

ESCOLA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PEDIATRIA E SAÚDE DA CRIANÇA
DOUTORADO EM PEDIATRIA E SAÚDE DA CRIANÇA

NAILÊ KARINE NUÑEZ

**EFEITOS DA DEFICIÊNCIA DE VITAMINA D NA FUNÇÃO PULMONAR DE UM MODELO DE
ASMA ALÉRGICA EXPERIMENTAL**

Porto Alegre
2017

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

NAILÊ KARINE NUÑEZ

**EFEITOS DA DEFICIÊNCIA DE VITAMINA D
NA FUNÇÃO PULMONAR DE UM MODELO DE ASMA ALÉRGICA
EXPERIMENTAL**

**Tese apresentada como requisito para a
obtenção do título de Doutor(a) em Saúde
da Criança pelo Programa de Pós-
Graduação em Pediatria e Saúde da
Criança da Escola de Medicina da
Pontifícia Universidade Católica do Rio
Grande do Sul.**

Orientador: Dr. Paulo Márcio Condessa Pitrez

Co-orientador: Dr. Graeme R. Zosky

Porto Alegre

2017

DADOS DE CATALOGAÇÃO

Ficha Catalográfica

N992 Nuñez, Nailê Karine

Efeitos da deficiência de vitamina D na função pulmonar de um modelo de asma alérgica experimental / Nailê Karine Nuñez . – 2017.

65 f.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina/Pediatria e Saúde da Criança, PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Márcio Condessa Pitrez.

Co-orientador: Prof. Dr. Graeme Robert Zosky.

1. Deficiência de vitamina D. 2. Ácaro da poeira doméstica. 3. Função pulmonar. 4. Modelo murino. I. Pitrez, Paulo Márcio Condessa. II. Zosky, Graeme Robert. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

NAILÊ KARINE NUÑEZ

**EFEITOS DA DEFICIÊNCIA DE VITAMINA D
NA FUNÇÃO PULMONAR DE UM MODELO DE ASMA ALÉRGICA
EXPERIMENTAL**

Tese apresentada como requisito para a obtenção do título de Doutor(a) em Saúde da Criança pelo Programa de Pós-Graduação em Pediatria e Saúde da Criança da Escola de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Apresentada em 12 de Julho de 2017.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dra. Liana Antunes

Prof. Dr. Márcio Donadio

Prof. Dra. Simone Sudbrack

Porto Alegre

2017

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao professor Paulo Pitrez, meu orientador, que desde a iniciação científica sempre me deu apoio e incentivo para que eu seguisse nessa jornada acadêmica. Me ajudou a abrir muitas portas e me deu a oportunidade de dar passos que nunca pensei que fosse dar. Obrigada por tudo!!!

Agradeço ao meu co-orientador Graeme Zosky e as minhas colegas de laboratório Ellen e Ling por todo o auxílio que me deram durante minha estadia na UTAS. Sem a ajuda de vocês eu não estaria aqui defendendo meu doutorado.

Agradeço aos meus colegas do lab 13, Aline, Rodrigo, Cristian, Géssica, Josiane, Tássia e Carol que sempre foram mais que colegas, mas amigos, que sempre estiveram prontos para me ajudar em qualquer tarefa. Vocês fizeram muita falta enquanto estive longe e por isso, passei a valorizar ainda mais a união de um grupo. Em especial agradeço ao Rodrigo pelos nossos longos anos de convivência, amizade, coleguismo e por tu ser a pessoa mais solícita que conheço, além de ser um excepcional ouvido amigo para uma boa tagarela como eu.

Agradeço a Carla e a Elis pela amizade e por sempre terem me ajudado, muito mais do que deveriam, me recebendo sempre com muito carinho e respeito. Obrigada!

Mas nenhuma alegria e vitória para mim faz sentido se eu não estiver compartilhando com minha família. Agradeço aos meus pais Marlise e Carlos e meu irmão Vinícius por todo o incentivo, por sempre acreditarem que sou capaz, por sempre me deixarem livre para decidir os caminhos que quero seguir. Vocês são e sempre serão meu espelho e minha inspiração. Agradeço também ao meu marido, Tiago que topou largar tudo e “viver” meu doutorado comigo lá do outro lado do mundo, longe de tudo e de todos e com inúmeros desafios pela frente. Obrigada por andar sempre ao meu lado e ser meu porto seguro.

Agradeço a CAPES pelo auxílio financeiro.

RESUMO

Introdução: A asma é uma doença crônica das vias aéreas, caracterizada por inflamação e hiperresponsividade brônquica, que atinge aproximadamente 300 milhões de pessoas ao redor do mundo. O aumento da prevalência da asma nos últimos anos tem sido associado ao aumento da deficiência de vitamina D. Cerca de 1 bilhão de pessoas no mundo apresenta níveis insuficientes de vitamina D em função de diversos fatores, tais como a redução de atividades ao ar livre, uso de protetor solar e dieta pobre em vitamina D. Além disso, estudos sugerem que a deficiência de vitamina D possui um efeito direto na função pulmonar, causando alterações na estrutura das vias aéreas e no processo inflamatório.

Objetivo: Avaliar o efeito da deficiência de vitamina D em diferentes estágios da vida de camundongos com asma induzida por ácaro domiciliar (*house dust mite*; HDM) sobre a inflamação e função pulmonar.

Métodos: Camundongos BALB/c fêmeas receberam dieta rica ou deficiente em vitamina D a partir da terceira semana de vida. Com 8 semanas de vida, as fêmeas foram acasaladas com machos em dieta rica em vitamina D. Ao nascimento foi realizado o *cross-fostering* (adoção cruzada) com a prole para que fosse possível avaliar o efeito da deficiência de vitamina D em diferentes estágios da vida, *in utero* (Vit D -/+), pós-natal (Vit D +/-) e durante toda a vida (Vit D -/-), em comparação ao grupo controle, que recebeu dieta rica em vitamina D durante toda a vida (Vit D +/+). Com 8 semanas de vida, camundongos de ambos os sexos foram desafiados por 10 dias consecutivos por via intranasal, com extrato de HDM ou apenas solução salina. Os animais foram anestesiados para a realização do teste de função pulmonar e então submetidos a eutanásia para a realização do lavado broncoalveolar (LBA) e retirada do tecido pulmonar, 24 horas após o último desafio intranasal. Foi avaliada a contagem total de células do LBA e quantificação de colágeno no homogeneizado de tecido pulmonar.

Resultados: A deficiência de vitamina D não afetou a inflamação induzida por HDM, que foi caracterizada por eosinofilia no LBA. A deficiência de vitamina D em qualquer fase da vida dos camundongos (*in utero*, pós-natal e durante toda a vida) causou uma

piora na função pulmonar, aumentando o *tissue damping* e *tissue elastance*, sendo observado particularmente em fêmeas. Por outro lado, a asma induzida por HDM diminuiu a distensibilidade das vias aéreas apenas em fêmeas e a vitamina D não alterou essa resposta.

Conclusão: Nossos resultados sugerem que a vitamina D e HDM possuem diferentes mecanismos que influenciam no desenvolvimento da doença pulmonar alérgica e, além disso, os efeitos parecem ser dependentes do sexo.

Palavras-chave: deficiência de vitamina D; ácaro da poeira doméstica; função pulmonar; modelo murino

ABSTRACT

Background: Asthma is a chronic disease of the airways, characterized by bronchial inflammation and hyperresponsiveness, which affects approximately 300 million people around the world. The increase in the prevalence of asthma in recent years has been associated with an increase in vitamin D deficiency. About 1 billion people in the world have insufficient levels of vitamin D due to many factors such as reduced outdoor activities, sunscreens use and a diet low in vitamin D. In addition, many studies suggest that vitamin D deficiency has a direct effect on lung function, leading to changes in the structure of the airways and in the inflammatory process.

Objectives: To evaluate the effect of vitamin D deficiency at different life stages in a murine model of allergic airways disease house dust mite (HDM) induced on inflammation and lung function.

Methods: Female BALB / c mice were placed in a diet replete or deficient in vitamin D at three-week old. At 8 weeks, females were mated with males on a diet replete in vitamin D. At birth, pups were cross-fostered to assess the effects of vitamin D deficiency at different stages of life, *in utero* (Vit D -/+), postnatal (Vit D +/-) and whole-life (Vit D - / -) compared to the control group whole-life vitamin D replete (Vit D + / +). At 8 weeks of age, mice of both sexes were challenged for 10 consecutive days intranasally with either HDM extract or saline solution after mild anesthesia. The animals were anesthetized for lung function test and then submitted to euthanasia for bronchoalveolar lavage (BAL) and lung tissue removal 24 hours after the last intranasal challenge. The total BAL cell count and collagen quantification of lung tissue homogenized were evaluated.

Results: Vitamin D deficiency did not affect HDM-induced inflammation, which was characterized by BAL eosinophilia. Vitamin D deficiency at any life stage (*in utero*, postnatal and all life) caused impairment of lung function, increased tissue damping and tissue elastance, being particularly observed in females. On the other hand, the asthma HDM-induced decreased airway distensibility, but only in females and vitamin D do not altered this response.

Conclusion: Our results suggest that vitamin D and HDM have different mechanisms that influence in the development of allergic lung disease and furthermore the effects appear to be sex-specific.

Keywords: Vitamin D deficiency; house dust mite; lung function; mouse model.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Desenho do protocolo de estudo.....299

Apêndice- Artigo original em inglês

Figura 1: Characteristic pressure dependence curves **Error! Bookmark not defined.**2

Figura 2: Tissue damping (G)..... **Error! Bookmark not defined.**4

Figura 3: Tissue elastance (H) **Error! Bookmark not defined.**5

Figura 4: Hysteresivity **Error! Bookmark not defined.**6

Figura 5: Airway distensibility **Error! Bookmark not defined.**7

Figura 6: Differential cell count. **Error! Bookmark not defined.**8

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Grupos de estudo	28
----------------------------------	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

DPBS: *Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline*

EELV: *end-expiratory lung volume*, volume pulmonar expiratório final

FOT: *forced oscillation technique*, técnica de oscilação forçada

G: *tissue damping*, amortecimento do tecido

G_{aw}: *airway distensibility*, distensibilidade da via aérea

G/H: *hysteresivity*, histerese

GINA: Global Initiative for Asthma

H: *tissue elastance*, elastância do tecido

HDM: *house dust mite*, ácaro da poeira doméstica

IgE: *Immunoglobulin E*, Imunoglobulina E

IL: *interleucin*, interleucina

LBA: lavado broncoalveolar

LFOT: *low frequency forced oscillation technique*, técnica de oscilação forçada de baixa frequência

PEEP: *positive end-expiratory pressure*, pressão expiratória final positiva

η: *hysteresivity*, histerese

OMS: Organização Mundial da Saúde

P_{rs}: *transrespiratory pressure*, pressão transrespiratória

PBS: phosphate buffered saline, tampão fosfato salino

R_{aw}: *airway resistance*, resistência das vias aéreas

Th1: *T helper cells type 1*, células T auxiliares do tipo 1

Th2: *T helper cells type 2*, células T auxiliares do tipo 2

VDR: *Vitamin D receptor*, receptor de vitamin D

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1 Asma	18
2.2 Vitamina D.....	19
2.3 Vitamina D e o sistema imune.....	20
2.4 Deficiência de vitamina D e asma	21
2.5 Modelos experimentais de asma.....	23
3 HIPÓTESE	25
4 OBJETIVOS	26
4.1 Objetivo geral	26
4.2 Objetivos específicos	26
5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
5.1 Modelo animal.....	27
5.2 Protocolo de dieta rica ou deficiente em Vitamina D.....	27
5.3 Protocolo de asma alérgica com HDM.....	27
5.4 Anestesia e eutanásia	29
5.5 Traqueostomia e canulação	29
5.6 Teste de função pulmonar	30
5.7 Lavado broncoalveolar	31
5.8 Concentração de colágeno	31
5.9 Análise estatística	31
5.10 Aspectos éticos	32
6 CONCLUSÕES	33
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
ANEXOS	43

Anexo 1- Aprovação do Comitê de ética.....	43
APÊNDICE	46
1 Artigo Original – submetido ao jornal Scientific Reports	46

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A asma é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas que afeta crianças e adultos de todas as idades. Atualmente, cerca de 300 milhões de pessoas no mundo tem asma. É uma doença caracterizada pela inflamação das vias aéreas e hiperresponsividade brônquica que pode levar a episódios de sibilância, tosse e falta de ar (1,2) .

A prevalência de doenças alérgicas, incluindo asma, tem aumentado nas últimas décadas e tem se observado que ela aumenta conforme as populações se tornam mais urbanizadas e adotam um estilo de vida mais ocidental (1–4). Os efeitos da urbanização e o estilo de vida ocidental também exercem influência na epidemia de deficiência de vitamina D no mundo. Estimativas sugerem que aproximadamente um bilhão de pessoas no mundo sejam insuficientes ou deficientes em vitamina D (5). A redução de atividades ao ar livre e conseqüente diminuição da exposição ao sol, aumento do uso de protetor solar (6) e dieta pobre em vitamina D (7) são alguns dos fatores associados a esse problema de saúde.

A importância do papel da vitamina D na saúde dos ossos, homeostase do cálcio e fósforo já é bem descrita (7), mas atualmente, também é reconhecido o impacto da deficiência de vitamina D no desenvolvimento de diversas doenças, tais como, doenças cardiovasculares, alguns tipos de câncer, doenças autoimunes e doenças respiratórias crônicas, como DPOC (doença pulmonar obstrutiva crônica) e asma (5,7,8). Devido a importância que tem sido atribuída à vitamina D na resposta imune e a importância de compreender o impacto da disseminação desse problema de saúde no mundo, a vitamina D tem sido alvo de interesse de muitos grupos de pesquisa.

