



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

JOÃO VICTOR DE MELO GOMES

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE IMUNOMODULADORA, ANTIOXIDANTE
E ANTIFIBRÓTICA DE DERIVADOS TIAZOLIDÍNICOS COMO PERSPECTIVA DE
TRATAMENTO PARA ESCLEROSE SISTÊMICA**

Recife
2023

JOÃO VICTOR DE MELO GOMES

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE IMUNOMODULADORA, ANTIOXIDANTE
E ANTIFIBRÓTICA DE DERIVADOS TIAZOLIDÍNICOS COMO PERSPECTIVA DE
TRATAMENTO PARA ESCLEROSE SISTÊMICA**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Inovação
Terapêutica da Universidade Federal de
Pernambuco, como requisito para
obtenção do título de mestre em inovação
terapêutica.

Orientadora: Profa. Dra. Maira Galdino da Rocha Pitta

Coorientador: Dr. Anderson Rodrigues de Almeida

Recife
2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Gomes, João Victor de Melo

Avaliação in vitro da atividade imunmoduladora, antioxidante e antifibrótica de derivados tiazolidínicos como perspectiva de tratamento para esclerose sistêmica / João Victor de Melo Gomes– 2023.

99 f. : il., fig., tab.

Orientadora: Maíra Galdino da Rocha Pitta

Coorientador: Anderson Rodrigues de Almeida

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Recife, 2023.

Inclui referências, apêndices e anexo.

1. Esclerose sistêmica 2. Citocinas 3. Tiazoles I. Pitta, Maíra Galdino da Rocha (orient.) II. Almeida, Anderson Rodrigues de (coorient.) III. Título

JOÃO VICTOR DE MELO GOMES

**AVALIAÇÃO IN VITRO DA ATIVIDADE IMUNOMODULADORA, ANTIOXIDANTE
E ANTIFIBRÓTICA DE DERIVADOS TIAZOLIDÍNICOS COMO PERSPECTIVA DE
TRATAMENTO PARA ESCLEROSE SISTÊMICA**

Dissertação apresentada a Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de mestre em Inovação Terapêutica. Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos Essenciais para a Saúde

Aprovado em: 30/05/2023.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Maria Danielly Lima de Oliveira
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Dr. Anderson Rodrigues de Almeida (Coorientador)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Dr^a. Erika da Silva Bezerra de Menezes
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

AGRADECIMENTOS

Primeiramente eu agradeço a Deus e dou graças, sempre esteve comigo todos os dias durante a minha jornada;

Agradeço a minha mãe, Rosilene, pela vida e me lembrar sempre que estamos nesse mundo para servir e não para sermos servidos;

Agradeço a minha avó, Edite, pelo amor incondicional, carinho, compreensão e cuidados;

Agradecimento a minha amada tia Maroca (*in memoriam*), que partiu antes do depósito do documento, apenas ratifico o que disse a ela após a aprovação da dissertação: Sou grato por tudo que senhora fez por mim, cada vitória e conquista minha, também são da senhora, logo faço questão de compartilhar esses momentos com você. Eternas saudades.

Agradeço aos meus tios, Ivanildo e Rosângela, que são grandes incentivadores e inspiração em meus estudos;

Agradeço a minha noiva Flávia pelo companheirismo, conselhos e carinho incondicional;

Agradeço minha irmã, Beatriz, e minha prima, Sarah, pela companhia e alegria durante a rotina;

Agradeço a vida das minhas tia-avó, Ceça, por sempre estarem sempre presentes;

À minha tia-avó (*in memoriam*), Têca, por ter sido presente na minha vida, muitas saudades;

Agradeço a profa. Maira Pitta, minha orientadora, pelo grande apoio, confiança e pelas oportunidades para minha formação desde o período da iniciação científica até o mestrado;

Agradeço ao meu coorientador Anderson Rodrigues pelo cuidado na construção do trabalho;

Aos outros professores do NUPIT, Michelly Pereira, Moacyr Rêgo e Michele Melgarejo, pela atenção e pelas contribuições;

Agradecimento ao corpo técnico do NUPIT, em especial, Valéria, Thacianna, Shana e Luciana pela companhia e suporte durante meus experimentos;

Aos amigos que sempre fazem a vida ser mais leve;

Agradecimento especial ao grupo de esclerose sistêmica do NUPIT, assim como Anderson, Eudes e Maria Eduarda foram pessoas que compartilhei bastante tempo durante discussões acadêmicas e experimentos, não poderia ter encontrado grupo melhor durante minha jornada científica.

Agradecimentos aos “pós-doc” do NUPIT, em especial, Eraldo, Sayonara, Amanda, José Luis e Bárbara pela ajuda, ensinamentos e companhia diária;

Agradecimentos a todos usuários da sala de cultura de células do NUPIT pelo precioso tempo compartilhado nesse local de trabalho.

Agradecimento ao Hospital das Clínicas da UFPE pela parceria com o estudo.

Agradecimento a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco pelo incentivo financeiro através da bolsa de estudos que pôde proporcionar a minha pesquisa e atividades relacionadas a UFPE.

“O Senhor é refúgio para os oprimidos, uma torre segura na hora da adversidade. Os que conhecem o teu nome confiam em ti, pois tu, Senhor, jamais abandonas os que te buscam. (Salmos 9:9-10)”

RESUMO

A esclerose sistêmica (ES) é uma doença autoimune que tem como pilares vasculopatia, autoimunidade e fibrose desregulada, sendo seu tratamento focado no controle dos sintomas e prevenção de complicações, pois não há cura. As tiazolidinedionas são uma classe de fármacos que ativam o receptor ativado por proliferador de peroxissoma-gama (PPAR γ) e possuem ação anti-inflamatória, antifibrótica e antioxidante, sendo possíveis agentes terapêuticos para a ES. O trabalho possui o objetivo de avaliar as atividades imunomoduladora, antifibrótica e antioxidante dos derivados tiazolidínicos LPSF/JB-3 e LPSF/JB-20, possíveis agonistas do PPAR γ , com análise de suas propriedades farmacocinéticas. A análise *in silico* das propriedades farmacocinéticas do LPSF/JB-3 e LPSF/JB-20 ocorreu pelo SwissADME. A linhagem 3T3-L1 foi utilizada para os ensaios de citotoxicidade pelo MTT, diferenciação adipogênica induzida por coquetel de estímulo (CE) com os derivados para coloração de lipídeos pelo Oil Red O e avaliação de expressão gênica de PPAR γ por RT-qPCR. Em cultura de células mononucleadas do sangue periférico (PBMC) de voluntários saudáveis estimuladas com fitohemaglutinina (PHA) e tratadas com os derivados foi avaliado a atividade imunomoduladora por ELISA sanduíche. Com fibroblastos de pele de um voluntário saudável foram avaliados a atividade antioxidante após estimulação com peróxido de hidrogênio (H₂O₂), então tratadas e marcação de espécies reativas de oxigênio (ROS) pela sonda DHE, já avaliação antifibrótica pela marcação de COL1A2 e pSmad2/3 ocorreu após estimulação com TGF- β e tratamento *in vitro*. A análise *in silico* mostrou que os derivados LPSF/JB-3 e LPSF/JB-20 possuem absorção pelo trato gastrointestinal e não sofrem efluxo pela glicoproteína-P. Pelo druglikeness mostrou que os derivados respeitam a regra de Lipinski. A predição prevê que os derivados possuem probabilidade de ligação com PPAR γ . Os derivados não apresentaram atividade citotóxica nas concentrações testadas (10 μ M, 25 μ M e 50 μ M) na linhagem 3T3-L1. O tratamento com CE + LPSF/JB-3 (10 μ M) (**p= 0,0076), CE + LPSF/JB-20 (10 μ M e 25 μ M) (**p= 0,0033 e ***p= 0,0003) apresentou maior conteúdo lipídico (%) que o grupo CE. O grupo CE + rosiglitazona (RSG - 10 μ M) comparada com CE + LPSF/JB-3 (10 μ M, 25 μ M e 50 μ M) e CE + LPSF/JB-20 (10 μ M) não diferiram significativamente no conteúdo lipídico relativo, mas CE + LPSF/JB-20 (25 μ M) (**p= 0,0069) acumulou mais lipídeos que CE + RSG. Foi observado que células 3T3-L1 tratadas apenas com CE (*p= 0,0412)

tiveram maior expressão, significativa, de RNA mensageiro de PPARy do que células tratadas com CE + RSG, CE + LPSF/JB-3 (10 μ M, 25 μ M) e CE + LPSF/JB-20 (10 μ M, 25 μ M). O sobrenadante de PBMC tratado com LPSF/JB-20 (50 μ M) reduziu os níveis de IFNy (**p= 0,0079) em comparação com a PBMCs apenas estimuladas com PHA. Porém, os derivados não reduziram os níveis de IL-1 β , IL-6 e IL-13. Em fibroblastos foi observado que o LPSF/JB-3 (25 μ M) reduziu significativamente a marcação de pSmad2/3 (*p= 0,0197) e COL1A2 (*p= 0,0212) e reduziu a marcação de ROS quando comparado com grupo H202 (*p= 0,0463). Conforme os resultados, é sugerido que o LPSF/JB-20, apresente atividade imunomoduladora, o LPSF/JB-3 possua atividade antifibrótica e antioxidante, e ambos derivados com potencial atividade de ligação com PPARy.

Palavras-chave: Esclerose sistêmica; Tiazolidinedionas; PPAR; Citocina; ROS.

