

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

**AVALIAÇÃO DA SUPLEMENTAÇÃO DE VITAMINA D NO DESENVOLVIMENTO
E EVOLUÇÃO DE LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO EM MODELO
EXPERIMENTAL**

EDUARDA CORREA FREITAS

Porto Alegre
2019

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

**AVALIAÇÃO DA SUPLEMENTAÇÃO DE VITAMINA D NO DESENVOLVIMENTO
E EVOLUÇÃO DE LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO EM MODELO
EXPERIMENTAL**

EDUARDA CORREA FREITAS

Orientador: Prof. Dr. Odirlei André Monticielo

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

Porto Alegre
2019

“É preciso ter o caos em si mesmo para ser capaz de dar à luz uma estrela dançante.”

Friedrich Nietzsche

Dedico à minha mãe, ao meu irmão, a minha avó materna, especialmente, ao meu companheiro, pelo apoio, compreensão e carinho destinados a mim durante a realização desta tese de doutorado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço principalmente a todos os momentos vividos durante estes seis anos de pós-graduação. Cada dia um novo aprendizado, uma nova dificuldade, um novo sorriso e uma comemoração.

Agradeço também a minha família como um todo que mesmo de longe esteve presente torcendo e vibrando por mim.

Agradeço a minha mãe, Maria Aparecida, e a minha avó materna, Vó Silveira, pessoas que dedicaram integralmente suas vidas para dar o suporte que eu precisei para cursar minha carreira profissional e pessoal.

Agradeço ao meu companheiro, Elton, pelo equilíbrio necessário para entender e ajudar na superação das dificuldades que passei ao longo da realização deste trabalho. Por todos os incentivos e “puxões de orelha” ao longo dos anos. Esteve presente em todos os momentos que fizeram parte da minha história acadêmica, deste a graduação até o meu doutorado.

Agradeço a minha amiga Carol, pelo companheirismo e amizade, sendo uma importante pessoa na minha vida desde a graduação.

Agradeço ao meu orientador, professor Odirlei André Monticielo, pela amizade, confiança, apoio e pela persistente cobrança por crescimento e desenvolvimento acadêmico. Por me tornar uma profissional melhor em cada encontro e por me permitir ser criativa dentro da nossa linha de pesquisa em lúpus experimental.

Um agradecimento muito carinhoso a todos os colegas de Laboratório de Doenças Autoimunes. Patrícia, por ter me levado para o LABDAI. A Priscila por ter me acolhido no LABDAI, me orientado e ensinado. Jordana e Rafaela, por todo o auxílio durante a execução da experimentação animal deste trabalho. Ao Paulo e Mirian pelo companheirismo. As novas mestrandas, Suelen e Manuela. Aos alunos de iniciação científica, Barbara e Renata. Em especial aos alunos de iniciação científica que auxiliaram durante a execução deste projeto, Mayara e Thales. E ainda mais especial para o presente de aluna que recebi no final de 2017, Thaís. Obrigada!

Aos colegas do Serviço de Reumatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em especial a Gabriela por todas as ajudas burocráticas.

Aos colegas pesquisadores que auxiliaram de alguma forma nesta tese, especial agradecimentos às colegas do Laboratório de Patologia Experimental – Dra. Emily e a Flavinha, e a Unidade de Experimentação Animal – Marta, Rosa, Dani e Ana e inúmeros outros que não caberiam neste documento.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), ao Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE/HCPA) e ao Fundo de Apoio a Pesquisa da Sociedade de Reumatologia do Rio Grande do Sul (SRRS) pelos incentivos financeiros dados a este projeto.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, especialmente ao programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas pela oportunidade.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	8
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	10
LISTA DE TABELAS	11
RESUMO	12
ABSTRACT	14
1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO SISTEMÁTICA DA LITERATURA	19
2.1 ESTRATÉGIAS PARA LOCALIZAR E SELECIONAR AS INFORMAÇÕES	19
2.2 LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO	20
2.2.1 Conceito de LES	20
2.2.2 Epidemiologia do LES	20
2.2.3 Etiologia e patogênese do LES	23
2.3 MODELOS EXPERIMENTAIS DE LÚPUS	29
2.3.1 Modelo de lúpus induzido por pristane	30
2.4 VITAMINA D	31
2.4.1 Considerações gerais	31
2.4.2 Metabolismo da vitamina D	33
2.4.3 Níveis séricos e deficiência de vitamina D	35
2.4.4 Receptor de vitamina D	37
2.4.5 Efeitos fisiológicos da vitamina D	38
2.5 VITAMINA D E LÚPUS	40
3. MARCO CONCEITUAL	44
4. JUSTIFICATIVA	45
5. OBJETIVOS	46
5.1 OBJETIVO GERAL	46
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	46
6. REFERÊNCIAS DA REVISÃO SISTEMÁTICA DA LITERATURA	47
7. ARTIGO 1	70
8. ARTIGO 2	83
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS	112
10. PERSPECTIVAS FUTURAS	113
11. CONSIDERAÇÕES GERAIS	114
12. ANEXO 1 – CONSORT 2010 GUIDELINE	115

LISTA DE ABREVIATURAS

1,25(OH) ₂ D	1,25-dihidroxitamina D
24,25(OH) ₂ D	24,25-dihidroxitamina D
25(OH)D	25-hidroxitamina D
7-DHC	7-Deidrocolesterol
ACR	<i>American College of Rheumatology</i>
BAFF	<i>B-cell activating factor</i> (Fator de ativação de células B)
BANK1	<i>B cell scaffold protein with ankyrin repeats</i>
BLK	<i>B lymphoid kinase</i> (Cinase dos linfócitos B)
BLys	<i>B lymphocyte stimulator</i> (Estimulador de linfócitos B)
CMV	Citomegalovírus
CYP24A1	<i>Cytochrome P450 family 24 subfamily A member 1</i>
CYP27B1	<i>Cytochrome P450 family 27 subfamily B member 1</i>
CYP2R1	<i>Cytochrome P450 family 2 subfamily R member 1</i>
DCV	Doença cardiovascular
DHEA	Dehidroepiandrosterona
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dsDNA	<i>Double stranded DNA</i> (DNA de cadeia dupla)
EBV	Epstein–Barr vírus
FcγRIIA	<i>Fc gamma receptor IIA</i>
FcγRIIIA	<i>Fc gamma receptor IIIA</i>
FcγRIIIB	<i>Fc gamma receptor IIIB</i>
GWAS	<i>Genome-wide association study</i> (Estudos de associação global do genoma humano)
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i> (Antígeno leucocitário humano)
IC	Imunocomplexo
IFN-α	Interferon-alfa
IFN-γ	Interferon-gama
IL-2	Interleucina-2
IL-6	Interleucina-6
IRAK1	<i>Interleukin 1 receptor associated kinase 1</i>
IRF5	<i>Interferon regulatory factor 5</i>

ITGAM	<i>Integrin alpha M</i>
LES	Lúpus Eritematoso Sistêmico
LYN	<i>Src family of protein tyrosine kinase</i>
MBL	<i>Mannose-binding lectin</i> (Lectina ligadora da manose)
MECP2	<i>Methyl CpG binding protein 2</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> (Complexo maior de histocompatibilidade)
NK	<i>Natural Killer</i> (Exterminadora natural)
OX40L	OX40 ligante
PCR	Proteína C-reativa
PDCD1	<i>Programmed cell death 1</i>
PTH	Paratormônio
PTPN22	<i>Protein tyrosine phosphatase non-receptor 22</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RXR	Receptor X Retinóico
SLICC	<i>Systemic Lupus International Collaborating Clinics</i>
SPP1	<i>Secreted phosphoprotein 1</i>
STAT4	<i>Signal transducer and activator of transcription 4</i>
Tfh	Linfócitos T auxiliares foliculares
Th	Linfócitos T auxiliares
TLR	<i>Toll-like receptors</i>
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral-alfa
TREX1	<i>Three-prime repair exonuclease</i>
UVB	Raios ultravioleta B
VDBP	Proteína ligadora da vitamina D
VDR	Receptor de vitamina D
VDRE	Elementos de resposta à vitamina D

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Modelo esquemático da estratégia de busca de informações. *Critérios de exclusão dos artigos: tema não relacionado aos objetivos da pesquisa; artigos não disponíveis na íntegra; artigos não disponíveis em inglês e/ou português. 19
- Figura 2.** Resumo do envolvimento de múltiplos fatores, especialmente genéticos, imunológicos, hormonais e ambientais, presentes na etiologia e a patogênese do LES. Fonte: Robbins Patologia Básica (9ª Edição), 2013. 29
- Figura 3.** Estrutura química dos precursores e metabólitos da vitamina D. 7-deidrocolesterol (pró-vitamina D3); colecalciferol (Vitamina D3); ergosterol (Vitamina D2); 25-hidroxitamina D [25(OH)D ou calcidiol]; 1 α ,25-diidroxitamina D [1 α ,25(OH) $_2$ D ou calcitriol]. Fonte: de Castro LCG, 2011 (149)..... 32
- Figura 4.** Metabolismo da vitamina D e principais efeitos biológicos. * Trato reprodutivo (útero, ovário, placenta, testículos e próstata), mamas, ilhotas pancreáticas, hipófise, tireóide, córtex adrenal, musculatura lisa e esquelética, coração, pele, cérebro. 35
- Figura 5.** Mecanismo de ação da vitamina D. Abreviações: MR (molécula reguladora); mRNA (ácido ribonucleico mensageiro); RXR (receptor X retinóico); VDR (receptor da vitamina D); VDRE (elementos de resposta a vitamina D). 38
- Figura 6.** Marco teórico do presente trabalho. ssDNA: DNA de cadeia simples; (+): melhora; (-): piora; 44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Modelos animais de LES.....31

Tabela 2. Modelos experimentais de lúpus e suplementação de vitamina D.....43

RESUMO

INTRODUÇÃO: O Lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença inflamatória multifatorial e autoimune, caracterizada pela produção de autoanticorpos, formação e deposição de imunocomplexos (IC), inflamação em diversos órgãos e dano tecidual. O estudo de diferentes modelos animais proporcionou uma melhor compreensão desta doença. O modelo de lúpus induzido por pristane representa um modelo adequado para estudar fatores que podem influenciar a indução e/ou progressão do LES, incluindo fatores genéticos. A vitamina D, é um destes fatores, e exerce efeitos imunomodulatórios nas células do sistema imune, dentre elas linfócitos T, linfócitos B e células dendríticas. Desta forma a suplementação de vitamina D pode interagir minimizando os sintomas do lúpus.

OBJETIVO: Avaliar o desenvolvimento e evolução de LES após suplementação de vitamina D em modelo experimental de lúpus induzido por pristane.

METODOLOGIA: O modelo experimental foi induzido com uma injeção intraperitoneal contendo 500ul de pristane em camundongos BALB/c fêmeas de 8-12 semanas de idade. Os animais foram divididos em três grupos: grupo controle (CO), grupo lúpus induzido por pristane (PIL) e grupo lúpus induzido por pristane suplementado com vitamina D (VD). Após a indução do modelo, os animais do grupo VD foram tratados com vitamina D através de injeção subcutânea contendo 100ul de Calcijex [2ug/kg/animal] diluído em PBS-Tween 20 em dias alternados durante 180 dias. Nós tempos 0, 60, 120 e 180 dias após a indução foi avaliado escore clínico articular, nocicepção por Von Frey e o edema articular por pletismômetro. No dia 150 após a indução do modelo foi coletado urina em gaiola metabólica para dosagem de proteína na urina. No dia 180 após a indução os animais foram submetidos à eutanásia. No mesmo tempo, foi coletado soro para dosagem de citocinas inflamatórias, e tecido articular e renal para análise histológica.

RESULTADOS: Os animais do grupo PIL apresentaram artrite e lesão renal, caracterizada pelo aumento dos níveis de proteinúria, deposição de IC e hiperplasticidade mesangial glomerular. Além disso, os animais do grupo PIL demonstraram níveis aumentados de IL-6, TNF- α e IFN- γ no soro. No presente estudo, nós observamos que o tratamento com vitamina D melhorou a artrite através da redução da incidência de artrite e da redução de escore clínico articular e edema

das patas posteriores, mas não foi capaz de influenciar na lesão renal. O tratamento com vitamina D não reduziu níveis de proteinúria, hiper celularidade mesangial glomerular e deposição de IgG e IgM no tecido renal. A suplementação de vitamina D não alterou os níveis séricos das citocinas IL-6, TNF- α , IL-2 e IL-4, mas reduzir os níveis de séricos de IFN- γ .

CONCLUSÃO: Neste estudo demonstrou-se que a vitamina D foi capaz de modular os sintomas clínicos e histopatológicos da artrite, mas não alterou o curso clínico e histopatológico da doença renal, apesar de ter modificado o perfil de citocinas. Estes resultados confirmam que o papel da vitamina D pode ser diferente dependendo do sítio de ativação, o que poderia explicar diferentes respostas de acordo com o fenótipo clínico. Ainda é necessário explorar a concentração de dose adequada e segura, o tempo de tratamento e a influência da vitamina D nas diferentes bases moleculares no LES.

PALAVRAS-CHAVE

Lúpus Eritematoso Sistêmico, vitamina D, 1,25-hidroxivitamina D, receptor da vitamina D, lúpus induzido por pristane.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Systemic lupus erythematosus (SLE) is a multifactorial and autoimmune inflammatory disease, characterized by the production of autoantibodies, formation and deposition of immunocomplexes, inflammation in various organs and tissue damage. The study of different murine models has provided a better understanding of these autoimmune phenomena. Pristane-induced lupus model represents a suitable model for studying factors that may influence the induction and/or progression of SLE, including genetic factors. Vitamin D is one of these factors and exerts immunomodulatory effects on the cells of the immune system, among them T lymphocytes, B lymphocytes and dendritic cells.

OBJECTIVE: To evaluate the development and evolution of SLE after vitamin D supplementation in an experimental model of lupus induced by pristane.

METHODOLOGY: The experimental model was induced with an intraperitoneal injection containing 500ul pristane in 8-12 week old female BALB/c mice. The animals were divided into three groups: control group (CO), pristane-induced lupus group (PIL) and pristane-induced lupus group supplemented with vitamin D (VD). After induction of the model, the animals of the VD group were treated with vitamin D by subcutaneous injection containing 100ul of Calcijex [2ug / kg / animal] diluted in PBS-Tween 20 on alternate days for 180 days. At 0, 60, 120 and 180 days after induction we evaluated the arthritis clinical score, nociception and hind paws edema. On day 150 after the induction of the model urine was collected in metabolic cage for protein dosage in the urine. At day 180 after induction, the animals were euthanized. At the same time, serum was collected for the dosage of inflammatory cytokines and renal and articular tissue for histological analysis.

RESULTS: PIL group showed arthritis and kidney injury, characterized by increased proteinuria, glomerular mesangial expansion and inflammation. Moreover, PIL model showed increased levels of IL-6, TNF- α and IFN- γ in serum. We observed that treatment with vitamin D improved arthritis through reduced of incidence and arthritis clinical score and edema, but does not influenced renal injury. Treatment with vitamin D was not able to reduce proteinuria levels, decrease mesangial hypercellularity or IgG and IgM deposition in the kidney. Vitamin D supplementation did not alter IL-6, TNF- α , IL-2 and IL-4 cytokine levels, but we observed a reduce IFN- γ levels.

CONCLUSION: In this study, it was demonstrated that vitamin D was able to modulate the arthritis clinical and histopathological symptoms, but did not alter the clinical and histopathological course of renal disease, although it modified the cytokine profile. These results support that the role of vitamin D may be different depending on the acting site, which could explain different responses according clinical phenotype. Therefore, further investigations are still necessary to explore the adequate and safe dose concentration, the timing of treatment and the influence of vitamin D on the different molecular bases in SLE.

KEYWORDS

Systemic lupus erythematosus; Vitamin D; 1,25- hydroxyvitamin D; Pristane – induced lupus.

1. INTRODUÇÃO

O Lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença autoimune caracterizada pela produção de autoanticorpos, formação e deposição de imunocomplexos (IC), inflamação em diversos órgãos (pele, articulações, coração, pulmões, sangue, rins e cérebro) e dano tecidual. É estimada uma incidência de 1-22 casos para cada 100.000 pessoas por ano, acometendo mais mulheres na idade fértil (1). A etiologia do LES é multifatorial e permanece ainda pouco conhecida, porém sabe-se da importante participação de fatores hormonais, ambientais, genéticos e imunológicos para o surgimento da doença. Inúmeros genes têm sido relacionados com o surgimento do LES, incluindo o gene *VDR* (do inglês *vitamin D receptor* - receptor de vitamina D) que sintetiza o receptor de vitamina D.

O VDR é um receptor nuclear, pertencente à família dos receptores esteroides de classe 2, semelhante aos receptores do ácido retinoico e do hormônio tireoestimulante (2). A 1,25-dihidroxitamina D ($1,25(\text{OH})_2\text{D}$), forma ativa da vitamina D, liga-se ao VDR e determina uma resposta genômica através da regulação da transcrição de alguns genes. As principais etapas envolvidas no controle da transcrição genética incluem: a ligação da $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ ao VDR, heterodimerização com o receptor X retinoico (RXR), ligação deste heterodímero a sequências específicas do DNA (do inglês *deoxyribonucleic acid* - ácido desoxirribonucleico), conhecidas como elementos de resposta à vitamina D (do inglês *vitamin D response elements* - VDRE) localizados no DNA, nas regiões promotoras dos genes que são ativados pela vitamina D e recrutamento de outras proteínas nucleares para dentro do complexo transcricional (3).

Diversos autores descreveram o VDR não somente em tecidos clássicos como ossos, rins e intestino, mas também em outros locais, tais como células do sistema imune, musculatura lisa e esquelética, pele, cérebro e fígado (4). Além da distribuição quase universal do VDR, algumas células (queratinócitos, monócitos, ossos e placenta) expressam a enzima 1α -hidroxilase que produz a forma ativada da vitamina D *in situ* (2,5).

As funções biológicas da vitamina D são mediadas pelo VDR. A função clássica da $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ está relacionada a regulação da homeostase do cálcio, sendo responsável por incrementar a reabsorção de cálcio e fósforo nos rins. Além

dos efeitos no metabolismo do cálcio, a $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ está envolvida na regulação do magnésio, liberação de insulina pelo pâncreas, secreção de prolactina pela hipófise, inibição da síntese de renina, aumento da contratilidade miocárdica, manutenção da musculatura esquelética e depuração de creatinina endógena (6–10). Ainda a $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ interfere de forma direta ou indireta no controle de mais de 200 genes envolvidos na regulação do ciclo celular, diferenciação, apoptose e angiogênese, podendo determinar diminuição da proliferação de células normais ou neoplásicas (11).

