

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

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE VITAMINA D NAS ALTERAÇÕES
HISTOPATOLÓGICAS DO TECIDO ESPLÊNICO DE CAMUNDONGOS COM
LÚPUS INDUZIDO POR PRISTANO**

GUSTAVO FLORES CHAPACAIS

Porto Alegre

2024

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE VITAMINA D NAS ALTERAÇÕES
HISTOPATOLÓGICAS DO TECIDO ESPLÊNICO DE CAMUNDONGOS COM
LÚPUS INDUZIDO POR PRISTANO**

GUSTAVO FLORES CHAPACAIS

Orientador: Prof. Dr. Odirlei André Monticielo

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

Porto Alegre

2024

CIP - Catalogação na Publicação

Chapacais, Gustavo Flores
EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE VITAMINA D NAS
ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS DO TECIDO ESPLÊNICO DE
CAMUNDONGOS COM LÚPUS INDUZIDO POR PRISTANO / Gustavo
Flores Chapacais. -- 2024.
69 f.
Orientador: Odirlei André Monticielo.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de
Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto
Alegre, BR-RS, 2024.

1. lúpus eritematoso sistêmico. 2. baço. 3. modelo
animal. 4. megacariócito. 5. vitamina D. I.
Monticielo, Odirlei André, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Certamente a presença de cada pessoa que cruzou minha trajetória nos últimos dois anos moldou, direta ou indiretamente, pouco ou muito, este trabalho. Portanto, começo agradecendo a cada um e cada uma que fez parte da minha vida durante o mestrado, pois aqui há um pedacinho de vocês, que sabem quem são.

Dos agradecimentos direcionados, em primeiro lugar agradeço à minha família, em especial meus pais Sandra e Ricardo e meu irmão Pedro, que sempre me apoiaram na busca por instrução e conhecimento. Sou grato e privilegiado por Educação ter sido uma prioridade em casa desde os meus primeiros anos de vida. Por isso, também agradeço ao Ensino Superior Federal brasileiro, especialmente à Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS); ao Sistema Único de Saúde (SUS), especialmente ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e; às instituições públicas de fomento que mantêm a pesquisa científica brasileira, como a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), que me concedeu a bolsa de mestrado. Sem esses entes este trabalho não teria sido possível. Também agradeço à Sociedade de Reumatologia do Rio Grande do Sul (SRRS) o apoio financeiro concedido ao projeto.

Agradeço ao meu orientador, professor Odirlei, a oportunidade de cursar e concluir este mestrado acadêmico e desenvolver este projeto, ouvindo e acatando as minhas ideias, e a sua qualificada supervisão deste trabalho. Também agradeço à Thaís, que praticamente atuou como co-orientadora no meu primeiro ano de mestrado e de quem eu “emprestei” as amostras para as minhas investigações, além de me honrar com sua amizade. Agradeço a todos os meus colegas do Laboratório de Doenças Autoimunes (LABDAI) e ao Serviço de Reumatologia/HCPA as contribuições, em especial ao Rodrigo, que além de ser quem mais me ajudou com os experimentos, tornou-se um amigo muito querido nesse período. Também agradeço fortemente a Maria Luísa, Daniel, Natália, Stephanie, Vinícius, Marina e Andressa, pois são meus amigos mais próximos no laboratório e meus parceiros dentro e fora dali.

Não posso deixar de agradecer a todas as minhas amigas e amigos o apoio moral e a companhia, principalmente nos momentos de lazer que foram essenciais para a manutenção do meu bem-estar físico e emocional, o que contribuiu para eu lograr alcançar este momento importante na minha trajetória. Por terem sido os que estiveram mais presentes e disponíveis para me ouvir, pessoal ou virtualmente, e oferecer cuidado e afeto nos momentos mais importantes dentro destes dois anos, cito em especial Joice, Maicon, Guime, Lou, Felipe,

Natália, Duds, João Pedro, Dimas, Fernando, Nêmora, Alana, Júlia e Allan. Adicionalmente, estendo este agradecimento a toda a minha rede de afetos e amizades.

Por fim, não posso deixar de agradecer ao meu gato Elias, que tem sido o meu companheiro mais assíduo nos últimos 10 anos e que, no exato momento em que escrevo estes agradecimentos, está dormindo nos meus pés. Sua companhia tem sido um conforto para mim mesmo nos dias mais pesados.

*A resposta certa, não importa nada: o essencial é
que as perguntas estejam certas.*

(Mário Quintana)

RESUMO

Lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença autoimune crônica de caráter inflamatório e de etiologia pouco conhecida, que acomete múltiplos órgãos e tecidos. Há produção de autoanticorpos contra antígenos do próprio organismo, tendo como consequência o depósito de imunocomplexos nos tecidos, ocasionando um processo inflamatório crônico, mediado por uma miríade de moléculas, entre elas o fator de transcrição NF- κ B. O baço é um dos órgãos afetados no LES. Assim, algumas das manifestações esplênicas observadas nos pacientes são esplenomegalia e alterações histológicas do órgão. A proliferação de megacariócitos (MKs) no tecido esplênico é observada facilmente no baço de camundongos em modelos de LES. Um destes modelos é o de lúpus induzido por pristano (PIL). A vitamina D (vitD) vem sendo estudada por seu potencial imunomodulador, agindo tanto na imunidade inata quanto adaptativa. Neste trabalho, procurou-se identificar alterações histopatológicas no baço de camundongos PIL, além da esplenomegalia, assim como avaliar a expressão, neste tecido, de moléculas envolvidas na inflamação sistêmica causada pelo LES. Adicionalmente, buscou-se identificar possíveis efeitos moduladores da vitD sobre essas manifestações. Para isso, foram analisadas amostras de baço de 38 camundongos BALB/c fêmeas, divididos em três grupos: controle (CO), lúpus induzido por pristano (PIL) e PIL com suplementação de vitamina D (VD). Os baços foram pesados e foi calculada a proporção do peso do órgão sobre o peso do animal. As análises histológicas foram realizadas em lâminas de hematoxilina-eosina (H&E) e imunofluorescência (IF) dos baços. As lâminas de H&E foram analisadas para identificação das alterações histopatológicas e para a contagem de MKs. Esta contagem foi realizada em 10 campos aleatórios. Lâminas de IF foram marcadas com anticorpos anti-IgM, anti-IgG e anti-NF- κ B. Os animais dos grupos PIL e VD desenvolveram esplenomegalia e apresentaram alterações histopatológicas como presença de células espumosas, desorganização das polpas vermelha e branca e expansão da cápsula fibrosa. Tanto PIL quanto VD tiveram aumento significativo no número de MKs por campo observado, comparados com o grupo CO. Não houve diferença significativa entre os grupos PIL e VD nessa contagem. Ademais, não foi observada diferença estatisticamente significativa na expressão de IgM, IgG e NF- κ B entre os três grupos pesquisados. Deste modo, conclui-se que o modelo PIL desenvolve esplenomegalia e alterações histopatológicas com aumento da presença de MKs no baço dos animais induzidos. Ao mesmo tempo, não foram observados efeitos imunomoduladores da suplementação de vitD no tecido esplênico de camundongos PIL.

Palavras-chave: lúpus eritematoso sistêmico; baço; modelo animal; megacariócito; vitamina D.

ABSTRACT

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a chronic autoimmune disease with an inflammatory nature and an unknown etiology, affecting multiple organs and tissues. There is the production of autoantibodies against the body's own antigens, resulting in the deposition of immune complexes in tissues, causing a chronic inflammatory process mediated by a myriad of molecules, including the transcription factor NF- κ B. Spleen is one of the organs affected in SLE. Thus, some of the splenic manifestations observed in patients include splenomegaly and histological alterations of the organ. The proliferation of megakaryocytes (MKs) in the splenic tissue is easily observed in the spleens of mice in SLE models. One of these models is pristane-induced lupus (PIL). Vitamin D (vitD) has been studied for its potential immunomodulatory effects, acting on both innate and adaptive immunity. In this study, we sought to identify histopathological changes in the spleens of PIL mice, as well as splenomegaly, and to evaluate the splenic expression of molecules involved in the systemic inflammation caused by SLE. Additionally, we aimed to identify possible modulatory effects of vitD on these manifestations. For this, spleen samples from 38 female BALB/c mice, divided into three groups – control (CO), pristane-induced lupus (PIL), and PIL with vitamin D supplementation (VD) –, were analyzed. Spleens were weighed, and the proportion of organ weight to animal weight was calculated. Histological analyses were performed on hematoxylin-eosin (H&E) and immunofluorescence (IF) slides of the spleens. The H&E slides were analyzed to identify histopathological changes and to count MKs. These counts were performed in 10 random fields. IF slides were labeled with anti-IgM, anti-IgG, and anti-NF- κ B antibodies. Animals in the PIL and VD groups developed splenomegaly and exhibited histopathological changes such as the presence of foam cells, disorganization of red and white pulp, and expansion of the fibrous capsule. Both PIL and VD had a significant increase in the number of MKs per observed field compared to the CO group. There was no significant difference between the PIL and VD groups in these counts. Furthermore, no statistically significant difference was observed in the expression of IgM, IgG, and NF- κ B among the three groups studied. Thus, we conclude that the PIL model develops splenomegaly and histopathological changes with an increased presence of MKs in the spleens of induced animals. Simultaneously, no immunomodulatory effects of vitD supplementation were observed in the splenic tissue of PIL mice.

Keywords: systemic lupus erythematosus; spleen; animal model; megakaryocyte; vitamin D.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Modelo esquemático da estratégia de busca de informações.....	15
Figura 2 - Ilustração representando corte histológico longitudinal do baço.....	20
Figura 3 - Resumo da indução e progressão do modelo de lúpus induzido por pristano em camundongos (<i>Mus musculus</i>).....	26
Figura 4 - Esquema mostrando os diferentes efeitos imunomoduladores da vitamina D	29
Figura 5 - Esquema representando o marco conceitual do trabalho	31

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Critérios de classificação e diagnóstico do LES, segundo EULAR/ACR 2019.....	23
Quadro 2 - Características observadas em diferentes modelos murinos de LES.....	25

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1,25(OH) ₂ D	1,25-dihidróxivitamina D
ANA	Anticorpo antinuclear
ACR	<i>American College of Rheumatology</i>
AR	Artrite reumatoide
BAFF	Fator de ativação de célula B
C3	Molécula do complemento C3
C4	Molécula do complemento C4
CAR-T	Célula T programada por receptor de antígeno quimérico
CLR	Receptor de lectina tipo-C
dsDNA	DNA dupla-fita
EULAR	<i>European Alliance of Associations for Rheumatology</i>
GN	Glomerulonefrite
GWAS	Estudo de associação de genoma completo
IC	Imunocomplexo
IFN	Interferon
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
IRF	Fator regulatório de interferon
LES	Lúpus eritematoso sistêmico
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MK	Megacariócito
NETose	Processo de morte celular por ação de neutrófilos
NF-κB	Fator nuclear kappa
NLR	Receptor tipo-NOD
pDC	Célula dendrítica plasmacitóide
PIL	Lúpus induzido por pristano
PPAR	Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma
PRR	Receptores de reconhecimento de padrões
RIG	Gene induzível por ácido retinóico
RNA	Ácido ribonucleico

RNP	Ribonucleoproteína
ROS	Espécie reativa de oxigênio
RXR	Receptor X retinóide
Sm	Anticorpo contra Smith
STAT	Transdutor de sinal e ativação de transcrição
Th	Célula T auxiliar
TLR	Receptor tipo <i>toll</i>
UV	Radiação ultravioleta
VDR	Receptor de vitamina D
VDRE	Elemento responsivo à vitamina D

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1 ESTRATÉGIAS PARA LOCALIZAR E SELECIONAR AS INFORMAÇÕES	15
2.2 LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO	16
2.2.1 Fisiopatogenia	17
2.2.2 Envolvimento esplênico	19
2.2.3 Demais manifestações e critérios diagnósticos	21
2.2.4 Tratamento	23
2.3 MODELO MURINO DE LÚPUS INDUZIDO POR PRISTANO	24
2.3.1 Observações esplênicas no modelo PIL	26
2.4 MEGACARIÓCITOS	27
2.5 VITAMINA D	28
2.5.1 Vitamina D no contexto do LES	30
3 MARCO CONCEITUAL	31
4 JUSTIFICATIVA	32
5 OBJETIVOS	33
5.1 OBJETIVO PRIMÁRIO	33
5.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS	33
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
7 ARTIGO CIENTÍFICO	49
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	50
9 PERSPECTIVAS FUTURAS	51
ANEXO A – CHECKLIST (ARRIVE GUIDELINES 2.0)	52

1 INTRODUÇÃO

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença autoimune crônica, caracterizada pela perda de tolerância do sistema imune aos componentes próprios, levando a uma resposta inflamatória exacerbada, devido, entre outros fatores, a uma falha na eliminação de *debris* celulares [1]. A etiologia da doença é complexa e envolve fatores genéticos e ambientais [2]. No LES, há produção de autoanticorpos, que formam imunocomplexos que se depositam nos tecidos, ativando a sinalização por interferons do tipo I (IFN-I) a partir de células dendríticas plasmocitoides (pDCs) e com a participação de receptores do tipo *toll* (TLRs), contribuindo para a ativação inadequada do sistema imunológico [1].

A prevalência da doença é estimada em mais de 40 casos por 100 mil habitantes [3]. As manifestações variam amplamente entre os pacientes, podendo afetar qualquer órgão ou sistema, resultando em inflamação crônica com perda parcial ou total de função do órgão atingido. Acometimento cutâneo, musculoesquelético, hematológico, renal e neuropsiquiátrico são os mais comuns e significativos, mas outros órgãos, como fígado e baço, também podem ser envolvidos [4–8].

O baço, um órgão linfóide secundário, desempenha papéis cruciais nos processos hematológicos e imunológicos, sendo dividido histologicamente em polpa vermelha, polpa branca e zona marginal, cada qual desempenhando funções específicas [9]. No LES, embora o envolvimento do baço seja pouco específico, este tecido participa das respostas inflamatórias crônicas típicas da doença. Isso pode levar a manifestações como esplenomegalia, hiper ou hipoesplenismo, infartos, rupturas espontâneas e desenvolvimento de nódulos calcificados no tecido [10–17].

