

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**EFEITO IMUNORREGULATÓRIO DA VITAMINA D NO SISTEMA  
NERVOSO CENTRAL DE CAMUNDONGOS COM LÚPUS  
INDUZIDO POR PRISTANE**

THAÍS EVELYN KARNOPP

Porto Alegre  
2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**EFEITO IMUNORREGULATÓRIO DA VITAMINA D NO SISTEMA  
NERVOSO CENTRAL DE CAMUNDONGOS COM LÚPUS  
INDUZIDO POR PRISTANE**

THAÍS EVELYN KARNOPP

Orientador: Prof. Dr. Odirlei André Monticielo  
Coorientadora: Dra. Eduarda Correa Freitas

Tese apresentada como requisito parcial  
para obtenção de título de Doutora em  
Medicina: Ciências Médicas, da  
Universidade Federal do Rio Grande do  
Sul, Programa de Pós-Graduação em  
Medicina: Ciências Médicas.

Porto Alegre  
2023

### CIP - Catalogação na Publicação

Karnopp, Thais Evelyn

Efeito imunorregulatório da vitamina D no sistema nervoso central de camundongos com lúpus induzido por pristane / Thais Evelyn Karnopp. -- 2023.

124 f.

Orientador: Odirlei André Monticielo.

Coorientadora: Eduarda Correa Freitas.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, BR-RS, 2023.

1. Lúpus neuropsiquiátrico. 2. Lúpus induzido por pristane. 3. Vitamina D. 4. Neuroinflamação. I. Monticielo, Odirlei André, orient. II. Freitas, Eduarda Correa, coorient. III. Título.



*Epígrafe:*

*“Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável para aprender a conhecer a beleza libertadora do intelecto para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer”*  
*(Albert Einstein)*

## **Agradecimentos**

Agradeço de coração aos meus queridos pais, Luciane e Carlos, por sempre acreditarem em mim e por todo amor e apoio incondicional que me oferecem desde sempre. À minha irmã Thamiris, por sua crença em mim e pelas palavras amigas que sempre me confortam. Agradeço também ao meu companheiro, Charles, por sua paciência e amor incansáveis. Você está sempre ao meu lado, me dando força, ouvindo-me e sendo paciente mesmo nos momentos mais difíceis.

Aos meus irmãos de quatro patas, Nenê, Amy e Odin, que sempre me recebem com festa, e aos meus adoráveis filhos peludos, Luna, Ônix, Spark, Simba, Brie e Zoe, por seu amor incondicional e carinho constante. São meu refúgio nos dias difíceis. Amo todos vocês profundamente.

À minha família no Laboratório de Doenças Autoimunes – LABDAI, agradeço por compartilhar seis anos de pós-graduação comigo. Sou grata pelos auxílios recebidos, que tornaram possível a conclusão deste trabalho. Agradeço especialmente à minha equipe incrível por compartilhar momentos maravilhosos, abraços, risadas, sorvetes e café, além das discussões enriquecedoras sobre este trabalho. Ao Vinicius, Maria Luísa e Marina por sua ajuda nos experimentos comportamentais e pós-experimentação animal, e ao Gustavo e Andressa por seu apoio nas pesagens e experimentos comportamentais. Natália, obrigada pela companhia nas longas semanas de Labirinto de Barnes, idas à patologia e compartilhamento do microscópio de fluorescência. Agradeço ao Lucas, pelo apoio nos testes de locomoção. A presença de vocês sempre foi uma luz nos meus dias, e serei eternamente grata por sua ajuda e amizade.

Eduarda, sua escolha ao me orientar foi um privilégio para mim. Minha coorientadora, você é uma fonte constante de luz, calma e amor. Agradeço pelas palavras amigas, pelo carinho e por me acalmar sempre que necessário. Sou grata por ter uma pessoa tão incrível em minha vida.

Aos professores do serviço de reumatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, especialmente ao professor Rafael e ao professor Charles, agradeço por me aceitarem no estágio docente. O que aprendi durante esse período será uma bagagem valiosa para toda a vida. Agradeço por sua

compreensão, paciência e carinho. À Gabriela por toda a ajuda recebida, obrigada.

Obrigada, professor Odirlei André Monticielo, por me acolher como sua orientanda. Sua compreensão e positividade foram uma fonte constante de motivação para mim. Agradeço por sua amizade e orientação durante esses anos.

E a você, meu eterno orientador, Alexandre Rieger, minha gratidão não tem limites. Desde o início, você acreditou em mim, orientou-me durante o TCC, coorientou meu mestrado e continua a me guiar durante estes quatro anos de doutorado. Agradeço por seus desafios e por me mostrar os caminhos a seguir. Obrigada por orientar-me nos fins de semana, à noite, feriados... Além de orientador, você é um amigo que sempre posso contar. Agradeço também ao Nikolas que me auxiliou com as análises estatísticas e me auxiliará na continuidade deste trabalho.

Aos funcionários e pesquisadores do Centro de Pesquisa Experimental, especialmente da Unidade de Patologia Experimental e Unidade de Experimentação Animal, agradeço por seu auxílio e colaboração incansáveis. Fernanda Visioli, obrigada por seu ensinamento e ajuda preciosos neste trabalho.

Por fim, expresso minha profunda gratidão à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), ao Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE/HCPA) e ao Fundo de Apoio a Pesquisa da Sociedade de Reumatologia do Rio Grande do Sul (SRRS) pelos incentivos financeiros que tornaram este projeto possível. Agradeço também à Universidade Federal do Rio Grande do Sul, especialmente ao programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, pela oportunidade de crescer e aprender.

## RESUMO

**Introdução:** O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença autoimune inflamatória crônica e multissistêmica. Entre os diversos órgãos e sistemas que podem ser afetados, o sistema nervoso central (SNC) se destaca, podendo ter manifestações neurológicas e/ou psiquiátricas. Esta condição é conhecida como lúpus neuropsiquiátrico (NPSLE). Na sua fisiopatogenia, há ruptura da barreira hematoencefálica (BHE) levando ao surgimento de lesões e disfunções neuronais que podem se expressar como alterações cognitivas, distúrbios psiquiátricos, convulsões e cefaleia. Estudos demonstram que a vitamina D tem efeito imunomodulador e protetor em células do sistema imune e também no SNC, sendo capaz de atravessar a BHE devido a sua lipossolubilidade. Apesar de apresentar vários sintomas da doença em humanos, o modelo de lúpus induzido por pristane (PIL) é pouco estudado quanto aos mecanismos fisiopatogênicos de disfunção neuronal e suas repercussões neuropsiquiátricas.

**Objetivo:** Avaliar os efeitos imunorregulatórios da vitamina D no cérebro de modelo murino de lúpus induzido por pristane.

**Metodologia:** Foram utilizados 76 camundongos Balb/c fêmeas de 8-12 semanas. O modelo foi induzido através de uma injeção intraperitoneal (i.p.) contendo 500µl de pristane. Os animais foram randomizados em 3 grupos: controle (CO), lúpus induzido por pristane (PIL) e PIL que receberam uma injeção i.p contendo 2µg/kg de 1 $\alpha$ ,25 dihidroxivitamina D, em dias alternados. Foram realizados testes comportamentais como nado forçado, labirinto de Barnes [memória de curto (STM) e longo (LTM) prazo], locomoção em labirinto aberto e labirinto elevado, nos tempos 0, 90 e 180 dias (T0, T90, T180) após a indução. Cada grupo foi dividido em 2 subgrupos que foram eutanasiados em 90 e 180 dias após a indução. Foi realizada análise de citocinas IL-6 e IFN- $\alpha$ 1, no soro destes animais, pela técnica de ELISA. Foi realizada imunofluorescência para marcação de infiltrado de IgG e IgM, e expressão do receptor de vitamina D fosforilado (pVDR). Também foi realizado teste de sensibilidade e especificidade, curva AUC-ROC, para as imunoglobulinas.

**Resultados:** Os grupos PIL e VD apresentaram um aumento de imobilidade no teste de nado forçado, comparado ao grupo CO, bem como redução do tempo



de nado, em ambos os tempos. Houve redução do número de entradas nos braços abertos do labirinto elevado, em animais com PIL, comparados ao grupo CO, tanto no T90, quanto no T180. O grupo PIL obteve um maior número de erros no T90, no labirinto de Barnes, em relação ao grupo VD (STM). Ainda, em LTM T90, o grupo PIL obteve um maior número de erros e menor número de acertos em relação aos grupos CO e VD. Tanto o grupo PIL, quanto o VD, apresentaram aumento do baço, depósito de IgG nos rins e um escore elevado de glomerulonefrite. Os níveis de IFN- $\alpha$ 1 foram elevados em PIL e VD, comparados ao grupo CO em T90 e T180. No cérebro, o grupo PIL apresentou maior infiltrado de IgM e IgG, quando comparado aos grupos CO e VD em ambos os tempos. A expressão de pVDR permaneceu reduzida no grupo PIL, enquanto nos grupos CO e VD houve aumento. A curva AUC-ROC demonstrou 100% de sensibilidade e especificidade para IgG no cérebro.

**Conclusão:** Animais com PIL apresentaram sinais de depressão, ansiedade e déficit de memória, já a partir do terceiro mês após indução. Também apresentaram depósitos de imunoglobulinas no cérebro e redução da expressão de pVDR. A vitamina D não foi capaz de modular o comportamento do tipo depressivo e ansioso destes animais, mas teve ação protetora na memória. A vitamina D obteve um efeito imunomodulador e reduziu os depósitos de IgM e IgG no cérebro, além de aumentar a expressão de seu receptor ativo (pVDR) neste órgão.

**Palavras-chaves:** Lúpus neuropsiquiátrico, Modelo animal, Lúpus induzido por pristane; vitamina D.

**ABSTRACT**

**Introduction:** Systemic lupus erythematosus (SLE) is a chronic, multisystem inflammatory autoimmune disease that can affect various organs and systems. Notably, the central nervous system (CNS) is often impacted, leading to neurological and psychiatric manifestations collectively known as neuropsychiatric lupus (NPSLE). The pathophysiology of NPSLE involves disruption of the blood-brain barrier (BBB), resulting in neuronal injuries and dysfunctions, which can manifest as cognitive changes, psychiatric disorders, seizures, and headaches. Vitamin D is recognized for its immunomodulatory and protective effects on both the immune system cells and the CNS. Its lipid solubility allows it to cross the BBB. Despite humans exhibiting several disease symptoms, the pristane-induced lupus (PIL) model is relatively understudied concerning the pathophysiological mechanisms of neuronal dysfunction and its neuropsychiatric consequences.

**Objective:** The objective of this study was to assess the immunoregulatory effects of vitamin D in the brain of a murine pristane-induced lupus model.

**Methodology:** Seventy-six female Balb/c mice aged 8-12 weeks were utilized. The PIL model was induced via intraperitoneal injection of pristane. The mice were divided into three groups: control (CO), pristane-induced lupus (PIL), and PIL mice receiving intraperitoneal injections of 2µg/kg of 1α,25 dihydroxyvitamin D on alternate days. Behavioral tests including forced swimming, Barnes maze (short (STM) and long (LTM) term memory], open maze locomotion, and elevated maze exploration were conducted at 0, 90, and 180 days (T<sub>0</sub>, T<sub>90</sub>, T<sub>180</sub>) post-induction. Animals were euthanized at 90 and 180 days post-induction for further analysis. Serum cytokine levels (IL-6 and IFN-α1) were measured using ELISA, and immunofluorescence was employed to detect IgG and IgM infiltrates and phosphorylated Vitamin D receptor (pVDR) expression. Sensitivity and specificity tests, as well as AUC-ROC curve analysis, were also conducted for the immunoglobulins.

**Results:** Animals in the PIL and VD groups exhibited increased immobility in the forced swimming test and reduced swimming time compared to the CO group at both time points. PIL animals showed decreased entries into the open

arms of the elevated maze at T90 and T180 compared to the CO group. In the Barnes maze, the PIL group made more errors at T90 than the VD group (STM). Additionally, at LTM T90, the PIL group had more errors and fewer correct answers compared to the CO and VD groups. Both PIL and VD groups displayed enlarged spleens, IgG deposition in kidneys, and high glomerulonephritis scores. IFN- $\alpha$ 1 levels were elevated in PIL and VD groups compared to the CO group at T90 and T180. The PIL group exhibited higher IgM and IgG infiltration in the brain compared to the CO and VD groups at both time points. pVDR expression remained reduced in the PIL group, whereas it increased in the CO and VD groups. The AUC-ROC curve showed 100% sensitivity and specificity for IgG in the brain.

**Conclusion:** Animals with PIL exhibited signs of depression, anxiety, and memory deficits, starting from the third month after induction. They also showed immunoglobulin deposits in the brain and reduced expression of pVDR. Vitamin D was not able to modulate the depressive and anxious behaviors in these animals but had a protective effect on memory. Vitamin D had an immunomodulatory effect and reduced IgM and IgG deposits in the brain, as well as increased expression of its active receptor (pVDR) in this organ.

**Keywords:** Neuropsychiatric lupus, Animal model, Pristane-induced lupus, Vitamin D.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Modelo esquemático da estratégia de busca de informações.....	19
<b>Figura 2.</b> Diferentes órgãos e sistemas afetados pelo lúpus eritematoso sistêmico.....	20
<b>Figura 3.</b> A barreira hematoencefálica (BHE), estrutura e disfunção.....	27
<b>Figura 4.</b> Metabolismo da vitamina D, ativação e efeitos imunomodulatórios.....	34
<b>Figura 5.</b> Vitamina D e a barreira hematoencefálica (BHE).....	36
<b>Figura 6.</b> Lipogranulomas no peritônio de camundongos Balb/c.....	38
<b>Figura 7.</b> Marco conceitual da tese de doutorado.....	42
<b>Figura 8.</b> Score de condição corporal.....	109
<b>Figura 9.</b> Esquemática da indução de lúpus induzido por pristane e tratamento.....	113
<b>Figura 10.</b> Labirinto elevado.....	114
<b>Figura 11.</b> Nado forçado.....	116
<b>Figura 12.</b> Linha do tempo e esquematização do labirinto de Barnes.....	118
<b>ARTIGO 1</b>	
<b>Resumo em gráfico</b> .....	57
<b>Figura 1.</b> Modelo esquemático da estratégia de busca de informações.....	59
<b>Figura 2.</b> Metabolismo da vitamina D, ativação e efeitos imunomodulatórios.....	64
<b>Figura 3.</b> Ação da vitamina D no cérebro.....	66

**ARTIGO 2**

<b>Figura 1.</b> Ilustração do desenho experimental.....	80
<b>Figura 2.</b> Linha do tempo do labirinto de Barnes.....	82
<b>Figura 3.</b> Características histopatológicas do modelo de lúpus induzido por pristane.....	85
<b>Figura 4.</b> Delta de peso corporal dos animais.....	86
<b>Figura 5.</b> Dados comportamentais.....	88
<b>Figura 6.</b> Variação na expressão de citocinas no soro (fold change).....	89
<b>Figura 7.</b> Depósito total de IgG e IgM e expressão de pVDR no cérebro em um modelo de lúpus induzido por pristane.....	90
<b>Figura 8.</b> Área sob a curva característica de operação do receptor (AUC-ROC) para os valores de concentração de imunoglobulinas no cérebro e nos rins aos 3 e 6 meses.....	92

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

**Tabela 1** - Critérios de classificação diagnóstica de lúpus eritematoso sistêmico, conforme *European League Against Rheumatism – EULAR* e *American College of Rheumatology – ACR*.....22

**Tabela 2** - Síndromes neuropsiquiátricas observadas em portadores de lúpus eritematoso sistêmico.....25

**Quadro 1** - Endpoints para avaliação do modelo de lúpus induzido por pristane.....110

### ARTIGO 1

**Tabela 1.** Síndromes neuropsiquiátricas observadas em pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico.....61

**Tabela 2.** Artigos publicados relacionando vitamina D e manifestações neuropsiquiátricas no Lúpus Eritematoso Sistêmico.....67

### ARTIGO 2

**Tabela suplementar 1.** Peso do órgão.....99

**Tabela suplementar 2.** Dados do teste de natação forçada e teste de labirinto elevado.....100

**Tabela suplementar 3.** Dados obtidos no teste do labirinto de Barnes.....101

**Tabela suplementar 4.** Intensidade de fluorescência de IgM e IgG no cérebro e rim, VDR no cérebro e pontuação de glomerulonefrite.....103

**Tabela suplementar 5.** Pontos de corte gerados pelo índice de Youden que maximiza a sensibilidade e especificidade de cada modelo binário gerado pelo AUC-ROC.....104

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ACR – Colégio americano de reumatologia (*American college of reumatology*)
- ANA – Anticorpos antinucleares
- BHE – Barreira hematoencefálica
- DCs - Células dendríticas (*Dendritic cells*)
- FAN – Fator antinuclear
- He – Hematoxilina/ eosina
- IFN – Interferon
- IFNAR- Receptor de IFN $\alpha/\beta$
- IgG – Imunoglobulina G
- IL – Interleucina
- IP – Injeção intraperitoneal
- LCR – Líquido cefalorraquidiano
- LES – Lúpus eritematoso sistêmico
- LPS - Lipopolissacarídeo
- NK – Células *natural killer*
- NMDAR - N-metil D-aspartato
- NPSLE – Lúpus neuropsiquiátrico (*Neuropsychiatric systemic lupus erythematosus*)
- PBS – Tampão fosfato salino (*Phosphate-buffered saline*)
- pDCs - Células dendríticas plasmocitóides (*Plasmacytoid dendritic cells*)
- PGE2 - Prostaglandina 2
- PIL – Lúpus induzido por pristane (*Pristane-induced lupus*)
- pVDR – Receptor e vitamina D fosforilado (*phosphorylated vitamin D receptor*)
- RXR – Receptor do ácido retinoico X (*Retinoic acid X receptor*)
- SC – Injeção subcutânea
- SLICC - Clínicas colaboradoras internacionais de lúpus sistêmico (*Systemic lupus international collaborating clinics*)
- SNC – Sistema nervoso central
- SNP – Sistema nervoso periférico
- SPSS - Pacote estatístico para as ciências sociais (*Statistical package for the social sciences*)
- TGF- $\beta$  - Fator transformador de crescimento  $\beta$  (*transforming growth factor  $\beta$* )
- TNF $\alpha$  – Fator de necrose tumoral alfa (*Tumor necrosis factor alpha*)
- T<sub>reg</sub> – Células T reguladoras
- VD – Vitamina D
- VDREs - Elementos de resposta à vitamina D (*Vitamin D response elements*)

## SUMÁRIO

Resumo	8
Lista de figuras	12
Lista de tabelas e quadros	14
Lista de abreviaturas e siglas	15
1. Introdução	18
2. Revisão da literatura	21
2.1 Estratégias para localizar e selecionar as informações	21
2.2 Lúpus eritematoso sistêmico	22
2.3 Lúpus neuropsiquiátrico	26
2.4 Barreira hematoencefálica (BHE) e disfunção	28
2.5 Citocinas	31
2.5.1 Interleucina 6 (IL-6)	31
2.5.2 Interferon do tipo I (IFN I)	32
2.6 Vitamina D	34
2.7 Modelo animal de lúpus neuropsiquiátrico	38
2.8 Lúpus induzido por pristane (PIL)	40
2.9 Testes comportamentais	41
2.9.1 Nado Forçado	41
2.9.2 Locomoção em campo aberto	42
2.9.3 Labirinto elevado	42
2.9.4 Labirinto de Barnes	42
3. Marco conceitual	44
4. Justificativa	46
5. Objetivos	47
5.1 Objetivo Principal	47
5.2 Objetivos específicos	47
6. Referências	48



Artigo 1 _____	60
Artigo 2 _____	61
7. Considerações finais _____	62
8. Perspectivas futuras _____	63
9. Anexos _____	64
Anexo I – Metodologia expandida _____	64
9.1 Ética _____	64
9.2 Animais _____	64
9.3 Modelo experimental de lúpus _____	67
9.4 Tratamento _____	68
9.5 Avaliações clínicas _____	69
9.5.1 Peso dos animais _____	69
9.5.2 Peso dos órgãos _____	69
9.6 Avaliações comportamentais _____	70
9.6.1 Avaliações de Ansiedade _____	70
9.6.2 Testes de comportamento depressivos _____	70
9.6.3 Testes de memória de curto prazo e longo prazo _____	72
9.7 Sangue _____	74
9.8 Tecido _____	75
9.9 Análise de citocinas no soro _____	75
9.10 Imunofluorescência – anti-IgM, anti-IgG e VDR _____	75
9.11 Avaliação renal _____	76
9.12 Área sob a curva característica de operação do receptor _____	77
9.13 Cálculo do tamanho amostral e análise estatística _____	77
Anexo II – Carta de aprovação CEUA/HCPA _____	79
Anexo III - ARRIVE Guidelines _____	80

## 1. INTRODUÇÃO

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença autoimune inflamatória crônica com envolvimento multissistêmico. É caracterizada por uma perturbação da homeostase imunológica, que envolve a ativação anormal de células T, células B e células apresentadoras de antígenos, levando a uma resposta imune autorretativa com produção de autoanticorpos e deposição de imunocomplexos, além de inflamação nos locais afetados (1–3). A etiologia da doença é pouco conhecida; no entanto, sabe-se que fatores hormonais, ambientais, genéticos e imunológicos contribuem para seu desenvolvimento (4). O LES atinge principalmente mulheres, entre 20-45 anos, com pico de incidência em torno dos 30 anos. No Brasil, a estimativa é que existam em torno de 150.000 – 300.000 pessoas acometidas por esta doença (5). As principais manifestações clínicas incluem lesões mucocutâneas, hemocitopenias, artrite, nefrite, serosite e, em muitos casos, envolvimento do sistema nervoso central (SNC) e periférico (SNP) (6,7).

As manifestações de atividade inflamatória no sistema nervoso em pacientes com LES, conhecidas como lúpus neuropsiquiátrico (*Neuropsychiatric lúpus* - NPSLE), estão presentes em mais de 50% dos casos. NPSLE pode afetar tanto o SNC quanto o SNP, sendo este acometimento a segunda causa de morbidade e mortalidade mais frequente em pacientes com LES (8). A variedade de sintomas, por vezes desconhecidos ou confundidos com distúrbios comuns, torna difícil estabelecer um diagnóstico ou tratamento para o NPSLE. Devido a essa complexidade, os dados de prevalência do NPSLE não são bem estabelecidos, variando consideravelmente nos estudos, de 6% a 93% (9–11).

Embora a patogênese do NPSLE ainda não tenha sido completamente caracterizada, células B, autoanticorpos e citocinas são considerados os principais mediadores da doença. No NPSLE, citocinas presentes na periferia ou no SNC podem desencadear a ruptura da barreira hematoencefálica (BHE), permitindo a passagem de autoanticorpos para o SNC. A deposição desses autoanticorpos resulta em neurotoxicidade, neurodegeneração e ativação das células gliais. Essas células gliais, por sua vez, podem produzir citocinas em abundância e localmente, enriquecendo o ambiente do SNC. Isso pode levar a

anormalidades comportamentais, como disfunções cognitivas, psicose, convulsões, transtornos de humor, entre outros. Além disso, outras condições patológicas ou traumas também podem provocar a ruptura da BHE (12,13).