A asma é uma doença complexa e dependente de fatores genéticos e ambientais, cuja prevalência tem aumentando significativamente nos últimos anos, e segue sendo a doença crônica mais comum na infância no mundo. Além disso, apesar de todos os avanços feitos nesse campo, a asma ainda é uma doença sem cura, cujas causas não são totalmente esclarecidas. Os tratamentos disponíveis até o momento são utilizados após o estabelecimento da doença e ainda não existem métodos de

Introdução

prevenir o desenvolvimento da mesma. Este cenário gera grande impacto econômico e social e a necessidade de que pesquisas nessa área continuem sendo realizadas.

Neste contexto, a deficiência de vitamina D entra como um fator externo e ambiental, que pode estar colaborando com o aumento da prevalência de asma no mundo e por isso, avaliar o impacto da deficiência de vitamina D em um modelo de asma alérgica é importante para o avanço do conhecimento nessa área e para que se consiga chegar mais perto de esclarecer as causas e de encontrar melhores formas de tratamento para essa doença.

Os ácaros da poeira doméstica (*house dust mite*; HDM) são os principais aeroalérgenos que contribuem para o desenvolvimento de asma alérgica. Sabe-se que a exposição a esses alérgenos resultam em uma forte resposta do tipo Th2, caracterizada por eosinofilia nas vias aéreas (9). O processo inflamatório pode induzir neste modelo, metaplasia das células caliciformes, espessamento da musculatura lisa e aumento da deposição de colágeno nas vias aéreas, levando a alterações estruturais e uma piora da função pulmonar (9–11).

Visto que a deficiência de vitamina D e a exposição a HDM individualmente podem levar a déficits na função pulmonar, este estudo teve como objetivo avaliar o papel da deficiência de vitamina D na inflamação e na função pulmonar de camundongos com doença pulmonar alérgica induzida por HDM.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Asma

A asma é uma doença heterogênea, caracterizada por uma inflamação crônica das vias aéreas e hiperresponsividade brônquica, que podem levar ao remodelamento das vias aéreas. Clinicamente é definida pelo histórico de sintomas; episódios recorrentes de sibilância, dispneia, pressão torácica e tosse, particularmente à noite e no início da manhã, além da limitação variável do fluxo aéreo, sendo a obstrução frequentemente reversível espontaneamente ou com tratamento (12).

A asma é influenciada tanto por fatores genéticos quanto ambientais, e tem sido reconhecida como uma síndrome, devido a sua complexidade e por apresentar diferenças quanto a gravidade da doença, fenótipos, comorbidades e resposta aos tratamentos (13). Dentre os diversos fenótipos da asma, a asma alérgica com perfil Th2 é o mais bem descrito, entretanto, muitas evidências demonstram que alguns indivíduos não respondem bem a terapias direcionadas para o perfil eosinofílico, que vem sendo considerado um outro fenótipo da doença, denominado não-eosinofílico (14,15).

A asma alérgica tem seu início geralmente na infância ou no início da adolescência e é caracterizada por uma resposta inflamatória mediada por linfócitos CD4⁺ de perfil Th2, eosinofilia e produção de IgE (16). As células do sistema imune, quando ativadas, secretam interleucinas (IL) (IL-4, IL-5 e IL-13) que recrutam e ativam eosinófilos, mastócitos e basófilos (17,18). A IL-4 e IL-13 estão relacionadas à produção de anticorpos IgE alérgeno-específicos pelas células B (19), e ao aumento na expressão de receptores de IgE nos mastócitos e basófilos, levando a liberação de mediadores inflamatórios, como histamina e leucotrienos, que resultam em vasodilatação, edema, hiperplasia das células caliciformes, seguido de aumento na produção de muco e consequente broncoconstrição das vias aéreas.

A partir de 1960 observou-se um crescimento substancial da prevalência de asma alérgica no mundo (20). A asma atinge entre 1-18% da população em diferentes países, e estima-se que aproximadamente mais de 300 milhões de pessoas ao redor

Referencial teórico

do mundo sejam asmáticas. Projeções estimam que até 2025 mais de 100 milhões de pessoas desenvolvam asma no mundo (2).

A asma causa um grande impacto na qualidade de vida dos indivíduos afetados e suas famílias. Além disso, o impacto econômico também é alarmante, visto que gera um grande custo aos sistemas de saúde, com gastos em medicamentos, internações e custos indiretos, como faltas ao trabalho e mortes prematuras (2). Segundo a OMS, no ano de 2015, cerca de 383.000 pessoas morreram de asma no mundo (21).

Atualmente, a prevalência de asma tem sido associada ao aumento na deficiência de vitamina D no mundo, pois ambos compartilham alguns fatores de risco, tais como urbanização (2) que já foi mencionando anteriormente, mas também, obesidade (22,23) e etnia afroamericana (24,25). Baixos níveis de vitamina D (< 20ng/mL) foram associados ao aumento da inflamação, piora na função pulmonar e aumento das exacerbações em pacientes com asma, enquanto a suplementação com vitamina D parece ter efeitos benéficos no desfecho da doença conforme revisado por S.C. Hall and D.K. Agrawal (26). Alguns estudos sugerem que a vitamina D pode prevenir o desenvolvimento da asma inibindo a resposta inflamatória a vírus através da regulação de proteínas antimicrobianas (27,28), e que a deficiência de vitamina D pode predispor a asma e outras alergias (4).

2.2 Vitamina D

A vitamina D pode ser adquirida através da exposição solar, dieta e suplementação. A principal fonte, no entanto, é a exposição da pele aos raios solares UVB. Os raios UVB convertem o 7-hidrocolesterol presente na epiderme em pré-vitamina D₃, que é metabolizada no fígado em 25(OH)D (principal forma circulante no sangue). No fígado também é realizada a conversão da vitamina D proveniente da dieta. Nos rins, a 25(OH)D é metabolizada para 1,25(OH₂)D₃, que é a forma ativa (5). A 1,25(OH₂)D₃ pode ser metabolizada em muitos outros tecidos, como cérebro, cólon, próstata e também células do epitélio respiratório e do sistema imune, pois possuem a enzima 25-hidroxivitamina D 1 α -hidroxilase, capaz de converter a vitamina D para a

Referencial teórico

sua forma ativa (8,29–31). A sinalização da vitamina D ocorre através da ligação da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ao receptor de vitamina D (VDR) no citoplasma celular, promovendo a formação de um heterodímero com o receptor X retinóide no núcleo celular, e subsequente regulação da expressão gênica (26,32).

Os níveis de vitamina D são medidos através dos níveis de $25(\text{OH})\text{D}$ no plasma sanguíneo, porém não existe um consenso estabelecido quanto aos níveis ideais de vitamina D no sangue. Tem se considerado deficientes em vitamina D indivíduos com níveis de $25(\text{OH})\text{D}$ abaixo de 20ng/mL , segundo o Instituto de Medicina da Academia Nacional de Ciências (33), insuficientes entre $21\text{-}29\text{ ng/mL}$ e suficientes acima de 30 ng/mL (5). Levando em consideração essa definição, estima-se que 1 bilhão de pessoas no mundo estejam insuficientes ou deficientes em vitamina D (5).

O que pode estar contribuindo para essa epidemia é o fato de que as pessoas tem passado mais tempo em ambientes fechados, com pouca exposição solar, em consequência do processo de urbanização e de um estilo de vida mais ocidental. Além disso, o uso de proteção solar, dieta pobre em vitamina D, as estações do ano, latitude, pigmentação da pele, idade, entre outros, são fatores que influenciam no metabolismo da vitamina D e contribuem para o aumento da deficiência (5).

2.3 Vitamina D e o sistema imune

A importância atribuída a vitamina D na imunidade resulta em parte, pela presença do receptor da forma ativa da vitamina D, (*vitamin D receptor*, VDR) ser encontrado em praticamente todos os tecidos do organismo, incluindo diversas células do sistema imune, como monócitos, macrófagos, células dendríticas, *natural killers*, linfócitos T e B (34,35).

A forma ativa da vitamina D (1,25-dihidroxitamina D_3) tem um importante papel na regulação da resposta Th1, como demonstrado em estudos experimentais de

Referencial teórico

doenças autoimunes, diminuindo a produção dos níveis de IFN- γ e IL-2 (36,37). Outro importante efeito imunomodulador da 1,25-dihidroxitamina D₃ é a indução da síntese de proteínas antimicrobianas, tais como a catelecidina e β -defensinas (28,38–40).

A catelecidina possui atividade anti-bacteriana, antifúngica, antiviral, imunoestimuladora e é um importante agente antimicrobiano no combate a infecção por *Mycobacterium tuberculosis* (28). Além disso, as catelecidinas e β -defensivas contribuem inibindo a inflamação decorrente de infecção viral no trato respiratório. Isso pode ter um efeito modulador na asma pois, as infecções virais, como por rinovírus, são uma das principais causas de exacerbação da asma, que pode levar ao remodelamento da via aérea, através do aumento do depósito de matriz extracelular (29,41). Baixos níveis de 25(OH)D também foram associados a tuberculose (42) e diabetes tipo 2 (42–44). Com base nisso, fica evidente a importância da vitamina D no sistema imune e o motivo pelo qual diversos estudos tem investigado a associação entre deficiência de vitamina D e asma.

Alguns estudos epidemiológicos mostram associação entre polimorfismos no VDR e asma (45,46), enquanto outros, não encontraram essa associação (47,48). Interessantemente, animais deficientes de VDR não desenvolveram hiperresponsividade brônquica e inflamação pulmonar em um modelo de asma alérgica (49), e a expressão do VDR parece ser importante na indução de inflamação pulmonar (50), sugerindo que a vitamina D possa ser necessária para a inflamação Th2 nas vias aéreas. No entanto, seu papel na resposta Th2 ainda não esta bem esclarecido.

2.4 Deficiência de vitamina D e asma

Alguns estudos associam baixos níveis de vitamina D ao aumento do uso de corticoide e reduzido controle da asma em crianças (51–53). Gupta e colaboradores demonstraram pela primeira vez uma relação inversa entre os níveis de vitamina D, função pulmonar e mudanças estruturais nas vias aéreas *in vivo*. Este estudo avaliou crianças com asma grave resistente ao tratamento, e observou que elas apresentavam baixos níveis de vitamina D. Essas crianças apresentaram redução da

Referencial teórico

função pulmonar, aumento no uso de corticoide e exacerbações, bem como espessamento da musculatura lisa, relacionados a baixos níveis de vitamina D (54). Em adultos, os baixos níveis de vitamina D também foram associados a uma redução da sensibilidade ao tratamento com corticoide, piora na função pulmonar e maior hiperresponsividade das vias aéreas, sugerindo que a suplementação seria uma alternativa para melhorar esses desfechos (55). Por outro lado, um outro estudo apresentou resultados conflitantes. O estudo VIDA demonstrou que a suplementação com vitamina D₃ em adultos com níveis insuficientes não reduziu as exacerbações em adultos com asma persistente (56).

Estudos experimentais demonstraram que a deficiência de vitamina D induz uma potente resposta inflamatória (57,58) e reduz a função pulmonar (59). A deficiência de vitamina D contribui para a hiperresponsividade brônquica e aumento da musculatura lisa das vias aéreas, e conseqüente remodelamento em camundongos BALB/c fêmeas adultas (60).

Em um modelo de inflamação alérgica das vias aéreas induzido por ovalbumina, a deficiência de vitamina D foi associada a hiperresponsividade brônquica, eosinofilia no LBA e remodelamento das vias aéreas. A suplementação de vitamina D diminuiu os efeitos da inflamação, mas não os reverteu completamente (61). Já, em um modelo de asma crônica, o tratamento com vitamina D diminuiu a fibrose sub-epitelial, a hiperplasia de células caliciformes e o aumento da musculatura lisa (62). Nesta mesma linha, Vasilou e colaboradores demonstraram que a deficiência de vitamina D induz eosinofilia em um modelo de doença pulmonar alérgica em camundongos neonatos e a suplementação com vitamina D após o desmame reduziu a eosinofilia pulmonar (57).

Algumas evidências sugerem que a deficiência de vitamina D afeta os estágios iniciais do desenvolvimento pulmonar (59,63). Zosky e colaboradores, mostraram que a deficiência de vitamina D entre 16 a 20 semanas de gestação foi associada com piora na função pulmonar e asma aos seis anos de idade, sugerindo que os níveis de vitamina D *in utero* possam ser determinantes para um desenvolvimento pulmonar normal pós-natal (64). Estudos observacionais mostraram associação entre níveis de vitamina D durante a gestação e risco reduzido de sibilância (65,66), risco reduzido de desenvolver asma (67), bem como a insuficiência ou a deficiência de vitamina D

Referencial teórico

foram associada com asma (68). No entanto, alguns estudos não mostraram essa associação ou mostraram um risco aumentado de desenvolver asma (69,70).

Na literatura, fica claro o importante papel da vitamina D na asma, porém, os resultados ainda são conflitantes. Todas as observações levam a concluir que a deficiência de vitamina D tem capacidade por si só de causar alterações na resposta inflamatória e na estrutura pulmonar, podendo levar a déficits na função pulmonar. Além disso, o momento em que o indivíduo se torna deficiente em vitamina D, por exemplo *in utero*, pode ser determinante para os desfechos da asma ao longo da vida.