ABSTRACT

Systemic sclerosis (SSc) is an autoimmune disease whose pillars are vasculopathy, autoimmunity and dysregulated fibrosis, and its treatment is focused on controlling symptoms and preventing complications, as there is no cure. Thiazolidinediones are a class of drugs that activate the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) and have anti-inflammatory, antifibrotic and antioxidant action, being possible therapeutic agents for SSc. The objective of this work is to evaluate the immunomodulatory, antifibrotic and antioxidant activities of thiazolidine derivatives LPSF/JB-3 and LPSF/JB-20, possible PPAR γ agonists, with analysis of their pharmacokinetic properties. In silico analysis of the pharmacokinetic properties of LPSF/JB-3 and LPSF/JB-20 was performed by SwissADME. The 3T3-L1 cell line was used for cytotoxicity assays by MTT, adipogenic differentiation induced by stimulus cocktail (SC) with derivatives for lipid staining by Oil Red O and evaluation of PPAR γ gene expression by RT-qPCR. In culture of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from healthy volunteers stimulated with phytohemagglutinin (PHA) and treated with the derivatives, the immunomodulatory activity was evaluated by sandwich ELISA. With skin fibroblasts from a healthy volunteer, the antioxidant activity was evaluated after stimulation with hydrogen peroxide (H₂O₂), then treated and marking of reactive oxygen species (ROS) by the DHE probe, already antifibrotic evaluation by the marking of COL1A2 and pSmad2/3 occurred after stimulation with TGF- β and in vitro treatment. The in silico analysis showed that the LPSF/JB-3 and LPSF/JB-20 derivatives are absorbed by the gastrointestinal tract and are not effluxed by P-glycoprotein. By druglikeness it showed that derivatives respect Lipinski's rule. The prediction predicts that the derivatives are likely to bind with PPAR γ . The derivatives did not show cytotoxic activity at the tested concentrations (10 μ M, 25 μ M and 50 μ M) in the 3T3-L1 strain. Treatment with SC + LPSF/JB-3 (10 μ M) (**p= 0.0076), SC + LPSF/JB-20 (10 μ M and 25 μ M) (**p= 0.0033 and ***p= 0.0003) had a higher lipid content (%) than the SC group. The SC + rosiglitazone (RSG - 10 μ M) group compared with SC + LPSF/JB-3 (10 μ M, 25 μ M and 50 μ M) and SC + LPSF/JB-20 (10 μ M) did not differ significantly in relative lipid content, but SC + LPSF/JB-20 (25 μ M) (**p= 0.0069) accumulated more lipids than SC + RSG. It was observed that 3T3-L1 cells treated only with SC (*p= 0.0412) had a significantly higher expression of PPAR γ messenger RNA than cells treated with SC + RSG, SC + LPSF/JB-3 (10 μ M, 25 μ M) and SC +

LPSF/JB-20 (10 μ M, 25 μ M). PBMC supernatant treated with LPSF/JB-20 (50 μ M) reduced IFN γ levels (**p= 0.0079) compared to PHA-only PBMCs. However, the derivatives did not reduce the levels of IL-1 β , IL-6 and IL-13. In fibroblasts, it was observed that LPSF/JB-3 (25 μ M) significantly reduced pSmad2/3 marking (*p= 0.0197) and COL1A2 (*p= 0.0212) and reduced ROS marking when compared to the group H202 (*p=0.0463). According to the results, it is suggested that LPSF/JB-20 has immunomodulatory activity, LPSF/JB-3 has antifibrotic and antioxidant activity, and both derivatives have potential binding activity with PPAR γ .

Keywords: Systemic sclerosis; thiazolidinediones; PPAR; Cytokine; ROS.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 — Fisiopatologia da esclerose sistêmica.....	25
Figura 2 — Interação do miofibroblasto no microambiente com citocinas pró-fibróticas, expressão de α -SMA e formação dos componentes da MEC.....	28
Figura 3 — Via de sinalização TGF- β /Smad. O TGF- β se liga ao seu receptor ativando proteínas Smad que formam um complexo que se direcionam ao núcleo da célula permitindo a transcrição de genes fibróticos.....	30
Figura 4 — Acometimentos de diferentes órgãos na esclerose sistêmica.....	32
Figura 5 — Anel de tiazolididina.....	42
Figura 6 — Estrutura química da Roziglitazona e Pioglitazona com dos derivados tiazolidínicos (LPSF/JBs).....	42
Figura 7 — Rota de síntese dos derivados tiazolidínicos LPSF/JBs.....	45
Figura 8 — Derivados tiazolidínicos LPSF/JB-3 (A) e LPSF/JB-20 (B).....	47
Figura 9 — Diferenciação adipogênica com linhagem 3T3-L1.....	50
Figura 10 — Gráfico boiled-egg para farmacocinética de LPSF/JB-3, LPSF/JB-20 e Rosiglitazona.....	56
Figura 11 — Viabilidade celular da linhagem 3T3-L1 em ensaio de MTT.....	58
Figura 12 — Gráfico de comparação do conteúdo lipídico relativo (%) entre os grupos controles e diferentes concentrações dos derivados tiazolidínicos.....	60
Figura 13 — Microfotografias da diferenciação adipogênica após adição de CE e derivados tiazolidínicos em diferentes concentrações.....	61
Figura 14 — Expressão gênica de PPAR γ em tratamento de 3T3-L1 com LPSF/JB-3 e LPSF/JB-20.....	63
Figura 15 — Avaliação de imunomodulação de IFN γ , IL-1 β , IL-6 e IL-13 com derivado tiazolidínidico LPSF/JB-3 e LPSF/JB-20.....	64

Figura 16 — Fluorescência celular total corrigida de DHE em fibroblastos primários pré-tratados com derivados tiazolidínicos (48h) e posterior adição de H ₂ O ₂ (1h).....	65
Figura 17 — Microfotografias de fluorescência de DHE em fibroblastos primários pré-tratados com derivados tiazolidínicos (48h) e posterior adição de H ₂ O ₂ (1h).. ..	66
Figura 18 — Fluorescência celular total corrigida de fibroblastos primários estimulados com TGF-β com tratamento com derivados tiazolidínicos.....	67
Figura 19 —Microfotografias de imunofluorescência de pSmad2/3 e COL1A2 em fibroblastos primários estimulados com TGF-β com posterior tratamento com LPSF/JB-3 e LPSF/JB-20.. ..	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Comparaçao entre os derivados tiazolidínicos aps analise in silico pelo SwissADME	57
Tabela 2 – Predicão ao PPARy de LPSF/JB-3 e LPSF/JB-20 pelo Swiss Target Prediction	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α-SMA	Alfa actina de musculo liso (Do inglês <i>alpha-smooth muscle actin</i>)
ACR	Colégio Americano de Reumatologia (Do inglês <i>American College of Rheumatology</i>)
ANA	Anticorpo antinuclear
BCC	Bloqueadores dos canais de cálcio BRA
DHE	Dihidroetídio
DPI	Doença Pulmonar Insterticial
EULAR	Liga Europeia Contra o Reumatismo (Do inglês <i>European League Against Rheumatism</i>)
anti-CENP	Anticorpos anti-centrômero
anti-Scl70	Anticorpos anti-topoisomerase I
anti-RNAP	Anti-RNA polimerase
CPU	Capiloscopia periungueal
Ct	<i>Cycle threshold</i>
CTGF	Fator de crescimento do tecido conjuntivo (Do inglês <i>connective tissue growth factor</i>)
ES	Esclerose sistêmica
ESd	Esclerose sistêmica difusa
ESI	Esclerose sistêmica limitada
FRy	Fenômeno de Raynaud
FPI	Fibrose pulmonar idiopática
HAP	Hipertensão arterial pulmonar
GC	Glicocorticóides
gp-P	Glicoproteína P
GWAS	Iniciativa dos estudos de associação ampla do genoma (Do inglês, <i>Genome Wide Association Studies</i>)
ICAM	Moléculas de adesão intracitoplasmática
IFN- α	Interferon alfa
IFN- γ	Interferon gama
LAP	Peptídeo associado a latênciam

LTGF-β	Fator de crescimento beta latente (Do inglês <i>latent transforming growth factor beta</i>)
LPSF	Laboratório de planejamento e síntese de fármacos
IL	Interleucinas
MAPK	Proteínas quinases ativadas por mitógenos
MCF	Metacarpofalangeanas
MTF	Metatarsofalangeanas
MEC	Matriz extracelular
MHC	Complexo de histocompatibilidade
MMP	Metaloproteinase de matriz
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio
NOX	NADPH oxidase
NT	Não tratado
PBMC	Células mononucleadas do sangue periférico
PHA	Fitohemaglutinina
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinases
qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
ROS	Espécies reativas de oxigênio (Do inglês <i>Reactive oxygen species</i>)
RSG	Rosiglitazona
TAK1	<i>Activated kinase 1</i>
TC	Tomografia computadorizada
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TGF-β	Fator de crescimento beta (Do inglês <i>transforming growth factor beta</i>)
Th	Linfócitos T <i>helper</i>
O2•	Radical superóxido
H2O2	Peróxido de hidrogênio
TGI	Trato gastroinstetinal
TZD	Tiazolidinedionas
VCAM	Molécula de adesão celular-vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
2	JUSTIFICATIVA	20
3	OBJETIVOS.....	21
3.1.	OBJETIVO GERAL	21
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
4	REVISÃO DE LITERATURA	22
4.1.	ESCLEROSE SISTÊMICA.....	22
4.1.1.	Epidemiologia.....	23
4.1.2.	Etiopatogênese	24
4.1.3.	Fisiopatologia.....	24
4.1.3.1.	Disfunção do endotélio vascular	25
4.1.3.2.	Alteração do sistema imunológico.....	26
4.1.3.3.	Fibrose	27
4.1.3.4.	Estresse oxidativo	30
4.1.4.	Manifestações clínicas	31
4.1.5.	Diagnóstico.....	34
4.1.6.1.	Processo de desenvolvimento de novos fármacos	37
4.1.6.2.	Receptores PPAR como alvos terapêuticos	38
4.1.6.3.	Tiazolidinedionas como alternativa terapêutica na esclerose sistêmica	41
4.1.6.4.	Rotas de síntese dos LPSF/JBs.....	44
5	MATERIAIS E MÉTODOS	46
5.1.	Delineamento experimental do estudo.....	46
5.2.	Derivados tiazodilínicos	46
5.3.	Análise <i>in silico</i> dos derivados tiazodilínicos	47

5.4.	Critérios de inclusão e exclusão para coleta de amostras de sangue total	47
5.5.	Coleta de fragmento de pele.....	48
5.6.	Isolamento de fibroblastos primários.....	48
5.7.	Linhagem imortalizada	49
5.8.	Avaliação de atividade citotóxica na linhagem 3T3-L1 em tratamento com derivados tiazolidínicos	49
5.9.	Efeitos dos derivados tiazolidínicos na diferenciação adipogênica em 3T3-L1.....	50
5.10.	Avaliação da atividade agonista ao PPAR γ dos derivados tiazolidínicos por qPCR em 3T3-L1	51
5.11.	Atividade imunomoduladora dos derivados tiazolidínicos em PBMC	52
5.12.	Dosagem de citocinas inflamatórias por ELISA em sobrenadante de cultura de PBMC	52
5.13.	Avaliação de atividade antioxidante dos derivados tiazolidínicos em fibroblastos primários	53
5.14.	Avaliação da atividade antifibrótica dos derivados tiazolidínicos em fibroblastos primários	54
5.15.	Análise dos resultados	55
6	RESULTADOS	56
6.1.	Dados <i>in silico</i> de LPSF/JB-3 e LPSF/JB-20	56
6.3.	Efeito dos derivados tiazolidínicos no acúmulo de lipídios em linhagem 3T3-L1.....	59
6.5.	Imunomodulação de citocinas em sobrenadante de PBMC de voluntários sadios tratadas com os derivados tiazolidínicos	63
7	DISCUSSÃO	69
8	CONCLUSÕES	73
	REFERÊNCIAS.....	74

