clin Immunol.** v.28,n.4, p.314-21, 2008.

ALJABRI, K.S.; BOKHARI, S.A.; KHAN, M.J. Glycemic changes after vitamin D supplementation in patients with type 1 diabetes mellitus and vitamin D deficiency. **Annals of Saudi Medicine.** v.30, n.6, p.454-58, 2010.

ALROY, I.; TOWERS, T.L.; FREEDMAN, L.P. Transcriptional repression of the interleukin-2 gene by vitamin D_3: direct inhibition of NFATp/AP-1 complex formation by a nuclear hormone receptor. **Mol Cell Biol.** v.15, p.5789–99, 1995.

ALVAREZ, J.A.; ASHRAF, A. Role of vitamin d in insulin secretion and insulin sensitivity for glucose homeostasis. **Int J Endocrinol.** v2010, p. 351385, 2010.

AMARTEY, N.A.A.; NSIAH, K.; MENSAH, F.O. Plasma Levels of Uric Acid, Urea and Creatinine in Diabetics Who Visit the Clinical Analysis Laboratory (CAn-Lab) at Kwame Nkrumah University of Science and Technology, Kumasi, Ghana. **J Clin Diagn Res.** v. 9, n.2, p.BC05-BC09, 2015.

ANGEL, P.; SZABOWSKI, A.; SCHORPP-KISTNER, M. Function and regulation of AP-1 subunits in skin physiology and pathology.**Oncogene.**v.20, n.19, p.2413–23, 2001.

ANJOS-VALOTTA, E.A.; MARTINS, J.O.; OLIVEIRA, M.A. CASOLARI, D.A.; BRITTO, L.R.; TOSTES, R.C.; FORTES, Z.B.; SANNOMIYA, P. Inhibition of tumor necrosis factor-alpha-induced intercellular adhesion molecule-1 expression in diabetic rats: role of insulin. **Inflamm Res.** v.55, n.1, p.16-22, 2006.

ANTICO, A.; TAMPOIA, M.; TOZZOLI, R.; BIZZARO, N. Can supplementation with vitamin D reduce the risk or modify the course of autoimmune diseases? A systematic review of the literature**. Autoimmun Ver**. v.12, p.127-136, 2012.

ARANGO DUQUE, G.; DESCOTEAUX, A. Macrophage Cytokines: Involvement in Immunity and Infectious Diseases. **Front Immunol.** v.5, p.491, 2014.

ARANGO DUQUE, G.; DESCOTEAUX, A. Macrophage Cytokines: Involvement in Immunity and Infectious Diseases. **Front Immunol.** v.5, n.491, 2014.

ATKINSON, M.A.; EISENBARTH, G.S.; MICHELS, A.W. Type 1 diabetes. **Lancet.** v.383, p.69–82, 2014.

AUCELLA, F.; SCALZULLI, R.P.; GATTA, G.; VIGILANTE, M.; CARELLA, A.M.; STALLONE, C. Calcitriol increases burst-forming unit-erythroid proliferation in chronic renal failure. A synergistic effect with r-HuEpo Nephron. **Clinical Practice.** v.95, n.4, p.c121–c27, 2003.

BABIKER, A.; ANDERSSON, O.; LUND, E.; XIU, R. J.; DEEB, S.; RESHEF, A.; LEITERSDORF, E.; DICZFALUSY, U.; BJORKHEM, I. Elimination of cholesterol in macrophages and endothelial cells by the sterol 27-hydroxylase mechanism. Comparison with high density lipoprotein-mediated reverse cholesterol transport. **J Biol Chem.** v.272**,** p.26253-61, 1997.

BANTING, F.; BEST, C. The internal secretion of the pancreas. **J. Lab. Clin. Med.** v.7, 251-66, 1922.

BECKMAN, M.J.; TADIKONDA, P.; WERNER, E.; PRAHL, J.; YAMADA, S.; DELUCA, H.F. Human 25-hydroxyvitamin D_3-24-hydroxylase, a multicatalytic enzyme. **Biochemistry.** v.35, n.25, p.8465–72, 1996.

BELLA, L.M., FIERI, I., TESSARO, F.H.G., NOLASCO, E.L., NUNES, F.P.B., FERREIRA, S.S., AZEVEDO, C.B.; MARTINS, J.O. Vitamin D Modulates Hematological Parameters and Cell Migration into Peritoneal and Pulmonary Cavities in Alloxan-Diabetic Mice. **BioMed Res Int.** v.7651815, 2017.

BERGHAUS, L.J.; MOORE, J.N.; HURLEY, D.J.; VANDENPLAS, M.L.; FORTES, B.P.; WOLFERT, M.A.; BOONS, G.-J. Innate immune responses of primary murine macrophage-lineage cells and RAW 264.7 cells to ligands of Toll-like receptors 2, 3, and 4. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**. v.33, n.5, p.443–54, 2010.

BERNARDI, M.; RICCI, C.S.; ZACCHERINI, G. Role of Human Albumin in the Management of Complications of Liver Cirrhosis. **J Clin Experimen Hepatol.** v.4, n.4, p.302-11, 2014.

BERRIDGE, M.J. Vitamin D deficiency and diabetes. **Biochem J.** v. 474, n.8, p.1321-32, 2017.

BIKLE, D.D. Vitamin D metabolism, mechanism of action, and clinical applications. **Chem Biol.** v.21, p.319–29, 2014.

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. **J Clin Endocrinol Metab.** v.63, p.954-59, 1986.

BIZZARO, G.; ANTICO. A.; FORTUNATO, A.; BIZZARO, N. Vitamin D and Autoimmune Diseases: Is Vitamin D Receptor (VDR) Polymorphism the Culprit? **Isr Med Assoc J.** v.19, n.7, p.438-43, 2017.

BIZZARRI, C.; PITOCCO, D.; NAPOLI, N.; DI STASIO, E.; MAGGI, D.; MANFRINI, S. No protective effect of calcitriol on beta-cell function in recent-onset type 1 diabetes: the IMDIAB XIII trial. **Diabetes Care***.* v.33, n.9, p.1962–3, 2010.

BOUILLON, R.; CARMELIET, G.; VERLINDEN, L.; VAN ETTEN, E.; VERSTUYF, A.; LUDERER, H.F.; LIEBEN, L.; MATHIEU, C.; DEMAY, M. Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. **Endocr Rev.** v.29, n.6, p.726-76, 2008.

CALLE, C.; MAESTRO, B.; GARCIA-ARENCIBIA, M. Genomic actions of 1,25-dihydroxyvitamin D_3 on insulin receptor gene expression, insulin receptor number and insulin activity in the kidney, liver and adipose tissue of streptozotocin-induced diabetic rats. **B MC Molecular Biology**, London, v. 9, n. 65, 2008.

CARNOT, P.; DEFLANDRE, C. Sur l'activite hemopoietique de serum au cours de la regeneration du sang. **C R Acad Sci.** v.143, p.384-86, 1906.

CASTRO, L.G.C. O sistema endocrinológico da vitamina D. **Arq Bras Endocrinol Metab**. v.55, n.8, p. 566-75, 2011.

CHAMBERLAIN, J.J.; RHINEHART, A.S.; SHAEFER, C.F JR.; NEUMAN, A. Diagnosis and Management of Diabetes: Synopsis of the 2016 American Diabetes Association Standards of Medical Care in Diabetes.**Ann Intern Med.** v.164, n.8, p.542-52, 2016.

CHAN, E.D.; RICHES, D.W. IFN-gamma + LPS induction of iNOS is modulated by ERK, JNK/SAPK, and p38(mapk) in a mouse macrophage cell line. **Am J Physiol Cell Physiol.** v.280, n.3, p. C441-50, 2001.

CHANG, J,M.;KUO, M.C.; KUO, H.T.; HWANG, S.J.; TSAI, J.C.; CHEN, H,C.; LAI, Y.H. 1-alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 regulates inducible nitric oxide synthase messenger RNA expression and nitric oxide release in macrophage-like RAW 264.7 cells.**J Lab Clin Med.** v.143, n.1, .p14-22, 2004.

CHEN, B.C.; LIN, W.W. PKC- and ERK-dependent activation of I kappa B kinase by lipopolysaccharide in macrophages: enhancement by P2Y receptor-mediated CaMK activation.**Br J Pharmacol.** v.134, n.5, p.1055-65, 2001.

CHEN, T.C.; LU, Z.; HOLICK M.F. Photobiology of vitamin D. In: Holick MF, editor. Vitamin D physiology, molecular biology, and clinical applications, **2nd edition. New York: Springer.** p.35-60, 2010.

CHEN, Y.; ZHANG, J.; GE, X.; DU, J.; DEB, D.K.; LI, Y.C. Vitamin D Receptor Inhibits Nuclear Factor κB Activation by Interacting with IκB Kinase β Protein. **J Biol Chem.** v.288, n.27, p.19450-58, 2013.

CHIRUMBOLO, S.; BJØRKLUND, G.; SBOARINA, A.; VELLA, A. The Role of Vitamin D in the Immune System as a Pro-survival Molecule. **Clin Ther.** v.39, n.5, 894-916, 2017.

CHIU, K.C.; CHU, A.; GO, V.L.; SAAD, M.F. Hypovitaminosis D is associated with insulin resistance and beta cell dysfunction. **Am J Clin Nutr.** v.79; p.820–5, 2004.

CHRISTAKOS, S.; DHAWAN, P.; VERSTUYF, A.; VERLINDEN, L.; CARMELIET, G. VITAMIN D: metabolism, molecular mechanism of action, and pleiotropic effects**. Physiol Rev.** v**.**96, n.1, p.365-408, 2016.

CHRISTOFFERSSON, G.; RODRIGUEZ-CALVO, T.; VON HERRATH, M. RECENT ADVANCES IN UNDERSTANDING TYPE 1 DIABETES. **F1000 RESEARCH,** V.5, 2016.

COLAK, S.; GEYIKOGLU, F.; ASLNA, A.; DENIZ, G.Y. Effects of lichen extracts on haematological parameters of rats with experimental insulin-dependent diabetes mellitus.**ToxicolInd Health.**v.30, n;10, p.878-87,2014.

COMITÊ INTERNACIONAL DE ESPECIALISTAS. Internacional expert committee report on the role of the A1c assay in the diagnosis of diabetes. **Diabetes Care.** v.32, n.7, p.1327-34, 2009.

COPENHAVER, M.; HOFFMAN, R.P. Type 1 diabetes: where are we in 2017? **Translational Pediatrics.** v.6, n.4, p.359-64, 2017.

DAME, C.; BARTMANN, P.; WOLBER, E.; FAHNENSTICH, H.; HOFMANN, D.; FANDREY, J. Erythropoietin Gene Expression In Different Areas Of The Developing Human Central Nervous System**. Brain Res Dev Brain Res.** V.125, P. 69–74, 2000.

DANKERS, W.; COLIN, E.M.; VAN HAMBURG, J.P.; LUBBERTS, E. VITAMIN D IN Autoimmunity: molecular mechanisms and therapeutic potential. **Frontiers in immunology.** V.7, N.697, P.1-26, 2017.

DEFRONZO, R.A. From the triumvirate to the ominous octet: a new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. **Diabetes.** v.58, p773-95, 2009.

DELAMAIRE, M.; MAUGENDRE, D.; MORENO, M.; LE GOFF, M.C.; ALLANNIC, H.; GENETET, B. Impaired leucocyte functions in diabetic patients. **Diabet Med.** v.14, n.1, p. 29-34, 1997.

DIAB, R.A.; FARES, M.; ABEDI-VALUGERDI, M.; KUMAGAI-BRAESCH, M.; HOLGERSSON, J.; HASSAN, M. Immunotoxicological effects of streptozotocin and alloxan: in vitro and in vivo studies. **Immunol Lett.** v.163, n.2, p.193-8, 2015.

DIABETES. **Actas Bioq**. v.8: p.65-78, 2007.

DIAZ-VALENCIA, P.A.; BOUGNÈRES, P.; VALLERON, A.J. Global epidemiology of type 1 diabetes in young adults and adults: a systematic review. **BMC Public Health.** v.255, p.1-15, 2015.

DINARELLO, C.A. Historical Review of Cytokines. **Eur J Immunol.** v.37, s.1, p.S34-S45, 2007.

DONG, H.; WOO, S.L. Hepatic insulin production for type 1 diabetes. **Trends Endocrinol Metab.** v.12, n.10, p.441-6, 2001.

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.4620-29, 2011.

DU, T.; ZHOU, Z.G.; YOU, S.; LIN, J.; YANG, L.; ZHOU, W.D.; HUANG, G.; CHAO, C. Regulationby1, 25-dihydroxy-vitamin D_3onalteredTLRs expression and response to ligands of monocyte from autoimmune diabetes. **ClinChim Acta.** v.402, n.1-2, p.133-8, 2009.

DUNN JS, SHEEHAN HL, MCLETHIE NGB: Necrosis of islets of Langerhans produced experimentally. **Lancet.** v.1, p.484-87, 1943.

DUSSE, L.M.S.; VIEIRA, L.M; CARVALHO, M.G. Revisão sobre óxido nítrico. **J Bras Patol Med Lab.** v.39, n.4, p.343-50, 2003.

EHLERS, M.R. Strategies for clinical trials in type 1 diabetes. **J Autoimmun.** v.71, p.88-96, 2016.

FRANZÉN, S.; FRIEDERICH-PERSSON, M.; FASCHING, A.; HANSELL, P.; NANGAKU, M.; PALM, F. Differences in susceptibility to develop parameters of diabetic nephropathy in four mouse strains with type 1 diabetes. **Am J Physiol Renal Physiol.** v.306, n.10, p.F1171-78, 2014.

GABBAY, M.L.; SATO, M.N.; FINAZZO, C.; DUARTE, A.S.; DIB, S.A. Effect of Cholecalciferol as Adjunctive Therapy with Insulin on Protective Immunologic Profile and Decline of Residual β-Cell Function in New-Onset Type 1 Diabetes Mellitus. **Arch Pediatr Adolesc Med.** v.166, n.7, p.601-7, 2012.

GAULTON, G.N.; SCHWARTZ, J.L.; EARDLEY, D.D. Assessment of diabetogenic drugs alloxan and streptozotocin as model for the study of immune defects in diabetic mic.**Diabetologia.**v.28, p.769-75, 1985.

GEORGE, P.; MCCRIMMON, R.J. Potential role of non-insulin adjunct therapy in Type 1 diabetes. **Diabet Med.** v.30, n.2, p.179-88, 2013.

GONÇALVES, J.G.; DE BRAGANÇA, A.C.; CANALE, D.; SHIMIZU, M.H.; SANCHES, T.R.; MOYSÉS, R.M.; ANDRADE, L.; SEGURO, A.C.; VOLPINI, R.A. Vitamin D deficiency aggravates chronic kidney disease progression after ischemic acute kidney injury. **PLoS One.** v.15, n.9, :e107228, 2014.

GORDON, S.; TAYLOR, P.R. Monocyte and macrophage heterogeneity. **Nat Rev Immunol.** v.5, p.953–64, 2005.

GOWDA, S.; DESAI, P.B.; HULL, V.V.; MATH, A.A.K.; VERNEKAR, S.N.; KULKARNI, S.S. A review on laboratory liver function tests. **Pan Afr med j.**;v.3, n.17, 2009.

GOWDA, S.; DESAI, P.B.; KULKARNI, S.S.; HULL, V.V.; MATH, A.A.K.; VERNEKAR, S.N. Markers of renal function tests. **N Am J Med Sci.** v.2, n.4, p.170-73, 2010.