2.5 Modelos experimentais de asma

Modelos murinos são muito importantes e amplamente utilizados em estudos pré-clínicos que investigam a patogênese da asma alérgica pois, estes modelos conseguem reproduzir muitas características da doença em humanos, tais como, uma robusta resposta inflamatória do tipo Th2, eosinofilia e hiperreatividade das vias aéreas (71). A ovalbumina (OVA) é um dos principais alérgenos utilizados para induzir uma resposta pulmonar alérgica em camundongos. No entanto, este modelo sofre muitas críticas, primeiramente, por não ser um alérgeno relevante para a doença em humanos, além disso, a OVA necessita de uma sensibilização sistêmica para induzir a resposta inflamatória, sendo frequentemente administrada por via intraperitoneal em associação com adjuvantes, como hidróxido de alumínio e os animais podem apresentar tolerância imunológica quando expostos continuamente a OVA (72–74). Como alternativa, muitos estudos utilizam o extrato de *house dust mite* (HDM), o ácaro da poeira doméstica, que é um aeroalérgeno de relevância clínica mundial, pois, diversos pacientes asmáticos são facilmente sensibilizados por esses alérgenos e apresentam níveis elevados de IgE específica para HDM (75). Nos modelos que utilizam HDM, a principal rota de exposição ao alérgeno é via mucosa respiratória, através de desafios intranasais, sem o uso de adjuvantes. A exposição ao extrato de HDM induz uma forte resposta Th2, com aumento de IL-4 e IL-5, persistente inflamação eosinofílica, hiperresponsividade das vias aéreas após desafio com

Referencial teórico

metacolina (9,11) além de alterações estruturais, tais como aumento de depósito de colágeno e hiperplasia das células caliciformes (11). Apesar das várias limitações que os modelos experimentais possam apresentar (76,71), eles ainda são uma ferramenta de extrema importância para compreensão dos mecanismos da doença, busca por novos tratamentos e cura da asma.

*Hipótese***3 HIPÓTESE**

A associação da deficiência de vitamina D e doença pulmonar alérgica induzida por ácaro da poeira doméstica (HDM) induz déficits na função pulmonar maiores do que os observados individualmente.

Objetivos

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da interação da deficiência de vitamina D e asma induzida por ácaro da poeira doméstica (HDM) na resposta inflamatória e função pulmonar de camundongos BALB/c.

4.2 Objetivos específicos

- I. Avaliar os efeitos da deficiência de vitamina D em diferentes estágios da vida (*in utero*, pós-natal e durante toda a vida) na função pulmonar e resposta inflamatória de camundongos com doença pulmonar alérgica induzida por HDM.
- II. Avaliar as diferenças sexuais .

5 MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo experimental foi realizado na Escola de Medicina da Faculdade de Saúde da Universidade da Tasmânia, Austrália, durante o período de estágio de doutorado sanduíche, realizado no ano de 2015.

5.1 Modelo animal

Foram utilizados camundongos BALB/c machos e fêmeas (Cambridge Farm Facility, Universidade da Tasmânia, TAS, AU). Os animais foram mantidos em caixas transparentes (cinco animais por caixa), sob foto-períodos de 12 horas claro/escuro, com ração e água à vontade.

5.2 Protocolo de dieta rica ou deficiente em Vitamina D

Inicialmente, fêmeas BALB/c foram colocadas em uma dieta deficiente ou rica em vitamina D, contendo 0 ou 2.280 UI de vitamina D₃. A ração das dietas deficientes em vitamina D foram suplementadas com 2% de cálcio (vs 1%), para evitar hipocalcemia e prevenir defeitos ósseos. Com oito semanas de vida, as fêmeas foram acasaladas com machos em dieta rica em vitamina D, conforme descrito por Foong e colaboradores (60). Ao nascimento, os filhotes provenientes desses acasalamentos foram submetidos ao *cross-fostering* (adoção cruzada) para termos acesso aos efeitos da deficiência de vitamina D em diferentes estágios da vida: *in utero* (Vit D -/+), pós-natal (Vit D +/-), durante toda a vida (Vit D -/-) (58).

5.3 Protocolo de asma alérgica com HDM

O protocolo de indução de asma alérgica teve início quando ambos machos e fêmeas da prole completaram 8 semanas de vida. Os animais foram superficialmente anestesiados por inalação com metoxiflurano em câmara de anestesia. Após anestesia, os animais foram desafiados por via intranasal com 25µg de extrato de HDM (Greer Laboratories, Lenoir, NC, USA), em 50µl de solução salina, ou apenas

Materiais e métodos

solução salina, por 10 dias consecutivos (Figura 2). Este estudo foi dividido em 8 grupos de machos e fêmeas de acordo com o tratamento ao qual foram submetidos conforme demonstrado na Tabela 1, totalizando 16 grupos de estudo.

Tabela 1: Descrição dos grupos de estudo para ambos os sexos.

<i>GRUPOS</i>	<i>DIETA IN UTERO</i>	<i>DIETA PÓS-NATAL</i>	<i>DESAFIO INTRANASAL</i>
Vit D -/+ SAL	-	+	SAL
Vit D -/+ HDM	-	+	HDM
Vit D +/- SAL	+	-	SAL
Vit D +/- HDM	+	-	HDM
Vit D -/- SAL	-	-	SAL
Vit D -/- HDM	-	-	HDM
Vit D +/+ SAL	+	+	SAL
Vit D +/+ HDM	+	+	HDM

- O símbolo (-) significa dieta pobre em vitamina D e (+), dieta rica em vitamina D. SAL: solução salina; HDM: ácaro da poeira doméstica; Vit D: vitamina D. Vit D -/-: dieta deficiente em vitamina D durante toda a vida; Vit D -/+: deficiência em vitamina D *in utero*; Vit D +/-: deficiência em vitamina D pós-natal; Vit D +/+ : dieta rica em vitamina D durante toda a vida (controle). Foram utilizados entre 7-13 animais por grupo dependendo do desfecho avaliado.

Materiais e métodos

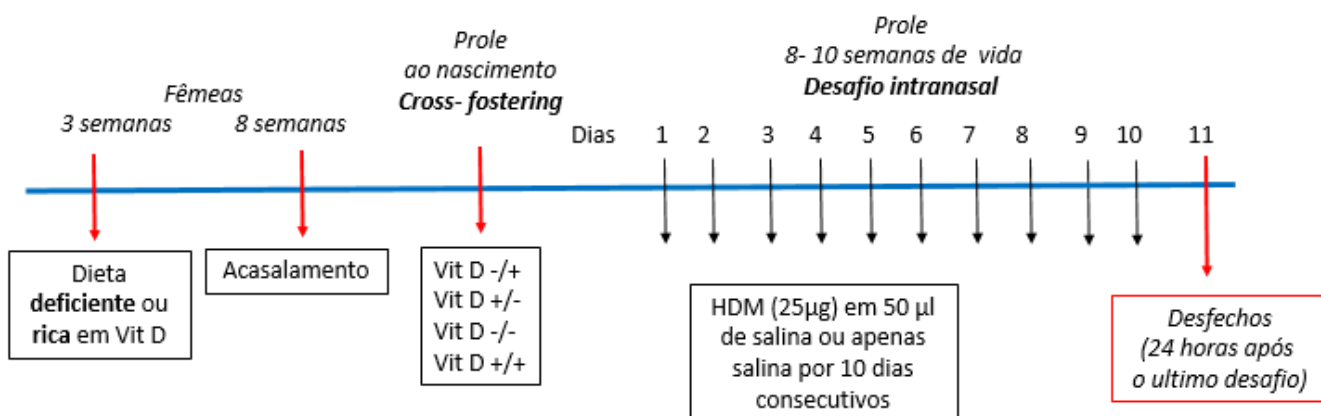


Figura 1: Desenho do protocolo de estudo. Vit D: vitamina D; Vit D-/+ : deficiente em vitamina D *in utero*; Vit D +/-: deficiente em vitamina D pós-natal; Vit D -/-: deficiente em vitamina D durante toda a vida e Vit D +/+ : controle, rico em vitamina D durante toda a vida. HDM: house dust mite.

5.4 Anestesia e eutanásia

Após 24 horas do último desafio intranasal, os camundongos foram anestesiados com uma solução preparada com cetamina (40mg/mL) e xilazina (2mg/mL), na dose de 0.01 mL/g por via intraperitoneal. Inicialmente, foi administrado 1/3 da dose da solução anestésica e caso houvesse necessidade, administrava-se mais 1/3 da dose. Isso se repetia até os animais estarem totalmente anestesiados para a realização da traqueostomia e canulação. O restante da dose foi administrado ao conectar os animais no ventilador (HSE-Harvard MiniVent; Harvard apparatus, Holliston, MA, USA). Ao final do teste de função pulmonar, os animais foram eutanasiados com uma overdose dos anestésicos.

5.5 Traqueostomia e canulação

Após anestesiados, a traquéia dos animais foi exposta, e um tubo endotraqueal de 1cm foi introduzido. Este tubo foi utilizado para conectar o animal ao ventilador.

Materiais e métodos

5.6 Teste de função pulmonar

Após a traqueostomia e canulação, os animais foram conectados individualmente a um ventilador e então o restante da anestesia foi administrado. Os camundongos foram ventilados a uma frequência respiratória de 400 ciclos/min, com volume corrente de 10mL/kg, e 2cmH₂O de pressão expiratória final positiva (PEEP, positive end-expiratory pressure). A mecânica pulmonar foi acessada através da técnica modificada de oscilação forçada de baixa frequência (LFOT, Low frequency forced oscillation technique), durante manobras de inflação desde o volume pulmonar expiratório final (EELV, end-expiratory lung volume), até 20 cmH₂O de pressão transrespiratória (Prs) (77). O sinal oscilatório consistiu em nove frequências, variando entre 4-38 Hz, que foi transportado de um alto falante, que aplica a perturbação até a cânula endotraqueal via *wavetube* de características conhecidas, para calcular a impedância do sistema respiratório.

Para este trabalho foi utilizado um modelo de fase constante de quatro parâmetros proposto por Hantos *et al.* (78) que avalia os componentes de via aérea e tecido separadamente. Isso nos permitiu avaliar a resistência da via aérea (R_{aw}), *tissue damping* (G , amortecimento do tecido), *tissue elastance* (H , elastância do tecido) e *hysteresivity* (η , histerese), de 0 a 20cmH₂O Prs. Também foi avaliada a distensibilidade das vias aéreas através do *slope* da condutância ($G_{aw} = 1/R_{aw}$) versus uma curva de 2 a 10cmH₂O Prs.

Com os animais já conectados ao ventilador MiniVent, o volume corrente foi ajustado de acordo com o peso do animal (200 μ L para cada 20g de peso do animal). Após o ajuste do volume corrente iniciou-se a ventilação, com uma frequência respiratória baixa, até atingir os 400 ciclos/minuto. Para evitar o colapso do pulmão durante a ventilação, utilizou-se uma PEEP, onde um tubo conectado ao ventilador ficava submerso por dois centímetros em uma coluna com água. A PEEP era retirada e a ventilação desligada durante as medidas de FOT. Foram realizadas 6 medidas de FOT por seis vezes. A análise dos dados da função pulmonar foi realizada no software WinLung, desenvolvido no Departamento de Informática Médica na Universidade de Szeged, Hungria.

Materiais e métodos

5.7 Lavado broncoalveolar

Após a eutanásia, foi realizado o lavado broncoalveolar (LBA) através da instilação de 500µl de DPBS (*Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline*) nos pulmões, pelo tubo endotraqueal, por três vezes. O LBA foi centrifugado a 5.000 rpm por cinco minutos e, após a centrifugação, o precipitado foi ressuspenso em PBS. A contagem total de células foi realizada em câmara de Neubauer. Foram confeccionadas duas lâminas de citologia por animal em citocentrífuga (500 rpm, por cinco minutos), que posteriormente, foram coradas com o corante Haem Kwik (HD Scientific Supplies Pty Ltd., AU). As células foram analisadas conforme sua morfologia em microscópio óptico, por um observador cegado. Foram contadas 200 células por animal.

5.8 Concentração de colágeno

Após a realização do LBA, foi feita a retirada do tecido pulmonar total. A concentração de colágeno tipo 1 alfa 1 (COL1A1) foi realizada em homogeneizado pulmonar, através de um teste de ELISA, seguindo as instruções do fabricante (DLDEVELOP Ltd., Wuxi, Jisngsu, PRC).

5.9 Análise estatística

A análise estatística foi realizada pelo software SigmaPlot v.12.5 (Systat, Germany) e os gráficos foram gerados no software *Graphpad Prism* v.4.0 (Graphpad Software Inc, San Diego, CA, USA). Foi utilizado o teste ANOVA de duas vias com *posthoc* de Holm-Sidak para avaliar os efeitos da vitamina D e exposição a HDM nos desfechos de interesse. Os dados foram transformados em logaritmo, quando necessário. Foi considerado significativo um $p < 0,05$. Os dados foram apresentados em média e desvio padrão (DP).

Materiais e métodos

5.10 Aspectos éticos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal da Universidade da Tasmânia (Anexo 1) e seguiu as normas do Conselho Nacional de Saúde e Pesquisa Médica da Austrália.

6 CONCLUSÕES

Foi avaliado o efeito da deficiência de vitamina D na inflamação e na função pulmonar em um modelo de asma, em machos e fêmeas, em diferentes estágios da vida.

Os resultados encontrados corroboram os de outros estudos, demonstrando que a deficiência de vitamina D resulta em uma piora da função pulmonar. Porém, sugerem que a deficiência de vitamina D exerce pouco efeito na inflamação, pois não alterou a resposta inflamatória induzida pelo ácaro.

A deficiência de vitamina D *in utero* e pós-natal foi suficiente para causar uma piora consistente na mecânica do parênquima pulmonar dos camundongos, porém, esse efeito foi mais pronunciado em fêmeas. Esses resultados sugerem que a vitamina D e a asma alérgica possuem efeitos independentes na inflamação das vias aéreas e na função pulmonar, e que estes efeitos podem ser influenciados pelo sexo. Além disso, a vitamina D parece ter um efeito direto no parênquima pulmonar, enquanto na asma alérgica parece afetar mais a inflamação nas vias aéreas.