APÊNDICE A – DADOS DE SWISSTARGETPREDICTION DO DERIVADO LPSF/JB-3 PARA OS POSSÍVEIS ALVOS.....	92
APÊNDICE B – DADOS DE SWISSTARGETPREDICTION DO DERIVADO LPSF/JB-20 PARA OS POSSÍVEIS ALVOS.....	93
APÊNDICE C – DADOS DE SWISSTARGETPREDICTION DA ROSIGLITAZONA PARA OS POSSÍVEIS ALVOS.....	94
APÊNDICE D – MICROFOTOGRAFIAS DE FLUORESCÊNCIA DE DHE EM FIBROBLASTOS PRIMÁRIOS EM 8-BIT (3-3-2 RGB).....	95
APÊNDICE E – MICROFOTOGRAFIAS DE IMUNOFLUORESCÊNCIA DE COL1A2 E PSMAD2/3 EM FIBROBLASTOS PRIMÁRIOS EM 8-BIT (3-3-2 RGB).....	96
APÊNDICE F – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA COLETA DE FRAGMENTO DE PELE SAUDÁVEL	97
APÊNDICE G – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA COLETA DE SANGUE DE VOLUNTÁRIOS SAUDÁVEIS	98
ANEXO A – PARECER CONSUSTANCIADO DO CEP	99

1 INTRODUÇÃO

Algumas doenças reumáticas, tais como a esclerose sistêmica (ES) são caracterizadas pela disfunção do sistema imunológico e fibrose, adquirindo um caráter de doença inflamatória crônica. A fibrose não é uma doença, mas o resultado da reparação de tecido que pode ser desregulada quando este é constantemente lesionado. A fibrose patológica é decorrente do acúmulo progressivo e irreversível de componentes da matriz extracelular (MEC), como colágeno e fibronectina, que são produzidos em maiores quantidades por miofibroblastos, causando ruptura da arquitetura do tecido, disfunção de órgãos e pôr fim a falha do funcionamento dos órgãos com fibrose. Os mecanismos relacionados ao acúmulo progressivo da MEC estão também associados com a produção desregulada de citocinas inflamatórias pelas células do sistema imunológico (HENDERSON; RIEDER; WYNN, 2020).

Os linfócitos T e os monócitos/macrófagos atuam como importantes reguladores no tecido fibrosado por influenciar na iniciação, manutenção e reparo do tecido lesionado. A regulação dessas células é mediada por meio da produção de citocinas inflamatórias por linfócitos T *helper* (Th) que possui diferentes perfis de respostas no organismo, em destaque, os perfis Th1, Th2 e Th17. Os diferentes perfis de citocinas atuam dificultando as abordagens terapêuticas que não são capazes de regredir o quadro inflamatório influenciado por mais de uma citocina relacionada a fisiopatologia da ES (CUTOLO; SOLDANO; SMITH, 2019)

O fator de crescimento beta (TGF- β , do inglês), é a mais importante citocina pró-fibrótica, entre outras como IL-1, IL4, IL-13, IL-6, IL-17A e IL-22 que colaboraram para o estado de retroalimentação da fibrose patológica (HENDERSON; RIEDER; WYNN, 2020; WILSON et al., 2010). Além das citocinas, outro fator importante envolvido na retroalimentação da fibrose patológica envolvem as espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês). Em pacientes que desenvolvem fibrose pulmonar foi observado que o peróxido de hidrogênio é capaz de induzir apoptose do epitélio alveolar, ativação de fibroblastos e produção de IL-1 e IL-6 em miofibroblastos (FORMAN; ZHANG, 2021; VONA et al., 2018). A partir desse contexto, a busca por novas abordagens terapêuticas que possam controlar inflamação, fibrose e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) é essencial no tratamento de doenças como a esclerose sistêmica (ES), conhecida por sua fisiopatologia complexa que acomete o tecido conjuntivo, possuindo a fibrose progressiva como principal fenótipo.

Os compostos tiazolidínicos, também denominados tiazolidinedionas (TZDs) são ligantes sintéticos do receptor ativado pelo proliferador de peroxissoma-gama (PPAR γ). Essas moléculas foram desenvolvidas na década de 1990 e foram inicialmente concebidas como agentes antidiabéticos. As TZDs têm sido estudadas como uma possível opção de tratamento para a ES devido ao seu potencial efeito antifibrótico e anti-inflamatório. Estudos têm demonstrado que as TZDs podem reduzir a produção de citocinas inflamatórias, colágeno e outras proteínas envolvidas na fibrose (NHU et al., 2020; SANTOS; FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES. RECIFE, 2018).

Atualmente, não existe uma cura para a ES e o tratamento é geralmente baseado no controle dos sintomas e na prevenção de suas complicações. Isso se deve à ausência de agentes farmacológicos que possuam atividade direta no bloqueio da fibrose, a manifestação mais importante da ES (DENTON, 2016). Na perspectiva da ES, é fundamental a implementação de estudos com novas moléculas que possuam potencial atividade terapêutica no controle e progressão da doença.

2 JUSTIFICATIVA

A ES é uma doença autoimune que afeta o tecido conjuntivo e pode causar danos aos vasos sanguíneos, pele, órgãos internos e sistema musculoesquelético. A patogênese dessa doença envolve uma resposta imunológica desregulada que resulta em uma inflamação crônica e depósito de proteínas de matriz extracelular. Atualmente, não há cura para a ES e o tratamento é focado apenas em aliviar os sintomas e retardar a progressão da doença. São mais utilizados na rotina médica os imunossupressores, glicocorticoides, vasodilatadores como antagonistas da endotelina e bloqueadores dos canais de cálcio, antagonistas alfa-adrenérgicos, inibidores da fosfodiesterase, inibidores da enzima conversora de angiotensina e bloqueadores do receptor da angiotensina II.

A escolha do tratamento depende do quadro clínico e do grau de acometimento dos órgãos, além de levar em consideração se a doença está ativa e reversível, caracterizada por vasoconstrição e inflamação, ou se já apresenta estágios irreversíveis, como fibrose ou necrose. Apesar dos avanços recentes no tratamento da ES, muitos pacientes não respondem satisfatoriamente aos tratamentos existentes ou experimentam efeitos colaterais significativos. Além disso, a ES é uma doença progressiva e potencialmente fatal em alguns casos.

Diante do exposto , a pesquisa com potenciais agentes terapêuticos na perspectiva da ES é uma necessidade clínica importante e a experimentação *in silico* e *in vitro* é uma etapa crítica nesse processo, pois permite avaliar sua eficácia e segurança antes de testá-los em animais e humanos.

3 OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar as atividades imunomoduladora, antifibrótica, antioxidante e propriedades farmacocinéticas dos derivados tiazolidínicos LPSF/JB-3 e LPSF/JB-20 como potenciais moléculas no tratamento para esclerose sistêmica

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar *in silico* farmacocinética, *druglikeness* e predição do alvo terapêutico;
- Avaliar a atividade imunomoduladora *in vitro* dos derivados tiazolidínicos;
- Avaliar a atividade agonista do PPARy *in vitro* dos derivados tiazolidínicos;
- Avaliar a atividade antifibrótica *in vitro* dos derivados tiazolidínicos;
- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* dos compostos tiazolidínicos.

4 REVISÃO DE LITERATURA

1.1. ESCLEROSE SISTÊMICA

A ES é uma doença reumatológica autoimune que afeta o tecido conjuntivo, e afeta órgãos vitais, como pulmões, coração, rins e o trato gastrointestinal (TGI). A partir da extensão e localização do acometimento cutâneo, a ES pode ser classificada nas formas clínicas: cutânea limitada (ESI) e cutânea difusa (ESd) (ZUO et al., 2017). O diagnóstico, caracterização dos subtipos da doença e prognóstico dos pacientes seguem os critérios do Colégio Americano de Reumatologia e a Liga Europeia Contra o Reumatismo (ACR/EULAR, siglas em inglês), que determina que o espessamento da pele dos dedos estendendo-se proximalmente às articulações metacarpofalângicas. Na ausência desse achado, sete outros achados devem ser identificados e pontuados: espessamento da pele dos dedos, lesões nas pontas dos dedos, telangiectasias (pequenas veias que se desenvolvem logo abaixo da pele), capilares anormais, doença pulmonar intersticial ou hipertensão arterial pulmonar, Fenômeno de Raynaud (Fry — constrição das pequenas artérias faz com que os dedos fiquem pálidos ou azulados, dormentes e com formigamento) e autoanticorpos relacionados à ES (HUGHES; HERRICK, 2019).

As manifestações em órgãos internos envolvem a fibrose pulmonar, falência renal (acompanhada de quadros de hipertensão e micro angiopatia trombótica) complicações gástricas, que estão vinculadas as altas taxas de mortalidade da doença (DENTON; KHANNA, 2017; ZIMMERMANN; PIZZICHINI, 2013). É bastante comum no estágio inicial da doença a presença do FRy e refluxo gastresofágico, mas são considerados sintomas comuns encontrados na população em geral, então é bastante importante considerar todas as características possíveis ao contexto clínico por ser uma doença com fenótipo heterogêneo. A identificação de autoanticorpos é importante, pois na ES eles podem ser usados para diagnosticar, classificar a doença e definir prognóstico do paciente. A ESI é bastante associada com anticorpos anti-centrônero (anti-CENP), enquanto a ESd é mais comumente relacionada com anticorpos anti-topoisomerase I (anti-Scl70) ou anti-RNA polimerase (anti-RNAP) III (ALLANORE et al., 2015; STEEN, 2005). O prognóstico do paciente é determinado por meio das manifestações clínicas predominantes, em destaque aquelas envolvidas

com os órgãos internos, acompanhado do diagnóstico laboratorial. (DENTON; KHANNA, 2017; ZIMMERMANN; PIZZICHINI, 2013).