A vitamina D é utilizada como coadjuvante no tratamento do LES e tem sido alvo de pesquisas para controlar as manifestações clínicas da doença. Ela desempenha um papel na imunomodulação tanto da resposta imune inata quanto da adaptativa. Estudos destacam não apenas a importância da vitamina D no metabolismo ósseo e de cálcio, mas também na regulação do sistema imunológico e em diversos tecidos, incluindo o cérebro (14–16). Além disso, a deficiência dessa vitamina está associada à gravidade das manifestações clínicas em doenças autoimunes, como o LES (15,16).

Além de atuar na imunomodulação, a vitamina D possui receptores em diversos tecidos (17). Algumas áreas cerebrais expressam o receptor de vitamina D (*Vitamin D receptor*, VDR), tais como cerebelo, tálamo, hipotálamo, gânglios basais, hipocampo, sistema olfativo e os córtices temporais, orbitários e cingulados. Estudos indicam que a vitamina D tem efeito neuroprotetor além de estar relacionada com o desenvolvimento cerebral fetal e de proteção contra danos ao DNA (18–23).

Pesquisas em humanos com manifestações de NPSLE são difíceis devido à grande heterogeneidade da doença e à dificuldade em acessar o SNC. Os modelos animais têm sido um recurso valioso para novas descobertas, tanto para entender os mecanismos envolvidos na fisiopatologia do LES quanto para desenvolver novos tratamentos (24,25).

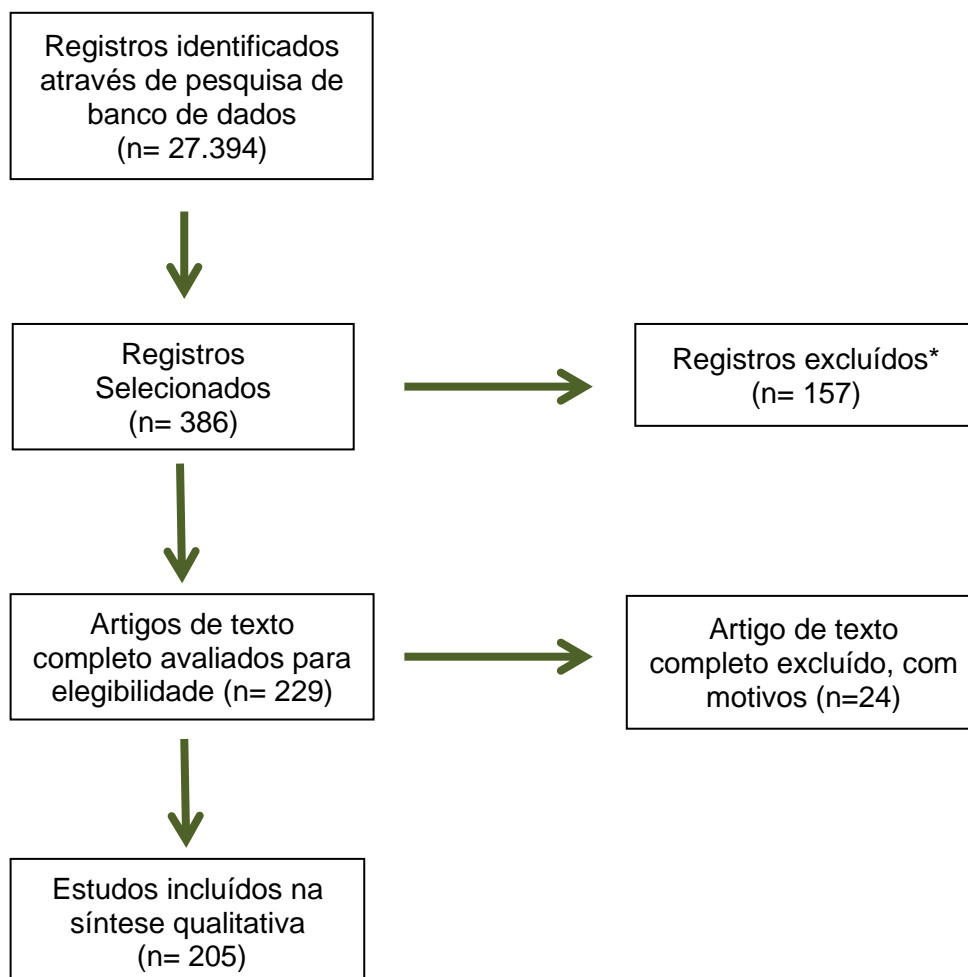
Sabe-se que o modelo de lúpus induzido por pristane (PIL) é o modelo animal que apresenta o maior número de critérios de classificação diagnóstica do LES. No entanto, as informações em relação as manifestações neuropsiquiátricas são escassas. Luciano-Jaramillo e colaboradores (26) descreveram uma regulação negativa na expressão do gene *NR2A*, relacionado ao acometimento cognitivo no modelo PIL, e demonstraram que o pristane pode ter um papel na disrupção da BHE. Recentemente, foram relatados sinais de depressão e ansiedade em camundongos com PIL, submetidos aos testes de nado forçado, labirinto em zero e locomoção em campo aberto (27,28). Além disso, também foi encontrado disfunção da memória de curto e longo prazo em animais com PIL, por meio do teste de

labirinto de Barnes (26). Nosso grupo de pesquisa realizou um trabalho inicial com o modelo de PIL e demonstrou que os animais com PIL apresentaram depósito anormal de imunoglobulina G (IgG) na região do hipocampo (29). Apesar destes dados iniciais sobre manifestações de NPSLE no modelo de PIL, faz-se necessário explorar as implicações neuropsiquiátricas que o modelo de PIL pode apresentar ao longo do curso da doença, bem como entender o papel potencial da vitamina D nesse contexto.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Estratégias para localizar e selecionar as informações

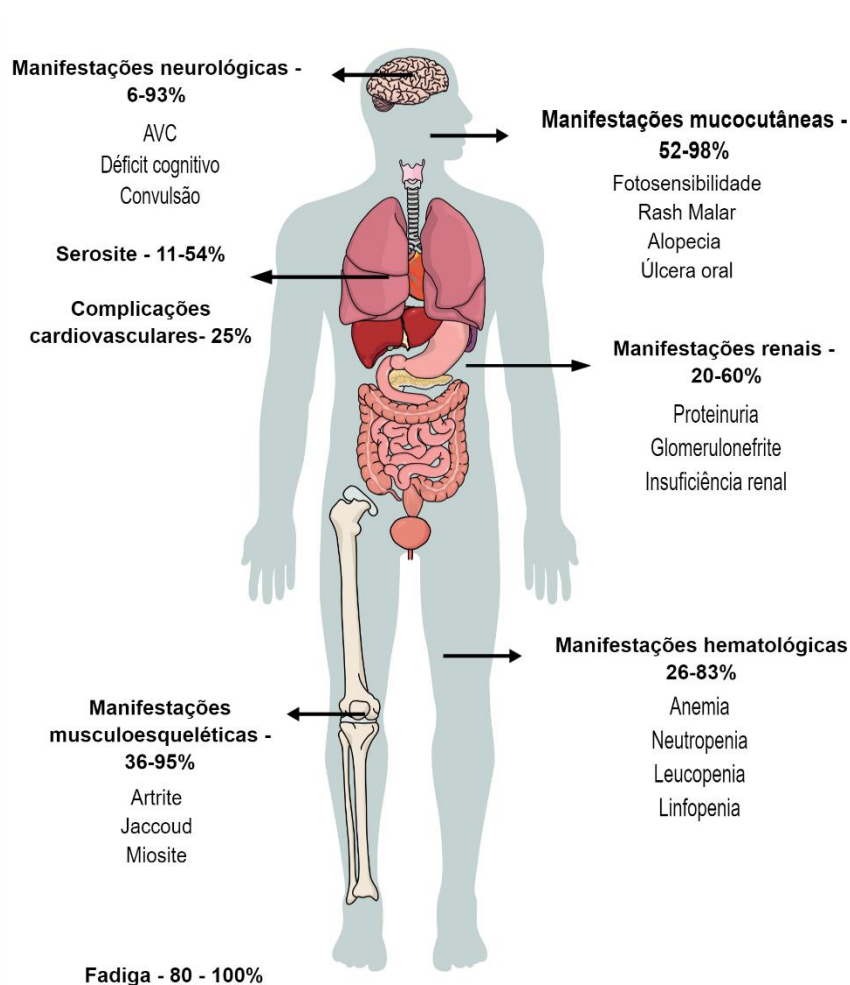
A estratégia de busca envolveu as seguintes bases de dados: PubMed, SciELO e Embase. Foram incluídos artigos de 1978 a 2023. Foram realizadas buscas através da lista de termos e suas combinações: “vitamin D”, “lupus”, “systemic lupus erythematosus”, “vitamin D and lupus”, “neuropsychiatric lupus”, “vitamin D and brain”, “DNA damage in lupus”, “cytokines and lupus”, “IFN-I and neuropsychiatric lupus”, “IFN-I and lupus”, “IL-6 and lupus”, “IL-6 and neuropsychiatric lupus”, “animal model for lupus”, “animal model for neuropsychiatric lupus”.



**Figura 1.** Modelo esquemático da estratégia de busca de informações. \*Critérios de exclusão dos artigos: tema não relacionado aos objetivos da pesquisa; artigos não disponíveis na íntegra; artigos não disponíveis em inglês e/ou português. Lúpus eritematoso sistêmico (LES).

## 2.2 Lúpus eritematoso sistêmico

O LES é uma doença inflamatória crônica, caracterizada pela produção de autoanticorpos, resultando em lesões em diversos órgãos e tecidos (Figura 2) (30). A doença possui uma evolução imprevisível, com períodos de remissão e recorrência, e pode afetar qualquer órgão do corpo. Suas manifestações clínicas são variadas, algumas semelhantes a outras doenças como artrite reumatoide, polimiosite e síndrome de Sjögren. Devido à grande diversidade de sintomas, em 1982, o *American College of rheumatology (ACR)* estabeleceu 11 critérios para diagnóstico de LES. Tais critérios foram revisados e reestabelecidos pelo *Systemic lupus international collaborating clinics (SLICC)*, em 2012. Para a obtenção da classificação diagnóstica de LES, o paciente deve apresentar quatro ou mais dos critérios (sendo no mínimo 1 critério clínico e 1 critério laboratorial/imunológico) (6,31–33).



**Figura 2.** Diferentes órgãos e sistemas afetados pelo lúpus eritematoso sistêmico. Elaborada pela autora.

Em 2019, o ACR, em colaboração com a *European league against rheumatism (EULAR)*, estabeleceu novos critérios de classificação diagnóstica para o LES. Esses novos critérios possuem sensibilidade semelhante aos estabelecidos pelo SLICC, mas apresentam uma maior especificidade (93,4%, enquanto os critérios SLICC tinham 83,6%) (34,35). Conforme estes critérios, para se iniciar uma investigação de LES, é obrigatório que o paciente apresente exame de anticorpos antinucleares (ANA) positivo com título  $\geq 1:80$ , pelo menos uma vez, afastando a possibilidade de falso-positivo e diagnósticos diferenciais. Os critérios adicionais geram uma pontuação diagnóstica, sendo destes 7 domínios clínicos e 3 domínios imunológicos (tabela 1). Para se obter a classificação diagnóstica de LES, o paciente deve obter uma pontuação igual ou superior a 10, além do ANA reagente, que é o critério de entrada. Além disso, os critérios pertencentes ao mesmo domínio não somam pontos (34).

Pouco se sabe sobre a etiologia exata do LES. No entanto, algumas evidências, como a segregação familiar e os altos índices de desenvolvimento do LES em gêmeos idênticos, sugerem uma forte contribuição genética. Além disso, mais de 50 genes estão relacionados à predisposição ao LES (36). A influência hormonal, principalmente em mulheres, é um fator de risco importante. Estrogênio e prolactina exacerbam a autoimunidade e aumentam a produção do fator de ativação das células B, além de modular a ativação de linfócitos e células dendríticas (36).

Além destes, fatores ambientais como tabagismo, exposição à sílica e ao pristane podem servir como gatilhos ambientais para o desenvolvimento da doença (37). O uso de certos medicamentos pode levar ao desenvolvimento do lúpus induzido por drogas, devido à desmetilação do DNA e alterações nos antígenos próprios (38).

Apesar de não se conhecer a patogenia exata da doença, sabe-se que há uma ativação anormal do sistema inato e adaptativo, com elevada produção de autoanticorpos (39). Ainda, diversas citocinas estão envolvidas no desenvolvimento da autoimunidade no LES. Essas citocinas medeiam a lesão tecidual inflamatória, incluindo o interferon do tipo I (IFN-I), IFN-II, fator de necrose tumoral (TNF), estimulador de linfócitos B (BLys), interleucina-6 (IL-6) e IL-17 (40).

**Tabela 1** - Critérios para classificação diagnóstica de LES, conforme *European league against rheumatism – EULAR* e *American college of rheumatology - ACR*

<b>Domínio Clínico</b>	<b>Item</b>	<b>Pontos</b>
Constitucional	Febre	2
Hematológico	Leucopenia	3
	Trombocitopenia	4
	Hemólise autoimune	4
Neuropsiquiátrico	Delírio	2
	Psicose	3
	Convulsão	4
Mucocutâneo	Alopecia	2
	Úlceras orais	2
	Lúpus eritematoso subagudo (LECSA) / lúpus eritematoso discóide (LED)	4
	Lúpus Eritematoso Cutâneo Agudo (LECA)	6
Serosa	Efusão pericárdica ou pleural	5
	Pericardite aguda	6
Musculoesquelético	Envolvimento das articulações	6
Renal	Proteinúria >0,5g/24h	4
	Biópsia renal classe II ou V de nefrite lúpica	8
	Biópsia renal classe III ou IV de nefrite lúpica	10
<b>Domínio Imunológico</b>	<b>Item</b>	<b>Pontos</b>
Anticorpos antifosfolípeidos	Antifosfolípeidos	2
Complementos	C3 ou C4 baixo	3
	C3 e C4 baixo	4
Anticorpos específicos para LES	Anti-Sm	6
	Ant-dsDNA	6

**Fonte:** ARINGER et al., 2019 (34).



O IFN-I desempenha um papel na patogênese da doença, e a superprodução de IFN-I está fortemente associada ao LES. A assinatura do IFN ocorre quando células mononucleares de pacientes com LES superexpressam genes estimulados por interferon (41). Pacientes com assinatura de IFN apresentam baixos níveis de complemento, aumento da frequência de nefrite e aumento da produção de anticorpos anti-dsDNA, anti-Sm, anti-RNP e anti-Ro (42).

Ao longo da sua evolução clínica, muitos pacientes com LES podem desenvolver complicações neurológicas quando o sistema nervoso é afetado. Os sintomas podem surgir repentinamente ou em períodos de remissão e recidiva ao longo do tempo, podendo variar na localização e extensão da lesão. Mudanças na visão podem ser resultados do LES ou do uso de corticosteróides utilizados no tratamento. Complicações cardiocirculatórias podem ser uma causa de morte nestes pacientes, assim como as infecções em geral. Os pacientes também podem apresentar anemia, fadiga, dores e inchaço nas articulações e febre (7).

O conceito chave para a patogenia do LES é o desequilíbrio entre a produção de células apoptóticas (células com morte programada) e a disposição de material apoptótico. Em condições normais, os detritos apoptóticos são rapidamente eliminados do organismo por fagócitos (43). O processo de eliminação se inicia quando a célula apoptótica secreta quimiocinas, estimulando a migração e ativação de leucócitos em direção às células apoptóticas. Para evitar inflamação, a migração de neutrófilos em direção a essas células é inibida pela secreção de lactoferrina. Em seguida, as células apoptóticas secretam citocinas como o fator transformador de crescimento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e a interleucina 10 (IL-10) para facilitar o reconhecimento e a fagocitose pelas células fagocíticas, por meio de receptores (44,45).

No entanto, quando ocorrem falhas e alguns desses detritos, contendo ácidos nucleicos, permanecem, pode ocorrer estimulação de uma resposta imunomediada através da ativação de receptores de reconhecimento de ácidos nucleicos, como os receptores do tipo Toll (TLR) (43). Foi demonstrado que macrófagos cultivados em laboratório de pacientes com LES, apresentavam

capacidade reduzida e atrasada de engolfar seu próprio material apoptótico (46,47).

### 2.3 Lúpus neuropsiquiátrico

Lúpus neuropsiquiátrico (*Neuropsychiatric lupus* - NPSLE) se refere a uma série de sintomas neurológicos e psiquiátricos que surgem em pacientes com LES (48). Ainda não há uma estimativa exata da prevalência de NPSLE em portadores de LES; no entanto, uma meta-análise, que incluiu 10 estudos, relatou uma prevalência de cerca de 56% de acometimento neuropsiquiátrico entre os indivíduos com LES (10).

De acordo com Hanly (49), existem dois mecanismos patogênicos autoimunes distintos e potencialmente inter-relacionados para o NPSLE. O primeiro mecanismo envolve danos aos vasos sanguíneos grandes e pequenos, mediados por anticorpos antifosfolídeos, complexos imunes e leucoaglutinação. As consequências clínicas desse tipo de lesão vascular incluem eventos neuropsiquiátricos focais, como acidentes vasculares cerebrais, e eventos neuropsiquiátricos difusos, como disfunção cognitiva. O segundo mecanismo implica uma lesão inflamatória autoimune, com aumento da permeabilidade da BHE, formação intratecal de complexos imunes e produção de IFN- $\alpha$  e outros mediadores inflamatórios. As consequências clínicas desse mecanismo envolvem manifestações neuropsiquiátricas difusas, como cefaleia, distúrbios de humor, disfunções cognitivas, convulsões e doença cerebrovascular (48,49).

Devido à diversidade de sintomas, o *American college of reumatology* (1999) (50) descreveu 19 manifestações clínicas, divididas em centrais e periféricas (Tabela 2), para estabelecer um quadro clínico do lúpus neuropsiquiátrico. No entanto, os critérios são inespecíficos para o estabelecimento de um diagnóstico preciso.

O LES é capaz de produzir uma elevada quantidade de autoanticorpos. Até o momento, foram descritos mais de 180 tipos de autoanticorpos no soro de pacientes com LES, dos quais apenas 10 são testados em exames de rotina. Nos últimos anos tem sido demonstrado a presença de alguns autoanticorpos em pacientes com NPSLE. Esses autoanticorpos parecem ter uma associação com manifestações comuns no NPSLE. Anticorpos anti-NR2 e anti-ribossomal-

P são alguns exemplos. O primeiro reconhece a subunidade do receptor N-metil D-aspartato (NMDAR), sendo essencial para a plasticidade sináptica cerebral e memória. O segundo, anticorpos anti-ribossomal-P, reconhece proteínas ribossomais (51). Estudos realizados com pacientes com LES associaram a presença de anticorpos anti-NR2 com disfunção do funcionamento motor e do processamento visuoespacial, bem como com a perda de memória (52,53), a presença de autoanticorpos anti-ribossomal-P foi associada à depressão e psicose (54).

**Tabela 2.** Síndromes neuropsiquiátricas observadas em portadores de Lúpus Eritematoso Sistêmico

<b>Sistema Nervoso Central</b>		<b>Sistema Nervoso Periférico</b>
<b>Difuso</b>	<b>Focal</b>	
Estado confuso agudo	Meningite asséptica	Síndrome de Guillain-Barre
Transtorno de ansiedade	Distúrbios convulsivos	Transtorno autonômico
Cefaleia (incluindo enxaqueca e hipertensão intracraniana benigna)	Transtorno do movimento (coreia)	Mononeuropatia isolada ou múltipla
Disfunção cognitiva	Mielopatia	Polineuropatia
Psicose	Síndrome desmielinizante	Miastenia grave
Transtorno do humor	Doença cerebrovascular	Neuropatia craniana
		Plexopatia

**Fonte:** Adaptado de LIANG et al., 1999(50).

O cérebro é protegido pela BHE contra os autoanticorpos circulantes. Entretanto, se a barreira perder sua integridade, os autoanticorpos podem ter acesso ao parênquima cerebral (55). Jafri e colaboradores (56) descreveram um modelo de lesão no NSPLE, desenvolvido em 3 etapas. Inicialmente, a periferia produz os anticorpos antineuronais. Logo após, ocorre uma violação da BHE, que pode ou não estar relacionada ao LES, seguida de danos neuronais mediados por autoanticorpos (56).

Nesse sentido, a integridade da BHE pode ser comprometida por infecções bacterianas, sepse, trauma, isquemia cerebral, assim como pelo estresse (57). Estudos realizados em roedores demonstraram que a ruptura da BHE ocorre de forma regional, dependendo da natureza da lesão. Essas pesquisas revelaram que, após a estimulação bacteriana com lipopolissacarídeos (LPS), ocorre um influxo de IgG apenas no hipocampo, e a administração sistêmica de adrenalina permite a passagem de IgG para a amígdala (58–60).