Uma das formas de se estudar a doença é a partir de modelos experimentais utilizando camundongos (*Mus musculus*). Um destes modelos é o de lúpus induzido por pristano (PIL), uma substância oleosa que atua provocando uma resposta autoimune semelhante à do LES em pacientes [18,19]. Este é o modelo que apresenta a maior quantidade de manifestações clínicas e laboratoriais da doença [19,20], mas o envolvimento de alguns órgãos e sistemas ainda necessita de melhor caracterização.

A vitamina D (1,25(OH)₂D) é um hormônio esteroide obtido pela exposição ao sol, dieta ou suplementação, nas formas D2 (ergocalciferol) e D3 (colecalciferol). A vitamina D3 é sintetizada na pele com a ajuda da radiação UV e metabolizada no fígado e rins, onde é convertida em sua forma ativa, calcitriol. Sua função mais conhecida é na regulação dos níveis de cálcio e fósforo, essenciais para a saúde óssea [21–24]. A vitamina D também desempenha

papéis importantes no sistema imunológico, como a modulação de células imunológicas e a promoção de processos tolerogênicos [24]. A deficiência de vitamina D tem sido associada ao desenvolvimento de doenças autoimunes, como artrite reumatoide, LES e esclerose sistêmica [25].

A relação entre a vitamina D e o LES tem sido estudada e a suplementação de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ é comum nos pacientes, que podem apresentar deficiência nos seus níveis, muitas vezes causada pela baixa exposição solar devido à fotossensibilidade. Estudos mostram que a deficiência de vitamina D está associada a uma maior atividade da doença, enquanto a suplementação pode reduzir essa atividade [26–31]. Além disso, a ativação nuclear do receptor de vitamina D (VDR) tem sido relacionada à modulação de processos inflamatórios, como a via de NF- κ B, em nefrite lúpica [32]. Portanto, tanto a $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ quanto seu receptor nuclear estão envolvidos na modulação do sistema imunológico.

Desta forma, este trabalho busca estudar as alterações esplênicas que ocorrem no modelo experimental PIL ao longo do tempo de experimentação e como a suplementação de vitamina D poderia modular estas alterações através dos seus efeitos imunorregulatórios já descritos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ESTRATÉGIAS PARA LOCALIZAR E SELECIONAR AS INFORMAÇÕES

Os termos de pesquisa para a seleção dos artigos nesta revisão da literatura foram utilizados nas bases de dados *Pubmed*, *Embase* e *Scielo*. Apenas artigos escritos em língua inglesa ou língua portuguesa foram selecionados. Os *MESH Terms* incluídos na pesquisa, entre tópicos relacionados ao tema deste trabalho, foram “*Lupus Erythematosus, Systemic*”, “*Spleen*”, “*Models, Animal*”, “*Vitamin D*” e “*Megakaryocytes*”, isoladamente ou em combinação. A Figura 1 apresenta um esquema de como os artigos foram selecionados e quais critérios foram utilizados para filtrar as informações.

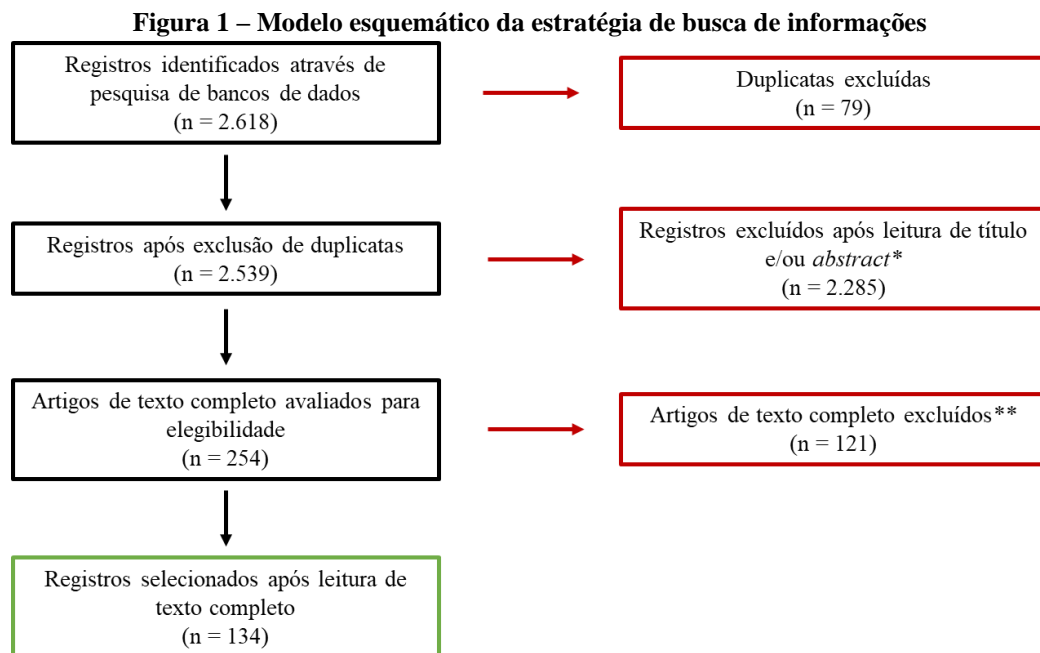


Figura de autoria própria produzida com o programa *Microsoft Power Point*. *Critérios de exclusão após leitura de título e *abstract*: tema não relacionado aos objetivos da pesquisa; *abstracts* não disponíveis; *abstracts* não disponíveis em inglês ou português. **Critérios de exclusão após leitura de texto completo: informações não relacionadas aos objetivos da pesquisa e artigos não disponíveis na íntegra.

2.2 LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença crônica inflamatória, mediada por processo autoimune. É caracterizada pela perda de tolerância a componentes do próprio organismo, denominados autoantígenos, que desencadeiam a resposta imune exacerbada. Essa ativação descontrolada do sistema imunológico resulta em inflamação multissistêmica, podendo afetar órgãos como pele, rins, coração, pulmões, articulações e sistema nervoso central, levando a sintomas variáveis. A etiologia exata ainda é desconhecida, mas se acredita que fatores genéticos, hormonais e ambientais desempenhem um papel importante no desenvolvimento da doença [33,34].

Os dados de prevalência e incidência da doença são heterogêneos a depender da geografia e das características demográficas da população estudada. Tian e colaboradores estimaram uma incidência global de LES de 5,14 por 100 mil pessoas ao ano. Entre mulheres, essa estimativa subiu para 8,82 e, entre homens, foi de 1,53 por 100 mil ao ano [3]. De fato, é observado na prática clínica que a maioria das pacientes com a doença são mulheres. No mesmo estudo, a prevalência global de LES foi estimada em 43,7 por 100 mil pessoas, ou seja, cerca de 3,41 milhões de pacientes ao redor do mundo [3].

Estudos epidemiológicos que busquem dados de prevalência e incidência do LES na população brasileira são escassos. Em 2002, Pereira Vilar e Sato estimaram a incidência da doença na cidade de Natal/RN como 8,7 por 100 mil habitantes ao ano [35]. Dois anos depois, um estudo de coorte de Senna e colaboradores estimou a prevalência da doença no Brasil em 0,098% [36]. Já em 2011, Nakashima e colaboradores estimaram uma incidência de 4,8 novos casos por ano para cada 100 mil habitantes em Cascavel/PR [37]. Finalmente, Marques e colaboradores observaram um aumento da incidência de lúpus na população brasileira durante a pandemia de COVID-19, estimando que em 2021 esse dado foi de 221,8 casos para cada 1 milhão de habitantes, sendo a maior incidência na região sul (253,3/1 milhão) e a menor, na região norte (154,5) [38].

Além da diferença de incidência e prevalência observada entre os sexos, também são observadas diferenças étnico-raciais. Sendo assim, o LES é mais incidente em pessoas de ascendência africana, hispânica ou asiática do que naquelas que possuem ascendência europeia [39,40]. Também, pacientes não-brancas tendem a ser mais gravemente afetadas pela doença, com manifestações mais severas (como nefrite lúpica e eritema discoide) e acumulação mais

rápida de dano permanente. Manifestações renais também costumam aparecer mais cedo nessas pacientes [41–43].

2.2.1 Fisiopatogenia

A etiologia da doença é pouco conhecida e são diversos os fatores que se acredita serem responsáveis pela sua etiopatogenia, dentre os quais se destacam fatores ambientais e genéticos. Por exemplo, infecções (notadamente pelo vírus Epstein-Barr), exposição à radiação ultravioleta (UV) e à sílica e uso de determinadas substâncias, como tabaco, estão entre algumas possíveis causas. Além disso, o hormônio estrogênio, a dieta e a composição da microbiota intestinal também podem estar associados, em maior ou menor grau, com a incidência da doença [2]. Ademais, a hereditariedade genética exerce importante papel no desenvolvimento do LES, com 66% de correspondência em gêmeos univitelinos. Estudos de associação do genoma completo (GWAS) identificaram mais de 100 *loci* de suscetibilidade associados à doença, particularmente em genes do complexo principal de histocompatibilidade (MHC). Essa suscetibilidade genética é maior em determinadas populações, como as de ascendência africana e asiática. Ainda assim, o desenvolvimento da doença é multifatorial, com a predisposição genética sendo tão somente uma das múltiplas causas, muito frequentemente ativada por fatores ambientais e hormonais [44].

Na doença, ocorre uma resposta imune exacerbada contra antígenos próprios, que ficam disponíveis após subseqüentes falhas do sistema de fagocitose em limpar os tecidos de *debris* de células apoptóticas, especialmente micropartículas nucleares, como de DNA dupla-fita (dsDNA). As partículas apoptóticas nucleares disponíveis durante o processo de morte celular por NETose (proveniente da ação de neutrófilos) parecem ser as que mais contribuem para a patogênese do LES [1,45]. A partir disso, células B ativadas passam a produzir imunoglobulinas, em especial IgM, IgG e IgA, contra antígenos próprios, os autoanticorpos. Cada tipo de imunoglobulina apresenta papéis e comportamentos distintos. IgM tende a ser produzida na resposta inicial a danos e invasores e possui capacidade elevada de ativação de moléculas do complemento. IgG é um isotipo mais abundante e duradouro, apresentando alta capacidade de opsonização. Finalmente, IgA se apresenta nas formas sérica e secretória, sendo a primeira muito importante na ativação de células fagocíticas e a segunda, na proteção de regiões mucosas [46].

Hipergamaglobulinemia (aumento da concentração de imunoglobulinas na circulação sanguínea) é uma manifestação comum em pacientes com alta atividade de doença, devido à elevada ativação da imunidade humoral e produção excessiva de autoanticorpos [46,47]. Por outro lado, alguns pacientes podem apresentar hipogamaglobulinemia, em decorrência de perda proteica como consequência de síndrome nefrótica e/ou uso de fármacos imunossupressores [46,48,49].

Os principais autoanticorpos produzidos no LES são os anticorpos antinucleares (ANAs) que têm como alvos os componentes do núcleo das células. Há dois tipos destes anticorpos: anticorpos anti-DNA e anticorpos anti-proteínas ligadoras de RNA (RBPs), como anti-Sm, anti-Ro, anti-La e anti-RNPs (ribonucleoproteínas) [50]. Sabe-se que os níveis séricos de anti-DNA variam conforme a atividade da doença [50–52] enquanto os níveis de anticorpos contra RBPs são relativamente estáveis ao longo do tempo [50].

Autoanticorpos tendem a formar imunocomplexos nos tecidos e na circulação. Estes imunocomplexos são compostos por imunoglobulinas associadas a seus respectivos autoantígenos, que ativam a sinalização por interferons do tipo I (IFN-I), cuja assinatura é característica do LES [50,53,54]. Esse mecanismo se dá porque os autoanticorpos supracitados são capazes de ativar células dendríticas plasmocitoides (pDCs) [55,56] altamente produtoras de IFN-I, por meio da ativação de receptores do tipo *toll* (TLRs) [55]. Os mais comuns TLRs envolvidos na fisiopatogenia do LES são TLR7 e 9 [57,58]. Esse mecanismo envolvendo pDCs, IFN e receptores é fisiologicamente essencial para o combate a possíveis infecções virais, mas no contexto do LES se torna promotor da ativação inadequada de genes envolvidos na doença [55], que produzirão uma cascata de moléculas inflamatórias.

A sinalização por IFN-I acarreta uma resposta imunológica que envolve tanto a imunidade inata quanto adaptativa, ao estimular a diferenciação de fagócitos derivados de monócitos da circulação e promover a ativação de células B autorreativas (autoimunidade humoral) [55,56]. Por isso, o fator de ativação de célula B (BAFF, em inglês) tem atraído o interesse da comunidade científica como alvo terapêutico, pois contribui para a proliferação e sobrevivência destas células, que produzem os autoanticorpos que se depositam nos tecidos [59]. Complementarmente, a deficiência de origem genética no sistema complemento observada em pacientes com LES é um fator de risco para a doença, uma vez que esses componentes são importantes para a depuração dos imunocomplexos [60]. Todos esses fatores

desencadeantes acabam tendo como consequência a perda de tolerância de linfócitos B e T a autoantígenos [61].

Os macrófagos são outro tipo celular fagocítico que atua no sistema imune inato. São células grandes e altamente plásticas que residem nos tecidos e se polarizam em diferentes perfis a depender dos sinais fisiológicos ou patológicos que recebem [62,63]. O perfil M1 (ativação clássica), usualmente referido como “pró-inflamatório”, é induzido por TLRs [62] e IFN- γ [64]. Esses macrófagos são conhecidos por produzirem citocinas como IL-1, IL-6 e TNF [63]. Já o perfil M2 (ativação alternativa), “anti-inflamatório”, contrasta ao ser induzido por IL-4 e IL-13 e está envolvido na reparação tecidual e regulação imune, promovendo a resolução da inflamação [62,63,65].

Ademais, alguns fatores de transcrição gênica são essenciais para a regulação do processo de polarização [63]. Destacam-se o fator nuclear kappa (NF- κ B) [66], o transdutor de sinal e ativação de transcrição 1 (STAT1) [66] e o fator regulatório de interferon 5 (IRF5) [67] na ativação clássica (M1). Já STAT6 [68], IRF4 [69] e receptor ativado por proliferadores de peroxissoma tipo gama (PPAR- γ) [70] regulam a ativação alternativa (M2).