GUPTA, R.P.; HOLLIS, B.W.; PATEL, S.B.; PATRICK, K.S.; BEL, L.N.H. CYP3A4 is human microsomal vitamin D 25-hydroxylase. **J Bone Miner Res.** v.19, p.680-88, 2004.

GRANGER, D.L.; TAINTOR R.R.; BOOCKVAR, K.S.; HIBBS, J.B. JR. Measurement of nitrate and nitrite in biological samples using nitrate reductase and Griess reaction.**Methods Enzymol.**v.268, p.142-51, 1996.

HARANT, H.; ANDREW, P.J.; REDDY-, G.S.; FOGLAR, E.; LINDLEY, I.J. 1,25-dihydroxyvitamin D_3 and a variety of its natural metabolites transcriptionally repress nuclear-factor-B-mediated interleukin-8 gene expression. **Eur J Biochem.** v.250, p.63–71, 1997.

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 J Endocrinol Metab.**v.16, n.6, p.904–09, 2012.

HOLICK, M.F. MCCOLLUM AWARD LECTURE, 1994: VITAMIN D--NEW HORIZONS FOR THE 21ST CENTURY. **Am J Clin Nutr.** v.60, p.619–30, 1994.

HOLICK, M.F. Vitamin d: a D-lightful health perspective. **Nutrition Reviews.** V.66, S182-194, 2008.

HOLICK, M.F.; BINKLEY, N.C.; BISCHOFF-FERRARI, H.A.; GORDON, C.M.; HANLEY, D.A. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. **J Clin Endocrinol Metab.** v.96, s.7, p.1911-30, 2011.

HOLLIS, BW. Comparison of equilibrium and disequilibrium assay conditions for ergocalciferol, cholecalciferol and their major metabolites. **J Steroid Biochem.** v. 21, n.1, p.81-6, 1984.

HOUGHTON, L.A.; VIETH, R. The case against ergocalciferol (vitamin D_2) as a vitamin supplement. **Am Clin Nutr.** v.84, n. 4694-7, 2006.

HU, M.C.; SHIIZAKI, K.; KURO-O, M.; MOE, O.W. Fibroblast growth factor 23 and Klotho: physiology and pathophysiology of an endocrine network of mineral metabolism. Annu Rev Physiol. v.75, p.503–33, 2013.

HUO, L.; HARDING, J.L.; PEETERS, A.; SHAW, J.E.; MAGLIANO, D.J. Life expectancy of type 1 diabetic patients during 1997-2010: a national Australian registry-based cohort study. **Diabetologia.** v.59, n.6, p.1177-85, 2016.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. Diabetes: Facts and Figures, IDF, 2017. Disponível em: https://www.idf.org/e-library/epidemiology-research/diabetes-atlas/134-idf-diabetes-atlas-8th-edition.html. Acesso em: 07 de fevereiro de 2018.

JACOB, A.N.; SALINAS, K.; ADAMS-HUET, B.; RASKIN, P. Potential causes of weight gain in type 1 diabetes mellitus. **Diabetes Obes Metab.** v.8, n.4, p.404-11, 2006.

JACOBSEN, R.; LORENZEN, J.K.; TOUBRO, S.; KROG-MIKKELSEN, I.; ASTRUP, A. Effect of short0-term high dietary calcium intake on, 24h energy expenditure, fat oxidation, and fecal fat excretion.**Int J Obes.** v.29.; n.3; p.292-301, 2005.

JELKMANN W. Regulation of erythropoietin production. **The Journal of Physiology.** v. 589, n.6, p.1251–58, 2011.

JELKMANN, W. Erythropoietin. **Front Horm Res.** v.47, p.115-27, 2016.

JONES, E.; ADCOCK, I.M.; AHMED, B.Y.; PUNCHARD, N.A. Modulation of LPS stimulated NF-kappaB mediated Nitric Oxide production by PKCε and JAK2 in RAW macrophages.**J Inflamm.** v. 4, n.23, p.1-9, 2007.

JOO, T.; SOWNDHARARAJAN, K.; HONG, S.; LEE, J.; PARK, S.Y.; KIM, S.; JHOO, J.W. Inhibitionof nitric oxide productionin LPS-stimulated RAW 264.7 cellsbystembarkof *Ulmuspumila L.* **Saudi J BiolSci.** v.21, n.5, p;427-35, 2014.

KALLIOLIAS, G. D.; IVASHKIV, L. B. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies.**Nat Rev Rheumatol.** v. 12, p. 49-62, 2016.

KATSAROU, A.; GUDBJÖRNSDOTTIR, S.; RAWSHANI, A.; DABELEA, D.; BONIFACIO, E.; ANDERSON, B.J.; JACOBSEN, L.M.; SCHATZ, D.A.; LERNMARK, Å. Type 1 diabetes mellitus. **Nat Rev Dis Primers.** v.3, n.17016, p.1-17, 2017.

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-hidroxivitamin D_3 inhibits proliferation but not the suppressive function of regulatory T cells in the absence of antigen-presenting cells. **Immunology.** v.134, p.459-68, 2011.

KOSTOGLOU-ATHANASSIOU, I.; ATHANASSIOU, P.; GKOUNTOUVAS, A.; KALDRYMIDES, P. Vitamin D and glycemic control in diabetes mellitus type 2. **Ther Adv in Endocrinol Metab.** v.4, n.4, p.122-28, 2013.

KOTOH, K.; ENJOJI, M.; KATO, M.; KOHJIMA, M.; NAKAMUTA, M.; TAKAYANAGI, R. A new parameter using serum lactate dehydrogenase and alanine aminotransferase level is useful for predicting the prognosis of patients at an early stage of acute liver injury: A retrospective study. **Comp Hepatol.** v.7, n.6, 2008.

KOZICZAK-HOLBRO, M.; GLUCK, A.; TSCHOPP, C.; MATHISON, J.C.; GRAM, H IRAK-4 kinase activity-dependent and -independent regulation of lipopolysaccharide-inducible genes. **Eur J Immunol.** v.38, p.788–96, 2008.

KRISHNA, C.S.M.; SRIKANTA, S. Type 1 diabetes pathogenesis – Prevention? **Indian J EndocrinolMetab.** v.19, p.58–63, 2015.

KUNDU, R.; CHAIN, B.M.; COUSSENS, A.K.; KHOO, B.; NOURSADEGHI, M. Regulation of CYP27B1 and CYP24A1 hydroxylases limits cell-autonomous activation of vitamin D in dendritic cells. **Eur J Immunol.** v.44, n.6, p.1781-90 2014.

LACOMBE, C.; MAYEUX, P. The molecular biology of erythropoietin. **Nephrol Dial Transplant.** v.14, n.2, p. 22-28, 1999.

LANG, P.O.; ASPINALL, R. Vitamin D Status and the Host Resistance to Infections: What It Is Currently (Not) Understood. **Clin Ther.** v.39, n.5, p.930-45, 2017.

LEE, S.H. KWAK, C.H. LEE, S.K. HA, S.H. PARK, J. CHUNG, T.W. HA, K.T. SUH, S.J. CHANG, Y.C. CHANG, H,W. LEE, Y.C. KANG, B.S. MAGAE, J. KIM, C.H. Anti-Inflammatory Effect of Ascochlorin in LPS-Stimulated RAW 264.7 Macrophage Cells Is Accompanied With the Down-Regulation of iNOS, COX-2 and Proinflammatory Cytokines Through NF-κB, ERK1/2, and p38 Signaling Pathway.**J Cell Biochem.** v.117, n.4, p.978-87, 2016.

LENZEN, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes.**Diabetologia.**v.51, n.2, p.216-26, 2008.

LEON, C.G.; TORY, R.; JIA, J.; SIVAK, O. WASAN, K.M. Discovery and development of toll-like receptor (TLR4) antagonists: a new paradigm for treating sepsis and other disease. **Pharm Res,** v.25, p. 1751-61, 2008.

LI, C.; EOM, T.; JEONG, Y. Glycyrrhizaglabra L. Extract Inhibits LPS-Induced Inflammation in RAW Macrophages.**J NutrSciVitaminol.**v.61, n.5, p.375-81, 2015.

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. **J Steroid BiochemMol Biol.** v.112, p.122-6, 2008.

LI, W.; HUANG, H.; ZHANG, Y.; FAN, T.; LIU, X.; XING, W.; NIU, X.Anti-inflammatory effect of tetrahydrocoptisinefrom Corydalis impatiensis a function of possible inhibition of TNF-α, IL-6 and NO production inlipopolysaccharide-stimulated peritoneal macrophages through inhibiting NFκB activation and MAPK pathway. **Eur J Pharmacol.**v.5, n.715, n.1-3, p. 62-71, 2013.

LIPPI, G.; TARGHER, G. Glycated hemoglobin (HbA1c): old dogmas, a new perspective? **Clin Chem Lab Med.** v.48, n.5, p.609-14, 2010.

LOMBARDO, E.; ALVAREZ-BARRIENTOS, A.; MAROTO, B.; BOSCA, L.; KNAUS, U. G. TLR4-Mediated Survival of Macrophages Is MyD88Dependent and Requires TNF-alpha Autocrine Signalling. **J Immunol**, v.178, p. 3731–39, 2007.

LU, Y.C.; YEH, W.C.; OHASHI, P.S. LPS/TLR4 signal transduction pathway. **Cytokine.** v.42, p.145–51, 2008.

MATHIEU, C.; GILLARD, P.; BENHALIMA, K. Insulin analogues in type 1 diabetes mellitus: getting better all the time. **Nat Rev Endocrinol.** v.13, n.7, p.385-99, 2017.

MATHIEU, C.; WAER, M.; LAUREYS, J.; RUTGEERTS, O.; BOUILLON, R. Prevention of autoimmune diabetes in NOD mice by 1,25 dihydroxyvitamin D_3. **Diabetologia.**v.37, p.552-58, 1994.

MATOUGH, F.; BUDIN, S.; HAMID, Z.; LOUIS, S.; ALWAHAIBI, N.; MOHAMED, J. Palm vitamin E reduces oxidative stress, and physical and morphological alterations of erythrocyte membranes in streptozotocin-induced diabetic rats. **Oxid Antioxid Med Sci.** v.1, n.1, p.59–68, 2012.

MEDZHITOV, R.; PRESTON-HURLBURT, P.; JANEWAY, C.A.JR. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity.**Nature.**v.388, p.394–397, 1997.

MAIESE, K. Erythropoietin and diabetes mellitus. **World J Diabetes.** v.6, n.14, p.1259-73, 2015.

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. **Obes Res.** v.13, n.12, p.2102-12, 2005.

MOLINA, D.K.; DIMAIO, V.J. Normal organ weights in men: part II-the brain, lungs, liver, spleen, and kidneys. **Am J Forensic Med Pathol.** v.33, n.4, p.368-72, 2012.

MOSSER, D.M. EDWARDS, J.P. Exploring the full spectrum of macrophage activation.**Nat Rev Immunol.**v.8, n.12, p958-68, 2008.

NAGPAL, S.; NA, S.; RATHNACHALAM, R. Noncalcemic actions of vitamin D receptor ligands. **Endocr. Rev.** v.26, p.662–87, 2005.

NARVAEZ, C.J.; MATTHEEWA, D.; BROUN, E.; CHAN, M.; WELSH, J. Lean phenotype and resistence to diet-induced obesity in vitamin D receptor knocknout mice correlates with induction of uncoupling protein-1 in white adipose tissue. **Endocrinol.** v.150, p.651-61, 2009.

NDISANG, J.F.; VANNACCI, A.; RASTOGI, S. Insulin Resistance, Type 1 and Type 2 Diabetes, and Related Complications 2017. **J Diabetes Res.** 2017.

NEGRI, A. L. Proximal tubule endocytic apparatus as the specific renal uptake mechanism for vitamin D-binding protein/25-(OH)D_3 complex. **Nephrology.** v.11, p.510–15, 2006.

NICOLAU, J.; NOGUEIRA, F.N.; SIMOES, A. Diabetes: noções gerais para o Cirurgião-Dentista. **Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent.** v.69, n.3, p. 260-65, 2015.

NORMAN, A.W.; FRANKEL, J.B.; HELDT, A.M.; GRODSKY, G.M. Vitamin D deficiency inhibits pancreatic secretion of insulin. **Science.** v.209, P.823–5, 1980.

NORVAL, M.; BJÖRN, L.O.; DE GRUIJL, F.R. Is the action spectrum for the UV-induced production of previtamin D_3 in human skin correct? **Photochem Photobiol Sci.** v. 9, n.1, p.11-7, 2009.

OCHS-BALCOM, H.M.; CHENNAIMANENI, R.; MILLEN, A.E.; SHIELDS, P.G.; MARIAN, C. TREVISAN, M. FREUDENHEM, J.L. Vitamin D receptor gene polymorphism are associated with adiposity phenotypes. **Am J Clin Nut.** v.3, p.5-10, 2011.

OKUDA, S.; SHERMAN, D.J.; SILHAVY, T.J.; RUIZ, N.; KAHNE, D. Lipopolysaccharide transport and assembly at the outer membrane: the PEZ model.**Nat Rev Microbiol.**v.14, n.6, p.337-45, 2016.

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 [Smallanthussonchifolius (Popp.&Endl.)] tretment. **Food Chem Toxicol.** v.59, p.256-60, 2013.

PÅLSSON-MCDERMOTT, E.M.; O'NEILL, L.A. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4.**Immunology.**v.113, n.2, p.153-62, 2004.

PANDYA, D.; NAGRAJAPPA, A.K.; RAVI, K. Assessment and Correlation of Urea and Creatinine Levels in Saliva and Serum of Patients with Chronic Kidney Disease, Diabetes and Hypertension– A Research Study. **J Clin Diagn Res.** v.10, n.10, p. ZC58-62, 2016.

PARCHWANI, D.N.; UPADHYAH, A.A. Diabetic nephropathy: Progression and pathophysiology. **Int J MedSciPublic Health.** v.1, n.2, p.59-70, 2012.

PARRILLO, JE. Pathogenetic mechanisms of septic shock. **N Engl J Med.** v.328, p.1471–77, 1993.

PEREIRA, F.; ALMEIDA, M.D.V. Vitamina D: uma verdadeira hormona. **Nutrícias.** v.8, p.42-7, 2008.

PHILLIPS, K.M.; HORST, R.L.; KOSZEWSKI, N.J.; SIMON, R.R. VITAMIN D_4 IN MUSHROOMS. **PLOS ONE.** V.7, P.8, 2012.

POLTORAK, A.; HE, X.; SMIRNOVA, I.; LIU, M.Y.; VAN HUFFEL, C.; DU, X.; BIRDWELL, D.; ALEJOS, E.; SILVA, M.; GALANOS, C.; FREUDENBERG, M.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P.; LAYTON, B.; BEUTLER, B. Defective LPS signaling in C3H/HEJ and C57BL/10SCCR mice: mutations in TLR4 gene. **Science.** v.282, p.2085–8, 1998.

QUINN, C.M.;JESSUP, W.; WONG, J.; KRITHARIDES, L.; BROWN, A.J. Expression and regulation of sterol 27-hydroxylase (CYP27A1) in human macrophages: a role for RXR and PPAR gamma ligands.**Biochem J.** v.385, n.3, p.823-30, 2005.

RAETZ, C.R.; WHITFIELD, C. Lipopolysaccharide endotoxins. **Annu. Rev. Biochem.** v.71, p.635–700, 2002.

ROCHEL N, WURTZ JM, MITSCHLER A, KLAHOLZ B, MORAS D. The crystal structure of the nuclear receptor for Vitamin D bound to its natural ligand. **Mol Cell.** v.5, p.173–79, 2000.