A $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ também exerce efeitos imunomodulatórios nas células do sistema imune, dentre elas linfócitos T, linfócitos B e células dendríticas (12,13), onde se destacam a diminuição da produção de interleucina-2 (IL-2), do interferon-gama (IFN- γ) e do fator de necrose tumoral-alfa (do inglês, *tumor necrosis factor-alpha* -TNF- α). Cada uma destas células expressa VDR e 1α -hidroxilase, podendo produzir $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ localmente. Seus efeitos parácrinos/autócrinos dependem da adequada concentração da $25(\text{OH})\text{D}$, o que faz da deficiência de $25(\text{OH})\text{D}$ um fator crucial no funcionamento do sistema imune (14). Há estudos com polimorfismos em pacientes cuja influência se dá através de alterações envolvendo a imunidade inata, os quais estão associados com níveis elevados de interferon-alfa (IFN- α), uma importante citocina envolvida na fisiopatogenia do LES (15–18).

Devido à heterogenidade da doença e as diferenças interpessoais quanto aos efeitos da vitamina D no organismo em humanos, causados por polimorfismos descritos principalmente no gene *VDR*, estudos experimentais podem ser uma boa alternativa para avaliar a modulação do VDR após a suplementação com $1,25(\text{OH})_2\text{D}$. Os modelos animais mais estudados em LES são os espontâneos, principalmente (NZBXW)F1 e MRL lpr . Porém o modelo (NZBXW)F1 diverge em alguns aspectos do LES humano, como na ausência da produção de autoanticorpos contra o RNA (do inglês *Ribonucleic acid* – Ácido ribonucleico) (19). Enquanto que as alterações fisiopatológicas do modelo de LES induzido por pristane são semelhantes às encontradas em pacientes (aumentando os níveis de IFN- α/β , produção de autoanticorpos em altos níveis, glomerulonefrite por deposição de IC e hiperplasia mesangial) (20).

Até o presente momento existem 5 estudos com suplementação de vitamina D em modelo animal de LES. O primeiro trabalho publicado, em 1992 com camundongos MRL/lpr, demonstrou que a suplementação com 1,25(OH)₂D atenuou algumas manifestações do LES, como ausência das lesões cutâneas e redução da proteinúria (21). Em 2000, um estudo brasileiro realizado em camundongos (NZBXW)F1, observou piores achados histopatológicos nas biópsias renais do grupo que recebeu a suplementação de colecalciferol (vitamina D3), o que sugere que a vitamina D pode ter agravado a doença (22). Arab e colaboradores realizaram um estudo com suplementação de 1,25(OH)₂D em modelo de lúpus induzido por cromatina ativada, onde os animais apresentaram redução na proteinúria, aumento da expressão de TGF-β e Foxp3, diminuição da expressão de interleucina-6 (IL-6) e interleucina-10 (IL-10) e aumento de células T regulatórias (23). Em 2016, um estudo submeteu o modelo de MRL/lpr a uma dieta deficiente em vitamina D, e os animais apresentaram baixos níveis de 25(OH)D, mas essa deficiência não foi capaz de alterar os níveis de anti-dsDNA (do inglês *double stranded DNA* - DNA de cadeia dupla), IgG total e proteinúria, a histologia renal ou o depósito de IC (IgG e C3) no rim (24). O último trabalho, publicado em 2017, suplementou 1,25(OH)₂D em modelo de MRL/lpr por via oral. Os animais apresentaram redução das úlceras cutâneas e injúria renal e aumento dos níveis de linfócitos CD4+ quando comparados com o grupo MRL/lpr sem suplementação (25). Estes trabalhos realizaram a suplementação de vitamina D através de diferentes vias de tratamento, concentrações do ativo e moléculas da vitamina D. Desta forma, mais estudos são necessários para determinar o papel da vitamina D no LES.

2. REVISÃO SISTEMÁTICA DA LITERATURA

2.1 ESTRATÉGIAS PARA LOCALIZAR E SELECIONAR AS INFORMAÇÕES

A estratégia de busca envolveu as seguintes bases de dados: EMBASE, PubMed e LILACS. O período da pesquisa foi de 1962 a 2018. Foram realizadas buscas através da lista de temas e suas combinações: “vitamin D”, “vitamin D receptor”, “lupus nephritis”, “systemic lupus erythematosus”, “vitamin D response element”, “vitamin D-binding protein”, “vitamin D deficiency”, “25-Hydroxyvitamin D”, “1,25-dihydroxyvitamin D”.

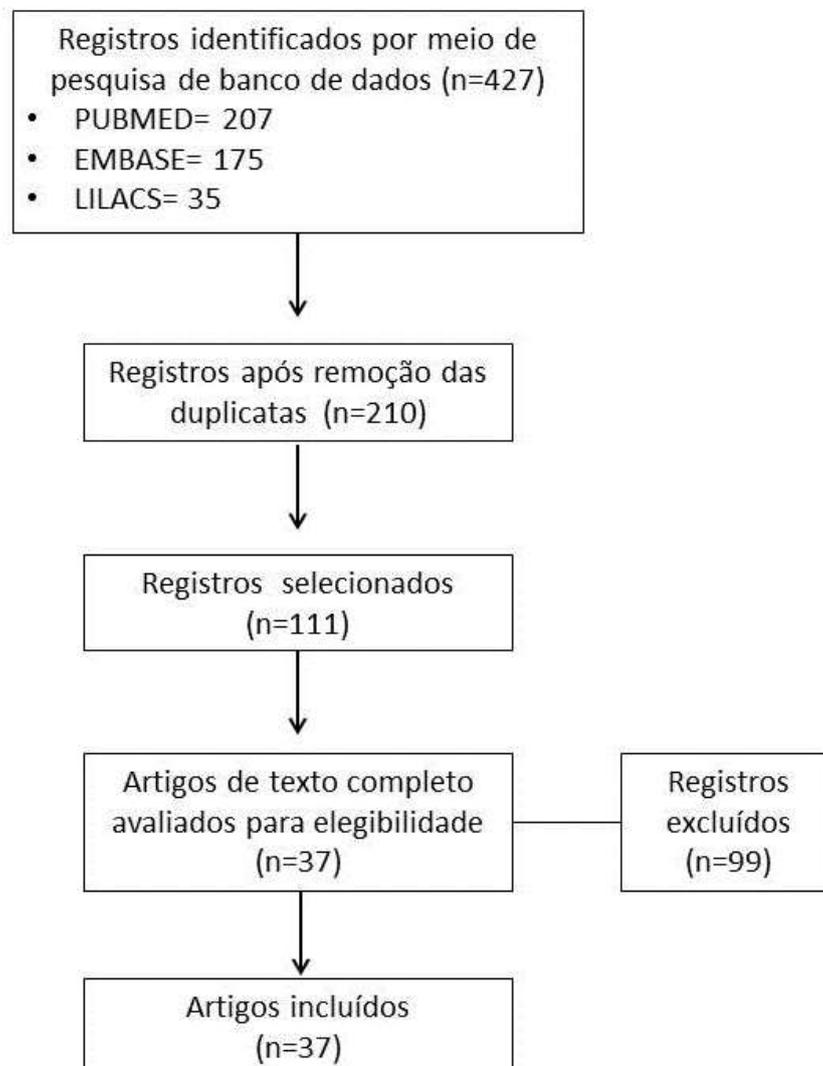


Figura 1. Modelo esquemático da estratégia de busca de informações. *Critérios de exclusão dos artigos: tema não relacionado aos objetivos da pesquisa; artigos não disponíveis na íntegra; artigos não disponíveis em inglês e/ou português.

2.2 LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

2.2.1 Conceito de LES

O LES é uma doença autoimune multissistêmica complexa, caracterizada por amplo espectro de anormalidades clínicas, laboratoriais e imunológicas, com curso e desfecho variáveis. É uma doença caracterizada pela produção exacerbada de autoanticorpos direcionados particularmente ao dsDNA e a pequenas proteínas nucleares de ligação ao RNA. O LES possui um envolvimento multissistêmico que afeta comumente os sistemas cutâneo, renal, musculoesquelético e hematopoiético. A etiologia ainda é pouco conhecida, mas sabe-se da participação de fatores genéticos, imunológicos, hormonais e ambientais. As características clínicas são polimórficas e a evolução costuma ser crônica, com períodos de exacerbação e remissão. A doença pode cursar com sintomas constitucionais, artrite, serosite, nefrite, vasculite, miosite, manifestações mucocutâneas, hemocitopenias imunológicas, diversos quadros neuropsiquiátricos, hiperatividade reticuloendotelial e pneumonite. Diante desta apresentação heterogênea da doença foram desenvolvidos critérios de classificação para facilitar as pesquisas. Desta forma, convencionou-se realizar seu diagnóstico através de achados clínicos e laboratoriais, conforme os critérios de classificação propostos pelo *American College of Rheumatology* (ACR) em 1982 (26) e revisados em 1997 (27). No entanto, ao longo do tempo, surgiu a discussão sobre itens redundantes/ausentes, e em 2012, o grupo *Systemic Lupus International Collaborating Clinics* (SLICC) elaborou novos critérios de classificação onde se devem observar quatro ou mais sintomas para o diagnóstico de LES, sendo no mínimo 1 critério clínico e 1 critério laboratorial/imunológico (28).

2.2.2 Epidemiologia do LES

As taxas de incidência globais para o LES variam de cerca de 0,3 a 23,7 casos para cada 100.000 pessoas por ano (29,30). Enquanto as taxas de prevalência variam de 6,5 a 178 casos para cada 100.000 pessoas (31). A taxa de incidência e prevalência em crianças (<16 anos) é consideravelmente menor. A taxa de incidência anual de LES em crianças foi relatada como inferior a 1 caso para

cada 100.000 pessoas em estudos da Europa e da América do Norte (32). Estudos epidemiológicos envolvendo o LES são complexos devido à diversidade de apresentações clínicas da doença, dependência de critérios de classificação para definição do diagnóstico e baixa frequência na população. As variabilidades genéticas entre os povos e o local onde é conduzido o estudo influenciam nos resultados epidemiológicos referentes à doença.

A prevalência do LES na população norte-americana é de cerca de 70 a 178 casos para cada 100.000 pessoas e estimativas de incidência variam aproximadamente de 3,7 a 7,4 casos para cada 100.000 pessoas por ano (33). Até recentemente, pouco se sabia sobre a epidemiologia do LES entre a população árabe no mundo e no Oriente Médio. Em 2015, uma incidência de 2,1 vezes maior de LES entre os árabes-americanos em comparação com caucasianos não-árabes e afro-americanos foi descrita em sudeste de Michigan (34). Al Dhanhani e colaboradores estudaram a incidência e prevalência de LES nos Emirados Árabes Unidos (35). A incidência observada neste estudo foi de 8,6 casos para cada 100.000 pessoas por ano e a prevalência 103 casos para cada 100.000 pessoas.

Em uma revisão sistemática de estudos epidemiológicos da incidência e prevalência mundial de LES (36), as maiores estimativas de incidência e prevalência de LES foram na América do Norte (23,2 casos para cada 100.000 pessoas por ano e 241 casos para cada 100.000 pessoas, respectivamente). As menores incidências de LES foram relatadas na África e na Ucrânia (0,3 casos para cada 100.000 pessoas por ano) (29,37), e a menor prevalência foi no norte da Austrália (0 casos em uma amostra de 847 pessoas). Em geral, os países europeus tiveram menor incidência de LES, enquanto a Ásia, a Australásia e as Américas tiveram maior incidência.

No Brasil, um estudo no nordeste brasileiro estimou uma incidência de LES em torno de 8,7 casos para cada 100.000 pessoas por ano. Nas mulheres esta estimativa foi de 14 casos para cada 100.000 pessoas por ano e nos homens foi de 2,2 casos para cada 100.000 pessoas por ano. O pico de incidência ocorreu em mulheres entre 35 e 39 anos, com 32,7 casos para cada 100.000 mulheres por ano (38). Em 2004, outro estudo estimou a prevalência de doenças reumáticas em Montes Carlos. Dentre os pacientes diagnosticados com doenças reumáticas

somente 3 (1,4%) foram diagnosticados com lúpus e a prevalência nesta amostra foi de 0,098% para o lúpus (39).

O LES é mais comumente visto em mulheres durante a idade reprodutiva (40), para todos os grupos étnicos, com uma taxa nove vezes maior que a dos homens (9:1), e aquelas de ascendência afro-americana e asiática manifestam doença mais grave do que aquelas de ancestralidade europeia (41). A proporção entre os sexos pode variar de 3:1 (42) a 15:1 (43). Em crianças, esta razão é de 3:1; em adultos jovens chega a 15:1 e nos indivíduos com maior idade, novamente tende a ser menor, em torno de 8:1. Observa-se uma maior incidência em mulheres em todas as faixas etárias, embora as proporções sejam menores em ambos os extremos de idade. Este fato pode estar relacionado tanto ao cromossomo X duplo quanto às diferenças nos níveis de estrogênio, que modulam as respostas imunológicas (44–46). As curvas de prevalência por idade possuem uma distribuição semelhante à dos dados de incidência (36).

É bem conhecido que existem diferenças nas variantes de risco de doenças autoimunes em diferentes populações. A prevalência de LES varia substancialmente por ancestralidade étnica. Nos estudos que relatam diferenças entre grupos étnicos (30,47–49), as taxas de incidência são 3 a 5 vezes maior de LES nos afro-americanos comparado aos indivíduos com ascendência europeia (50–52). Os grupos étnicos asiáticos e hispânicos possuem taxas de incidências intermediárias entre os grupos étnicos citados anteriormente (53–55). Semelhante aos dados de incidência, os grupos étnicos negros possuem maior prevalência de LES, os grupos brancos, menor prevalência, e os asiáticos e hispânicos, intermediários, tanto para homens quanto para mulheres (36).

A sobrevida nos pacientes com LES tem melhorado muito nos últimos anos. Na década de 50, a sobrevida média em cinco anos era de 50% (56). De 1975 a 1990, a sobrevida em 10 anos aumentou de 64 para 87%. Ainda mais melhorias ocorreram recentemente de 1990 a 2004, quando a sobrevida de 20 anos aumentou para 78% (57). Nos dias atuais, taxas de sobrevida de 5, 10 e 15 anos foram relatadas como estando na faixa de 96, 93 e 76%, respectivamente (58–60). Vários fatores contribuíram para isso, principalmente melhoria da conscientização e classificação da doença, levando a um diagnóstico precoce, o melhor entendimento

da sua fisiopatologia e as melhores condições de tratamento, bem como melhorias no tratamento da hipertensão, infecção e insuficiência renal, algumas das principais comorbidades que esses pacientes apresentam (59,61).

As doenças cardiovasculares (DCV), as infecções e a doença ativa são as principais causas de morte no LES. Os pacientes com LES apresentam taxas de mortalidade duas a cinco vezes maiores que a população geral (62). Um padrão bimodal de mortalidade tem sido reconhecido no LES desde meados da década de 1970 (63), nos primeiros anos da doença, as principais causas de morte são infecções graves devido à imunossupressão ou morte por complicações da doença ativa, como nefrite lúpica e lúpus neuropsiquiátrico; enquanto as causas de morte tardias incluem danos há longo prazo do LES, complicações do tratamento e as DCV (57,64). Lee e colaboradores realizaram um estudo de meta-análise e examinaram as taxas de mortalidade padrão no LES. O risco de mortalidade foi significativamente maior para doença renal, DCV e infecção, mas não devido a câncer (65). A doença renal ocorre em até 60% dos pacientes com LES e continua sendo uma causa predominante de morbidade e mortalidade no LES (66).

No Brasil, um estudo publicado em 2017, caracterizou as causas de mortalidade no lúpus de 2002-2011. A taxa de mortalidade no LES no Brasil foi de 4,76 mortes para cada 105 habitantes, sendo maior nas regiões Centro-Oeste, Norte e Sudeste do que no país como um todo. Os distúrbios do sistema musculoesquelético e do tecido conjuntivo foram mencionados como a causa subjacente de morte em 77,5% dos casos; também foram observadas doenças do sistema circulatório e infecciosas e parasitárias, embora em menor frequência (67).

2.2.3 Etiologia e patogênese do LES

A etiologia e a patogênese do LES são complexas e permanecem ainda pouco conhecidas, mas envolvem múltiplos fatores, especialmente genéticos, imunológicos, hormonais e ambientais (68). O dano tecidual e o acometimento de órgãos e sistemas podem estar relacionados à presença de autoanticorpos e IC. No LES, observa-se ativação da imunidade inata e adaptativa, com a participação de receptores do tipo Toll (do inglês *Toll-like receptors* – TLR) 7 e 9 no reconhecimento de autoantígenos derivados do RNA e DNA, respectivamente, provenientes de

células apoptóticas, e o envolvimento de células B e T ativadas a partir da interação com estes autoantígenos (69,70). A resposta imune anormal que permite a persistência de células B e T patogênicas, também aumenta o processamento de autoantígenos pelas células apresentadoras de antígenos, ocasiona hiperativação linfocitária e determina falha nos mecanismos imunorregulatórios que poderiam interromper este processo.

A predisposição ao LES tem sido relacionada à herança de determinados genes e não segue um modelo monoalélico. Estudos demonstram que gêmeos monozigóticos possuem um risco 10 vezes maior de desenvolver LES do que gêmeos dizigóticos ou irmãos não gêmeos, e em estudos observacionais a presença de múltiplos casos de LES nas famílias (71–74). Aproximadamente, de 5 a 12% dos familiares de pacientes com LES poderão ter a doença, o que representa um risco 100 vezes maior do que a população geral (75). Deficiências geneticamente herdadas de componentes do complemento (C1q, C4A e B e C2) e a mutação do gene que sintetiza a exonuclease 3'-5' envolvida no metabolismo e depuração do DNA (do inglês *Three-prime repair exonuclease* - TREX1), apesar de raramente encontradas, são fatores genéticos fortemente associados com o desenvolvimento do LES (76–79). O encontro de outras doenças autoimunes em familiares de pacientes com LES e sua associação com alguns distúrbios geneticamente determinados, também reforçam a importância da predisposição genética para o surgimento da doença. A combinação de fatores genéticos, tanto a presença de genes de suscetibilidade, quanto à ausência de genes de proteção, determina risco suficiente para o desencadeamento da doença. Estes dados, juntamente com os achados em estudos de associação global do genoma humano (do inglês *Genome-wide association study* - GWAS), implica um forte *background* genético para o LES (80,81).