Todavia, é importante ressaltar que a divisão M1/M2 é simplificada e que o espectro de polarização destas células é mais amplo e apresenta estados intermediários entre esses dois [63]. Em resumo, macrófagos desempenham funções tanto na inflamação crônica quanto aguda, e no processo de resolução desta [71]. Deste modo, é sabido que no LES há uma desregulação no funcionamento destas células [72]. Embora os macrófagos M1 sejam vistos como mais proeminentes em processos inflamatórios, estudos indicam que o fenótipo M2 exerce um papel protagonista na patogênese do LES [72–74]. Em um contexto de LES em alta atividade, há uma hiperativação do tipo M1, com alta produção de citocinas pró-inflamatórias [72]. Complementarmente, o desenvolvimento da doença também ocasiona que macrófagos M2 se tornem ineficientes no processo de fagocitose e limpeza tecidual, especialmente dos imunocomplexos depositados nos tecidos [72,75]. Como consequência, há dano à função dos órgãos afetados.

2.2.2 Envolvimento esplênico

O baço é um órgão linfoide secundário que participa de processos hematológicos e imunológicos, que ocorrem em suas diferentes regiões teciduais (Figura 2). Estas regiões

identificáveis são a polpa vermelha e os compartimentos linfoides (polpa branca e zona marginal). Funcionalmente, é na polpa vermelha que há a filtração das células sanguíneas, a reciclagem do ferro e a produção de anticorpos pelos plasmócitos. Na polpa branca se encontram compartimentos de linfócitos T e linfócitos B, similarmente ao que se observa nos linfonodos. Nessa região ocorre interação entre diferentes tipos de células hematopoiéticas, especialmente das células T com células B e células dendríticas, e também expansão clonal de células B ativadas [9]. Finalmente, a zona marginal é uma região de transição do baço, onde as células passam da corrente sanguínea para o tecido esplênico. Esta região é importante para o correto funcionamento da vigilância imunológica, uma vez que é nela que as células B desta zona interagem com células apresentadoras de antígeno, processo fundamental para o desenvolvimento de defesa contra agentes infecciosos e para a manutenção da homeostase imunológica [9,76].

Figura 2 – Ilustração representando corte histológico longitudinal do baço

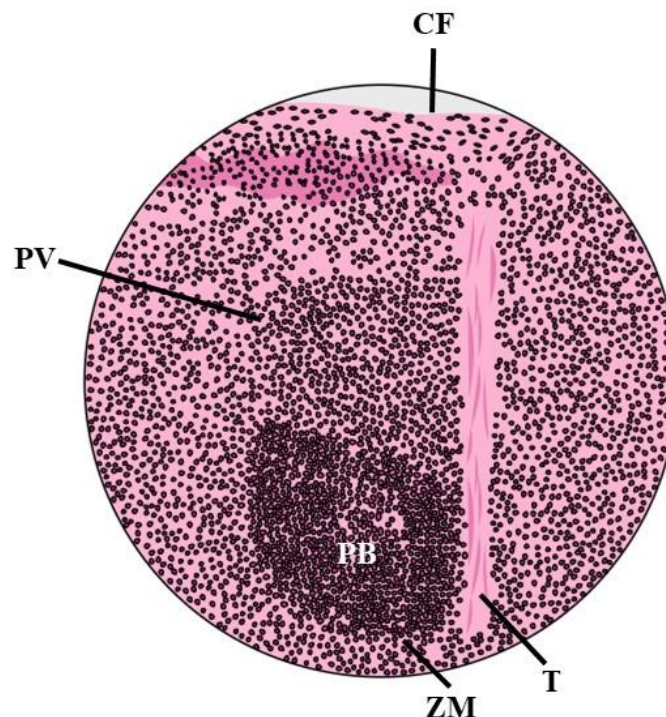


Figura de autoria própria produzida com os programas *Mind the Graph* e *Microsoft Power Point*. O baço é um órgão linfóide secundário que participa da manutenção da homeostase hematológica e imunológica. É revestido por uma cápsula fibrosa (CF) de tecido conjuntivo denso não modelado e apresenta três regiões distinguíveis: polpa vermelha (PV), polpa branca (PB) e zona marginal (ZM). Na PV, ocorre essencialmente a filtração das células sanguíneas. Na PB é onde ocorre a interação entre diferentes células do sistema imunológico, como linfócitos e células dendríticas. Já a ZM é uma interface entre as duas outras regiões, onde ocorre a troca de células da corrente sanguínea para o tecido esplênico e vice-versa. PB e ZM formam o chamado “componente linfóide”

deste órgão. As trabéculas (T) são estruturas de tecido conjuntivo que se estendem da CF para o interior do órgão, proporcionando suporte para os vasos sanguíneos e células do baço.

Em geral, o envolvimento do baço na patogenia do LES não é específico da doença, mas de ocorrência esperada em processos inflamatórios e respostas imunes. Quando infecção ou dano ao hospedeiro é identificado, o tecido esplênico é ativado através dos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), como TLRs, receptores tipo-NOD (NLRs), RNA helicases tipo-gene induzível por ácido retinóico tipo I (RIG-I) e receptores de lectina tipo-C (CLRs). Em resposta a isso, células T emitem sinais de ativação de células apresentadoras de antígeno e fagócitos e há secreção de citocinas no tecido esplênico. A secreção de citocinas pró-inflamatórias no baço estimula a ativação de pDCs e macrófagos, que por sua vez recrutam leucócitos que se mantêm ativos no tecido enquanto o processo não é resolvido [77]. Por ser uma doença de caráter inflamatório, no LES isso se torna crônico e recorrente.

Esplenomegalia (aumento do baço), hiper ou hipoesplenismo, infarto, ruptura espontânea e presença de nódulos calcificados no baço são algumas das manifestações reportadas em pacientes com LES [10–17]. Das manifestações mencionadas, a primeira é a mais destacada, com taxas variando entre 9% e 46% dos pacientes sendo acometidos [78,79]. Em geral, o aumento do baço se dá devido a três mecanismos principais: elevação do sequestro de células da circulação, hiperplasia imune/linfoide e bloqueio do fluxo sanguíneo [79]. Uma das causas para o último pode ser algum acometimento do fígado e, no LES, a esplenomegalia costuma estar associada à hepatomegalia. Na hiperplasia linfoide, o baço apresenta aumento da polpa branca (folículos linfoides) e acumulação de macrófagos e plasmócitos no entorno de arteríolas e da polpa vermelha. Histologicamente, o principal achado em baços esplenectomizados de pacientes com LES são as chamadas “lesões casca de cebola”, que consistem em múltiplas camadas de colágeno hialinizado periarticular observadas no tecido [78].

2.2.3 Demais manifestações e critérios diagnósticos

As manifestações clínicas e laboratoriais dos pacientes com LES são bastante heterogêneas e variam muito entre os indivíduos com a doença. Qualquer órgão e sistema pode ser acometido, o que pode levar à inflamação crônica e perda de função. A pele é acometida em

cerca de 90% dos pacientes com LES, incluindo os subtipos lúpus cutâneo agudo, subagudo e crônico, tendo como principais manifestações o eritema malar e a fotossensibilidade [6]. As manifestações musculoesqueléticas mais comuns são artralgia e artrite, geralmente afetando mais de uma região do corpo [4–6]. Anemia, leucopenia, linfopenia, trombocitopenia, presença de anticorpos antifosfolipídeos e anticoagulante lúpico são manifestações hematológicas observadas nestes pacientes [7,8]. O envolvimento renal tem importância clínica bastante relevante, pois está fortemente associado ao aumento de morbidade e mortalidade, atingindo cerca de metade dos pacientes [6]. Manifestações neuropsiquiátricas são comuns em pacientes com LES, porém muitas vezes são inespecíficas e podem ser secundárias à doença ou a outras etiologias. Incluem convulsões, psicose, neuropatias, estado confusional agudo, transtornos de ansiedade e de humor, dentre outros [6,80].

Em 2019, os critérios de classificação diagnóstica para o LES foram atualizados pela *European Alliance of Associations for Rheumatology* (EULAR) e o *American College of Rheumatology* (ACR) (Quadro 1). O paciente precisa apresentar anticorpo antinuclear (ANA) positivo pelo menos uma vez e somar 10 ou mais pontos para atender aos critérios de classificação [81].

Quadro 1 – Critérios de classificação do LES, segundo EULAR/ACR 2019

Domínios Clínicos	Item	Pontuação
Constitutivo	Febre	2
Hematológico	Leucopenia	3
	Trombocitopenia	4
	Hemólise autoimune	4
Neuropsiquiátrico	Delírio	2
	Psicose	3
	Convulsão	5
Mucocutâneo	Alopecia	2
	Úlceras orais	2
	LECS/LED	4
	LECA	6
Seroso	Efusão pericárdica ou pleural	5
	Pericardite aguda	6
Musculoesquelético	Envolvimento articular	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
Domínio Imunológico	Item	Pontuação
Anticorpos antifosfolípídeo	Antifosfolípídeo	2
Complemento	C3 ou C4 baixo	3
	C3 e C4 baixos	4
Anticorpos positivos específicos do LES	Anti-Sm	6
	Anti-dsDNA	6

Fonte: quadro construído pelo próprio autor, baseado em Aringer e colaboradores, 2019 [81]. LECS: lúpus eritematoso cutâneo subagudo; LED: lúpus eritematoso discoide; LECA: lúpus eritematoso cutâneo agudo; C3: molécula do complemento C3; C4: molécula do complemento C4; anti-Sm: anticorpo contra Smith; anti-dsDNA: anticorpo contra DNA dupla-fita.

2.2.4 Tratamento

A escolha do tratamento para pacientes com LES deve levar em consideração fatores específicos de cada paciente e a forma como a doença se apresenta, seja pelo perfil das manifestações e órgãos atingidos, seja pelo nível de atividade da doença no momento avaliado [82]. Segundo o EULAR, o objetivo é a redução da atividade da doença ou sua remissão [8,83,84]. O padrão de tratamento da doença se inicia com o emprego de antimaláricos, como a hidroxicloroquina. Também podem ser prescritas drogas imunossupressoras, tais como azatioprina, ciclosporina, metotrexato e micofenolato de mofetil. Quanto ao uso de

glicocorticoides, são necessários para controlar atividade da doença em fases agudas, mas se deve evitar a prescrição por longos períodos de tempo [8,84].

Além disso, tem-se avançado na pesquisa e uso de imunobiológicos, por terem como alvo moléculas específicas envolvidas na fisiopatogenia da doença, sendo rituximabe, belimumabe e anifrolumabe as que são utilizadas atualmente no tratamento de casos moderados a graves de LES. O rituximabe induz a depleção de linfócitos B ao se ligar à molécula CD20 expressa nestas células. O belimumabe inibe o BAFF, inativando células B produtoras de autoanticorpos. E o anifrolumabe inibe o receptor de IFN do tipo I, bloqueando a sinalização mediada por esta citocina [84,85]. Entretanto, o mais recente avanço na área foi com os ótimos resultados no uso ainda experimental de célula T programada por receptor de antígeno quimérico (*CAR-T cell*) contra CD19, que depleta profundamente as células B, reduzindo drasticamente a produção de autoanticorpos e melhorando os sintomas relacionados ao LES [84,86].

Os pacientes também precisam ser incentivados a manter hábitos saudáveis, com controle de peso, atividade física e evitar o tabagismo. A atividade física reduz os riscos cardiovasculares nesta população e o uso de tabaco pode prejudicar o efeito de determinados medicamentos, tais como os antimaláricos. Tratamentos adjuvantes, como suplementação de vitaminas e minerais e o uso de antiagregantes plaquetários e anti-hipertensivos, também podem ser prescritos. É o caso da vitamina D, cuja suplementação é importante para evitar a deficiência e as consequências negativas desta sobre a atividade da doença [87].

2.3 MODELO MURINO DE LÚPUS INDUZIDO POR PRISTANO

Modelos experimentais são importantes para estudos que visem compreender os processos fisiopatogênicos envolvidos em doenças das mais variadas naturezas. Nos estudos sobre LES, são especialmente importantes devido à heterogeneidade e complexidade da doença e o difícil acesso a órgãos e tecidos de pacientes humanos. Além de esses tecidos poderem ser acessados em animais menores, o uso de modelos animais é imperativo para a pesquisa de potenciais tratamentos [19].

Os modelos murinos de LES utilizados atualmente são divididos em duas categorias principais: modelos em que a sintomatologia se desenvolve espontaneamente, devido a

modificações genéticas dadas pelo subsequente cruzamento de linhagens ou por transgenia, e modelos induzidos [88]. Um resumo das características dos diferentes modelos espontâneos e induzidos está apresentado no Quadro 2.

Quadro 2 – Características observadas em diferentes modelos murinos de LES

Tipo	Modelo	Principais Manifestações
Espontâneo	NZB/W F1	Esplenomegalia, anemia hemolítica, níveis elevados de anticorpos anti-dsDNA, glomerulonefrite (GN) mediada por imunocomplexos (ICs), insuficiência renal
	NZM	GN grave, nefrite membranosa, aumento na deposição de ICs
	MRL/lpr	Linfadenopatia severa, células T duplo-negativas (CD4 ⁻ CD8 ⁻), altos níveis de anticorpos anti-dsDNA, autoanticorpos dirigidos ao RNA, GN, dermatite
	BXSB/Yaa	Hiperplasia linfóide, GN mediada por ICs, monocitose, altos níveis de anticorpos anti-DNA e anti-RNA, esplenomegalia
Induzido	Lúpus induzido por pristano (PIL)	Artrite, GN grave, serosite, anemia, anticorpos anti-ribonucleoproteína, anti-DNA, anti-histona, deposição de ICs
	Doença crônica do enxerto contra o hospedeiro (cGVHD)	Ativação policlonal de células B e T, GN, proteinúria, alta produção de autoanticorpos (anti-dsDNA, anticorpos antinucleares)

Fonte: autoria própria, baseado em Li, Titov e Morel, 2017 [89]. dsDNA: molécula de ácido desoxirribonucleico dupla-fita; RNA: ácido ribonucleico; GN: glomerulonefrite; IC: imunocomplexo.

O pristano (2,6,10,14-tetrametilpentadecano) é um hidrocarboneto alceno isoprenoide. Ao ser injetado intraperitonealmente em camundongos (*Mus musculus*), tem como manifestação inicial a formação de ascite, com a presença de estruturas chamadas lipogranulomas e a produção de um líquido rico em autoanticorpos e moléculas pró-inflamatórias [18,19] (Figura 3). O modelo de lúpus induzido por pristano (PIL) é caracterizado por ser o modelo com a maior quantidade de manifestações contidas nos critérios de classificação do LES, com produção de autoanticorpos antinucleares específicos e desenvolvimento de proteinúria, serosite, glomerulonefrite e artrite, entre outras manifestações [19,20]. Este modelo se desenvolve mais fortemente em camundongos fêmeas do que em machos [90]. Também é observado no modelo a deposição de imunocomplexos nos tecidos, formados por imunoglobulinas IgM e IgG [91].