1.1.1. Epidemiologia

Como em uma doença rara, a ES tem taxas de incidência e prevalência que variam conforme as diferentes regiões do mundo (HORIMOTO et al., 2017; INGEGNOLI; UGHI; MIHAI, 2018).

Mundialmente, uma entre 10.000 pessoas pode ser afetada pela ES (BOSSINI-CASTILLO et al., 2015). A ES é uma doença com poucos estudos epidemiológicos, o que se deve à grande variabilidade na prevalência e incidência. Esse fato é causado, principalmente, pelas manifestações clínicas relativamente incomuns na maioria da população e pelas diferentes proteínas que podem ser identificadas, assim como na evolução dos critérios de classificação da ES ao longo do tempo. Estudos epidemiológicos, a partir de 2010, têm sido conduzidos ao redor do mundo, apresentando as taxas de prevalência e incidência da ES com o uso de critérios diagnósticos distintos a incidência global varia de 8 a 56 novos casos/milhão/ano. É importante salientar que as atuais medidas terapêuticas atenuar a situação clínica dos pacientes e aumentaram a expectativa de vida, o que impacta na prevalência da ES ao longo dos anos (ANAGNOSTOPOULOS et al., 2010; BAJRAKTARI et al., 2013; EL ADSSI et al., 2013; FURST et al., 2012; GOTTSCHALK et al., 2014; HOFFMANN-VOLD et al., 2012; KANECKI et al., 2017; KUO et al., 2011; MEYER et al., 2016; RADIĆ et al., 2010; ROSA et al., 2011).

No Brasil, um estudo realizado na capital do estado de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, foi relatado taxas de incidência de 11,9 por milhão/habitantes e a prevalência de 105,6 por milhão/habitantes, taxas menores comparadas a países americanos e europeus (HORIMOTO et al., 2017; INGEGNOLI; UGHI; MIHAI, 2018). No estado de Pernambuco, um estudo desenvolvido por Ferreira e colaboradores em 111 pacientes com ES no serviço de referência estadual, o ambulatório de reumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC/UFPE), foi observado que 94% dos pacientes atendidos são mulheres com média de idade de 49 anos, a maioria dos pacientes foram acometidos com a ESI (61%) e que vivem em região urbana (92%) (FERREIRA; LIMA, 2022).

1.1.2. Etiopatogênese

Apesar de não estar determinado qual é o principal gatilho para o desenvolvimento da ES, tem sido observado que um indivíduo com uma base genética permissiva desencadeia uma série de interações complexas. Isso inclui diferentes estruturas que estão envolvidos nos aspectos funcionais e moleculares bem estabelecidos que participam em um processo retroalimentação, como as células endoteliais, plaquetas, células estruturais (principalmente fibroblastos e miofibroblastos), células do sistema imune, citocinas, fatores de crescimento, autoanticorpos, estresse oxidativo e além de tantas outras moléculas biologicamente ativas, levando ao acúmulo de matriz e culminando em fibrose progressiva. (ALLANORE et al., 2015; BHATTACHARYYA; WEI; VARGA, 2011; FEGHALI-BOSTWICK; VARGA, 2017; KATSUMOTO; WHITFIELD; CONNOLLY, 2011).

A iniciativa dos estudos de associação ampla do genoma (GWAS, sigla em inglês) têm analisado como diferentes *loci* estão relacionados com a susceptibilidade a doença, assim como nas manifestações clínicas (ALLANORE et al., 2015). Por exemplo, em genes da região do complexo de histocompatibilidade (MHC) apresentam maiores indícios de associação com ES, devido a essa região agrupar importantes genes para o bom funcionamento do sistema imune (JIN et al., 2014; NAVARRO; BUSTOS, 2006; STICHERLING, 2012). O grau parentesco também pode estar associado ao surgimento da doença, os parentes de primeiro grau aparentam ter maior predisposição em desenvolver a ES em relação à população em geral (MAYES; TROJANOWSKA, 2007; STICHERLING, 2012).

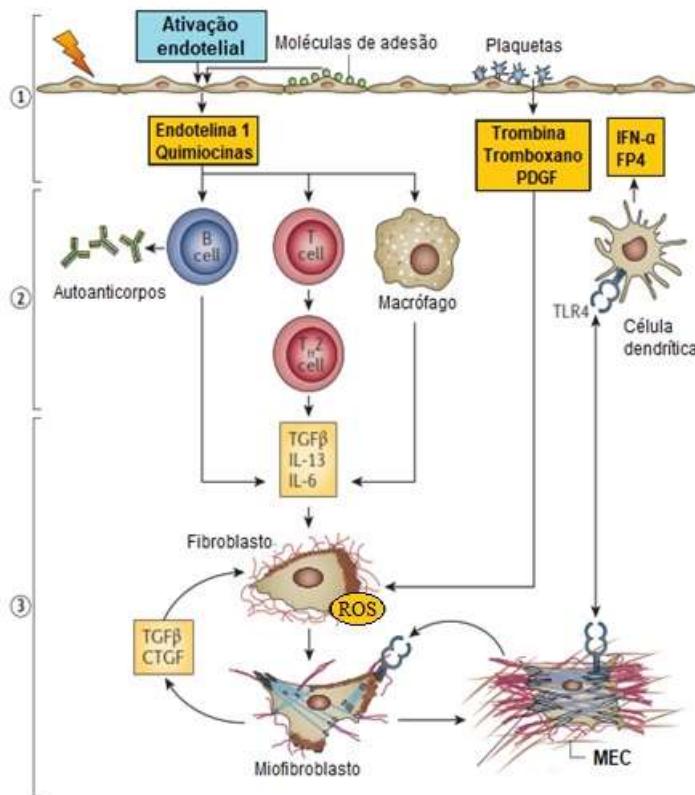
Além disso, as viroses e agentes infecciosos são importantes candidatos a gatilhos ocasionados pelo ambiente que os pacientes vivem, isso se deve ao fato de ter sido encontrado em pacientes com ES anticorpos do citomegalovírus humano, detecção de material genético de Eritrovírus B19 e Epstein-Barr vírus em fibroblastos e miofibroblastos de região fibrosada (FARINA et al., 2014; LUNARDI et al., 2005)

1.1.3. Fisiopatologia

A ES é uma doença autoimune caracterizada pela combinação de fatores genéticos e eventos ambientais que acionam gatilhos moleculares em um indivíduo suscetível (pacientes que tiveram contato com amianto, sílica, solventes orgânicos e vírus) desencadeiam a ativação persistente do sistema imunológico e perda de pontos de checagem. Isso leva os pacientes a desenvolverem os principais mecanismos da

ES: alterações vasculares (1), autoimunidade (2) e fibrose (3), que funcionam em um mecanismo complexo e retroalimentativo com participação de diferentes tipos celulares (células endoteliais, células dendríticas, macrófagos, linfócitos T e B, fibroblastos e miofibroblastos), citocinas inflamatórias (TGF- β , IFN α , IL-6 e IL-13) e produção de espécies reativas do oxigênio (ROS), ilustrado na figura 1 (ALLANORE et al., 2015; BENFAREMO et al., 2022; DENTON; KHANNA, 2017; KATSUMOTO; WHITFIELD; CONNOLLY, 2011).

Figura 1 — Fisiopatologia da esclerose sistêmica. (MEC = matriz extracelular; PDGF = Fator de crescimento derivado de plaqueta; TLR4 = receptores toll-like 4; Th2 = Linfócitos T helper ativados do tipo 2; ERO = espécies reativas de oxigênio; TGF- β = fator do crescimento beta; IFN- α = interferon alfa; IL = Interleucina; FP4 = fator plaquetário 4).



Fonte: Modificado de Allanore. (2015).

1.1.3.1. Disfunção do endotélio vascular

Os danos a pequenos vasos e a ativação endotelial são conhecidos como os prováveis eventos iniciais na ES (ALLANORE et al., 2015; TROJANOWSKA, 2010). A progressão da disfunção vascular costuma provocar a diminuição do número de capilares, espessamento da túnica íntima e média em vasos sanguíneos e estreitamento da microvasculatura do lúmen intestinal, que cursa a quadros de hipoxia

e estresse oxidativo (ALLANORE et al., 2015; TROJANOWSKA, 2010). As células endoteliais secretam diferentes mediadores inflamatórios, principalmente pela expressão das moléculas de adesão intracitoplasmática (ICAM), molécula de adesão celular-vascular 1 (VCAM-1) e selectina-E, e a secreção dessas moléculas que resulta no mecanismo de diapedese e no recrutamento de células inflamatórias. Elas também expressam outros mediadores pró-inflamatórios e pró-fibróticos, como a endotelina-1 e o fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF) (ALLANORE et al., 2015; TROJANOWSKA, 2010). Em pacientes que desenvolveram HAP foi observado a redução da expressão de PPAR- γ , a relação do receptor com a vasculatura pode ser descrita por estudo *in vivo* com camundongos com gene PPAR γ inativo em células lisas do músculo ou em células endoteliais, nas quais ambos os modelos desenvolveram problemas hipertensão vascular (TROJANOWSKA, 2010).

1.1.3.2. Alteração do sistema imunológico

Na ES, a resposta imune e celular encontram-se desreguladas. Na imunidade humoral, a autoimunidade é mediada principalmente por autoanticorpos, enquanto a imunidade celular com atividade de células inflamatórias e citocinas presente em órgãos, como a pele e os pulmões, caracterizando as formas clínicas da doença (ALLANORE et al., 2015).