Os GWAS têm sido bem sucedidos na identificação de novos *loci* que contribuem para a suscetibilidade genética do LES. A contribuição isolada de cada um deles no desenvolvimento da doença é pequena, geralmente com risco inferior a 2 ou 3 vezes (82). Através destes trabalhos, começou-se a elucidar a complexa arquitetura genética do LES, e coletivamente, esses estudos identificaram e confirmaram aproximadamente 90 *loci* que contribuem para esta patogênese. Esses dados destacam a importância de várias vias imunológicas incluindo aquelas que

envolvem a ativação e função dos linfócitos, a depuração do complexo imunológico, a resposta imune inata e as resposta imune adaptativa (68,83). Dentre os alelos do complexo maior de histocompatibilidade (do inglês *Major histocompatibility complex* - MHC), sabe-se que a região do antígeno leucocitário humano (do inglês *Human leukocyte antigen* - HLA), mais especificamente DR2, DR3 e DR8, contribuem para o risco de LES e outras doenças autoimunes desde a década de 1970 (84–87). Polimorfismos genéticos de suscetibilidade podem influenciar a depuração de IC e células apoptóticas através da alteração de componentes do sistema complemento, como os descritos anteriormente (C1q, C4A e B e C2) e também outros, tais como a lectina ligadora da manose (do inglês *Mannose-binding lectin* - MBL), receptores Fc gama IIA (do inglês *Fc gamma receptor IIA* - FcγRIIA), IIIA (do inglês *Fc gamma receptor IIIA* - FcγRIIIA), IIIB (do inglês *Fc gamma receptor IIIB* - FcγRIIIB), proteína C-reativa (PCR) e integrina alfa M (do inglês *Integrin alpha M* - ITGAM) (81,88–91). Há variantes alélicas encontradas nos genes PTPN22 (do inglês *Protein tyrosine phosphatase non-receptor 22*), OX40L (OX40 ligante, também conhecida como glicoproteína 34 kDa), PDCD1 (do inglês *Programmed cell death 1*), BANK1 (do inglês *B cell scaffold protein with ankyrin repeats*), LYN (do inglês *Src family of protein tyrosine kinase*) e BLK (do inglês *B lymphoid kinase* – cinase dos linfócitos B) que afetam a sinalização de linfócitos, resultando em mudanças na ativação, supressão e sobrevivência das células B e T (92–98). Há estudos com polimorfismos cuja influência se dá através de alterações envolvendo a imunidade inata, dentre eles, os que são encontrados nos genes IRF5 (do inglês *Interferon regulatory factor 5*), STAT4 (do inglês *Signal transducer and activator of transcription 4*), IRAK1 (do inglês *Interleukin 1 receptor associated kinase 1*) e SPP1 (do inglês *Secreted phosphoprotein 1*), os quais estão associados com níveis elevados de IFN- α , uma importante citocina envolvida na fisiopatogenia do LES (99–101). O alelo B do polimorfismo Bsm1 do gene *VDR* mostrou significativa associação com LES em pacientes asiáticos (102–104). Todos estes marcadores genéticos são encontrados de maneira muito variada em diferentes populações, especialmente os que se relacionam com o MHC, sendo alguns mais ou menos frequentes, de acordo com a etnia. A influência genética destes fatores potencialmente pode alterar a regulação imune, a degradação de proteínas, o transporte de peptídeos através da membrana celular, a cascata do complemento, o funcionamento do sistema reticuloendotelial, a

produção de imunoglobulinas, a apoptose e a produção e liberação de hormônios (105).

Os hormônios têm função imunorregulatória e alterações em suas concentrações podem ter papel na patogênese do LES, influenciando na incidência e no curso clínico da doença (44). O estrogênio estimula tímócitos, linfócitos T CD8+ e CD4+, linfócitos B, macrófagos, a liberação de citocinas, a expressão de moléculas do HLA e moléculas de adesão endotelial, além de reduzir a apoptose de linfócitos B ativados (106,107). Os androgênios evidenciam efeito imunossupressor (108). O desequilíbrio entre os níveis de estrogênio e androgênio parece influenciar a resposta imune. Em uma meta-análise de estudos clínicos, observaram-se níveis mais baixos de testosterona e dehidroepiandrosterona (DHEA) e níveis mais altos de estradiol e prolactina em mulheres com LES (109). Isto justificaria, em parte, o maior número de casos de LES em mulheres na idade reprodutiva e em indivíduos com síndrome de Klinefelter (47,XXY) e a menor prevalência da doença em pacientes com síndrome de Turner (45,X) (110,111). Estas duas síndromes suscitam a possibilidade de o risco para desenvolver LES estar relacionado à existência de dose genética cumulativa, visto que há pelo menos três genes predisponentes ao LES localizados no cromossomo X (IRAK1, TLR7 e MECP2 – do inglês *Methyl CpG binding protein 2*) (112). Alguns estudos mostraram associação entre o risco de desenvolver LES com a menarca precoce, o uso exógeno de hormônios (incluindo contraceptivos orais e terapia de reposição hormonal) e a menopausa cirúrgica (113,114). Um estudo de coorte prospectivo com mulheres do *Nurse's Health Study* demonstrou que uma maior exposição estrogênica, decorrente de menarca precoce ou do uso de estrogênio exógeno através de contraceptivos orais ou terapia de reposição hormonal na pós-menopausa, aumentou em 1,5 a 2,5 vezes o risco do desenvolvimento do LES (113). Em contraste, a progesterona parece reduzir o risco de LES ao contrabalançar os efeitos do estrogênio, o que sugere que o equilíbrio entre o estrogênio e a progesterona pode determinar a expressão da doença (115). A progesterona diminui a proliferação de células T e aumenta o número de células CD8+ (116). A prolactina encontra-se elevada em pacientes com LES de ambos os sexos (117). Os níveis de prolactina estão correlacionados diretamente com a atividade clínica e sorológica da doença (118). Ocorre também aumento de doença tireoidiana autoimune em pacientes com LES, o que altera os níveis dos hormônios

tireoidianos e do hormônio tireoestimulante (119). A vitamina D apresenta efeitos imunorregulatórios em diversas células do sistema imune, especialmente linfócitos T, linfócitos B e células dendríticas (120,121). Alguns estudos têm demonstrado associação entre baixos níveis de vitamina D e LES, sugerindo sua participação na etiopatogenia desta doença (122).

Anormalidades na regulação do sistema imune, incluindo quebra inicial da autotolerância, reconhecimento de autoantígenos, ativação de linfócitos T e B, secreção de citocinas, proliferação e diferenciação de linfócitos B e produção de autoanticorpos, são características de pacientes com LES (123). Defeitos na morte celular, nos mecanismos de fagocitose e depuração ineficaz de material apoptótico, restos celulares e de IC são achados que colaboram para perpetuação da autoimunidade no LES (124).

Plasmócitos produtores de autoanticorpos estão persistentemente sendo ativados por uma molécula chamada de fator de ativação de células B (do inglês *B-cell activating factor* – BAFF), também conhecida como BLys (do inglês *B lymphocyte stimulator* – estimulador de linfócitos B) ou CD257, no qual encontra-se elevada em pacientes com LES (125,126). Outras anormalidades também podem ser destacadas, dentre elas: a diminuição do número dos linfócitos T supressores e citotóxicos (127); deficiência qualitativa e quantitativa de células T regulatórias (128); aumento dos linfócitos T auxiliares foliculares (do inglês *Follicular helper T cells* - Tfh) e linfócitos T auxiliares (do inglês *T helper* - Th) CD4+ (129,130); ativação policlonal de linfócitos B e defeitos na tolerância destes linfócitos (131); aumento do microquimerismo fetal, provendo antígenos para o sistema imune (132); elevação dos níveis circulantes de IFN- α e aumento da expressão da transcrição do RNA indutor de IFN- α pelas células mononucleares (133,134). A sinalização anormal dos TLR7 e 9, levando ao reconhecimento de autoantígenos contendo RNA e DNA, respectivamente, aliada ao aumento de células B de memória e plasmócitos expressando TLR9, apontam uma possível ativação de linfócitos B diretamente através do sistema imune inato, independente de células T, o que tem sido relacionado com predisposição e modulação do quadro clínico de pacientes com LES (135,136).

Vários fatores ambientais têm sido associados ao desenvolvimento do LES. Mecanismos que ligam exposições ambientais e LES incluem modificações epigenéticas, aumento do estresse oxidativo, da inflamação sistêmica, das citocinas inflamatórias e efeitos hormonais (137). O *National Institute of Environmental Health Science Expert Panel* revisou e avaliou a influência de fatores ambientais sobre a autoimunidade e associou um aumento no desenvolvimento do LES com a exposição à sílica e o tabagismo (138). Infecções causadas por vírus, dentre eles o vírus Epstein-Barr (do inglês *Epstein-Barr vírus* – EBV), poderiam contribuir para o desenvolvimento de autoimunidade, principalmente por mimetismo molecular (139). Outros vírus, como Citomegalovírus (CMV), Parvovírus B19 e alguns retrovírus, também estão relacionados (140). Radiação ultravioleta B (UVB) pode estimular os queratinócitos a expressarem antígenos nucleares em sua superfície e aumentar a secreção de citocinas que estimulam linfócitos B à produção de autoanticorpos (141). Medicamentos, como procainamida, hidralazina e isoniazida podem desencadear lúpus induzido por droga, que é caracterizado pelo surgimento de manifestações clínicas e laboratoriais após exposição a estes fármacos, seguido por desaparecimento do quadro com a suspensão dos mesmos (Figura 1).

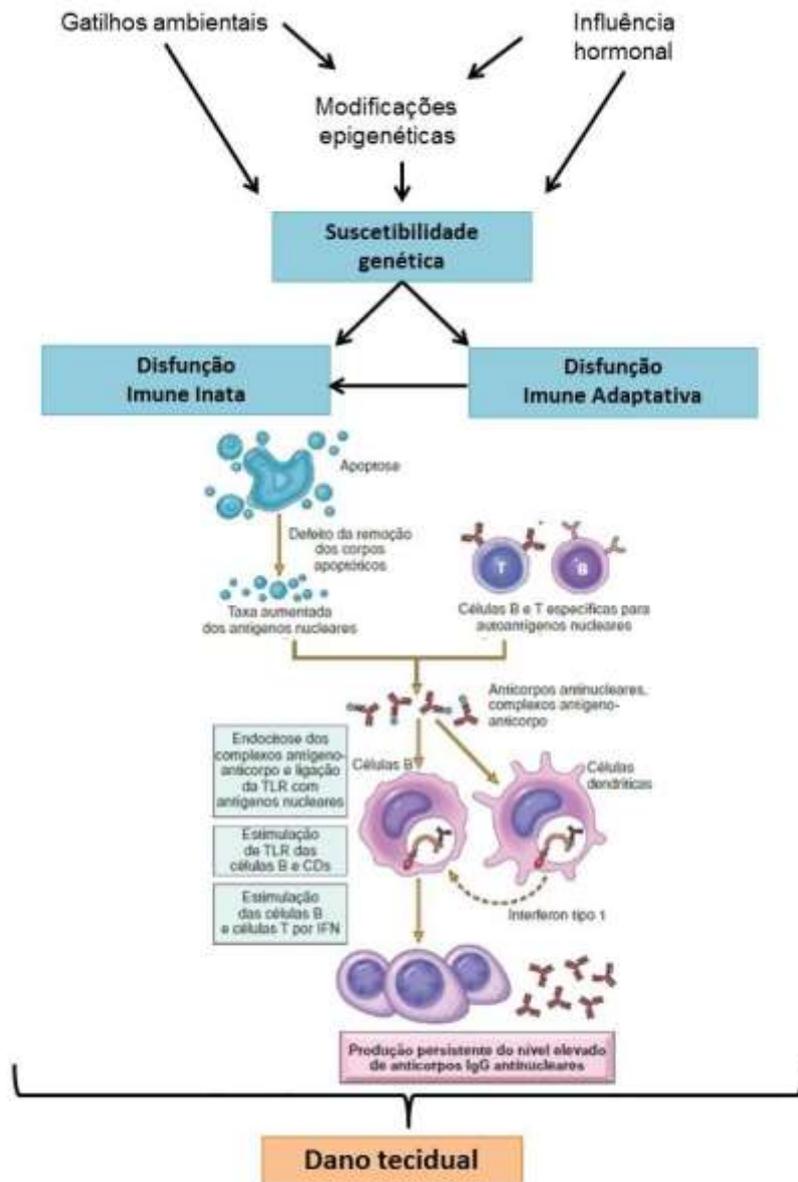


Figura 2. Resumo do envolvimento de múltiplos fatores, especialmente genéticos, imunológicos, hormonais e ambientais, presentes na etiologia e a patogênese do LES. Fonte: Robbins Patologia Básica (9ª Edição), 2013.

2.3 MODELOS EXPERIMENTAIS DE LÚPUS

O alto grau de complexidade e heterogeneidade da apresentação clínica no LES, aliada às limitações inerentes à pesquisa clínica, dificultam a investigação da etiologia dessa doença diretamente nos pacientes. Os modelos animais tem sido valiosos para investigar os mecanismos celulares e genéticos do LES, bem como na identificação e validação de alvos terapêuticos. Desta forma, os modelos experimentais de LES têm contribuído para entender os mecanismos celulares, de

sinalização e metabólicos que contribuem para a doença, e como o direcionamento dessas vias pode fornecer alvos terapêuticos (142).

Os modelos experimentais de LES podem ser divididos basicamente em espontâneo e induzido. Cada modelo compartilha subconjuntos específicos de atributos da doença observada em humanos, o que fornece aos pesquisadores uma ferramenta para adequá-los às suas necessidades específicas. No entanto, nenhum deles representa completamente todo o espectro clínico encontrado em pacientes com LES (Tabela 1) (143).

Tabela 1. Modelos animais de LES.

Modelo animal	Assinatura de IFN	Anti-DNA	Anti-Sm/RNP	Manifestações Clínicas	Critérios de LES*
NZB/W F1	Fraca	Sim	Não	ANAs, NL grave	3
MRL/lpr	Ausente	Sim	Sim	ANAs, NL grave, artrite, erupções cutâneas	6
B6/lpr	Ausente	Não	Não	ANAs	1
BXSB male	N/A	Sim	Não	ANAs, NL grave	3
Pristane	Forte	Sim	Sim	ANAs, NL, artrite, HAD, anemia, serosite	8

N/A: Não disponível; ANAs: anticorpos antinucleares; NL: nefrite lúpica; HAD: hemorragia alveolar difusa.

*Número de critérios do SLICC para classificação do LES (em humanos são necessários quatro critérios para definir o lúpus com 95% de certeza, pelo menos um critério clínico e um laboratorial). Fonte: Tabela adaptada de Zhuang e colaboradores, 2015 (143).

2.3.1 Modelo de lúpus induzido por pristane

O pristane é um alcano isoprenoide encontrado em alta concentração no óleo mineral. Uma injeção intraperitoneal de pristane é um método padrão para obtenção de um fluido ascítico enriquecido em anticorpos monoclonais. Dentre os anticorpos produzidos no modelo de lúpus induzido por pristane em BALB/c podemos encontrar anti-ribonucleoproteína, anti-DNA e anti-histona. Os animais submetidos à injeção de pristane também apresentam deposição de IC no rim, causando uma glomerulonefrite (144).

O modelo de lúpus induzido por pristane também é impulsionado por uma forte resposta do IFN-I, e este modelo é bem adequado para investigar a assinatura

de IFN-I presente em muitos pacientes com LES, mas mais fraca ou ausente em outros modelos animais (143). Este modelo também é útil para testar o impacto de um gene específico no desenvolvimento do lúpus.

Assim como observado no LES em humanos, o modelo de lúpus induzido por pristane é mais grave nas fêmeas do que nos machos (145). Ainda, dependendo da linhagem de camundongo utilizado na indução do modelo de lúpus induzido por pristane são observadas diferentes manifestações clínicas, o que ilustra o papel das interações gene/ambiente na suscetibilidade da doença (146). Uma explanação mais aprofundada deste modelo experimental esta descrita no Artigo 1 apresentado neste trabalho.

2.4 VITAMINA D

2.4.1 Considerações gerais

As vitaminas são compostos orgânicos essenciais para o metabolismo dos seres vivos. A vitamina D compreende compostos lipossolúveis, e existe em duas isoformas principais, de origem vegetal (vitamina D2 ou ergosterol) ou animal (vitamina D3 ou colecalciferol), responsáveis principalmente pela manutenção do equilíbrio do metabolismo ósseo (147,148). Ambas as vitaminas D2 e D3 são metabolizadas pela mesma via e produzem metabólitos ativos com efeitos biológicos equivalentes (Figura 2) (149). A vitamina D pode ser encontrada em alguns alimentos e suplementos alimentares, porém sua maior fonte é proveniente da síntese cutânea, a partir da adequada exposição à radiação UVB da luz solar. Apenas cerca de 20% das necessidades corporais diárias são supridas pela alimentação, fato que a torna diferente da maioria das demais vitaminas que geralmente precisam ser adquiridas através da dieta (150). Poucos alimentos contêm ou são enriquecidos, naturalmente, com vitamina D, dentre eles as principais fontes de vitamina D3 são o óleo de fígado de peixe, peixes gordurosos (atum e salmão) e a gema do ovo, enquanto que a vitamina D2 é derivada da ingestão de fontes de fungos, como cogumelos e leveduras. A vitamina D2 é uma molécula com 28 carbonos e pode ser manufaturada através da irradiação UVB do ergosterol encontrado em fungos (151). A vitamina D3 apresenta 27 carbonos e pode ser obtida através da irradiação UVB do 7-deidrocolesterol (7-DHC) proveniente da lanolina (152). Diante destas particularidades envolvendo a biodisponibilidade da

vitamina D nos seres humanos, entende-se o crescente interesse em pesquisas envolvendo este esteroide, visto que estudos em diferentes populações têm mostrado uma alta prevalência de hipovitaminose D e a implicação clínica deste achado ainda continua pouco entendida (153).