Figura 3 – Resumo da indução e progressão do modelo de lúpus induzido por pristano em *Mus musculus*

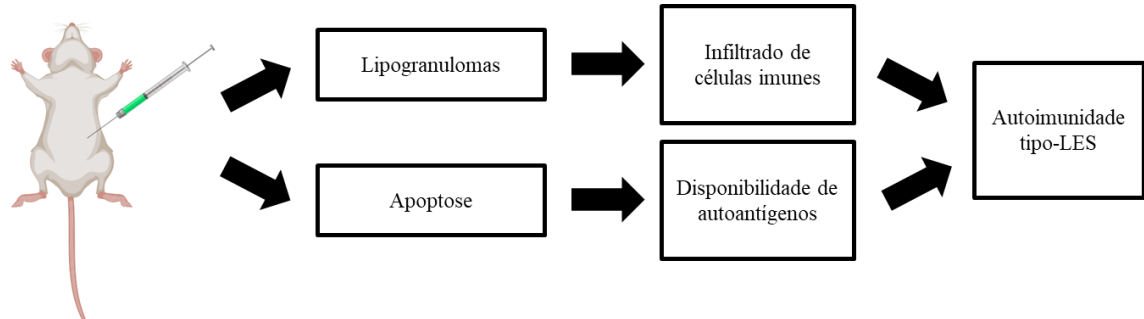


Figura de autoria própria produzida com os programas *BioRender* e *Microsoft Power Point*. Uma única injeção intraperitoneal de 500 μ L de pristano ocasiona uma reação na cavidade abdominal do camundongo (*Mus musculus*), que passa a formar estruturas chamadas lipogranulomas, ricas em leucócitos produtores de moléculas pró-inflamatórias, como interferons. Simultaneamente, por ser uma substância oleosa, o pristano interage com a membrana plasmática das células do peritônio, ocasionando o seu rompimento. Assim, componentes celulares se tornam disponíveis nos tecidos e na circulação, servindo de autoantígenos para uma resposta imune exacerbada. Essas reações têm como consequência um processo autoimune semelhante ao lúpus eritematoso sistêmico (LES) em humanos.

Os autoanticorpos antinucleares circulantes, principalmente imunoglobulinas G (IgG) contra DNA, cromatina, Sm e RNPs depositam-se nos tecidos, formando os imunocomplexos característicos do LES [18]. Conseqüentemente, há produção em excesso de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, IL-12 e IFNs [19]. A propósito, a forte assinatura de IFN-I observada no modelo PIL é uma vantagem deste modelo em relação a outros modelos murinos, mimetizando uma característica importante da doença em humanos [18]. A expressão de IFN-I é detectada nas primeiras semanas após a indução por pristano, enquanto os autoanticorpos podem ser detectados apenas três meses após a injeção [92].

2.3.1 Observações esplênicas no modelo PIL

Na maioria dos modelos espontâneos de lúpus, há um aumento da presença de pDCs produtoras de IFN- α e responsivas a TLR7 e 9 no baço [93]. No modelo MRL-lpr, o gene *Mdm2* está altamente expresso no baço [94], sendo um regulador negativo de p53, proteína reguladora do ciclo celular responsável por ativar a morte programada em células defeituosas e tumorais [95].

Já no baço de camundongos PIL, foi detectado aumento no número de células T com perfil associado ao LES e diminuição no percentual de células T_{reg} importantes para a

manutenção da tolerância imunológica [96]. Análises histológicas observaram multiplicação do número de nodos linfáticos e a formação de imunocomplexos (IgM ou IgG) na região da polpa vermelha [91]. Também observam-se indícios de necrose, células inflamatórias, vacuolizadas e/ou pigmentadas, além de aumento e desorganização de centros germinais, folículos linfoides e zonas marginais no tecido esplênico desses animais [91,96,97]. Aumento das dimensões e volume do baço, caracterizando esplenomegalia, é a principal observação no modelo [96,98–100]. Isto é medido através do comprimento do órgão em centímetros, sua massa em gramas ou a proporção da massa, em miligramas, do órgão sobre a massa total do animal, em gramas.

2.4 MEGACARIÓCITOS

Os megacariócitos (MKs) são células hematopoiéticas grandes e multilobulares, produzidas na medula óssea, num processo chamado megacariopoiese. Adicionalmente, podem ser observados em outros tecidos, como os pulmões e o baço. São originários de células progenitoras mieloides e sua função mais típica é a produção de plaquetas, essenciais para a manutenção da homeostase. A megacariopoiese pode ocorrer também no tecido esplênico, especialmente em situações de inflamação sistêmica (como no LES). Isso ocorre quando o baço identifica perturbações que afetam a homeostase do organismo, produzindo mais destas células a fim de prover a circulação de mais plaquetas, num contexto em que a produção pela medula óssea pode não estar suficiente [101]. Entretanto, diferentes estados inflamatórios podem causar tanto trombocitose (excesso de plaquetas na circulação, acima de $450 \times 10^9/L$) quanto/ou trombocitopenia (diminuição do número de plaquetas a níveis abaixo de $150 \times 10^9/L$) [102].

Além disso, megacariócitos participam também de funções imunes, direta ou indiretamente [101]. MKs apresentam TLRs [103–106] e receptores Fc- γ [107] em sua superfície celular, permitindo sua resposta a patógenos e outras ameaças [101]. Assim, podem promover resposta de células T [101,108]. Nos pulmões, acredita-se que MKs atuem como sentinelas, detectando processos de inflamação sistêmica e contribuindo para a defesa imunológica ao produzirem novas plaquetas e ao liberarem mediadores na circulação [101,109]. Sabe-se que, em murinos, MKs também liberam citocinas, como IL-1 [109–111], e geram micropartículas envolvidas na inflamação sistêmica [112,113], que podem interagir com outras células, como neutrófilos [101]. Complementar a isso, células progenitoras de MKs estimulam

resposta celular do tipo Th17 e Th1/Th17, regulando a diferenciação de células T auxiliares (Th). Células do tipo Th17 produzem IL-17, uma citocina envolvida em processos inflamatórios e autoimunes, como no LES e na artrite reumatoide (AR) [114]. Deste modo, MKs podem ter um impacto sistêmico, tendo participação em doenças autoimunes como o LES.

2.5 VITAMINA D

A vitamina D, ou 1,25-diidroxivitamina D ($1,25(\text{OH})_2\text{D}$), é um hormônio esteroide. Humanos o adquirem via exposição à luz solar, dieta ou suplementação. Apresenta-se em duas formas, D_2 e D_3 . A forma D_2 (ergocalciferol) é encontrada em fungos e plantas, portanto pode ser adquirida exclusivamente pela dieta. Já a forma D_3 (colecalfiferol) é sintetizada endogenamente pela pele a partir do 7-deidrocolesterol, com a participação da radiação UV proveniente dos raios solares. Adicionalmente, pode ser adquirida exogenamente através da ingestão de peixes gordurosos. Também participam da sua metabolização o fígado e os rins, onde finalmente a vitamina D_3 é convertida em sua forma ativa (calcitriol) e biodisponibilizada à circulação [21–24].

A função mais conhecida e elucidada da $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ é a sua participação na homeostase de alguns minerais, como cálcio e fósforo. Promove, ao ativar determinados genes, a absorção de cálcio pelas células intestinais e reabsorção pelas células dos túbulos contorcidos distais dos rins. Deste modo, essa vitamina tem função essencial na reabsorção óssea e na estimulação da função de osteócitos e osteoblastos. Em sinergia com o paratormônio, nos rins, também atua em mobilizar cálcio do tecido ósseo para a circulação a fim de manter os níveis séricos fisiológicos desse mineral [23]. Os dois hormônios também promovem maturação de osteoclastos e atuam na reabsorção do fosfato nos túbulos contorcidos proximais [115]. Além disso, há pesquisas sobre as funções da vitamina D no sistema nervoso e no sistema cardiovascular [22], principalmente via ação do receptor de vitamina D (VDR), presente em diversos tipos celulares.

O VDR é um receptor nuclear com função de fator de transcrição gênica. Ao se ligar ao VDR, a vitamina D induz que esse receptor forme heterodímeros com os receptores X retinóides (RXRs). Uma vez formado o heterodímero, este se liga aos VDREs (elementos responsivos à vitamina D) localizados no DNA, em regiões promotoras de genes ativados pela $1,25(\text{OH})_2\text{D}$

[116]. Alguns destes genes estão envolvidos nas funções de modulação de ordem imunológica que essa molécula executa.

Destaca-se a participação da vitamina D no estímulo às atividades antimicrobianas de monócitos e macrófagos, pela produção de catelicidina, influenciando também a função linfocitária; na modulação da diferenciação de células apresentadoras de antígeno (por exemplo, células dendríticas), mantendo-as imaturas [117]; na supressão da expressão de TLRs, espécies reativas de oxigênio e citocinas pró-inflamatórias de resposta Th1 [21,24,25,117–121]; na inibição da formação de plasmócitos e indução da apoptose de linfócitos B ativados [24,122,123]; e na ativação de células T reguladoras (T_{reg}) e *natural killer* (NK) [25]. Geldmeyer-Hilt e colaboradores também observaram um efeito modulador da vitamina D sobre a expressão de NF- κ B em células B *in vitro* [24,124]. Em resumo, o efeito geral da $1,25(OH)_2D$ na imunidade é a facilitação da conversão de processos pró-inflamatórios em processos tolerogênicos [24] (Figura 3).

Figura 4 - Esquema mostrando os diferentes efeitos imunomoduladores da vitamina D

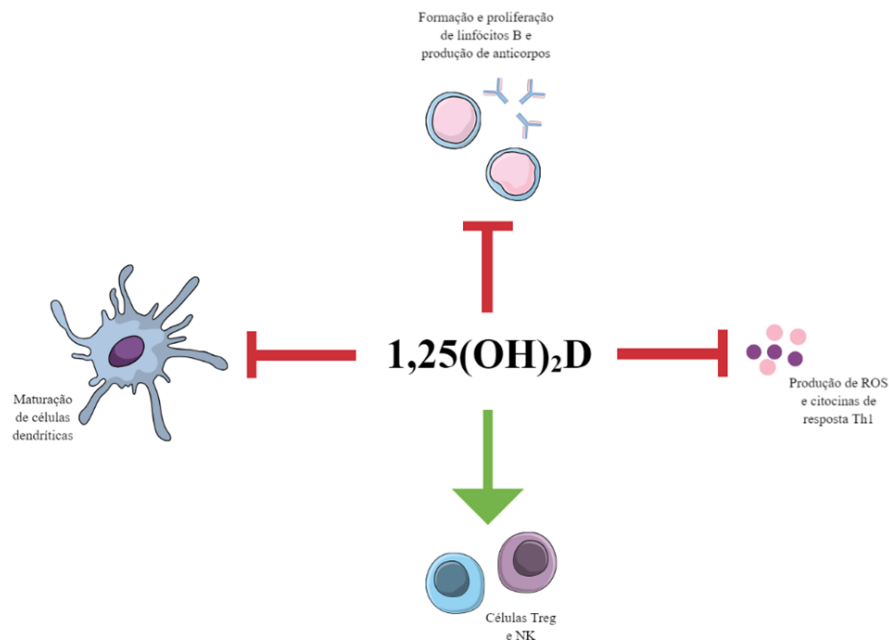


Figura de autoria própria produzida com o programa *Mind the Graph*. A 1,25-dihidroxitamina D ($1,25(OH)_2D$) possui propriedades imunomoduladoras com potencial tolerogênico. Destacam-se a estimulação de células T reguladoras (T_{reg}) e *natural killer* (NK) e a inibição da maturação de células dendríticas, da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e citocinas de resposta inflamatória (Th1) e da formação e proliferação de linfócitos B e plasmócitos produtores de anticorpos. Seta verde: estimulação; setas vermelhas: inibição.

Estudos têm relacionado a deficiência de vitamina D com o desenvolvimento de doenças reumáticas imunomediadas, como artrite reumatoide (AR), LES, doença de Sjögren, espondilite anquilosante, artrite psoriática e esclerose sistêmica. A deficiência de vitamina D também está associada com maior atividade da doença, em especial na AR e no LES. Além disso, por apresentar propriedades imunomoduladoras, a suplementação com vitamina D pode beneficiar os pacientes, interferindo em manifestações clínicas e laboratoriais dessas doenças [25].

2.5.1 Vitamina D no contexto do LES

A relação da vitamina D com o LES é amplamente pesquisada e a suplementação dessa molécula é uma prática comum em pacientes, visando prevenir e tratar sua deficiência, frequentemente ligada à baixa exposição solar devido à fotossensibilidade, e suas consequências. Estudos demonstram associação entre deficiência de vitamina D e aumento da atividade da doença (índice SLEDAI) [26–30], assim como a redução desta quando da suplementação com aquela [31]. No mesmo sentido, Huang e colaboradores demonstraram relação entre a ativação de VDR com a modulação de processos inflamatórios, como aqueles que envolvem a via de NF- κ B, em nefrite lúpica [32].

Contrariamente, a expressão aumentada de VDR em linfócitos T CD4⁺ tem sido associada a uma maior atividade da doença [125]. Estudos indicam que quatro polimorfismos (*ApaI*, *BsmI*, *TakI* e *FokI*) do gene que codifica o receptor estão relacionados a uma maior suscetibilidade ao desenvolvimento de doenças autoimunes [126,127]. No contexto do LES, tão somente foi demonstrada associação de *BsmI* e *FokI* com maior propensão à doença, especialmente em populações asiáticas [128–130].

Nosso grupo de pesquisa também já conseguiu demonstrar efeito da vitamina D sobre manifestações observadas em modelo animal: diminuição da inflamação articular [131], associação entre expressão de VDR e IgG no hipocampo [132], modulação da autofagia [133] e melhor performance em testes comportamentais [134]. Embora não tenha sido observada a reversão da esplenomegalia, o efeito da vitamina D sobre o envolvimento esplênico no modelo ainda não está caracterizado na literatura.