#### **2.4 Barreira hematoencefálica (BHE) e disfunção**

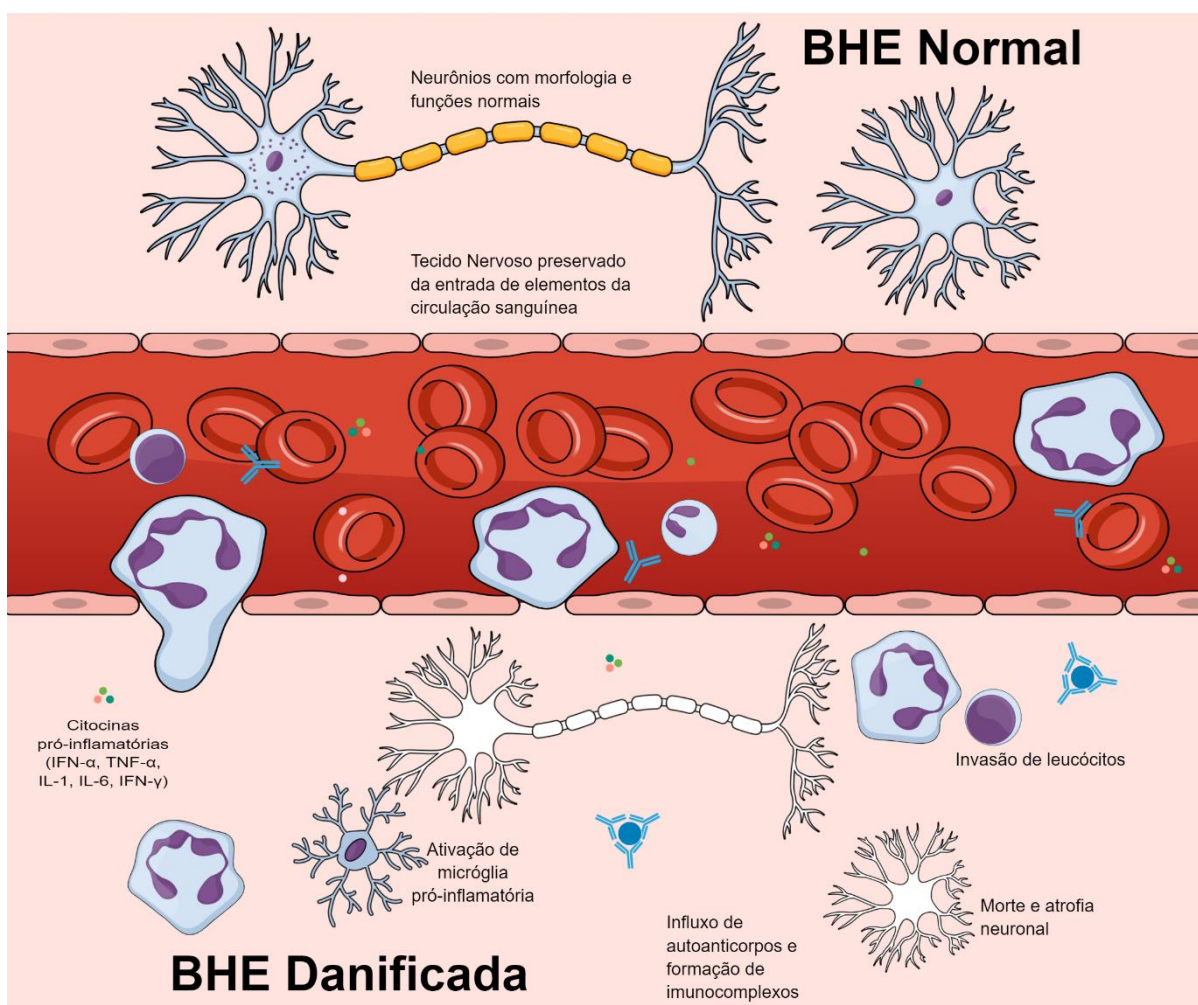
Em geral, a BHE forma uma interface entre o sangue e o cérebro, protegendo o cérebro de componentes sanguíneos como anticorpos, citocinas, células imunes, entre outros (61). Esta barreira é composta de células endoteliais, astrócitos, pericitos, macrófagos perivasculares e membrana. A BHE permite a passagem livre de algumas moléculas essenciais solúveis em água, enquanto outros nutrientes complexos dependem de sistemas de transporte altamente seletivos para entrar no cérebro (62).

Alterações na formação celular da barreira ou uma ruptura nas suas junções podem causar um aumento de permeabilidade, resultando no influxo de moléculas pró-inflamatórias, células e autoanticorpos que perturbam a função do cérebro e levam a danos neuronais (figura 3) (63). Tem sido demonstrado que quantidades excessivas de neurotransmissores, citocinas, quimiocinas e hormônios periféricos podem influenciar na permeabilidade da BHE (61).

Recentemente, foi demonstrado que perturbações no líquido cefalorraquidiano (LCR) podem ativar gatilhos que levam ao NPSLE (64). Os autores sugerem que a disfunção na barreira LCR-sangue facilita a exposição do cérebro aos anticorpos e entrada anormal de linfócitos nos ventrículos cerebrais. Pelo menos 20 autoanticorpos, presentes tanto no soro quanto no LCR, têm sido relacionados ao NPSLE, e eles podem atravessar a barreira quando sua integridade está comprometida (58,65–67). Outros componentes, como a albumina presente no LCR, a haptoglobina, a macroglobulina  $\beta$ -2 e a macroglobulina  $\alpha$ -2, estão aumentados em pacientes com NPSLE (68). A proteína S100 $\beta$  é secretada principalmente pelos astrócitos. Foi relatado que

níveis mais elevados desta proteína no soro de pacientes com NPSLE refletem lesão cerebral e aumento da permeabilidade da BHE (68–70).

Além disso, uma mutação no gene *TREX1* pode levar a ruptura na BHE. Esse gene está associado à autoinflamação mediada por IFN- $\alpha$  devido à deposição de ácido nucleico intracelular (71,72). Estudos têm demonstrado um envolvimento severo do SNC quando o polimorfismo (rs11797) está presente nesse gene (73,74). Pacientes com NPSLE podem ser distinguidos de pacientes com LES sem o envolvimento neuropsiquiátrico através da identificação desse polimorfismo (75).



**Figura 3.** A barreira hematoencefálica (BHE), estrutura e disfunção. A BHE impede que alguns componentes celulares e inflamatórios cheguem ao cérebro. Quando rompida por algum trauma ou infecção, autoanticorpos, citocinas inflamatórias, imunocomplexos e leucócitos invadem o cérebro e se inicia o processo inflamatório nesta região. Devido às injúrias e inflamação, ocorre a morte neuronal, complicações cognitivas, disfunção de memória e transtornos causados no NPSLE. Fonte: Elaborada pela autora.

Ainda, citocinas e anticorpos podem alterar a função das células endoteliais, diminuindo a integridade da BHE. Por exemplo, a ativação do complemento, com a geração de C5a, é uma marca registrada do LES ativo. Foi demonstrado que o componente C5a do complemento induz a ruptura da BHE e ativa o NF- $\kappa$ B em um modelo *in vitro* de LES (76,77). Uma variedade de citocinas tem sido identificada como mediadores inflamatórios, incluindo TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IFN- $\gamma$  e IFN- $\alpha$ . Essas citocinas desempenham um papel patogênico e podem levar à disfunção da BHE (48,76,78,79).

Recentemente, Zeng e colaboradores (80) evidenciaram que o IFN- $\alpha$  tem participação direta na patogênese do NPSLE, resultando em distúrbios do SNC e na fisiologia do cérebro (80). O IFN- $\alpha$  parece causar danos ao ativar a micróglia no LCR (81,82). Através desta ativação, as células microgliais internalizam componentes das células neuronais. A degradação destes componentes causa danos a estas células, podendo levar à apoptose (82). Além disso, o IFN- $\alpha$  pode prejudicar a função cerebral, alterando os níveis de neurotransmissores, gerando metabólitos tóxicos, e mediando o dano pela liberação secundária de citocinas e quimiocinas, como IL-6 e IL-10 (83).

A IL-6 também desempenha um papel importante no NPSLE; seus níveis no LCR estão aumentados em pacientes com NPSLE e associam-se com atividade da doença (84–86). Esta citocina pode penetrar na BHE ou ser produzida por via intratecal. Asano e colaboradores (87) descreveram a regulação positiva do mRNA da IL-6 no hipocampo e no córtex cerebral de pacientes com NPSLE (87). Além disso, a produção neuronal de IL-6 pode ser induzida pela ativação prolongada do receptor metil-D-aspartato (NMDAR), que pode resultar de autoanticorpos ou de níveis aumentados de ácido quinolínico (88,89). Alguns estudos com modelos murinos utilizam LPS bacterianos para acelerar a disfunção da BHE. O LPS causa neurotoxicidade progressiva através da via do TLR-4, mimetizando os efeitos da inflamação através da liberação de TNF- $\alpha$ , IL-6, óxido nítrico e prostaglandina 2 (PGE2) (26,90,91).

Os autoanticorpos também podem levar à disfunção da BHE. O receptor anti-NMDA e anti-ribossomal-P são anticorpos neuropáticos circulantes e não são capazes de cruzar a BHE; no entanto, eles têm sido identificados como efetores no NPSLE (92,93). Wang e colaboradores demonstraram que os

anticorpos anti-NR2 podem danificar a BHE e penetrar no cérebro (94). Portanto, é possível inferir que o efeito de um anticorpo antineuronal potencial depende da localização da violação da BHE, o que, por sua vez, está relacionado à injúria provocada, alterando assim a variedade de manifestações observadas no NPSLE (13).

Células do sistema imunológico são capazes de atravessar a BHE quando esta está comprometida. Infiltrados celulares têm sido encontrados tanto em modelos animais quanto em pacientes com NPSLE. No modelo animal MRL/lpr há um infiltrado de células T, especialmente no estroma do plexo coroide (64). No entanto, as células B desempenham um papel importante na apresentação de antígenos às células T, facilitando sua ativação. Além disso, as células B secretam várias citocinas, como TNF e IL-6, contribuindo para a inflamação local e a infiltração mediada de leucócitos (95,96).

## **2.5 Citocinas**

Apesar de não se saber exatamente a patogênese do LES, sabe-se que a hiperativação do sistema imune pode levar à superprodução de autoanticorpos, deposição de imunocomplexos, liberação de citocinas inflamatórias e, eventualmente, início da doença. As citocinas são moléculas solúveis geradas principalmente por células imunológicas e desempenham papel crucial na diferenciação, maturação e ativação dessas células. Essas citocinas podem exercer efeitos pró-inflamatórios e/ou anti-inflamatórios, dependendo de microambientes locais específicos. Elas atuam como mediadores críticos que unem os sistemas imunológicos inato e adaptativo, constituindo uma rede de resposta imune complexa. Anormalidades de várias citocinas podem refletir o desequilíbrio entre diferentes subconjuntos de células imunes, como células T auxiliares ( $T_{h1}$ ,  $T_{h2}$ ,  $T_{h17}$ ) e células T reguladoras ( $T_{reg}$ ), contribuindo para a patogênese do LES (97–99). Dentre as diversas citocinas, a interleucina 6 (IL-6) e o interferon do tipo I (IFN I) se destacam na patogênese do LES.

### *2.5.1 Interleucina 6 (IL-6)*

A IL-6 é uma citocina pleiotrópica que pode atuar na regulação imune, hematopoiese, inflamação e oncogênese. É produzida principalmente por

monócitos, fibroblastos e células endoteliais, mas também pode ser secretada por queratinócitos, células mesangiais, linfócitos T e B (98,100). A função principal da IL-6 é estimular os estágios finais da maturação das células B, levando à sua diferenciação em células plasmáticas secretoras de imunoglobulina (Ig). A IL-6 pode induzir o crescimento de células T, a diferenciação de células T citotóxicas por meio do aumento da expressão do receptor de IL-2 e da produção de IL-2, além de induzir a produção de anticorpos de forma indireta (100,101).

A IL-6 desempenha um papel fundamental na patogênese do LES, além de mediar danos a diversos órgãos, essa citocina promove a proliferação de células B autorreativas, acelerando assim, a produção de autoanticorpos (98,102). A superprodução de IL-6 no LES está relacionada a diversas fontes e mecanismos. Linfócitos B e T autorreativos são capazes de produzir esta citocina em grande quantidade (102,103). Ainda, a produção excessiva de anti-dsDNA pode regular positivamente a expressão de IL-6 em células endoteliais e estimular a liberação desta citocina em células mononucleares em repouso, de forma parácrina (104).

Diversos estudos, tanto em animais (105–107), quanto em humanos (103,108), têm associado níveis anormais de IL-6 com manifestações no LES. Em pacientes com LES com manifestações neuropsiquiátricas, foram encontrados níveis elevados de IL-6 no LCR. Pacientes com estado confusional agudo obtiveram maiores níveis de IL-6 no LCR em comparação com pacientes que tinham outros sintomas difusos (transtorno de ansiedade, disfunção cognitiva, transtorno de humor e psicose) ou focais do NPSLE (109–111). Esses dados indicam que a IL-6 pode ser considerada um potencial marcador de gravidade do NPSLE no LCR.

### *2.5.2 Interferon do tipo I (IFN I)*

Os interferons são mediadores imunes geralmente classificados em três famílias (tipo I, tipo II e tipo III), que diferem em suas propriedades imunomoduladoras, sua homologia estrutural e as células das quais eles são secretados (112). A família do IFN I compreende os interferons alfa, beta, ômega (IFN- $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\omega$ ) e outros subtipos menos comuns (IFN- $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\tau$ ,  $\zeta$ ,  $\kappa$ ). Já as famílias do IFN II e IFN III compreendem o IFN-gama (IFN- $\gamma$ ) e o IFN-lambda



(IFN- $\lambda$ ), respectivamente (113). O IFN I tem um papel central em respostas imunes antivirais e na patogênese de diversas doenças autoimunes, como o LES (114,115).

Os IFNs tipo I podem ser produzidos por diversas células, incluindo macrófagos, fibroblastos e células dendríticas (DC). O IFN- $\alpha$  é produzido principalmente pelas células dendríticas plasmocitoides (pDC). Tais células são capazes de produzir cerca de  $10^9$  moléculas de IFN- $\alpha$  em 12h (116). A produção de IFN I é desencadeada principalmente pela ativação de receptores de reconhecimento de padrão de ligação ao ácido nucleico, incluindo os TLR 3, 4, 7 e 9 (117). Em condições normais, essas vias de detecção de ácidos nucleicos estão sujeitas a regulação estrita e são necessárias para formar uma resposta antiviral apropriada, mas muitos pacientes com LES demonstram hiperatividade crônica nessas vias (118).

Em pacientes com LES, 50-75% têm produção elevada de IFN I, dando origem a um aumento da assinatura de IFN (119). Há evidências de que níveis séricos elevados de IFN, em pacientes com LES, estejam correlacionados com a atividade da doença. Alguns estudos demonstram que pacientes com hepatite viral que receberam tratamento com IFN- $\alpha$  desenvolveram autoanticorpos encontrados no LES (120,121).

Dentro do SNC, o IFN I tem função em vários processos, incluindo na prevenção da invasão viral. Confere neuroproteção ao impedir a entrada de vírus no SNC através da regulação, mediada pelo receptor de IFN- $\alpha/\beta$  (IFNAR), da permeabilidade da BHE (122,123). Quando ocorrem infecções no SNC, há produção local de IFN I. Essas citocinas estão envolvidas na defesa de primeira linha contra infecções na periferia e no SNC (124). Além de suas propriedades antivirais, o eixo IFN/IFNAR tipo I parece desempenhar um papel fundamental na homeostase do SNC e na função cerebral normal (125–127).

No entanto, Mastorakos e colaboradores (128) sugerem que a indução da sinalização de IFN I no SNC dificulta o processo de reparo vascular após lesão cerebral traumática ou lesão cerebrovascular, que está associada à ruptura da BHE e à falha na restauração da função motora e cognitiva (128). Além disso, foi descoberto que a superexpressão de IFN- $\beta$  no SNC de camundongos selvagens transforma a assinatura transcricional microglial para

induzir um processo semelhante ao envelhecimento, prejudicando assim o desempenho cognitivo (129).

Shiozawa e colaboradores (130) foram os primeiros a demonstrar que o IFN I tem um papel importante no NPSLE. Os autores encontraram níveis de IFN- $\alpha$  mais elevados no LCR de pacientes com NPSLE do que em pacientes com LES, sem manifestações neuropsiquiátricas (130). Um estudo com animais NZB/NZW F1, tratados com IFN- $\alpha$ , demonstrou que os animais apresentaram uma série de transtornos neuropsiquiátricos, tais como ansiedade, depressão e déficit cognitivo e social. Com estes achados, os autores afirmam que o IFN- $\alpha$  tem um papel crítico no NPSLE (131). Em modelo murino transgênico, a superexpressão seletiva de IFN- $\alpha$  no SNC demonstrou que a produção local de IFN- $\alpha$  induz muitas características semelhantes ao NPSLE. Os camundongos que expressaram níveis extremamente elevados de IFN- $\alpha$  no SNC desenvolveram convulsões e distúrbios comportamentais graves com alta mortalidade. Enquanto camundongos com menor expressão de IFN- $\alpha$  apresentaram dificuldades de aprendizagem mais sutis (132). Esses achados sugerem que diferentes manifestações clínicas podem ser observadas dependendo da concentração de IFN- $\alpha$  intratecal.

## **2.6 Vitamina D**

A vitamina D pode ser encontrada em diversas formas, sendo a vitamina D3 ou colecalciferol e a vitamina D2 ou ergocalciferol, os principais tipos encontrados. A primeira é formada na pele através da exposição à luz solar ou à luz ultravioleta (figura 3), além de fontes nutritivas como peixes gordurosos. A segunda é obtida através de alimentos de origem vegetal. Algumas limitações são encontradas para a síntese desta vitamina, como, por exemplo, a idade, a pigmentação da pele, o uso de protetor solar e roupas (133).

Sabe-se que a vitamina D é importante no processo de absorção de cálcio dependente de vitamina. Sua forma ativa 1,25 dihidroxivitamina D [1,25(OH) $_2$ D] tem por principal efeito aumentar a absorção de cálcio a partir do intestino. Este processo auxilia no aumento da mineralização osteoide, estimula a função dos osteoblastos e osteoclastos e suprime a secreção do hormônio da paratireoide (15,133).

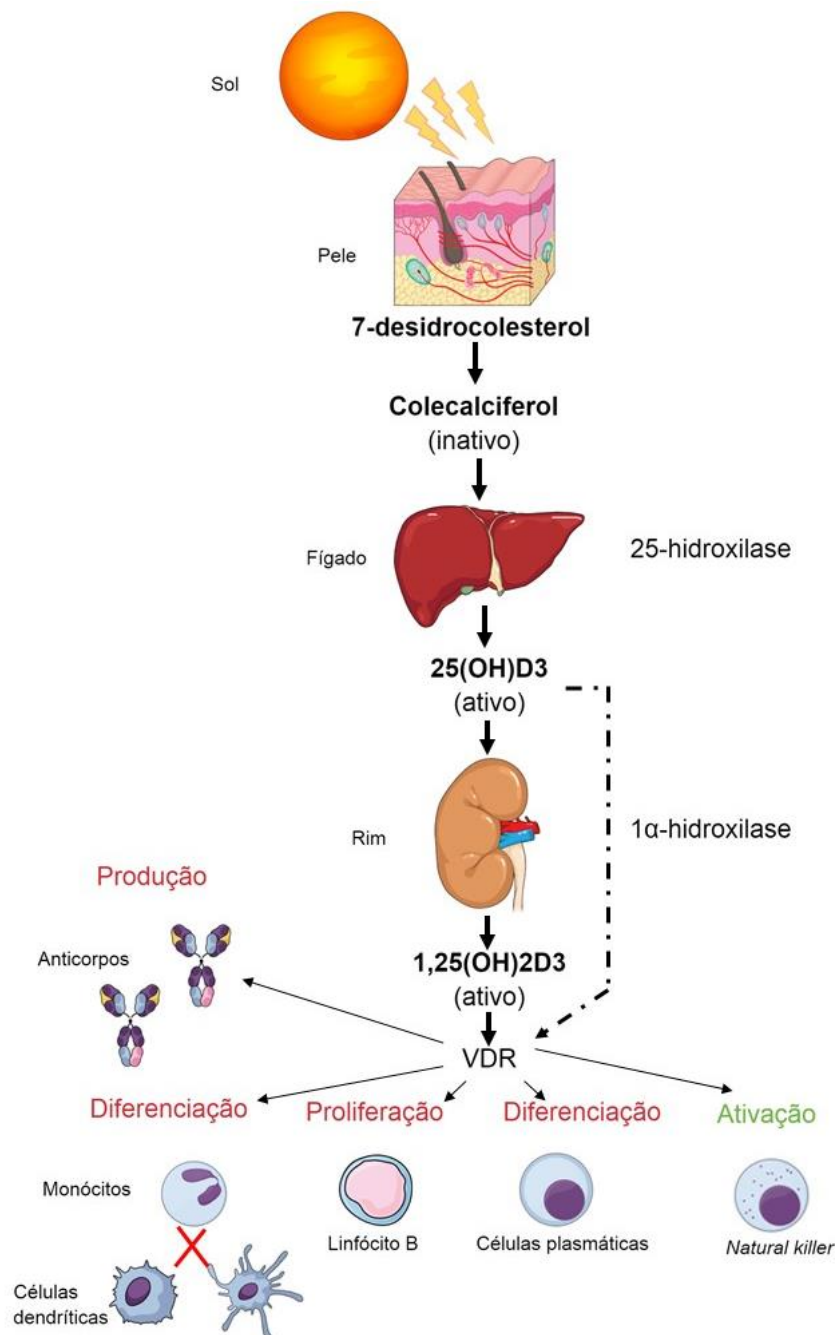
Algumas funções não clássicas da vitamina D têm sido descritas, como efeitos sobre a proliferação e diferenciação celular, além de ações imunorregulatórias, resultando na capacidade de manter a tolerância e promover a imunidade protetora. Tanto as células apresentadoras de antígenos (macrófagos e células dendríticas) quanto as células T e B possuem a maquinaria necessária para sintetizar e responder a  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  (134).

No sistema imune, a vitamina D atua inibindo a proliferação e bloqueando a diferenciação de células B, bem como a secreção de imunoglobulinas (135,136). Também suprime a proliferação de células T e auxilia na inibição da produção de citocinas inflamatórias, como as IL-1, IL-6, IL-17 e IL-21 e TNF- $\alpha$ , aumentando a produção de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10 (15,137,138). A vitamina D diminui a atividade de apresentação de antígenos, auxiliando na inibição da diferenciação e maturação de células dendríticas (DC). Quando maduras, as DCs apresentam o antígeno a células T, facilitando uma resposta imune contra esse antígeno. Quando imaturas, a apresentação do antígeno facilita a auto-tolerância (15). Além de induzir a ativação de células  $T_{\text{reg}}$  e células *natural killer* (NK), ela aumenta a apoptose induzidas por células dendríticas e linfócitos T (figura 4) (139). Assim a vitamina D desempenha um papel importante na regulação da auto-tolerância.

Vários estudos relacionam a deficiência de vitamina D com a fisiopatogenia de doenças autoimunes, tais como esclerose múltipla, artrite reumatoide, diabetes *mellitus* e LES (140–142). Um estudo realizado com 161 pacientes com doença do tecido conjuntivo não diferenciada demonstrou que, após dois anos de acompanhamento, os pacientes que evoluíram para doença definida tinham uma deficiência de vitamina D maior do que aqueles que permaneceram sem definição do quadro (143,144).

Em pacientes com LES em alta atividade, foram relatados baixos níveis de vitamina D. Nos pacientes com baixa atividade da doença, os níveis da vitamina mostraram-se mais elevados (145,146). Além da gravidade da doença, os níveis da vitamina D parecem ter associação inversamente proporcional a algumas comorbidades, como doenças cardiovasculares, necrose avascular, distúrbios do sono e fadiga (147–151). Os baixos níveis de vitamina D no sistema também podem estar associados ao aumento de estresse oxidativo, o que leva a lesões e quebras em proteínas e no DNA,

sugerindo que a vitamina possa ter um efeito protetor contra tais danos (152). Em modelos animais de LES, a suplementação de vitamina D melhora a longevidade, reduz a proteinúria, diminui a artrite e previne lesões dermatológicas (143,153).



**Figura 4.** Metabolismo da vitamina D, ativação e efeitos imunomodulatórios. A vitamina D (colecalfiferol) pode ser obtida a partir da ingestão alimentar ou por síntese na pele do 7-desidroxicolesterol em resposta à luz ultravioleta (UV) também emitidos pelos raios solares. No fígado, ocorre a hidroxilação por 25-hidroxilase, formando a 25-hidroxivitamina D (25(OH)D<sub>3</sub>). Nos rins, a 1α-hidroxilase atua na hidroxilação da 25(OH)D<sub>3</sub> para a forma biologicamente mais ativa da vitamina D, a 1,25-di-hidroxivitamina D<sub>3</sub> (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>). Tanto o 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> quanto o

25(OH)D<sub>3</sub> são imunomoduladores por ligação a um receptor de vitamina D (VDR) presente no núcleo de quase todas as células imunológicas. Seus efeitos imunomoduladores incluem a inibição da diferenciação de monócitos em células dendríticas, a proliferação de células B, a diferenciação de células plasmáticas e produção de anticorpos. A vitamina também induz a ativação de células *natural killer* (NK). Fonte: Elaborada pela autora.