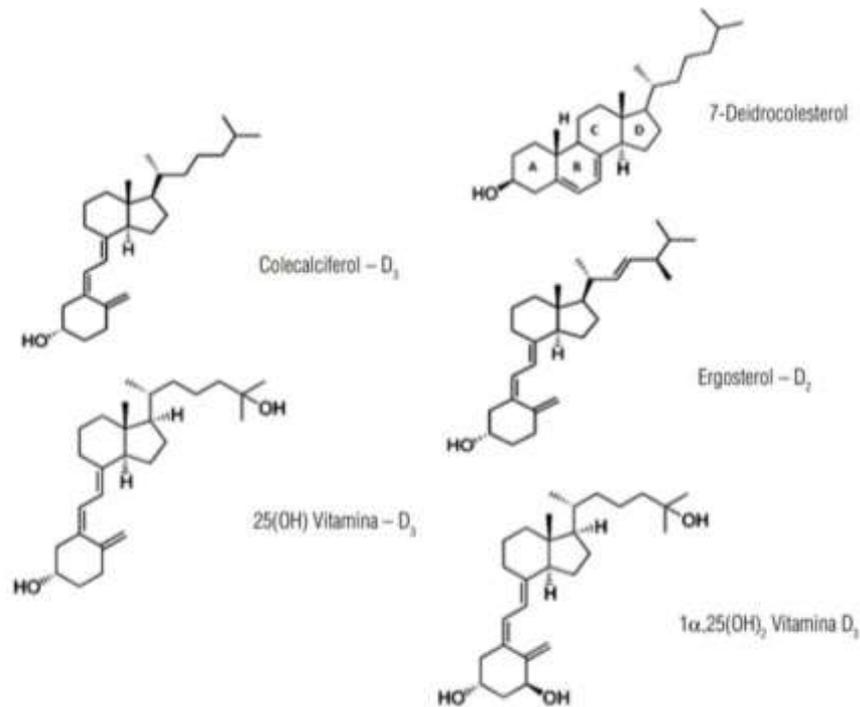


Figura 3. Estrutura química dos precursores e metabólitos da vitamina D. 7-deidrocolesterol (pró-vitamina D₃); colecalciferol (Vitamina D₃); ergosterol (Vitamina D₂); 25-hidroxivitamina D [25(OH)D ou calcidiol]; 1α,25-diidroxitamina D [1α,25(OH)₂D ou calcitriol]. Fonte: de Castro LCG, 2011 (149).

A vitamina D tem um importante papel no metabolismo ósseo, incluindo absorção de cálcio e fósforo. A descoberta de que a maioria das células expressa o VDR, e algumas possuem também maquinaria enzimática para produzir formas ativas da vitamina D, gerou grande interesse nos seus potenciais efeitos biológicos, visto que há evidências da influência desta vitamina na patogenia de doenças autoimunes, neoplásicas, osteometabólicas, infecciosas, cardiovasculares e metabólicas (153). A mais alta expressão do gene *VDR* é encontrada em tecidos metabólicos, como intestino, rins e ossos, mas níveis baixos a moderados do VDR podem ser observados em mais da metade dos cerca de 400 tecidos e tipos de células que formam o corpo humano (154). Estudos sugerem que a vitamina D

apresenta efeitos regulatórios em aproximadamente 900 genes (155). A identificação do VDR nas células responsáveis pela resposta imune, como as células mononucleares, dendríticas e apresentadoras de antígeno, e também nos linfócitos B e T, sugere que a vitamina D possa exercer atividade imunorregulatória (121,156). No sistema imune, a vitamina D promove diferenciação e regulação de monócitos, linfócitos e células exterminadoras naturais (do inglês, *natural killer* - NK), além de interferir na secreção de quase todas as citocinas envolvidas no sistema imune. Entre os efeitos imunomoduladores, destacam-se a diminuição da produção de IL-2, do IFN- γ e TNF- α , inibição da expressão de IL-6 e inibição da secreção e produção de autoanticorpos pelos linfócitos B (153,157).

Há grandes diferenças interpessoais quanto aos efeitos da vitamina D no organismo e, parte desta variação, deve-se a alterações nas sequências de DNA que sintetizam importantes proteínas envolvidas no metabolismo e na ação da vitamina D nas células-alvo. Um exemplo disto seria a mutação deletéria no gene *VDR* que causa raquitismo por resistência a 1,25(OH) $_2$ D. Outras variações genéticas mais sutis envolvem a presença de alguns polimorfismos no gene *VDR*, porém com consequências funcionais ainda pouco conhecidas (158,159).

2.4.2 Metabolismo da vitamina D

Nos seres humanos, a pele é o único sítio capaz de produzir vitamina D. A pró-vitamina D (7-DHC) é produzida na derme e epiderme e, sob ação da radiação UVB com comprimento de onda entre 280 e 315 nm, sofre conjugação de pontes de hidrogênio nos carbonos C5 e C7, dando origem a pré-vitamina D. Esta, após aproximadamente 24 horas, forma homodímeros, transformando-se em vitamina D (160,161).

A vitamina D proveniente da dieta é absorvida no intestino delgado e, juntamente com a vitamina D endógena, transportada até o fígado para ser metabolizada. O transporte ocorre principalmente através da proteína ligadora da vitamina D (do inglês *vitamin D-binding protein* - VDBP) e, em menor proporção, com a albumina (162). A enzima hepática 25-hidroxilase (CYP2R1 – do inglês *Cytochrome P450 family 2 subfamily R member 1*) incorpora um radical hidroxila na posição 25 da molécula da vitamina D, originando a forma 25-hidroxivitamina D

(25(OH)D), também conhecida como calcidiol (163). Por manter níveis séricos mais estáveis, é a forma usada para dosar a vitamina D do paciente. O fígado é o reservatório usual da vitamina D. O tecido adiposo também pode atuar como reservatório. Além do fígado, outros tecidos, como pele, intestino e rins são capazes de promover a 25-hidroxilação da vitamina D, porém em menor proporção (159). A 25(OH)D circula ligada à VDBP até o rim, onde sofre nova hidroxilação, resultado da atividade das enzimas 1 α -hidroxilase (CYP27B1 – do inglês *Cytochrome P450 family 27 subfamily B member 1*) ou 24-hidroxilase (CYP24A1 – do inglês *Cytochrome P450 family 24 subfamily A member 1*) (164). Os produtos são, respectivamente, a 1,25(OH)₂D (calcitriol), a forma mais ativa e a 24,25-dihidroxitamina D (24,25(OH)₂D), um metabólito inativo hidrossolúvel, conhecido também como ácido calcitroico que é excretado na bile. A concentração plasmática da 1,25(OH)₂D é regulada a partir dos níveis de 25(OH)D e da atividade das enzimas 1 α -hidroxilase e 24-hidroxilase. A enzima 1 α -hidroxilase é regulada pelo paratormônio (PTH), pela concentração de fósforo e pelos níveis séricos de 1,25(OH)₂D (165). O aumento do PTH estimulam a enzima a sintetizar 1,25(OH)₂D, enquanto a 1,25(OH)₂D exerce estímulo negativo sobre esta enzima (165,166). Ambas, 1,25(OH)₂D e 25(OH)D são degradadas, em parte, pela enzima 24-hidroxilase, através da síntese do ácido calcitroico (2). Os níveis séricos da 1,25(OH)₂D, ao contrário da 25(OH)D, são fortemente controlados por mecanismos de retroalimentação, com níveis séricos bastante variados e meia-vida de cerca de 6 horas (162). A 1 α -hidroxilase também esta presente nos tecidos extrarrenal (pulmão, próstata, cérebro, placenta) e nas células do sistema imune, o que torna possível a produção local da forma ativa da vitamina D, que passa a ter efeito parácrino e autócrino (167). É importante salientar que a 1 α -hidroxilase extrarrenal é regulada diferentemente da resposta vista ao PTH, cálcio e fósforo séricos (168). Particularmente, esta 1 α -hidroxilase não é estimulada pelo PTH e, conseqüentemente, a produção de 1,25(OH)₂D passa a depender das concentrações do substrato, ou seja, a 25(OH)D, o que pode determinar maior impacto na função da vitamina D nestes locais em casos de hipovitaminose D (14,167). Por outro lado, alguns estudos sugerem um mecanismo de autorregulação negativo exercido pela 1,25(OH)₂D sobre a síntese do seu precursor via inibição da 25-hidroxilase (169,170).

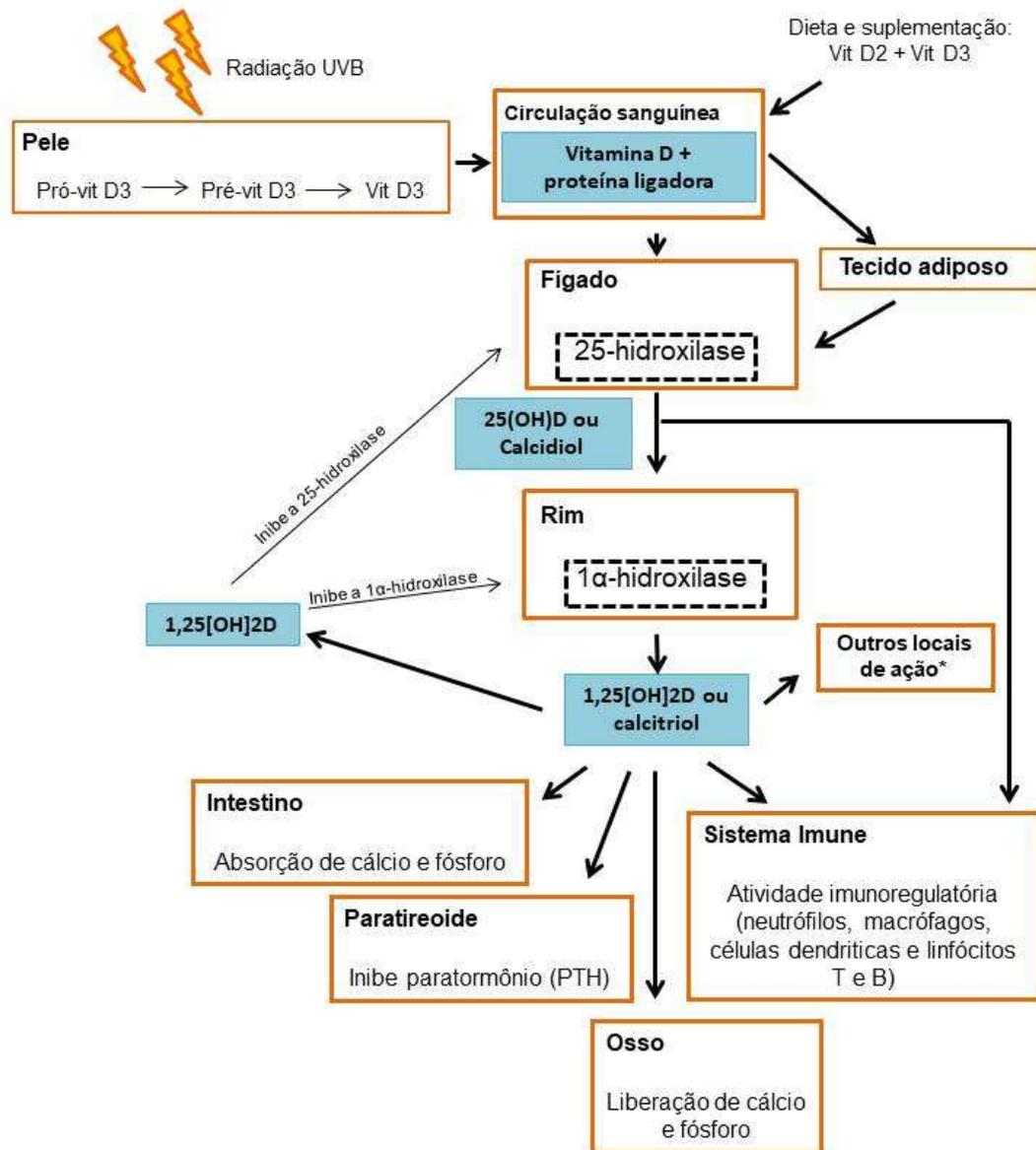


Figura 4. Metabolismo da vitamina D e principais efeitos biológicos. * Trato reprodutivo (útero, ovário, placenta, testículos e próstata), mamas, ilhotas pancreáticas, hipófise, tireóide, córtex adrenal, musculatura lisa e esquelética, coração, pele, cérebro.

2.4.3 Níveis séricos e deficiência de vitamina D

A vitamina D pode ser quantificada a partir da verificação da concentração da 25(OH)D, que representa sua forma circulante em maior quantidade, com meia-vida de aproximadamente três semanas. A 1,25(OH)₂D não costuma ser usada para avaliação da concentração da vitamina D, devido a sua curta meia-vida e sua baixa

concentração, cerca de 1000 vezes inferior à da 25(OH)D (171). Além disso, no caso de deficiência de vitamina D, existe um aumento compensatório na secreção do PTH, o que estimula o rim a aumentar a produção de 1,25(OH)₂D. Deste modo, quando ocorre deficiência de vitamina D e queda nos níveis de 25(OH)D, a concentração sérica de 1,25(OH)₂D se mantém dentro dos níveis normais ou mesmo elevados (172).

Não existe consenso sobre a concentração sérica da 25(OH)D. Há uma concordância de que os níveis séricos de vitamina D sejam mantidos dentro de uma faixa que não induza o aumento do PTH (150,173). A deficiência de vitamina D é definida pela maioria dos autores como níveis séricos de 25(OH)D inferiores a 50 nmol/l (20 ng/ml) (174–177). Níveis séricos entre 50 e 75 nmol/l (20 e 30 ng/ml) seriam indicativos de insuficiência relativa de 25(OH)D e níveis iguais ou maiores que 75 nmol/l (30 ng/ml) poderiam ser considerados como estado suficiente de vitamina D (162,177). Valores abaixo de 25 nmol/l (10 ng/ml) indicariam níveis criticamente baixos (178,179). Intoxicação associada com hipervitaminose D poderia ser vista com níveis de 25(OH)D superiores a que 374 nmol/l (150 ng/ml) (180).

As concentrações plasmáticas ideais de 25(OH)D foram definidas, como visto anteriormente, a partir da sua influência sobre os níveis séricos do PTH, o que as tornam clinicamente relevantes para a manutenção da homeostase do cálcio. Entretanto, as concentrações ideais de 25(OH)D necessárias para o bom funcionamento do sistema imunológico ainda não foram definidas e podem ser distintas daqueles valores que atualmente são conhecidos (181). Além disso, estudos demonstram que alguns polimorfismos genéticos envolvendo a VDBP, enzimas envolvidas no seu metabolismo, e o próprio VDR podem determinar variações nos níveis séricos da 25(OH)D e tornam ainda mais complexa a definição da concentração ideal de vitamina D, a qual pode ser diferente para cada indivíduo (182). Há inúmeras causas para haver deficiência de vitamina D, dentre elas, redução da síntese cutânea e da absorção intestinal, além de doenças herdadas ou adquiridas do seu metabolismo ou que interfiram na responsividade à vitamina D (166).

2.4.4 Receptor de vitamina D

O VDR é um receptor nuclear de 50 kDa (183), pertencente à família dos receptores esteroides de classe 2, semelhante aos receptores do ácido retinoico e do hormônio tireoestimulante. Seu gene de 75kb está situado no braço longo do cromossomo 12 (159). A estrutura de VDR consiste em um domínio N-terminal, para ligação com o DNA, uma região de charneira flexível e um domínio de ligação com o ligante, $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ (183). Além do clássico VDR nuclear, acredita-se que exista um VDR de membrana responsável por ações rápidas da vitamina D (184).

A $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ liga-se ao VDR nuclear e determina uma resposta genômica através da regulação da transcrição de alguns genes. As principais etapas envolvidas no controle da transcrição genética incluem a ligação da $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ ao VDR, heterodimerização com o RXR, ligação deste heterodímero a sequências específicas do DNA, também conhecidas como VDRE localizados no DNA, nas regiões promotoras dos genes que são ativados pela vitamina D e recrutamento de outras proteínas nucleares para dentro do complexo transcricional (figura 5) (3,183). Acredita-se que a $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ possa exercer ações genômicas e não genômicas rápidas interagindo com o VDR. As atividades não genômicas rápidas são mediadas pelo VDR de membrana que também é ativado por $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, o que resulta na abertura dos canais de cálcio dependentes de voltagem ou na ativação de segundos mensageiros, como por exemplo a proteína quinase C (185).

O VDR foi descoberto inicialmente nos tecidos envolvidos na regulação da homeostase do cálcio e fosfato (intestino, ossos, rins e paratireoide) (186). Além dos tecidos clássicos, o VDR também está presente em outros locais, tais como células do sistema imune, trato reprodutivo (útero, ovário, placenta, testículo e próstata), mamas, sistema endócrino (ilhotas pancreáticas, hipófise, tireoide, paratireoide e córtex adrenal), musculatura lisa e esquelética, coração, pele, cérebro e fígado (187). Além da distribuição quase universal do VDR, algumas células (queratinócitos, monócitos, ósseas e placentárias) expressam a enzima 1α -hidroxilase que produz a forma ativa da vitamina D *in situ*, podendo ocorrer efeito parácrino e autócrino deste hormônio (2,5).