3 MARCO CONCEITUAL

Figura 5 – Esquema representando o marco conceitual do trabalho

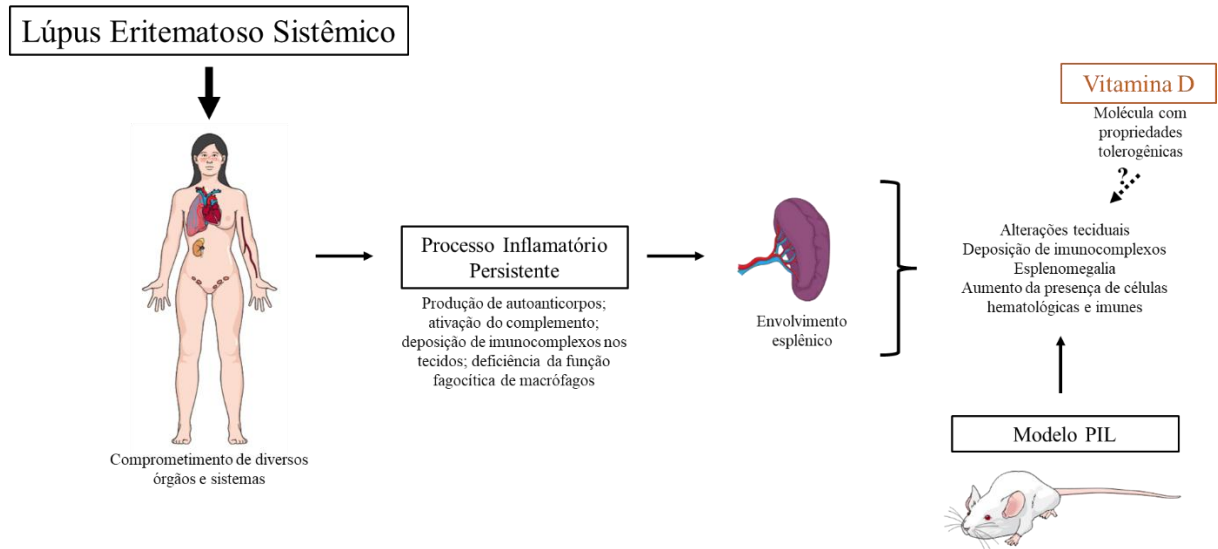


Figura de autoria própria produzida com os programas *Mind the Graph* e *Microsoft Power Point*. O lúpus eritematoso sistêmico é uma doença autoimune caracterizada pelo comprometimento de múltiplos órgãos e sistemas, causado por um processo inflamatório exacerbado e crônico. O baço é um tecido linfóide que pode ser afetado pela doença. No modelo de lúpus induzido por pristano (PIL), são observadas manifestações nesse órgão como alterações histopatológicas, deposição de imunocomplexos, aumento do tamanho do órgão e proliferação de células do sangue. Entretanto, são poucos os estudos que caracterizam o baço no modelo PIL. Além disso, terapias suplementares podem contribuir para aumentar a tolerância imunológica, podendo contribuir para a amenização dos sintomas. Uma molécula estudada para esse fim é a vitamina D, que possui propriedades imunomoduladoras. Contudo, é necessário melhor entendimento do efeito desta molécula no sistema imunológico e a capacidade de modular as alterações esplênicas descritas neste modelo experimental de LES.

4 JUSTIFICATIVA

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) afeta milhões de pessoas globalmente e impacta a qualidade de vida dos pacientes, mas sua etiologia e fisiopatogenia ainda não são completamente compreendidas. Como essa doença pode afetar uma variedade de órgãos e sistemas e se apresentar de forma heterogênea, estudos que visem compreender melhor sua origem e progressão são muito importantes. Para tanto, estudos clínicos apresentam limitações, como a dificuldade de acesso a tecidos humanos para análises moleculares e histológicas. Isso reforça a importância do uso de modelos experimentais, como modelos animais, para investigar o LES de forma mais detalhada. O modelo de lúpus induzido por pristano (PIL) é de relativo baixo custo e apresenta, dentre os modelos utilizados atualmente, a maior quantidade de manifestações observadas em pacientes humanos. Entretanto, o acometimento de órgãos específicos, como o baço, ainda necessita de maior caracterização, uma vez que esse órgão desempenha papel crucial na regulação da imunidade e na homeostase sanguínea. O baço é frequentemente impactado em doenças autoimunes, incluindo o LES, mas a compreensão detalhada do envolvimento esplênico ainda é limitada.

Além disso, a vitamina D, reconhecida por suas propriedades imunomoduladoras, é amplamente utilizada como suplemento em pacientes com LES. Seu potencial efeito sobre a resposta imunológica inata e adaptativa no contexto do LES pode ter implicações terapêuticas relevantes. A investigação do papel modulador da vitamina D no acometimento esplênico em modelos de LES pode abrir novas perspectivas sobre intervenções terapêuticas que busquem não apenas controlar os sintomas, mas também influenciar os mecanismos subjacentes à doença.

Desta forma, este estudo se justifica pela necessidade de caracterizar de forma mais precisa o acometimento esplênico no modelo PIL, proporcionando novos entendimentos sobre os mecanismos histológicos e imunológicos envolvidos. Esclarecer esse processo é importante para a melhor compreensão das manifestações sistêmicas do LES e suas repercussões imunológicas. Ao mesmo tempo, busca-se elucidar o papel modulador da vitamina D nesse contexto. Tais entendimentos podem contribuir para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas mais eficazes para o tratamento do LES no futuro.

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO PRIMÁRIO

Identificar achados histológicos no tecido esplênico de camundongos com lúpus induzido por pristano suplementados com vitamina D.

5.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

- a) Identificar o desenvolvimento de esplenomegalia nos camundongos PIL e o efeito da vitamina D sobre esta manifestação;
- b) Observar alterações histológicas no baço dos camundongos PIL e o efeito da vitamina D sobre estas alterações;
- c) Quantificar o número de megacariócitos no baço dos camundongos PIL;
- d) Avaliar, por imunofluorescência, a expressão de imunoglobulina M (IgM) no baço dos camundongos PIL;
- e) Avaliar, por imunofluorescência, a expressão de imunoglobulina G (IgG) no baço dos camundongos PIL;
- f) Avaliar, por imunofluorescência, a expressão de NF- κ B, receptor envolvido na ativação de células inflamatórias, no baço dos camundongos PIL.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] S. Caielli, Z. Wan, V. Pascual, Systemic Lupus Erythematosus Pathogenesis: Interferon and Beyond, *Annu. Rev. Immunol.* 41 (2023) 533–560.
<https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-101921-042422>.
- [2] C. Cardelli, D. Zucchi, E. Elefante, V. Signorini, M. Menchini, C. Stagnaro, M. Mosca, C. Tani, Environment and systemic lupus erythematosus, *Clin. Exp. Rheumatol.* 42 (2024) 1104–1114. <https://doi.org/10.55563/clinexprheumatol/17vmqc>.
- [3] J. Tian, D. Zhang, X. Yao, Y. Huang, Q. Lu, Global epidemiology of systemic lupus erythematosus: a comprehensive systematic analysis and modelling study, *Ann. Rheum. Dis.* 82 (2023) 351–356. <https://doi.org/10.1136/ard-2022-223035>.
- [4] M. Petri, Musculoskeletal complications of systemic lupus erythematosus in the Hopkins lupus cohort: An update, *Arthritis Rheum.* 8 (1995) 137–145.
<https://doi.org/10.1002/art.1790080305>.
- [5] J.M. Grossman, Lupus arthritis, *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* 23 (2009) 495–506.
<https://doi.org/10.1016/j.berh.2009.04.003>.
- [6] A. Fava, M. Petri, Systemic lupus erythematosus: Diagnosis and clinical management., *J. Autoimmun.* 96 (2019) 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2018.11.001>.
- [7] A. Klein, Y. Molad, Hematological Manifestations among Patients with Rheumatic Diseases., *Acta Haematol.* 144 (2021) 403–412. <https://doi.org/10.1159/000511759>.
- [8] C.H. Siegel, L.R. Sammaritano, Systemic Lupus Erythematosus: A Review., *JAMA.* 331 (2024) 1480–1491. <https://doi.org/10.1001/jama.2024.2315>.
- [9] R.E. Mebius, G. Kraal, Structure and function of the spleen, *Nat. Rev. Immunol.* 5 (2005) 606–16. <https://doi.org/10.1038/nri1669>.
- [10] H. Kitamura, H. Kitamura, T. Ito, M. Kanisawa, K. Kato, Systemic lupus erythematosus with multiple calcified fibrous nodules of the spleen., *Acta Pathol. Jpn.* 35 (1985) 213–26. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1827.1985.tb02220.x>.
- [11] A. Tolaymat, F. Al-Mousily, A.B. Haafiz, N. Lammert, S. Afshari, Spontaneous rupture of the spleen in a patient with systemic lupus erythematosus., *J. Rheumatol.* 22 (1995) 2344–5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8835573>.
- [12] F.B. Karassa, D.A. Isenberg, Spontaneous rupture of the spleen: an unusual complication of systemic lupus erythematosus., *Lupus.* 10 (2001) 876–8.

- <https://doi.org/10.1191/096120301701548535>.
- [13] A.T. Tieng, C.A. Sadow, J.G. Hochsztein, C. Putterman, Diffuse calcifications of the spleen: a novel association with systemic lupus erythematosus., *Semin. Arthritis Rheum.* 41 (2011) 187–93. <https://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2010.10.003>.
- [14] J. Han, N. Li, J. Wang, J. Zhou, J. Zhang, Life-threatening spontaneous splenic rupture with systemic lupus erythematosus: case report and literature review., *Clin. Rheumatol.* 31 (2012) 1019–25. <https://doi.org/10.1007/s10067-011-1934-8>.
- [15] N. Li, J.C. Wang, M.H. Zhu, J.Y. Wang, X.L. Fu, J.R. Zhou, S.G. Zheng, J. Han, P. Chan, Pathologic diagnosis of spontaneous splenic rupture in systemic lupus erythematosus., *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 6 (2013) 273–80. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23330013>.
- [16] A.G. Vaiopoulos, M.A. Kanakis, K. Katsouri, S. Kyriazi, G.A. Vaiopoulos, P. Kaklamanis, Diffuse Calcifications of the Spleen in a Woman with Systemic Lupus Erythematosus., *Case Rep. Med.* 2015 (2015) 414102. <https://doi.org/10.1155/2015/414102>.
- [17] F.E. Elzein, S. Elzein, R. Albalawi, Splenic calcification in systemic lupus erythematosus., *BMJ Case Rep.* 2017 (2017). <https://doi.org/10.1136/bcr-2017-222206>.
- [18] W.H. Reeves, P.Y. Lee, J.S. Weinstein, M. Satoh, L. Lu, Induction of autoimmunity by pristane and other naturally occurring hydrocarbons, *Trends Immunol.* 30 (2009) 455–64. <https://doi.org/10.1016/j.it.2009.06.003>.
- [19] E.C. Freitas, M.S. de Oliveira, O.A. Monticielo, Pristane-induced lupus: considerations on this experimental model, *Clin. Rheumatol.* 36 (2017) 2403–2414. <https://doi.org/10.1007/s10067-017-3811-6>.
- [20] T.E. Karnopp, G.F. Chapacais, E.C. Freitas, O.A. Monticielo, Lupus animal models and neuropsychiatric implications, *Clin. Rheumatol.* (2020). <https://doi.org/10.1007/s10067-020-05493-7>.
- [21] M.F. Holick, Vitamin D deficiency, *N. Engl. J. Med.* 357 (2007) 266–81. <https://doi.org/10.1056/NEJMra070553>.
- [22] M.A. Zmijewski, Vitamin D and human health, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019). <https://doi.org/10.3390/ijms20010145>.
- [23] N. Charoenngam, A. Shirvani, M.F. Holick, Vitamin D for skeletal and non-skeletal health: What we should know, *J. Clin. Orthop. Trauma.* 10 (2019) 1082–1093.

- <https://doi.org/10.1016/j.jcot.2019.07.004>.
- [24] N. Charoenngam, M.F. Holick, Immunologic Effects of Vitamin D on Human Health and Disease, *Nutrients*. 12 (2020). <https://doi.org/10.3390/nu12072097>.
- [25] L. Athanassiou, I. Kostoglou-Athanassiou, M. Koutsilieris, Y. Shoenfeld, Vitamin D and Autoimmune Rheumatic Diseases, *Biomolecules*. 13 (2023) 1–20. <https://doi.org/10.3390/biom13040709>.
- [26] A. Arshad, S.B.Z. Mahmood, A. Ayaz, A. Al Karim Manji, A.K. Ahuja, Association of vitamin D deficiency and disease activity in systemic lupus erythematosus patients: Two-year follow-up study., *Arch. Rheumatol.* 36 (2021) 101–106. <https://doi.org/10.46497/ArchRheumatol.2021.8178>.
- [27] M. Correa-Rodríguez, G. Pocovi-Gerardino, J.-L. Callejas-Rubio, R. Ríos-Fernández, M. Martín-Amada, M.-G. Cruz-Caparrós, S. DelOlmo-Romero, N. Ortego-Centeno, B. Rueda-Medina, Vitamin D Levels are Associated with Disease Activity and Damage Accrual in Systemic Lupus Erythematosus Patients., *Biol. Res. Nurs.* 23 (2021) 455–463. <https://doi.org/10.1177/1099800420983596>.
- [28] S.M. Attar, A.M. Siddiqui, Vitamin D deficiency in patients with systemic lupus erythematosus, *Oman Med. J.* 28 (2013) 42–47. <https://doi.org/10.5001/omj.2013.10>.
- [29] Y. Schoindre, M. Jallouli, M.-L. Tanguy, P. Ghillani, L. Galicier, O. Aumaître, C. Francès, V. Le Guern, F. Lioté, A. Smail, N. Limal, L. Perard, H. Desmurs-Clavel, D. Le Thi Huong, B. Asli, J.-E. Kahn, L. Sailler, F. Ackermann, T. Papo, K. Sacré, O. Fain, J. Stirnemann, P. Cacoub, G. Leroux, J. Cohen-Bittan, J.-S. Hulot, P. Lechat, L. Musset, J.-C. Piette, Z. Amoura, J.-C. Souberbielle, N. Costedoat-Chalumeau, Lower vitamin D levels are associated with higher systemic lupus erythematosus activity, but not predictive of disease flare-up., *Lupus Sci. Med.* 1 (2014) e000027. <https://doi.org/10.1136/lupus-2014-000027>.
- [30] M. Haroon, O. Fitzgerald, Vitamin D and its emerging role in immunopathology, *Clin. Rheumatol.* 31 (2012) 199–202. <https://doi.org/10.1007/s10067-011-1880-5>.
- [31] S.A. Irfan, A.A. Ali, N. Shabbir, H. Altaf, A. Ahmed, J. Thamara Kunnath, N.V.L. Divya Boorle, A.K. Miguel, C.C. Loh, N. Gandrakota, M.M. Ali Baig, Effects of Vitamin D on Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity and Autoimmunity: A Systematic Review and Meta-Analysis., *Cureus*. 14 (2022) e25896. <https://doi.org/10.7759/cureus.25896>.