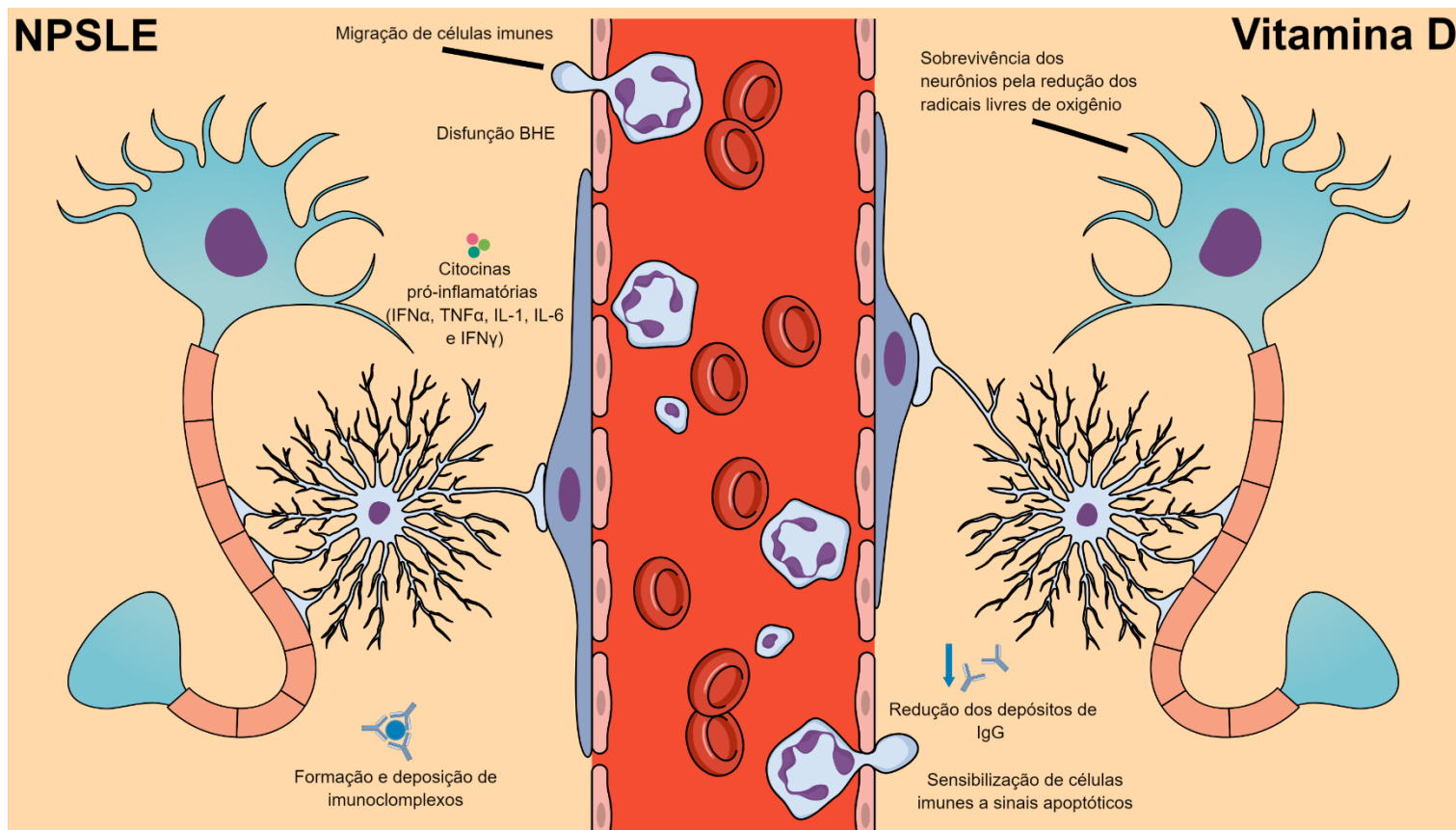
A vitamina D pode ser produzida localmente no cérebro, e seus metabólitos são capazes de atravessar a BHE. Esta vitamina desempenha um papel importante na promoção da sobrevivência dos neurônios. Ainda, pode suprimir as vias oxidativas no cérebro, reduzindo a formação de radicais livres de oxigênio (154). Em um estudo prévio, demonstramos que a suplementação com vitamina D pode reduzir o depósito de IgG no cérebro de camundongos com lúpus induzido por pristane (Figura 5) (29).

Sua ação é exercida nas células-alvo por meio de receptores nucleares (155). A 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> se liga ao VDR nuclear, ativando-o para desencadear uma resposta celular. Este receptor ativado forma um complexo com o receptor do ácido retinoico X (RXR), que então se desloca para o núcleo da célula. O complexo VDR-RXR se liga a sequências específicas de DNA chamadas elementos de resposta à vitamina D (VDREs) presentes nas regiões regulatórias dos genes. Esta ligação ao DNA resulta na ativação ou supressão da transcrição gênica, influenciando a produção de proteínas e, assim, afetando os processos celulares e biológicos (156,157).

A fosforilação de proteínas pode exercer um mecanismo regulatório de diversos processos celulares e vias metabólicas, e essa modificação também pode controlar a atividade de certas proteínas receptoras (158). O VDR é fosforilado em resíduos de serina por várias cinases diferentes. A Ser208 é o principal local fosforilado pela caseína quinase II após a adição de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (158). A fosforilação da Ser208 do VDR humano aumenta a atividade transcricional do heterodímero VDR-RXR, possivelmente aumentando as interações com coativadores (158–160).

No cérebro humano e em murinos, também são expressas proteínas VDR, em diversas regiões como no cerebelo, tálamo, hipotálamo, gânglios basais, hipocampo, sistema olfativo e os córtices temporais, orbitais e cingulados (19,20,161). A presença do VDR no hipocampo, córtex e sistemas límbicos, tanto de humanos, como de roedores, demonstra um papel funcional da vitamina D na regulação da aprendizagem e memória, bem como funções

cognitivas (162,163). A vitamina D pode também desempenhar um papel no sistema somatossensorial, visto que seu receptor está presente nos sistemas olfativo, visual e auditivo (155,164).



**Figura 5.** Vitamina D e a barreira hematoencefálica (BHE). No NPSLE, a ruptura da BHE proporciona a passagem de células do sistema imunológico e de moléculas para o cérebro. A vitamina D é capaz de reduzir os radicais livres no ambiente cerebral proporcionando sobrevivência neuronal, também é capaz de reduzir os depósitos de IgG e garantir a sinalização apoptótica pelas células do sistema imunológico. Figura produzida pela autora.

## 2.7 Modelo animal de lúpus neuropsiquiátrico

Devido a frequentes complicações no SNC, como a disfunção comportamental e cognitiva, associados ao LES e à dificuldade em compreender plenamente a extensão dessas manifestações, associado ao fato de que o mecanismo disfuncional do NPSLE permanece em grande parte pouco definido, torna-se indispensável a busca por modelos que representem de forma mais precisa as características clínicas do LES e NPSLE. Isso é fundamental para realizar estudos aprofundados sobre essas condições (24,25).

A maioria dos modelos animais para lúpus produz autoanticorpos, complexos imunes e desenvolve glomerulonefrite. Os modelos variam entre os animais que desenvolvem a doença espontaneamente, como os modelos NZB/F1; os animais que são geneticamente modificados para desenvolver a doença, como os modelos MRL/*lpr*, e os modelos animais induzidos, como por exemplo o lúpus induzido por pristane (Balb/c e C57) (165,166).

O modelo NZB/F1 é o modelo mais antigo de lúpus. Apresenta diversas manifestações semelhante a doença, incluindo esplenomegalia, elevação sérica de autoanticorpos anti-dsDNA, produção de citocinas IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e nefrite mediada por complexos imunes. Também apresenta manifestações neuropsiquiátricas, como déficits de aprendizagem e memória (167).

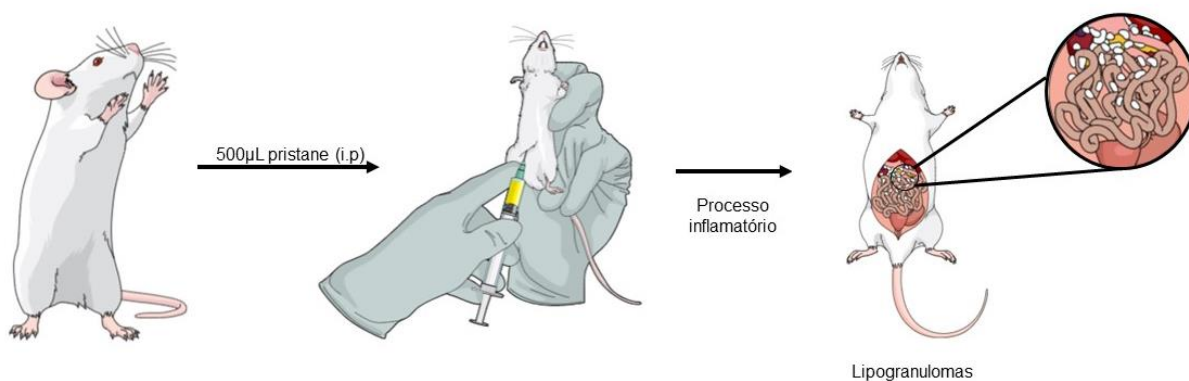
O modelo MRL/*lpr*, por outro lado, é derivado de uma mutação espontânea no gene autossômico recessivo *lpr*. Essa mutação é responsável por alterações na transcrição no receptor Fas, levando a linfadenopatia, aumento significativo de células T, altos títulos de autoanticorpos e à falta de apoptose nos linfócitos. Esse modelo desenvolve uma doença que se assemelha ao lúpus de forma rápida e agressiva, caracterizada por danos imunomediados nos rins, pele, coração, pulmões, articulações e cérebro (167).

Algumas pesquisas conduzidas com camundongos da linhagem MRL/*lpr* revelaram uma propensão desses animais a manifestarem sintomas neuropsiquiátricos, incluindo disfunções cognitivas e ansiedade. Para confirmar a condição patológica, são necessários diversos testes, como avaliações de ansiedade, comportamento depressivo, comportamentos semelhantes aos da doença, além de testes de cognição e habilidades motoras. Além das avaliações realizadas com os animais, é possível conduzir exames post-mortem, tais como análises de marcadores de IgG, dosagem de albumina, medição de citocinas inflamatórias e estudo dos infiltrados celulares no cérebro (168–170).

O modelo de lúpus induzido por pristane (PIL) é capaz de produzir uma ampla variedade de autoanticorpos específicos associados ao LES. Animais com PIL desenvolvem, além da elevada produção de autoanticorpos, diversas manifestações semelhantes ao LES em humanos, tais como glomerulonefrite, aumento da expressão de IFN I, serosite e artrite (171).

## 2.8 Lúpus induzido por pristane (PIL)

O PIL é um modelo LES reproduzido em camundongos Balb/c ou C57BL/6J, conhecido por ser o modelo mais semelhante do LES em humanos quando comparado aos modelos espontâneos e geneticamente modificados (172). A doença é induzida por meio de uma injeção intraperitoneal de 500  $\mu$ L de pristane, um alcano isoprenóide, que provoca uma resposta imune, resultando em uma inflamação local (lipogranulomas) no peritônio (figura 6) (172). Este modelo é caracterizado pela produção de autoanticorpos específicos do LES, proteinúria, serosite, glomerulonefrite, aumento da expressão de TNF $\alpha$  e artrite (171,173,174).



**Figura 6.** Lipogranulomas no peritônio de camundongos Balb/c. Após a injeção intraperitoneal com pristane, ocorre o desenvolvimento de uma inflamação local, caracterizada por lipogranulomas. Adaptada de Karnopp et al (167).

A produção de citocinas inflamatórias desempenha um papel importante no PIL. O estímulo para a formação de autoanticorpos é feito pelas citocinas IL-6, IL-12, IFN I, IFN- $\gamma$  neste modelo (175,176). Estas citocinas promovem a produção de autoanticorpos, como anti-dsDNA, anti-ssDNA, anti-ribossomal P, anti-Sm e anti-Su (173,177–180).

Ainda, o modelo PIL expressa grandes quantidades de IFN I e IFN- $\gamma$ , além de uma forte assinatura de IFN, característica da doença em seres humanos (174,181,182). Enquanto o IFN I é detectável em apenas duas semanas após a indução do pristane, os autoanticorpos aparecem apenas após três meses da indução da doença (183).



Sabe-se que citocinas pró-inflamatórias, como a IL-6 e IL-1, podem induzir o comprometimento experimental da aprendizagem cognitiva, emocional e espacial. Camundongos com PIL têm uma expressão elevada de IL-6 no soro (174,182). O modelo também apresenta hipergamaglobulinemia e produção de anticorpos antinucleares (ANA), semelhante ao LES em humanos (184).

Em relação ao NPSLE, Jeltsch-David e Muller (170), apontaram que não há descrições de manifestações neuropsiquiátricas em animais com lúpus induzido. No entanto, um estudo mostrou que camundongos Balb/c com PIL tenderam a diminuir sua atividade de locomoção espontânea (185), semelhante ao que ocorre no modelo MRL/lpr. Essa diminuição na atividade de locomoção poderia estar associada à depressão, como no modelo MRL/lpr e em pacientes com LES (169).

Recentemente, foi descrita uma baixa regulação, no hipocampo, das subunidades NR2A do gene NMDA, relacionadas ao comprometimento cognitivo no modelo PIL. Os autores demonstram que o pristane pode ter um papel potencial em perturbar a BHE, produzindo anticorpos anti-Sm. Eles também encontraram distúrbios de aprendizagem e memória, associados à baixa regulação da NR2A (26).

Ainda, Yun e colaboradores (27,28) encontraram distúrbios olfatórios, comportamento do tipo ansioso e depressivo, aumento de citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-10 no cérebro de camundongos com PIL, além de depósitos de lipofuscina e IgG no cérebro destes animais. Este último achado corrobora os resultados prévios de nosso grupo de pesquisa (29).

## **2.9 Testes comportamentais**

### *2.9.1 Nado Forçado*

A depressão é frequentemente vista como uma falta de capacidade de lidar com o estresse. O teste de nado forçado envolve a exposição dos animais ao estresse e avalia o comportamento do animal a esse estímulo (186).

O teste consiste em alocar o animal em um pequeno recipiente com água em temperatura ambiente, em nível adequado para que o animal não encoste a cauda ou as patas no fundo do recipiente (170). Ao ser colocado no recipiente, o animal tentará escapar, nadando ou escalando as paredes do recipiente.

Eventualmente, este permanecerá imóvel (ou seja, flutuará sem qualquer movimento, exceto os necessários para manter o nariz acima da água ou se reequilibrar) (187–189). Esta imobilidade tem sido interpretada como refletindo um estado de “desespero comportamental” ou desamparo, que ocorre quando o animal aprende que escapar é impossível, caracterizando um comportamento do tipo depressivo (190,191).

### *2.9.2 Locomoção em campo aberto*

A locomoção em campo aberto consiste em alocar o animal em uma arena com paredes transparentes. Esta arena é monitorada por sensores que rastreiam as atividades locomotoras do animal. Os sintomas de comportamento depressivo incluem fadiga e apatia, que podem ser avaliadas como diminuição da atividade voluntária e da exploração em um ambiente novo e fechado. Além disso, a locomoção em campo aberto também pode refletir um comportamento semelhante à ansiedade, medido pela quantidade de tempo que o animal evita a área central da arena e permanece próximo à parede (170).

### *2.9.3 Labirinto elevado*

O teste do labirinto elevado é utilizado para medir o comportamento semelhante à ansiedade em roedores e pode fornecer informações sobre condições marcadas por comportamento ansioso. Também pode ser empregado como componente na triagem de novos compostos quanto a propriedades ansiolíticas. Este modelo baseia-se na aversão a espaços abertos, sendo que quanto menor o tempo que o animal permanecer nos braços abertos, mais ansioso ele estará (169,192,193).

### *2.9.4 Labirinto de Barnes*

O labirinto de Barnes é um teste usado para memória espacial. Ele avalia a capacidade do animal em aprender e memorizar o comando ensinado. Este teste representa uma alternativa bem estabelecida ao mais popular labirinto aquático de Morris e oferece a vantagem de estar livre da influência potencialmente confusa do comportamento de natação (194).

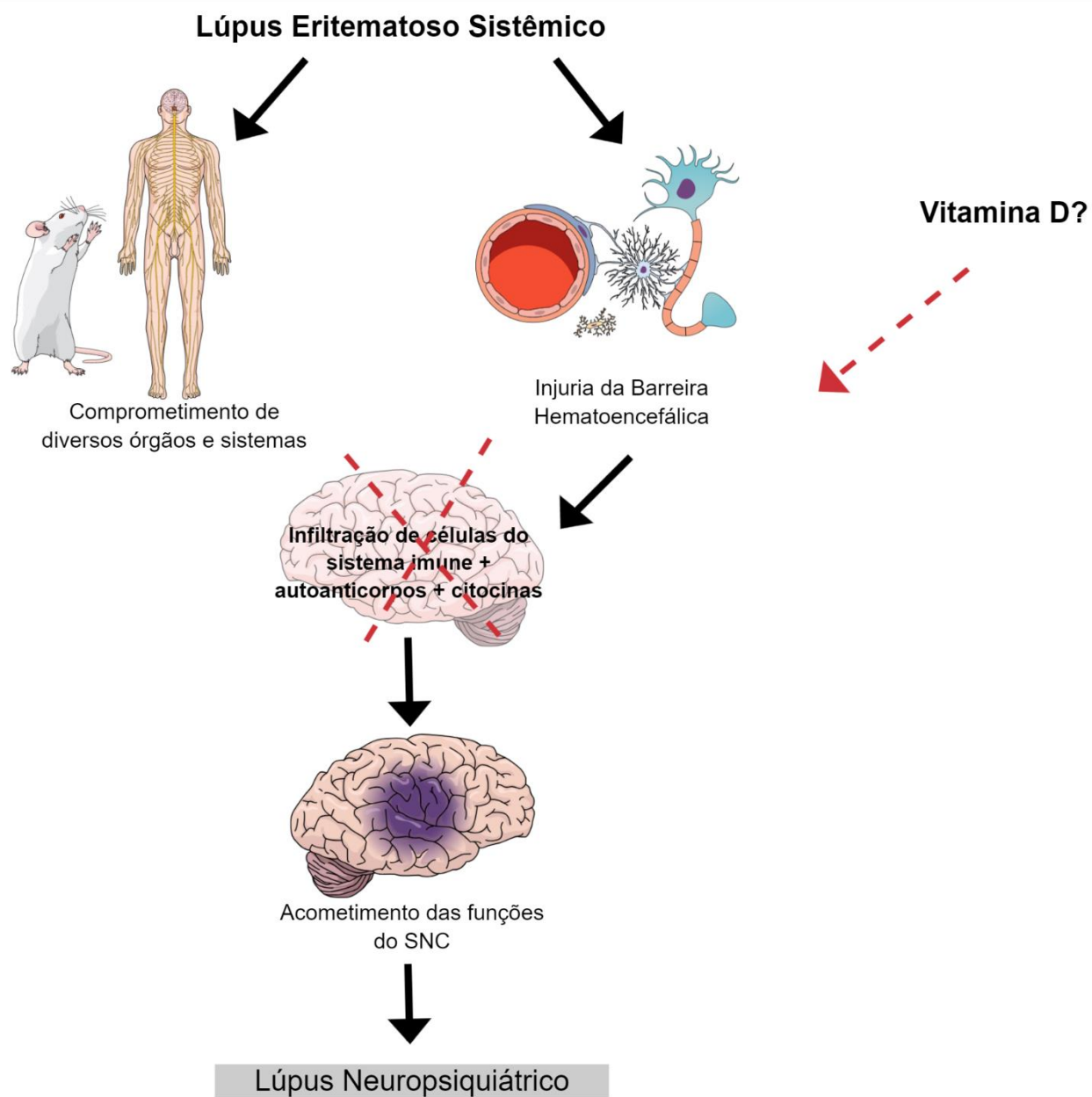
A configuração típica do labirinto de Barnes consiste em uma plataforma circular elevada com diversos buracos espaçados uniformemente ao redor do perímetro. Uma caixa de fuga é montada embaixo de um buraco (buraco alvo). Cada vez que o animal colocar a cabeça a modo de explorar um dos buracos que não contém a caixa de fuga, um erro é contabilizado. O objetivo do animal é encontrar o buraco alvo e entrar nele com um menor número de erros possível e maior rapidez (194).

### 3. MARCO CONCEITUAL

A geração de autoanticorpos contra constituintes celulares do próprio hospedeiro leva à inflamação crônica. Esta inflamação acomete diversos órgãos do corpo, levando ao LES. Quando a inflamação atinge o SNC, havendo quebra na BHE, há infiltração de células do sistema imune, como linfócitos T e B, citocinas e autoanticorpos também são penetráveis. Esta sequência de eventos pode levar ao comprometimento das funções do SNC.

Diversos sintomas podem ser apresentados, como disfunções cognitivas, convulsões, distúrbios de humor, depressão e outros. Esses eventos são propícios para o desenvolvimento do lúpus neuropsiquiátrico. Estudos em pacientes são raros devido à dificuldade em acessar o SNC. Modelos experimentais de LES são uma alternativa para se estudar as implicações clínicas, laboratoriais e comportamentais do NPSLE.

A vitamina D possui diversas funções fisiológicas, principalmente no metabolismo ósseo e do cálcio, no entanto recentemente descobriu-se efeito no metabolismo do sistema endócrino e na imunomodulação. Ainda, a vitamina D é capaz de proporcionar proteção ao sistema neuronal. No entanto são escassos estudos descrevendo tais efeitos relacionados ao NPSLE (Figura 7).



**Figura 7.** Marco conceitual do lúpus neuropsiquiátrico.

#### 4. JUSTIFICATIVA

O uso da suplementação de vitamina D em pacientes com doenças autoimunes é uma recomendação comum. Entretanto ainda são escassos os estudos que observam as alterações clínicas e laboratoriais no SNC causados pelo NPSLE, bem como quais os mecanismos de imunomodulação da vitamina D neste sistema. Visando uma melhor compreensão do NPSLE e dos efeitos da suplementação com vitamina D no SNC, os modelos animais são uma excelente fonte de conhecimento. Existem diversos modelos de NPSLE bem estabelecidos na literatura, porém esses modelos são espontâneos e mimetizam poucos sintomas do LES. Em contrapartida, o modelo PIL é um modelo induzido que, além de mimetizar uma maior variedade de sinais e sintomas do LES, possui um fator de indução ambiental da doença, como ocorre em humanos. Apesar do crescente aumento de publicações utilizando o modelo PIL nos últimos anos, pouco é estudado sobre as manifestações neuropsiquiátricas presentes neste modelo murino de SLE e as implicações da suplementação com vitamina D.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo Principal**

– Avaliar os efeitos imunorregulatórios da vitamina D no cérebro de modelo murino de lúpus induzido por pristane.