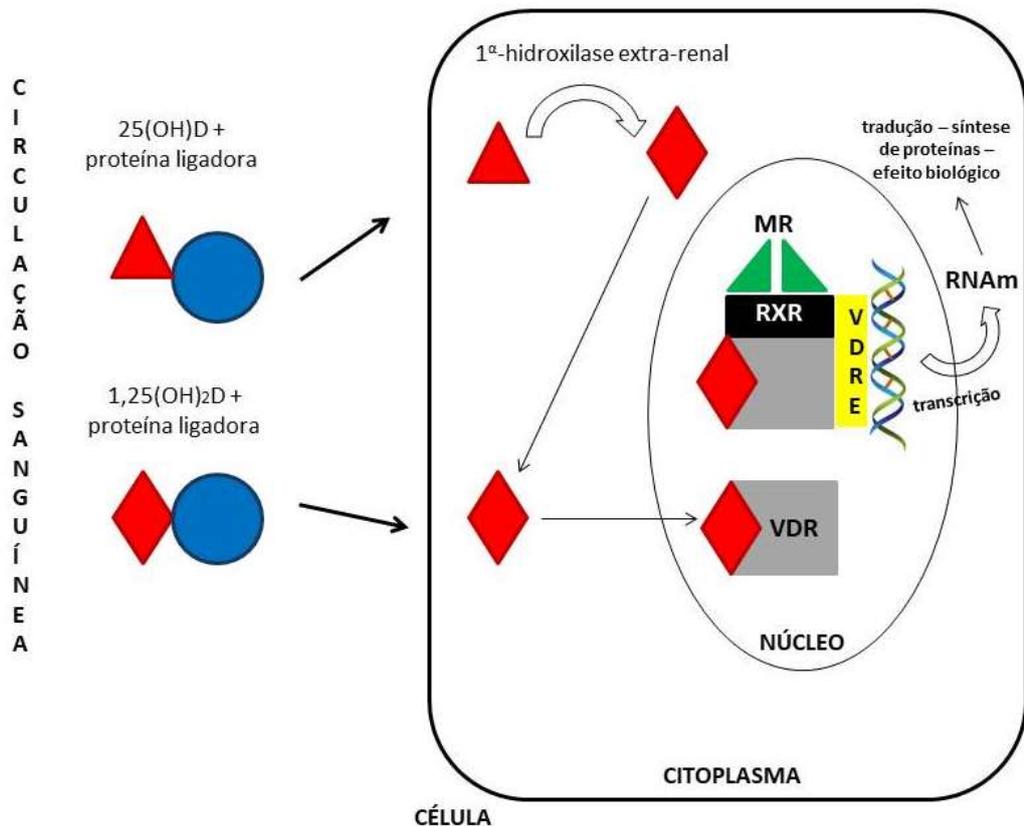


Figura 5. Mecanismo de ação da vitamina D. Abreviações: MR (molécula reguladora); mRNA (ácido ribonucleico mensageiro); RXR (receptor X retinóico); VDR (receptor da vitamina D); VDRE (elementos de resposta a vitamina D).

2.4.5 Efeitos fisiológicos da vitamina D

A função clássica da $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ relaciona-se com a regulação da homeostase do cálcio. No duodeno, estimula o transporte ativo de cálcio para a corrente circulatória. A absorção de fósforo também é aumentada sob ação deste hormônio. Há participação na manutenção da massa óssea, permitindo a mineralização normal do osso e atuando na maturação do colágeno e da matriz (188). Atua de forma sinérgica com o PTH na ativação e maturação de osteoclastos, resultando na mobilização do cálcio do osso para a circulação. Nos rins, é responsável por incrementar a reabsorção de cálcio e fósforo. Além dos efeitos no metabolismo do cálcio, a $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ está envolvida na regulação do magnésio, liberação de insulina pelo pâncreas, secreção de prolactina pela hipófise, inibição da síntese de renina, aumento da contratilidade miocárdica, manutenção da musculatura esquelética e depuração de creatinina endógena (6–10).

A $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ interfere de forma direta ou indireta no controle de mais de 200 genes envolvidos na regulação do ciclo celular, diferenciação, apoptose e angiogênese, podendo determinar diminuição da proliferação de células normais ou neoplásicas (189). Estudos com animais evidenciaram que a $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ pode suprimir o crescimento tumoral por indução da apoptose, inibição da angiogênese e redução da atividade invasiva das células cancerígenas (190). Na pele, atua de forma parácrina, inibindo a proliferação de queratinócitos e fibroblastos (162).

Vários efeitos imunomodulatórios também têm sido atribuídos a $1,25(\text{OH})_2\text{D}$. O sistema imune inato atua como primeira barreira na defesa contra invasão de micro-organismos e a presença de alguns peptídeos antimicrobianos tem sido um fator importante neste contexto. Em humanos, pode ser encontrada a catelicidina, um peptídeo antimicrobiano produzido por macrófagos, monócitos e queratinócitos, com grande atividade contra bactérias, micobactérias, vírus e fungos (191,192). A vitamina D ativada parece estimular a produção de catelicidina por estas células (193). Monócitos e macrófagos expostos a lipopolissacarídeos bacterianos ou à presença do *Mycobacterium tuberculosis* ativam o gene *VDR* e 1α -hidroxilase, levando ao aumento local da $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ e do seu receptor, o que eleva a produção de catelicidina. Esta resposta frente aos micro-organismos parece ser atenuada em indivíduos que apresentam deficiência de $25(\text{OH})\text{D}$ (194,195).

Como descrito anteriormente, a vitamina D tem efeitos conhecidos sobre diversas células do sistema imune, dentre elas linfócitos T CD4^+ e CD8^+ , linfócitos B, células dendríticas e macrófagos (181). Cada uma destas células expressa *VDR* e 1α -hidroxilase, podendo produzir $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ localmente. Seus efeitos parácrinos e autócrinos dependem da adequada concentração da $25(\text{OH})\text{D}$, o que faz da deficiência de vitamina D um fator crucial no funcionamento do sistema imune (14). Nos linfócitos podem ser verificadas as seguintes alterações relacionadas à vitamina D: supressão do receptor de célula T, alteração no perfil de citocinas (diminuição de $\text{IFN-}\gamma$, IL-22, IL-2 e $\text{TNF-}\alpha$ e aumento de $\text{TGF-}\beta$, IL-4, IL-5 e IL-10) e troca do fenótipo Th1 para Th2, com maior tolerância imunológica; supressão das células Th17 envolvidas na autoimunidade e redução da produção de IL-17; supressão da produção de IL-6 e IL-12 e IL-23; estímulo à atividade de células T regulatórias na supressão da proliferação de células T (196–205); inibição da produção de imunoglobulinas e diminuição e interrupção da diferenciação de células B (206–209).

Todos estes efeitos salientam o importante papel da vitamina D na resposta das células B e T, no processo inflamatório e na produção de autoanticorpos, o que potencialmente pode resultar em dano tecidual. Nas células dendríticas, os efeitos da vitamina D talvez sejam os mais relevantes para o fenômeno da autoimunidade, devido ao papel protetor e mantenedor da tolerância imunológica desempenhado por estas células, visto que a $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, atuando na sua maturação, diferenciação e migração, estimula a produção de células dendríticas mais tolerantes (210–216). Nos macrófagos, a $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ aumenta a maturação de monócitos em macrófagos, mas reduz simultaneamente a sua capacidade de apresentar antígenos para as células T, diminuindo a expressão do MHC de classe II e diminuindo as citocinas IL-1 β , IL-6, TNF- α e aumenta IL-10 (217–221).

2.5 VITAMINA D E LÚPUS

A vitamina D exerce inúmeras ações sobre o sistema imunológico e várias descobertas têm sido feitas a respeito da sua influência na etiopatogenia de algumas doenças autoimunes. Do ponto de vista das doenças autoimunes, o papel mais importante da vitamina D é sua capacidade de regular negativamente os mecanismos relacionados imunidade e induzir tolerância imunológica, bem como um efeito anti-inflamatório (222).

Em 1979, surgiu a primeira descrição que sugeriu a associação entre deficiência de vitamina D e LES em humanos. Foi um estudo com doze adolescentes lúpicas usuárias de glicocorticoides que evidenciou baixos níveis de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ em 7 delas (223). A literatura relata uma prevalência de insuficiência de vitamina D (entre 20 e 30 ng/ml) entre 38-96% em pacientes com LES e a prevalência de deficiência de vitamina D (menor que 20 ng/ml) entre 8 e 30% (178). Os baixos níveis de vitamina D nos pacientes com LES estão associados à exposição solar reduzida devido à fotossensibilidade, ao uso de fotoproteção, a alteração do metabolismo renal de vitamina D, entre outras (224). Os estudos demonstram uma associação entre baixa concentração de vitamina D e a atividade da doença no LES (225). Existem diversos trabalhos publicados na literatura avaliando níveis de vitamina D em pacientes com LES (226).

Há evidências de que a vitamina D reduz a chance de desenvolver doença autoimune em modelos murinos experimentais de artrite reumatoide, encefalite e lúpus (21,227,228). Visto que esta tese avaliou os efeitos da suplementação de vitamina D em modelo de lúpus induzido por pristane, os trabalhos discutidos a seguir são sobre os efeitos desta suplementação em modelos experimentais de lúpus.

Em 1992, foi publicado por Lemire e colaboradores o primeiro trabalho avaliando a influência da suplementação de vitamina D em modelo experimental de lúpus. Este trabalho utilizou o modelo espontâneo de MRL/lpr. Os animais foram suplementados com $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ na concentração de 0,1 e 0,15 pg por via intraperitoneal em dias alternados. Dentre os principais resultados, a suplementação com $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ inibiu completamente o aparecimento de lesões cutâneas e reduziu a proteinúria. Apesar destes resultados positivos, a redução na linfadenopatia, o retardo no início do aparecimento de proteinúria e a redução estatisticamente significativa nos níveis de anti-ssDNA não foram observados nestes animais (21).

Em um estudo brasileiro, realizado em 2000, Vaisberg e colaboradores utilizaram camundongos (NZBxW) F1, geneticamente predispostos a desenvolver lúpus, e suplementaram estes animais com colecalciferol nas concentrações de 3 e 10 ug por via intraperitoneal 1 vez por semana. Os animais apresentaram piores achados histopatológicos na biópsia renal no grupo que recebeu suplementação de vitamina D, sugerindo que a vitamina D pudesse ter atuado como fator agravante da doença (22). Estes dados não foram reproduzidos em outros estudos.

Após 15 anos sem atualizações sobre a suplementação de vitamina D e modelos de lúpus, Arab e colaboradores utilizaram o modelo de lúpus induzido por cromatina ativada em camundongos BALB/c e suplementaram estes animais com $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ na concentração de 50 ng por via oral diariamente. Neste estudo foi utilizado dois protocolos de tratamento: (a) um protocolo preventivo (início da suplementação 2 semanas antes da indução do modelo) e (b) um protocolo de tratamento (início do tratamento 2 semanas após o estabelecimento da doença). Tanto a suplementação preventiva quanto a suplementação como tratamento não foram capazes de reduzir os níveis de anti-dsDNA ou alterar os níveis de proteinúria, mas observou-se um aumento na expressão de Foxp3 e TGF- β e uma redução de

IL-6 e IL-10. Este trabalho também avaliou o efeito da suplementação nas células Treg. A porcentagem de células Treg no grupo que recebeu tratamento preventivo aumentou significativamente (23).

Em 2016, um trabalho avaliou os efeitos de uma dieta deficiente em vitamina D exposta aos camundongos MRL/lpr durante 6 semanas. Após este período os animais apresentaram baixos níveis séricos de 25(OH)D, confirmando a deficiência em vitamina D. Apesar dos níveis séricos de vitamina D baixos, os animais não apresentaram nenhuma anormalidade quanto ao peso corporal, alopecia, nos níveis séricos de anti-dsDNA e IgG total e no dano renal (proteinúria, histologia renal e depósito de IgG e C3 no rim) (24).

Em 2017, Ding e colaboradores exploraram os efeitos da 1,25(OH)₂D no modelo de MRL/lpr. A suplementação de 1,25(OH)₂D ocorreu na concentração de 5ug/kg através da via oral diariamente. A suplementação demonstrou um efeito protetivo, reduzindo as úlceras cutâneas e o dano renal (25). A tabela 2 apresenta resumo dos trabalhos publicados até o momento entre vitamina D e modelo experimental de lúpus.

Tabela 2. Modelos experimentais de lúpus e suplementação de vitamina D.

Modelo experimental	Forma da vitamina D	Concentração	Via de administração	Frequência	Resultados principais	Referências
Espontâneo						
	1,25(OH) ₂ D	0,1 e 0,15 pg	intraperitoneal	Dias alternados	Inibição das lesões de pele Redução da proteinúria Redução nos níveis de 25(OH)D Sem alterações nos níveis de anti-dsDNA, IgG total, proteinúria, histologia renal e depósito de IgG e C3. Redução das úlceras cutâneas	Lemire e colaboradores, 1992 (21)
MRL/lpr	Dieta deficiente em vitamina D	N/A	N/A	N/A	Redução do dano renal	Reynolds e colaboradores, 2016 (24)
	1,25(OH) ₂ D	5ug/kg	oral	Diariamente	Redução do dano renal	Ding e colaboradores, 2017 (25)
(NZBxW)F1	Colecalciferol	3 e 10 ug	intraperitoneal	Semanalmente	Piora da histologia renal	Vaisberg e colaboradores, 2000 (22)

Induzido

Cromatina ativada	1,25(OH) ₂ D	50 ng	oral	Diariamente	Aumento de Foxp3 e TGF- β Redução de IL- 6 e IL-10	Arab e colaboradores, 2015 (23)
----------------------	-------------------------	-------	------	-------------	---	------------------------------------

3. MARCO CONCEITUAL

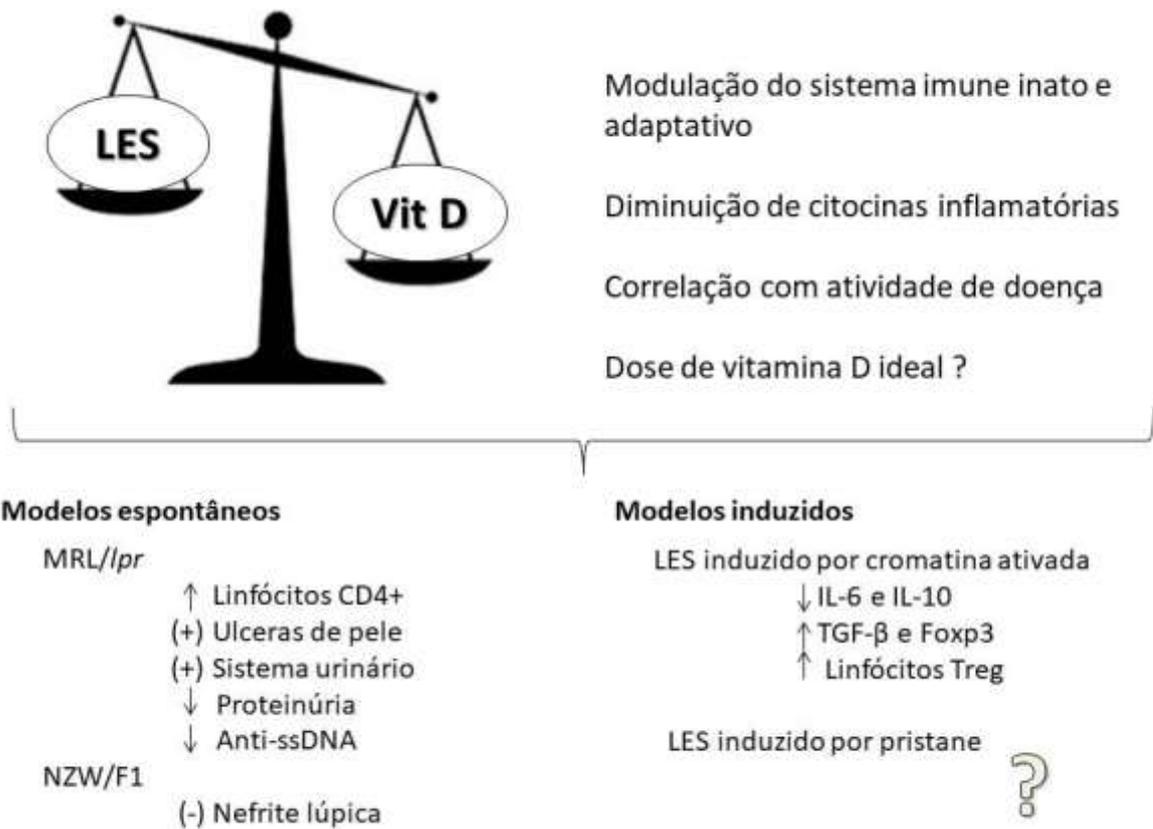


Figura 6. Marco teórico do presente trabalho. ssDNA: DNA de cadeia simples; (+): melhora; (-): piora;

4. JUSTIFICATIVA

O uso da suplementação de vitamina D em pacientes com doenças autoimunes é uma recomendação comum. Contudo ainda são controversos os estudos que observam as mudanças no processo crônico dos LES, bem como quais os mecanismos de imunomodulação da vitamina D. Devido à heterogeneidade da doença e as diferenças interpessoais quanto aos efeitos da vitamina D no organismo em humanos, estudos experimentais podem 1,25(OH)₂D.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o desenvolvimento e evolução de LES após suplementação de vitamina D em modelo experimental de lúpus induzido por pristane.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estudar a ação da suplementação de vitamina D nas manifestações clínicas do LES induzido por pristane através de:

- a. Avaliação de escore clínico articular;
- b. Avaliação de nocicepção articular;
- c. Avaliação de edema articular;

2. Estudar a ação da suplementação de vitamina D nas manifestações laboratoriais do LES induzido por pristane através de:

- a. Deposição de IgM e IgG nos rins (glomérulo);
- b. Quantificação de mediadores inflamatórios sistêmicos;

3. Determinar os padrões histopatológicos no rim e na articulação;

6. REFERÊNCIAS DA REVISÃO SISTEMÁTICA DA LITERATURA

1. Pons-Estel GJ, Alarcón GS, Scofield L, Reinlib L, Cooper GS. Understanding the epidemiology and progression of systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum*. 2010 Feb;39(4):257–68.
2. DeLuca HF. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *Am J Clin Nutr*. 2004;80(6 Suppl):1689S–96S.
3. Yamada S, Yamamoto K, Masuno H, Choi M. Three-dimensional structure-function relationship of vitamin D and vitamin D receptor model. *Steroids*. 2001;66(3–5):177–87.
4. Braidman IP, Anderson DC. Extra-endocrine functions of vitamin D. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1985;23(4):445–60.
5. Cross HS. Extrarenal Vitamin D Hydroxylase Expression and Activity in Normal and Malignant Cells: Modification of Expression by Epigenetic Mechanisms and Dietary Substances. *Nutr Rev*. 2008;65(8 pt 2):S108-12.
6. Fonseca V, Mohiuddin J, Weerakoon J, Boss M, Mikhailidis DP, Dandona P. Plasma creatinine and creatinine clearance in nutritional osteomalacia. *Lancet (London, England)*. 1984 May 19;1(8386):1093–5.
7. Walters MR. Newly Identified Actions of the Vitamin D Endocrine System. *Endocr Rev*. 1992 Nov;13(4):719–64.
8. Li YC. Vitamin D regulation of the renin-angiotensin system. *J Cell Biochem*. 2003;88(2):327–31.
9. Chiu KC, Chu A, Go VLW, Saad MF. Hypovitaminosis D is associated with insulin resistance and beta cell dysfunction. *Am J Clin Nutr*. 2004;79(5):820–5.
10. Pfeifer M, Begerow B, Minne HW. Vitamin D and muscle function. Vol. 13, *Osteoporosis International*. 2002. p. 187–94.
11. Verstuyf A, Bouillon R. Vitamin D and cancer. *Cell Cycle*. 2013;12(7):1018–1018.
12. Arnson Y, Amital H, Shoenfeld Y. Vitamin D and autoimmunity: new

- aetiological and therapeutic considerations. *Ann Rheum Dis.* 2007 Sep;66(9):1137–42.
13. Deluca HF, Cantorna MT. Vitamin D: its role and uses in immunology. *FASEB J.* 2001 Dec;15(14):2579–85.
 14. Kamen DL, Tangpricha V. Vitamin D and molecular actions on the immune system: modulation of innate and autoimmunity. *J Mol Med (Berl).* 2010;88(5):441–50.
 15. Graham RR, Kozyrev S V, Baechler EC, Reddy MVPL, Plenge RM, Bauer JW, et al. A common haplotype of interferon regulatory factor 5 (IRF5) regulates splicing and expression and is associated with increased risk of systemic lupus erythematosus. *Nat Genet.* 2006;38(5):550–5.
 16. Kariuki SN, Crow MK, Niewold TB. The PTPN22 C1858T polymorphism is associated with skewing of cytokine profiles toward high interferon-alpha activity and low tumor necrosis factor alpha levels in patients with lupus. *Arthritis Rheum.* 2008 Sep;58(9):2818–23.
 17. Kariuki SN, Kirou KA, MacDermott EJ, Barillas-Arias L, Crow MK, Niewold TB. Cutting edge: autoimmune disease risk variant of STAT4 confers increased sensitivity to IFN-alpha in lupus patients in vivo. *J Immunol.* 2009 Jan 1;182(1):34–8.
 18. Niewold TB, Kelly JA, Flesch MH, Espinoza LR, Harley JB, Crow MK. Association of the IRF5 risk haplotype with high serum interferon-alpha activity in systemic lupus erythematosus patients. *Arthritis Rheum.* 2008;58(8):2481–7.
 19. Perry D, Sang A, Yin Y, Zheng Y-Y, Morel L. Murine models of systemic lupus erythematosus. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:271694.
 20. Isenberg. Lupus-molecular and cellular pathogenesis. *Ann Rheum Dis.* 2000;59(3):172A–172.
 21. Lemire JM, Ince A, Takashima M. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 attenuates the expression of experimental murine lupus of MRL/l mice. *Autoimmunity.* 1992;12(2):143–8.