- [32] J. Huang, Q. An, B.-M. Ju, J. Zhang, P. Fan, L. He, L. Wang, Role of vitamin D/VDR nuclear translocation in down-regulation of NF- κ B/NLRP3/caspase-1 axis in lupus nephritis., *Int. Immunopharmacol.* 100 (2021) 108131.
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.108131>.
- [33] A. Hoi, T. Igel, C.C. Mok, L. Arnaud, Systemic lupus erythematosus, *Lancet.* 403 (2024) 2326–2338. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(24\)00398-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(24)00398-2).
- [34] G.C. Tsokos, The immunology of systemic lupus erythematosus, *Nat. Immunol.* 25 (2024) 1332–1343. <https://doi.org/10.1038/s41590-024-01898-7>.
- [35] M.J. Pereira Vilar, E.I. Sato, Estimating the incidence of systemic lupus erythematosus in a tropical region (Natal, Brazil), *Lupus.* 11 (2002) 528–532.
<https://doi.org/10.1191/0961203302lu244xx>.
- [36] E.R. Senna, A.L.P. De Barros, E.O. Silva, I.F. Costa, L.V.B. Pereira, R.M. Ciconelli, M.B. Ferraz, Prevalence of rheumatic diseases in Brazil: a study using the COPCORD approach., *J. Rheumatol.* 31 (2004) 594–7.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14994410>.
- [37] C.A.K. Nakashima, A.P. Galhardo, J.F.M. da Silva, G.R. Fiorenzano, A.B. da S. Dos Santos, M.F.S. Leite, M.A. Nogueira, P.V. da S. Menolli, R.A. Menolli, Incidence and clinical-laboratory aspects of systemic lupus erythematosus in a Southern brazilian city., *Rev. Bras. Reumatol.* 51 (2011) 231–9.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21625811>.
- [38] N.P. Marques, N.C.T. Marques, E.H.G. de Lucena, D.R.B. Martelli, E.A. Oliveira, H. Martelli-Junior, The continuous increase in the number of systemic lupus erythematosus cases in Brazil in the COVID-19 era, *Braz. Oral Res.* 37 (2023).
<https://doi.org/10.1590/1807-3107bor-2023.vol37.0066>.
- [39] G. Stojan, M. Petri, Epidemiology of systemic lupus erythematosus: an update, *Curr. Opin. Rheumatol.* 30 (2018) 144–150.
<https://doi.org/10.1097/BOR.0000000000000480>.
- [40] M. Kiriakidou, C.L. Ching, Systemic Lupus Erythematosus, *Ann. Intern. Med.* 172 (2020) ITC81–ITC96. <https://doi.org/10.7326/AITC202006020>.
- [41] G.S. Alarcon, G. McGwin, M. Petri, J.D. Reveille, R. Ramsey-Goldman, R.P. Kimberly, Baseline characteristics of a multiethnic lupus cohort: PROFILE, *Lupus.* 11 (2002) 95–101. <https://doi.org/10.1191/0961203302lu155oa>.

- [42] B.A. Pons-Estel, L.J. Catoggio, M.H. Cardiel, E.R. Soriano, S. Gentiletti, A.R. Villa, I. Abadi, F. Caeiro, A. Alvarellos, D. Alarcón-Segovia, The GLADEL Multinational Latin American Prospective Inception Cohort of 1,214 Patients With Systemic Lupus Erythematosus, *Medicine (Baltimore)*. 83 (2004) 1–17.
<https://doi.org/10.1097/01.md.0000104742.42401.e2>.
- [43] M.J. Lewis, A.S. Jawad, The effect of ethnicity and genetic ancestry on the epidemiology, clinical features and outcome of systemic lupus erythematosus, *Rheumatology*. (2016). <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kew399>.
- [44] Y.-C. Kwon, S. Chun, K. Kim, A. Mak, Update on the Genetics of Systemic Lupus Erythematosus: Genome-Wide Association Studies and Beyond, *Cells*. 8 (2019).
<https://doi.org/10.3390/cells8101180>.
- [45] J.S. Knight, M.J. Kaplan, Lupus neutrophils: “NET” gain in understanding lupus pathogenesis, *Curr. Opin. Rheumatol.* 24 (2012) 441–450.
<https://doi.org/10.1097/BOR.0b013e3283546703>.
- [46] I. Almaghlouth, S.R. Johnson, E. Pullenayegum, D. Gladman, M. Urowitz, Immunoglobulin levels in systemic lupus erythematosus: A narrative review, *Lupus*. 30 (2021) 867–875. <https://doi.org/10.1177/09612033211004714>.
- [47] A.H. Draborg, M.C. Lydolph, M. Westergaard, S. Olesen Larsen, C.T. Nielsen, K. Duus, S. Jacobsen, G. Houen, Elevated Concentrations of Serum Immunoglobulin Free Light Chains in Systemic Lupus Erythematosus Patients in Relation to Disease Activity, Inflammatory Status, B Cell Activity and Epstein-Barr Virus Antibodies, *PLoS One*. 10 (2015) e0138753. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138753>.
- [48] P.F.K. Yong, L. Aslam, M.Y. Karim, M.A. Khamashta, Management of hypogammaglobulinaemia occurring in patients with systemic lupus erythematosus, *Rheumatology*. 47 (2008) 1400–1405. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/ken255>.
- [49] V. Reddy, L. Martinez, D.A. Isenberg, M.J. Leandro, G. Cambridge, Pragmatic Treatment of Patients With Systemic Lupus Erythematosus With Rituximab: Long-Term Effects on Serum Immunoglobulins, *Arthritis Care Res. (Hoboken)*. 69 (2017) 857–866. <https://doi.org/10.1002/acr.22993>.
- [50] D.S. Pisetsky, Evolving story of autoantibodies in systemic lupus erythematosus, *J. Autoimmun.* 110 (2020) 102356. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2019.102356>.
- [51] P.H. Schur, J. Sandson, Immunologic Factors and Clinical Activity in Systemic Lupus

- Erythematosus, *N. Engl. J. Med.* 278 (1968) 533–538.
<https://doi.org/10.1056/NEJM196803072781004>.
- [52] G.A. McCarty, J.R. Rice, M.L. Bembe, D.S. Pisetsky, Independent expression of autoantibodies in systemic lupus erythematosus., *J. Rheumatol.* 9 (1982) 691–5.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6983576>.
- [53] K.A. Kirou, C. Lee, S. George, K. Louca, M.G.E. Peterson, M.K. Crow, Activation of the interferon- α pathway identifies a subgroup of systemic lupus erythematosus patients with distinct serologic features and active disease, *Arthritis Rheum.* 52 (2005) 1491–1503. <https://doi.org/10.1002/art.21031>.
- [54] C.E. Weckerle, B.S. Franek, J.A. Kelly, M. Kumabe, R.A. Mikolaitis, S.L. Green, T.O. Utset, M. Jolly, J.A. James, J.B. Harley, T.B. Niewold, Network analysis of associations between serum interferon- α activity, autoantibodies, and clinical features in systemic lupus erythematosus, *Arthritis Rheum.* 63 (2011) 1044–1053.
<https://doi.org/10.1002/art.30187>.
- [55] X. Huang, S. Dorta-Estremera, Y. Yao, N. Shen, W. Cao, Predominant Role of Plasmacytoid Dendritic Cells in Stimulating Systemic Autoimmunity, *Front. Immunol.* 6 (2015). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00526>.
- [56] Q. Zhang, L. Xiang, M.H. Zaman, W. Dong, G. He, G.-M. Deng, Predominant Role of Immunoglobulin G in the Pathogenesis of Splenomegaly in Murine Lupus, *Front. Immunol.* 10 (2020). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.03020>.
- [57] L. Rönnblom, M.-L. Eloranta, The interferon signature in autoimmune diseases, *Curr. Opin. Rheumatol.* 25 (2013) 248–253.
<https://doi.org/10.1097/BOR.0b013e32835c7e32>.
- [58] M. Postal, J.F. Vivaldo, R. Fernandez-Ruiz, J.L. Paredes, S. Appenzeller, T.B. Niewold, Type I interferon in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus, *Curr. Opin. Immunol.* 67 (2020) 87–94. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2020.10.014>.
- [59] T. Möckel, F. Basta, J. Weinmann-Menke, A. Schwarting, B cell activating factor (BAFF): Structure, functions, autoimmunity and clinical implications in Systemic Lupus Erythematosus (SLE), *Autoimmun. Rev.* 20 (2021) 102736.
<https://doi.org/10.1016/j.autrev.2020.102736>.
- [60] S.L. Coss, D. Zhou, G.T. Chua, R.A. Aziz, R.P. Hoffman, Y.L. Wu, S.P. Ardoin, J.P. Atkinson, C.-Y. Yu, The complement system and human autoimmune diseases, *J.*

- Autoimmun. 137 (2023) 102979. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2022.102979>.
- [61] G.C. Tsokos, Autoimmunity and organ damage in systemic lupus erythematosus., *Nat. Immunol.* 21 (2020) 605–614. <https://doi.org/10.1038/s41590-020-0677-6>.
- [62] F. Ginhoux, J.L. Schultze, P.J. Murray, J. Ochando, S.K. Biswas, New insights into the multidimensional concept of macrophage ontogeny, activation and function, *Nat. Immunol.* 17 (2016) 34–40. <https://doi.org/10.1038/ni.3324>.
- [63] P.J. Murray, Macrophage Polarization, *Annu. Rev. Physiol.* 79 (2017) 541–566. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-022516-034339>.
- [64] P.J. Murray, J.E. Allen, S.K. Biswas, E.A. Fisher, D.W. Gilroy, S. Goerdts, S. Gordon, J.A. Hamilton, L.B. Ivashkiv, T. Lawrence, M. Locati, A. Mantovani, F.O. Martinez, J. Mege, D.M. Mosser, G. Natoli, J.P. Saeij, Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines, *Immunity.* 41 (2014) 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.008>.
- [65] T. Varga, R. Mounier, A. Horvath, S. Cuvellier, F. Dumont, S. Poliska, H. Ardjoune, G. Juban, L. Nagy, B. Chazaud, Highly Dynamic Transcriptional Signature of Distinct Macrophage Subsets during Sterile Inflammation, Resolution, and Tissue Repair, *J. Immunol.* 196 (2016) 4771–4782. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1502490>.
- [66] C.K. Glass, G. Natoli, Molecular control of activation and priming in macrophages, *Nat. Immunol.* 17 (2016) 26–33. <https://doi.org/10.1038/ni.3306>.
- [67] T. Krausgruber, K. Blazek, T. Smallie, S. Alzabin, H. Lockstone, N. Sahgal, T. Hussell, M. Feldmann, I.A. Udalova, IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses, *Nat. Immunol.* 12 (2011) 231–238. <https://doi.org/10.1038/ni.1990>.
- [68] R. Rutschman, R. Lang, M. Hesse, J.N. Ihle, T.A. Wynn, P.J. Murray, Cutting Edge: Stat6-Dependent Substrate Depletion Regulates Nitric Oxide Production, *J. Immunol.* 166 (2001) 2173–2177. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.4.2173>.
- [69] T. Satoh, O. Takeuchi, A. Vandenbon, K. Yasuda, Y. Tanaka, Y. Kumagai, T. Miyake, K. Matsushita, T. Okazaki, T. Saitoh, K. Honma, T. Matsuyama, K. Yui, T. Tsujimura, D.M. Standley, K. Nakanishi, K. Nakai, S. Akira, The Jmjd3-Irf4 axis regulates M2 macrophage polarization and host responses against helminth infection, *Nat. Immunol.* 11 (2010) 936–944. <https://doi.org/10.1038/ni.1920>.
- [70] A. Chawla, Control of Macrophage Activation and Function by PPARs, *Circ. Res.* 106

- (2010) 1559–1569. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.216523>.
- [71] M.D. Park, A. Silvin, F. Ginhoux, M. Merad, Macrophages in health and disease, *Cell*. 185 (2022) 4259–4279. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.10.007>.
- [72] M.M. Ahamada, Y. Jia, X. Wu, Macrophage Polarization and Plasticity in Systemic Lupus Erythematosus, *Front. Immunol.* 12 (2021). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.734008>.
- [73] J. Orme, C. Mohan, Macrophage subpopulations in systemic lupus erythematosus., *Discov. Med.* 13 (2012) 151–8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22369974>.
- [74] G. Olmes, M. Büttner-Herold, F. Ferrazzi, L. Distel, K. Amann, C. Daniel, CD163+ M2c-like macrophages predominate in renal biopsies from patients with lupus nephritis, *Arthritis Res. Ther.* 18 (2016) 90. <https://doi.org/10.1186/s13075-016-0989-y>.
- [75] G.A. Robinson, M.G.L. Wilkinson, C. Wincup, The Role of Immunometabolism in the Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus, *Front. Immunol.* 12 (2022). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.806560>.
- [76] A. Cerutti, M. Cols, I. Puga, Marginal zone B cells: virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes., *Nat. Rev. Immunol.* 13 (2013) 118–32. <https://doi.org/10.1038/nri3383>.
- [77] S.M. Lewis, A. Williams, S.C. Eisenbarth, Structure and function of the immune system in the spleen., *Sci. Immunol.* 4 (2019). <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aau6085>.
- [78] D. Fishman, D.A. Isenberg, Splenic involvement in rheumatic diseases, *Semin. Arthritis Rheum.* 27 (1997) 141–155. [https://doi.org/10.1016/S0049-0172\(97\)80013-3](https://doi.org/10.1016/S0049-0172(97)80013-3).
- [79] S.H. Nam, H. Park, S.M. Ahn, J.S. Oh, Y. Kim, C. Lee, B. Yoo, S. Hong, Clinical features of systemic lupus erythematosus patients with splenomegaly: focussed on the cytopenias, *Intern. Med. J.* 53 (2023) 2341–2345. <https://doi.org/10.1111/imj.16290>.
- [80] I. Carrión-Barberà, T.C. Salman-Monte, F. Vélchez-Oya, J. Monfort, Neuropsychiatric involvement in systemic lupus erythematosus: A review., *Autoimmun. Rev.* 20 (2021) 102780. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2021.102780>.
- [81] M. Aringer, K. Costenbader, D. Daikh, R. Brinks, M. Mosca, R. Ramsey-Goldman, J.S. Smolen, D. Wofsy, D.T. Boumpas, D.L. Kamen, D. Jayne, R. Cervera, N. Costedoat-Chalumeau, B. Diamond, D.D. Gladman, B. Hahn, F. Hiepe, S. Jacobsen, D.