Na imunidade celular, o linfócito T é responsável pela produção de diversas citocinas que controlam múltiplas tarefas simultaneamente pelo organismo com o objetivo da manutenção da homeostase (KUMAR; CONNORS; FARBER, 2018). Em algumas doenças autoimunes como a ES, o linfócito T exerce um importante papel na fisiopatologia da doença por impactar no acúmulo de MEC e nas vasculopatias (BREMBILLA; CHIZZOLINI, 2012). As células Th2 caracterizam-se pela produção de interleucinas (IL) como IL-4, IL-5, IL-13 e IL-21 que influenciam no metabolismo dos fibroblastos e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) em oposição a atividade de interferon- α (IFN- α) de células de perfil de resposta Th1, potentes inibidores da síntese de colágeno (BREMBILLA; CHIZZOLINI, 2012a; CHIZZOLINI et al., 2003). Além disso, tem sido relatado que em células do sangue periférico de pacientes com ES possuem uma expressão elevada de IFN- γ , citocina de perfil Th1 que apresentar ter atividade antifibrótica. Por outro lado, um estudo desenvolvido por Scala e colaboradores, foi observado níveis reduzidos de IFN- γ em pacientes com ES em comparação aos controles saudáveis. Em contraste, o estudo realizado por

Needleman e colaboradores não reportaram diferenças entre os grupos avaliados (DANTAS et al., 2015; NEEDLEMAN; WIGLEY; STAIR, 1992; SCALA et al., 2004). Em um estudo realizado por Radstake e colaboradores observou-se que a combinação de IL-17, IFN- γ e TGF- β permitiu distinguir os subtipos da ES (RADSTAKE et al., 2009).

Na autoimunidade, a alta atividade dos linfócitos B provoca a produção de autoanticorpos que interferem na regulação da atividade inflamatória. Ainda não se sabe como essas células progridem e regulam as manifestações específicas da ES (YOSHIZAKI, 2018). A presença de autoanticorpos circulantes tem sido usada no diagnóstico de indivíduos afetados pela ES. A presença de autoanticorpos é uma característica central na ativação da imunidade em pacientes com ES, mas sua influência na patogênese não está esclarecida (ALLANORE et al., 2015; YOSHIZAKI, 2018). Vale salientar que a maioria dos anticorpos se ligam diretamente a抗ígenos nucleares, são os anticorpos antinucleares. Os principais ANA associados com a ES, que são específicos ao diagnóstico, são anti-Scl70, anti-CENP, anti-RNAP I e III e o antifibrilarina, e esses quatro diferentes autoanticorpos representam até 80% dos ANA detectados na ES (MEHRA et al., 2013). No entanto, há anticorpos que podem interagir contra receptores de membrana celular,抗ígenos extracelulares, incluindo fibrilina-1, metaloproteinase de matriz 1 (MMP, sigla em inglês) e MMP3 (GUN et al., 2009).

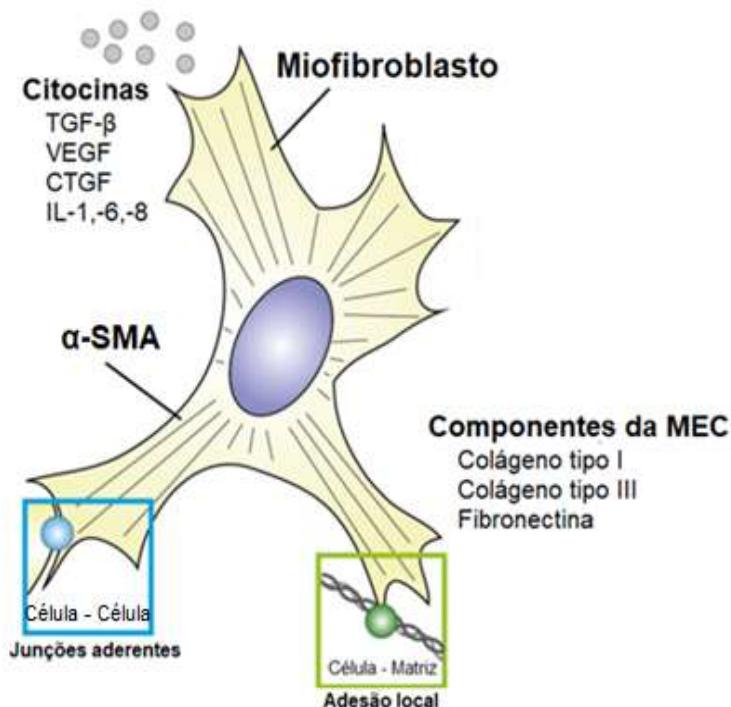
1.1.3.3. Fibrose

A fibrose é a principal característica da patologia da ES, e é resultado do acúmulo progressivo de proteínas da MEC, como colágeno, elastina, glicosaminoglicano e fibronectina, além de enzimas que impulsionam as produções cruzadas do colágeno, isso resulta em cicatrização permanente e substituição da arquitetura normal do tecido por outro mecanicamente rígido e estressado (ALLANORE et al., 2015; ZIMMERMANN; PIZZICHINI, 2013). A extensão da fibrose cutânea está associada à mortalidade pela ES, tudo isso se deve a uma interação complexa entre células do sistema imune, citocinas, quimiocinas e moléculas de sinalização intracelular. (ALLANORE et al., 2015; ZIMMERMANN; PIZZICHINI, 2013). É visto que os pacientes apresentam cicatrização permanente com o tecido mecanicamente rígido e estressado, a extensão da fibrose cutânea é associada a mortalidade pela ES (ALLANORE et al., 2015; ZIMMERMANN; PIZZICHINI, 2013).

Em condições normais, os fibroblastos são células responsáveis pela produção e remodelação da MEC. Na ES, o fibroblasto permanece em estado permanente de hiperatividade, com expressão alterada de genes que determinam a produção abundante de MEC. A medula óssea é uma grande contribuidora para o crescimento populacional de fibroblastos com liberação de células pluripotentes como os fibrócitos para pele e pulmão (KAHALEH, 2004).

Os diferentes fatores pró-fibróticos envolvidos, como TGF- β , IL-4, IL-13, IL-8, IL-6, CTGF, PDGF, MCP-1, IFN- α , que sinergicamente se ocupam em promover o quadro inflamatório e favorecem o depósito de MEC no tecido conjuntivo. Os miofibroblastos são fibroblastos ativos, que também podem ser originados de adipócitos, monócitos, fibrócitos e células endoteliais, são caracterizados pela expressão de alfa actina de músculo liso (α -SMA), o que garante funções contráteis e são produtores de proteínas da MEC como colágeno do tipo I, colágeno do tipo III e fibronectinas, representado na figura 2 (ALLANORE et al., 2015; CHIZZOLINI et al., 2011; ZIMMERMANN; PIZZICHINI, 2013).

Figura 2 — Interação do miofibroblasto no microambiente com citocinas pró-fibróticas, expressão de α -SMA e formação dos componentes da MEC. α -SMA= alfa actina de músculo liso; TGF- β = Fator de crescimento beta; CTGF= Fator de crescimento do tecido conjuntivo.



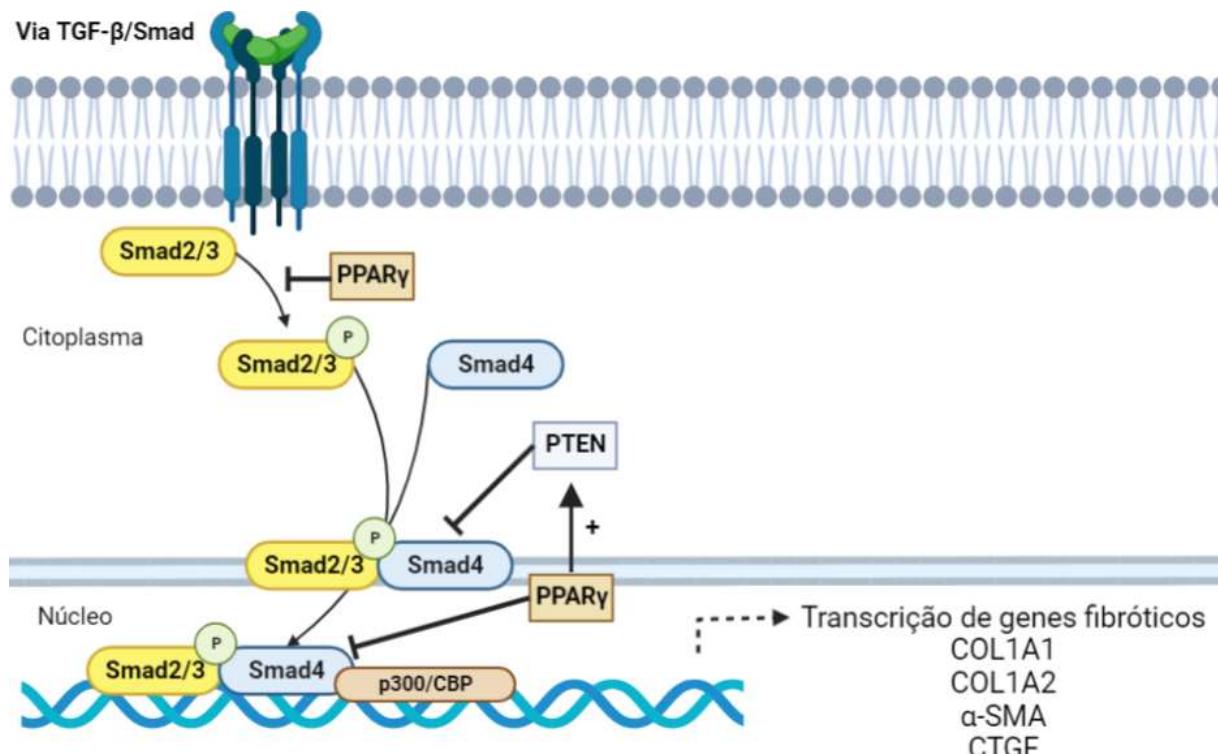
Fonte: Modificado de VAN CAAM (2018).

O TGF- β é o principal indutor da fibrose em condições fisiológicas e na fisiopatologia da ES. Essa citocina multifuncional pertence a uma família de proteínas que participa de diferentes processos fisiológicos, como desenvolvimento embrionário, homeostase, cicatrização de feridas, quimiotaxia e controle do ciclo celular. Entre os membros dessa família, há três principais isoformas descritas em mamíferos, TGF- β I, TGF- β II e TGF- β III. O TGF- β é produzido principalmente por fibroblastos, miofibroblastos, linfócitos T, monócitos e plaquetas, liberado, a princípio, como um complexo latente precursor (LTGF- β). O LTGF- β estar ligado não-covalentemente ao peptídeo associado a latência (LAP, sigla em inglês), sua ativação, incluem a participação de proteases MMP-2 e MMP-9 que interagem com LAP, enfim ativando TGF- β (FENG; DERYNCK, 2005; VERRECCHIA; MAUVIEL; FARGE, 2006).