22. Vaisberg MW, Kaneno R, Franco MF, Mendes NF. Influence of cholecalciferol (vitamin D3) on the course of experimental systemic lupus erythematosus in F1 (NZBxW) mice. *J Clin Lab Anal.* 2000;14(3):91–6.
23. Lavi Arab F, Rastin M, Faraji F, Zamani Taghizadeh Rabe S, Tabasi N, Khazaee M, et al. Assessment of 1,25-dihydroxyvitamin D3 effects on Treg cells in a mouse model of systemic lupus erythematosus. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2015;37(1):12–8.
24. Reynolds JA, Rosenberg AZ, Smith CK, Sergeant JC, Rice GI, Briggs TA, et al. Brief Report: Vitamin D Deficiency Is Associated With Endothelial Dysfunction and Increases Type I Interferon Gene Expression in a Murine Model of Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheumatol (Hoboken, NJ).* 2016;68(12):2929–35.
25. Ding Y, Liao W, He X-J, Xiang W. Effects of 1,25(OH)₂ D₃ and vitamin D receptor on peripheral CD4⁺ /CD8⁺ double-positive T lymphocytes in a mouse model of systemic lupus erythematosus. *J Cell Mol Med.* 2017;21(5):975–85.
26. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1982;25(11):1271–7.
27. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1997;40(9):1725.
28. Petri M, Orbai A-M, Alarcón GS, Gordon C, Merrill JT, Fortin PR, et al. Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2012 Aug;64(8):2677–86.
29. Nasonov E, Soloviev S, Davidson JE, Lila A, Ivanova R, Togizbayev G, et al. The prevalence and incidence of systemic lupus erythematosus (SLE) in selected cities from three Commonwealth of Independent States countries (the Russian Federation, Ukraine and Kazakhstan). *Lupus.* 2014;23(2):213–9.
30. Feldman CH, Hiraki LT, Liu J, Fischer MA, Solomon DH, Alarcón GS, et al.

- Epidemiology and sociodemographics of systemic lupus erythematosus and lupus nephritis among US adults with Medicaid coverage, 2000-2004. *Arthritis Rheum.* 2013;65(3):753–63.
31. Pons-Estel GJ, Ugarte-Gil MF, Alarcón GS. Epidemiology of systemic lupus erythematosus. *Expert Rev Clin Immunol.* 2017;13(8):799–814.
 32. Huemer C, Huemer M, Dorner T, Falger J, Schacherl H, Bernecker M, et al. Incidence of pediatric rheumatic diseases in a regional population in Austria. *J Rheumatol.* 2001;28(9):2116–9.
 33. Stojan G, Petri M. Epidemiology of systemic lupus erythematosus: an update. *Curr Opin Rheumatol.* 2017;30(2):144–50.
 34. Housey M, DeGuire P, Lyon-Callo S, Wang L, Marder W, McCune WJ, et al. Incidence and prevalence of systemic lupus erythematosus among Arab and Chaldean Americans in southeastern Michigan: the Michigan Lupus Epidemiology and Surveillance Program. *Am J Public Health.* 2015;105(5):e74-9.
 35. Al Dhanhani AM, Agarwal M, Othman YS, Bakoush O. Incidence and prevalence of systemic lupus erythematosus among the native Arab population in UAE. *Lupus.* 2017;26(6):664–9.
 36. Rees F, Doherty M, Grainge MJ, Lanyon P, Zhang W. The worldwide incidence and prevalence of systemic lupus erythematosus: a systematic review of epidemiological studies. *Rheumatology (Oxford).* 2017;56(11):1945–61.
 37. Taylor HG, Stein CM. Systemic lupus erythematosus in Zimbabwe. *Ann Rheum Dis.* 1986 Aug;45(8):645–8.
 38. Vilar MJP, Sato EI. Estimating the incidence of systemic lupus erythematosus in a tropical region (Natal, Brazil). *Lupus.* 2002;11(8):528–32.
 39. Senna ER, De Barros ALP, Silva EO, Costa IF, Pereira LVB, Ciconelli RM, et al. Prevalence of rheumatic diseases in Brazil: a study using the COPCORD approach. *J Rheumatol.* 2004;31(3):594–7.
 40. López P, Mozo L, Gutiérrez C, Suárez A. Epidemiology of systemic lupus

- erythematosus in a northern Spanish population: gender and age influence on immunological features. *Lupus*. 2003;12(11):860–5.
41. Petri M. Epidemiology of systemic lupus erythematosus. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2002;16(5):847–58.
 42. Michet CJ, McKenna CH, Elveback LR, Kaslow RA, Kurland LT. Epidemiology of systemic lupus erythematosus and other connective tissue diseases in Rochester, Minnesota, 1950 through 1979. *Mayo Clin Proc*. 1985 Feb;60(2):105–13.
 43. Flower C, Hennis AJM, Hambleton IR, Nicholson GD, Liang MH, Barbados National Lupus Registry Group. Systemic lupus erythematosus in an African Caribbean population: incidence, clinical manifestations, and survival in the Barbados National Lupus Registry. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2012 Aug;64(8):1151–8.
 44. Moulton VR. Sex Hormones in Acquired Immunity and Autoimmune Disease. *Front Immunol*. 2018;9:2279.
 45. Petri M. Sex hormones and systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2008;17(5):412–5.
 46. Strickland FM, Hewagama A, Lu Q, Wu A, Hinderer R, Webb R, et al. Environmental exposure, estrogen and two X chromosomes are required for disease development in an epigenetic model of lupus. *J Autoimmun*. 2012;38(2–3):J135-43.
 47. Rees F, Doherty M, Grainge M, Davenport G, Lanyon P, Zhang W. The incidence and prevalence of systemic lupus erythematosus in the UK, 1999-2012. *Ann Rheum Dis*. 2016;75(1):136–41.
 48. Lerang K, Gilboe I, Garen T, Thelle DS, Gran JT. High incidence and prevalence of systemic lupus erythematosus in Norway. *Lupus*. 2012;21(12):1362–9.
 49. McCarty DJ, Manzi S, Medsger TA, Ramsey-Goldman R, LaPorte RE, Kwok CK. Incidence of systemic lupus erythematosus. Race and gender differences.

- Arthritis Rheum. 1995;38(9):1260–70.
50. Petri M, Perez-Gutthann S, Longenecker JC, Hochberg M. Morbidity of systemic lupus erythematosus: role of race and socioeconomic status. *Am J Med.* 1991;91(4):345–53.
 51. Reveille JD, Moulds JM, Ahn C, Friedman AW, Baethge B, Roseman J, et al. Systemic lupus erythematosus in three ethnic groups: I. The effects of HLA class II, C4, and CR1 alleles, socioeconomic factors, and ethnicity at disease onset. LUMINA Study Group. *Lupus in minority populations, nature versus nurture.* *Arthritis Rheum.* 1998;41(7):1161–72.
 52. Fernández M, Alarcón GS, Calvo-Alén J, Andrade R, McGwin G, Vilá LM, et al. A multiethnic, multicenter cohort of patients with systemic lupus erythematosus (SLE) as a model for the study of ethnic disparities in SLE. *Arthritis Rheum.* 2007;57(4):576–84.
 53. Bae SC, Fraser P, Liang MH. The epidemiology of systemic lupus erythematosus in populations of African ancestry: a critical review of the “prevalence gradient hypothesis”. *Arthritis Rheum.* 1998;41(12):2091–9.
 54. Hart HH, Grigor RR, Caughey DE. Ethnic difference in the prevalence of systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.* 1983 Oct;42(5):529–32.
 55. Serdula MK, Rhoads GG. Frequency of systemic lupus erythematosus in different ethnic groups in Hawaii. *Arthritis Rheum.* 1979;22(4):328–33.
 56. Merrell M, Shulman LE. Determination of prognosis in chronic disease, illustrated by systemic lupus erythematosus. *J Chronic Dis.* 1955;1(1):12–32.
 57. Bernatsky S, Boivin J-F, Joseph L, Manzi S, Ginzler E, Gladman DD, et al. Mortality in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2006;54(8):2550–7.
 58. Kasitanon N, Magder LS, Petri M. Predictors of survival in systemic lupus erythematosus. *Medicine (Baltimore).* 2006;85(3):147–56.
 59. Doria A, Iaccarino L, Ghirardello A, Zampieri S, Arienti S, Sarzi-Puttini P, et al. Long-term prognosis and causes of death in systemic lupus erythematosus.

- Am J Med. 2006;119(8):700–6.
60. Bellomio V, Spindler A, Lucero E, Berman A, Santana M, Moreno C, et al. Systemic lupus erythematosus: mortality and survival in Argentina. A multicenter study. *Lupus*. 2000;9(5):377–81.
 61. Abu-Shakra M, Gladman DD, Urowitz MB. Mortality studies in SLE: how far can we improve survival of patients with SLE. *Autoimmun Rev*. 2004;3(6):418–20.
 62. Borchers AT, Keen CL, Shoenfeld Y, Gershwin ME. Surviving the butterfly and the wolf: mortality trends in systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev*. 2004;3(6):423–53.
 63. Urowitz MB, Bookman AA, Koehler BE, Gordon DA, Smythe HA, Ogryzlo MA. The bimodal mortality pattern of systemic lupus erythematosus. *Am J Med*. 1976;60(2):221–5.
 64. Cartella S, Cavazzana I, Ceribelli A, Inverardi F, Tincani A, Franceschini F. Evaluation of mortality, disease activity, treatment, clinical and immunological features of adult and late onset systemic Lupus erythematosus. *Autoimmunity*. 2013;46(6):363–8.
 65. Lee YH, Choi SJ, Ji JD, Song GG. Overall and cause-specific mortality in systemic lupus erythematosus: an updated meta-analysis. *Lupus*. 2016;25(7):727–34.
 66. Waldman M, Appel GB. Update on the treatment of lupus nephritis. *Kidney Int*. 2006;70(8):1403–12.
 67. Costi LR, Iwamoto HM, Neves DC de O, Caldas CAM. Mortality from systemic erythematosus lupus in Brazil: evaluation of causes according to the government health database. *Rev Bras Reumatol*. 2017;57(6):574–82.
 68. Moser KL, Kelly JA, Lessard CJ, Harley JB. Recent insights into the genetic basis of systemic lupus erythematosus. *Genes Immun*. 2009 Jul;10(5):373–9.
 69. Zharkova O, Celhar T, Cravens PD, Satterthwaite AB, Fairhurst AM, Davis LS. Pathways leading to an immunological disease: systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)*. 2017;56(1):i55–66.

70. Rose T, Dörner T. Drivers of the immunopathogenesis in systemic lupus erythematosus. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2017;31(3):321–33.
71. Alarcón-Segovia D, Alarcón-Riquelme ME, Cardiel MH, Caeiro F, Massardo L, Villa AR, et al. Familial aggregation of systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, and other autoimmune diseases in 1,177 lupus patients from the GLADEL cohort. *Arthritis Rheum*. 2005 Apr;52(4):1138–47.
72. Deapen D, Escalante A, Weinrib L, Horwitz D, Bachman B, Roy-Burman P, et al. A revised estimate of twin concordance in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1992 Mar;35(3):311–8.
73. Sestak AL, Shaver TS, Moser KL, Neas BR, Harley JB. Familial aggregation of lupus and autoimmunity in an unusual multiplex pedigree. *J Rheumatol*. 1999;26(7):1495–9.
74. Arora-Singh RK, Assassi S, del Junco DJ, Arnett FC, Perry M, Irfan U, et al. Autoimmune diseases and autoantibodies in the first degree relatives of patients with systemic sclerosis. *J Autoimmun*. 2010;35(1):52–7.
75. Arnett FC, Reveille JD, Wilson RW, Provost TT, Bias WB. Systemic lupus erythematosus: current state of the genetic hypothesis. *Semin Arthritis Rheum*. 1984;14(1):24–35.
76. Botto M, Kirschfink M, Macor P, Pickering MC, Würzner R, Tedesco F. Complement in human diseases: Lessons from complement deficiencies. *Mol Immunol*. 2009;46(14):2774–83.
77. Yang Y, Lhotta K, Chung EK, Eder P, Neumair F, Yu CY. Complete complement components C4A and C4B deficiencies in human kidney diseases and systemic lupus erythematosus. *J Immunol*. 2004;173(4):2803–14.
78. Lee-Kirsch MA, Gong M, Chowdhury D, Senenko L, Engel K, Lee Y-A, et al. Mutations in the gene encoding the 3'-5' DNA exonuclease TREX1 are associated with systemic lupus erythematosus. *Nat Genet*. Nature Publishing Group; 2007;39(9):1065–7.
79. Rice GI, Rodero MP, Crow YJ. Human disease phenotypes associated with

- mutations in TREX1. *J Clin Immunol*. Springer US; 2015;35(3):235–43.
80. Taylor KE, Chung SA, Graham RR, Ortmann WA, Lee AT, Langefeld CD, et al. Risk Alleles for Systemic Lupus Erythematosus in a Large Case-Control Collection and Associations with Clinical Subphenotypes. McCarthy MI, editor. *PLoS Genet*. 2011 Feb 17;7(2):e1001311.
 81. Hom G, Graham RR, Modrek B, Taylor KE, Ortmann W, Garnier S, et al. Association of systemic lupus erythematosus with C8orf13-BLK and ITGAM-ITGAX. *N Engl J Med*. 2008;358(9):900–9.
 82. Deng Y, Tsao BP. Genetic susceptibility to systemic lupus erythematosus in the genomic era. *Nat Rev Rheumatol*. 2010;6(12):683–92.
 83. Chen L, Morris DL, Vyse TJ. Genetic advances in systemic lupus erythematosus: An update. *Curr Opin Rheumatol*. 2017;29(5):423–33.
 84. Nies KM, Brown JC, Dubois EL, Quismorio FP, Friou GJ, Terasaki PI. Histocompatibility (HL-A) antigens and lymphocytotoxic antibodies in systemic lupus erythematosus (SLE). *Arthritis Rheum*. 1974;17(4):397–402.
 85. Reinertsen JL, Klippel JH, Johnson AH, Steinberg AD, Decker JL, Mann DL. B-lymphocyte alloantigens associated with systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med*. 1978;299(10):515–8.
 86. Barcellos LF, May SL, Ramsay PP, Quach HL, Lane JA, Nititham J, et al. High-density SNP screening of the major histocompatibility complex in systemic lupus erythematosus demonstrates strong evidence for independent susceptibility regions. *PLoS Genet*. 2009;5(10):e1000696.
 87. Bentham J, Morris DL, Graham DSC, Pinder CL, Tombleson P, Behrens TW, et al. Genetic association analyses implicate aberrant regulation of innate and adaptive immunity genes in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Nat Genet*. 2015;47(12):1457–64.
 88. Monticielo OA, Chies JAB, Mucenic T, Rucatti GG, Júnior JMZ, da Silva GK, et al. Mannose-binding lectin gene polymorphisms in Brazilian patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*. SAGE PublicationsSage UK: London,

- England; 2010;19(3):280–7.
89. Blank MC, Stefanescu RN, Masuda E, Marti F, King PD, Redecha PB, et al. Decreased transcription of the human FCGR2B gene mediated by the -343 G/C promoter polymorphism and association with systemic lupus erythematosus. *Hum Genet.* Springer-Verlag; 2005;117(2–3):220–7.
 90. Jönsen A, Gunnarsson I, Gullstrand B, Svenungsson E, Bengtsson AA, Nived O, et al. Association between SLE nephritis and polymorphic variants of the CRP and FcgammaRIIIa genes. *Rheumatology (Oxford).* 2007 Sep;46(9):1417–21.
 91. Enocsson H, Sjöwall C, Kastbom A, Skogh T, Eloranta M-L, Rönnblom L, et al. Association of Serum C-Reactive Protein Levels With Lupus Disease Activity in the Absence of Measurable Interferon- α and a C-Reactive Protein Gene Variant. *Arthritis Rheumatol.* 2014;66(6):1568–73.
 92. Lea WW, Lee YH. The association between the PTPN22 C1858T polymorphism and systemic lupus erythematosus: a meta-analysis update. *Lupus.* 2011;20(1):51–7.
 93. Manku H, Graham DSC, Vyse TJ. Association of the co-stimulator OX40L with systemic lupus erythematosus. *J Mol Med (Berl).* Springer-Verlag; 2009;87(3):229–34.
 94. Gao J, Gai N, Wang L, Liu K, Liu X-H, Wei L-T, et al. Meta-analysis of programmed cell death 1 polymorphisms with systemic lupus erythematosus risk. *Oncotarget.* 2017;8(22):36885–97.
 95. Chung SA, Taylor KE, Graham RR, Nititham J, Lee AT, Ortmann WA, et al. Differential genetic associations for systemic lupus erythematosus based on anti-dsDNA autoantibody production. de Bakker PIW, editor. *PLoS Genet.* 2011;7(3):e1001323.
 96. Lu R, Vidal GS, Kelly JA, Delgado-Vega AM, Howard XK, Macwana SR, et al. Genetic associations of LYN with systemic lupus erythematosus. *Genes Immun.* 2009;10(5):397–403.