- Khanna, K. Lerstrøm, E. Massarotti, J. McCune, G. Ruiz-Irastorza, J. Sanchez-Guerrero, M. Schneider, M. Urowitz, G. Bertsias, B.F. Hoyer, N. Leuchten, C. Tani, S.K. Tedeschi, Z. Touma, G. Schmajuk, B. Anic, F. Assan, T.M. Chan, A.E. Clarke, M.K. Crow, L. Czirják, A. Doria, W. Graninger, B. Halda-Kiss, S. Hasni, P.M. Izmirlly, M. Jung, G. Kumánovics, X. Mariette, I. Padjen, J.M. Pego-Reigosa, J. Romero-Diaz, Í. Rúa-Figueroa Fernández, R. Seror, G.H. Stummvoll, Y. Tanaka, M.G. Tektonidou, C. Vasconcelos, E.M. Vital, D.J. Wallace, S. Yavuz, P.L. Meroni, M.J. Fritzler, R. Naden, T. Dörner, S.R. Johnson, 2019 European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology Classification Criteria for Systemic Lupus Erythematosus, *Arthritis Rheumatol.* 71 (2019) 1400–1412.
<https://doi.org/10.1002/art.40930>.
- [82] T. Dörner, R. Furie, Novel paradigms in systemic lupus erythematosus, *Lancet.* 393 (2019) 2344–2358. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)30546-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)30546-X).
- [83] A. Fanouriakis, M. Kostopoulou, A. Alunno, M. Aringer, I. Bajema, J.N. Boletis, R. Cervera, A. Doria, C. Gordon, M. Govoni, F. Houssiau, D. Jayne, M. Kouloumas, A. Kuhn, J.L. Larsen, K. Lerstrøm, G. Moroni, M. Mosca, M. Schneider, J.S. Smolen, E. Svenungsson, V. Tesar, A. Tincani, A. Troldborg, R. van Vollenhoven, J. Wenzel, G. Bertsias, D.T. Boumpas, 2019 update of the EULAR recommendations for the management of systemic lupus erythematosus, *Ann. Rheum. Dis.* 78 (2019) 736–745.
<https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2019-215089>.
- [84] D. Accapezzato, R. Caccavale, M.P. Paroli, C. Gioia, B.L. Nguyen, L. Spadea, M. Paroli, Advances in the Pathogenesis and Treatment of Systemic Lupus Erythematosus, *Int. J. Mol. Sci.* 24 (2023). <https://doi.org/10.3390/ijms24076578>.
- [85] S.N. Liossis, C. Staveri, What’s New in the Treatment of Systemic Lupus Erythematosus, *Front. Med.* 8 (2021) 655100.
<https://doi.org/10.3389/fmed.2021.655100>.
- [86] A. Mackensen, F. Müller, D. Mougiakakos, S. Böltz, A. Wilhelm, M. Aigner, S. Völkl, D. Simon, A. Kleyer, L. Munoz, S. Kretschmann, S. Kharboutli, R. Gary, H. Reimann, W. Rösler, S. Uderhardt, H. Bang, M. Herrmann, A.B. Ekici, C. Buettner, K.M. Habenicht, T.H. Winkler, G. Krönke, G. Schett, Anti-CD19 CAR T cell therapy for refractory systemic lupus erythematosus, *Nat. Med.* 28 (2022) 2124–2132.
<https://doi.org/10.1038/s41591-022-02017-5>.

- [87] F. Basta, F. Fasola, K. Triantafyllias, A. Schwarting, Systemic Lupus Erythematosus (SLE) Therapy: The Old and the New, *Rheumatol. Ther.* 7 (2020) 433–446. <https://doi.org/10.1007/s40744-020-00212-9>.
- [88] R. Lu, X.M. Luo, The role of gut microbiota in different murine models of systemic lupus erythematosus, *Autoimmunity*. 57 (2024). <https://doi.org/10.1080/08916934.2024.2378876>.
- [89] W. Li, A.A. Titov, L. Morel, An update on lupus animal models, *Curr. Opin. Rheumatol.* 29 (2017) 434–441. <https://doi.org/10.1097/BOR.0000000000000412>.
- [90] D.L. Smith, X. Dong, S. Du, M. Oh, R.R. Singh, R.R. Voskuhl, A female preponderance for chemically induced lupus in SJL/J mice, *Clin. Immunol.* 122 (2007) 101–7. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2006.09.009>.
- [91] N. Pannu, A. Bhatnagar, Oxidative stress and immune complexes: Pathogenic mechanisms in pristane induced murine model of lupus, *Immunobiology*. 225 (2020) 151871. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2019.11.006>.
- [92] P.Y. Lee, J.S. Weinstein, D.C. Nacionales, P.O. Scumpia, Y. Li, E. Butfiloski, N. van Rooijen, L. Moldawer, M. Satoh, W.H. Reeves, A novel type I IFN-producing cell subset in murine lupus, *J. Immunol.* 180 (2008) 5101–8. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.7.5101>.
- [93] Z. Zhou, J. Ma, C. Xiao, X. Han, R. Qiu, Y. Wang, Y. Zhou, L. Wu, X. Huang, N. Shen, Phenotypic and functional alterations of pDCs in lupus-prone mice, *Sci. Rep.* 6 (2016) 20373. <https://doi.org/10.1038/srep20373>.
- [94] R. Allam, S.G. Sayyed, O.P. Kulkarni, J. Lichtnekert, H.-J. Anders, Mdm2 promotes systemic lupus erythematosus and lupus nephritis, *J. Am. Soc. Nephrol. JASN.* 22 (2011) 2016–27. <https://doi.org/10.1681/ASN.2011010045>.
- [95] Y. Haupt, R. Maya, A. Kazaz, M. Oren, Mdm2 promotes the rapid degradation of p53, *Nature*. 387 (1997) 296–9. <https://doi.org/10.1038/387296a0>.
- [96] T.V. Peixoto, S. Carrasco, D.A.C. Botte, S. Catanozi, E.R. Parra, T.M. Lima, N. Ugriumov, F.G. Soriano, S.B.V. de Mello, C.M. Rodrigues, C. Goldenstein-Schainberg, CD4+CD69+ T cells and CD4+CD25+FoxP3+ Treg cells imbalance in peripheral blood, spleen and peritoneal lavage from pristane-induced systemic lupus erythematosus (SLE) mice., *Adv. Rheumatol.* 59 (2019) 30. <https://doi.org/10.1186/s42358-019-0072-x>.

- [97] D. Han, C. Jiang, H. Xu, R. Chu, R. Zhang, R. Fang, H. Ge, M. Lu, M. Wang, Y. Tai, S. Yan, W. Wei, Q. Wang, Inhibition of GRK2 ameliorates the pristane-induced mouse SLE model by suppressing plasma cells differentiation, *Int. Immunopharmacol.* 138 (2024) 112557. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2024.112557>.
- [98] E. Correa Freitas, T. Evelyn Karnopp, J.M. de Souza Silva, R. Cavalheiro do Espírito Santo, T.H. da Rosa, M.S. de Oliveira, F. da Costa Gonçalves, F.H. de Oliveira, P. Guilherme Schaefer, O. André Monticielo, Vitamin D supplementation ameliorates arthritis but does not alleviates renal injury in pristane-induced lupus model., *Autoimmunity.* 52 (2019) 69–77. <https://doi.org/10.1080/08916934.2019.1613383>.
- [99] W.-D. Xu, L.-C. Su, L. Fu, Y.-Y. Lan, X.-Y. Liu, Q. Huang, Q. Wu, J. Zhou, A.-F. Huang, IL-38, a potential therapeutic agent for lupus, inhibits lupus progression, *Inflamm. Res.* 71 (2022) 963–975. <https://doi.org/10.1007/s00011-022-01581-3>.
- [100] D.-C. Wang, W.-D. Xu, Y.-Y. Tang, C. Yang, R. Li, G.-C. Wu, A.-F. Huang, Neuropeptide Y, a potential marker for lupus, promotes lupus development, *Int. Immunopharmacol.* 126 (2024) 111272. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2023.111272>.
- [101] P. Cunin, P.A. Nigrovic, Megakaryocytes as immune cells, *J. Leukoc. Biol.* 105 (2019) 1111–1121. <https://doi.org/10.1002/JLB.MR0718-261RR>.
- [102] G. Couldwell, K.R. Machlus, Modulation of megakaryopoiesis and platelet production during inflammation, *Thromb. Res.* 179 (2019) 114–120. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2019.05.008>.
- [103] R. Shiraki, N. Inoue, S. Kawasaki, A. Takei, M. Kadotani, Y. Ohnishi, J. Ejiri, S. Kobayashi, K. Hirata, S. Kawashima, M. Yokoyama, Expression of Toll-like receptors on human platelets, *Thromb. Res.* 113 (2004) 379–385. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2004.03.023>.
- [104] G. Andonegui, S.M. Kerfoot, K. McNagny, K.V.J. Ebbert, K.D. Patel, P. Kubes, Platelets express functional Toll-like receptor-4, *Blood.* 106 (2005) 2417–2423. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-03-0916>.
- [105] L.M. Beaulieu, E. Lin, K.M. Morin, K. Tanriverdi, J.E. Freedman, Regulatory effects of TLR2 on megakaryocytic cell function, *Blood.* 117 (2011) 5963–5974. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-09-304949>.
- [106] L.P. D’Atri, J. Etulain, L. Rivadeneyra, M.J. Lapponi, M. Centurion, K. Cheng, H. Yin, M. Schattner, Expression and functionality of Toll-like receptor 3 in the

- megakaryocytic lineage, *J. Thromb. Haemost.* 13 (2015) 839–850.
<https://doi.org/10.1111/jth.12842>.
- [107] B. Markovic, Z. Wu, C.N. Chesterman, B.H. Chong, Quantitation of soluble and membrane-bound FC7RIIA (CD32A) mRNA in platelets and megakaryoblastic cell line (Meg-01), *Br. J. Haematol.* 91 (1995) 37–42. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1995.tb05241.x>.
- [108] A. Zufferey, E.R. Speck, K.R. Machlus, R. Aslam, L. Guo, M.J. McVey, M. Kim, R. Kapur, E. Boilard, J.E. Italiano, J.W. Semple, Mature murine megakaryocytes present antigen-MHC class I molecules to T cells and transfer them to platelets, *Blood Adv.* 1 (2017) 1773–1785. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2017007021>.
- [109] E. Lefrançois, G. Ortiz-Muñoz, A. Caudrillier, B. Mallavia, F. Liu, D.M. Sayah, E.E. Thornton, M.B. Headley, T. David, S.R. Coughlin, M.F. Krummel, A.D. Leavitt, E. Passegué, M.R. Looney, The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors, *Nature.* 544 (2017) 105–109.
<https://doi.org/10.1038/nature21706>.
- [110] B. Sandrock, K.M. Hudson, D.E. Williams, M.A. Lieberman, Cytokine production by a megakaryocytic cell line, *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Anim.* 32 (1996) 225–233.
<https://doi.org/10.1007/BF02722950>.
- [111] L.M. Beaulieu, E. Lin, E. Mick, M. Koupenova, E.O. Weinberg, C.D. Kramer, C.A. Genco, K. Tanriverdi, M.G. Larson, E.J. Benjamin, J.E. Freedman, Interleukin 1 Receptor 1 and Interleukin 1 β Regulate Megakaryocyte Maturation, Platelet Activation, and Transcript Profile During Inflammation in Mice and Humans, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 34 (2014) 552–564.
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.113.302700>.
- [112] R. Flaumenhaft, J.R. Dilks, J. Richardson, E. Alden, S.R. Patel-Hett, E. Battinelli, G.L. Klement, M. Sola-Visner, J.E. Italiano, Megakaryocyte-derived microparticles: direct visualization and distinction from platelet-derived microparticles, *Blood.* 113 (2009) 1112–1121. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-06-163832>.
- [113] J.E. Italiano, A.T. Mairuhu, R. Flaumenhaft, Clinical relevance of microparticles from platelets and megakaryocytes, *Curr. Opin. Hematol.* 17 (2010) 578–584.
<https://doi.org/10.1097/MOH.0b013e32833e77ee>.
- [114] A. Finkielsztejn, A.C. Schlinker, L. Zhang, W.M. Miller, S.K. Datta, Human

- megakaryocyte progenitors derived from hematopoietic stem cells of normal individuals are MHC class II-expressing professional APC that enhance Th17 and Th1/Th17 responses, *Immunol. Lett.* 163 (2015) 84–95.
<https://doi.org/10.1016/j.imlet.2014.11.013>.
- [115] S. Christakos, P. Dhawan, A. Verstuyf, L. Verlinden, G. Carmeliet, Vitamin D: Metabolism, molecular mechanism of action, and pleiotropic effects, *Physiol. Rev.* 96 (2015) 365–408. <https://doi.org/10.1152/physrev.00014.2015>.
- [116] S. Kato, The function of vitamin D receptor in vitamin D action, *J. Biochem.* 127 (2000) 717–22. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a022662>.
- [117] T. Ao, J. Kikuta, M. Ishii, The Effects of Vitamin D on Immune System and Inflammatory Diseases., *Biomolecules.* 11 (2021).
<https://doi.org/10.3390/biom11111624>.
- [118] B. Prietl, G. Treiber, T.R. Pieber, K. Amrein, Vitamin D and immune function., *Nutrients.* 5 (2013) 2502–21. <https://doi.org/10.3390/nu5072502>.
- [119] C. Aranow, Vitamin D and the immune system, *J. Investig. Med.* 59 (2011) 881–6.
<https://doi.org/10.2310/JIM.0b013e31821b8755>.
- [120] J.S. Adams, S. Ren, P.T. Liu, R.F. Chun, V. Lagishetty, A.F. Gombart, N. Borregaard, R.L. Modlin, M. Hewison, Vitamin d-directed rheostatic regulation of monocyte antibacterial responses., *J. Immunol.* 182 (2009) 4289–95.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803736>.
- [121] P.T. Liu, S. Stenger, H. Li, L. Wenzel, B.H. Tan, S.R. Krutzik, M.T. Ochoa, J. Schaubert, K. Wu, C. Meinken, D.L. Kamen, M. Wagner, R. Bals, A. Steinmeyer, U. Zügel, R.L. Gallo, D. Eisenberg, M. Hewison, B.W. Hollis, J.S. Adams, B.R. Bloom, R.L. Modlin, Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response, *Science (80-.)*. 311 (2006) 1770–3.
<https://doi.org/10.1126/science.1123933>.
- [122] S. Chen, G.P. Sims, X.X. Chen, Y.Y. Gu, S. Chen, P.E. Lipsky, Modulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on human B cell differentiation, *J. Immunol.* 179 (2007) 1634–47. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.3.1634>.
- [123] J.M. Lemire, J.S. Adams, R. Sakai, S.C. Jordan, 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 suppresses proliferation and immunoglobulin production by normal human peripheral blood mononuclear cells, *J. Clin. Invest.* 74 (1984) 657–61.