Após a ativação, TGF- β exerce suas funções nas células ao se ligar aos receptores do tipo I e tipo II em superfícies celulares. A sinalização tem início somente quando o TGF- β se liga ao TGF- β R do tipo II, essa ligação promove a fosforilação dos receptores de proteína quinase do TGF- β R do tipo I (também conhecido como ALK5), resultando na fosforilação de proteínas Smad e na transdução de sinais até o núcleo. Os dois tipos de TGF- β R são incapazes de funcionar independente um do outro, e é fundamental a interação entre os dois tipos de receptores (ALLANORE et al., 2015; IHN, 2008; VERRECCHIA; MAUVIEL; FARGE, 2006)

A sinalização do TGF- β R do tipo I até o núcleo tem início pelo reconhecimento e fosforilação dos seus mediadores, proteínas Smad, que previamente a fosforilação são ancorados a proteína de ancoragem SARA localizados no lado interno da membrana plasmática. A figura 3 ilustra como ocorre a sinalização intracelular, as principais proteínas Smad são Smad2 e Smad3 que então fosforiladas formam um complexo com o cofator Smad4 que se desloca ao núcleo, onde se liga ao DNA e atua como fator de transcrição para regulação de genes pró-fibróticos. Existem outras proteínas da família Smad que atuam como controle negativo da fibrose, Smad6 e Smad7 que bloqueiam a sinalização via Smad por prevenir a fosforilação de proteínas R-Smad. Já a Smad7 se destaca por promover bloqueio do receptor nuclear NR4A1, que tem um papel na degradação de Smad7 e modula a sinalização do TGF- β , na ES é descrito níveis baixos de Smad7 (ALLANORE et al., 2015; IHN, 2008; JIN et al., 2014; VERRECCHIA; MAUVIEL; FARGE, 2006).

Figura 3 — Via de sinalização TGF- β /Smad. O TGF- β se liga ao seu receptor ativando proteínas Smad que formam um complexo que se direcionam ao núcleo da célula permitindo a transcrição de genes fibróticos. O PPAR γ atua como regulador da sinalização não permitindo hiperatividade do receptor e transcrição contínua de genes fibróticos. TGF- β = Fator de crescimento beta; PPAR γ = receptores ativados por proliferador de peroxissoma gama; PTEN= Fosfatase homóloga à tensina; COL1A1= colágeno alfa-1 tipo I; COL1A2= colágeno alfa-2 tipo I; α -SMA= alfa actina de músculo liso; CTGF= Fator de crescimento do tecido conjuntivo.



Fonte: Adaptado de Dantas (2015).

Outras sinalizações intracelulares mediadas pelo TGF- β implicados na ES, como proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK, sigla em inglês), p38, WNT, fosfatidilinositol 3-quinases (PI3K), AKT e TGF- β -activated kinase 1 (TAK1). Essa variedade de mediadores na sinalização de TGF- β pode permitir a seleção de potenciais alvos terapêuticos (ALLANORE et al., 2015; VARGA; PASCHE, 2009).

1.1.3.4. Estresse oxidativo

A principal hipótese de início do desenvolvimento de fibrose na ES se dá por meio do dano vascular que ocasiona reperfusão isquêmica, acompanhado pela produção excessiva da enzima NADPH oxidase (NOX) em células endoteliais, permitindo assim a produção de ROS como o radical superóxido, poderoso agente oxidante (ALLANORE et al., 2015; PENDYALA et al., 2009). A atividade de ROS na fisiopatologia da ES está relacionada com a ativação de fibroblastos e produção de

citocinas inflamatórias como IL-1 β que é capaz de modular atividade das ROS e induzir atividade de TGF- β (LUM; ROEBUCK, 2001; NAIK; DIXIT, 2011; XU; MU; WEI, 2019). A ativação crônica e diferenciação de fibroblastos é medida por TGF- β que permite a produção de proteínas da MEC e das citocinas IL-1 β e IL-13 que estimulam a produção de colágeno em pacientes com ES via ativação de células endoteliais, linfócitos T e fibroblastos (BARAUT et al., 2015; MIDGLEY et al., 2013; XU; MU; WEI, 2019). Apesar dos níveis de TGF- β variar entre os pacientes, é notável sua atividade na produção de ERO por prejudicar função da mitocôndria com o aumento do consumo de oxigênio e indução pela enzima NOX (ABE et al., 2013; LIU et al., 2012).

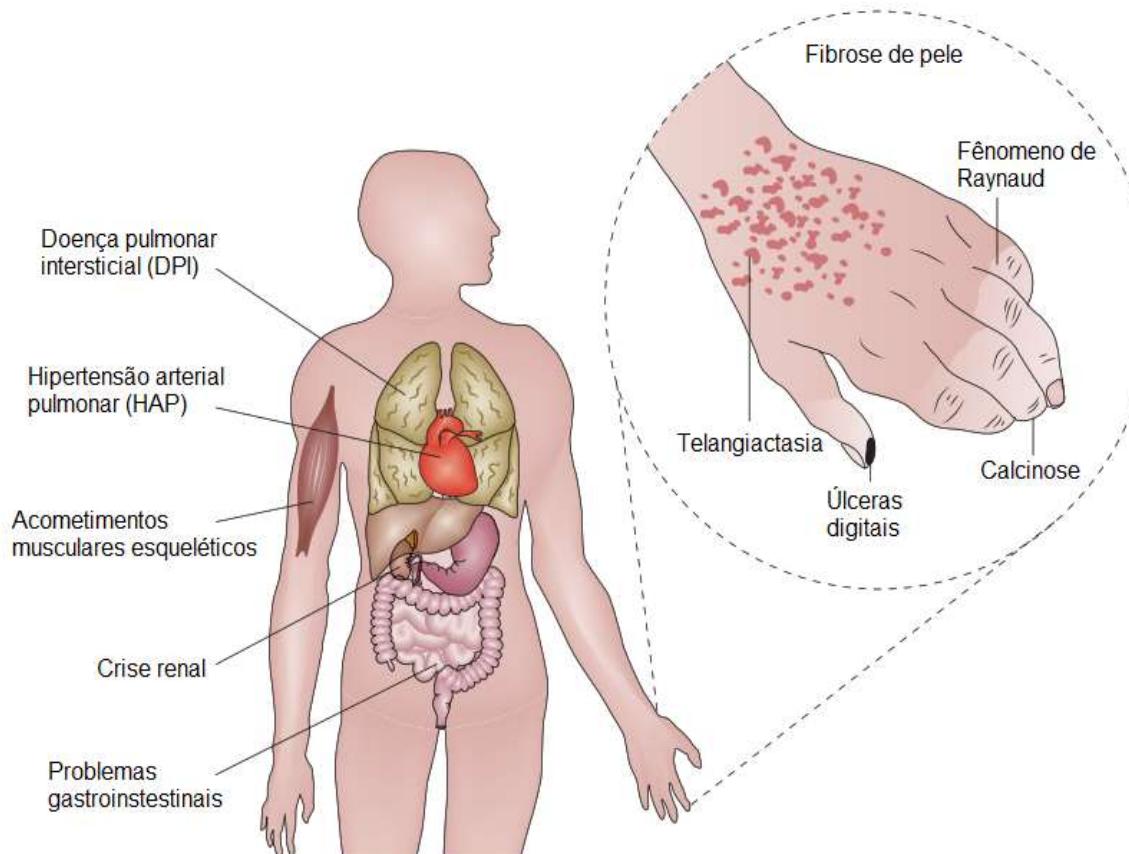
1.1.4. Manifestações clínicas

Os pacientes com ES são classificados em grupos conforme o grau de extensão do comprometimento de pele. Primeiramente, o fenótipo cutâneo limitado (ESl) está associado a evolução mais lenta, com problemas pulmonares, presença do anticorpo centromero e manifestações denominadas como CREST (calcinose, Fry, doença esofágica, esclerodactilia — fibrose limitada aos dedos e telangiectasias), representado na figura 4 (ZUO et al., 2017). Em pacientes com a forma difusa (ESd) também apresentam envolvimento vascular, como o FRy que costuma preceder as outras manifestações da doença de meses a anos, frequentemente associado a úlceras digitais, a fibrose nesses pacientes é observada na pele das regiões do tronco e extremidades (DENTON, 2006). Do ponto de vista sistêmico a forma difusa está relacionada a acometimentos em órgãos internos com fibrose pulmonar, crise renal e doença gastrointestinal difusa que podem desencadear a morte de pacientes (ZUO et al., 2017). Outras manifestações incluem dismotilidade esofágica, refluxos gastrointestinais e a telangiectasia como importante indicativo para a ES (DENTON, 2006). Adicionalmente a isso, pacientes com o fenótipo ESd apresentam em estágios iniciais características como espessamento da pele, coceira, inchaço em membros inferiores e fadiga muscular (ALLANORE et al., 2015).

As alterações na pele são uma causa recorrente de morbidade em pacientes e não está sempre associada geralmente a mortalidade (RACINE et al., 2016). No entanto, os pacientes com o fenótipo ESd são descritos com rápido crescimento da fibrose na pele que acaba sendo associado ao alto risco de mortalidade e consequentes danos a órgãos viscerais (DENTON; KHANNA, 2017). A partir disso, foi desenvolvido escore de Rodnan que visa quantificar a extensão da fibrose na pele, na

qual delimita espessamento na pele em 17 regiões do corpo com escala de 0 (normal) a 3 (severo) com pontuação máxima de 51 (SAMPAIO-BARROS, 2013).

Figura 4 — Acometimentos de diferentes órgãos na esclerose sistêmica. A lesão aos órgãos é ocasionada pela fibrose descontrolada que leva complicações severas aos pacientes e a resposta a tratamentos



Fonte: Modificado de Allanore (2015).

Não sendo exclusivo da ES, o FRy é uma manifestação comum que afeta pequenos vasos sanguíneos em extremidades como mão e pés, atribuindo a aparência pálida, seguida de cianose e eritema, que pode preceder outras manifestações clínicas da doença (ALLANORE et al., 2015; DENTON; KHANNA, 2017). Outra manifestação que atinge as extremidades são as úlceras digitais, que possibilitam a infecções bacterianas, gangrenas, osteomielite e amputação (STEEN et al., 2009). A calcinose em tecidos não-articulares é encontrado com frequência em mãos, joelhos e quadris que acompanha com dores constantes, que pode variar de acordo tamanho e morfologia da deposição de cálcio (BARTOLI et al., 2016).