ROWLING, M.J.; KEMMIS, C.M.; TAFFANY, D.A.; WELSH, J. Megalin-Mediated Endocytosis of Vitamin D Binding Protein Correlates with 25-Hydroxycholecalciferol Actions in Human Mammary Cells. **The Journal of nutrition.** v.136, n.11, p.2754-59, 2006.

RYLE, A.P.; SANGER, F.; SMITH, L.F.; KITAI, R. The disulphide bonds of insulin. **Biochem. J.** v.60, 541–56 1955.

SACKS, D.B. Correlation between Hemoglobin A1c (HbA1c) and Average Blood Glucose: Can HbA1c Be Reported as Estimated Blood Glucose Concentration? **J Diabetes Sci Technol.** v.1, n.6, p.801-803, 2007.

SAHAY, M.; KALRA, S.; BANDGAR, T. Renal endocrinology: The new frontier. **Indian J Endocrinol Metab.** v.16, n.2, p.154-55, 2012.

SAKAKI, T.; KAGAWA, N.; YAMAMOTO, K.; INOUYE, K. Metabolism of vitamin D_3 by cytochromes P450. **Front Biosci.**v.10, p.119-34, 2005.

SAKAKI, T.; SAWADA, N.; KOMAI, K.; SHIOZAWA, S.; YAMADA, S.; YAMAMOTO, K.; OHYAMA, Y.; INOUYE, K. Dual metabolic pathway of 25-hydroxyvitamin D3 catalyzed by human CYP24. **Eur J Biochem.** v. 267, n.20, p.6158-65, 2000.

SAMPANIS, C. Management of Hyperglycemia in Patients with Diabetes Mellitus and Chronic Renal Failure. **Hippokratia.** v.12, n.1, p.22–7, 2008.

SANCHEZ-NIÑO, M.D.; BOZIC, M.; CÓRDOBA-LANÚS, E.; VALCHEVA, P.; GRACIA, O.; IBARZ, M.; FERNANDEZ, E.; NAVARRO-GONZALEZ, J.F.; ORTIZ, A.; VALDIVIELSO, J.M. Beyond proteinuria: VDR activation reduces renal inflammation in experimental diabetic nephropathy. **Am J Physiol Renal Physiol.** v.302, n.6, p.F647-57, 2012.

SAWADA, N.; SAKAKI, T.; KITANAKA, S.; KATO, S.; INOUYE, K. Structure-function analysis of CYP27B1 and CYP27A1. Studies on mutants from patients with vitamin D-dependent rickets type I (VDDR-I) and cerebrotendinous xanthomatosis (CTX). **Eur J Biochem.** v.268, n.24, p.6607-15, 2001.

SCHUMANN, R.R.; LEONG, S.R.; FLAGGS, G.W.; GRAY, P.W.; WRIGHT, S.D.; MATHISON, J.C.; TOBIAS, P.S.; ULEVITCH, R.J. Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. **Science.**v.249, p.1429–31, 1990.

SCHWAN, W.R.; HUANG, X.Z.; HU, L.; KOPECKO, D.J. Differential Bacterial Survival, Replication, and Apoptosis-Inducing Ability of*Salmonella*Serovars within Human and Murine Macrophages.**Infect Immun.** v.68, n.3, p.1005–13, 2000.

SHABANPOOR, F.; SEPAROVIC, F.; WADE, J.D. The human insulin superfamily of polypeptide hormones. **Vitam Horm.** v.80, p.1-31, 2009.

SHARMA, U.; PAL, D.; PRASAD, R. Alkaline Phosphatase: An Overview. **Indian J Clin Biochem.** v.29, n.3, 269-78, 2014.

SHI, H.; KOKOEVA, M.V.; INOUYE, K.; TZAMELI, I.; YIN, H.; FLIER, J.S.; TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance.**J Clin Invest**. v.116, p.3015–25, 2006.

SHI, Q.; CHENG, L.; LIU, Z.; HU, K.; RAN, J.; DI GE, D.; FU, J. The p38 MAPK inhibitor SB203580 differentially modulates LPS-induced interleukin 6 expression in macrophages. **Cent Eur J Immunol.**v.40, n.3, p.276–82, 2015.

SIM, J.J.; LAC, P.T.; LIU, I.A.; MEGUERDITCHIAN, S.O.; KUMAR, V.A.; KUJUBU, D.A.; RASGON, S.A. Vitamin D deficiency and anemia: a cross-sectional study. **Ann of Hematol.** v.89, n.5, p.447–52, 2010.

SINGH, D.K.; WINOCOUR, P.; SUMMERHAYES, B.; VILJOEN, A.; SIVAKUMAR, G.; FARRINGTON, K. Are low erythropoietin and 1,25-dihydroxyvitamin D levels indicative of tubulo-interstitial dysfunction in diabetes without persistent microalbuminuria? **Diabetes Res Clin Pract.** v.85, n.3, p.258-64, 2009.

SLOMINSKI, A.T.; BROŻYNA, A.A.; ZMIJEWSKI, M.A.; JÓŹWICKI, W.; JETTEN, A.M.; MASON, R.S.; TUCKEY, R.C.; ELMETS, C.A. Vitamin D signaling and melanoma: role of vitamin D and its receptors in melanoma progression and management. **Lab Invest.** v.97, n.6, p.706-24, 2017.

SOCIEDADE AMERICANA DO DIABETES. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care.** v.40, s.1, p.s11-s24, 2017.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes. São Paulo, SP, 2017.

SOUDI, S.; ZAVARAN-HOSSEINI, A.; HASSAN, Z.M.; SOLEIMANI, M.; ADEGANI F.J. HASHEMI, S.M. Comparative Study of The Effect of LPS on The Function of BALB/c and C57BL/6 Peritoneal Macrophages. **Cell J.** v.15, n.1, p.45-54, 2013.

SOUZA, C.F.; GROSS, J.L.; GERCHMAN, F.; LEITÃO, C.B. Pré-diabetes: diagnóstico, avaliação de complicações crônicas e tratamento. **Arq Bras Endocrinol Metab.** v. 56, n.5, p. 275-84, 2012.

SPEECKAERT, M.M.; SPEECKAERT, R.; VAN GEEL, N.; DELANGHE, J.R. Vitamin D binding protein: a multifunctional protein of clinical importance. **Adv Clin Chem.** v.63, p.1-57, 2014.

SPIEGEL DM, BRADY K. Calcium balance in normal individuals and in patients with chronic kidney disease on low and high calcium diets. **Kidney int.** 2012 v.81, n.11, p.1116-22, 2016.

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.1584-91, 2012.

SZKUDELSKI, T.; The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas. **Physiol Res.** v.50, p.536-46, 2001.

TAKEUCHI, A.; REDDY, G.S.; KOBAYASHI, T.; OKANO, T.; PARK, J.; SHARMA, S. Nuclear factor of activated T cells (NFAT) as a molecular target for 1,25-dihydroxyvitamin D3-mediated effects. **J Immunol**. v.160, p.209-18, 1998.

TAKIISHI, T.; DING, L.; BAEKE, F.; SPAGNUOLO, I.; SEBASTIANI, G.; LAUREYS, J.; VERSTUYF, A.; CARMELIET, G.; DOTTA, F.; VAN BELLE, T.L.; GYSEMANS, C.A.; MATHIEU, C. Dietary supplementation with high doses of regular vitamin D_3 safely reduces diabetes incidence in NOD mice when given early and long term. **Diabetes.** v.63, n.6, p.2026–36, 2014.

TESSARO, F.H.G.; AYALA, T.S.; NOLASCO, E.L.; BELLA, L.M.; MARTINS, J.O. Insulin Influences LPS-Induced TNF-α and IL-6 Release Through Distinct Pathways in Mouse Macrophages from Different Compartments. **Cell Physiol Biochem.** v.42, n.5, p2093-104, 2017.

THOMAS, M.C.; MACISAAC, R.J.; TSALAMANDRIS, C.; MOLYNEAUX, L.; GOUBINA, I.; FULCHER, G.; YUE, D.; JERUMS, G.**J ClinEndocrinolMetab.** Anemia in patients with type 1 diabetes.v.89, n.9, p.4359-63, 2004.

TIITTANEN, M.; HUUPPONEN, J.T.; KNIP, M.; VAARALA, O. Insulin treatment in patients with type 1 diabetes induces upregulation of regulatory T-cell markers in peripheral blood mononuclear cells stimulated with insulin in vitro. **Diabetes.**v.55, n.12, p.3446-54, 2006.

VELDURTHY, V.; WEI, R.; OZ, L.; DHAWAN, P.; JEON, Y.H.; CHRISTAKOS, S. Vitamin D, calcium homeostasis and aging. **Bone Research.** v.4, p16041, 2016.

WALTER, M.; KAUPPER, T.; ADLER, K.; FOERSCH, J.; BONIFACIO, E.; ZIEGLER, A.G. No effect of the 1alpha,25-dihydroxyvitamin D_3 on beta-cell residual function and insulin requirement in adults with new-onset type 1 diabetes. **Diabetes Care*,*** v.33, n.7, p.1443–8, 2012.

WANG, Y.; HE, D.; NI, C.; ZHOU, H.; WU, S.; XUE, Z.; ZHOU, Z. Vitamin D induces autophagy of pancreatic β-cells and enhances insulin secretion. **Mol Med Rep.** v.14, n.3, p.2644-50, 2016.

WEISS, M.; STEINER, D.F.; PHILIPSON, L.H. Insulin Biosynthesis, Secretion, Structure, and Structure-Activity Relationships. [Updated 2014 Feb 1]. In: De Groot LJ, Chrousos G, Dungan K, et al., editors. Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000-. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279029/

WU, J.; YAN, L-J.Streptozotocin-induced type 1 diabetes in rodents as a model for studying mitochondrial mechanisms of diabetic β cell glucotoxicity. **Diabetes Metab Syndr Obes**. v.8, p.181-88, 2015.

YOUN, C.K.; PARK, S.J.; LEE, M.Y.; CHA, M.J.; KIM, O.H.; YOU, H.J.; CHANG, I.Y.; YOON, S.P.;JEON. Y.J. Silibinin Inhibits LPS-Induced Macrophage Activation by Blocking p38 MAPK in RAW 264.7 Cells. **BiomolTher (Seoul).**v.21, n.4, p.258–63, 2013.

YOUSEFZADEH, P.; SHAPSES, S.A.; WANG, X. Vitamin D Binding Protein Impact on 25-Hydroxyvitamin D Levels under Different Physiologic and Pathologic Conditions. **Int J Endocrinol.** 2014.

ZACCARDI, F.; WEBB, D.R.; YATES, T.; DAVIES, M.J. Pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus: a 90-year perspective. **Postgrad Med J.** v.92, n.1084, p.63-9, 2016.

ZANONI, I.; OSTUNI, R.; MAREK, L.R.; BARRESI, S.; BARBALAT, R.; BARTON, G.M.; GRANUCCI, F.; KAGAN, J.C. CD14 controls the LPS-induced endocytosis of Toll-like receptor 4. **Cell.** v.147, n.4, p. 868-80, 2011.

ZHAI, T.; WANG, J.; SUN, L.; CHEN, Y. The effect of streptozotocin and alloxan on the mRNA expression of rat hepatic transporters in vivo. **AAPS PharmSciTech.** v.16, n.4, p.767-70, 2015.

ZHANG, X; GONÇALVES, R.; MOSSER, D.M. The Isolation and Characterization of Murine Macrophage. **Curr Protocol mmunol***.* c.14, u.14.1, 2008.

ZHANG, Y.; LEUNG, D.Y.; RICHERS, B.N.; LIU, Y.; REMIGIO, L.K.; RICHES, D.W.; GOLEVA, E. Vitamin D inhibits monocyte/macrophage proinflammatory cytokine production by targeting MAPK phosphatase-1. **J Immunol.** v. 188, n.5, p.2127-35, 2012.

ZHANG, Y.; WANG, L.; DEY, S.; ALNAEELI, M.; SURESH, S.; ROGERS, H. Erythropoietin action in stress response, tissue maintenance and metabolism. **Int J Mol Sci.** v.15, p.10296–333, 2014.

ZHOU, S.; LEBOFF, M.S.; GLOWACKI, J. Vitamin D metabolism and action in human bone marrow stromal cells. **Endocrinology.** vol.151, n.6, p.14–22, 2010.

ZHU, J.; LUO, C.; WANG, P.; HE, Q.; ZHOU, J.; PENG, H. Saikosaponin A mediates the inflammatory response by inhibiting the MAPK and NF-κB pathways in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. **Exp Ther Med.** v.*5, n.*5, p.1345–50, 2013.

ZHU, W.; CAI, D.; WANG, Y.; LIN, N.; HU, Q.; QI, Y.; MA, S.; AMARASEKARA, S. Calcium plus vitamin D_3 supplementation facilitated fat loss in overweight and obese college students with very-low calcium consumption: a randomized controlled trial. **Nut J.** V.12, p.1-8, 2013.

ZIMMERMAN, D.R.; REINHARDT, T.A.; KREMER, R.; BEITZ, D.C.; REDDY, G.S.; HORST, R.L. Calcitroic acid is a major catabolic metabolite in the metabolism of 1 alpha-dihydroxyvitamin D_2. **Arch Biochem Biophys.** v. 392, n.1, p.14-22, 2001.

ANEXOS

ANEXO I

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

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

Ofício CEUA/FCF **62.2014-P464**

C E R T I F I C A D O

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 insulina e da suplementação de vitamina D em macrófagos no modelo de diabetes mellitus experimental**" (Protocolo CEUA/FCF/464), de responsabilidade do(a) pesquisador(a) **Leonardo Mendes Bella**, sob orientação do(a) **Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins**, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi APROVADO em reunião de **04 de julho de 2014**. Conforme a legislação vigente, deverá ser apresentado, no encerramento deste Projeto de Pesquisa, o respectivo **relatório final**.

São Paulo, 7 de julho de 2014.

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

Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13 A, Cidade Universitária, CEP 05508-900, São Paulo, SP
Telefone: (11) 3091 3622 - e-mail: ceuafcf@usp.br

ANEXO II

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

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

Oficio CEUA/FCF **055.2018**

São Paulo, 14 de agosto de 2018.

Prezado(a) Senhor(a),

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade da FCF/USP, em reunião realizada em 03 de agosto de 2018, **APROVOU** o relatório final, bem como a solicitação de alteração de título, relativo ao projeto de pesquisa **"Influência da insulina e da suplementação de vitamina D em macrófagos no modelo de diabetes mellitus experimental"** para **"Colecalciferol regula os parâmetros hematológicos e a produção de citocinas pró-inflamatórias renais em camundongos diabéticos e nas células RAW 264.7"** (Protocolo CEUA nº **464**).

Cordialmente,

Edna Kato

Profa. Dra. Edna Tomiko Myiake Kato
Coordenadora Decana CEUA/FCF/USP

APÊNDICES

Valores referentes aos pesos e às glicemias representados na figura 2A e 2B.