### **5.2 Objetivos específicos**

- Avaliar as manifestações neuropsiquiátricas como depressão, disfunção cognitiva e transtorno de ansiedade no modelo murino de lúpus induzido por pristane;
- Avaliar os níveis séricos de IL-6 e IFN- $\alpha$ 1 no modelo murino de lúpus induzido por pristane;
- Avaliar o depósito de IgM e IgG total no cérebro deste modelo murino de lúpus induzido por pristane;
- Avaliar a expressão do receptor ativo da vitamina D no cérebro deste modelo murino de lúpus induzido por pristane;

## 6. REFERÊNCIAS

1. D'Cruz DP, Khamashta M a, Hughes GR V. Systemic lupus erythematosus. *The Lancet*. 2007 Feb;369(9561):587–96.
2. Uva L, Miguel D, Pinheiro C, Freitas JP, Marques Gomes M, Filipe P. Cutaneous manifestations of systemic lupus erythematosus. Vol. 1, *Autoimmune Diseases*. 2012.
3. Tsokos GC, Lo MS, Reis PC, Sullivan KE. New insights into the immunopathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Nat Rev Rheumatol*. 2016;12(12):716–30.
4. Herrmann M, Voll RE, Kalden JR. Etiopathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Immunol Today*. 2000;21(9):424–6.
5. Klumb EM, Scheinberg M, Souza VA de, Xavier RM, Azevedo VF, McElwee E, et al. The landscape of systemic lupus erythematosus in Brazil: An expert panel review and recommendations. *Lupus*. 2021 Sep 13;30(10):1684–95.
6. Reumatologia SB de. Lúpus [Internet]. 2011 [cited 2020 Aug 5]. p. 22. Available from: <https://www.reumatologia.org.br/orientacoes-ao-paciente/lupus-eritematoso-sistemico-les-cartilha-da-sbr/>
7. Ginzler E, Tayar J. Systemic Lupus Erythematosus. *American College of Rheumatology*. 2013;1–6.
8. Schwartz N, Stock AD, Putterman C. Neuropsychiatric lupus: new mechanistic insights and future treatment directions. *Nat Rev Rheumatol*. 2019 Mar 1;15(3):137–52.
9. Bertias GK, Ioannidis JPA, Aringer M, Bollen E, Bombardieri S, Bruce IN, et al. EULAR recommendations for the management of systemic lupus erythematosus with neuropsychiatric manifestations: report of a task force of the EULAR standing committee for clinical affairs. *Ann Rheum Dis*. 2010;69(12):2074–82.
10. Unterman A, Nolte JES, Boaz M, Abady M, Shoenfeld Y, Zandman-Goddard G. Neuropsychiatric Syndromes in Systemic Lupus Erythematosus: A Meta-Analysis. *Semin Arthritis Rheum*. 2011;41(1):1–11.
11. Borowoy AM, Pope JE, Silverman E, Fortin PR, Pineau C, Smith CD, et al. Neuropsychiatric Lupus: The Prevalence and Autoantibody Associations Depend on the Definition: Results from the 1000 Faces of Lupus Cohort. *Semin Arthritis Rheum*. 2012;42(2):179–85.
12. Wen J, Stock AD, Chalmers SA, Putterman C. The role of B cells and autoantibodies in neuropsychiatric lupus. Vol. 15, *Autoimmunity Reviews*. 2016. p. 890–5.
13. Simone Appenzeller, Lilian Tereza Lavras Costallat. Central Nervous System Manifestations in Systemic Lupus Erythematosus. *Curr Rheumatol Rev*. 2007 Aug 1;3(3):205–14.
14. Kamen DL. Vitamin d in lupus: New kid on the block? *Bull NYU Hosp Jt Dis*. 2010;68(3):218–22.
15. Aranow C. Vitamin D and the immune system. *Journal of Investigative Medicine*. 2011;59(6):881–6.
16. Yap KS, Northcott M, Hoi ABY, Morand EF, Nikpour M. Association of low vitamin D with high disease activity in an Australian systemic lupus erythematosus cohort. *Lupus Sci Med*. 2015;2(1):e000064.
17. Bikle D. Nonclassic actions of vitamin D. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2009;94(1):26–34.



18. Veenstra TD, Prüfer K, Koenigsberger C, Brimijoin SW, Grande JP, Kumar R. 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> receptors in the central nervous system of the rat embryo. *Brain Res.* 1998;804(2):193–205.
19. Prüfer K, Veenstra TD, Jirikowski GF, Kumar R. Distribution of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> receptor immunoreactivity in the rat brain and spinal cord. *J Chem Neuroanat.* 1999;16(2):135–45.
20. Eyles DW, Smith S, Kinobe R, Hewison M, McGrath JJ. Distribution of the vitamin D receptor and 1 alpha-hydroxylase in human brain. *J Chem Neuroanat.* 2005;29(1):21–30.
21. Cui X, McGrath JJ, Burne THJ, Mackay-Sim A, Eyles DW. Maternal vitamin D depletion alters neurogenesis in the developing rat brain. *International Journal of Developmental Neuroscience.* 2007;25(4):227–32.
22. Harms LR, Burne THJ, Eyles DW, McGrath JJ. Vitamin D and the brain. Vol. 25, *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism.* 2011. p. 657–69.
23. Nair-Shalliker V, Armstrong BK, Fenech M. Does vitamin D protect against DNA damage? *Mutat Res.* 2012;733(1–2):50–7.
24. Vo A, Volpe BT, Tang CC, Schiffer WK, Kowal C, Huerta PT, et al. Regional Brain Metabolism in a Murine Systemic Lupus Erythematosus Model. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism.* 2014 Aug 14;34(8):1315–20.
25. Tsokos GC. Systemic Lupus Erythematosus. *New England Journal of Medicine.* 2011;365(22):2110–21.
26. Luciano-Jaramillo J, Sandoval-García F, Vázquez-Del Mercado M, Gutiérrez-Mercado YK, Navarro-Hernández RE, Martínez-García EA, et al. Downregulation of hippocampal NR2A/2B subunits related to cognitive impairment in a pristane-induced lupus BALB/c mice. Kavushansky A, editor. *PLoS One.* 2019 Sep 9;14(9):e0217190.
27. Yun Y, Wang X, Xu J, Chen J, Wang X, Yang P, et al. Optogenetic stimulation of basal forebrain cholinergic neurons prevents neuroinflammation and neuropsychiatric manifestations in pristane induced lupus mice. *Behav Brain Funct.* 2023 Jun 15;19(1):11.
28. Yun Y, Wang X, Xu J, Jin C, Chen J, Wang X, et al. Pristane induced lupus mice as a model for neuropsychiatric lupus (NPSLE). *Behavioral and Brain Functions.* 2023 Feb 10;19(1):3.
29. Karnopp TE, Freitas EC, Rieger A, Chapacais GF, Monticielo OA. Higher IgG level correlated with vitamin D receptor in the hippocampus of a pristane-induced lupus model. *Clin Rheumatol.* 2022 Feb 12;(0123456789).
30. La Paglia GMC, Leone MC, Lepri G, Vagelli R, Valentini E, Alunno A, et al. One year in review 2017: systemic lupus erythematosus. *Clinical and Experimental Rheumatology.* 2017;35:551–61.
31. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, Mcshane DJ, Rothfield NF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1982 Nov 1;25(11):1271–7.
32. Hochberg MC. Updating the American college of rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1997 Sep 1;40(9):1725–1725.
33. Petri M, Orbai AM, Alarcón GS, Gordon C, Merrill JT, Fortin PR, et al. Derivation and validation of the systemic lupus international collaborating clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2012;64(8):2677–86.
34. Aringer M, Costenbader K, Daikh D, Brinks R, Mosca M, Ramsey-Goldman R, et al. 2019 European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.* 2019 Sep;78(9):1151–9.

35. Narváez J. Lupus erythematosus 2020. *Medicina Clínica (English Edition)*. 2020 Dec;155(11):494–501.
36. Justiz Vaillant AA, Goyal A, Varacallo M. Systemic Lupus Erythematosus [Internet]. 2023 [cited 2023 Oct 18]. Available from: [www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535405/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535405/)
37. Khan MF, Wang H. Environmental Exposures and Autoimmune Diseases: Contribution of Gut Microbiome. *Front Immunol*. 2020 Jan 10;10:3094.
38. Solhjoo M, Bansal P, Goyal A, Chauhan K. Drug-Induced Lupus Erythematosus. *StatPearls*. 2021 Jan 27;
39. Fan Y, Hao YJ, Zhang ZL. Systemic lupus erythematosus: year in review 2019. *Chin Med J (Engl)*. 2020 Sep 20;133(18):2189–96.
40. Karnopp TE, Chapacais GF, Freitas EC, Monticelo OA. Lupus animal models and neuropsychiatric implications. *Clin Rheumatol*. 2021;40(7):2535–45.
41. Baechler EC, Batliwalla FM, Karypis G, Gaffney PM, Ortmann WA, Espe KJ, et al. Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(5):2610–5.
42. Dall'Era MC, Cardarelli PM, Preston BT, Witte A, Davis JC. Type I interferon correlates with serological and clinical manifestations of SLE. *Ann Rheum Dis*. 2005;64(12):1692–7.
43. Theofilopoulos AN, Kono DH, Beutler B, Baccala R. Intracellular Nucleic Acid Sensors and Autoimmunity. *Journal of Interferon & Cytokine Research*. 2011;31(12):867–86.
44. Mahajan A, Herrmann M, Muñoz LE. Clearance Deficiency and Cell Death Pathways: A Model for the Pathogenesis of SLE. *Front Immunol*. 2016 Feb 8;7.
45. Shao WH, Cohen PL. Disturbances of apoptotic cell clearance in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther*. 2010;13(1):202.
46. Herrmann M, Voll RE, Zoller OM, Hagenhofer M, Ponner BB, Kalden JR. Impaired phagocytosis of apoptotic cell material by monocyte-derived macrophages from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1998 Jul;41(7):1241–50.
47. Gaipf US, Munoz LE, Grossmayer G, Lauber K, Franz S, Sarter K, et al. Clearance deficiency and systemic lupus erythematosus (SLE). *J Autoimmun*. 2007 Mar;28(2–3):114–21.
48. Kivity S, Agmon-Levin N, Zandman-Goddard G, Chapman J, Shoenfeld Y. Neuropsychiatric lupus: a mosaic of clinical presentations. *BMC Med*. 2015;13(1):43.
49. Hanly JG. Diagnosis and management of neuropsychiatric SLE. *Nat Rev Rheumatol*. 2014 Jun 11;10(6):338–47.
50. Liang MH, Corzillius M, Bae SC, Lew RA, Fortin PR, Gordon C, et al. The American College of Rheumatology nomenclature and case definitions for neuropsychiatric lupus syndromes. *Arthritis Rheum*. 1999 Apr;42(4):599–608.
51. Moore E, Huang MW, Putterman C. Advances in the diagnosis, pathogenesis and treatment of neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol*. 2020 Mar 1;32(2):152–8.
52. Lauvsnes MB, Tjensvoll AB, Maroni SS, Kvikvik I, Grimstad T, Greve OJ, et al. The blood–brain barrier, TWEAK, and neuropsychiatric involvement in human systemic lupus erythematosus and primary Sjögren’s syndrome. *Lupus*. 2018 Nov 1;27(13):2101–11.
53. Nestor J, Arinuma Y, Huerta TS, Kowal C, Nasiri E, Kello N, et al. Lupus antibodies induce behavioral changes mediated by microglia and blocked by ACE inhibitors. *Journal of Experimental Medicine*. 2018 Oct 1;215(10):2554–66.
54. Choi MY, FitzPatrick RD, Buhler K, Mahler M, Fritzler MJ. A review and meta-analysis of anti-ribosomal P autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev*. 2020 Mar;19(3):102463.

55. Yaniv G, Twig G, Shor DBA, Furer A, Sherer Y, Mozes O, et al. A volcanic explosion of autoantibodies in systemic lupus erythematosus: A diversity of 180 different antibodies found in SLE patients. Vol. 14, *Autoimmunity Reviews*. 2015. p. 75–9.
56. Jafri K, Patterson SL, Lanata C. Central Nervous System Manifestations of Systemic Lupus Erythematosus. *Rheumatic Disease Clinics of North America*. 2017 Nov;43(4):531–45.
57. Brimberg L, Mader S, Fujieda Y, Arinuma Y, Kowal C, Volpe BT, et al. Antibodies as Mediators of Brain Pathology. Vol. 36, *Trends in Immunology*. 2015. p. 709–24.
58. Kowal C, DeGiorgio LA, Lee JY, Edgar MA, Huerta PT, Volpe BT, et al. Human lupus autoantibodies against NMDA receptors mediate cognitive impairment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006;103(52):19854–9.
59. Huerta PT, Kowal C, DeGiorgio LA, Volpe BT, Diamond B. Immunity and behavior: antibodies alter emotion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Jan 17;103(3):678–83.
60. Kowal C, DeGiorgio LA, Nakaoka T, Hetherington H, Huerta PT, Diamond B, et al. Cognition and immunity: Antibody impairs memory. *Immunity*. 2004;21(2):179–88.
61. De Boer AG, Gaillard PJ. Blood-brain barrier dysfunction and recovery. *J Neural Transm*. 2006;113(4):455–62.
62. Patel JP, Frey BN. Disruption in the blood-brain barrier: The missing link between brain and body inflammation in bipolar disorder? Vol. 2015, *Neural Plasticity*. 2015.
63. Jacob A, Hack B, Chen P, Quigg RJ, Alexander JJ. C5a/CD88 signaling alters blood-brain barrier integrity in lupus through nuclear factor- $\kappa$ B. *J Neurochem*. 2011;119(5):1041–51.
64. Gelb S, Stock AD, Anzi S, Putterman C, Ben-Zvi A. Mechanisms of neuropsychiatric lupus: The relative roles of the blood-cerebrospinal fluid barrier versus blood-brain barrier. *J Autoimmun*. 2018;91:34–44.
65. Faust TW, Chang EH, Kowal C, Berlin R, Gazaryan IG, Bertini E, et al. Neurotoxic lupus autoantibodies alter brain function through two distinct mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010;
66. Rekvig OP, Putterman C, Casu C, Gao HX, Ghirardello A, Mortensen ES, et al. Autoantibodies in lupus: Culprits or passive bystanders? *Autoimmun Rev*. 2012 Jun;11(8):596–603.
67. DeGiorgio LA, Konstantinov KN, Lee SC, Hardin JA, Volpe BT, Diamond B. A subset of lupus anti-DNA antibodies cross-reacts with the NR2 glutamate receptor in systemic lupus erythematosus. *Nat Med*. 2001 Nov 1;7(11):1189–93.
68. Schwartz N, Stock AD, Putterman C. Neuropsychiatric lupus: new mechanistic insights and future treatment directions. *Nat Rev Rheumatol*. 2019 Mar 18;15(3):137–52.
69. Lapa AT, Postal M, Sinicato NA, Bellini BS, Fernandes P, Marini R, et al. S100 $\beta$  is associated with cognitive impairment in childhood-onset systemic lupus erythematosus patients. *Lupus*. 2017 Apr 10;26(5):478–83.
70. Noris-García E, Arce S, Nardin P, Lanigan M, Acuña V, Gutierrez F, et al. Peripheral levels of brain-derived neurotrophic factor and S100B in neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2018 Nov 30;27(13):2041–9.
71. Namjou B, Kothari PH, Kelly JA, Glenn SB, Ojwang JO, Adler A, et al. Evaluation of the TREX1 gene in a large multi-ancestral lupus cohort. *Genes Immun*. 2011 Jun 27;12(4):270–9.
72. Blank T, Prinz M. Type I interferon pathway in CNS homeostasis and neurological disorders. *Glia*. 2017 Sep;65(9):1397–406.

73. Rice GI, Rodero MP, Crow YJ. Human Disease Phenotypes Associated With Mutations in TREX1. *J Clin Immunol*. 2015 Apr 4;35(3):235–43.
74. Kisla Ekinci RM, Balci S, Bisgin A, Altintas DU, Yilmaz M. A homozygote TREX1 mutation in two siblings with different phenotypes: Chilblains and cerebral vasculitis. *Eur J Med Genet*. 2017 Dec;60(12):690–4.
75. Fredi M, Bianchi M, Andreoli L, Greco G, Olivieri I, Orcesi S, et al. Typing TREX1 gene in patients with systemic lupus erythematosus. *Reumatismo*. 2015 Jun 30;67(1):1–7.
76. Stock AD, Gelb S, Pasternak O, Ben-Zvi A, Putterman C. The blood brain barrier and neuropsychiatric lupus: new perspectives in light of advances in understanding the neuroimmune interface. *Autoimmun Rev*. 2017 Jun;16(6):612–9.
77. Mahajan SD, Parikh NU, Woodruff TM, Jarvis JN, Lopez M, Hennon T, et al. C5a alters blood-brain barrier integrity in a human *in vitro* model of systemic lupus erythematosus. *Immunology*. 2015 Sep;146(1):130–43.
78. Stock AD, Wen J, Putterman C. Neuropsychiatric Lupus, the Blood Brain Barrier, and the TWEAK/Fn14 Pathway. *Front Immunol*. 2013;4.
79. Wen J, Doerner J, Weidenheim K, Xia Y, Stock A, Michaelson JS, et al. TNF-like weak inducer of apoptosis promotes blood brain barrier disruption and increases neuronal cell death in MRL/lpr mice. *J Autoimmun*. 2015 Jun;60:40–50.
80. Zeng J, Meng X, Zhou P, Yin Z, Xie Q, Zou H, et al. Interferon- $\alpha$  exacerbates neuropsychiatric phenotypes in lupus-prone mice. *Arthritis Res Ther*. 2019 Sep 3;21(1).
81. Meszaros ZS, Perl A, Faraone S V. Psychiatric Symptoms in Systemic Lupus Erythematosus. *J Clin Psychiatry*. 2012 Jul 15;73(07):993–1001.
82. Bialas AR, Presumey J, Das A, van der Poel CE, Lapchak PH, Mesin L, et al. Microglia-dependent synapse loss in type I interferon-mediated lupus. *Nature*. 2017 Jun 22;546(7659):539–43.
83. Santer DM, Yoshio T, Minota S, Möller T, Elkon KB. Potent Induction of IFN- $\alpha$  and Chemokines by Autoantibodies in the Cerebrospinal Fluid of Patients with Neuropsychiatric Lupus. *The Journal of Immunology*. 2009 Jan 15;182(2):1192–201.
84. Wang JB, Li H, Wang LL, Liang HD, Zhao L, Dong J. Role of IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 and IFN- $\gamma$  in pathogenesis of central nervous system neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(9):16658–63.
85. Yoshio T, Okamoto H, Kurasawa K, Dei Y, Hirohata S, Minota S. IL-6, IL-8, IP-10, MCP-1 and G-CSF are significantly increased in cerebrospinal fluid but not in sera of patients with central neuropsychiatric lupus erythematosus. *Lupus*. 2016 Aug 3;25(9):997–1003.
86. Hirohata S, Kikuchi H. Role of Serum IL-6 in Neuropsychiatric Systemic lupus Erythematosus. *ACR Open Rheumatol*. 2021 Jan 3;3(1):42–9.
87. Asano T, Ito H, Kariya Y, Hoshi K, Yoshihara A, Ugawa Y, et al. Evaluation of blood-brain barrier function by quotient alpha2 macroglobulin and its relationship with interleukin-6 and complement component 3 levels in neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *PLoS One*. 2017 Oct 16;12(10):e0186414.
88. Erta M, Quintana A, Hidalgo J. Interleukin-6, a Major Cytokine in the Central Nervous System. *Int J Biol Sci*. 2012;8(9):1254–66.
89. Ali C, Nicole O, Docagne F, Lesne S, MacKenzie ET, Nouvelot A, et al. Ischemia-Induced Interleukin-6 as a Potential Endogenous Neuroprotective Cytokine against NMDA Receptor-Mediated Excitotoxicity in the Brain. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2000 Jun 31;20(6):956–66.
90. Maher A, El-Sayed NSE, Breitingner HG, Gad MZ. Overexpression of NMDAR2B in an inflammatory model of Alzheimer's disease: Modulation by NOS inhibitors. *Brain Res Bull*. 2014 Oct;109:109–16.

91. Diamond B, Volpe BT. A model for lupus brain disease. *Immunol Rev.* 2012 Jul;248(1):56–67.
92. Yoshio T, Hirata D, Onda K, Nara H, Minota S. Antiribosomal P protein antibodies in cerebrospinal fluid are associated with neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *Journal of Rheumatology.* 2005;32(1):34–9.
93. Popescu A, H. Kao A. Neuropsychiatric Systemic Lupus Erythematosus. *Curr Neuropharmacol.* 2011 Sep 1;9(3):449–57.
94. Wang JY, Zhao YH, Zhang JH, Lei HW. Anti-N-Methyl-D-Aspartic Acid Receptor 2 (Anti-NR2) Antibody in Neuropsychiatric Lupus Serum Damages the Blood–Brain Barrier and Enters the Brain. *Medical Science Monitor.* 2019 Jan 18;25:532–9.
95. Chan OTM, Madaio MR, Shlomchik MJ, Chan OIM, Madaio MP, Shlomchik MJ. The central and multiple roles of B cells in lupus pathogenesis. *Immunol Rev.* 1999 Jun;169(1):107–21.
96. Giles JR, Kashgarian M, Koni PA, Shlomchik MJ. B Cell–Specific MHC Class II Deletion Reveals Multiple Nonredundant Roles for B Cell Antigen Presentation in Murine Lupus. *The Journal of Immunology.* 2015;195(6):2571–9.
97. Talaat RM, Mohamed SF, Bassyouni IH, Raouf AA. Th1/Th2/Th17/Treg cytokine imbalance in systemic lupus erythematosus (SLE) patients: Correlation with disease activity. *Cytokine.* 2015 Apr 1;72(2):146–53.
98. Su DL, Lu ZM, Shen MN, Li X, Sun LY. Roles of Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines in the Pathogenesis of SLE. *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012:1–15.
99. Okamoto A, Fujio K, Okamura T, Yamamoto K. Regulatory T-Cell-Associated Cytokines in Systemic Lupus Erythematosus. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:1–9.
100. Naka T, Nishimoto N, Kishimoto T. The paradigm of IL-6: from basic science to medicine. *Arthritis Res.* 2002 May 9;4(3):S233–42.
101. Dienz O, Eaton SM, Bond JP, Neveu W, Moquin D, Noubade R, et al. The induction of antibody production by IL-6 is indirectly mediated by IL-21 produced by CD4+ T cells. *J Exp Med [Internet].* 2009 Jan 16 [cited 2023 Apr 13];206(1):69–78. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19139170/>
102. Linker-Israeli M, Deans RJ, Wallace DJ, Prehn J, Ozeri-Chen T, Klinenberg JR. Elevated levels of endogenous IL-6 in systemic lupus erythematosus. A putative role in pathogenesis. *J Immunol.* 1991 Jul 1;147(1):117–23.
103. Grondal G, Gunnarsson I, Ronnelid J, Rogberg S, Klareskog L, Lundberg I. Cytokine production, serum levels and disease activity in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol.* 2000;18(5):565–70.
104. Sun KH, Yu CL, Tang SJ, Sun GH. Monoclonal anti-double-stranded DNA autoantibody stimulates the expression and release of IL-1beta, IL-6, IL-8, IL-10 and TNF-alpha from normal human mononuclear cells involving in the lupus pathogenesis. *Immunology.* 2000;99(3):352–60.
105. Suzuki H, Yasukawa K, Saito T, Narazak M, Hasegawa A, Taga T, et al. Serum soluble interleukin-6 receptor in MRL/lpr mice is elevated with age and mediates the interleukin-6 signal. *Eur J Immunol.* 1993 May 1;23(5):1078–82.
106. Cash H, Relle M, Menke J, Brochhausen C, Jones SA, Topley N, et al. Interleukin 6 (IL-6) deficiency delays lupus nephritis in MRL-Fas/lpr mice: the IL-6 pathway as a new therapeutic target in treatment of autoimmune kidney disease in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 2010 Jan;37(1):60–70.
107. Finck BK, Chan B, Wofsy D. Interleukin 6 promotes murine lupus in NZB/NZW F1 mice. *Journal of Clinical Investigation.* 1994;94(2):585.
108. Tsai CY, Wu TH, Yu CL, Lu JY, Tsai YY. Increased Excretions of  $\beta$ 2-Microglobulin, IL-6, and IL-8 and Decreased Excretion of Tamm-Horsfall Glycoprotein in Urine of Patients with Active Lupus nephritis. *Nephron.* 2000;85(3):207–14.