- <https://doi.org/10.1172/JCI111465>.
- [124] K. Geldmeyer-Hilt, G. Heine, B. Hartmann, R. Baumgrass, A. Radbruch, M. Worm, 1,25-dihydroxyvitamin D₃ impairs NF- κ B activation in human naïve B cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 407 (2011) 699–702. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.03.078>.
- [125] Y. Zhang, L. Niu, F. Wang, X. Tang, C. Wang, Y. Zhu, Vitamin D receptor expression in SLE peripheral blood CD4⁺T cells is associated with disease activity and cell apoptosis., *Mod. Rheumatol.* 32 (2022) 577–583. <https://doi.org/10.1093/mr/roab023>.
- [126] W. Dankers, E.M. Colin, J.P. van Hamburg, E. Lubberts, Vitamin D in autoimmunity: Molecular mechanisms and therapeutic potential, *Front. Immunol.* 7 (2017). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00697>.
- [127] Y. Arnson, H. Amital, Y. Shoenfeld, Vitamin D and autoimmunity: New aetiological and therapeutic considerations, *Ann. Rheum. Dis.* 66 (2007) 1137–1142. <https://doi.org/10.1136/ard.2007.069831>.
- [128] O. Monticciolo, J. Brenol, J. Chies, M. Longo, G. Rucatti, R. Scalco, R. Xavier, The role of Bsm I and Fok I vitamin D receptor gene polymorphisms and serum 25-hydroxyvitamin D in Brazilian patients with systemic lupus erythematosus, *Lupus.* 21 (2012) 43–52. <https://doi.org/10.1177/0961203311421798>.
- [129] O.A. Monticciolo, T. de M. Teixeira, J.A.B. Chies, J.C.T. Brenol, R.M. Xavier, Vitamin D and polymorphisms of VDR gene in patients with systemic lupus erythematosus., *Clin. Rheumatol.* 31 (2012) 1411–21. <https://doi.org/10.1007/s10067-012-2021-5>.
- [130] J. Xiong, Z. He, X. Zeng, Y. Zhang, Z. Hu, Association of vitamin D receptor gene polymorphisms with systemic lupus erythematosus: a meta-analysis., *Clin. Exp. Rheumatol.* 32 (2014) 174–181.
- [131] E. Correa Freitas, T. Evelyn Karnopp, J.M. de Souza Silva, R. Cavalheiro do Espírito Santo, T.H. da Rosa, M.S. de Oliveira, F. da Costa Gonçalves, F.H. de Oliveira, P. Guilherme Schaefer, O. André Monticciolo, Vitamin D supplementation ameliorates arthritis but does not alleviates renal injury in pristane-induced lupus model, *Autoimmunity.* 52 (2019) 69–77. <https://doi.org/10.1080/08916934.2019.1613383>.
- [132] T.E. Karnopp, E.C. Freitas, A. Rieger, G.F. Chapacais, O.A. Monticciolo, Higher IgG level correlated with vitamin D receptor in the hippocampus of a pristane-induced lupus model, *Clin. Rheumatol.* (2022). <https://doi.org/10.1007/s10067-022-06094-2>.

- [133] M. Dos Santos, J.M. de Souza Silva, B.J. Bartikoski, E.C. Freitas, A. Busatto, R.C. do Espírito Santo, O.A. Monticielo, R.M. Xavier, Vitamin D supplementation modulates autophagy in the pristane-induced lupus model., *Adv. Rheumatol.* (London, England). 62 (2022) 27. <https://doi.org/10.1186/s42358-022-00261-4>.
- [134] T.E. Karnopp, G.F. Chapacais, M.L. Gasparini, N.G. dos Santos, V. da Silva Freitas, M. Piccoli, A.L. Di Domenico, L.D. Doria, N.M.P. de Souza, A. Rieger, E.C. Freitas, F. Visioli, O.A. Monticielo, The role of vitamin D: a promising pathway to combat neuropsychiatric lupus disorders, *Clin. Exp. Immunol.* (2024). <https://doi.org/10.1093/cei/uxae099>.

7 ARTIGO CIENTÍFICO

O artigo original apresentado a seguir foi escrito sob as normas de publicação do periódico científico *Immunologic Research* (Fator de Impacto 3,3 e Qualis CAPES B1), da editora *Springer Nature*. No anexo A se encontram os *checklist* dos *guidelines ARRIVE* para pesquisas com animais.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho, buscamos responder questões que contribuíssem para melhor caracterização do acometimento esplênico no modelo de lúpus induzido por pristano, como: quais alterações histopatológicas estão presentes e quais moléculas inflamatórias estão expressas no tecido? Além disso, objetivamos compreender se a suplementação de vitamina D poderia apresentar algum efeito modulador sobre essas manifestações.

Observamos que os animais que receberam a injeção com óleo de pristano desenvolveram, após 180 dias de experimentação, esplenomegalia, medida através do cálculo da proporção do peso do baço sobre o peso do animal na eutanásia. Entretanto, esse fenômeno se manteve nos animais que receberam suplementação de vitamina D subcutânea a cada dois dias. O mesmo se observou nas alterações histopatológicas observadas, quais sejam, presença de células espumosas vacuolizadas, desorganização das polpas e expansão da cápsula fibrosa, que não foram alteradas com a suplementação.

Dentre as observações histopatológicas no tecido esplênico dos camundongos PIL, a que mais nos chamou atenção foi o aumento na contagem de megacariócitos, indicando que o baço pode estar participando de um processo de compensação de hematopoiese extramedular devido à inflamação sistêmica causada pela doença. Acreditamos que este achado merece estudos mais aprofundados no modelo, apresentando potencial para melhor compreensão dos processos hematológicos e imunológicos da doença.

Por fim, não observamos alterações estatisticamente significativas na expressão das moléculas envolvidas na inflamação IgM, IgG e NF- κ B. O significado deste resultado pode ser tanto que o modelo não contribui para maior produção dessas moléculas no baço suficientemente para se detectar um aumento na sua expressão ou que os métodos empregados não são os mais sensíveis, exigindo maior aprofundamento nesta problemática.

Em resumo, o modelo PIL apresenta alterações esplênicas condizentes com o processo inflamatório sistêmico causado pela indução com pristano. Ademais, neste estudo não foram observados efeitos moduladores da vitamina D sobre as manifestações esplênicas no modelo PIL. Deste modo, reconhecemos que mais estudos são necessários para melhor elucidar as questões aqui apresentadas.

9 PERSPECTIVAS FUTURAS

A caracterização de um tecido em um modelo de doença requer múltiplas análises moleculares, celulares e histológicas. Deste modo, este trabalho não esgota todas as possibilidades de investigação do tecido esplênico no modelo de lúpus induzido por pristano (PIL).

Assim sendo, temos como perspectivas futuras a análise da expressão de marcadores celulares, principalmente de macrófagos M1 e M2, como CD163 e CD86, respectivamente. Essa análise será importante para complementar os achados histológicos descritos anteriormente, investigando se há mudança de perfil celular com a indução do modelo e se a ativação destas células é alterada com a suplementação de vitamina D. Assim como as células dendríticas, macrófagos são muito importantes na fisiopatogenia do lúpus.

Também temos a intenção de investigar a expressão de outras moléculas pró-inflamatórias, como as citocinas IL-6 e TNF- α , no tecido esplênico. Isso permitirá melhor compreender quais vias inflamatórias são ativadas no baço em modelo PIL.

Finalmente, será importante transpor as mesmas análises já realizadas para amostras retiradas em outros tempos de experimentação, como após 90 dias da indução com pristano. O motivo para isso é procurar compreender melhor como se dá a evolução do envolvimento esplênico no modelo PIL ao longo do tempo e se as mesmas observações identificadas na doença estabelecida já estão presentes em estágios iniciais.

ANEXO A – CHECKLIST (ARRIVE GUIDELINES 2.0)


 The ARRIVE guidelines 2.0: author checklist

The ARRIVE Essential 10

These items are the basic minimum to include in a manuscript. Without this information, readers and reviewers cannot assess the reliability of the findings.

Item	Recommendation	Section/line number, or reason for not reporting
Study design	For each experiment, provide brief details of study design including: <ol style="list-style-type: none"> The groups being compared, including control groups. If no control group has been used, the rationale should be stated. The experimental unit (e.g. a single animal, litter, or cage of animals). 	Materials and methods/Animals (page 53)
Sample size	<ol style="list-style-type: none"> Specify the exact number of experimental units allocated to each group, and the total number in each experiment. Also indicate the total number of animals used. Explain how the sample size was decided. Provide details of any <i>a priori</i> sample size calculation, if done. 	Materials and methods/Animals (page 53)
Inclusion and exclusion criteria	<ol style="list-style-type: none"> Describe any criteria used for including and excluding animals (or experimental units) during the experiment, and data points during the analysis. Specify if these criteria were established <i>a priori</i>. If no criteria were set, state this explicitly. For each experimental group, report any animals, experimental units or data points not included in the analysis and explain why. If there were no exclusions, state so. For each analysis, report the exact value of <i>n</i> in each experimental group. 	Materials and methods/Animals (page 53)
Randomisation	<ol style="list-style-type: none"> State whether randomisation was used to allocate experimental units to control and treatment groups. If done, provide the method used to generate the randomisation sequence. Describe the strategy used to minimise potential confounders such as the order of treatments and measurements, or animal/cage location. If confounders were not controlled, state this explicitly. 	N/A, project used samples from a prior randomized project.
Blinding	Describe who was aware of the group allocation at the different stages of the experiment (during the allocation, the conduct of the experiment, the outcome assessment, and the data analysis).	Materials and methods/Hematoxylin and eosin (H&E) staining (page 53)
Outcome measures	<ol style="list-style-type: none"> Clearly define all outcome measures assessed (e.g. cell death, molecular markers, or behavioural changes). For hypothesis-testing studies, specify the primary outcome measure, i.e. the outcome measure that was used to determine the sample size. 	Materials and methods
Statistical methods	<ol style="list-style-type: none"> Provide details of the statistical methods used for each analysis, including software used. Describe any methods used to assess whether the data met the assumptions of the statistical approach, and what was done if the assumptions were not met. 	Materials and methods/Statistical analyses (page 55)
Experimental animals	<ol style="list-style-type: none"> Provide species-appropriate details of the animals used, including species, strain and substrain, sex, age or developmental stage, and, if relevant, weight. Provide further relevant information on the provenance of animals, health/immune status, genetic modification status, genotype, and any previous procedures. 	Materials and methods/Animals (page 53)

<p>Experiment</p> <p>al procedures</p>	<p>For each experimental group, including controls, describe the procedures in enough detail to allow others to replicate them, including:</p> <ol style="list-style-type: none"> a. What was done, how it was done and what was used. b. When and how often. c. Where (including detail of any acclimatisation periods). d. Why (provide rationale for procedures). 	<p>Materials and</p> <p>methods</p>
<p>Results</p> <p>0</p>	<p>For each experiment conducted, including independent replications, report:</p> <ol style="list-style-type: none"> a. Summary/descriptive statistics for each experimental group, with a measure of variability where applicable (e.g. mean and SD, or median and range). b. If applicable, the effect size with a confidence interval. 	<p>Results</p>

The Recommended Set

These items complement the Essential 10 and add important context to the study. Reporting the items in both sets represents best practice.

Item	Recommendation	Section/line number, or reason for not reporting
Abstract	11 Provide an accurate summary of the research objectives, animal species, strain and sex, key methods, principal findings, and study conclusions.	Page 51
Background	12 a. Include sufficient scientific background to understand the rationale and context for the study, and explain the experimental approach. b. Explain how the animal species and model used address the scientific objectives and, where appropriate, the relevance to human biology.	Pages 51-52
Objectives	13 Clearly describe the research question, research objectives and, where appropriate, specific hypotheses being tested.	Page 52
Ethical statement	14 Provide the name of the ethical review committee or equivalent that has approved the use of animals in this study, and any relevant licence or protocol numbers (if applicable). If ethical approval was not sought or granted, provide a justification.	Page 53
Housing and husbandry	15 Provide details of housing and husbandry conditions, including any environmental enrichment.	Page 53
Animal care and monitoring	16 a. Describe any interventions or steps taken in the experimental protocols to reduce pain, suffering and distress. b. Report any expected or unexpected adverse events. c. Describe the humane endpoints established for the study, the signs that were monitored and the frequency of monitoring. If the study did not have humane endpoints, state this.	N/A, animal experimentation was held in a prior project, described in the section Materials and Methods/Animals
Interpretation/ scientific implications	17 a. Interpret the results, taking into account the study objectives and hypotheses, current theory and other relevant studies in the literature. b. Comment on the study limitations including potential sources of bias, limitations of the animal model, and imprecision associated with the results.	Pages 58-61
Generalisability/ translation	18 Comment on whether, and how, the findings of this study are likely to generalise to other species or experimental conditions, including any relevance to human biology (where appropriate).	Pages 58-61
Protocol registration	19 Provide a statement indicating whether a protocol (including the research question, key design features, and analysis plan) was prepared before the study, and if and where this protocol was registered.	N/A
Data access	20 Provide a statement describing if and where study data are available.	Page 61
Declaration of interests	21 a. Declare any potential conflicts of interest, including financial and non-financial. If none exist, this should be stated. b. List all funding sources (including grant identifier) and the role of the funder(s) in the design, analysis and reporting of the study.	Page 61