	Variação Peso (g)		Glicemia (mg/dL)			
	Não diabéticos	Diabéticos	Dia -1 Não Diabético	Dia 10 Não Diabético	Dia -1 Diabéticos	Dia 10 Diabéticos
	-0,70	0,40	172,	159,00	191,	583,
	1,50	-1,20	180,	159,00	187,	559,
	0,20	-0,50	156,	151,00	169,	600,
	-0,20	-1,40	176,	159,00	159,	600,
	0,10	-5,70	152,	219,00	158,	362,
	0,20	-4,00	182,	174,00	159,	586,
	0,60	-2,20	190,	182,00	131,	554,
	3,90	-5,40	200,	156,00	172,	600,
	-2,30	-4,80	183,	148,00	176,	600,
	-0,90	-3,90	181,	158,00	187,	524,
	-1,00	-5,60	187,	189,00	186,	600,
	1,00	-6,10	186,	183,00	196,	600,
	0,50	-1,70	196,	184,00	196,	550,
	0,00	-0,60	177,	188,00	204,	544,
	-1,70	-5,60	174,	158,00	177,	600,
	-0,80	-5,60	150,	156,00	143,	600,
	0,40	-4,40	161,	187,00	162,	509,
	0,20	-2,40	169,	159,00	163,	600,
	0,10	-3,00	165,	171,00	174,	530,
	-1,10	-0,50	172,	167,00	166,	505,
	2,54	-8,00	148,	172,00	147,	499,
	0,62	-7,10	150,	139,00	147,	510,
	2,77	-8,00	159,	201,00	152,	480,
	2,57	-5,30	166,	162,00	144,	567,
		-6,50			148,	599,
		-6,30			151,	467,
		-4,20			157,	511,
		-4,89			162,	597,
		-4,27			177,	597,
		-2,10			167,	570,
		-3,23			164,	591,
		-2,45			160,	569,
		-2,28			162,	592,
		-1,90			153,	600,
		-1,62			147,	600,
		1,10			176,	574,
		-1,85			169,	600,
		-0,68			157,	582,
		0,88			154,	480,
		-1,85				
		-0,68				
		0,88				
Média	0,3542	-3,203	172,2	170,0	165,4	558,7
Desvio Padrão	1,472	2,487	14,89	18,54	16,62	52,56
Erro Padrão da Média	0,3005	0,3837	3,039	3,785	2,661	8,417

Valores referentes aos pesos representados na figura 2C.

	Peso (g) o décimo dia da administração da aloxana					
	C	CV	D	DI	DV	DVI
	25,0	25,9	23,3	27,0	22,7	23,0
	29,8	29,7	20,3	27,5	27,0	30,9
	29,3	27,7	23,4	30,2	19,1	30,6
	29,6	27,0	22,5	30,0	21,7	24,8
	29,6	29,9	23,9	27,3	23,3	27,5
	29,1	29,0	22,8	23,4	22,8	25,7
	29,4	30,4	27,5	23,0	21,1	26,7
	27,6	31,0	24,8	28,0	27,1	25,0
	27,8	29,3	15,1	30,1	20,3	22,3
	27,3	27,4	21,6	20,5	19,0	20,3
	27,0	28,5	23,9	24,1	19,0	21,1
	23,8	28,9	19,2	23,7	19,6	18,4
	25,2	29,2		25,4	24,6	
		26,5		25,9		
		26,1				
Média	27,73	28,43	22,36	26,15	22,10	24,69
Desvio Padrão	2,009	1,589	3,116	2,966	2,835	3,895
Erro Padrão da Média	0,5573	0,4103	0,8995	0,7927	0,7862	1,124

Abreviações: C: controle; CV: controle + vitamina D; D: diabético; DI: diabético + insulina; DV: diabético + vitamina D; DVI: diabético + vitamina D + insulina.

Valores referentes às variações de peso representadas na figura 2D.

	Variação do Peso (g) durante os sete dias de tratamento					
	C	CV	D	DI	DV	DVI
	1,40	0,20	-0,30	3,20	-0,10	0,20
	0,80	0,80	4,00	3,10	0,50	2,30
	1,10	0,60	0,70	7,60	-1,30	1,70
	0,10	0,60	-0,80	5,70	-1,00	1,90
	-0,20	-0,10	0,60	2,90	-0,20	5,70
	0,90	-1,40	-2,40	0,80	-0,70	1,90
	-0,20	-0,20	0,40	0,90	-2,40	1,80
	-0,10	-0,60	-1,10	5,40	-0,20	2,80
	0,40	0,20	-1,30	1,60	-0,70	1,20
	1,10	-0,50	-1,57	0,20	-2,30	0,35
	-1,10	0,70	-0,55	3,90	-3,20	0,78
	0,78	0,50	-5,57	0,15	-2,18	-5,78
	0,35	0,00		5,38	1,00	
		1,33		2,80		
		1,23				
Média	0,4100	0,2240	-0,6575	3,116	-0,9831	1,238
Desvio Padrão	0,6979	0,7235	2,236	2,283	1,241	2,632
Erro Padrão da Média	0,1936	0,1868	0,6455	0,6102	0,3443	0,7598

Abreviações: C: controle; CV: controle + vitamina D; D: diabético; DI: diabético + insulina; DV: diabético + vitamina D; DVI: diabético + vitamina D + insulina.

Valores referentes às glicemias representadas na figura 2E.

	Glicemia (mg/dL) o décimo dia da administração da aloxana					
	C	CV	D	DI	DV	DVI
1	170,	187,	600,	74,	564,	596,
2	171,	197,	600,	600,	600,	515,
3	162,	164,	600,	281,	600,	504,
4	166,	154,	600,	584,	597,	582,
5	159,	171,	539,	527,	517,	398,
6	163,	163,	406,	542,	600,	513,
7	162,	173,	517,	125,	580,	526,
8	162,	190,	480,	136,	348,	463,
9	180,	167,	559,	105,	565,	492,
10	155,	169,	552,	206,	536,	588,
11	159,	185,	479,	445,	462,	353,
12	164,	180,	524,	585,	540,	234,
13	114,	154,		507,	438,	
14		148,		530,		
15		163,				
Média	160,5	171,0	538,0	374,8	534,4	480,3
Desvio Padrão	15,37	14,34	60,99	206,9	76,56	106,3
Erro Padrão da Média	4,26	3,70	17,61	55,28	21,23	30,69

Abreviações: C: controle; CV: controle + vitamina D; D: diabético; DI: diabético + insulina; DV: diabético + vitamina D; DVI: diabético + vitamina D + insulina.

Valores referentes às variações de glicemia representadas na figura 2F.

	Variação da Glicemia (mg/dL) durante os sete dias de tratamento					
	C	CV	D	DI	DV	DVI
	11,	31,	17,	-485,	-36,	-4,
	12,	-22,	238,	14,	46,	-83,
	-47,	-25,	0,	-300,	44,	-58,
	-7,	-49,	0,	-10,	-1,	52,
	-19,	-5,	-61,	-33,	-83,	-149,
	-14,	3,	-82,	35,	0,	-27,
	-18,	38,	6,	-326,	10,	-33,
	8,	-4,	-25,	-310,	12,	-4,
	23,	24,	-338,	-495,	85,	-19,
	-1,	26,	-45,	-293,	-31,	-12,
	-19,	9,	-91,	-65,	-137,	-229,
	-8,	-13,	-67,	16,	-60,	-246,
	-25,	-53,		-85,	-136,	
		1,		-70,		
Média	-8,00	-2,78	-37,33	-171,9	-22,08	-67,67
Desvio Padrão	18,74	27,97	128,0	188,9	67,82	93,19
Erro Padrão da Média	5,19	7,47	36,96	50,48	18,81	26,90

Abreviações: C: controle; CV: controle + vitamina D; D: diabético; DI: diabético + insulina; DV: diabético + vitamina D; DVI: diabético + vitamina D + insulina.

Valores referentes às concentrações de colecalciferol representadas na figura 3A.

	Colecalciferol sérico (ng/mL)					
	C	CV	D	DI	DV	DIV
	2,03	10,97	1,74	7,78	10,82	8,14
	4,53	10,97	4,1	3,31	20,42	1,16
	6,81	10,83	1,34	2,22	17,34	3,3
	3,67	9,62	5,39	8,84	12,89	1,89
	1,43	17,38	5,57	4,41	19,17	3,21
Média	3,69	11,95	3,62	5,31	16,13	3,54
Desvio Padrão	2,13	3,08	1,99	2,86	4,11	2,72
Erro Padrão da Média	0,95	1,38	0,89	1,28	1,84	1,21

Abreviações: C: controle; CV: controle + vitamina D; D: diabético; DI: diabético + insulina; DV: diabético + vitamina D; DVI: diabético + vitamina D + insulina.

Valores referentes às concentrações de insulina representadas na figura 3B.

	Insulina (ng/mL)					
	C	CV	D	DI	DV	DIV
	0,250	0,214	0,0759	2,55	0,1857	52,21
	0,326	0,175	0,0756	6,4	0,135	64
	0,325	0,212	0,1247	0,318	0,1346	97
	0,555	0,174	0,1315	1,719	0,1677	112
	0,291	0,205	0,1247	0,381	0,1478	45
Média	0,335	0,196	0,1065	2,274	0,1542	74,04
Desvio Padrão	0,126	0,02	0,02819	2,491	0,0221	29,11
Erro Padrão da Média	0,0567	0,008	0,01261	1,114	0,0099	13,02

Abreviações: C: controle; CV: controle + vitamina D; D: diabético; DI: diabético + insulina; DV: diabético + vitamina D; DVI: diabético + vitamina D + insulina.

Valores referentes às concentrações de eritropoietina sérica representadas na figura 3C.

	Eritropetina sérica (pg/mL)					
	C	CV	D	DI	DV	DIV
	155,94	779,95	384,79	754,01	297,83	319,19
	236,03	429,04	2102,73	1654,17	683,83	624,33
	296,3	467,18	862,33	892,85	917,26	2072,21
	342,07	688,4	1095,77	912,68	380,21	587,71
	311,56	342,07	602,97	485,49	642,63	2622,99
Média	268,38	541,33	1009,72	939,84	584,35	1245,29
Desvio Padrão	73,76	184,65	667,04	434,22	248,94	1031,69
Erro Padrão da Média	32,99	82,58	298,31	194,19	111,33	461,38

Abreviações: C: controle; CV: controle + vitamina D; D: diabético; DI: diabético + insulina; DV: diabético + vitamina D; DVI: diabético + vitamina D + insulina.

Valores referentes à leucometria representada na figura 4A.

	Leucometria (10^3 células/mm^3)					
	C	CV	D	DI	DV	DVI
	2,2	3,2	1,6	3,0	1,7	1,5
	3,5	1,5	1,8	1,2	1,3	4,1
	1,8	4,3	3,5	2,4	6,4	3,3
		2,1	4,5	2,0	2,3	1,2
		3,2	0,8	3,9		
		2,0	0,9			
			0,8			
Média	2,50	2,71	1,98	2,50	2,92	2,52
Desvio Padrão	0,88	1,03	1,46	1,02	2,35	1,40
Erro Padrão da Média	0,51	0,42	0,55	0,45	1,17	0,70

Abreviações: C: controle; CV: controle + vitamina D; D: diabético; DI: diabético + insulina; DV: diabético + vitamina D; DVI: diabético + vitamina D + insulina.

Valores referentes à hematimetria representada na figura 4B.

	Hematimetria (10^6 células/mm^3)					
	C	CV	D	DI	DV	DVI
	10,7	8,70	8,3	7,6	11,6	9,8
	9,4	7,62	7,6	7,5	8,4	9,1
	8,9	8,00	8,3	8,9	10,0	8,3
		6,94	6,4	8,7	8,6	7,8
		7,37	6,7	8,4		
		7,06	5,2			
			4,9			
Média	9,66	7,61	6,77	8,22	9,65	8,75
Desvio Padrão	0,92	0,65	1,38	0,63	1,48	0,88
Erro Padrão da Média	0,53	0,26	0,52	0,28	0,74	0,44

Abreviações: C: controle; CV: controle + vitamina D; D: diabético; DI: diabético + insulina; DV: diabético + vitamina D; DVI: diabético + vitamina D + insulina.

Valores referentes às concentrações de hemoglobina representadas na figura 4C.

	Hemoglobina (g/dL)					
	C	CV	D	DI	DV	DVI
	16,9	14,00	12,5	12,0	17,1	14,7
	14,1	12,60	11,5	12,1	12,9	14,3
	14,2	12,90	13,2	13,7	14,2	13,0
		11,30	9,9	13,4	12,1	11,6
		12,10	10,4	13,2		
		11,80	8,6			
			7,8			
Média	15,07	12,45	10,56	12,88	14,08	13,40
Desvio Padrão	1,58	0,94	1,98	0,77	2,19	1,40
Erro Padrão da Média	0,91	0,38	0,74	0,34	1,09	0,70

Abreviações: C: controle; CV: controle + vitamina D; D: diabético; DI: diabético + insulina; DV: diabético + vitamina D; DVI: diabético + vitamina D + insulina.

Valores referentes aos hemtócritos representados na figura 4D.

	Hematócrito (%)					
	C	CV	D	DI	DV	DVI
	47,9	39,8	36,5	34,3	51,7	42,8
	41,9	33,9	32,1	35,7	37,4	43,6
	41,4	36,6	39,1	42,0	45,2	39,7
		31,3	30,0	40,6	38,5	36,3
		34,5	31,5	34,7		
		29,6	20,7			
			20,1			
Média	43,73	34,28	30,0	37,46	43,20	40,60
Desvio Padrão	3,61	3,65	7,26	3,57	6,63	3,32
Erro Padrão da Média	2,08	1,49	2,74	1,60	3,31	1,66

Abreviações: C: controle; CV: controle + vitamina D; D: diabético; DI: diabético + insulina; DV: diabético + vitamina D; DVI: diabético + vitamina D + insulina.

Valores referentes aos volumes corpusculares médios representados na figura 4E.

	Volume Corpuscular Médio (fL)					
	C	CV	D	DI	DV	DVI
	45,0	46,0	44,0	48,0	45,0	44,0
	45,0	44,0	42,0	48,0	45,0	48,0
	47,0	46,0	47,0	47,0	45,0	48,0
		45,0	47,0	47,0	45,0	47,0
		47,0	47,0			44,0*
		42,0	40,0			42,0*
Média	45,67	45,00	44,00	46,20	45,00	46,75
Desvio Padrão	1,155	1,78	3,05	2,95	0,0	1,89
Erro Padrão da Média	0,6667	0,73	1,15	1,31	0,0	0,94

Abreviações: C: controle; CV: controle + vitamina D; D: diabético; DI: diabético + insulina; DV: diabético + vitamina D; DVI: diabético + vitamina D + insulina.

Valores referentes à hemoglobina corpuscular média representada na figura 4F.

	Hemoglobina Corpuscular Média (pg)					
	C	CV	D	DI	DV	DVI
	15,7	16,1	15,0	16,8	14,8	15,0
	15,0	16,5	15,1	16,2	15,4	15,7
	16,1	16,1	15,9	15,4	14,1	15,8
		16,4	15,6	15,5	14,1	14,9
		16,4	15,6	15,7		
		16,7	16,6			
			15,9			
Média	15,60	16,37	15,67	15,92	14,60	15,35
Desvio Padrão	0,55	0,23	0,54	0,58	0,62	0,46
Erro Padrão da Média	0,32	0,09	0,20	0,25	0,31	0,23

Abreviações: C: controle; CV: controle + vitamina D; D: diabético; DI: diabético + insulina; DV: diabético + vitamina D; DVI: diabético + vitamina D + insulina.

Valores referentes à concentração de hemoglobina corpuscular média na figura 4G.

	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (g/dL)					
	C	CV	D	DI	DV	DVI
	35,2	35,2	34,2	35,1	33,2	34,3
	33,7	37,1	35,9	33,9	34,5	32,7
	34,4	35,2	33,7	32,6	31,4	32,9
		36,2	33,2	33,0	31,5	31,9
		35,1	33,1	38,1		
		39,8	41,4			
		39,8	38,9			
Média	34,43	36,43	35,77	34,54	32,65	32,95
Desvio Padrão	0,75	1,82	3,21	2,21	1,48	0,99
Erro Padrão da Média	0,43	0,74	1,21	0,98	0,74	0,49

Abreviações: C: controle; CV: controle + vitamina D; D: diabético; DI: diabético + insulina; DV: diabético + vitamina D; DVI: diabético + vitamina D + insulina.