Essas observações evidenciam a complexidade dos efeitos da vitamina D e a importância do sexo na resposta inflamatória e função pulmonar na asma. No entanto, mais pesquisas são necessárias afim de desvendar em maior detalhes os mecanismos que estão envolvidos na associação entre deficiência de vitamina D e asma.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRAMAN SS. The Global Burden of Asthma * The Global Burden of Asthma *. Chest J. 2006;
2. MASOLI M, FABIAN D, HOLT S, BEASLEY R. Global Burden of Asthma. Chest J. 2004;59(5):469–78.
3. JAMES AL, KNUIMAN MW, DIVITINI ML, HUI J, HUNTER M, PALMER LJ, ET AL. Changes in the prevalence of asthma in adults since 1966: The Busselton health study. Eur Respir J. 2010;35(2):273–8.
4. LITONJUA AA, WEISS ST. Is vitamin D deficiency to blame for the asthma epidemic? J Allergy Clin Immunol. 2007;120(5):1031–5.
5. HOLLICK M. Vitamin D Deficiency. N Engl J Med. 2007;357:266–81.
6. KHO AT, SHARMA S, QIU W, GAEDIGK R, KLANDERMAN B, NIU S, ET AL. Vitamin D related genes in lung development and asthma pathogenesis. BMC Med Genomics. 2013;6(1):47.
7. HOLICK M. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. Am J Clin Nutr. 2004;
8. HOLICK M, CHEN T. Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. Am J Clin Nutr. 2008;
9. CATES EC, FATTOUH R, WATTIE J, INMAN MD, GONCHAROVA S, COYLE AJ, ET AL. Intranasal Exposure of Mice to House Dust Mite Elicits Allergic Airway Inflammation via a GM-CSF-Mediated Mechanism. J Immunol. 2004;173(9):6384–92.
10. SAGLANI S, MATHIE SA, GREGORY LG, BELL MJ, BUSH A, LLOYD CM. Pathophysiological features of asthma develop in parallel in house dust mite-exposed neonatal mice. Am J Respir Cell Mol Biol. 2009;41(3):281–9.
11. JOHNSON JR, WILEY RE, FATTOUH R, SWIRSKI FK, GAJEWSKA BU, COYLE AJ, ET AL. Continuous exposure to house dust mite elicits chronic airway inflammation and

Referências bibliográficas

- structural remodeling. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;169(3):378–85.
12. BOUSQUET J, CLARK TJH, HURD S, KHALTAEV N, LENFANT C, O'BYRNE P, ET AL. GINA guidelines on asthma and beyond. Vol. 62, *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2007. p. 102–12.
 13. BJERMER LH, WENZEL SE. Asthma endotypes : a new approach to classification of disease entities within the asthma syndrome . *J Allergy Clin Immunol Asthma endotypes : A new approach to classification of disease entities within the asthma syndrome*. *J Allergy*. 2011;(August 2015).
 14. HALDAR P, PAVORD ID. Noneosinophilic asthma: A distinct clinical and pathologic phenotype. Vol. 119, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2007. p. 1043–52.
 15. WENZEL SE. Asthma : defini ng of the persistent adult phenotypes. *Lancet*. 2006;368:804–13.
 16. SENIOR AUK, HOSPITAL G, PHENOTYPES CA. CLUSTER ANALYSIS AND CLINICAL ASTHMA. *Am J*. 2008;(C).
 17. LAMBRECHT BN, HAMMAD H. The airway epithelium in asthma. *Nat Med*. 2012;18(5):684–92.
 18. KOYASU S, MORO K. Type 2 innate immune responses and the natural helper cell. *Immunology*. 2011;132(4):475–81.
 19. KIM YM, KIM YS, JEON SG, KIM YK. Immunopathogenesis of allergic asthma: More than the Th2 hypothesis. *Allergy, Asthma Immunol Res*. 2013;5(4):189–96.
 20. EDER W, EGE MJ, VON MUTIUS E. The Asthma Epidemic. *N Engl J Med*. 2006;355(21):2226–35.
 21. WHO [Internet]. [cited 2017 Aug 29]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs307/en/>
 22. DIXON AE, HOLGUIN F, SOOD A, SALOME CM, PRATLEY RE, BEUTHER DA, ET AL. An Official American Thoracic Society Workshop Report: Obesity and Asthma. *Proc*

Referências bibliográficas

- Am Thorac Soc. 2010;7(5):325–35.
23. WORTSMAN J, MATSUOKA L, CHEN T, LU Z. Decreased bioavailability of vitamin D in obesity- American Journal of Clinical Nutrition 2000. The American journal. 2000.
 24. CELEDÓN JC, SREDL D, WEISS ST, PISARSKI M, WAKEFIELD D, CLOUTIER M. Ethnicity and Skin Test Reactivity to Aeroallergens among Asthmatic Children in Connecticut. Chest. 2004;125(1):85–92.
 25. RAJAKUMAR K. Vitamin D Insufficiency in Preadolescent African-American Children. Clin Pediatr (Phila). 2005;44(8):683–92.
 26. HALL S, AGRAWAL D. Vitamin D and Bronchial Asthma: An Overview of Data From the Past 5 Years. Clin Ther [Internet]. 2017 [cited 2017 Jun 16]; Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0149291817302370>
 27. BEARD JA, BEARDEN A, STRIKER R. Vitamin D and the anti-viral state. J Clin Virol. 2011;50(3):194–200.
 28. LIU PT. Toll-Like Receptor Triggering of a Vitamin D-Mediated Human Antimicrobial Response. Science (80-). 2006;311(5768):1770–3.
 29. BERRAIES A, HAMZAOUI K, HAMZAOUI A. Link between vitamin D and airway remodeling. J Asthma Allergy. 2014;7:23–30.
 30. LUCAS R, GORMAN S, GELDENHUYS S, HART P. Vitamin D and immunity. F1000Prime Rep. 2014;6.
 31. LITONJUA AA, WEISS ST, LITONJUA AA, WEISS ST. Is vitamin D deficiency to blame for the asthma epidemic?[see comment]. J Allergy Clin Immunol. 2007;120(5):1031–5.
 32. PAUL G, BREHM J, ALCORN J, HOLGUÍN F. Vitamin D and asthma. Am J [Internet]. 2012 [cited 2017 Jun 16]; Available from: <http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/rccm.201108-1502CI>
 33. ROSS A, MANSON J, ABRAMS S. The 2011 report on Dietary Reference Intakes for calcium and vitamin D from the Institute of Medicine: what clinicians need to

Referências bibliográficas

- know. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;53–8.
34. BERER A, STÖCKL J, MAJDIC O, WAGNER T, KOLLARS M, LECHNER K, ET AL. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits dendritic cell differentiation and maturation in vitro. *Exp Hematol.* 2000;28(5):575–83.
35. MACDONALD HM. Contributions of sunlight and diet to vitamin D status. *Calcif Tissue Int.* 2013;92(2):163–76.
36. CANTORNA M, HAYES C, DELUCA H. 1, 25-Dihydroxycholecalciferol inhibits the progression of arthritis in murine models of human arthritis. *J Nutr.* 1998;128(1):68–72.
37. CANTORNA MT, MUNSICK C, BEMISS C, MAHON BD. 1,25-Dihydroxycholecalciferol Prevents and Ameliorates Symptoms of Experimental Murine Inflammatory Bowel Disease. *J Nutr.* 2000;130(11):2648–52.
38. LIU PT, KRUTZIK SR, MODLIN RL. Therapeutic implications of the TLR and VDR partnership. Vol. 13, *Trends in Molecular Medicine.* 2007. p. 117–24.
39. WANG T-T-T, NESTEL FP, BOURDEAU V, NAGAI Y, WANG Q, LIAO J, ET AL. Cutting edge: 1,25-dihydroxyvitamin D3 is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression. *J Immunol.* 2004;173(5):2909–12.
40. SCHAUBER J, DORSCHNER RA, CODA AB, BÜCHAU AS, LIU PT, KIKEN D, ET AL. Injury enhances TLR2 function and antimicrobial peptide expression through a vitamin D-dependent mechanism. *J Clin Invest.* 2007;117(3):803–11.
41. KUO C, LIM S, KING NJC, JOHNSTON SL, BURGESS JK, BLACK JL, ET AL. Rhinovirus infection induces extracellular matrix protein deposition in asthmatic and nonasthmatic airway smooth muscle cells. *AJP Lung Cell Mol Physiol.* 2011;300(6):L951–7.
42. ZHAO S, LIANG H. Is low serum 25-hydroxyvitamin D level a possible link between pulmonary tuberculosis and type 2 diabetes? *airitfile.com.* 2017;26(2):241–6.
43. CHIU KC, CHU A, GO VL SM. Hypovitaminosis D is associated with insulin resistance and beta cell dysfunction. *Am J Clin Nutr.* 2004;79(4):820–825.

Referências bibliográficas

44. ISAIA G, GIORGINO R, ADAMI S. High prevalence of hypovitaminosis D in female type 2 diabetic population. *Diabetes Care*. 2001;
45. RABY BA, LAZARUS R, SILVERMAN EK, LAKE S, LANGE C, WJST M, ET AL. Association of vitamin D receptor gene polymorphisms with childhood and adult asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;170(10):1057–65.
46. POON AH, LAPRISE C, LEMIRE M, MONTPETIT A, SINNETT D, SCHURR E, ET AL. (background II) Association of vitamin D receptor genetic variants with susceptibility to asthma and atopy. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;170:967–73.
47. VOLLMERT C, ILLIG T, ALTMÜLLER J, KLUGBAUER S, LOESGEN S, DUMITRESCU L, ET AL. Single nucleotide polymorphism screening and association analysis--exclusion of integrin beta 7 and vitamin D receptor (chromosome 12q) as candidate genes for asthma. *Clin Exp Allergy*. 2004;34(12):1841–50.
48. WJST M. Variants in the vitamin D receptor gene and asthma. *BMC Genet*. 2005;25:2–9.
49. WITTKA A, WEAVER V, MAHON BD, AUGUST A, CANTORNA MT. Vitamin D Receptor-Deficient Mice Fail to Develop Experimental Allergic Asthma. *J Immunol*. 2004;173(5):3432–6.
50. WITTKA A, CHANG A, FROICU M, HARANDI OF, WEAVER V, AUGUST A, ET AL. Vitamin D receptor expression by the lung micro-environment is required for maximal induction of lung inflammation. *Arch Biochem Biophys*. 2007;460(2):306–13.
51. SEARING DA, ZHANG Y, MURPHY JR, HAUK PJ, GOLEVA E, LEUNG DYM. Decreased serum vitamin D levels in children with asthma are associated with increased corticosteroid use. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(5):995–1000.
52. GOLEVA E, SEARING DA, JACKSON LP, RICHERS BN, LEUNG DYM. Steroid requirements and immune associations with vitamin D are stronger in children than adults with asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;129(5):1243–51.
53. BREHM JM, SCHUEMANN B, FUHLBRIGGE AL, HOLLIS BW, STRUNK RC, ZEIGER RS, ET AL. Serum vitamin D levels and severe asthma exacerbations in the Childhood

Referências bibliográficas

- Asthma Management Program study. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;126(1):52–8.e5.
54. T.A. M, J. M. Relationship between serum vitamin D, disease severity, and airway remodeling in children with asthma. *Pediatrics.* 2012;130(SUPPL.1):S28–9.
55. SUTHERLAND ER, GOLEVA E, JACKSON LP, STEVENS AD, LEUNG DY. Vitamin D levels, lung function, and steroid response in adult asthma. *AmJRespirCrit Care Med.* 2010;181(1535–4970 (Electronic)):699–704.
56. CASTRO M, KING TS, KUNSELMAN SJ, CABANA MD, DENLINGER L, HOLGUIN F, ET AL. Effect of vitamin D3 on asthma treatment failures in adults with symptomatic asthma and lower vitamin D levels: the VIDA randomized clinical trial. *JAMA.* 2014;311(20):2083–91.
57. VASILIOU JE, LUI S, WALKER SA, CHOHAN V, XYSTRAKIS E, BUSH A, ET AL. Vitamin D deficiency induces Th2 skewing and eosinophilia in neonatal allergic airways disease. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol.* 2014;69(10):1380–9.
58. FOONG RE, BOSCO A, JONES AC, GOUT A, GORMAN S, HART PH, ET AL. The effects of in utero Vitamin D deficiency on airway smooth muscle mass and lung function. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2015;53(5):664–75.
59. ZOSKY GR, BERRY LJ, ELLIOT JG, JAMES AL, GORMAN S, HART PH. Vitamin D deficiency causes deficits in lung function and alters lung structure. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011;183(10):1336–43.
60. FOONG RE, SHAW NC, BERRY LJ, HART PH, GORMAN S, ZOSKY GR. Vitamin D deficiency causes airway hyperresponsiveness, increases airway smooth muscle mass, and reduces TGF- β expression in the lungs of female BALB/c mice. *Physiol Rep.* 2014;2(3):e00276-10.
61. AGRAWAL T, GUPTA GK, AGRAWAL DK. Vitamin D supplementation reduces airway hyperresponsiveness and allergic airway inflammation in a murine model. *Clin Exp Allergy.* 2013;43(6):672–83.
62. LAI G, WU C, HONG J, SONG Y. 1, 25-Dihydroxyvitamin D3 (1, 25-(OH) 2D3)