109. Hirohata S, Kanai Y, Mitsuo A, Tokano Y, Hashimoto H. Accuracy of cerebrospinal fluid IL-6 testing for diagnosis of lupus psychosis. A multicenter retrospective study. *Clin Rheumatol*. 2009 Jul 12;28(11):1319–23.
110. Katsumata Y, Harigai M, Kawaguchi Y, Fukasawa C, Soejima M, Takagi K, et al. Diagnostic reliability of cerebral spinal fluid tests for acute confusional state (delirium) in patients with systemic lupus erythematosus: interleukin 6 (IL-6), IL-8, interferon-alpha, IgG index, and Q-albumin. *J Rheumatol*. 2007;34(10).
111. Hirohata S, Kikuchi H. Role of Serum IL-6 in Neuropsychiatric Systemic lupus Erythematosus. *ACR Open Rheumatol*. 2021 Jan 1;3(1):42–9.
112. Psarras A, Emery P, Vital EM. Type I interferon-mediated autoimmune diseases: pathogenesis, diagnosis and targeted therapy. *Rheumatology*. 2017 Jan 24;56(10):kew431.
113. Theofilopoulos AN, Baccala R, Beutler B, Kono DH. Type I interferons (alpha/beta) in immunity and autoimmunity. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:307–36.
114. Crow MK, Olfieriev M, Kirou KA. Type I Interferons in Autoimmune Disease. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-020117-043952>. 2019 Jan 24;14:369–93.
115. Raftopoulou S, Rapti A, Karathanasis D, Evangelopoulos ME, Mavragani CP. The role of type I IFN in autoimmune and autoinflammatory diseases with CNS involvement. *Front Neurol*. 2022 Nov 10;13.
116. Rönnblom L, Alm G V. Systemic lupus erythematosus and the type I interferon system. *Arthritis Res Ther*. 2003;5(2):68.
117. Crowl JT, Gray EE, Pestal K, Volkman HE, Stetson DB. Intracellular Nucleic Acid Detection in Autoimmunity. *Annu Rev Immunol*. 2017 Apr 26;35(1):313–36.
118. Schlee M, Hartmann G. Discriminating self from non-self in nucleic acid sensing. *Nature Reviews Immunology* 2016 16:9. 2016 Jul 25;16(9):566–80.
119. Bennett L, Palucka AK, Arce E, Cantrell V, Borvak J, Banchereau J, et al. Interferon and Granulopoiesis Signatures in Systemic Lupus Erythematosus Blood. *Journal of Experimental Medicine*. 2003 Mar 17;197(6):711–23.
120. Fukuyama S, Kajiwara E, Suzuki N, Miyazaki N, Sadoshima S, Onoyama K. Systemic lupus erythematosus after alpha-Interferon therapy for chronic hepatitis C: a case report and review of the literature. *Am J Gastroenterol*. 2000 Jan;95(1):310–2.
121. Ioannou Y, Isenberg DA. Current evidence for the induction of autoimmune rheumatic manifestations by cytokine therapy. *Arthritis Rheum*. 2000 Jul;43(7):1431–42.
122. Daniels BP, Holman DW, Cruz-Orengo L, Jujjavarapu H, Durrant DM, Klein RS. Viral Pathogen-Associated Molecular Patterns Regulate Blood-Brain Barrier Integrity via Competing Innate Cytokine Signals. *mBio*. 2014 Oct 31;5(5).
123. Daniels BP, Jujjavarapu H, Durrant DM, Williams JL, Green RR, White JP, et al. Regional astrocyte IFN signaling restricts pathogenesis during neurotropic viral infection. *Journal of Clinical Investigation*. 2017 Jan 30;127(3):843–56.
124. Owens T, Khoroshii R, Wlodarczyk A, Asgari N. Interferons in the central nervous system: A few instruments play many tunes. *Glia*. 2014 Mar;62(3):339–55.
125. Ejlerskov P, Hultberg JG, Wang J, Carlsson R, Ambjørn M, Kuss M, et al. Lack of Neuronal IFN- $\beta$ -IFNAR Causes Lewy Body- and Parkinson's Disease-like Dementia. *Cell*. 2015 Oct;163(2):324–39.
126. Hosseini S, Michaelsen-Preusse K, Grigoryan G, Chhatbar C, Kalinke U, Korte M. Type I Interferon Receptor Signaling in Astrocytes Regulates Hippocampal Synaptic Plasticity and Cognitive Function of the Healthy CNS. *Cell Rep*. 2020 May;31(7):107666.
127. Kundu N, Kumar A, Corona C, Chen Y, Seth S, Karuppagounder SS, et al. A STING agonist preconditions against ischaemic stroke via an adaptive antiviral Type 1 interferon response. *Brain Commun*. 2022 May 2;4(3).

128. Mastorakos P, Russo M V., Zhou T, Johnson K, McGavern DB. Antimicrobial immunity impedes CNS vascular repair following brain injury. *Nat Immunol*. 2021 Oct 23;22(10):1280–93.
129. Deczkowska A, Matcovitch-Natan O, Tsitsou-Kampeli A, Ben-Hamo S, Dvir-Szternfeld R, Spinrad A, et al. Mef2C restrains microglial inflammatory response and is lost in brain ageing in an IFN-I-dependent manner. *Nat Commun*. 2017 Sep 28;8(1):717.
130. Shiozawa S, Kuroki Y, Kim M, Hirohata S, Ogino T. Interferon-alpha in lupus psychosis. *Arthritis Rheum*. 1992 Apr;35(4):417–22.
131. Zeng J, Meng X, Zhou P, Yin Z, Xie Q, Zou H, et al. Interferon- $\alpha$  exacerbates neuropsychiatric phenotypes in lupus-prone mice. *Arthritis Res Ther*. 2019 Dec 3;21(1):205.
132. Campbell IL, Krucker T, Steffensen S, Akwa Y, Powell HC, Lane T, et al. Structural and functional neuropathology in transgenic mice with CNS expression of IFN- $\alpha$ 1. Published on the World Wide Web on 17 March 1999.1. *Brain Res*. 1999 Jul;835(1):46–61.
133. Lips P. Vitamin D physiology. Vol. 92, *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 2006. p. 4–8.
134. Wu S, Ren S, Nguyen L, Adams JS, Hewison M. Splice variants of the CYP27b1 gene and the regulation of 1,25-dihydroxyvitamin D3 production. *Endocrinology*. 2007;148(7):3410–8.
135. Lemire JM, Adams JS, Sakai R, Jordan SC. 1  $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D3 suppresses proliferation and immunoglobulin production by normal human peripheral blood mononuclear cells. *Journal of Clinical Investigation*. 1984;74(2):657–61.
136. Chen S, Sims GP, Chen XX, Gu YY, Chen S, Lipsky PE. Modulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on human B cell differentiation. *J Immunol*. 2007;179(3):1634–47.
137. Bhalla a K, Amento EP, Serog B, Glimcher LH. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits antigen-induced T cell activation. Vol. 133, *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950). 1984. p. 1748–54.
138. Almerighi C, Sinistro A, Cavazza A, Ciaprini C, Rocchi G, Bergamini A. 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits CD40L-induced pro-inflammatory and immunomodulatory activity in Human Monocytes. *Cytokine*. 2009;45(3):190–7.
139. Pelajo CF, Lopez-Benitez JM, Miller LC. Vitamin D and Autoimmune Rheumatologic Disorders. Vol. 9, *Autoimmunity Reviews*. 2010. p. 507–10.
140. Yap KS, Morand EF. Vitamin D and systemic lupus erythematosus: Continued evolution. *Int J Rheum Dis*. 2015;18(2):242–9.
141. Jeffery LE, Raza K, Hewison M. Vitamin D in rheumatoid arthritis—towards clinical application. *Nat Rev Rheumatol*. 2015;12(4):201–10.
142. Mathieu C. Vitamin D and diabetes: Where do we stand? Vol. 108, *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2015. p. 201–9.
143. Adorini L. Intervention in autoimmunity: The potential of vitamin D receptor agonists. In: *Cellular Immunology*. 2005. p. 115–24.
144. Mathieu C, Gysemans C, Giulietti A, Bouillon R. Vitamin D and diabetes mellitus. *Diabetologia*. 2005;48(7):1247–57.
145. Borba VZC, Vieira JGH, Kasamatsu T, Radominski SC, Sato EI, Lazaretti-Castro M. Vitamin D deficiency in patients with active systemic lupus erythematosus. *Osteoporos Int*. 2009;20(3):427–33.
146. Becker A, Fischer R, Schneider M. [Bone density and 25-OH vitamin D serum level in patients with systemic lupus erythematosus]. *Z Rheumatol*. 2001;60(5):352–8.
147. Lertratanakul A, Wu P, Dyer A, Urowitz M, Gladman D, Fortin P, et al. 25-Hydroxyvitamin D and Cardiovascular Disease in Patients With Systemic Lupus

- Erythematosus: Data From a Large International Inception Cohort. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2014;66(8):1167–76.
148. Reynolds JA, Haque S, Berry JL, Pemberton P, Teh LS, Ho P, et al. 25-Hydroxyvitamin D deficiency is associated with increased aortic stiffness in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology*. 2012;51(3):544–51.
  149. Gurion R, Tangpricha V, Yow E, Schanberg LE, McComsey GA, Robinson AB, Yun. Avascular necrosis in pediatric systemic lupus erythematosus: a brief report and review of the literature. Vol. 13, *Pediatric rheumatology online journal*. 2015. p. 13.
  150. Gholamrezaei A, Bonakdar ZS, Mirbagher L, Hosseini N. Sleep disorders in systemic lupus erythematosus Does vitamin D play a role? *Lupus*. 2014;23(10):1054–8.
  151. Ruiz-Irastorza G, Gordo S, Olivares N, Egurbide MV, Aguirre C. Changes in vitamin D levels in patients with systemic lupus erythematosus: Effects on fatigue, disease activity, and damage. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2010;62(8):1160–5.
  152. Smith SM, Zwart SR, Block G, Rice BL, Davis-Street JE. The Nutritional Status of Astronauts Is Altered after Long-Term Space Flight Aboard the International Space Station. *J Nutr*. 2005;135(3):437–43.
  153. Shoenfeld N, Amital H, Shoenfeld Y. The effect of melanism and vitamin D synthesis on the incidence of autoimmune disease. Vol. 5, *Nature Clinical Practice Rheumatology*. 2009. p. 99–105.
  154. Grimm MOW, Thiel A, Lauer AA, Winkler J, Lehmann J, Regner L, et al. Vitamin D and its analogues decrease amyloid- $\beta$  (A $\beta$ ) formation and increase A $\beta$ -degradation. *Int J Mol Sci*. 2017;18(12).
  155. Glaser SD, Veenstra TD, Jirikowski GF, Pr ufer K. Distribution of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> receptor immunoreactivity in the rat olfactory system. *Cell Mol Neurobiol*. 1999 Jan 1;19(5):613–24.
  156. Cui X, Gooch H, Petty A, McGrath JJ, Eyles D. Vitamin D and the brain: Genomic and non-genomic actions. *Mol Cell Endocrinol*. 2017 Sep;453:131–43.
  157. Monticielo OA, Teixeira T de M, Chies JAB, Brenol JCT, Xavier RM. Vitamin D and polymorphisms of VDR gene in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol*. 2012 Oct 13;31(10):1411–21.
  158. Jurutka PW, Hsieh JC, Nakajima S, Haussler CA, Whitfield GK, Haussler MR. Human vitamin D receptor phosphorylation by casein kinase II at Ser-208 potentiates transcriptional activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1996 Apr 16;93(8):3519–24.
  159. Barletta F, Freedman LP, Christakos S. Enhancement of VDR-mediated transcription by phosphorylation: Correlation with increased interaction between the VDR and DRIP205, a subunit of the VDR-interacting protein coactivator complex. *Molecular Endocrinology*. 2002 Jan 1;16(2):301–14.
  160. Arriagada G, Paredes R, Olate J, van Wijnen A, Lian JB, Stein GS, et al. Phosphorylation at serine 208 of the 1 $\alpha$ ,25-dihydroxy Vitamin D<sub>3</sub> receptor modulates the interaction with transcriptional coactivators. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2007 Mar;103(3–5):425–9.
  161. Pardridge WM, Sakiyama R, Coty WA. Restricted Transport of Vitamin D and A Derivatives Through the Rat Blood??Brain Barrier. *J Neurochem*. 1985;44(4):1138–41.
  162. Langub MC, Herman JP, Malluche HH, Koszewski NJ. Evidence of functional vitamin D receptors in rat hippocampus. *Neuroscience*. 2001 Apr;104(1):49–56.
  163. Brewer LD, Thibault V, Chen KC, Langub MC, Landfield PW, Porter NM. Vitamin D Hormone Confers Neuroprotection in Parallel with Downregulation of L-Type Calcium Channel Expression in Hippocampal Neurons. *The Journal of Neuroscience*. 2001 Jan 1;21(1):98–108.



164. Prüfer K, Veenstra TD, Jirikowski GF, Kumar R. Distribution of 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor immunoreactivity in the rat brain and spinal cord. *J Chem Neuroanat.* 1999 Feb;16(2):135–45.
165. Richard ML, Gilkeson G. Mouse models of lupus: what they tell us and what they don't. *Lupus Sci Med.* 2018;5(1):e000199.
166. Du Y, Sanam S, Kate K, Mohan C. Animal models of lupus and lupus nephritis. *Curr Pharm Des.* 2015;21(18):2320–49.
167. Karnopp TE, Chapacais GF, Freitas EC, Monticielo OA. Lupus animal models and neuropsychiatric implications. *Clin Rheumatol.* 2021 Jul 6;40(7):2535–45.
168. Ballok DA, Woulfe J, Sur M, Cyr M, Sakic B. Hippocampal damage in mouse and human forms of systemic autoimmune disease. Vol. 14, *Hippocampus.* 2004. p. 649–61.
169. Šakić B, Szechtman H, Talangbayan H, Denburg SD, Carbotte RM, Denburg JA. Disturbed emotionality in autoimmune MRL-lpr mice. *Physiol Behav.* 1994;56(3):609–17.
170. Jeltsch-David H, Muller S. Neuropsychiatric systemic lupus erythematosus and cognitive dysfunction: The MRL-lpr mouse strain as a model. *Autoimmun Rev* [Internet]. 2014 Sep;13(9):963–73. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1568997214001591>
171. Freitas EC, de Oliveira MS, Monticielo OA. Pristane-induced lupus: considerations on this experimental model. *Clin Rheumatol.* 2017;36(11):2403–14.
172. Shaheen VM, Satoh M, Richards HB, Yoshida H, Shaw M, Jennette JC, et al. Immunopathogenesis of environmentally induced lupus in mice. *Environ Health Perspect.* 1999;107 Suppl(suppl 5):723–7.
173. Satoh M. Induction of lupus-associated autoantibodies in BALB/c mice by intraperitoneal injection of pristane. *Journal of Experimental Medicine.* 1994 Dec 1;180(6):2341–6.
174. Correa Freitas E, Evelyn Karnopp T, de Souza Silva JM, Cavalheiro do Espírito Santo R, da Rosa TH, de Oliveira MS, et al. Vitamin D supplementation ameliorates arthritis but does not alleviates renal injury in pristane-induced lupus model. *Autoimmunity.* 2019;52(2):69–77.
175. Nacionales DC, Kelly-Scumpia KM, Lee PY, Weinstein JS, Lyons R, Sobel E, et al. Deficiency of the type I interferon receptor protects mice from experimental lupus. *Arthritis Rheum.* 2007;56(11):3770–83.
176. Mitani Y, Takaoka A, Kim SH, Kato Y, Yokochi T, Tanaka N, et al. Cross talk of the interferon- $\alpha/\beta$  signalling complex with gp130 for effective interleukin-6 signalling. *Genes to Cells.* 2001;6(7):631–40.
177. Richards HB. Interleukin 6 Dependence of Anti-DNA Antibody Production: Evidence for Two Pathways of Autoantibody Formation in Pristane-induced Lupus. *Journal of Experimental Medicine.* 2002;188(5):985–90.
178. Satoh M, Kumar A, Kanwar YS, Reeves WH. Anti-nuclear antibody production and immune-complex glomerulonephritis in BALB/c mice treated with pristane. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(24):10934–8.
179. Satoh M, Hamilton KJ, Ajmani AK, Dong X, Wang J, Kanwar YS, et al. Autoantibodies to ribosomal P antigens with immune complex glomerulonephritis in SJL mice treated with pristane. *J Immunol.* 1996;157(7):3200–6.
180. Satoh M, Richards HB, Shaheen VM, Yoshida H, Shaw M, Naim JO, et al. Widespread susceptibility among inbred mouse strains to the induction of lupus autoantibodies by pristane. *Clin Exp Immunol.* 2000;121(2):399–405.
181. Banchereau J, Pascual V. Type I Interferon in Systemic Lupus Erythematosus and Other Autoimmune Diseases. *Immunity.* 2006 Sep;25(3):383–92.
182. Kalim H, Pratama MZ, Nugraha AS, Prihartini M, Chandra A, Sholihah AI, et al. Regulatory T Cells Compensation Failure Cause the Dysregulation of Immune

- Response in Pristane Induced Lupus Mice Model. *Malays J Med Sci*. 2018/06/28. 2018 May;25(3):17–26.
183. Lee PY, Weinstein JS, Nacionales DC, Scumpia PO, Li Y, Butfiloski E, et al. A Novel Type I IFN-Producing Cell Subset in Murine Lupus. *The Journal of Immunology*. 2014;180(7):5101–8.
  184. Reeves WH, Lee PY, Weinstein JS, Satoh M, Lu L. Induction of autoimmunity by pristane and other naturally occurring hydrocarbons. *Trends Immunol*. 2009;30(9):455–64.
  185. He YYY, Yan YY, Zhang HFF, Lin YHH, Chen YCC, Yan YY, et al. Methyl salicylate 2-O- $\beta$ -D-lactoside alleviates the pathological progression of pristane-induced systemic lupus erythematosus-like disease in mice via suppression of inflammatory response and signal transduction. *Drug Des Devel Ther*. 2016 Sep 29;Volume 10:3183–96.
  186. Yankelevitch-Yahav R, Franko M, Huly A, Doron R. The Forced Swim Test as a Model of Depressive-like Behavior. *Journal of Visualized Experiments*. 2015 Mar 2;(97).
  187. Anisman H, Zacharko RM. Multiple neurochemical and behavioral consequences of stressors: Implications for depression. *Pharmacol Ther*. 1990 Jan;46(1):119–36.
  188. Caspi A, Sugden K, Moffitt TE, Taylor A, Craig IW, Harrington H, et al. Influence of Life Stress on Depression: Moderation by a Polymorphism in the 5-HTT Gene. *Science* (1979). 2003 Jul 18;301(5631):386–9.
  189. Doron R, Lotan D, Einat N, Yaffe R, Winer A, Marom I, et al. A novel herbal treatment reduces depressive-like behaviors and increases BDNF levels in the brain of stressed mice. *Life Sci*. 2014 Jan;94(2):151–7.
  190. Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M. “Behavioural despair” in rats and mice: Strain differences and the effects of imipramine. *Eur J Pharmacol*. 1978 Oct;51(3):291–4.
  191. Katzav A, Solodeev I, Brodsky O, Chapman J, Pick CG, Blank M, et al. Induction of autoimmune depression in mice by anti-ribosomal P antibodies via the limbic system. *Arthritis Rheum*. 2007 Mar;56(3):938–48.
  192. Simon P, Dupuis R, Costentin J. Thigmotaxis as an index of anxiety in mice. Influence of dopaminergic transmissions. *Behavioural Brain Research*. 1994 Mar;61(1):59–64.
  193. Gao HX, Campbell SR, Cui MH, Zong P, hee-Hwang J, Gulinello M, et al. Depression is an early disease manifestation in lupus-prone MRL/lpr mice. *J Neuroimmunol*. 2009;
  194. Pitts M. Barnes Maze Procedure for Spatial Learning and Memory in Mice. *Bio Protoc*. 2018;8(5).
  195. Ullman-Culleré MH, Foltz CJ. Body condition scoring: A rapid and accurate method for assessing health status in mice. *Lab Anim Sci*. 1999;49(3):319–23.
  196. Corachán A, Ferrero H, Escrig J, Monleon J, Faus A, Cervelló I, et al. Long-term vitamin D treatment decreases human uterine leiomyoma size in a xenograft animal model. *Fertil Steril*. 2020;113(1):205-216.e4.
  197. Gao HX, Sanders E, Tieng AT, Putterman C. Sex and autoantibody titers determine the development of neuropsychiatric manifestations in lupus-prone mice. *J Neuroimmunol*. 2010;
  198. Nielsen DM, Crnic LS. Elevated plus maze behavior, auditory startle response, and shock sensitivity in predisease and in early stage autoimmune disease MRL/lpr mice. *Brain Behav Immun*. 2002;
  199. Katzav A, Solodeev I, Brodsky O, Chapman J, Pick CG, Blank M, et al. Induction of autoimmune depression in mice by anti-ribosomal P antibodies via the limbic system. *Arthritis Rheum*. 2007;

200. Suman PR, Zerbinatti N, Theindl LC, Domingues K, De Oliveira CL. Failure to detect the action of antidepressants in the forced swim test in Swiss mice. *Acta Neuropsychiatr.* 2018;30(3):158–67.
201. Can A, Dao DT, Arad M, Terrillion CE, Piantadosi SC, Gould TD. The mouse forced swim test. *Journal of Visualized Experiments.* 2011;(58).
202. Savignac HM, Tramullas M, Kiely B, Dinan TG, Cryan JF. Bifidobacteria modulate cognitive processes in an anxious mouse strain. *Behavioural Brain Research.* 2015;287:59–72.
203. Barnes CA. Memory deficits associated with senescence: A neurophysiological and behavioral study in the rat. *J Comp Physiol Psychol.* 1979;93(1):74–104.
204. de Figueiredo M, Cordella CBY, Jouan-Rimbaud Bouveresse D, Archer X, Bégué JM, Rutledge DN. A variable selection method for multiclass classification problems using two-class ROC analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems.* 2018 Jun;177:35–46.
205. Bantis LE, Nakas CT, Reiser B. Construction of confidence regions in the ROC space after the estimation of the optimal Youden index-based cut-off point. *Biometrics.* 2014 Mar;70(1):212–23.