Valores referentes aos pesos dos rins esquerdos representados na figura 5A.

	Peso do rim esquerdo (mg)					
	C	CV	D	DI	DV	DVI
	221,6	210,2	205,5	185,3	184,3	179,4
	195,9	199,0	200,5	199,5	212,7	242,0
	215,0	194,4	224,0	232,0	182,9	252,7
	219,2	199,6	219,4	197,7	197,7	203,1
	243,1	206,0	256,2	227,1	251,9	255,1
	231,6	253,6	166,8	192,2	193,9	249,7
	229,0	239,8	230,7	211,6	259,0	222,2
	205,1	241,9	213,3	215,7	190,2	204,0
	223,8	229,2	189,4	203,3	201,7	212,3
	184,2	197,1	197,3	205,8	186,8	164,7
	170,8	201,0	182,0	215,0	193,0	190,3
	163,3	202,4	182,2	215,8	218,6	172,0
	141,2	180,6		237,4	185,0	
		187,9		226,1		
		162,8				
Média	203,4	207,0	205,6	211,8	204,4	212,3
Desvio Padrão	30,45	24,52	24,76	15,41	25,09	32,27
Erro Padrão da Média	8,44	6,33	7,14	4,11	6,95	9,31

Abreviações: C: controle; CV: controle + vitamina D; D: diabético; DI: diabético + insulina; DV: diabético + vitamina D; DVI: diabético + vitamina D + insulina.

Valores referentes às razões dos pesos dos pesos dos rins esquerdos/pesos corporais representados na figura 5B.

	Peso do rim esquerdo/peso corporal (mg/g)					
	C	CV	D	DI	DV	DVI
	0,939	0,818	0,871	0,779	0,808	0,787
	0,676	0,689	1,230	0,818	0,803	0,846
	0,762	0,717	0,987	1,027	0,897	0,874
	0,743	0,756	0,942	0,814	0,871	0,887
	0,816	0,687	1,100	0,931	1,072	1,170
	0,821	0,834	0,662	0,850	0,825	1,049
	0,774	0,784	0,851	0,957	1,102	0,892
	0,740	0,766	0,824	0,954	0,697	0,919
	0,817	0,788	1,155	0,713	0,960	1,006
	0,703	0,706	0,852	1,014	0,877	0,826
	0,608	0,723	0,744	1,064	0,869	0,937
	0,709	0,713	0,736	0,916	1,004	0,711
	0,568	0,618		1,186	0,784	
		0,747		0,979		
		0,655				
Média	0,744	0,733	0,912	0,928	0,889	0,908
Desvio Padrão	0,096	0,059	0,175	0,125	0,116	0,122
Erro Padrão da Média	0,026	0,015	0,050	0,033	0,032	0,035

Abreviações: C: controle; CV: controle + vitamina D; D: diabético; DI: diabético + insulina; DV: diabético + vitamina D; DVI: diabético + vitamina D + insulina.

Valores referentes aos escores de lesão renal representados na figura 6.

	Escore de lesão renal					
	C	CV	D	DI	DV	DVI
	0,07	0,07	0,10	0,07	0,04	0,07
	0,14	0,09	0,04	0,08	0,07	0,04
	0,17	0,07	0,11	0,04	0,11	0,08
	0,27	0,15	0,10	0,11	0,04	0,07
	0,07	0,11	0,23	0,28	0,36	0,27
	0,14	0,07	0,11	0,16	0,24	0,13
			0,04			0,18
			0,13			
Média	0,14	0,09	0,10	0,12	0,14	0,12
Desvio Padrão	0,07	0,03	0,05	0,08	0,12	0,08
Erro Padrão da Média	0,03	0,01	0,02	0,03	0,05	0,03

Abreviações: C: controle; CV: controle + vitamina D; D: diabético; DI: diabético + insulina; DV: diabético + vitamina D; DVI: diabético + vitamina D + insulina.

Valores referentes às concentrações renais de TNF-α representadas na figura 11A.

	TNF-α (pg/mg) renal					
	C	CV	D	DI	DV	DVI
	25,55	78,75	57,49	65,29	23,40	95,16
	15,86	82,82	81,93	189,56	27,41	23,25
	20,93	100,42	113,20	113,24	11,84	94,03
	47,37	58,29	172,28	137,79	20,22	81,33
	52,86	29,12	160,06	143,47	43,00	163,79
		33,29		61,92		
		85,92				
		68,60				
Média	32,51	67,15	117,0	118,5	25,17	91,51
Desvio Padrão	16,54	25,39	49,23	49,20	11,49	50,02
Erro Padrão da Média	7,398	8,977	22,02	20,09	5,139	22,37

Abreviações: C: controle; CV: controle + vitamina D; D: diabético; DI: diabético + insulina; DV: diabético + vitamina D; DVI: diabético + vitamina D + insulina.

Valores referentes às concentrações renais de IL-10 representadas na figura 11B.

	IL-10 (pg/mg) renal					
	C	CV	D	DI	DV	DVI
	24,54	67,18	29,04	37,02	14,03	85,88
	14,64	69,39	59,88	106,25	28,41	19,37
	11,79	67,84	57,76	70,17	5,31	68,18
	24,36	35,81	112,89	94,65	13,11	47,81
	27,55	17,57	104,21	111,81	27,72	98,56
		15,93		50,58		
		40,76				
		29,87				
Média	20,58	43,04	72,76	78,41	17,72	63,96
Desvio Padrão	6,912	22,38	35,01	30,69	10,04	31,40
Erro Padrão da Média	3,091	7,913	15,66	12,53	4,490	14,04

Abreviações: C: controle; CV: controle + vitamina D; D: diabético; DI: diabético + insulina; DV: diabético + vitamina D; DVI: diabético + vitamina D + insulina.

Valores referentes às concentrações renais de IL-6 representadas na figura 11C.

	IL-6 (pg/mg) renal					
	C	CV	D	DI	DV	DVI
	23,52	66,56	28,58	36,20	13,81	85,54
	14,46	69,25	58,63	103,31	28,54	19,20
	11,50	65,65	56,89	68,69	5,28	68,12
	23,84	34,45	109,94	94,30	13,16	47,59
	27,02	17,17	102,52	112,00	27,45	99,17
		15,79		50,87		
		39,45				
		28,55				
Média	32,51	67,15	117,0	118,5	25,17	91,51
Desvio Padrão	16,54	25,39	49,23	49,20	11,49	50,02
Erro Padrão da Média	7,398	8,977	22,02	20,09	5,139	22,37

Abreviações: C: controle; CV: controle + vitamina D; D: diabético; DI: diabético + insulina; DV: diabético + vitamina D; DVI: diabético + vitamina D + insulina.

Valores referentes às razões renais de TNF-α/IL-10 representadas na figura 11D.

	TNF-α/IL-10 renal					
	C	CV	D	DI	DV	DVI
	0,960	0,853	0,505	0,567	0,600	0,902
	0,923	0,838	0,731	0,561	1,037	0,833
	0,563	0,676	0,510	0,620	0,449	0,725
	0,514	0,614	0,655	0,687	0,648	0,588
	0,521	0,603	0,651	0,779	0,645	0,602
		0,479		0,817		
		0,474				
		0,435				
Média	0,6962	0,6215	0,6104	0,6718	0,6758	0,7300
Desvio Padrão	0,2251	0,1607	0,09921	0,1084	0,2176	0,1385
Erro Padrão da Média	0,1007	0,05680	0,04437	0,04425	0,09731	0,06195

Abreviações: C: controle; CV: controle + vitamina D; D: diabético; DI: diabético + insulina; DV: diabético + vitamina D; DVI: diabético + vitamina D + insulina.

Valores referentes às razões renais de IL-6/IL-10 representadas na figura 12E.

	IL-6/IL-10 renal					
	C	CV	D	DI	DV	DVI
	1,04	1,01	1,02	1,02	1,02	1,00
	1,01	1,00	1,02	1,03	1,00	1,01
	1,03	1,03	1,02	1,02	1,01	1,00
	1,02	1,04	1,03	1,00	1,00	1,00
	1,02	1,02	1,02	1,00	1,01	0,99
		1,01		0,99		
		1,03		1,02	1,02	1,00
		1,05		1,03	1,00	1,01
Média	1,02	1,02	1,02	1,01	1,01	1,00
Desvio Padrão	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Erro Padrão da Média	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,03

Abreviações: C: controle; CV: controle + vitamina D; D: diabético; DI: diabético + insulina; DV: diabético + vitamina D; DVI: diabético + vitamina D + insulina.

Valores referentes às concentrações de eritropoetina renais representadas na figura 11F.

	EPO (pg/mg) renal					
	C	CV	D	DI	DV	DVI
	1,04	1,01	1,02	1,02	1,02	1,00
	1,01	1,00	1,02	1,03	1,00	1,01
	1,03	1,03	1,02	1,02	1,01	1,00
	1,02	1,04	1,03	1,00	1,00	1,00
	1,02	1,02	1,02	1,00	1,01	0,99
		1,01		0,99		
		1,03		1,02	1,02	1,00
		1,05		1,03	1,00	1,01
Média	1,02	1,02	1,02	1,01	1,01	1,00
Desvio Padrão	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Erro Padrão da Média	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,03

Abreviações: C: controle; CV: controle + vitamina D; D: diabético; DI: diabético + insulina; DV: diabético + vitamina D; DVI: diabético + vitamina D + insulina.

Valores referentes às concentrações da 25(OH)D renal representadas na figura 11G.

	25(OH)D (ng/mg) renal					
	C	CV	D	DI	DV	DVI
	9,28	26,93	38,82	8,99	13,52	23,85
	6,26	27,30	27,42	10,88	13,92	15,04
	1,02	18,33	7,41	28,79	5,39	38,22
	1,21	34,98	7,10	14,81	7,27	25,06
	1,73	3,59	10,99	3,16	15,39	27,10
		2,26		6,09		
		8,55				
		6,10				
Média	3,90	16,01	18,35	12,12	11,10	25,85
Desvio Padrão	3,70	12,59	14,16	9,09	4,46	8,31
Erro Padrão da Média	1,65	4,45	6,33	3,71	1,99	3,71

Abreviações: C: controle; CV: controle + vitamina D; D: diabético; DI: diabético + insulina; DV: diabético + vitamina D; DVI: diabético + vitamina D + insulina.

Valores referentes às razões de EPO/IL-6 renal representadas na figura 11H.

	EPO/IL-6 renal					
	C	CV	D	DI	DV	DVI
	4,89	2,21	14,71	7,30	6,62	5,01
	5,27	2,23	3,53	3,10	1,71	3,74
	17,88	3,71	3,34	8,65	3,90	3,03
	10,56	9,41	2,48	3,34	5,30	2,87
	15,67	12,76	3,98	2,89	6,04	2,48
		18,87		3,37		
		4,22				
		6,57				
Média	10,85	7,49	5,61	4,77	4,71	3,43
Desvio Padrão	5,90	5,89	5,12	2,52	1,97	0,99
Erro Padrão da Média	2,64	2,08	2,29	1,03	0,88	0,44

Abreviações: C: controle; CV: controle + vitamina D; D: diabético; DI: diabético + insulina; DV: diabético + vitamina D; DVI: diabético + vitamina D + insulina.

Valores referentes às concentrações de cálcio representadas na figura 12A.

	Cálcio (mg/dL)					
	C	CV	D	DI	DV	DVI
	2,92	7,25	3,73	4,57	4,68	9,93
	4,79	5,88	4,18	5,98	2,73	3,11
	3,53	4,34	6,49	6,32	2,77	8,57
	5,88	4,34	6,34	2,51	2,67	6,42
	6,00	6,60	3,15	5,49	4,78	5,17
	2,66	4,61	3,26	3,87	6,22	3,14
	2,75	7,11	2,60		5,44	
Média	4,07	5,73	4,25	4,79	4,18	6,05
Desvio Padrão	1,46	1,29	1,55	1,43	1,45	2,80
Erro Padrão da Média	0,55	0,49	0,58	0,58	0,55	1,14

Abreviações: C: controle; CV: controle + vitamina D; D: diabético; DI: diabético + insulina; DV: diabético + vitamina D; DVI: diabético + vitamina D + insulina.

Valores referentes às concentrações de ureia representadas na figura 12B.

Ureia (mg/dL)						
	C	CV	D	DI	DV	DVI
	48,	54,	106,	55,	128,	60,
	49,	59,	119,	52,	136,	55,
	41,	54,	85,	65,	82,	78,
	66,	60,	130,	67,	60,	54,
	73,	73,	130,	55,	73,	
	50,	61,		64,	75,	
	54,	60,	76,			
Média	54,43	60,14	107,7	59,67	92,33	61,75
Desvio Padrão	11,18	6,36	23,00	6,37	31,64	11,15
Erro Padrão da Média	4,22	2,40	9,39	2,60	12,92	5,57

Abreviações: C: controle; CV: controle + vitamina D; D: diabético; DI: diabético + insulina; DV: diabético + vitamina D; DVI: diabético + vitamina D + insulina.

Valores referentes às concentrações de creatinina representadas na figura 12C.

Creatinina (mg/dL)						
	C	CV	D	DI	DV	DVI
	0,04	0,08	0,34	0,37	0,73	0,53
	0,08	0,07	0,80	0,38	0,41	0,37
	0,12	0,04	0,42	0,21	0,45	0,84
	0,20	0,16	0,35	0,37	0,41	0,43
	0,02	0,11	0,56	0,15	0,26	
	0,22	0,14	0,41	0,41		
			0,40			
Média	0,11	0,10	0,46	0,31	0,45	0,54
Desvio Padrão	0,08	0,04	0,16	0,10	0,17	0,20
Erro Padrão da Média	0,03	0,02	0,06	0,04	0,07	0,10

Abreviações: C: controle; CV: controle + vitamina D; D: diabético; DI: diabético + insulina; DV: diabético + vitamina D; DVI: diabético + vitamina D + insulina.

Valores referentes às razões de ureia/creatinina representadas na figura 12D.

Ureia/Creatinina						
	C	CV	D	DI	DV	DVI
	1200,00	675,00	311,76	140,54	175,34	113,20
	612,50	842,85	148,75	171,05	331,70	92,85
	550,00	1500,00	202,38	319,04	2136,84	125,58
	365,00	456,25	371,42	148,64	133,33	
	2500,00	554,54	232,14	426,66	178,04	
	245,45	428,57	141,46		288,46	
			190,00			
Média	912,2	742,9	228,3	241,2	540,6	110,5
Desvio Padrão	844,9	401,1	85,12	126,6	785,6	16,52
Erro Padrão da Média	344,9	163,7	32,17	56,60	320,7	9,540

Abreviações: C: controle; CV: controle + vitamina D; D: diabético; DI: diabético + insulina; DV: diabético + vitamina D; DVI: diabético + vitamina D + insulina.

Valores referentes às concentrações de AST representadas na figura 13A.

	AST (U/L)					
	C	CV	D	DI	DV	DVI
	4	3	6	24	3	7
	9	16	29	14	19	34
	13	15	112	88	22	12
	16	34	43	113,	17	34
	13	20	13	82	29	
Média	11	17,6	40,6	64,2	18	21,75
Desvio Padrão	4,63	11,15	42,42	43,01	9,53	14,29
Erro Padrão da Média	2,07	4,98	18,97	19,24	4,26	7,14

Abreviações: C: controle; CV: controle + vitamina D; D: diabético; DI: diabético + insulina; DV: diabético + vitamina D; DVI: diabético + vitamina D + insulina.