97. Coustet B, Dieudé P, Guedj M, Bouaziz M, Avouac J, Ruiz B, et al. C8orf13-BLK is a genetic risk locus for systemic sclerosis and has additive effects with BANK1: results from a large french cohort and meta-analysis. *Arthritis Rheum.* 2011;63(7):2091–6.
98. Kyogoku C, Langefeld CD, Ortmann WA, Lee A, Selby S, Carlton VEH, et al. Genetic association of the R620W polymorphism of protein tyrosine phosphatase PTPN22 with human SLE. *Am J Hum Genet.* 2004;75(3):504–7.
99. Dang J, Shan S, Li J, Zhao H, Xin Q, Liu Y, et al. Gene-gene interactions of IRF5, STAT4, IKZF1 and ETS1 in systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens.* 2014;83(6):401–8.
100. Jacob CO, Zhu J, Armstrong DL, Yan M, Han J, Zhou XJ, et al. Identification of IRAK1 as a risk gene with critical role in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(15):6256–61.
101. D'Alfonso S, Barizzone N, Giordano M, Chiocchetti A, Magnani C, Castelli L, et al. Two single-nucleotide polymorphisms in the 5' and 3' ends of the osteopontin gene contribute to susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* Wiley-Blackwell; 2005;52(2):539–47.
102. Ghaly MS, Badra DI, Dessouki O, Elmaraghy NN, Hassan R. Vitamin D receptor Fok1 & Bsm 1 Gene Polymorphisms in Systemic Lupus Erythematosus and Osteoarthritis: Autoimmune Inflammatory versus Degenerative Model. *Egypt J Immunol.* 2017;24(2):151–64.
103. Monticielo OA, Teixeira TDM, Chies JAB, Brenol JCT, Xavier RM. Vitamin D and polymorphisms of VDR gene in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol.* 2012;31(10):1411–21.
104. Lee YH, Bae S-C, Choi SJ, Ji JD, Song GG. Associations between vitamin D receptor polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Mol Biol Rep.* 2011;38(6):3643–51.
105. Theofilopoulos AN. The basis of autoimmunity: Part II. Genetic predisposition. *Immunol Today.* Elsevier Current Trends; 1995;16(3):150–9.

106. Cutolo M, Sulli A, Seriolo B, Accardo S, Masi AT. Estrogens, the immune response and autoimmunity. *Clin Exp Rheumatol*. 13(2):217–26.
107. Cohen-Solal JFG, Jeganathan V, Grimaldi CM, Peeva E, Diamond B. Sex hormones and SLE: influencing the fate of autoreactive B cells. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2006;305:67–88.
108. Lahita RG. Sex hormones and the immune system--Part 1. Human data. *Baillieres Clin Rheumatol*. 1990;4(1):1–12.
109. McMurray RW, May W. Sex hormones and systemic lupus erythematosus: review and meta-analysis. *Arthritis Rheum*. 2003;48(8):2100–10.
110. Scofield RH, Bruner GR, Namjou B, Kimberly RP, Ramsey-Goldman R, Petri M, et al. Klinefelter's syndrome (47,XXY) in male systemic lupus erythematosus patients: support for the notion of a gene-dose effect from the X chromosome. *Arthritis Rheum*. NIH Public Access; 2008;58(8):2511–7.
111. Cooney CM, Bruner GR, Aberle T, Namjou-Khales B, Myers LK, Feo L, et al. 46,X,del(X)(q13) Turner's syndrome women with systemic lupus erythematosus in a pedigree multiplex for SLE. *Genes Immun*. 2009;10(5):478–81.
112. Rullo OJ, Tsao BP. Recent insights into the genetic basis of systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*. 2013 Apr;72(suppl 2):ii56-ii61.
113. Costenbader KH, Feskanich D, Stampfer MJ, Karlson EW. Reproductive and menopausal factors and risk of systemic lupus erythematosus in women. *Arthritis Rheum*. 2007;56(4):1251–62.
114. Lateef A, Petri M. Hormone replacement and contraceptive therapy in autoimmune diseases. *J Autoimmun*. Academic Press; 2012;38(2–3):J170-6.
115. Hughes GC, Choubey D. Modulation of autoimmune rheumatic diseases by oestrogen and progesterone. *Nat Rev Rheumatol*. 2014 Dec 26;10(12):740–51.
116. Clemens LE, Siiteri PK, Stites DP. Mechanism of immunosuppression of progesterone on maternal lymphocyte activation during pregnancy. *J Immunol*.

- American Association of Immunologists; 1979;122(5):1978–85.
117. Borba VV, Zandman-Goddard G, Shoenfeld Y. Prolactin and Autoimmunity. *Front Immunol. Frontiers Media SA*; 2018;9:73.
 118. Cárdenas-Mondragón G, Ulloa-Aguirre A, Isordia-Salas I, Goffin V, Leaños-Miranda A. Elevated serum bioactive prolactin concentrations in patients with systemic lupus erythematosus are associated with disease activity as disclosed by homologous receptor bioassays. *J Rheumatol.* 2007;34(7):1514–21.
 119. Weetman AP, Walport MJ. The association of autoimmune thyroiditis with systemic lupus erythematosus. *Br J Rheumatol.* 1987;26(5):359–61.
 120. Cutolo M, Pizzorni C, Sulli A. Vitamin D endocrine system involvement in autoimmune rheumatic diseases. *Autoimmun Rev.* 2011;11(2):84–7.
 121. Sassi F, Tamone C, D'Amelio P. Vitamin D: Nutrient, Hormone, and Immunomodulator. *Nutrients. Multidisciplinary Digital Publishing Institute*; 2018;10(11):1656.
 122. Dall'Ara F, Cutolo M, Andreoli L, Tincani A, Paolino S. Vitamin D and systemic lupus erythematosus: a review of immunological and clinical aspects. *Clin Exp Rheumatol.* 36(1):153–62.
 123. Lino AC, Dörner T, Bar-Or A, Fillatreau S. Cytokine-producing B cells: a translational view on their roles in human and mouse autoimmune diseases. *Immunol Rev. Wiley/Blackwell (10.1111)*; 2016;269(1):130–44.
 124. Mahajan A, Herrmann M, Muñoz LE. Clearance Deficiency and Cell Death Pathways: A Model for the Pathogenesis of SLE. *Front Immunol.* 2016;7:35.
 125. Petri M, Stohl W, Chatham W, McCune WJ, Chevrier M, Ryel J, et al. Association of plasma B lymphocyte stimulator levels and disease activity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2008;58(8):2453–9.
 126. Cancro MP, D'Cruz DP, Khamashta MA. The role of B lymphocyte stimulator (BLyS) in systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest.* 2009 May 1;119(5):1066–73.

127. Konya C, Goronzy JJ, Weyand CM. Treating autoimmune disease by targeting CD8(+) T suppressor cells. *Expert Opin Biol Ther.* 2009;9(8):951–65.
128. Ohl K, Tenbrock K. Regulatory T cells in systemic lupus erythematosus. *Eur J Immunol.* 2015;45(2):344–55.
129. Kim SJ, Lee K, Diamond B. Follicular Helper T Cells in Systemic Lupus Erythematosus. *Front Immunol.* 2018;9:1793.
130. Suárez-Fueyo A, Bradley SJ, Tsokos GC. T cells in Systemic Lupus Erythematosus. *Curr Opin Immunol.* 2016;43:32–8.
131. Tsubata T. B-cell tolerance and autoimmunity. *F1000Research.* 2017;6:391.
132. Stevens AM. Microchimeric cells in systemic lupus erythematosus: targets or innocent bystanders? *Lupus.* 2006;15(11):820–6.
133. Chasset F, Arnaud L. Targeting interferons and their pathways in systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev.* 2018;17(1):44–52.
134. Muskardin TLW, Niewold TB. Type I interferon in rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol.* 2018;14(4):214–28.
135. Wu Y-W, Tang W, Zuo J-P. Toll-like receptors: potential targets for lupus treatment. *Acta Pharmacol Sin.* 2015;36(12):1395–407.
136. Devarapu SK, Anders H-J. Toll-like receptors in lupus nephritis. *J Biomed Sci.* 2018;25(1):35.
137. Parks CG, de Souza Espindola Santos A, Barbhaiya M, Costenbader KH. Understanding the role of environmental factors in the development of systemic lupus erythematosus. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2017;31(3):306–20.
138. Miller FW, Alfredsson L, Costenbader KH, Kamen DL, Nelson LM, Norris JM, et al. Epidemiology of environmental exposures and human autoimmune diseases: findings from a National Institute of Environmental Health Sciences Expert Panel Workshop. *J Autoimmun.* 2012;39(4):259–71.
139. Li Z-X, Zeng S, Wu H-X, Zhou Y. The risk of systemic lupus erythematosus associated with Epstein-Barr virus infection: a systematic review and meta-

- analysis. *Clin Exp Med*. 2018;
140. Nelson P, Rylance P, Roden D, Trela M, Tugnet N. Viruses as potential pathogenic agents in systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2014;23(6):596–605.
 141. Kuhn A, Wenzel J, Weyd H. Photosensitivity, apoptosis, and cytokines in the pathogenesis of lupus erythematosus: a critical review. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2014;47(2):148–62.
 142. Li W, Titov AA, Morel L. An update on lupus animal models. *Curr Opin Rheumatol*. 2017;29(5):434–41.
 143. Zhuang H, Szeto C, Han S, Yang L, Reeves WH. Animal Models of Interferon Signature Positive Lupus. *Front Immunol*. 2015;6(June):291.
 144. Reeves WH, Lee PY, Weinstein JS, Satoh M, Lu L. Induction of autoimmunity by pristane and other naturally occurring hydrocarbons. *Trends Immunol*. 2009;30(9):455–64.
 145. Smith DL, Dong X, Du S, Oh M, Singh RR, Voskuhl RR. A female preponderance for chemically induced lupus in SJL/J mice. *Clin Immunol*. 2007;122(1):101–7.
 146. Satoh M, Richards HB, Shaheen VM, Yoshida H, Shaw M, Naim JO, et al. Widespread susceptibility among inbred mouse strains to the induction of lupus autoantibodies by pristane. *Clin Exp Immunol*. 2000;121(2):399–405.
 147. Anderson PH. Vitamin D Activity and Metabolism in Bone. *Curr Osteoporos Rep*. 2017;15(5):443–9.
 148. Christakos S, Dhawan P, Verstuyf A, Verlinden L, Carmeliet G. Vitamin D: Metabolism, Molecular Mechanism of Action, and Pleiotropic Effects. *Physiol Rev*. 2016 Jan;96(1):365–408.
 149. de Castro LCG. O sistema endocrinológico vitamina D. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2011;55(8):566–75.
 150. Wacker M, Holick MF. Sunlight and Vitamin D: A global perspective for health.

- Dermatoendocrinol. 2013;5(1):51–108.
151. Cardwell G, Bornman JF, James AP, Black LJ. A Review of Mushrooms as a Potential Source of Dietary Vitamin D. *Nutrients*. 2018;10(10):1498.
 152. Göring H. Vitamin D in Nature: A Product of Synthesis and/or Degradation of Cell Membrane Components. *Biochemistry (Mosc)*. 2018;83(11):1350–7.
 153. Bouillon R, Carmeliet G. Vitamin D insufficiency: Definition, diagnosis and management. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. Baillière Tindall; 2018;32(5):669–84.
 154. Carlberg C. Vitamin D Genomics: From In Vitro to In Vivo. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9(MAY):250.
 155. Wang T-T, Tavera-Mendoza LE, Laperriere D, Libby E, MacLeod NB, Nagai Y, et al. Large-scale in silico and microarray-based identification of direct 1,25-dihydroxyvitamin D3 target genes. *Mol Endocrinol*. 2005;19(11):2685–95.
 156. Colotta F, Jansson B, Bonelli F. Modulation of inflammatory and immune responses by vitamin D. *J Autoimmun*. Academic Press; 2017;85:78–97.
 157. Ros-Soto J, Anthias C, Madrigal A, Snowden JA. Vitamin D: is it important in haematopoietic stem cell transplantation? A review. *Bone Marrow Transplant*. Springer US; 2018;
 158. Uitterlinden AG, Fang Y, van Meurs JBJ, van Leeuwen H, Pols HAP. Vitamin D receptor gene polymorphisms in relation to Vitamin D related disease states. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2004;89–90(1–5):187–93.
 159. Valdivielso JM, Fernandez E. Vitamin D receptor polymorphisms and diseases. *Clin Chim Acta*. 2006;371(1–2):1–12.
 160. Reichrath J, Zouboulis CC, Vogt T, Holick MF. Targeting the vitamin D endocrine system (VDES) for the management of inflammatory and malignant skin diseases: An historical view and outlook. *Rev Endocr Metab Disord*. 2016;17(3):405–17.
 161. Reichrath J. Vitamin D and the skin: an ancient friend, revisited. *Exp Dermatol*.

- 2007;16(7):618–25.
162. Premaor MO, Furlanetto TW. Hipovitaminose D em Adultos: Entendendo Melhor a Apresentação de Uma Velha Doença. *Arq Bras Endocrinol.* 2006;50(1):25–37.
 163. Baeke F, Takiishi T, Korf H, Gysemans C, Mathieu C. Vitamin D: modulator of the immune system. *Curr Opin Pharmacol.* 2010;10(4):482–96.
 164. Kitson MT, Roberts SK. D-livering the message: the importance of vitamin D status in chronic liver disease. *J Hepatol.* 2012;57(4):897–909.
 165. Takeyama K, Kitanaka S, Sato T, Kobori M, Yanagisawa J, Kato S. 25-Hydroxyvitamin D3 1alpha-hydroxylase and vitamin D synthesis. *Science.* 1997;277(5333):1827–30.
 166. Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005;289(1):F8-28.
 167. Jones G. Extrarenal vitamin D activation and interactions between vitamin D₂, vitamin D₃, and vitamin D analogs. *Annu Rev Nutr.* 2013;33(1):23–44.
 168. Rochel N, Molnár F. Structural aspects of Vitamin D endocrinology. *Mol Cell Endocrinol.* 2017;453:22–35.
 169. Theodoropoulos C, Demers C, Delvin E, Ménard D, Gascon-Barré M. Calcitriol regulates the expression of the genes encoding the three key vitamin D3 hydroxylases and the drug-metabolizing enzyme CYP3A4 in the human fetal intestine. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2003;58(4):489–99.
 170. Theodoropoulos C, Demers C, Petit J-L, Gascon-Barre M. High sensitivity of rat hepatic vitamin D3-25 hydroxylase CYP27A to 1,25-dihydroxyvitamin D3 administration. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003;284(1):E138-47.
 171. Yu C, Xue H, Wang L, Chen Q, Chen X, Zhang Y, et al. Serum Bioavailable and Free 25-Hydroxyvitamin D Levels, but Not Its Total Level, Are Associated With the Risk of Mortality in Patients With Coronary Artery Disease. *Circ Res.* 2018;123(8):996–1007.

172. Cavalier E, Delanaye P, Chapelle J-P, Souberbielle J-C. Vitamin D: current status and perspectives. *Clin Chem Lab Med*. 2009;47(2):120–7.
173. Dawson-Hughes B, Heaney RP, Holick MF, Lips P, Meunier PJ, Vieth R. Estimates of optimal vitamin D status. *Osteoporos Int*. 2005;16(7):713–6.
174. Holick MF. High prevalence of vitamin D inadequacy and implications for health. *Mayo Clin Proc*. 2006;81(3):353–73.
175. Bischoff-Ferrari HA, Giovannucci E, Willett WC, Dietrich T, Dawson-Hughes B. Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes. *Am J Clin Nutr*. 2006;84(1):18–28.
176. Thomas MK, Lloyd-Jones DM, Thadhani RI, Shaw AC, Deraska DJ, Kitch BT, et al. Hypovitaminosis D in medical inpatients. *N Engl J Med*. 1998;338(12):777–83.
177. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(7):1911–30.
178. Schneider L, Dos Santos ASP, Santos M, da Silva Chakr RM, Monticielo OA. Vitamin D and systemic lupus erythematosus: state of the art. *Clin Rheumatol*. 2014;33(8):1033–8.
179. Kamen DL, Cooper GS, Bouali H, Shaftman SR, Hollis BW, Gilkeson GS. Vitamin D deficiency in systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev*. 2006;5(2):114–7.
180. Marcinowska-Suchowierska E, Kupisz-Urbańska M, Łukaszewicz J, Płudowski P, Jones G. Vitamin D Toxicity-A Clinical Perspective. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9:550.
181. Vanherwegen A-S, Gysemans C, Mathieu C. Regulation of Immune Function by Vitamin D and Its Use in Diseases of Immunity. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2017;46(4):1061–94.
182. Uitterlinden AG. Genetics of the Vitamin D Endocrine System. In: *Vitamin D*.