Referências bibliográficas

- attenuates airway remodeling in a murine model of chronic asthma. *J Asthma* [Internet]. 2013 [cited 2017 Jun 8]; Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/02770903.2012.738269>
63. NGUYEN M, TRUBERT CL, RIZK-RABIN M, REHAN VK, BESANÇON F, CAYRE YE, ET AL. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and fetal lung maturation: Immunogold detection of VDR expression in pneumocytes type II cells and effect on fructose 1,6 bisphosphatase. In: *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2004. p. 93–7.
 64. ZOSKY GR, HART PH, WHITEHOUSE AJO, KUSEL MM, ANG W, FOONG RE, ET AL. Vitamin D deficiency at 16 to 20 weeks' gestation is associated with impaired lung function and asthma at 6 years of age. *Ann Am Thorac Soc*. 2014;11(4):571–7.
 65. MIYAKE, Y.; \T SASAKI, S.; \T TANAKA, K.; \T HIROTA Y. Dairy food, calcium and vitamin D intake in pregnancy, and wheeze and eczema in infants\n. *Eur Respir J*. 2010;35(6):1228–34.
 66. C.A. CJ, S.L. R-S, A.A. L, J.W. R-E, S.T. W, D.R. G, ET AL. Maternal intake of vitamin D during pregnancy and risk of recurrent wheeze in children at 3 y of age. *Am J Clin Nutr*. 2007;85(3):788–95.
 67. ERKKOLA M, KAILA M, NWARU BI, KRONBERG-KIPPILÄ C, AHONEN S, NEVALAINEN J, ET AL. Maternal vitamin D intake during pregnancy is inversely associated with asthma and allergic rhinitis in 5-year-old children. *Clin Exp Allergy*. 2009;39(6):875–82.
 68. FREISHTAT R, IQBAL S, PILLAI D, KLEIN C. High prevalence of vitamin D deficiency among inner-city African American youth with asthma in Washington, DC. *J* [Internet]. 2010 [cited 2017 Jun 16]; Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022347609012906>
 69. GALE C, ROBINSON S, HARVEY N. Maternal vitamin D status during pregnancy and child outcomes. *Eur J* [Internet]. 2008 [cited 2017 Jun 16]; Available from: <http://www.nature.com/ejcn/journal/v62/n1/abs/1602680a.html>

Referências bibliográficas

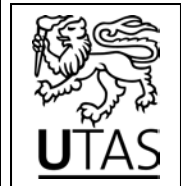
70. DEVEREUX G, WILSON A, AVENELL A, MCNEILL G, FRASER W. A case-control study of vitamin D status and asthma in adults. *Allergy*. 2010;65(5):666–7.
71. NIALS AT, UDDIN S. Mouse models of allergic asthma: acute and chronic allergen challenge. *Dis Model Mech* [Internet]. 2008;1(4–5):213–20. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2590830&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
72. SWIRSKI FK, SAJIC D, ROBBINS CS, GAJEWSKA BU, JORDANA M, STAMPFLI MR. Chronic Exposure to Innocuous Antigen in Sensitized Mice Leads to Suppressed Airway Eosinophilia That Is Reversed by Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor. *J Immunol* [Internet]. 2002;169(7):3499–506. Available from: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.169.7.3499>
73. VAN HOVE CL, MAES T, JOOS GF, TOURNOY KG. Prolonged inhaled allergen exposure can induce persistent tolerance. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2007;36(5):573–84.
74. CATES E, FATTOUH R, JOHNSON J, LLOP-GUEVARA A, JORDANA M. Modeling responses to respiratory house dust mite exposure. Vol. 14, *Contributions to Microbiology*. 2007. p. 42–67.
75. THOMAS WR, SMITH W-A, HALES BJ, MILLS KL, O'BRIEN RM. Characterization and immunobiology of house dust mite allergens. *Int Arch Allergy Immunol* [Internet]. 2002;129(1):1–18. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12372994>
76. ZOSKY GR, SLY PD. Animal models of asthma. *Clin Exp Allergy* [Internet]. 2007;37(7):973–88. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17581191>
77. ZOSKY GR, JANOSI TZ, ADAMICZA A, BOZANICH EM, CANNIZZARO V, LARCOMBE AN, ET AL. The bimodal quasi-static and dynamic elastance of the murine lung. *J Appl Physiol*. 2008;105(2):685–92.
78. HANTOS, Z; DAROCZY, B; SUKI, B; DARÓCZY, B; SUKI, B; NAGY, S; FREDBERG, JJ; DAROCZY B. Input impedance and peripheral inhomogeneity of dog lungs. *J Appl*

Referências bibliográficas

Physiol. 1992;72(1):168–78.

ANEXOS

Anexo 1- Aprovação do Comitê de ética

	University of Tasmania Animal Ethics Committee ETHICS APPROVAL PERMIT	University of Tasmania Office of Research Services Ph: 03 62267283 Fax: 03 62267148 animal.ethics@utas.edu.au
---	---	---

To: Prof Graeme Zosky

From: Marilyn Pugsley Executive Officer Animal Ethics

Date: 24 September 2013

Project: A13525 – Assessing the impact of Vitamin D deficiency on lung growth and chronic lung disease

Approved on: 20 September 2013

Approval expires: 20 September 2016 1st Annual Report due: 20 September 2014

Please read this permit carefully as **approval may be withdrawn**

for projects that do not comply with the conditions

The Animal Ethics Committee has approved the above project. The approval is subject to the review and approval of an annual report which is due on the approval anniversary. **Please note this date in your diary.**

If the project is to continue past the expiry date, a new initial application will need to be submitted. A project can only be approved for a maximum of 3 years.

As the Responsible Investigator, you **MUST** ensure that:

- (a) all aspects of the work conform to the requirements of the current edition of the *Australian code of practice for the care and use of animals for scientific purposes* 8th edition 2013
- (b) a full record is maintained of all animals used in this project. If at any stage you anticipate the need to use additional animals this must be communicated to the committee before use. Using additional animals

Anexos

without AEC approval is a breach of your ethics permit.

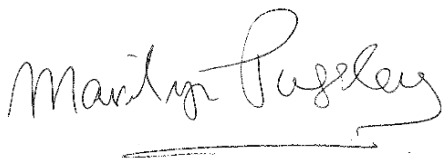
- (c) you contact the Animal Welfare Officer, Dr Sue Ottomanski (sue.ottomanski@utas.edu.au) to advise her when and where your experiments will be conducted. Sufficient notice needs to be given so that if the AWO wishes to make an inspection, this can be easily arranged.
- (d) That all investigators attend Ethics training sessions every three years. Contact the Executive Officer Animal Ethics for the next available session.

The Animal Ethics Committee is to be promptly notified of any unexpected events which occur during the period of the approved project and impact on the welfare of the animals.

Autopsy should be performed by a qualified veterinarian when animals die unexpectedly. Any foreseeable departure from this requirement must have been outlined and approved in the initial application.

If the investigation necessitates a Parks & Wildlife permit you are required to send a copy of this permit to the AEC Secretary before commencing work.

Animals used: 4,000 BALB/c Mice



Marilyn Pugsley
Executive Officer Animal Ethics

University of Tasmania Animal Ethics Committee	
Ethics Number	A13525

Anexos

Project Name	Assessing the impact of Vitamin D deficiency on lung growth and chronic lung disease
Chief Investigator	Prof G Zosky
School	Medicine
Person responsible for day-to-day care	
Ethics start date	20 September 2013
Ethics approved to	20 September 2016 (with annual renewal)
No of animals approved	4000
Emergency Contact	

APÊNDICE

1 Artigo Original – publicado na revista Scientific Reports

The independent effects of vitamin D deficiency and house dust mite exposure on lung function are sex-specific

Authors: Nailê K. Nuñez ^{1,2, *}, Ellen Bennett ², Ling Chen ², Paulo Márcio Pitrez ¹, Graeme R. Zosky²

¹ Laboratory of Pediatric Respiriology, Infant Center, Institute of Biomedical Research, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil; ² School of Medicine, Faculty of Health, University of Tasmania, Hobart, Tasmania, Australia.

Vitamin D deficiency is increasing around the world and has been associated with the development of asthma. This study aims to evaluate the effect of dietary vitamin D deficiency at different life stages on lung function using a murine model of allergic airways disease. BALB/c mice were challenged intranasally with HDM or saline alone for 10 days. Twenty four hours after the last challenge, mice were anesthetized and lung function was measured using the forced oscillation technique (FOT). Mice were euthanized for assessment of inflammation in the bronchoalveolar lavage (BAL) and total collagen content in lung homogenates by ELISA. Vitamin D deficiency impaired lung function in both male and female mice, increasing tissue damping and elastance, however had no effect on HDM induced inflammation. The impact of vitamin D deficiency was more evident in females. HDM also decreased airway distensibility, but only in females and this response was not altered by vitamin D deficiency. Our data suggest that vitamin D deficiency and HDM exposure have independent effects on lung

Artigo original

mechanics and that females are more susceptible to these effects. Vitamin D deficiency may exacerbate lung function deficits by having a direct, but independent, effect on parenchymal mechanics.

Keywords: Vitamin D deficiency, house dust mite, lung function, mouse model

Introduction

Asthma is a chronic disease characterized by airway inflammation, airway remodeling and reversible deficits in lung function (1,2). The prevalence of asthma increases when communities adopt western lifestyles and become more urbanized (3–6). Due to the associated reduction in outdoor activity, some have suggested that vitamin D deficiency may be responsible for this association (5). It has been estimated that one billion people around the world have inadequate levels of vitamin D due to many factors such as an indoor life style, increased use of sunscreen (7) and low dietary vitamin D (8). Due to the scale of this problem, it is important that we understand the potential health implications of widespread vitamin D deficiency.

While recent vitamin D supplementation trials in community based cohorts of pregnant women have shown no effect on the risk of wheeze in children at 3 years of age (9,10), it is unclear whether maternal vitamin D supplementation has effects on postnatal lung function, which is an important risk factor for asthma later in life (11). We have shown that maternal vitamin D deficiency at 16-20 weeks' gestation is associated with impaired lung function at 6 years of age in offspring (12). In line with this finding, we have also shown that *in utero* vitamin D deficiency is sufficient to induce increased

Artigo original

airway smooth muscle (ASM) mass and cause deficits in lung function in a mouse model (13–15); both of which are key characteristics of the asthmatic phenotype (1).

While these observations point to a role for vitamin D deficiency in causing alterations in lung structure, the inflammatory process itself can also lead to airway remodeling. House dust mite (HDM), a prevalent environmental allergen, is associated with allergic airway diseases (16) and drives inflammatory processes that are associated with airway remodeling (17,18) resulting in increased airway resistance (19). HDM induces a robust Th-2 driven inflammatory response in the airways that is characterized by eosinophilia and the production of IL-4, IL-5 and IL-13 (17,18). These inflammatory processes lead to goblet cell metaplasia, an increase in ASM thickness and deposition of collagen around the airways (18,20). Collectively, these structural changes cause deficits in lung function (18,19,21).

Given that both vitamin D deficiency and HDM may lead to deficits in lung function, we investigated the interaction between vitamin D deficiency and HDM, and their effects on lung function. We hypothesized that the combination of vitamin D deficiency and HDM exposure would lead to deficits in lung function that are greater than the individual effects of vitamin D deficiency and HDM alone. We addressed this hypothesis by evaluating the effects of *in utero*, postnatal and whole life vitamin D deficiency on lung function in a murine model of HDM induced allergic airways disease.

Materials and Methods

Artigo original

Mouse model

All studies were conducted with the approval of the University of Tasmania Animal Ethics Committee and conformed to the guidelines of the National Health and Medical Research Council (Australia). Three-week old female BALB/c mice (Cambridge Farm Facility, University of Tasmania, TAS, AU) were placed on vitamin D deficient or replete diets and mated with vitamin D replete males at 8 weeks of age as described previously (14). Pups were cross fostered at birth to assess the effects of *in utero* (Vit D -/+), postnatal (Vit D +/-) and whole-life (Vit D -/-) vitamin D-deficiency on inflammation and lung function outcomes compared to replete controls (Vit D +/+) (15). At 8 weeks of age (7-13 mice per group; see Figure legends for further details), male and female offspring were challenged intranasally with 25 µg of an HDM extract (Greer Laboratories, Lenoir, NC, USA) in 50 µl of saline or saline alone for 10 consecutive days under light methoxyflurane anesthesia. Twenty four hours after the last challenge, the outcomes described below were assessed.

Lung function

Mice were anesthetized with ketamine (40 mg/mL) and xylazine (2 mg/mL) by intraperitoneal injection at a dose of 0.01 mL/g body weight. Two-thirds of the dose was administered before tracheostomy and cannulation, and the remaining anesthetic was given when the mice were connected to the animal ventilator (HSE-Harvard MiniVent; Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA). Mice were ventilated at 400 breaths/min with a tidal volume of 10 mL/kg, and 2 cmH₂O of positive end-expiratory pressure (PEEP). Lung mechanics were assessed using a modified low frequency forced oscillation technique (LFOT) (22) during slow inflation manoeuvres from end-expiratory lung volume (EELV), up to 20 cmH₂O transrespiratory pressure (Prs) (22).

Artigo original

The oscillatory signal consisted of 9 frequencies ranging from 4-38 Hz and was delivered to the endotracheal cannula via a wavetube of known impedance to calculate the respiratory system impedance. A four-parameter model with constant-phase tissue impedance was fitted to the respiratory system impedance spectrum (23). This allowed us to calculate airway resistance (R_{aw}), tissue damping (G), tissue elastance (H) and hysteresivity ($\eta = G/H$) from 0 to 20 cmH₂O Prs. We also used these data to calculate airway distensibility as the slope of the conductance ($G_{aw} = 1/R_{aw}$) versus pressure curve between 2 and 10 cmH₂O Prs.

Differential cell counts

After lung function measurements, mice were euthanized with an overdose of ketamine/xylazine, and a bronchoalveolar lavage (BAL) was performed by washing the lung 3 times with 500 μ L of saline. The BAL was centrifuged at 5000 rpm for 5 minutes. Cytospin slides were generated from the resuspended pellet and stained with Haem Kwik (HD Scientific Supplies Pty Ltd., AU). Differential cells counts were performed under light microscopy by counting a minimum of 200 cells per mouse.

Collagen

We have previously found that vitamin D deficiency can increase collagen type 1 alpha 1 (COL1A1) expression *in utero* (24) which may impact on lung mechanics. In order to determine whether this persisted into adulthood, and whether it was altered by HDM exposure, we assessed COL1A1 expression in lung homogenates by ELISA according to the manufacturer's instructions (DLDEVELOP Ltd., Wuxi, Jiangsu, PRC). COL1A1 levels were calculated relative to total protein content in the lung measured by Bradford assay (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Artigo original

Statistical analysis

SigmaPlot (v12.5, Systat, Germany) was used to perform the statistical analysis. Two-way ANOVA with Holm-Sidak posthoc tests were used to assess the effect of vitamin D and HDM exposure on the outcomes of interest. Data were log-transformed when necessary to satisfy the model assumptions. A p-value <0.05 was considered significant. Data are presented as mean (SD).