A fibrose pulmonar ou doença pulmonar intersticial (DPI) e a hipertensão arterial pulmonar (HAP) desencadeiam o comprometimento das funções pulmonares, tornando em uma das grandes preocupações da doença por ser causa de 50% da mortalidade da doença, podendo apresentar sintomas, como tosse seca e dispneia ou ser silenciosa (ALLANORE et al., 2015). As consequências da DPI estão presentes em 80% dos pacientes, estão mais relacionados ao fenótipo da ESd, mas em pacientes ESI é comumente associada ao FRy e outras manifestações vasculares (BONHOMME et al., 2019). As principais ferramentas de *screening* para DPI são o teste de função pulmonar e a tomografia computadorizada (TC), já para o HAP é ecocardiograma (ALLANORE et al., 2015; DENTON; KHANNA, 2017b).

Os sintomas intestinais ocorrem nos dois subtipos da ES, logo provavelmente a severidade cutânea não deve estar relacionada com as manifestações relacionados ao TGI (SAVARINO et al., 2014; SZAMOSI; SZEKANEZ; SZÜCS, 2006). Pacientes com ES são acometidos com a dismotilidade gastrointestinal, sendo a causa de diferentes sinais clínicos como o refluxo gastroesofágico, disfagia, dor ardente no tórax, náuseas e perda de peso (SAVARINO et al., 2014). Acometimentos musculares-esqueléticos se fazem presentes nos dois subtipos da ES, causando mialgia, artralgia, encurtamento das digitais e dores nos tendões, são um dos principais fatores da redução de qualidade de vida dos pacientes (LÓRÁND; CZIRJÁK; MINIER, 2014).

Na ES, os problemas renais estão acompanhados de hipertensão, insuficiência renal progressiva, dores de cabeça, edema pulmonar, proteinúria e microangiopatia (BRUNI et al., 2018). O evento inicial provavelmente é o espessamento anormal da camada íntima dos vasos sanguíneos, facilitando agregação plaquetária, adesão, lançamento de fatores de coagulação e formação de ROS são acontecimentos importantes para produção e depósito de proteínas da MEC (BRUNI et al., 2018). Historicamente, a mortalidade entre os pacientes com crise renal é bastante alta, mas a introdução dos inibidores da enzima conversora de angiotensina tem reduzido essa estimativa durante anos. Mesmo com o progresso, a crise renal exige rápida identificação e tratamento agressivo para manutenção das funções renais. (ALLANORE et al., 2015; DENTON et al., 2009).

1.1.5. Diagnóstico

O diagnóstico da ES passou por diversas mudanças ao longo das décadas por iniciativas de profissionais da saúde e pesquisadores com finalidade de diagnosticar precocemente e avaliar possíveis opções de tratamento aos sintomas. Primeiramente, em 1980, o atual ACR publicou os critérios preliminares para o diagnóstico da ES, incluíam a presença de fibrose simétrica da pele proximal, as metacarpofalangeanas (MCF) ou metatarsofalangeanas (MTF) como critério maior e esclerodactilia, ulceração polpas digitais e fibrose nas bases pulmonares como critérios menores (HUDSON; FRITZLER, 2014; SAMPAIO-BARROS, 2013).

Em 2001, LeRoy e Medsger propuseram novos critérios com o objetivo de diagnosticar a ES em estágio inicial, ou seja, sem o aparecimento das manifestações viscerais e comprometimento cutâneo. Esses critérios englobam o FRy observada pelo médico com microangiopatia através da capiloscopia periungueal (CPU) ou anticorpos específicos (anticentrômero, antitopoisomerase I, antifibrilarina, anti-PM-Scl, anti-RNA polimerase I ou III). Esse método foi validado por estudo prospectivo no qual observou que 80% dos pacientes com FRy com anticorpos específicos e padrão SD na CPU desenvolveram ES (KOENIG et al., 2008).

Em 2013, com propósito de desenvolver critérios mais sensíveis que considerassem também a utilização de diagnósticos mais modernos, a EULAR em conjunto com a ACR incluiu os exames laboratoriais e CPU, que ainda não haviam sido validados. Em um escore com pontuação máxima de 19 pontos, o caso é classificado como ES se preencher 9 pontos ou mais. Os novos critérios abrangem o espessamento bilateral da pele dos dedos, a esclerodactilia, as lesões isquêmicas nas pontas do dedo (úlceras ou micro cicatrizes), as telangiectasias, a CPU alterada, a DPI e/ou HAP, FRy e a detecção de anticorpos específicos (HUDSON; FRITZLER, 2014; VAN DEN HOOGEN et al., 2013). A partir disso, se o paciente tem sinais de FRy e edema de dedos com teste de anticorpo antinuclear (ANA) reagente, é solicitado a detecção de anticorpos específicos e CPU para confirmação do diagnóstico precoce para ES (SAMPAIO-BARROS, 2013). Na presença desses sinais, o paciente é encaminhado para avaliação com especialista, essa estratégia é corroborada por estudo posterior que grande número dos pacientes que apresentam os três sinais apresentara anticorpos específicos para ES ou padrão SD na CPU, atendendo os critérios para diagnóstico precoce (MINIER et al., 2014). A inclusão dos

novos critérios permitiu a estabilização dos três principais pilares da ES, vasculopatia, autoimunidade e fibrose (VAN DEN HOOGEN et al., 2013).

1.1.6. Modalidades terapêuticas

A conduta terapêutica não é padronizada na ES devido à baixa prevalência e curso clínico variável, a condução de ensaios clínicos randomizados é desafiadora. O tratamento depende do quadro clínico e do acometimento visceral, assim como se a doença está ativa e reversível (vasoconstrição e inflamação) ou irreversível (fibrose ou necrose) (ALLANORE et al., 2015).

Os medicamentos que já se encontram disponíveis no mercado buscam atenuar os sintomas, se compõe em imunossupressores, glicocorticoides (GC) e vasodilatadores (antagonistas da endotelina, bloqueadores dos canais de cálcio (BCC)), antagonistas alfas adrenérgicos, inibidores da fosfodiesterase, inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECA), e os bloqueadores do receptor da angiotensina II (BRA)) (SAMPAIO-BARROS, 2013).

Ciclofosfamida oral sobressaiu-se em estudo duplo-cego, no qual os pacientes com ES apresentaram como desfecho primário significativo dos escores de Rodnan em tratamento realizado no período de 12 e 24 meses quando comparados ao grupo placebo e tal melhora desapareceu quando a medicação foi suspensa (TASHKIN et al., 2006). Com suspensão da medicação, as melhorias relacionadas ao espessamento da pele, decorrente de fibrose, desapareciam. No entanto, foi revelado que o medicamento é uma droga tóxica ao coração, gerando sobrecarga ao coração. Caso o paciente com ES tenha pré-disposição de problemas cardíacos aumenta o risco de vida desse tipo de tratamento (BURT et al., 2013).

O metotrexato é outro imunossupressor indicado para o espessamento cutâneo progressivo que apresenta a curto prazo melhora da pele (SAMPAIO-BARROS, 2013). Porém, são pouco eficazes a longo prazo com a progressão da doença e entre os principais efeitos adversos como leucopenia, plaquetopenia e aumento da sensibilidade da pele (“PORTARIA CONJUNTA No 9 - Imprensa Nacional”, 2017). Para a fibrose pulmonar é utilizado a azatioprina que consegue reduzir o acúmulo de MEC no órgão, mas possui efeitos adversos que podem diminuir a qualidade de vida como hepatopatias, queda de cabelo, leucopenia, vômitos e etc.

Nintedanib, inibidor de tirosina quinase, cujos os alvos são receptores do fator de crescimento de fibroblasto, receptor de PDGF e receptor do fator de crescimento

vascular, foi aprovado pela FDA e EMA para uso de pacientes com DPI, após resultados de estudos de fase III. Nesse estudo foi observado em 663 pacientes com ES que a capacidade de força vital, exame de função pulmonar, com avaliação de fibrose por tomografia computacional sugerem benefícios na capacidade pulmonar, mas a eficácia a longo prazo da Nintedanib ainda precisa ser avaliada (BENFAREMO et al., 2022)

Na ES, os GC têm sido frequentemente usados para manifestações musculoesqueléticas e da DPI em associação com os imunossupressores (IUDICI et al., 2014). No entanto, os GC devem ser usados em baixas doses no tratamento, tendo em vista que o uso crônico desse tipo de medicamento pode ser um fator de risco ao surgimento da crise renal em pacientes com ES (PORTARIA CONJUNTA No 9 - Imprensa Nacional”, 2017) O desbalanceamento dos componentes vasodilatadores e vasoconstrutores está entre os gatilhos iniciais que promovem a ES, logo, os vasodilatadores são bastante importantes contra essas manifestações. No tratamento da FRy as opções farmacológicas disponíveis são os BBC, antagonistas da endotelina e antagonistas alfas adrenérgicos, inibidores da fosfodiesterase (SAMPAIO-BARROS, [s.d.]) Em pacientes com crise renal, é indicado o uso de IECA com intenção de diminuir hipertensão arterial na prevenção de lesões irreversíveis em vasos renais. Aos pacientes que não responderem bem ao tratamento de IECA o uso de BBC pode ser empregado (DENTON et al., 2009).

Novas moléculas com potencial atividade anti-inflamatórias e antifibrótica estão sendo avaliadas como possíveis alvos terapêuticos em ensaios clínicos de fase III. O canabinoide Lenabasum demonstrou eficácia promissora em modelos pré-clínicos de inflamação e fibrose. Estudos pré-clínicos e clínicos em humanos demonstraram que o Lenabasum tem segurança, tolerabilidade e perfil farmacocinético favoráveis. No nível clínico, a droga demonstrou benefício significativo em um estudo de fase II em ESd, mantendo as melhorias nos escores de pele e vários resultados relatados pelo paciente no estudo de extensão aberto de longo prazo (MEISSNER et al., 2019; SPIERA et al., 2018). Um estudo de fase III de administração de Lenabasum em pacientes com ES difusa foi concluído em dezembro de 2020 (NCT03398837).