Valores referentes às concentrações de ALT representadas na figura 13B.

	ALT (U/L)					
	C	CV	D	DI	DV	DVI
	16	26	31	61	26	18
	65	156	62	162	80	78
	150	88	269	197	78	87
	172	119	233	310	95	119
	56	117	41	99	49	
Média	91,80	101,20	127,20	165,80	65,60	75,50
Desvio Padrão	66,27	48,47	114,28	96,47	27,70	42,18
Erro Padrão da Média	29,64	21,68	51,11	43,14	12,39	21,09

Abreviações: C: controle; CV: controle + vitamina D; D: diabético; DI: diabético + insulina; DV: diabético + vitamina D; DVI: diabético + vitamina D + insulina.

Valores referentes à razão AST/ALT representadas na figura 13C.

	AST/ALT					
	C	CV	D	DI	DV	DVI
	0,25	0,12	0,19	0,39	0,12	0,39
	0,14	0,10	0,47	0,09	0,24	0,44
	0,09	0,17	0,42	0,45	0,28	0,14
	0,09	0,29	0,18	0,36	0,18	0,29
	0,23	0,17	0,32	0,83	0,59	
Média	0,16	0,17	0,31	0,42	0,28	0,31
Desvio Padrão	0,076	0,07	0,13	0,26	0,18	0,13
Erro Padrão da Média	0,034	0,03	0,05	0,11	0,08	0,06

Abreviações: C: controle; CV: controle + vitamina D; D: diabético; DI: diabético + insulina; DV: diabético + vitamina D; DVI: diabético + vitamina D + insulina.

Valores referentes às concentrações de fosfatase alcalina representadas na figura 13D.

	Fosfatase Alcalina (U/L)					
	C	CV	D	DI	DV	DVI
	32	42	94	33	65	44
	42	35	71	89	61	57
	28	24	151	103	64	58
	33	30	64	108	263	
	42	43	97	89	65	
	32	44	155	57	107	
	31	52	169	167	56	
Média	34,29	38,57	114,4	92,29	97,29	53,00
Desvio Padrão	5,49	9,48	43,03	42,28	75,02	7,81
Erro Padrão da Média	2,07	3,58	16,27	15,98	28,36	4,51

Abreviações: C: controle; CV: controle + vitamina D; D: diabético; DI: diabético + insulina; DV: diabético + vitamina D; DVI: diabético + vitamina D + insulina.

Valores referentes às concentrações de albumina representadas na figura 13E.

	Albumina (g/dL)					
	C	CV	D	DI	DV	DVI
	1,29	1,90	1,90	1,79	1,63	2,08
	1,57	1,49	1,90	2,10	1,19	1,64
	1,17	1,12	2,01	2,30	1,62	1,05
	1,88	1,41	2,45	2,30	1,27	2,78
	2,09	2,19	1,73	2,21	1,86	1,81
	1,35	1,96	2,03	2,23	2,45	
	1,81	2,16	1,94	1,41	2,16	
Média	1,59	1,74	1,99	2,04	1,74	1,8
Desvio Padrão	0,34	0,40	0,22	0,33	0,45	0,63
Erro Padrão da Média	0,12	0,15	0,08	0,12	0,17	0,28

Abreviações: C: controle; CV: controle + vitamina D; D: diabético; DI: diabético + insulina; DV: diabético + vitamina D; DVI: diabético + vitamina D + insulina.

Valores referentes às concentrações de lactato desidrogenase representadas na figura 13F.

	Lactato desidrogenase lática (U/L)					
	C	CV	D	DI	DV	DVI
	386	440	1135	891	1050	1781
	450	578	1371	1498	726	448
	63	420	983	1656	427	1394
	136	146	813	401	262	880
	263	773	514	843	333	270
Média	308,8	471,4	963,2	1058	559,6	954,6
Desvio Padrão	138,9	230,1	324,2	514,0	326,2	633,8
Erro Padrão da Média	69,44	102,9	145,0	229,9	145,9	283,5

Abreviações: C: controle; CV: controle + vitamina D; D: diabético; DI: diabético + insulina; DV: diabético + vitamina D; DVI: diabético + vitamina D + insulina.

Valores referentes às concentrações de lactato representadas na figura 13G.

	Lactato (mg/dL)					
	C	CV	D	DI	DV	DVI
	72	52	63	35	119	90
	34	55	121	162	126	48,00
	24	42	168	151	87	121
	72	46	101	156	27	81
	36	169	125	90	55	59
	37	44	65	134	59	
	70	157	102	99	44	
Média	49,29	80,71	106,4	118,1	73,86	79,80
Desvio Padrão	21,06	56,50	36,51	46,11	37,84	28,49
Erro Padrão da Média	7,96	21,35	13,80	17,43	14,30	12,74

Abreviações: C: controle; CV: controle + vitamina D; D: diabético; DI: diabético + insulina; DV: diabético + vitamina D; DVI: diabético + vitamina D + insulina.

Valores referentes à razão lactato desidrogenase/lactato na figura 13H.

	Lactato desidrogenase/Lactato					
	C	CV	D	DI	DV	DVI
	11,35	8,46	9,38	5,50	8,82	19,79
	18,75	10,51	8,16	9,92	8,34	9,33
	3,78	10,00	9,73	10,62	15,81	11,52
	7,11	3,17	6,50	4,46	4,44	10,86
		17,57	5,04	6,29	7,57	4,58
Média	10,25	9,94	7,76	7,35	8,99	11,22
Desvio Padrão	6,460	5,16	1,97	2,74	4,17	5,50
Erro Padrão da Média	3,23	2,30	0,88	1,22	1,86	2,46

Abreviações: C: controle; CV: controle + vitamina D; D: diabético; DI: diabético + insulina; DV: diabético + vitamina D; DVI: diabético + vitamina D + insulina.

Valores referentes às concentrações hepáticas de TNF-α representadas na figura 14A.

	TNF-α (pg/mg) no fígado					
	C	CV	D	DI	DV	DVI
	35,64	21,67	30,44	36,85	28,93	29,61
	21,69	40,47	33,20	20,12	10,06	19,49
	22,41	37,48	24,47	14,45	20,47	25,22
		21,52	22,03	23,59	19,10	
		41,99	16,47	31,41	14,64	
Mean	26,58	32,63	25,32	25,28	18,64	24,77
Std. Deviation	7,854	10,20	6,674	8,919	7,054	5,075
Std. Error of Mean"	4,535	4,562	2,985	3,989	3,155	2,930

Abreviações: C: controle; CV: controle + vitamina D; D: diabético; DI: diabético + insulina; DV: diabético + vitamina D; DVI: diabético + vitamina D + insulina.

Valores referentes às concentrações hepáticas de IL-6 representadas na figura 14B.

	IL-6 (pg/mg) no fígado					
	C	CV	D	DI	DV	DVI
	6,20	5,25	6,10	7,54	6,00	7,93
	4,13	6,90	7,07	5,02	2,11	4,87
	5,66	7,11	4,38	3,26	4,86	5,47
		4,52	3,87	4,97	4,02	
		8,36	2,51	6,99	3,14	
Mean	5,33	6,43	4,79	5,55	4,02	6,09
Std. Deviation	1,07	1,54	1,81	1,72	1,50	1,62
Std. Error of Mean"	0,62	0,69	0,81	0,77	0,67	0,942

Abreviações: C: controle; CV: controle + vitamina D; D: diabético; DI: diabético + insulina; DV: diabético + vitamina D; DVI: diabético + vitamina D + insulina.

Valores referentes às concentrações hepáticas de IL-10 representadas na figura 14C.

	IL-10 (pg/mg) no fígado					
	C	CV	D	DI	DV	DVI
	9,43	6,98	8,38	7,55	5,66	7,68
	6,10	9,78	6,76	6,74	4,32	5,85
	6,77	8,32	5,96	5,05	7,79	6,60
		5,00	5,43	5,80	5,56	
		7,10	3,74	6,74	4,71	
Mean	7,43	7,44	6,05	6,38	5,61	6,71
Std. Deviation	1,76	1,77	1,71	0,97	1,34	0,92
Std. Error of Mean"	1,02	0,79	0,76	0,43	0,60	0,53

Abreviações: C: controle; CV: controle + vitamina D; D: diabético; DI: diabético + insulina; DV: diabético + vitamina D; DVI: diabético + vitamina D + insulina.

Valores referentes às concentrações hepáticas de IL-4 representadas na figura 14D.

	IL-4 (pg/mg) no fígado					
	C	CV	D	DI	DV	DVI
	15,86	9,45	11,23	14,04	9,86	10,25
	12,20	17,35	11,51	10,88	3,43	6,35
	11,41	16,52	8,64	6,94	6,94	7,19
		10,73	7,22	6,84	7,71	
		11,88	6,60	12,32	5,18	
Mean	13,16	13,19	9,04	10,20	6,62	7,93
Std. Deviation	2,37	3,54	2,25	3,23	2,45	2,05
Std. Error of Mean"	1,37	1,58	1,01	1,44	1,10	1,18

Abreviações: C: controle; CV: controle + vitamina D; D: diabético; DI: diabético + insulina; DV: diabético + vitamina D; DVI: diabético + vitamina D + insulina.

Valores referentes às concentrações hepáticas de IL-12 representadas na figura 14E.

	IL-12 (pg/mg) no fígado					
	C	CV	D	DI	DV	DVI
	131,61	81,07	94,93	111,98	90,89	103,76
	73,57	118,73	99,96	77,89	37,55	66,49
	95,79	109,90	65,09	48,66	67,50	82,36
		70,66	69,22	72,57	63,76	
		107,00	45,30	100,47	46,87	
Mean	100,3	97,47	74,90	82,31	61,31	84,20
Std. Deviation	29,28	20,52	22,55	24,78	20,57	18,70
Std. Error of Mean"	16,91	9,18	10,08	11,08	9,20	10,80

Abreviações: C: controle; CV: controle + vitamina D; D: diabético; DI: diabético + insulina; DV: diabético + vitamina D; DVI: diabético + vitamina D + insulina.

Valores referentes às razões hepáticas de TNF-α/IL-6 representadas na figura 14F.

	TNF-α/IL-6 no fígado					
	C	CV	D	DI	DV	DVI
	5,75	4,13	4,99	4,89	4,82	3,73
	5,25	5,87	4,69	4,01	4,76	4,00
	3,96	5,27	5,59	4,44	4,21	4,61
		4,76	5,69	4,75	4,75	
		5,02	6,56	4,49	4,66	
Mean	4,99	5,01	5,50	4,51	4,64	4,11
Std. Deviation	0,92	0,64	0,72	0,34	0,25	0,45
Std. Error of Mean	0,53	0,29	0,32	0,15	0,11	0,26

Abreviações: C: controle; CV: controle + vitamina D; D: diabético; DI: diabético + insulina; DV: diabético + vitamina D; DVI: diabético + vitamina D + insulina.

Valores referentes às razões hepáticas de TNF-α /IL-10 representadas na figura 14G.

	TNF-α/IL-10 no fígado					
	C	CV	D	DI	DV	DVI
	3,78	3,11	3,63	4,88	5,12	3,86
	3,55	4,14	4,91	2,98	2,33	3,33
	3,31	4,50	4,11	2,86	2,63	3,82
		4,30	4,05	4,07	3,43	
		5,91	4,40	4,66	3,11	
Mean	3,54	4,39	4,22	3,89	3,32	3,67
Std. Deviation	0,23	1,00	0,47	0,93	1,09	0,29
Std. Error of Mean	0,13	0,45	0,21	0,42	0,48	0,17

Abreviações: C: controle; CV: controle + vitamina D; D: diabético; DI: diabético + insulina; DV: diabético + vitamina D; DVI: diabético + vitamina D + insulina.

Valores referentes às concentrações de eritropoetina hepática representadas na figura 14H.

	EPO (pg/mg) hepática					
	C	CV	D	DI	DV	DVI
	38,64	27,00	35,68	51,86	40,49	41,34
	22,95	38,18	39,03	26,54	11,55	22,12
	32,87	40,10	22,27	16,75	26,46	27,96
		23,22	23,41	25,85	33,45	
		45,10	16,34	35,30	17,96	
Mean	31,49	34,72	27,35	31,26	25,98	30,47
Std. Deviation	7,94	9,23	9,60	13,25	11,61	9,85
Std. Error of Mean	4,58	4,13	4,29	5,93	5,19	5,69

Abreviações: C: controle; CV: controle + vitamina D; D: diabético; DI: diabético + insulina; DV: diabético + vitamina D; DVI: diabético + vitamina D + insulina.

Valores referentes às razões de EPO/IL-6 hepática representadas na figura 14I.

	EPO/IL-6 hepática					
	C	CV	D	DI	DV	DVI
	6,24	5,15	5,85	6,88	6,75	5,21
	5,56	5,54	5,52	5,28	5,46	4,54
	5,80	5,64	5,09	5,14	5,44	5,11
		5,13	6,04	5,21	8,33	
		5,39	6,51	5,05	5,71	
Mean	5,87	5,37	5,80	5,51	6,34	4,95
Std. Deviation	0,34	0,23	0,53	0,77	1,24	0,36
Std. Error of Mean	0,20	0,10	0,24	0,34	0,55	0,21

Abreviações: C: controle; CV: controle + vitamina D; D: diabético; DI: diabético + insulina; DV: diabético + vitamina D; DVI: diabético + vitamina D + insulina.

Valores referentes às concentrações de TNF-α no coração representadas na figura 15A.

	TNF-α (pg/mg) no coração					
	C	CV	D	DI	DV	DVI
	21,93	20,58	8,07	8,85	24,20	3,19
	20,63	20,29	12,03	2,28	21,79	1,63
	20,35	16,05	15,41	2,96	18,10	3,60
	22,00	19,76	8,77	2,20	10,21	2,82
	19,50	9,44		2,08	12,53	
	19,18	5,88		3,11		
Mean	20,60	15,33	11,07	3,580	17,37	2,810
Std. Deviation	1,185	6,266	3,369	2,616	5,946	0,8487
Std. Error of Mean"	0,4837	2,558	1,684	1,068	2,659	0,4244

Abreviações: C: controle; CV: controle + vitamina D; D: diabético; DI: diabético + insulina; DV: diabético + vitamina D; DVI: diabético + vitamina D + insulina.

Valores referentes às concentrações de IL-6 no coração representadas na figura 15B.

	IL-6 (pg/mg) no coração					
	C	CV	D	DI	DV	DVI
	9,85	8,00	2,96	2,48	6,51	1,30
	9,40	6,11	2,79	0,92	5,15	0,49
	8,51	6,61	3,83	1,15	5,45	1,30
	7,31	6,99	2,45	0,76	3,26	4,12
	6,92	2,90		0,67	3,21	
	8,33	2,15				
Mean	8,39	5,46	3,01	1,20	4,72	1,80
Std. Deviation	1,14	2,37	0,59	0,74	1,44	1,59
Std. Error of Mean"	0,46	0,97	0,29	0,33	0,64	0,80

Abreviações: C: controle; CV: controle + vitamina D; D: diabético; DI: diabético + insulina; DV: diabético + vitamina D; DVI: diabético + vitamina D + insulina.

Valores referentes às concentrações de IL-10 no coração representadas na figura 15C.

	IL-10 (pg/mg) no coração					
	C	CV	D	DI	DV	DVI
	8,76	7,08	4,95	5,02	7,28	3,95
	7,29	8,79	3,79	3,44	13,91	2,13
	6,03	6,34	4,70	2,78	7,52	1,93
	9,19	6,56	4,82	2,35	5,85	2,86
	6,68	3,86		2,58	6,82	
	6,41	3,60		3,06		
Mean	7,39	6,04	4,56	3,20	8,28	2,72
Std. Deviation	1,30	1,98	0,53	0,97	3,21	0,91
Std. Error of Mean"	0,53	0,81	0,26	0,39	1,44	0,45

Abreviações: C: controle; CV: controle + vitamina D; D: diabético; DI: diabético + insulina; DV: diabético + vitamina D; DVI: diabético + vitamina D + insulina.