# **ARTIGO 1**

## **ARTIGO 2**

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo, avaliamos a influência da suplementação com vitamina D na proteção do sistema nervoso em um modelo experimental de lúpus induzido por pristane. Também foram analisados os aspectos comportamentais relacionados à depressão, ansiedade e déficit cognitivo, bem como, investigou-se os níveis de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- $\alpha$ 1 e IL-6.

Os animais do grupo PIL apresentaram comportamento depressivo e ansioso aos 90 dias de experimento, persistindo até os 180 dias. Além disso, foi observado déficit de memória de curto e longo prazo aos 90 dias. A suplementação com vitamina D não influenciou as alterações comportamentais, exceto pelo déficit de memória de curto e longo prazo aos 90 dias, que foi melhorado. Houve um aumento significativo de IFN- $\alpha$ 1 nos animais do grupo PIL em comparação com o grupo CO. No entanto, a suplementação com vitamina D não reduziu os níveis dessa citocina. O grupo PIL também apresentou maior depósito de IgG e IgM no cérebro em comparação com os grupos CO e VD, indicando que houve disfunção da BHE e reforçando a validade do modelo PIL para o LES e para estudos sobre NPSLE. Um aspecto importante a ser considerado é a sensibilidade e especificidade exibidas tanto pela IgM quanto pela IgG no cérebro, evidenciando assim, a doença neuropsiquiátrica a partir dos 3 meses de indução.

A suplementação com vitamina D reduziu significativamente os depósitos de IgG e IgM total no cérebro desde os estágios iniciais (T90) até os 180 dias, atuando de forma neuromoduladora. Além disso, a suplementação aumentou a expressão de pVDR no cérebro aos 180 dias, equiparando-a aos níveis observados em animais saudáveis.

O modelo PIL foi capaz de demonstrar manifestações neuropsiquiátricas associadas ao LES, apresentando sintomas clínicos compatíveis com ansiedade, depressão e déficit de memória, bem como alterações histopatológicas significativas no tecido cerebral. Embora a vitamina D não tenha impactado nos sintomas de ansiedade e depressão, ela demonstrou potencial efeito protetor em relação à memória. Também reduziu os níveis de imunoglobulinas no cérebro e aumentou a expressão de pVDR, indicando seu potencial como agente imunomodulador no NPSLE.

## 8. PERSPECTIVAS FUTURAS

No próximo estágio deste estudo, planejamos analisar a expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IFN- $\alpha$ 1) no tecido cerebral. Além de uma análise estatística multivariada utilizando parâmetros clínicos comportamentais, para gerar modelos de predição do NPSLE.

Pretendemos realizar uma abordagem metabolômica, utilizando análise espectroquímica por meio de modelagem quimiométrica, utilizando soro de camundongos com PIL, com a finalidade de gerar modelos de predição do LES e NPSLE, bem como as implicações da suplementação com vitamina D. Além disso, nosso objetivo é aprofundar nossa compreensão sobre o papel dos receptores nucleares, como o VDR, na inflamação sistêmica em resposta à vitamina D neste modelo experimental.

Recentemente tem sido explorado o papel da microbiota intestinal no LES. Alguns estudos têm associado certas espécies de microrganismos a períodos de remissão ou atividade da doença. Para expandir nosso conhecimento sobre esse tema e sobre o modelo PIL, planejamos caracterizar o perfil da microbiota intestinal neste modelo experimental. Essa abordagem nos permitirá investigar possíveis ligações entre a composição da microbiota intestinal, a inflamação sistêmica e os sintomas observados no LES, proporcionando uma compreensão mais abrangente dos mecanismos subjacentes a essa doença complexa.

## 9. ANEXOS

### ANEXO I – Metodologia expandida

#### 9.1 Ética

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética do HCPA/UFRGS (nº 2020-0326), cumprindo com todas as determinações legais para pesquisa com animais previstas na Legislação Brasileira. Foi utilizada a técnica de enriquecimento ambiental, como preconiza as normativas 30 e 33 e o manual de bem-estar animal do CONCEA. Com o intuito de aumentar a qualidade de vida e bem-estar dos animais foi oferecido papel toalha, rolos de papel e tuneis. Os procedimentos foram realizados de acordo com a Lei Federal 11.794 de 08 de outubro de 2008, que regulamenta a utilização de animais na pesquisa científica. Os cuidados e manipulação dos animais seguiram as Diretrizes para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos (DBCA Resolução Normativa no 30, 2016, CONCEA). Os procedimentos são baseados na resolução 30 (2016), 33 (2016) e 39 (2018) CONCEA. A eutanásia seguiu as diretrizes para a prática de eutanásia do CONCEA (RN 37 de 2018).

#### 9.2 Animais

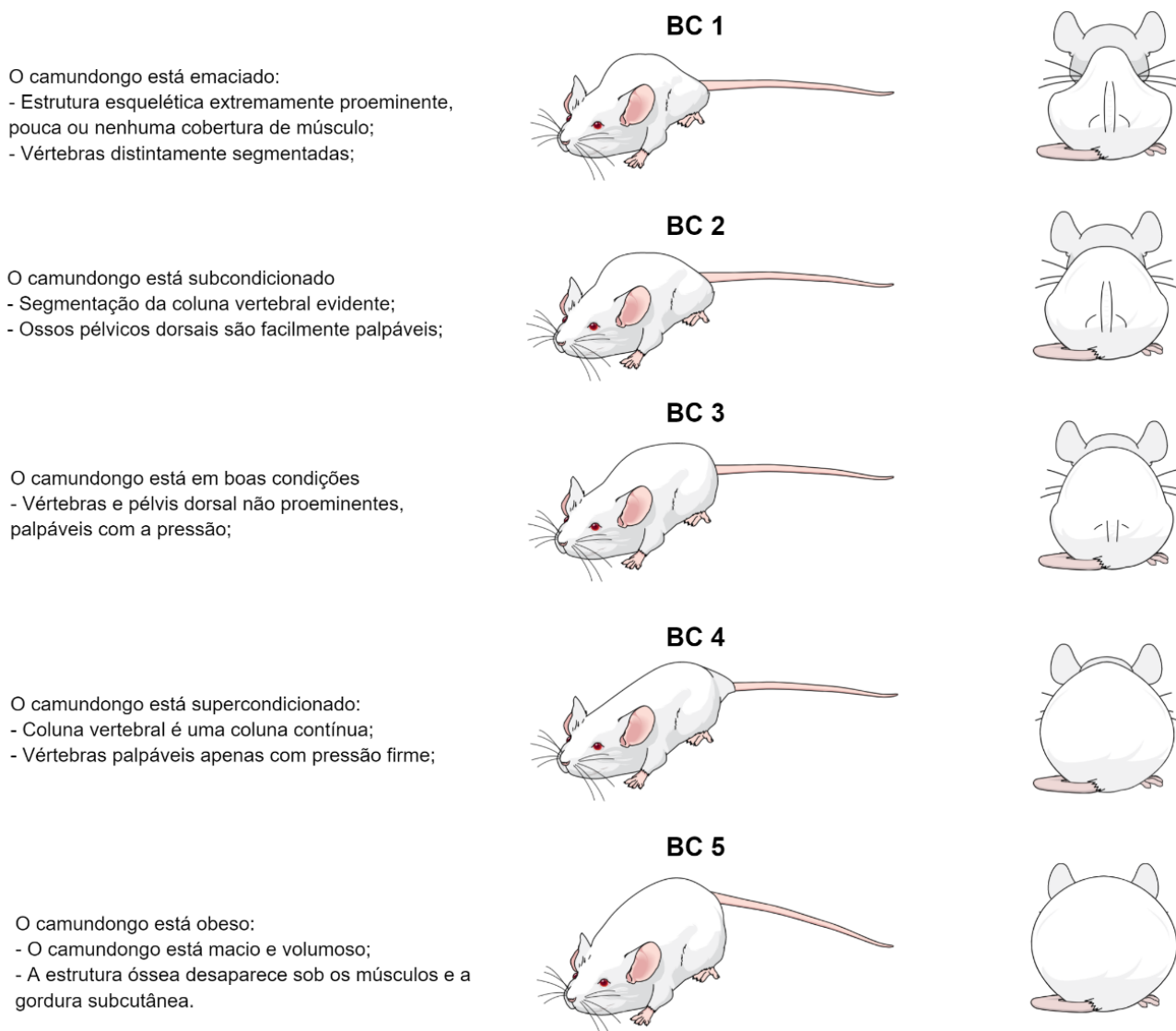
Foram utilizados camundongos Balb/c, 8-12 semanas de vida, fêmeas, com aproximadamente 18g. Os animais foram mantidos na Unidade de Experimentação Animal (UEA-HCPA) durante o experimento, em caixas plásticas transparentes 30x20x12cm forradas com maravalha, alojados em no máximo 5 animais/caixa, em ciclo de 12 horas claro/escuro, temperatura entre 22° +/- 2°C, umidade relativa do ar entre 40-60% e exaustão de ar. A água e a ração foram administradas *ad libitum*. Os animais passaram por um período de quarentena e aclimatação de 14 dias antes da indução da doença.

Os animais foram pesados e avaliados quanto ao grau de alerta mental, mobilidade espontânea, interesse pelo alimento e água, além de outros comportamentos normais a espécie (como interação com os companheiros de caixa, dormir em grupos e autolimpeza), a cada 3 dias após administração do pristane e semanalmente antes da administração do pristane e nos animais



controles. Em casos de dor e desconforto o tramadol não pode ser administrado, visto que avaliamos sinais de depressão e o alívio da dor poderia interferir nos resultados. Foi avaliado a composição corporal (Figura 8). Em casos em que se observou que os animais estavam sentindo dor extrema, em sofrimento e apresentando um score total maior que 14 pontos (Quadro 1), estes foram eutanasiados por anestesia profunda antes do período previsto como fim da experimentação. Os órgãos destes animais foram ser coletados e armazenados para análises posteriores.

### Score de Condição Corporal



**Figura 8.** Score de condição corporal. Adaptado de Ullman-Culleré and Foltz(195).



Distensão evidente da região abdominal com aspecto de coleção de líquido à palpação.									
<b>Evidente e prolongada</b>	4								
Distensão evidente da região abdominal com aspecto de coleção de líquido à palpação com persistência de $\geq$ 15 dias									
<b>Score Total</b>									

### **AVALIAÇÃO:**

Escore de 5 a 9: Aumentar a frequência da avaliação e, se possível, incluir medidas de manejo (como, facilitar o acesso do animal à ração ou subdividir os animais da caixa em grupos menores).

Escore de 10 a 14: Aumentar a frequência da observação e, se possível, aplicar medidas terapêuticas (fluidoterapia) e de manejo (como, facilitar o acesso do animal à ração ou subdividir os animais da caixa em grupos menores). Se não houver melhora em 48h, o animal será eutanasiado.

Escore > 14: o animal será imediatamente eutanasiado.

### **9.3 Modelo experimental de lúpus**

O modelo experimental de LES foi induzido por pristane através de uma única injeção intraperitoneal (i.p) de 500µl de pristane (2,6,10,14 tetramethylpentadecane; Sigma- Aldrich) (173) (figura 9), previamente filtrado em membrana 0,22 µm, após serem anestesiados com o agente inalatório isoflurano a 5% para indução e 2-3% para manutenção com 0,5 L/min de O<sub>2</sub>. Os animais controles receberam a mesma quantidade de água de injeção pela mesma via (171,173,174). Segundo recomendação do fabricante Sigma-Aldrich, como medidas de biossegurança para o manuseio do reagente pristane os pesquisadores utilizaram como equipamento de proteção individual (EPIs): máscara, luvas, jaleco e óculos. Devido a sua toxicidade aguda (oral, dérmica ou por inalação), podendo provocar irritação cutânea, ocular e causar sensibilização da pele. O pristane foi filtrado e fracionado em uma capela de fluxo para maior segurança. Todos os procedimentos para a manipulação do reagente foram realizados no dia da indução do modelo em ambiente estéril com materiais estéreis, as sobras das alíquotas de pristane foram descartadas.

Segundo recomendação do CEUA, juntamente a injeção i.p com pristane foi administrado Tramadol i.p. na concentração de 20mg/kg com o volume final de

200ul. Após 12h os animais foram avaliados pelas veterinárias e foi constatado que os mesmos encontravam-se bem, sem dor e sem necessidade de continuar a administração de Tramadol.

Ao longo do período experimental os animais foram eutanasiados a cada 3 meses nos respectivos subgrupos para acompanhamento do desenvolvimento da doença.

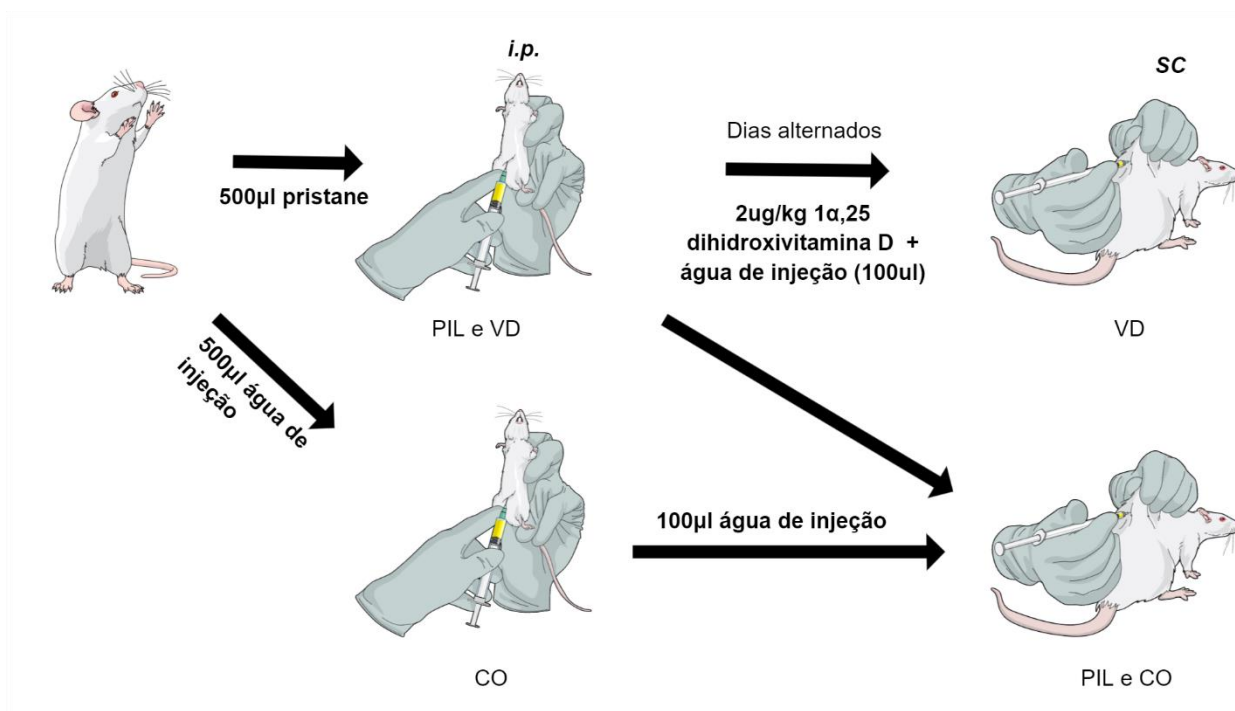
Os animais foram divididos em 3 grupos experimentais, eutanasiados em 2 tempos:

- Grupo CO3: camundongos Balb/c com 3 meses de experimentação (n= 12);
- Grupo CO6: camundongos Balb/c com 6 meses de experimentação (n= 12);
- Grupo PIL3: camundongos Balb/c com LES induzido por pristane (PIL) com 3 meses de experimentação (n= 14);
- Grupo PIL6: camundongos Balb/c com LES induzido por pristane (PIL) com 6 meses de experimentação (n= 14);
- Grupo VD3: camundongos Balb/c com LES induzido por pristane (PIL) + vitamina D com 3 meses de experimentação (n= 14);
- Grupo VD6: camundongos Balb/c com LES induzido por pristane (PIL) + vitamina D com 6 meses de experimentação (n= 14);

#### **9.4 Tratamento**

Todas as aplicações de suplementação foram realizadas no período da manhã, entre 9:00-11:00, com o intuito de evitar qualquer alteração circadiana. Os camundongos foram alocados, de forma randomizada pelo programa WinPepi, em conjuntos de 12-14 animais por grupo e foram tratados por via subcutânea com água de injeção ou  $1\alpha,25$  dihidroxivitamina D (Sigma-Aldrich). A vitamina D foi diluída em álcool 95% para solução estoque (concentração de 1mM) e armazenada em  $-20^{\circ}\text{C}$  até a sua utilização. Para a solução final foi realizada a diluição da solução estoque em água de injeção para uso em até 3 dias de tratamento, na concentração de 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$  (174,196). O tratamento foi realizado em dias alternados, com volume final de 100ul (figura 9). O tratamento foi realizado por 90 dias (nos grupos de 3 meses de

experimentação) e 180 dias (nos grupos de 6 meses de experimentação), iniciando 12h após a indução da doença.



**Figura 9.** Esquemática da indução de lúpus induzido por pristane e tratamento. Os animais dos grupos PIL (lúpus induzido por pristane) e VD (lúpus induzido por pristane suplementados com vitamina D) receberam uma injeção intraperitoneal contendo 500µL de pristane para indução da doença. Enquanto que o grupo CO (controle) recebeu água de injeção i.p., passando assim pelos mesmos procedimentos que os demais grupos. O tratamento com vitamina D (1 $\alpha$ ,25 dihidroxivitamina D – concentração de 2ug/kg + água de injeção, totalizando 100ul de solução) foi realizado por via subcutânea a cada dois dias no grupo VD. Os grupos PIL e CO receberam 100ul de água de injeção pela mesma via, nos mesmos dias. Fonte: Autor.

## 9.5 Avaliações clínicas

### 9.5.1 Peso dos animais

O peso corporal dos animais foi mensurado 3 vezes por semana para controle.

### 9.5.2 Peso dos órgãos

Todos os órgãos coletados (encéfalo, rins, baço, fígado e coração) foram pesados para posterior comparação.

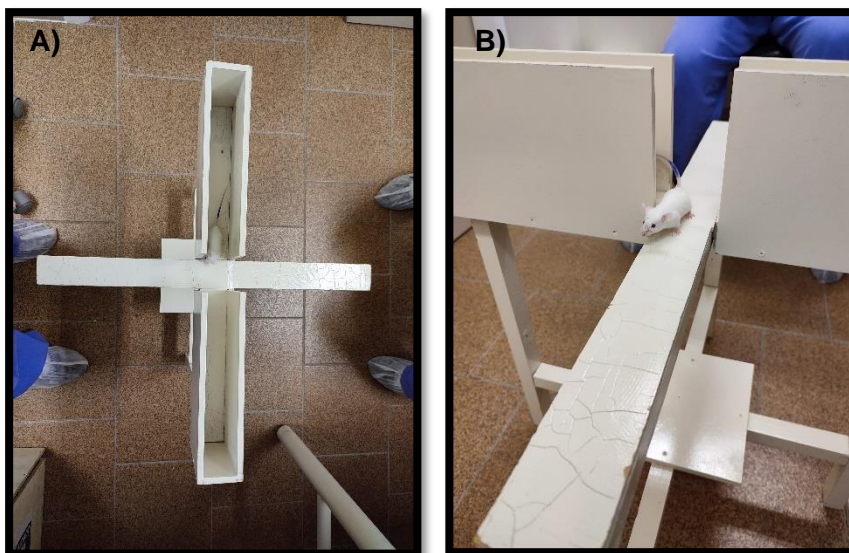
## 9.6 Avaliações comportamentais

Os testes comportamentais descritos a seguir foram avaliados nos tempos 0 (na semana anterior a indução), 90 (3 meses após a indução), 180 (6 meses após a indução).

### 9.6.1 Avaliações de Ansiedade

#### *Labirinto elevado*

O labirinto consiste em quatro braços, dois fechados e dois abertos (sem paredes) com medidas de 10cm x 43cm x 20cm cada braço (Figura 10A). O animal pode explorar livremente a plataforma durante 10 minutos. Foi considerado que o mesmo entrou nos braços abertos após passar da linha com as quatro patas (Figura 10B). Foi contabilizado o tempo, em segundos, de permanência nesse espaço. Além disso, foi contabilizado o número de vezes em que o camundongo entrou nos braços abertos (193,197). Este teste foi gravado.



**Figura 10.** Labirinto elevado. A) Labirinto em forma de cruz com dois braços fechados e dois braços abertos. B) Camundongo Balb/c posicionado nos braços abertos do labirinto.

### 9.6.2 Testes de comportamento depressivos

#### *Atividade locomotora em campo aberto*

A locomoção espontânea exploratória dos animais foi detectada no equipamento Monitor de Atividade IR da Insight Equipamentos Ltda®. Os animais foram colocados na arena de teste (50cm×50cm×30cm) (EP154C, Open Field - Insight) por pelo menos 30 segundos para ambientação. Após o tempo de ambientação, foram registrados 5 minutos de movimentação, onde foram determinados os seguintes parâmetros: desenho do trajeto percorrido, distância percorrida, velocidade média, número de vezes dos eventos (repouso, ficar de pé ou pulo).

#### *Teste de nado forçado*

Os animais foram colocados individualmente em um aquário de vidro dividido em 4 quadrantes de 45cm de altura e 18cm de comprimento contendo 20cm de água aquecida a 37°C, de forma que nunca tocassem o fundo do recipiente com as patas ou cauda (Figura 11). Os camundongos foram submetidos a uma sessão de 6 minutos no aquário. Os primeiros 2 minutos foram para ambientação do animal. Foi mensurado o tempo que o animal permaneceu imóvel nos últimos 4 minutos do teste. Após, os animais foram retirados e secos com um pano limpo para retirar o excesso de água e finalmente, com secador de cabelo a uma distância segura (198–201). Este teste foi gravado para posterior mensuração dos tempos e eventos.