Results

Lung function

R_{aw} , G, H and η have characteristic pressure dependences (25). Specifically, R_{aw} (airway resistance) decreases monotonically from 0 to 20 cmH₂O Prs (Figure 1A), G (tissue damping) and H (tissue elastance) (Figure 1B, 1C) initially decrease as Prs increases before increasing exponentially at high Prs, while η (hysteresivity = G/H; Figure 1D) initially increases before decreasing at high Prs. In order to simplify the analysis of our data, and to facilitate simple comparisons between groups, we characterized the pressure dependence of lung mechanics using the following indices: R_{aw} , G, H and η at 0 cmH₂O Prs (R_0 , G_0 , H_0 , η_0), R_{aw} , G, H and η at 20 cmH₂O Prs (R_{20} , G_{20} , H_{20} , η_{20}), the minimum G and H (G_{min} , H_{min}) and the maximum η (η_{max}) (Figure 1). We then compared these parameters for each of the vitamin D deficiency groups (Vit D -/-, Vit D -/+ and Vit D +/-) against the replete controls (Vit D +/+).

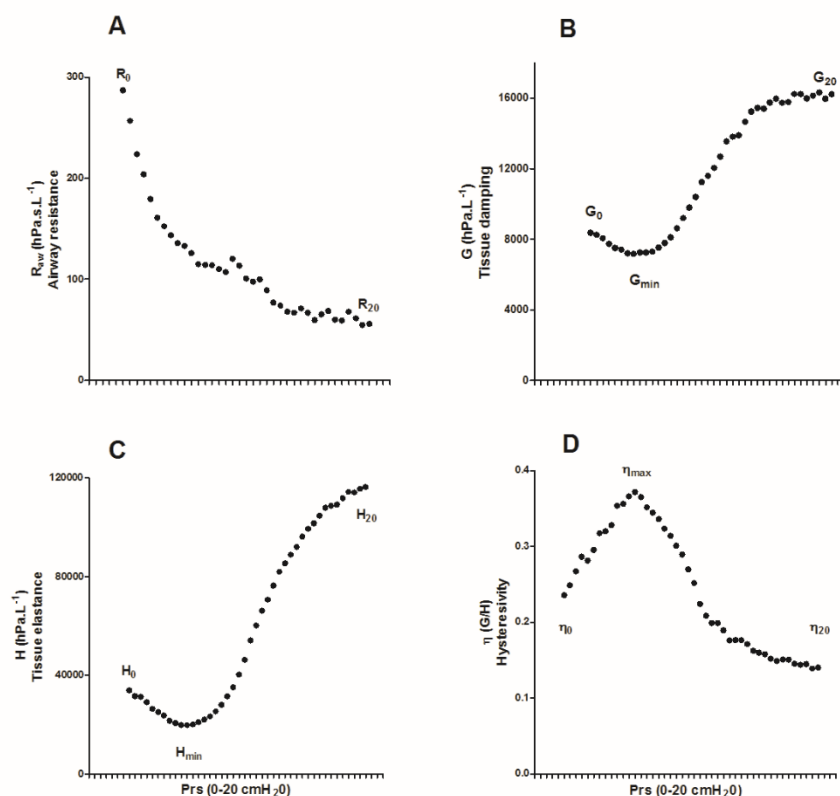


Figure 1: Mean R_{aw} (A; Newtonian resistance ~ airway resistance), G (B; tissue damping), H (C; tissue elastance) and η (D; hysteresivity) plotted against transrespiratory pressure (Prs) for female vitamin D replete (Vit D +/+) mice showing the characteristic pressure dependence of these parameters. In order to simplify the subsequent comparisons between groups we represented these curves by the indices indicated in the graphs; R_0 , R_{20} , G_0 , G_{min} , G_{20} , H_0 , H_{min} , H_{20} , η_0 , η_{max} , η_{20} .

Females

In females, R_{aw} was not affected by HDM ($p > 0.05$ for all comparisons) or vitamin D deficiency ($p > 0.05$ for all comparisons, *data not shown*). However, whole-life vitamin D deficiency increased tissue damping (Figure 2A) at G_{min} (7470 hPa.L^{-1} vs 6730 hPa.L^{-1} ; $p=0.027$) and G_{20} (18460 hPa.L^{-1} vs 17090 hPa.L^{-1} ; $p=0.046$), tissue elastance (Figure 3A) at H_0 (42730 hPa.L^{-1} vs 35210 hPa.L^{-1} ; $p<0.001$) and decreased hysteresivity (Figure 4A) at η_0 (0.21 vs 0.25 ; $p<0.001$). Many of these deficits in lung mechanics were also evident in female mice that were only vitamin D deficient *in utero* or postnatally. *In utero* vitamin D deficiency increased tissue damping (Figure 2B) at

Artigo original

G_0 (10150 hPa.L⁻¹ vs 8720 hPa.L⁻¹; $p=0.023$), G_{min} (7820 hPa.L⁻¹ vs 6730 hPa.L⁻¹; $p=0.009$) and G_{20} (20080 hPa.L⁻¹ vs 17090 hPa.L⁻¹; $p=0.003$), tissue elastance (Figure 3B) at H_0 (42990 hPa.L⁻¹ vs 35210 hPa.L⁻¹; $p=0.005$) and H_{20} (132500 hPa.L⁻¹ vs 114640 hPa.L⁻¹; $p=0.002$) and decreased the hysteresivity (Figure 4B) at η_{max} (0.39 vs 0.38; $p=0.037$) and η_{20} (0.39 vs 0.38; $p=0.025$). Postnatal vitamin D deficiency increased tissue damping (Figure 2C) at G_{min} (7830 hPa.L⁻¹ vs 6730 hPa.L⁻¹; $p=0.007$) and at G_{20} (19160 hPa.L⁻¹ vs 17090 hPa.L⁻¹; $p=0.009$), tissue elastance (Figure 3C) at H_0 (43260 hPa.L⁻¹ vs 35210 hPa.L⁻¹; $p<0.001$), H_{min} (22540 hPa.L⁻¹ vs 19000 hPa.L⁻¹; $p=0.023$) and at H_{20} (133770 hPa.L⁻¹ vs 114640 hPa.L⁻¹; $p=0.004$) and decreased the hysteresivity (Figure 4C) at η_0 (0.22 vs 0.25; $p=0.006$) and at η_{20} (0.13 vs 0.14; $p=0.042$). House dust mite had no effect on these measures of lung mechanics ($p > 0.05$ for all comparisons). In contrast, HDM decreased airway distensibility ($p=0.036$, Figure 5), a measure of airway stiffness, in female whole-life vitamin D deficient, while vitamin D deficiency had no effect on airway distensibility ($p>0.05$).

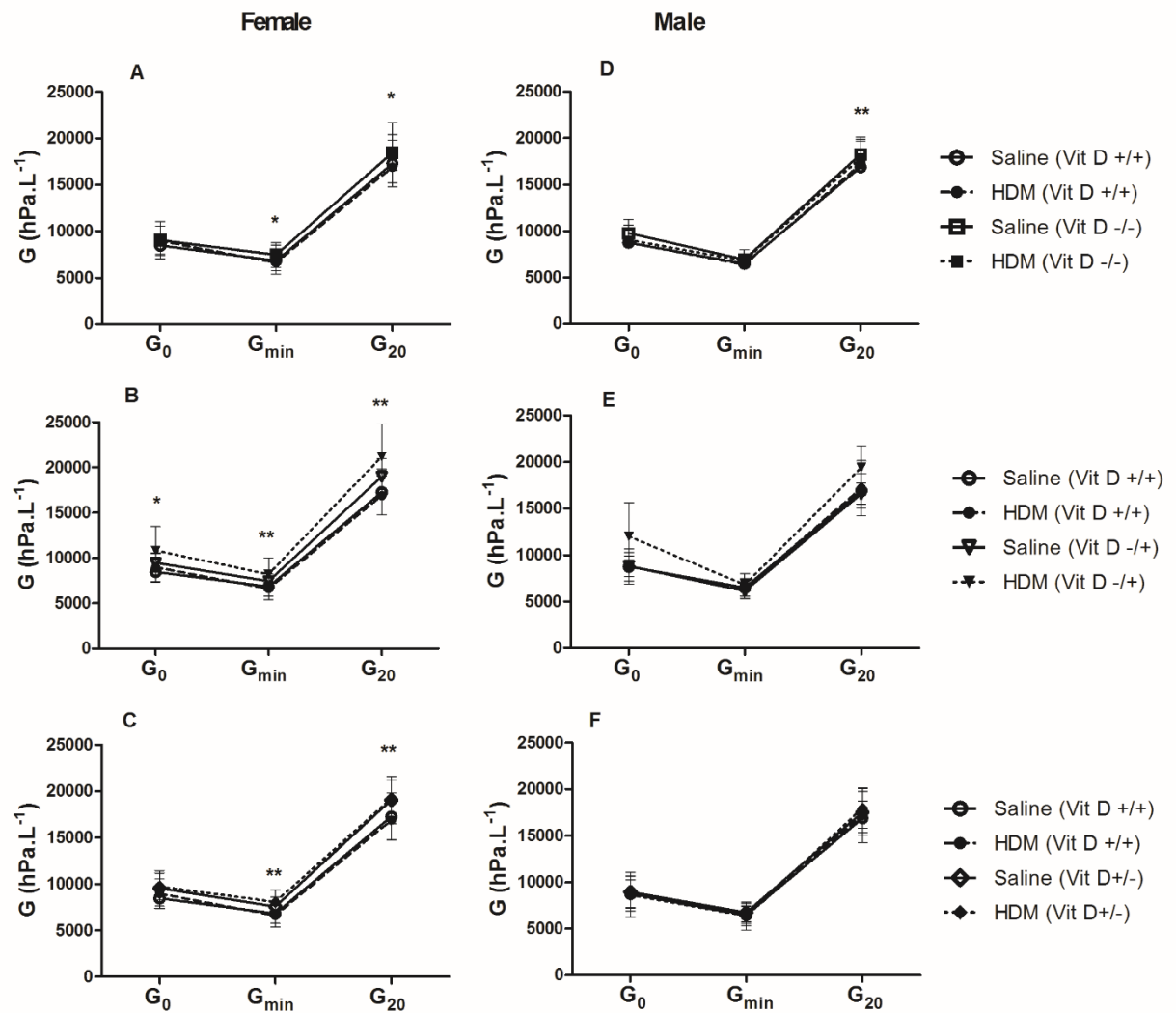


Figure 2: Tissue damping (G) at 0 cmH₂O Prs (G₀), 20 cmH₂O Prs (G₂₀) and the minimum (G_{min}) for female (A, B, C) and male (D, E, F) saline and house dust mite (HDM) exposed mice that were vitamin D replete (Vit D +/+), whole-life vitamin D deficient (Vit D -/-; A, D), *in utero* vitamin D deficient (Vit D +/-; B, E) or post-natal vitamin D deficient (Vit D +/-; C, F). Data are presented as mean (SD), n=9-13 for each group. *, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001.

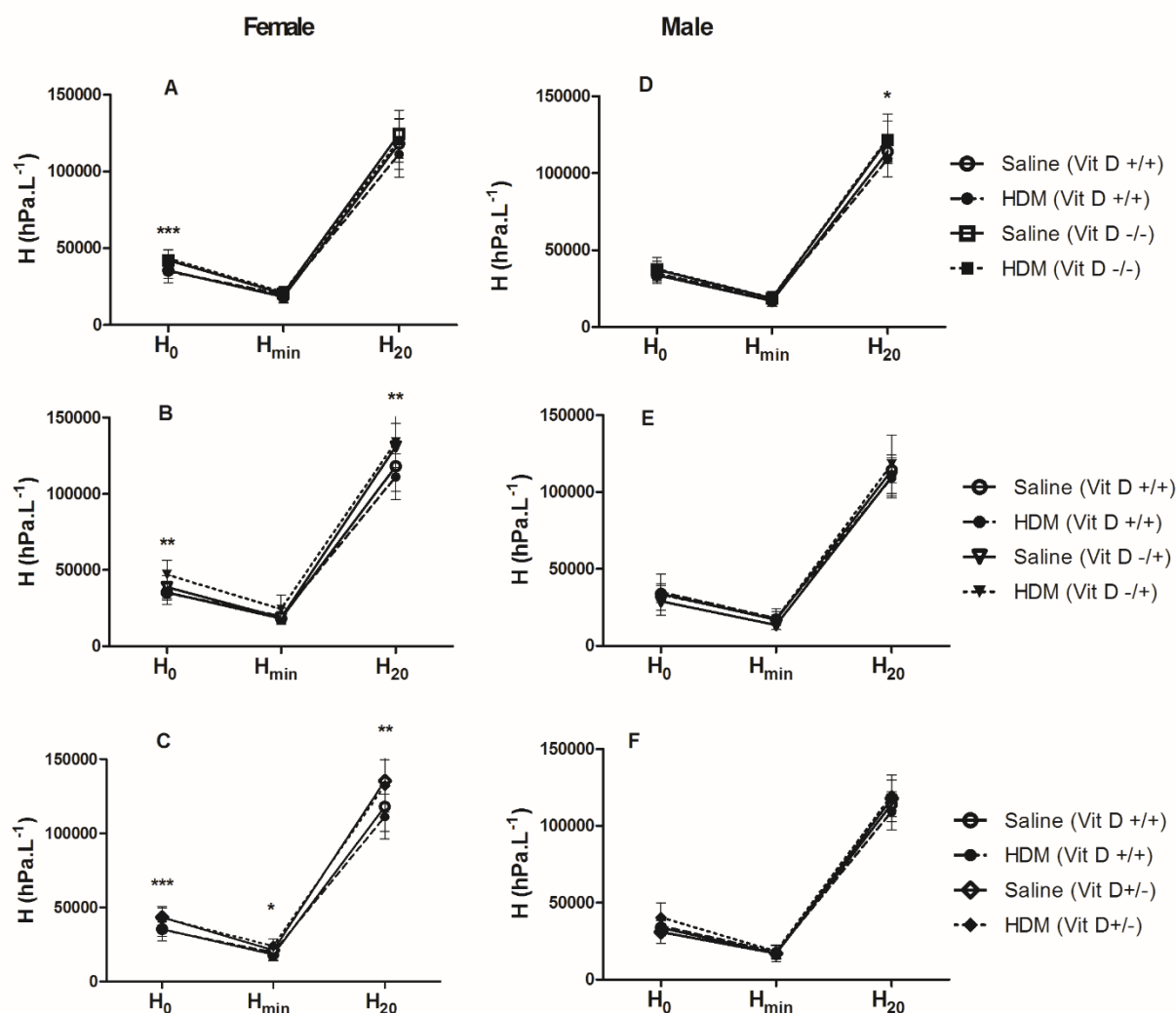


Figure 3: Tissue elastance (H) at 0 cmH₂O Prs (H₀), 20 cmH₂O Prs (H₂₀) and the minimum (H_{min}) for female (A, B, C) and male (D, E, F) saline and house dust mite (HDM) exposed mice that were vitamin D replete (Vit D +/+), whole-life vitamin D deficient (Vit D -/-; A, D), *in utero* vitamin D deficient (Vit D -/+; B, E) or post-natal vitamin D deficient (Vit D +/-; C, F). Data are presented as mean (SD), n=9-13 for each group. *, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001.