2018. p. 151–65.
183. Pike JW. Vitamin D3 receptors: structure and function in transcription. *Annu Rev Nutr.* 1991;11(1):189–216.
 184. Norman AW, Henry HL, Bishop JE, Song XD, Bula C, Okamura WH. Different shapes of the steroid hormone 1 α ,25(OH) $_2$ -vitamin D(3) act as agonists for two different receptors in the vitamin D endocrine system to mediate genomic and rapid responses. *Steroids.* 66(3–5):147–58.
 185. Norman AW. Minireview: vitamin D receptor: new assignments for an already busy receptor. *Endocrinology.* 2006;147(12):5542–8.
 186. Haussler MR, Jurutka PW, Hsieh JC, Thompson PD, Selznick SH, Haussler CA, et al. New understanding of the molecular mechanism of receptor-mediated genomic actions of the vitamin D hormone. *Bone.* 1995;17(2 Suppl):33S–38S.
 187. Wang Y, Zhu J, DeLuca HF. Where is the vitamin D receptor? *Arch Biochem Biophys.* 2012;523(1):123–33.
 188. van Leeuwen JP, van den Bemd GJ, van Driel M, Buurman CJ, Pols HA. 24,25-Dihydroxyvitamin D(3) and bone metabolism. *Steroids.* 66(3–5):375–80.
 189. Feldman D, Krishnan A V., Swami S, Giovannucci E, Feldman BJ. The role of vitamin D in reducing cancer risk and progression. *Nat Rev Cancer.* 2014;14(5):342–57.
 190. Matthews D, LaPorta E, Zinser GM, Narvaez CJ, Welsh J. Genomic vitamin D signaling in breast cancer: Insights from animal models and human cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2010;121(1–2):362–7.
 191. Trinchieri G, Sher A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(3):179–90.
 192. Ramanathan B, Davis EG, Ross CR, Blecha F. Cathelicidins: microbicidal activity, mechanisms of action, and roles in innate immunity. *Microbes Infect.* 2002;4(3):361–72.

193. Wang T-T, Nestel FP, Bourdeau V, Nagai Y, Wang Q, Liao J, et al. Cutting edge: 1,25-dihydroxyvitamin D3 is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression. *J Immunol*. 2004;173(5):2909–12.
194. Campbell GR, Spector SA. Toll-like receptor 8 ligands activate a vitamin D mediated autophagic response that inhibits human immunodeficiency virus type 1. *PLoS Pathog*. 2012;8(11):e1003017.
195. Liu PT, Stenger S, Li H, Wenzel L, Tan BH, Krutzik SR, et al. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science*. 2006;311(5768):1770–3.
196. van Etten E, Mathieu C. Immunoregulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3: basic concepts. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2005;97(1–2):93–101.
197. Teymoori-Rad M, Shokri F, Salimi V, Marashi SM. The interplay between vitamin D and viral infections. *Rev Med Virol*. 2019;286(2):e2032.
198. Rubtsov YP, Rasmussen JP, Chi EY, Fontenot J, Castelli L, Ye X, et al. Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces. *Immunity*. 2008;28(4):546–58.
199. Piantoni S, Andreoli L, Scarsi M, Zanola A, Dall'Ara F, Pizzorni C, et al. Phenotype modifications of T-cells and their shift toward a Th2 response in patients with systemic lupus erythematosus supplemented with different monthly regimens of vitamin D. *Lupus*. 2015;24(4–5):490–8.
200. Tian Y, Wang C, Ye Z, Xiao X, Kijlstra A, Yang P. Effect of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on Th17 and Th1 response in patients with Behçet's disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012;53(10):6434–41.
201. Colin EM, Asmawidjaja PS, van Hamburg JP, Mus AMC, van Driel M, Hazes JMW, et al. 1,25-dihydroxyvitamin D3 modulates Th17 polarization and interleukin-22 expression by memory T cells from patients with early rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2010;62(1):132–42.
202. Jeffery LE, Burke F, Mura M, Zheng Y, Qureshi OS, Hewison M, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and IL-2 Combine to Inhibit T Cell Production of

- Inflammatory Cytokines and Promote Development of Regulatory T Cells Expressing CTLA-4 and FoxP3. *J Immunol.* 2009;183(9):5458–67.
203. Lysandropoulos AP, Jaquiéry E, Jilek S, Pantaleo G, Schlupe M, Du Pasquier RA. Vitamin D has a direct immunomodulatory effect on CD8+ T cells of patients with early multiple sclerosis and healthy control subjects. *J Neuroimmunol.* 2011;233(1–2):240–4.
204. Chen J, Bruce D, Cantorna MT. Vitamin D receptor expression controls proliferation of naïve CD8+ T cells and development of CD8 mediated gastrointestinal inflammation. *BMC Immunol.* 2014 Feb 7;15(1):6.
205. Heine G, Niesner U, Chang H-D, Steinmeyer A, Zügel U, Zuberbier T, et al. 1,25-dihydroxyvitamin D(3) promotes IL-10 production in human B cells. *Eur J Immunol.* 2008;38(8):2210–8.
206. Chen S, Sims GP, Chen XX, Gu YY, Chen S, Lipsky PE. Modulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on human B cell differentiation. *J Immunol.* 2007;179(3):1634–47.
207. Lemire JM, Adams JS, Sakai R, Jordan SC. 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 suppresses proliferation and immunoglobulin production by normal human peripheral blood mononuclear cells. *J Clin Invest.* 1984;74(2):657–61.
208. Geldmeyer-Hilt K, Heine G, Hartmann B, Baumgrass R, Radbruch A, Worm M. 1,25-dihydroxyvitamin D3 impairs NF- κ B activation in human naïve B cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;407(4):699–702.
209. Drozdenko G, Scheel T, Heine G, Baumgrass R, Worm M. Impaired T cell activation and cytokine production by calcitriol-primed human B cells. *Clin Exp Immunol.* 2014;178(2):364–72.
210. Adorini L, Giarratana N, Penna G. Pharmacological induction of tolerogenic dendritic cells and regulatory T cells. *Semin Immunol.* 2004;16(2):127–34.
211. Adorini L, Penna G, Giarratana N, Uskokovic M. Tolerogenic dendritic cells induced by vitamin D receptor ligands enhance regulatory T cells inhibiting allograft rejection and autoimmune diseases. *J Cell Biochem.* 2003;88(2):227–

- 33.
212. Ferreira GB, Vanherwegen A-S, Eelen G, Gutiérrez ACF, Van Lommel L, Marchal K, et al. Vitamin D3 Induces Tolerance in Human Dendritic Cells by Activation of Intracellular Metabolic Pathways. *Cell Rep.* 2015;10(5):711–25.
213. van der Aar AMG, Sibiryak DS, Bakdash G, van Capel TMM, van der Kleij HPM, Opstelten D-JE, et al. Vitamin D3 targets epidermal and dermal dendritic cells for induction of distinct regulatory T cells. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;127(6):1532–40.e7.
214. Gauzzi MC, Purificato C, Donato K, Jin Y, Wang L, Daniel KC, et al. Suppressive effect of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 on type I IFN-mediated monocyte differentiation into dendritic cells: impairment of functional activities and chemotaxis. *J Immunol.* 2005;174(1):270–6.
215. Piemonti L, Monti P, Sironi M, Fraticelli P, Leone BE, Dal Cin E, et al. Vitamin D3 affects differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol.* 2000;164(9):4443–51.
216. Penna G, Adorini L. 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation. *J Immunol.* 2000;164(5):2405–11.
217. Overbergh L, Decallonne B, Valckx D, Verstuyf A, Depovere J, Laureys J, et al. Identification and immune regulation of 25-hydroxyvitamin D-1- α -hydroxylase in murine macrophages. *Clin Exp Immunol.* 2000 Apr;120(1):139–46.
218. Korf H, Wenes M, Stijlemans B, Takiishi T, Robert S, Miani M, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 curtails the inflammatory and T cell stimulatory capacity of macrophages through an IL-10-dependent mechanism. *Immunobiology.* 2012;217(12):1292–300.
219. Chen Y, Liu W, Sun T, Huang Y, Wang Y, Deb DK, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D promotes negative feedback regulation of TLR signaling via targeting microRNA-155-SOCS1 in macrophages. *J Immunol.* 2013;190(7):3687–95.

220. Neve A, Corrado A, Cantatore FP. Immunomodulatory effects of vitamin D in peripheral blood monocyte-derived macrophages from patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Med*. 2014;14(3):275–83.
221. Zhang X, Zhou M, Guo Y, Song Z, Liu B. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ Promotes High Glucose-Induced M1 Macrophage Switching to M2 via the VDR-PPAR γ Signaling Pathway. *Biomed Res Int*. 2015;2015:157834.
222. Norman PE, Powell JT. Vitamin D and cardiovascular disease. *Circ Res*. 2014;114(2):379–93.
223. O'Regan S, Chesney RW, Hamstra A, Eisman JA, O'Gorman AM, Deluca HF. Reduced serum 1,25-(OH)₂ vitamin D₃ levels in prednisone-treated adolescents with systemic lupus erythematosus. *Acta Paediatr Scand*. 1979;68(1):109–11.
224. Azrielant S, Shoenfeld Y. Eppur Si Muove: vitamin D is essential in preventing and modulating SLE. *Lupus*. 2016;25(6):563–72.
225. Dall'Ara F, Andreoli L, Piva N, Piantoni S, Franceschini F, Tincani A. Winter lupus flares are associated with low vitamin D levels in a retrospective longitudinal study of Italian adult patients. *Clin Exp Rheumatol*. 33(2):153–8.
226. Sousa JR, Rosa ÉPC, Nunes IF de OC, Carvalho CMRG de. Effect of vitamin D supplementation on patients with systemic lupus erythematosus: a systematic review. *Rev Bras Reumatol*. 2017;57(5):466–71.
227. Tian R, Li X, Li Y, Wang K, Wang C, Yang P. 1,25(OH)₂D₃ promotes chondrocyte apoptosis and restores physical function in rheumatoid arthritis through the NF- κ B signal pathway. *Biomed Pharmacother*. 2018;106:149–55.
228. Li B, Baylink DJ, Deb C, Zannetti C, Rajaallah F, Xing W, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ suppresses TLR8 expression and TLR8-mediated inflammatory responses in monocytes in vitro and experimental autoimmune encephalomyelitis in vivo. *PLoS One*. 2013;8(3):e58808.

7. ARTIGO 1

Pristane-induced lupus: considerations on this experimental model

(Artigo publicado no periódico *Clinical Rheumatology* – DOI: 10.1007/s10067-017-3811-6)

8. ARTIGO 2

Vitamin D supplementation ameliorates arthritis but does not alleviate renal injury in pristane-induced lupus model

(Manuscrito submetido para publicação no periódico *Autoimmunity*)

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo foi avaliada a influência da suplementação de vitamina D no desenvolvimento e evolução de LES em modelo experimental induzido por pristane. Demonstrou-se que a vitamina D foi capaz de modular os sintomas clínicos e histopatológicos da artrite, mas não alterou o curso clínico e histopatológico da doença renal, apesar de ter modificado o perfil de citocinas.

A suplementação com vitamina D [2ug/kg] foi capaz de reduzir a incidência da artrite e retardou as manifestações clínicas, diminuindo o escore de atividade articular e o edema nas patas posteriores. Entretanto, não foram observadas alterações na nocicepção articular dos animais. A vitamina D não alterou o curso da doença renal neste modelo experimental, visto que não diminuiu os níveis de proteinúria, não reduziu a proliferação mesangial glomerular e não teve influência na deposição de IC no tecido renal.

Os animais com lúpus induzido por pristane apresentaram níveis elevados de IL-6, TNF- α e IFN- γ , o que corrobora com os dados obtidos na literatura. A suplementação com vitamina D não alterou os níveis de IL-6 e TNF- α , mas reduziu drasticamente os níveis de IFN- γ . Os níveis de IL-2 e IL-4 não foram alterados. O IFN- γ é um dos principais mediadores de distúrbios autoimunes e esta correlacionado com a progressão da doença tanto em camundongos quanto em lúpus humano.

Estes resultados confirmam que o papel da suplementação de vitamina D é depende do sítio de atuação, o que poderia explicar diferentes respostas de acordo com o fenótipo clínico. Estes achados seriam explicados parcialmente pela diferença na expressão e ativação do receptor da vitamina D nas células e nos tecidos. Adicionalmente, deve-se levar em consideração que os mecanismos fisiopatogênicos também podem ser distintos de acordo com o sistema envolvido, o que de certa forma interferiria mais ou menos na influencia da suplementação de vitamina D. Ainda é necessário explorar a concentração de dose adequada e segura, o tempo de tratamento e a influência da vitamina D nas diferentes bases moleculares no LES.

10. PERSPECTIVAS FUTURAS

Este estudo implementou e padronizou o modelo de lúpus induzido por pristane no Laboratório de Doenças Autoimunes (LABDAI) do Centro de Pesquisa Experimental (CPE) vinculado ao Serviço de Reumatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). A partir disto, teve origem uma linha de pesquisa em lúpus experimental.

Na continuidade deste trabalho, pretendemos investigar:

- A composição corporal (tecido muscular e adiposo) no modelo de lúpus induzido por pristane;
- A influencia da vitamina D combinada com exercício físico no desenvolvimento e evolução do lúpus induzido por pristane;
- O papel da vitamina D no dano do DNA no hipocampo dos animais com lúpus induzido por pristane;
- A possibilidade deste modelo experimental permitir o estudo de manifestações neuropsiquiátricas do LES;
- A interação entre os receptores nucleares, VDR e PPAR- γ , na polarização de macrófagos M1/M2 no modelo de lúpus induzido por pristane.

11. CONSIDERAÇÕES GERAIS

A presente tese de doutorado é fruto do trabalho realizado no Laboratório de Doenças Autoimunes no Centro de Pesquisa Experimental vinculado ao Serviço de Reumatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. A participação de professores, médicos contratados, veterinários, outros funcionários contratados, alunos e bolsistas de iniciação científica foi fundamental para a idealização e realização desta pesquisa.

Durante o programa de pós-graduação que iniciou em janeiro de 2015, o autor participou dos seguintes publicações:

1. Cavalheiro R, Miranda J, Silva DS, Oliveira V, Teixeira N, Vinicius P, et al. Individualized moderate aerobic exercise improves physical capacity and prevents weight loss in collagen-induced arthritis. *Int J Clin Exp Med*. 2016;9(11):22696–703.
2. Freitas EC, de Oliveira MS, Monticielo OA. Pristane-induced lupus: considerations on this experimental model. *Clin Rheumatol*. 2017;36(11):2403–14.
3. Alabarse PVG, Lora PS, Silva JMS, Santo RCE, Freitas EC, de Oliveira MS, et al. Collagen-induced arthritis as an animal model of rheumatoid cachexia. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2018;9(3):603–12.
4. Silva JM de S, Alabarse PVG, Teixeira V de ON, Freitas EC, de Oliveira FH, Chakr RM da S, et al. Muscle wasting in osteoarthritis model induced by anterior cruciate ligament transection. *PLoS One*. 2018;13(4):e0196682.

12. ANEXO 1 – CONSORT 2010 GUIDELINE



CONSORT 2010 checklist of information to include when reporting a randomised trial*

Section/Topic	Item N°	Checklist item	Reported on page N°
Title and abstract			
	1a	Identification as a randomised trial in the title	1
	1b	Structured summary of trial design, methods, results, and conclusions (for specific guidance see CONSORT for abstracts)	12
Introduction			
Background and objectives	2a	Scientific background and explanation of rationale	16
	2b	Specific objectives or hypotheses	46
Methods			
Trial design	3a	Description of trial design (such as parallel, factorial) including allocation ratio	83
	3b	Important changes to methods after trial commencement (such as eligibility criteria), with reasons	83
Participants	4a	Eligibility criteria for participants	83
	4b	Settings and locations where the data were collected	83
Interventions	5	The interventions for each group with sufficient details to allow replication, including how and when they were actually administered	83
Outcomes	6a	Completely defined pre-specified primary and secondary outcome measures, including how and when they were assessed	83
	6b	Any changes to trial outcomes after the trial commenced, with reasons	83
Sample size	7a	How sample size was determined	83
	7b	When applicable, explanation of any interim analyses and stopping guidelines	83
Randomisation:			

Sequence generation	8a	Method used to generate the random allocation sequence	N/A
	8b	Type of randomisation; details of any restriction (such as blocking and block size)	N/A
Allocation concealment mechanism	9	Mechanism used to implement the random allocation sequence (such as sequentially numbered containers), describing any steps taken to conceal the sequence until interventions were assigned	N/A
	10	Who generated the random allocation sequence, who enrolled participants, and who assigned participants to interventions	N/A
Blinding	11a	If done, who was blinded after assignment to interventions (for example, participants, care providers, those assessing outcomes) and how	83
	11b	If relevant, description of the similarity of interventions	83
Statistical methods	12a	Statistical methods used to compare groups for primary and secondary outcomes	83
	12b	Methods for additional analyses, such as subgroup analyses and adjusted analyses	83
Results			
Participant flow (a diagram is strongly recommended)	13a	For each group, the numbers of participants who were randomly assigned, received intended treatment, and were analysed for the primary outcome	83
	13b	For each group, losses and exclusions after randomisation, together with reasons	83
Recruitment	14a	Dates defining the periods of recruitment and follow-up	N/A
	14b	Why the trial ended or was stopped	N/A
Baseline data	15	A table showing baseline demographic and clinical characteristics for each group	N/A
Numbers analysed	16	For each group, number of participants (denominator) included in each analysis and whether the analysis was by original assigned groups	N/A
Outcomes and estimation	17a	For each primary and secondary outcome, results for each group, and the estimated effect size and its precision (such as 95% confidence interval)	N/A

	17b	For binary outcomes, presentation of both absolute and relative effect sizes is recommended	N/A
Ancillary analyses	18	Results of any other analyses performed, including subgroup analyses and adjusted analyses, distinguishing pre-specified from exploratory	N/A
Harms	19	All important harms or unintended effects in each group (for specific guidance see CONSORT for harms)	
Discussion			
Limitations	20	Trial limitations, addressing sources of potential bias, imprecision, and, if relevant, multiplicity of analyses	97
Generalisability	21	Generalisability (external validity, applicability) of the trial findings	97
Interpretation	22	Interpretation consistent with results, balancing benefits and harms, and considering other relevant evidence	97
Other information			
Registration	23	Registration number and name of trial registry	N/A
Protocol	24	Where the full trial protocol can be accessed, if available	N/A
Funding	25	Sources of funding and other support (such as supply of drugs), role of funders	98

*We strongly recommend reading this statement in conjunction with the CONSORT 2010 Explanation and Elaboration for important clarifications on all the items. If relevant, we also recommend reading CONSORT extensions for cluster randomised trials, non-inferiority and equivalence trials, non-pharmacological treatments, herbal interventions, and pragmatic trials. Additional extensions are forthcoming: for those and for up to date references relevant to this checklist, see www.consort-statement.org.