Valores referentes às concentrações de IL-4 no coração representadas na figura 15D.

	IL-4 (pg/mg) no coração					
	C	CV	D	DI	DV	DVI
	4,91	2,77	2,53	5,96	3,78	2,93
	3,28	4,21	6,50	3,58	2,99	1,05
	2,73	4,67	7,65	3,09	2,35	2,32
	2,14	1,75	4,92	4,18	2,06	5,71
	3,80	0,72		2,58	3,75	
	2,34	1,84		2,37		
Mean	3,20	2,66	5,40	3,63	2,99	3,00
Std. Deviation	1,03	1,53	2,22	1,32	0,79	1,97
Std. Error of Mean"	0,42	0,62	1,11	0,54	0,35	0,98

Abreviações: C: controle; CV: controle + vitamina D; D: diabético; DI: diabético + insulina; DV: diabético + vitamina D; DVI: diabético + vitamina D + insulina.

Valores referentes às concentrações de IL-12 no coração representadas na figura 15E.

	IL-12 (pg/mg) no coração					
	C	CV	D	DI	DV	DVI
	33,83	36,63	14,02	36,36	27,02	26,43
	32,76	24,01	19,81	15,38	22,17	24,50
	33,32	32,42	51,92	19,36	23,01	20,33
	34,68	12,80	21,85	18,36	13,21	19,97
	30,16	10,59		13,04	14,45	
	27,40	10,21		13,96		
Mean	32,03	21,11	26,90	19,41	19,97	22,81
Std. Deviation	2,73	11,63	17,01	8,66	5,91	3,17
Std. Error of Mean"	1,12	4,75	8,50	3,53	2,64	1,59

Abreviações: C: controle; CV: controle + vitamina D; D: diabético; DI: diabético + insulina; DV: diabético + vitamina D; DVI: diabético + vitamina D + insulina.

Valores referentes às razões de TNF-α/IL-6 no coração representadas na figura 15F.

	TNF-α/IL-6 no coração					
	C	CV	D	DI	DV	DVI
	2,23	2,57	2,73	3,56	3,72	2,45
	2,20	3,32	4,31	2,47	4,23	3,35
	2,39	2,43	4,03	2,58	3,32	2,76
	3,01	2,83	3,58	2,90	3,13	0,68
	2,82	3,25		3,10	3,90	
Mean	2,49	2,85	3,66	2,92	3,66	2,31
Std. Deviation	0,34	0,36	0,69	0,44	0,44	1,15
Std. Error of Mean	0,14	0,15	0,34	0,19	0,198	0,57

Abreviações: C: controle; CV: controle + vitamina D; D: diabético; DI: diabético + insulina; DV: diabético + vitamina D; DVI: diabético + vitamina D + insulina.

Valores referentes às razões de TNF-α /IL-10 no coração representadas na figura 15G.

	TNF-α/IL-10 no coração					
	C	CV	D	DI	DV	DVI
	2,50	2,91	1,63	1,76	3,32	0,81
	2,83	2,31	3,17	0,66	1,57	0,77
	3,37	2,53	3,28	1,07	2,41	1,86
	2,39	3,01	1,82	0,93	1,74	0,99
	2,92	2,45		0,81	1,84	
Mean	2,83	2,47	2,47	1,04	2,18	1,11
Std. Deviation	0,35	0,49	0,87	0,43	0,71	0,51
Std. Error of Mean	0,14	0,20	0,43	0,19	0,32	0,25

Abreviações: C: controle; CV: controle + vitamina D; D: diabético; DI: diabético + insulina; DV: diabético + vitamina D; DVI: diabético + vitamina D + insulina.

Valores referentes às concentrações de eritropoetina no coração representadas na figura 15H.

	EPO (pg/mg) hepática					
	C	CV	D	DI	DV	DVI
	60,77	61,38	74,27	67,16	52,99	60,91
	60,69	52,45	31,97	56,66	95,93	28,89
	52,06	81,05	78,75	44,03	52,19	40,68
	77,34	29,88	39,93	33,55	33,36	19,14
	32,50	21,80		45,63	41,40	
Mean	54,13	50,11	56,23	46,46	55,17	37,41
Std. Deviation	15,88	21,52	23,71	13,58	24,19	17,98
Std. Error of Mean	6,481	8,787	11,86	5,545	10,82	8,99

Abreviações: C: controle; CV: controle + vitamina D; D: diabético; DI: diabético + insulina; DV: diabético + vitamina D; DVI: diabético + vitamina D + insulina.

Valores referentes às razões de EPO/IL-6 no coração representadas na figura 15I.

	EPO/IL-6 hepática					
	C	CV	D	DI	DV	DVI
	6,17	7,67	25,09	27,08	8,14	46,85
	6,46	8,58	11,46	61,59	18,63	58,96
	6,12	12,26	20,56	38,29	9,58	31,29
	10,58	4,27	16,30	44,14	10,23	4,65
	4,70	7,52		68,10	12,90	
Mean	6,17	7,67	25,09	27,08	8,14	46,85
Std. Deviation	6,46	8,58	11,46	61,59	18,63	58,96
Std. Error of Mean	6,12	12,26	20,56	38,29	9,58	31,29

Abreviações: C: controle; CV: controle + vitamina D; D: diabético; DI: diabético + insulina; DV: diabético + vitamina D; DVI: diabético + vitamina D + insulina. Valores referentes às taxas de metabolismo mitocondrial representadas na figura 16.

	Taxa de metabolismo mitocondrial 1h									
	C	CE	C1nM	C10nM	C100nM	L	LE	L1nM	L10nM	L100nM
	100,	111,520	107,220	105,342	102,217	102,014	80,206	90,738	93,391	90,061
	100,	99,304	106,343	117,448	93,436	93,702	94,656	96,383	92,762	91,502
	100,	87,797	109,113	112,486	112,279	77,321	89,435	107,404	98,277	98,691
	100,	116,602	82,796	114,245	110,646	85,074	103,187	101,630	89,638	92,295
	100,		95,857	92,918	104,170	85,089	100,689		93,344	84,870
	100,		95,488		112,667	77,206	101,769			96,107
Mean	100,0	103,8	99,47	108,5	105,9	86,73	94,99	99,04	93,48	92,25
Std. Deviation	0,0	12,91	10,07	9,77	7,50	9,66	8,89	7,13	3,09	4,82
Std. Error of Mean	0,0	6,45	4,11	4,37	3,06	3,94	3,63	3,57	1,38	1,97

Abreviações: C: grupo controle; CE: grupo tratado com veículo (etanol 1%); C 1 nM: grupo tratado com colecalciferol (1 nM); C 10 nM: grupo tratado com colecalciferol (10 nM); C 100 nM: grupo tratado com colecalciferol (100 nM); LPS: grupo estimulado com lipopolissacarídeo (100 ng/mL); LE: grupo estimulado com lipopolissacarídeo (100 ng/mL) e tratado com veículo (etanol 1%); L1: grupo estimulado com lipopolissacarídeo (100 ng/mL) e tratado com colecalciferol (1 nM); L10: grupo estimulado com lipopolissacarídeo (100 ng/mL) e tratado com colecalciferol (10 nM) e L100: grupo estimulado com lipopolissacarídeo (100 ng/mL) e tratado com colecalciferol (100 nM).

Taxa de metabolismo mitocondrial 3h										
	C	CE	C1nM	C10nM	C100nM	L	LE	L1nM	L10nM	L100nM
	100,	88,05	93,83	102,11	90,78	118,29	96,95	91,44	81,51	90,60
	100,	79,71	115,01	98,82	105,76	101,12	108,69	101,87	108,17	111,97
	100,	73,83	107,88	115,27	100,29	111,09	100,45	118,17	107,00	121,45
	100,	105,08	99,25	82,95	86,57	106,84	104,71	124,33	116,29	125,71
	100,	106,41	97,89	109,23	129,42	122,99	103,90	101,12	117,79	128,34
	100,	111,35	94,52	72,40	106,05	151,61		117,61	119,61	84,07
Mean	100,0	93,23	99,10	97,63	105,5	119,2	102,9	109,1	108,4	110,8
Std. Deviation	0,0	13,64	9,743	14,97	14,23	15,83	4,45	12,76	14,15	17,20
Std. Error of Mean	0,0	4,82	3,68	5,66	5,03	5,60	1,99	5,21	5,78	6,50

Abreviações: C: grupo controle; CE: grupo tratado com veículo (etanol 1%); C 1 nM: grupo tratado com colecalciferol (1 nM); C 10 nM: grupo tratado com colecalciferol (10 nM); C 100 nM: grupo tratado com colecalciferol (100 nM); LPS: grupo estimulado com lipopolissacarídeo (100 ng/mL); LE: grupo estimulado com lipopolissacarídeo (100 ng/mL) e tratado com veículo (etanol 1%); L1: grupo estimulado com lipopolissacarídeo (100 ng/mL) e tratado com colecalciferol (1 nM); L10: grupo estimulado com lipopolissacarídeo (100 ng/mL) e tratado com colecalciferol (10 nM) e L100: grupo estimulado com lipopolissacarídeo (100 ng/mL) e tratado com colecalciferol (100 nM).

Taxa de metabolismo mitocondrial 6h										
	C	CE	C1nM	C10nM	C100nM	L	LE	L1nM	L10nM	L100nM
	100	89,70	57,07	102,73	90,38	71,75	82,54	102,83	102,29	122,47
	100	85,96	106,31	110,30	102,15	100,34	71,36	84,50	77,11	98,55
	100	98,32	89,39	97,15	112,00	78,65	67,92	108,49	96,66	104,13
	100	89,28	108,45	110,52	106,55	95,49	94,31	83,38	106,17	98,00
	100	108,82	114,10	114,78	97,85	116,92	98,06	98,12	107,08	92,69
	100	106,36	104,06	115,12	97,34	113,14	94,69	102,38	105,55	89,11
Mean	100	102,1	101,5	106,3	95,92	97,95	86,87	95,33	101,4	102,9
Std. Deviation	0,0	14,01	20,10	7,28	11,62	16,64	11,69	9,78	10,71	10,84
Std. Error of Mean	0,0	4,95	7,11	2,57	4,11	5,88	4,13	3,46	3,79	3,83

Abreviações: C: grupo controle; CE: grupo tratado com veículo (etanol 1%); C 1 nM: grupo tratado com colecalciferol (1 nM); C 10 nM: grupo tratado com colecalciferol (10 nM); C 100 nM: grupo tratado com colecalciferol (100 nM); LPS: grupo estimulado com lipopolissacarídeo (100 ng/mL); LE: grupo estimulado com lipopolissacarídeo (100 ng/mL) e tratado com veículo (etanol 1%); L1: grupo estimulado com lipopolissacarídeo (100 ng/mL) e tratado com colecalciferol (1 nM); L10: grupo estimulado com lipopolissacarídeo (100 ng/mL) e tratado com colecalciferol (10 nM) e L100: grupo estimulado com lipopolissacarídeo (100 ng/mL) e tratado com colecalciferol (100 nM).

	Taxa de metabolismo mitocondrial 12h									
	C	CE	C1nM	C10nM	C100nM	L	LE	L1nM	L10nM	L100nM
	100	95,25	90,91	99,26	123,02	113,64	115,48	116,72	120,03	115,73
	100	95,70	95,11	89,98	125,02	111,94	113,14	117,75	125,94	118,51
	100	96,59	89,33	91,17	117,77	108,61	108,17	118,60	124,91	122,71
	100	96,73	88,96	89,26	118,25	114,11	104,13	117,09	115,68	125,66
	100		87,55	83,12		108,10		118,24	117,18	120,59
	100		94,21						111,92	107,37
Mean	100	96,07	91,01	90,56	121,0	111,3	110,2	117,7	119,3	118,4
Std. Deviation	0,0	0,71	3,03	5,78	3,57	2,80	5,08	0,78	5,44	6,40
Std. Error of Mean	0,0	0,35	1,24	2,58	1,78	1,25	2,54	0,35	2,22	2,61

Abreviações: C: grupo controle; CE: grupo tratado com veículo (etanol 1%); C 1 nM: grupo tratado com colecalciferol (1 nM); C 10 nM: grupo tratado com colecalciferol (10 nM); C 100 nM: grupo tratado com colecalciferol (100 nM); LPS: grupo estimulado com lipopolissacarídeo (100 ng/mL); LE: grupo estimulado com lipopolissacarídeo (100 ng/mL) e tratado com veículo (etanol 1%); L1: grupo estimulado com lipopolissacarídeo (100 ng/mL) e tratado com colecalciferol (1 nM); L10: grupo estimulado com lipopolissacarídeo (100 ng/mL) e tratado com colecalciferol (10 nM) e L100: grupo estimulado com lipopolissacarídeo (100 ng/mL) e tratado com colecalciferol (100 nM).

	Taxa de metabolismo mitocondrial 24h									
	C	CE	C1nM	C10nM	C100nM	L	LE	L1nM	L10nM	L100nM
	100	84,95	76,20	77,03	86,61	64,95	65,86	73,41	70,48	78,57
	100	99,75	96,08	89,91	74,90	72,35	67,61	72,58	75,20	79,71
	100	101,45	97,44	99,72	89,86	76,21	75,00	71,72	76,04	85,93
	100	102,08	102,39	106,96	93,10	75,71	77,49	75,69	72,03	86,67
	100	108,74	103,52	97,82	92,71	78,33	77,43	82,91	76,71	86,22
	100	108,16	98,50	103,22	98,26	74,96	76,82	78,92		90,83
Mean	100	100,3	95,30	97,86	92,89	73,22	75,08	76,50	76,42	86,15
Std. Deviation	0,0	7,51	8,96	10,13	9,57	4,15	5,50	4,45	4,55	4,84
Std. Error of Mean	0,0	2,66	3,17	3,58	3,38	1,47	1,94	1,57	1,72	1,71

Abreviações: C: grupo controle; CE: grupo tratado com veículo (etanol 1%); C 1 nM: grupo tratado com colecalciferol (1 nM); C 10 nM: grupo tratado com colecalciferol (10 nM); C 100 nM: grupo tratado com colecalciferol (100 nM); LPS: grupo estimulado com lipopolissacarídeo (100 ng/mL); LE: grupo estimulado com lipopolissacarídeo (100 ng/mL) e tratado com veículo (etanol 1%); L1: grupo estimulado com lipopolissacarídeo (100 ng/mL) e tratado com colecalciferol (1 nM); L10: grupo estimulado com lipopolissacarídeo (100 ng/mL) e tratado com colecalciferol (10 nM) e L100: grupo estimulado com lipopolissacarídeo (100 ng/mL) e tratado com colecalciferol (100 nM).