Males

In males, whole-life vitamin D deficiency increased airway resistance at R₀ (p=0.017, *data not shown*), tissue damping at G₂₀ (18070 hPa.L⁻¹ vs 17040 hPa.L⁻¹; p=0.008) (Figure 2D) and, tissue elastance at H₂₀ (122340 hPa.L⁻¹ vs 111740 hPa.L⁻¹; p=0.011) (Figure 3D), with no differences in hysteresivity (Figure 4D). Similar to the female mice,

Artigo original

HDM exposure did not affect R_{aw} , G, H or η ($p > 0.05$ for all comparisons). In contrast to the female mice, deficits in lung mechanics were only observed in male mice that were whole-life vitamin D deficient, while airway distensibility (Figure 5B) was not affected by HDM exposure ($p = 0.48$) or vitamin D deficiency ($p = 0.85$).

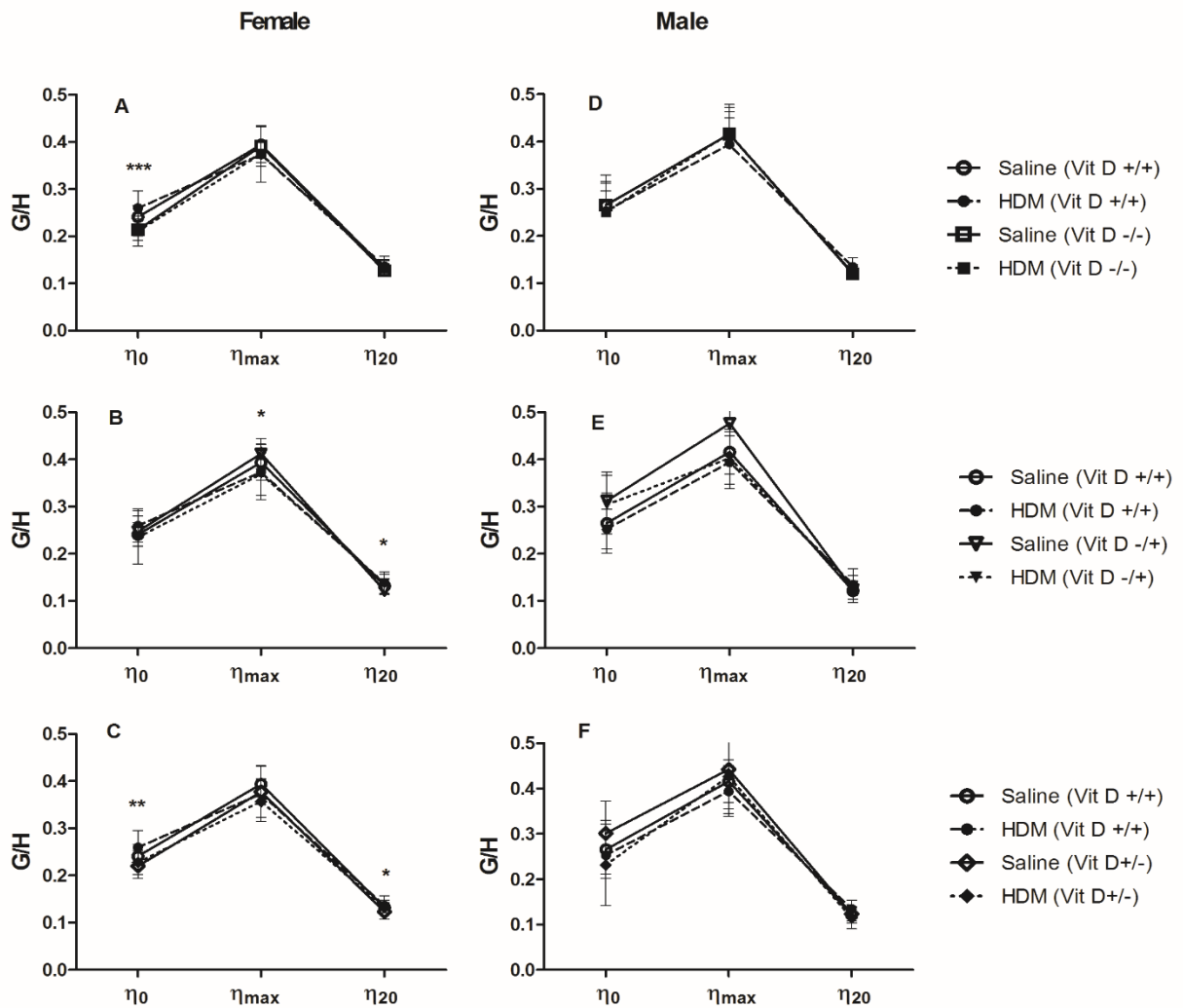


Figure 4: Hysteresivity at 0 cmH₂O Prs (η_0), 20 cmH₂O Prs (η_{20}) and the maximum (η_{max}) for female (A, B, C) and male (D, E, F) saline and house dust mite (HDM) exposed mice that were vitamin D replete (Vit D +/+), whole-life vitamin D deficient (Vit D -/-; A, D), *in utero* vitamin D deficient (Vit D +/-; B, E) or post-natal vitamin D deficient (Vit D +/-; C, F). Data are presented as mean (SD) n=9-13 for each group. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

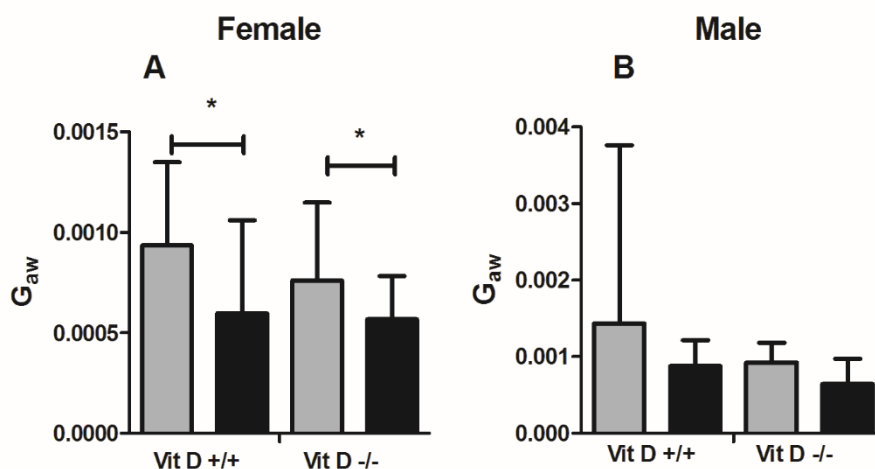


Figure 5: Airway distensibility, calculated as the slope of the conductance ($G_{aw} = 1/R_{aw}$) versus pressure curve between 2 and 10 cmH₂O Prs, for female (A) and male (B) vitamin D replete (Vit D +/+) and vitamin D deficient (Vit D -/-) mice exposed to 25 μ g of HDM in 50 μ L intranasally for 10 days (black bars) or saline alone (grey bars). Data are presented as mean (SD), n=7-10 for each group in female and 8-12 in male. * $p < 0.05$.

Differential cell counts

Females

In females, HDM caused an influx of eosinophils ($p < 0.001$) and lymphocytes ($p = 0.008$) in the BAL (Figure 6A and B), however vitamin D deficiency had no effect on the HDM induced influx of eosinophils ($p = 0.811$) or lymphocytes ($p = 0.320$). Neutrophil and macrophage numbers were not altered by vitamin D deficiency (neutrophils, $p = 0.928$; macrophages, $p = 0.157$) or by HDM (neutrophils, $p = 0.631$; macrophages, $p = 0.231$) (*data not shown*).

Males

In males, HDM caused an influx of eosinophils ($p < 0.001$, Figure 6C) and neutrophils ($p < 0.001$, *data not shown*), while vitamin D deficiency had no effect on these cells (eosinophils, $p = 0.761$; neutrophils, $p = 0.550$). In contrast to the female mice, HDM also increased lymphocytes numbers in the BAL (Figure 6D), but only in the groups that

Artigo original

were vitamin D deficient (Vit D $-/-$ $p=0.003$, Vit D $-/+$ $p=0.012$ and Vit D $+/-$ $p<0.001$). Macrophage numbers in the BAL were not affected by vitamin D ($p=0.125$) or HDM ($p=0.779$) in male mice (*data not shown*).

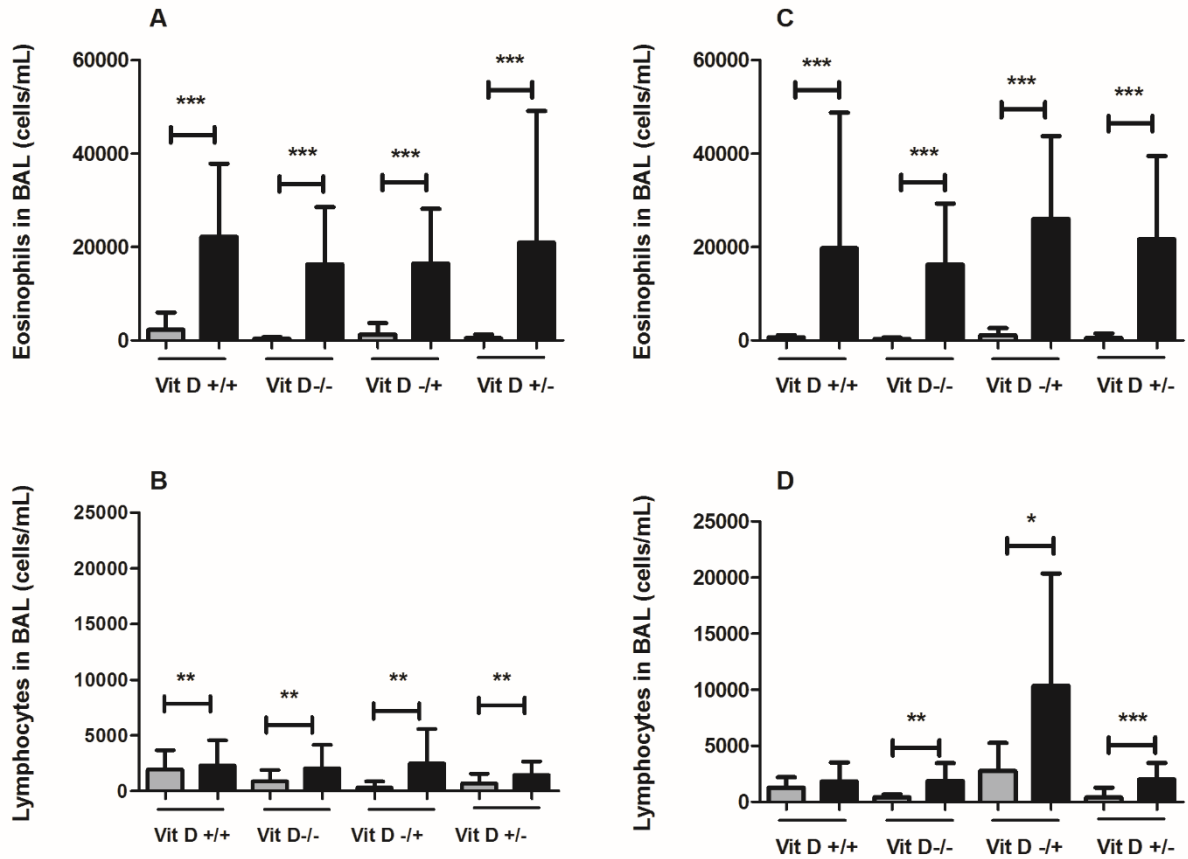


Figure 6: Eosinophil (A, C) and lymphocyte (B, D) cell counts in the BAL of female (A,B) and male (C,D) mice that were whole-life replete (Vit D $+/+$), whole-life deficient (Vit D $-/-$), *in utero* deficient (Vit D $-/+$) or postnatally deficient (Vit D $+/-$) in vitamin D and exposed to 25 μ g of house dust mite (HDM; black bars) intranasally in 50 μ L of saline or saline alone (grey bars) for 10 consecutive days. Data are presented as mean (SD), $n=8-11$ for each group in females and $7-11$ in males. *, $p<0.05$; **, $p<0.01$; ***, $p<0.001$.