**Figura 11.** Nado forçado. Camundongos Balb/c alocados nos quadrantes do aquário.

### **9.6.3 Testes de memória de curto prazo e longo prazo**

#### *Labirinto de Barnes*

Para determinar a disfunção cognitiva, avaliamos a memória e o processo de aprendizagem com o teste do labirinto de Barnes. O teste comportamental de Barnes adaptado para camundongos se baseia no medo que roedores têm de espaços abertos e vulneráveis (202,203).

O experimento consiste na utilização de uma plataforma circular de 1,22 metro de diâmetro sob um aparato branco de 0,6 metro de altura. Na plataforma encontram-se 20 orifícios de 10 cm de diâmetro espalhados pela superfície. Sob um destes orifícios, foi posicionada uma caixa escura que serviu de escape para o animal testado. Ao final do teste com cada animal todo o aparato foi limpo com álcool 70% para evitar que o cheiro do animal anterior afetasse o resultado. Além disso, a caixa preta foi posicionada em um orifício diferente para cada animal. Ao longo da plataforma foram adicionados quatro

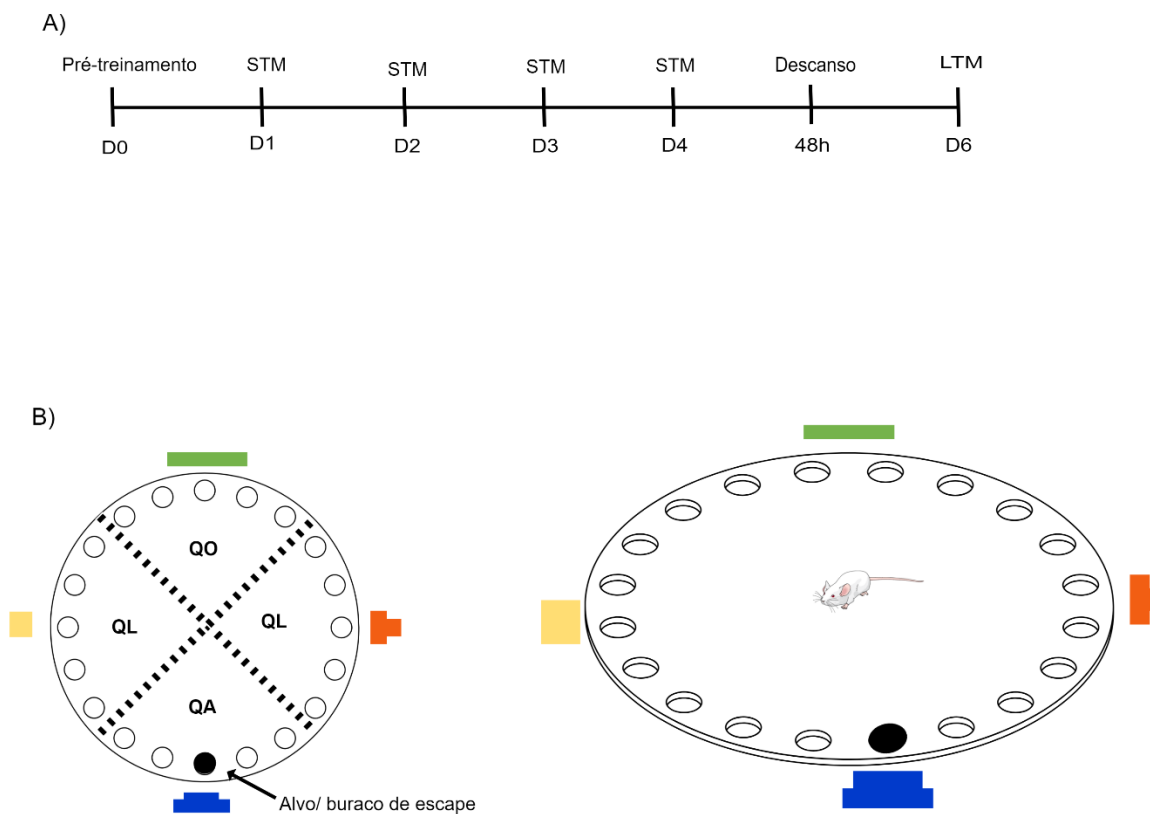


objetos diferentes equidistantes entre si, que serviram de guia para o animal aprender o caminho para o orifício contendo a caixa de escape.

O pré-treinamento consistiu em soltar o camundongo na caixa escura de escape por 2 minutos para habituação. Depois, o camundongo foi posicionado no centro da plataforma e guiado até o orifício sobre a caixa de escape, onde permaneceu mais 2 minutos. Por fim, o camundongo foi acondicionado numa caixa transparente posicionada no centro da plataforma e permaneceu nela por 30 segundos até ser solto, podendo explorar a plataforma por 2 minutos, caso o camundongo não encontrasse a caixa de escape, o pesquisador o guiou até a mesma.

O treinamento foi realizado por quatro dias, após o pré-treinamento, tendo cada camundongo três tentativas, por dia, para entrar no orifício contendo a caixa escura. Esta fase é denominada “teste de memória de curto prazo”. O animal foi posicionado no centro da plataforma estando dentro da caixa transparente e permaneceu nessa posição por 30 segundos. Após ser solto, foi estabelecido um limite de tempo de 3 minutos para o camundongo encontrar o escape. Caso não encontrasse após decorrido o tempo, o pesquisador o guiou até a caixa de escape. Ao final do teste, o animal foi colocado de volta na sua gaiola.

O teste definitivo ocorreu após 48h do último treinamento. Sendo esta fase denominada “teste de memória de longo prazo”. O camundongo foi posicionado no centro da plataforma dentro da caixa transparente, tendo uma oportunidade de 3 minutos para explorar o espaço após ser solto. Foi calculado o tempo que o animal levou para encontrar o orifício sob o qual se encontra a caixa escura e o número de erros – vezes em que escolheu explorar orifícios errados. Também foi observado o tempo que o animal levou para sair do centro do labirinto, bem como, para qual quadrante ele se encaminhou (quadrante alvo – QA, quadrante oposto – QO ou quadrante lateral –QL) (Figura 12). Este teste foi gravado.



**Figura 12.** A) Linha do tempo labirinto de barnes. D0 corresponde ao pré-treinamento onde os camundongos são guiados até o alvo/ buraco de escape para memorização da localização. D1-D4 corresponde aos dias de treinamento/ teste de memória de curto prazo (STM), onde os camundongos têm 3 tentativas de 180 segundos para encontrarem o buraco de escape, caso não encontrem o pesquisador pode guia-lo até o mesmo. Após 48h, no D7, os animais são submetidos ao teste de memória de longo prazo (LTM), onde se tem apenas uma tentativa de 180s para encontrar o buraco de escape. B) Esquematização do labirinto de barnes. O quadrante alvo (QA) refere-se ao quadrante onde se localiza o alvo/ buraco de escape. Em sequência temos os quadrantes laterais (QL) ao alvo e o quadrante oposto (QO) ao alvo. Para avaliar a memória espacial dos camundongos, o alvo sempre acompanhava um objeto/ peça de plástico tipo lego, azul, enquanto que nos quadrantes laterais se encontravam objetos laranja e amarelo e no oposto um objeto verde. Além de possuírem cores diferentes, os objetos também eram de tamanhos e formas diferentes. Fonte: autor.

## 9.7 Sangue

A coleta de sangue ocorreu no dia da eutanásia dos respectivos grupos. Os animais foram anestesiados com o agente inalatório isoflurano a 5% para indução e 2-3% para manutenção com 0,5 L/minuto de O<sub>2</sub> e o sangue foi coletado através de punção cardíaca. Após a coleta o sangue foi centrifugado a

3.000 rpm por 10 minutos e o soro armazenado em freezer -80°C até a realização das análises.

### **9.8 Tecido**

No dia da eutanásia, após a coleta de sangue, os animais receberam uma sobredose anestésica de isoflurano por via inalatória, até promoção de parada cardiorrespiratória. Somente após a confirmação da morte, foi retirado o encéfalo que foi dividido entre os hemisférios esquerdo e direito. Para ocorrer um congelamento rápido, minimizando a formação de cristais de gelo na amostra, o tecido foi imerso em solução O.C.T. (*Optimal Cutting Temperature*), e em seguida foi congelado em nitrogênio líquido. O tecido foi imediatamente acondicionado em nitrogênio líquido e posteriormente armazenado em freezer a -80°C, para análise histológica.

Foram coletados coração, rins, fígado e baço. Os órgãos foram acondicionados em formol tamponado 10% por no mínimo 24h e posteriormente armazenados em blocos de parafina. Estes estão armazenados para projetos futuros da equipe.

### **9.9 Análise de citocinas no soro**

Os níveis de citocinas séricas IL-6 e IFN $\alpha$ 1 foram analisados através de um ensaio de ELISA Standart BioLegend, de acordo com as instruções do fabricante. As concentrações de citocinas nas amostras foram determinadas utilizando uma curva padrão. Todas as análises foram realizadas em duplicata.

### **9.10 Imunofluorescência – anti-IgM, anti-IgG e VDR**

Os depósitos de IgM e IgG total no cérebro foram examinado por imunofluorescência direta. Seções congeladas de tecidos cerebrais foram cortadas em seções de 10 $\mu$ m de espessura e foi realizada dupla marcação para IgG e IgM com anticorpo policlonal de cabra anti-mouse IgG-FITC (diluição 1:100; Abcam – ab97022, EUA) e policlonal de cabra anti-mouse IgM-Alexa Fluor 647 (diluição de 1:200; Abcam – ab150123, EUA). Os anticorpos foram incubados com PBS-Tween 20 contendo BSA a 2% em uma incubadora

úmida por 4°C *overnight*. As seções foram lavadas três vezes por 5 min usando PBS-Tween 20 e então foi adicionado DAPI.

Para avaliar a expressão de VDR no cérebro, foi realizado ensaio de imunofluorescência indireta. A coloração para VDR foi realizada com anticorpo policlonal de coelho anti-fosfo-Vitamina D de camundongo (diluição 1:300; SAB4504326, Sigma-Aldrich, EUA). Brevemente, o anticorpo foi incubado com PBS-Tween 20 contendo BSA a 2% em uma incubadora úmida por 4°C *overnight*. Após, foram realizadas lavagens com PBS para retirada do anticorpo primário e então as seções foram incubadas com anticorpo secundário foi adicionado o anticorpo secundário policlonal anti-Rabbit Alexa Fluor 488 (diluição de 1:800; A011008, Invitrogen by ThermoFisher) à temperatura ambiente por 1 hora.

Após a finalização da incubação dos anticorpos, foi adicionado 50µl de DAPI em todos os tecidos, após 20 minutos a lâmina foi montada. Foram utilizados controles positivos e negativos do teste. Para os controles foi utilizado uma amostra de rim de um dos animais do grupo PIL, no controle negativo foi substituído o anticorpo pelo PBS. Foram capturadas imagens em microscópio Olympus BX51 (Olympus, Alemanha) com uma ampliação final de 400x. Foram capturadas cinco fotos por animal. A intensidade da fluorescência foi digitalizada e quantificada pelo software ImageJ.

### **9.11 Avaliação renal**

Para detectar a presença de depósito imunes e inflamação renal foram realizadas lâminas histopatológicas dos rins em parafina. Foi realizado ensaio de imunofluorescência direta de IgG e IgM total. As seções de tecido renal foram cortadas em seções de 3µm de espessura e foi realizada dupla marcação para IgG e IgM com anticorpo policlonal de cabra anti-mouse IgG-FITC (diluição 1:50; Abcam – ab97022, EUA) e policlonal de cabra anti-mouse IgM-Alexa Fluor 647 (diluição de 1:100; Abcam – ab150123, EUA). As seções foram submetidas à desparafinização em estufa a 75°C por 40 minutos. Após, as seções foram imersas em três xilóis por 5 minutos cada, depois em quatro álcoois a 99% e lavadas em água destilada. Para recuperação do antígeno, todas as seções foram incubadas com tampão citrato 10mM pH 6,0 por 35 min e aquecidas em banho-maria a 94°C por 10 min. Para o bloqueio de proteínas,

as seções foram incubadas com BSA a 3% em PBS-Tween 20 a 0,05% por 1 hora. Todos os anticorpos foram incubados com PBS-Tween 20 contendo BSA a 2% em uma incubadora úmida por 4°C overnight. As seções foram lavadas três vezes por 5 min usando PBS-Tween 20 e 50µl de DAPI foram adicionados a cada seção de tecido, após 20 minutos a lâmina foi montada.

Foram utilizados controles positivos e negativos do teste. Para controle positivo foi utilizado uma amostra de rim de um dos animais do grupo PIL e para controle negativo a mesma amostra foi utilizada, substituindo o anticorpo pelo PBS. Foram capturadas imagens em microscópio Olympus BX51(Olympus, Alemanha) com uma ampliação final de 400x. Foram capturadas cinco fotos por animal. A intensidade da fluorescência foi digitalizada e quantificada pelo software ImageJ.

### **9.12 Área sob a curva característica de operação do receptor**

A área sob a curva característica de operação do receptor (AUC-ROC) é um classificador binário baseado em limites de probabilidade para diferentes pontos de corte (204). A partir disso, o objetivo é gerar pontos de corte que maximizem a precisão. A AUC-ROC foi realizada nos valores dos depósitos de imunoglobulinas (IgM e IgG) no cérebro e nos rins aos 3 e 6 meses. Portanto, comparações binárias foram realizadas entre CO, PIL e VD. Os pontos de corte que maximizam a sensibilidade e a especificidade para cada modelo foram calculados através do índice de Youden (205). Este índice é calculado como sensibilidade + especificidade – 1 para cada ponto. Graficamente, é a distância máxima da curva ROC à diagonal principal.

### **9.13 Cálculo do tamanho amostral e análise estatística**

Baseado em trabalhos prévios do nosso grupo de pesquisa (nº GPPG 18-0246), utilizamos o número mínimo de animais por grupo (29). O n amostral foi calculado através do programa WinPepi. Para detectar alterações neuropsiquiátricas de 50%, mantendo-se  $\alpha = 0,05$  e poder de 80% foi obtido 12 animais por grupo. Visto que há chance de erro na injeção intraperitoneal e eutanásia antecipada dos animais devido a ascite foram adicionados 2 animais por grupo com indução de pristane. Sendo assim, usaremos n=14 por grupo

com indução de pristane totalizando 80 animais (24 controles, 28 doentes, 28 doentes suplementados com vitamina D.

Os resultados foram inseridos em programa específico de análise estatística *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS), versão 18.0, bem como foi utilizado o programa Prism GraphPad 6.0. Os dados quantitativos gerados foram descritos por média e desvio padrão ou erro padrão, quando apresentaram uma distribuição paramétrica ou por mediana de amplitude interquartil quando apresentaram uma distribuição não paramétrica. Foi utilizado o teste *one-way ANOVA*, seguido de *Tukey* para dados paramétricos e Teste de *Kruskal-wallis*, seguido de *Dunn* e não paramétricos. Para todos os testes assumiu-se um risco  $\alpha$  5% ( $p < 0,05$ ) e seu respectivo Intervalo de Confiança de 95% (IC 95%).

## ANEXO II – Carta de aprovação CEUA/HCPA



### HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE

#### Grupo de Pesquisa e Pós Graduação

#### Carta de Aprovação

Certificamos que o projeto abaixo, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) e pelas áreas de apoio indicadas pelo pesquisador.

**Projeto:** 2020/0326

**Título:** Efeito imunoregulatório da vitamina D no sistema nervoso central de camundongos com lúpus induzido por pristane

**Pesquisador Responsável:** ODIRLEI ANDRE MONTICIELO

**Equipe de Pesquisa:**

GUSTAVO FLORES CHAPACAIS

THAIS EVELYN KARNOPP

EDUARDA CORREA FREITAS

ANDRESSA LEITE DI DOMENICO

**Data de Aprovação:** 15/09/2021

**Data de Término:** 31/12/2025

Espécie/Linhagem	Sexo/Idade	Quantidade	Data Reunião	Documento
CAMUNDONGO ISOGÊNICO	F/8 Semana(s)	80	08/09/2020	Projeto

- Os membros da CEUA/HCPA não participaram do processo de avaliação onde constam como pesquisadores.
- Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada à CEUA/HCPA.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao CEUA/HCPA.

## ANEXO III - ARRIVE Guidelines

### TheARRIVEGuidelinesChecklist

#### AnimalResearch:ReportingInVivoExperiments

CarolKilkenny<sup>1</sup>,WilliamJBrowne<sup>2</sup>,InnesCCuthill<sup>3</sup>,MichaelEmerson<sup>4</sup> andDouglasGAltman<sup>5</sup>

<sup>1</sup>TheNationalCentrefortheReplacement,Refinement andReductionof AnimalsinResearch,London,UK,

<sup>2</sup>SchoolofVeterinaryScience,UniversityofBristol,Bristol,UK,<sup>3</sup>SchoolofBiologicalSciences,UniversityofBristol,Bristol,UK,<sup>4</sup>NationalHeartandLungInstitute,ImperialCollegeLondon,UK,<sup>5</sup>CentreforStatisticsinMedicine,UniversityofOxford,Oxford,UK.

	ITEM	RECOMMENDATION	Section/ Paragraph
Title	1	Provideasaccurateandconciseadescriptionofthecontentofthearticleaspossible.	1
Abstract	2	Provideanaccuratesummaryofthebackground,researchobjectives,includingdetailsofthespeciesorstrainofanimalused,keymethods,principalfindingsandconclusionsofthestudy.	6
<b>INTRODUCTION</b>			
Background	3	<p>a. Includesufficientscientificbackground(includingrelevantreferencestoprevious work) to understand the motivation and context for the study,andexplaintheexperimentalapproachandrational.</p> <p>b. Explain how and why the animal species and model being used canaddressthescientificobjectivesand,whereappropriate,thestudy'srelevancetohumanbiology.</p>	15
Objectives	4	Clearlydescribetheprimaryandanysecondaryobjectivesofthestudy,orspecifichypothesesbeingtested.	43
<b>METHODS</b>			
Ethicalstatement	5	Indicatethenatureoftheethicalreviewpermissions,relevantlicences(e.g.Animal[Scientific Procedures] Act 1986), and national or institutionalguidelinesforthecareanduseofanimals,thatcovertheresearch.	77
Studydesign	6	<p>Foreachexperiment,givebriefdetailsofthestudydesignincluding:</p> <p>a. Thenumerofexperimentalandcontrolgroups.</p> <p>b. Any steps taken to minimise the effects of subjective bias whenallocatinganimalstotreatment(e.g.randomisationprocedure)andwhenassessingresults(e.g.ifdone,describewhatwasblindedandwhen).</p> <p>c. Theexperimentalunit(e.g.asingleanimal,grouporcentageofanimals). Atime-linediagramorflowchartcanbeusefultoillustratehowcomplexstudydesignswerecarriedout.</p>	78
Experimental procedures	7	<p>Foreachexperimentandeachexperimentalgroup,includingcontrols,provideprecisedetailsofallprocedurescarriedout.Forexample:</p> <p>a. How(e.g.drugformulationanddose,siteandrouteofadministration,anaesthesia and analgesia used [including monitoring], surgicalprocedure,methodofeuthanasia).Providedetailsofany specialist equipmentused,includingsupplier(s).</p> <p>b. When(e.g.timeofday).</p> <p>c. Where(e.g.homecage,laboratory,watermaze).</p> <p>d. Why(e.g.rationaleforchoiceofspecificanaesthetic,routeofadministration,drugdoseused).</p>	78-83
Experimental animals	8	<p>a. Provide details oftheanimalsused,including species, strain, sex,developmental stage (e.g. mean or median age plus age range) andweight(e.g.meanormedianweightplusweightrange).</p> <p>b. Provide further relevant information such as the source of animals,international strain nomenclature, genetic modification status (e.g.knock-outortransgenic),genotype,health/immunestatus,drugortestnaïve,previousprocedures,etc.</p>	78



Housing and husbandry	9	<p>Provided details of:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>Housing (type of facility e.g. specific pathogen free [SPF]; type of cage or housing; bedding material; number of cage companions; tank shape and material etc. for fish).</li> <li>Husbandry conditions (e.g. breeding programme, light/dark cycle, temperature, quality of water etc for fish, type of food, access to food and water, environmental enrichment).</li> <li>Welfare-related assessments and interventions that were carried out prior to, during, or after the experiment.</li> </ol>	78
Sample size	10	<ol style="list-style-type: none"> <li>Specify the total number of animals used in each experiment, and the number of animals in each experimental group.</li> <li>Explain how the number of animals was arrived at. Provided details of any sample size calculation used.</li> <li>Indicate the number of independent replications of each experiment, if relevant.</li> </ol>	83
Allocating animals to experimental groups	11	<ol style="list-style-type: none"> <li>Give full details of how animals were allocated to experimental groups, including randomisation or matching if done.</li> <li>Describe the order in which the animals in the different experimental groups were treated and assessed.</li> </ol>	78
Experimental outcomes	12	Clearly define the primary and secondary experimental outcomes assessed (e.g. cell death, molecular markers, behavioural changes).	78-83
Statistical methods	13	<ol style="list-style-type: none"> <li>Provided details of the statistical methods used for each analysis.</li> <li>Specify the unit of analysis for each dataset (e.g. single animal, group of animals, single neuron).</li> <li>Describe any methods used to assess whether the data met the assumptions of the statistical approach.</li> </ol>	83
<b>RESULTS</b>			
Baseline data	14	For each experimental group, report relevant characteristics and health status of animals (e.g. weight, microbiological status, and drug or test naïve) prior to treatment or testing. (This information can often be tabulated).	78
Numbers analysed	15	<ol style="list-style-type: none"> <li>Report the number of animals in each group included in each analysis. Report absolute numbers (e.g. 10/20, not 50%).</li> <li>If any animals or data were not included in the analysis, explain why.</li> </ol>	78
Outcomes and estimation	16	Report the results for each analysis carried out, with a measure of precision (e.g. standard error or confidence interval).	83-91
Adverse events	17	<ol style="list-style-type: none"> <li>Give details of all important adverse events in each experimental group.</li> <li>Describe any modifications to the experimental protocols made to reduce adverse events.</li> </ol>	N/A
<b>DISCUSSION</b>			
Interpretation/scientific implications	18	<ol style="list-style-type: none"> <li>Interpret the results, taking into account the study objectives and hypotheses, current theory and other relevant studies in the literature.</li> <li>Comment on the study limitations including any potential sources of bias, any limitations of the animal model, and the imprecision associated with the results<sup>2</sup>.</li> <li>Describe any implications of your experimental methods or findings for the replacement, refinement or reduction (the 3Rs) of the use of animals in research.</li> </ol>	90
Generalisability/translation	19	Comment on whether, and how, the findings of this study are likely to translate to other species or systems, including any relevance to human biology.	93
Funding	20	List all funding sources (including grant number) and the role of the funder(s) in the study.	95

References: Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG (2010) Improving Bioscience Research Reporting: The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research. *PLoS Biol* 8(6):e1000412. doi:10.1371/journal.pbio.1000412