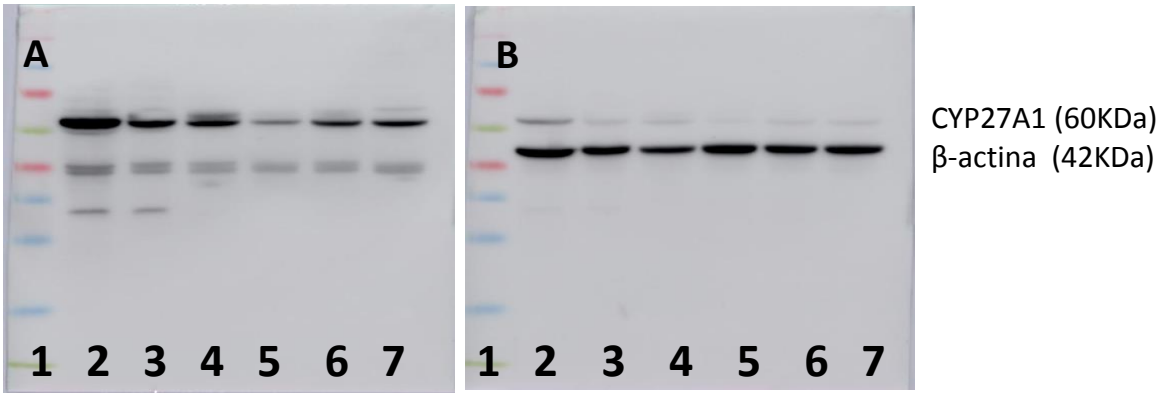
	Taxa de metabolismo mitocondrial 48h									
	C	CE	C1nM	C10nM	C100nM	L	LE	L1nM	L10nM	L100nM
	100	96,36	87,72	72,02	87,02	82,75	75,58	81,73	60,84	57,65
	100	116,32	111,45	103,46	83,52	88,59	86,56	78,84	77,35	78,76
	100	109,92	113,96	107,48	80,50	77,49	75,14	82,57	73,41	85,03
	100	118,08	96,86	76,62	110,74	72,90	82,46	81,62	70,45	87,52
	100	124,99	111,10	77,69	86,84	85,92	74,58	81,57	63,25	79,11
	100	90,28	100,54		113,44	77,28	95,42	62,44	60,99	85,11
Mean	100	109,3	103,6	87,45	93,68	79,36	78,08	78,13	66,97	79,53
Std. Deviation	0,0	13,43	10,32	16,64	14,49	6,661	9,930	7,789	6,688	10,17
Std. Error of Mean	0,0	5,48	4,21	7,44	5,91	2,52	3,51	3,18	2,53	3,84

Abreviações: C: grupo controle; CE: grupo tratado com veículo (etanol 1%); C 1 nM: grupo tratado com colecalciferol (1 nM); C 10 nM: grupo tratado com colecalciferol (10 nM); C 100 nM: grupo tratado com colecalciferol (100 nM); LPS: grupo estimulado com lipopolissacarídeo (100 ng/mL); LE: grupo estimulado com lipopolissacarídeo (100 ng/mL) e tratado com veículo (etanol 1%); L1: grupo estimulado com lipopolissacarídeo (100 ng/mL) e tratado com colecalciferol (1 nM); L10: grupo estimulado com lipopolissacarídeo (100 ng/mL) e tratado com colecalciferol (10 nM) e L100: grupo estimulado com lipopolissacarídeo (100 ng/mL) e tratado com colecalciferol (100 nM).

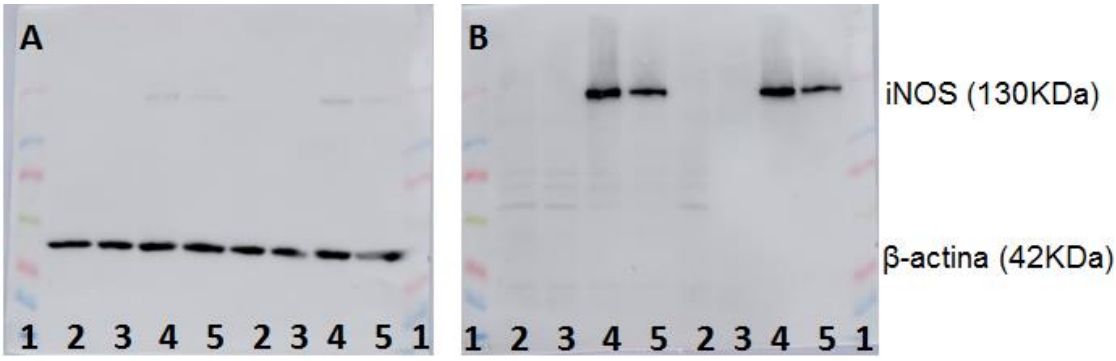
	Taxa de metabolismo mitocondrial 72h									
	C	CE	C1nM	C10nM	C100nM	L	LE	L1nM	L10nM	L100nM
	100	96,70	86,59	108,71	90,78	68,20	67,34	60,27	54,49	54,70
	100	115,63	107,40	112,65	97,85	61,34	74,30	64,22	63,28	65,38
	100	107,10	102,11	104,83	87,36	71,86	77,17	76,11	75,26	71,35
	100	104,62	101,58	106,00	88,42	73,18	79,57	72,22	64,02	75,12
	100	111,34	98,56	98,99	91,33	69,74	81,25	69,30	69,44	76,13
	100	92,62	81,37	105,02	93,82	82,24	63,28	63,86	71,78	76,05
Mean	100	102,5	91,69	103,9	90,22	71,79	73,78	64,68	66,05	71,37
Std. Deviation	0,0	8,61	14,28	5,75	4,48	6,06	6,87	7,92	6,35	7,84
Std. Error of Mean	0,0	3,04	5,05	2,03	1,58	2,14	2,43	2,80	2,24	2,77

Abreviações: C: grupo controle; CE: grupo tratado com veículo (etanol 1%); C 1 nM: grupo tratado com colecalciferol (1 nM); C 10 nM: grupo tratado com colecalciferol (10 nM); C 100 nM: grupo tratado com colecalciferol (100 nM); LPS: grupo estimulado com lipopolissacarídeo (100 ng/mL); LE: grupo estimulado com lipopolissacarídeo (100 ng/mL) e tratado com veículo (etanol 1%); L1: grupo estimulado com lipopolissacarídeo (100 ng/mL) e tratado com colecalciferol (1 nM); L10: grupo estimulado com lipopolissacarídeo (100 ng/mL) e tratado com colecalciferol (10 nM) e L100: grupo estimulado com lipopolissacarídeo (100 ng/mL) e tratado com colecalciferol (100 nM).

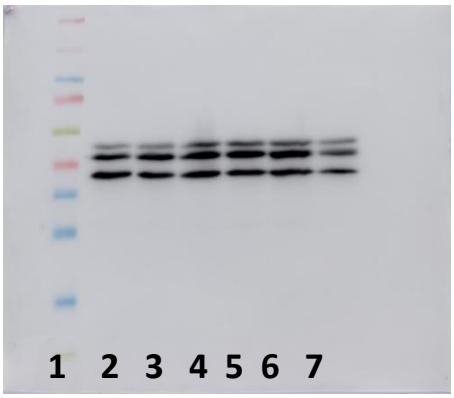
Citocina (pg/mL)	T Tempo	Controle			Controle +100 nM Colecalciferol			LPS			LPS +100 nM Colecalciferol		
		Média	EPM	n	Média	EPM	n	Média	EPM	n	Média	EPM	n
TNF-α	3 horas	464,8	42,21	6	440,8	70,89	6	4826,0	463,4	6	4039,0	462,2	6
	6 horas	538,8	48,35	6	511,2	81,64	6	3167,0	81,72	6	2981,0	148,7	6
	12 horas	566,6	63,69	6	553,3	28,56	6	2958,0	258,9	6	2974,0	246,7	6
	24 horas	372,6	73,61	6	419,8	50,91	6	2861,0	84,41	6	2871,0	131,2	6
IL-6	3 horas	0,90	0,46	5	0,25	0,44	6	270	9	6	203,40	339,30	6
	6 horas	2,92	1,21	6	2,19	0,73	6	1719	55	6	1326	260,70	6
	12 horas	9,87	4,40	6	5,18	5,09	6	1652	11	6	1755	196,80	6
	24 horas	9,05	3,87	4	3,80	2,80	4	2100	15	6	1802	274,00	6
IL-1β	3 horas	0,00	0,00	6	0,00	0,00	6	4,50	2,97	6	0,00	0,000	6
	6 horas	0,00	0,00	6	0,00	0,00	6	73,80	9,24	6	54,20	9,891	6
	12 horas	0,00	0,00	6	0,00	0,00	6	215,90	31,55	6	247,60	60,920	6
	24 horas	0,00	0,00	6	0,00	0,00	6	164,10	31,63	6	11,41	6,646	6
IL-10	3 horas	0,00	0,00	6	0,00	0,00	6	0,00	0,00	6	0,00	0,00	6
	6 horas	0,00	0,00	6	0,00	0,00	6	0,00	0,00	6	0,00	0,00	6
	12 horas	0,00	0,00	6	0,00	0,00	6	29,31	5,59	6	11,79	2,14	6
	24 horas	0,00	0,00	6	0,00	0,00	6	160,50	10,60	6	97,85	16,58	6
NO	3 horas	1,81	0,10	6	1,79	0,22	6	1,70	0,05	6	1,74	0,06	6
	6 horas	1,67	0,21	6	1,66	0,15	6	1,97	0,08	6	2,50	0,22	6
	12 horas	1,55	0,06	6	1,24	0,07	6	2,76	0,20	6	1,73	0,10	6
	24 horas	2,45	0,08	6	2,25	0,08	6	7,93	0,27	6	4,24	0,30	6



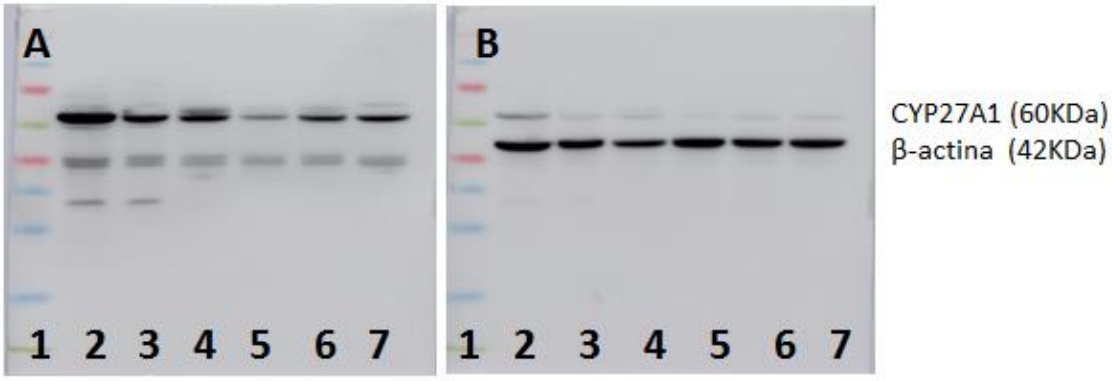
Membrana representativa das proteínas β-actina e CYP27A1. As figuras representam as membranas marcadas pelas bandas das proteínas β-actina (A) e CYP27A1 (B) presentes em lisados de fígado obtidas pela técnica de *western blotting* (Fig.14J). As colunas representam: 1: marcador de peso molecular *Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder – Thermo Scientific;* 2: grupo controle; 3: grupo tratado com colecalciferol; 4: grupo diabético; 5: grupo diabético tratado com colecalciferol; 6: grupo diabético tratado com insulina; 7: grupo diabético tratado com colecalciferol e insulina.



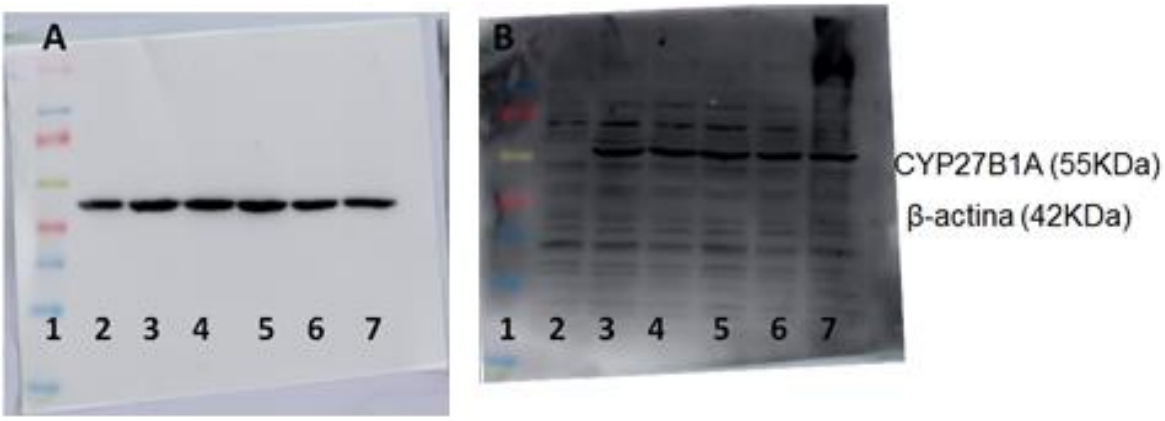
Membrana representativa das proteínas β-actina e iNOS. As figuras representam as membranas marcadas pelas bandas das proteínas β-actina (A) e iNOS (B)presentes em lisados de células RAW 264.7 obtidas pela técnica de *western blotting* (Fig.17A). As colunas representam: 1: marcador de peso molecular *Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder – Thermo Scientific*; 2: grupo controle; 3: grupo tratado com colecalciferol (100 nM); 4: grupo estimulado pelo LPS (100 ng/mL); 5: grupo estimulado pelo LPS e tratado com colecalciferol (100 nM).



Membrana representativa das proteínas GAPDH e ERK1/2 (p42 e p44). A figura representa a membrana marcada com as bandas das proteínas p42, p44 e GAPDH presentes em lisados de células RAW 264.7 obtidas pela técnica de *western blotting* (Fig.18). As colunas representam: 1: marcador de peso molecular *Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder – Thermo Scientific*; 2: grupo controle; 3: grupo estimulado pelo LPS (100 ng/mL); 4: grupo estimulado pelo LPS (100 ng/mL) e tratado com veículo (etanol 1%); 5: grupo estimulado pelo LPS (100 ng/mL)e tratado com colecalciferol (1 nM); 6: grupo estimulado pelo LPS e tratado com colecalciferol (10 nM); 7: grupo estimulado pelo LPS e tratado com colecalciferol (100 nM).



Membrana representativa das proteínas β-actina e CYP27A1. A figura representa a membrana marcada com as bandas das proteínas β-actina e CYP27A1 presentes em lisados de células RAW 264.7 obtidas pela técnica de *western blotting* (Fig.19A). As colunas representam: 1: marcador de peso molecular *Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder – Thermo Scientific*; 2: grupo controle; 3: grupo estimulado pelo LPS (100 ng/mL); 4: grupo estimulado pelo LPS (100 ng/mL) e tratado com veículo (etanol 1%); 5: grupo estimulado pelo LPS (100 ng/mL) e tratado com colecalciferol (1 nM); 6: grupo estimulado pelo LPS e tratado com colecalciferol (10 nM); 7: grupo estimulado pelo LPS e tratado com colecalciferol (100 nM).



Membrana representativa das proteínas β-actina e CYP27B1. A figura representa a membrana marcada com as bandas das proteínas β-actina e CYP27B1 presentes em lisados de células RAW 264.7 obtidas pela técnica de *western blotting* (Fig.19B). As colunas representam: 1: marcador de peso molecular *Spectra Multicolor Broad Range ProteinLadder – ThermoScientific*; 2: grupo controle; 3: grupo estimulado pelo LPS (100 ng/mL); 4: grupo estimulado pelo LPS (100 ng/mL) e tratado com veículo (etanol 1%); 5: grupo estimulado pelo LPS (100 ng/mL) e tratado com colecalciferol (1 nM); 6: grupo estimulado pelo LPS e tratado com colecalciferol (10 nM); 7: grupo estimulado pelo LPS e tratado com colecalciferol (100 nM).