Collagen

Artigo original

We sought to determine whether the effects we saw were due to differences in COL1A1 expression, however there were no differences in COL1A1 between groups (*data not shown*).

Discussion

In this study, we evaluated the independent and combined effect(s) of vitamin D deficiency during different life stages (*in utero* and/or postnatal) and allergen exposure on lung function outcomes using a mouse model. Vitamin D deficiency *in utero* and/or postnatally had wide-ranging effects on lung function, particularly in female mice, causing significant impairments in tissue mechanics (G, H and G/H). Vitamin D deficiency also resulted in an impairment in lung mechanics (R_{aw} , G, and H) in male mice, but to a lesser extent than observed in females, and only in response to whole-life vitamin D deficiency. Vitamin D deficiency did not appear to have an influence on airway stiffness. In contrast, while HDM had no effect on the pressure dependence of R_{aw} , G or H it significantly decreased airway stiffness; but only in female mice. These differences were discordant with cellular inflammation and could not be explained by differences in collagen expression in the lungs. These findings suggest that vitamin D deficiency and HDM have independent effects on lung function, which are unrelated to inflammation, and are sex-dependent. Thus, the net effect of *in utero* vitamin D deficiency on lung outcomes may depend on whether you are female or male, and will be influenced by the effect of postnatal allergen responses via vitamin D independent pathways.

Artigo original

In this study, vitamin D deficiency had a significant impact on lung mechanics, particularly parenchymal tissue mechanics. In males these effects were limited to the whole-life vitamin D deficiency group while in females these deficits were evident in all deficient groups. The observation that whole-life vitamin D deficiency increased G , a measure of lung mechanics linked to the small airways and ventilation heterogeneity (26), in both males (at G_{20}) and females (G_{\min} and G_{20}) at 8 weeks of age is consistent with our previous studies on 2 weeks old animals (13). A similar pattern was observed in H , a measure of tissue stiffness, while changes in η were only observed in females. Collectively, these observations suggest that vitamin D deficiency has an impact on parenchymal lung mechanics. Given that we have previously shown that vitamin D deficiency does not affect lung volume in adulthood¹⁴, it is unlikely that these differences are due to the influence of vitamin D deficiency on somatic growth. Vitamin D deficiency in female mice, either *in utero* or postnatally, was sufficient to impair lung function. These deficits in lung function may increase susceptibility to chronic lung disease and respiratory morbidity later in life (27).

There are well described differences in lung mechanics between males and females and we have previously described increased susceptibility in females to altered lung function as a result of *in utero* vitamin D deficiency (12,15). In relation to asthma, boys have a higher prevalence of asthma in early life whereas, after puberty, asthma is more prevalent in females (28). Similarly, airway reactivity increases with age in females but decreases in males (29). Some of these sex differences in asthma susceptibility have been linked to estrogen levels (30) and estrogen signaling is a critical component of lung development (31). Given the intimate association between vitamin D and estrogen synthesis (32), it is possible that estrogen is related to the increased susceptibility of

Artigo original

females to the effects of vitamin D deficiency; although we did not directly address this in the present study.

Despite the strong impact of vitamin D deficiency on the pressure-dependent parenchymal mechanics, airway distensibility was not affected by vitamin D deficiency. However, airway distensibility was diminished after exposure to HDM, but only in whole-life vitamin D deficient female mice. Airway distensibility is related to airway stiffness and is reduced in asthmatics (33). Our observation provides evidence that HDM exposure can directly alter airway stiffness, which has been linked to the increased propensity of the asthmatic airway to constrict (34). Based on these data, it is clear that vitamin D and HDM had independent effects on lung function whereby vitamin D did not modify the response to HDM for any of the lung function outcomes we measured. Thus, the net effect of HDM exposure and vitamin D deficiency is likely to be additive.

Interestingly, these lung function responses were completely discordant with inflammation. For example, in female mice, HDM caused substantial eosinophilia that was unaltered by vitamin D deficiency and yet parenchymal mechanics was altered in response to vitamin D deficiency. In contrast, vitamin D deficiency modified the inflammatory response to HDM in male mice but this was not associated with alterations in lung mechanics. While eosinophilia was associated with decreased airway distensibility in the females, inflammation was clearly not sufficient to alter airway stiffness in all cases as this association was not evident in male mice. At this stage we also do not have a structural explanation for the alterations in lung function

Artigo original

and deficits in parenchymal mechanics as a result of vitamin D deficiency were not due to altered type 1 collagen levels.

There are several limitations to this study. Firstly, after the measurements of lung function and post-mortem tissue processing (collecting BAL fluid), we were unable to obtain reliable structural measurements that could be directly related to the changes in lung function. Secondly, structural protein analysis was limited to only one type of collagen, but it is possible the changes in lung mechanics may be related to other functional proteins such as surfactant proteins that are essential for lung function and pulmonary homeostasis.

Notwithstanding these limitations, our data suggest that vitamin D deficiency and HDM have independent effects on lung function that are sex-specific. HDM induces a robust inflammatory response that may lead to increased airway stiffness in females. In contrast, vitamin D deficiency had limited effects on inflammation but caused consistent deficits in parenchymal mechanics that were more pronounced in female mice. Interestingly, *in utero* or postnatal vitamin D deficiency was sufficient to alter lung mechanics in these mice. While we were unable to identify mechanisms linking these observations, our data clearly highlight the complexity of the effects of vitamin D on lung function and the importance of probing the influence of sex on responses to respiratory insults.

Grants

This work was supported by a National Health and Medical Research Council Project Grant (1042235).

Disclosures

We have no conflicts of interest to disclose.

References

1. HOLGATE S. Pathogenesis of asthma. *Clin Exp Allergy*. 2008;38(6):872–97.
2. GALO BARDES B, GRANELL R, STERNE J, HUGHES R, MEJIA-LANCHEROS C, SMITH GD, ET AL. Childhood Wheezing, Asthma, Allergy, Atopy, and Lung Function: Different Socioeconomic Patterns for Different Phenotypes. *Am J Epidemiol*. 2015;182(9):763–74.
3. MASOLI M, FABIAN D, HOLT S, BEASLEY R. Global Burden of Asthma. *Chest J*. 2004;59(5):469–78.
4. BRAMAN SS. The global burden of asthma. *Chest*. 2006;130(1 SUPPL.):4S–12S.
5. LITONJUA AA, WEISS ST. Is vitamin D deficiency to blame for the asthma epidemic? *J Allergy Clin Immunol*. 2007;120(5):1031–5.
6. JAMES AL, KNUIMAN MW, DIVITINI ML, HUI J, HUNTER M, PALMER LJ, ET AL. Changes in the prevalence of asthma in adults since 1966: The Busselton health study. *Eur Respir J*. 2010;35(2):273–8.
7. KHO AT, SHARMA S, QIU W, GAEDIGK R, KLANDERMAN B, NIU S, ET AL. Vitamin D related genes in lung development and asthma pathogenesis. *BMC Med Genomics*. 2013;6(1):47.
8. HOLICK MF. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr*. 2004;80(6):1678S–1688.
9. CHAWES BL, BØNNELYKKE K, STOKHOLM J, VISSING NH, BJARNADÓTTIR E, SCHOOS A-MM, ET AL. Effect of Vitamin D3 Supplementation During Pregnancy on Risk of Persistent Wheeze in the Offspring: A Randomized Clinical Trial. *Jama*. 2016;315(4):353–61.
10. LITONJUA AA, CAREY VJ, LARANJO N, HARSHFIELD BJ, McELRATH TF, O’CONNOR GT, ET AL. Effect of Prenatal Supplementation With Vitamin D on Asthma or Recurrent Wheezing in Offspring by Age 3 Years: The VDAART Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2016;315(4):362–70.
11. MULLANE D, TURNER SW, COX DW, COX D, GOLDBLATT J, LANDAU LI, ET AL. Reduced infant lung function, active smoking, and wheeze in 18-year-old individuals. *JAMA Pediatr*. 2013;167(4):368–73.
12. ZOSKY GR, HART PH, WHITEHOUSE AJO, KUSEL MM, ANG W, FOONG RE, ET AL. Vitamin D deficiency at 16 to 20 weeks’ gestation is associated with impaired lung function and asthma at 6 years of age. *Ann Am Thorac Soc*.

Artigo original

- 2014;11(4):571–7.
13. ZOSKY GR, BERRY LJ, ELLIOT JG, JAMES AL, GORMAN S, HART PH. Vitamin D deficiency causes deficits in lung function and alters lung structure. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;183(10):1336–43.
 14. FOONG RE, SHAW NC, BERRY LJ, HART PH, GORMAN S, ZOSKY GR. Vitamin D deficiency causes airway hyperresponsiveness, increases airway smooth muscle mass, and reduces TGF- β expression in the lungs of female BALB/c mice. *Physiol Rep*. 2014;2(3):e00276-10.
 15. FOONG RE, BOSCO A, JONES AC, GOUT A, GORMAN S, HART PH, ET AL. The effects of in utero Vitamin D deficiency on airway smooth muscle mass and lung function. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2015;53(5):664–75.
 16. GANDHI VD, DAVIDSON C, ASADUZZAMAN M, NAHIRNEY D, VLIAGOFTIS H. House dust mite interactions with airway epithelium: Role in allergic airway inflammation. Vol. 13, *Current Allergy and Asthma Reports*. 2013. p. 262–70.
 17. CATES EC, FATTOUH R, WATTIE J, INMAN MD, GONCHAROVA S, COYLE AJ, ET AL. Intranasal Exposure of Mice to House Dust Mite Elicits Allergic Airway Inflammation via a GM-CSF-Mediated Mechanism. *J Immunol*. 2004;173(9):6384–92.
 18. SAGLANI S, MATHIE SA, GREGORY LG, BELL MJ, BUSH A, LLOYD CM. Pathophysiological features of asthma develop in parallel in house dust mite-exposed neonatal mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2009;41(3):281–9.
 19. PHAN JA, KICIC A, BERRY LJ, FERNANDES LB, ZOSKY GR, SLY PD, ET AL. Rhinovirus exacerbates house-dust-mite induced lung disease in adult mice. *PLoS One*. 2014;9(3):e92163.
 20. JOHNSON JR, WILEY RE, FATTOUH R, SWIRSKI FK, GAJEWSKA BU, COYLE AJ, ET AL. Continuous exposure to house dust mite elicits chronic airway inflammation and structural remodeling. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;169(3):378–85.
 21. LI S, ALIYEVA M, DAPHTARY N, MARTIN R A, POYNTER ME, KOSTIN SF, ET AL. Antigen-induced mast cell expansion and bronchoconstriction in a mouse model of asthma. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2014;306:L196-206.
 22. ZOSKY GR, JANOSI TZ, ADAMICZA A, BOZANICH EM, CANNIZZARO V, LARCOMBE AN, ET AL. The bimodal quasi-static and dynamic elastance of the murine lung. *J Appl Physiol*. 2008;105(2):685–92.
 23. HANTOS, Z; DAROCZY, B; SUKI, B; DARÓCZY, B; SUKI, B; NAGY, S; FREDBERG, JJ; DAROCZY B. Input impedance and peripheral inhomogeneity of dog lungs. *J Appl Physiol*. 1992;72(1):168–78.
 24. CHEN L, WILSON R, BENNETT E, ZOSKY GR. Identification of vitamin D sensitive pathways during lung development. *Respir Res*. 2016;17:47.
 25. HANTOS Z, COLLINS R A, TURNER DJ, JÁNOSI TZ, SLY PD. Tracking of airway and

Artigo original

- tissue mechanics during TLC maneuvers in mice. *J Appl Physiol*. 2003;95(4):1695–705.
26. BATES JHT, IRVIN CG, FARRÉ R, HANTOS Z. Oscillation mechanics of the respiratory system. *Compr Physiol*. 2011;1(3):1233–72.
 27. STOCKS J, HISLOP A, SONNAPPA S. Early lung development: lifelong effect on respiratory health and disease. *Lancet Respir Med*. 2013;1(9):728–42.
 28. ZEIN JG, ERZURUM SC. Asthma is Different in Women. Vol. 15, *Current Allergy and Asthma Reports*. 2015. p. 1–10.
 29. MCKENZIE R, BURTON MD, ROYCE SG, TANG MLK. Age and sex influences on airway hyperresponsiveness. *J Asthma*. 2010;47(6):651–4.
 30. DRAIJER C, HYLKEMA MN, BOORSMA CE, KLOK PA, ROBBE P, POSTMA DS, ET AL. Sexual maturation protects against development of lung inflammation through estrogen 1 Running head: Puberty protects against development of lung inflammation 2 3. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2015;310(2):L166–74.
 31. PATRONE C, CASSEL TN, PETERSSON K, PIAO Y-S, CHENG G, CIANA P, ET AL. Regulation of postnatal lung development and homeostasis by estrogen receptor beta. *Mol Cell Biol*. 2003;23(23):8542–52.
 32. KINUTA K, TANAKA H, MORIWAKE T, AYA K, KATO S, SEINO Y. Vitamin D is an important factor in estrogen biosynthesis of both female and male gonads. *Endocrinology*. 2000;141(4):1317–24.
 33. WARD C, JOHNS DP, BISH R, PAIS M, REID DW, INGRAM C, ET AL. Reduced airway distensibility, fixed airflow limitation, and airway wall remodeling in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164(9):1718–21.
 34. SEOW CY. Passive stiffness of airway smooth muscle: The next target for improving airway distensibility and treatment for asthma? *Pulm Pharmacol Ther*. 2013;26(1):37–41.



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Pró-Reitoria Acadêmica
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 1 - 3º andar
Porto Alegre - RS - Brasil
Fone: (51) 3320-3500 - Fax: (51) 3339-1564
E-mail: proacad@pucrs.br
Site: www.pucrs.br/proacad