Pirfenidona é um agente antifibrótico com propriedades anti-inflamatórias, incluindo inibição de citocinas pró-inflamatórias e inibição da proliferação de células inflamatórias (IYER; HYDE; GIRI, 2000). A pirfenidona foi aprovada para o tratamento de pacientes com fibrose pulmonar idiopática (FPI), uma doença crônica, progressiva,

que pode ser fatal (KING et al., 2014; NOBLE et al., 2011). Apesar das diferenças em sua apresentação clínica, FPI e ES-DPI compartilham alguns mecanismos patogênicos sobrepostos, incluindo lesão de células estruturais, ativação de fibroblastos, acúmulo de miofibroblastos, expressão de citocinas pró-fibróticas e fatores de crescimento e DPI progressiva. A pirfenidona é geralmente bem tolerada em pacientes com FPI e, em comparação com o placebo, a pirfenidona reduz significativamente a progressão da doença e aumenta a sobrevida livre de progressão. A pirfenidona também reduz significativamente o risco de mortalidade em pacientes com FPI em comparação com o placebo (KHANNA et al., 2016).

Evidências de modelos experimentais de fibrose indicam que a expressão de IL-17 e de seu receptor é regulada positivamente na fibrose pulmonar, com expressão aumentada de TGF- β (MI et al., 2011). O uso de agentes biológicos que têm como alvo a IL-17 é, portanto, uma estratégia potencial promissora na ES. Um ensaio clínico de fase III de brodalumab, um antagonista do receptor de IL-17, está em andamento (NCT03957681).

1.1.6.1. Processo de desenvolvimento de novos fármacos

A iniciativa para o desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas inicia na pesquisa básica com a fase pré-clínica que possui etapas, como o embasamento científico da problemática médica, a seleção de um alvo terapêutico, o desenvolvimento de estratégias de avaliação, os estudos *in silico*, a síntese e a caracterização de novos compostos, e os ensaios *in vitro* e *in vivo* (PANTALEÃO et al., 2022).

Em ensaios *in vitro*, é esperado que o princípio ativo do composto desenvolvido resulte ação terapêutica *in vivo*, por conta disso é fundamental que continuar ativo por um determinado período na vizinhança do alvo terapêutico. Para que isso se torne factível, necessitam-se de pesquisas sobre os percursos possíveis que o princípio ativo pode fazer desde a administração até alcançar a circulação sistêmica, para que possa exercer a atividade biológica esperada. Isso é permitido por meio de estudos da farmacocinética, que contempla os processos de absorção (A), distribuição (D), metabolismo (M) e excreção (E). Paralelamente ao processo ADME, é requerido um equilíbrio da dosagem do composto para os níveis de concentração na faixa terapêutica desejada sem alterar eficácia do tratamento e sem levar a toxidez (PANTALEÃO et al., 2022)

O método *in silico* que estabeleceu limites para avaliação da absorção e permeabilidade de fármacos foi desenvolvido por Lipinski e colaboradores, conhecida como “regra dos 5”. Segundo a regra, há grande probabilidade de compostos candidatos a fármacos possuir absorção e permeabilidade adequadas se respeitarem os seguintes parâmetros: peso molecular (g/mol) ≤ 500 g/mol; valor de Log P ≤ 5 ; possuir até 5 grupos doadores de ligação de hidrogênio; 10 acetores de ligações de hidrogênio (LIPINSKI et al., 2001). Novas propriedades moleculares foram implementadas, como a área total de superfície polar (A°) que também deve ser considerado na análise de permeabilidade (DAINA; MICHELIN; ZOETE, 2017).

Em compostos candidatos a fármacos onde o objetivo não esteja atuar no sistema nervoso central (SNC) é necessário considerar sua capacidade de transpor a barreira hematoencefálica (BHE), assim minimizando possíveis efeitos colaterais. A BHE é formada por endotélio capilar cujo objetivo é proteger o cérebro de substâncias químicas presentes no sangue. Sua complexa rede de capilares torna o cérebro restrito a substâncias apolares. Em compostos com área total da superfície polar $< 90 A^\circ$ e massa molecular ≤ 450 g/mol possuem maior probabilidade ultrapassar a BHE (CECCHELLI et al., 2007).

As propriedades ADME de compostos que podem se tornar medicamentos também consideram as proteínas transportadoras, sobretudo a glicoproteína-P (gp-P). Essa é uma proteína transportadora que depende de ATP para funcionar e atua como uma bomba de efluxo, retirando substâncias do organismo para o meio externo com o objetivo de protegê-lo de compostos que possam ser prejudiciais. Um eventual efluxo pela gp-P interfere nas propriedades ADME, resultando em dificuldades de absorção gastrointestinal, até a permeabilidade da BHE, se o objetivo do composto candidato seja atingir o SNC (WANG et al., 2018).

1.1.6.2. Receptores PPAR como alvos terapêuticos

A fisiopatologia da ES tem como característica a desregulação imunológica, aumento da atividade do fibroblasto, pois é capaz de se diferenciar em miofibroblasto, perda da camada de adipócitos da pele, expressão contínua de proteínas da MEC como colágenos (COL1A1 e COL1A2) e fibronectinas através da via canônica TGF- β /Smad e outras vias não canônicas que direcionam ao endurecimento da pele (DANTAS et al., 2015; LIU et al., 2020; RUZEHAJI et al., 2016). Esse contexto proporcionou estudos que tiverem a iniciativa de compreender os mecanismos do

sistema imunológico e fibrogênese da doença, foi observado que o PPAR α e PPAR γ estão envolvidos no controle da fibrose quando ativados (LIU et al., 2020; RUZEHAJI et al., 2016).

O PPAR γ é expresso em diferentes células do sistema imune como macrófagos e linfócitos assim como em fibroblastos no tecido conjuntivo (DANTAS et al., 2015; KLOTZ et al., 2005). Em linfócitos T, monócitos e macrófagos, PPAR γ por derivado tiazolidínico possui atividades antiproliferativas e anti-inflamatórias, isso foi observado em monócitos e macrófagos que tiveram a expressão de mediadores pró-inflamatórios inibidos e estresse oxidativo inibidos, bem como a inibição da secreção interferon gama (IFNy) em linfócitos T (CUNARD et al., 2004; FORMAN et al., 1995; JIANG; TING; SEED, 1998; KNETHEN; BRÜNE, 2002; LEHMANN et al., 1997; RICOTE et al., 1998). Em células mononucleadas do sangue periférico (PBMC) de pessoas saudáveis quando estimuladas com fitohemaglutinina (PHA) e tratadas com pioglitazona, um tiazolidínico, houve redução da secreção de IFNy, citocina que se destaca na resposta imune adaptativa (KLOTZ et al., 2005).

Também houve iniciativa de compreender os mecanismos da fibrogênese da doença através dos PPARs, foi observado que o PPAR α e PPAR γ estão envolvidos no controle da fibrose quando ativados (LIU et al., 2020; RUZEHAJI et al., 2016). Em estudos que avaliaram pan-agonismo apresentaram que todas as isoformas de PPAR estavam reduzidas em camundongos com fibrose ou em biópsias de pacientes com ES (AVOUAC et al., 2017; DERRETT-SMITH et al., 2021). Inicialmente, o PPAR γ se destacou por apresentar relação inversa com a sinalização aumentada de TGF- β em tecido lesionados, mas contrasta com estudo publicado por Żółkiewicz que apresentou pacientes com ES que possuem níveis elevados de PPAR γ . O papel dos PPARs na fisiopatologia da doença ainda não está bem esclarecido, a literatura menciona apenas suas propriedades antifibróticas após tratamento (DANTAS et al., 2015; DERRETT-SMITH et al., 2021; KORMAN et al., 2018; ŻÓŁKIEWICZ et al., 2020).

A identificação dos principais fatores que levam à fibrose é de interesse da terapia clínica, nenhum medicamento foi aprovado como antifibrótico capaz de prevenir definitivamente a progressão ou reverter a fibrose. Os ligantes de PPAR γ da família tiazolidinediona, incluindo rosiglitazona, pioglitazona e troglitazona já foram apontados como potenciais fármacos para controle da fibrose e agir como controle negativo das proteínas Smad2 e Smad3 e de vias não canônicas ativadas pelo TGF- β , mas estão associados ao risco de morte por doenças cardiovasculares. (DANTAS

et al., 2015b; LIU et al., 2020). Baseado nisso, há estudos pioneiros da literatura que desbravam pela busca de um pan-agonista de PPAR, se trata de estudos promissores com intuito de potencializar a atividade antifibrótica de pele e pulmão em ensaios *in vitro*, se destacam o IVA337 e lanifibranor (AVOUAC et al., 2017; DERRETT-SMITH et al., 2021; RUZEHAJI et al., 2016).

Em trabalho publicado por Derrett-Smith e equipe foi utilizado um modelo transgênico esclerodérmico de camundongo que possui elevada atividade da sinalização TGF- β com objetivo de averiguar atividade do lanifibranor como pan-agonista na via de sinalização de PPAR, os dados apresentados pela publicação direcionam, que o medicamento possui atividade antifibrótica *in vivo* e que os níveis das isoformas de PPAR estão reduzidas em camundongos com ES em comparação aos tipos selvagens (DERRETT-SMITH et al., 2021).

O IVA337 possui dois estudos promissores, o primeiro de autoria de Ruzehaji, que assim como Derrett-Smith e equipe, utilizou modelo animal, com diferença que para induzir a fibrose dermal nesses animais foi utilizado a bleomicina para avaliar atividade antifibrótica, paralelamente com estudos da pele de pacientes com ES que avaliou a presença dos PPARs e marcadores de fibrose. Os primeiros resultados apresentam em cortes histológicos como PPAR- α e PPAR- γ estavam reduzidos na biopsia de pele de pacientes com ES em comparação os controles saudáveis com elevada expressão de α -SMA, importante marcador de fibrose, PPAR β/δ não foi detectado em pele de pacientes e nem em controles saudáveis, pouco discrepante observado por Derrett-Smith que ainda detectou essa isoforma em camundongos com fibrose (DERRETT-SMITH et al., 2021; RUZEHAJI et al., 2016).

Os resultados de Derrett-Smith em modelo *in vivo* após indução com bleomicina, foi observado a redução da fibrose em pele de camundongos após tratamento com IVA337 em doses diferentes. Para ratificar a evidência da atividade do medicamento foi necessário identificar os efeitos inibitórios na via canônica TGF- β /Smad, os ensaios envolvidos utilizaram cultura primária de fibroblastos de pacientes com ES. Através da técnica de imunofluorescência foi observado que a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos foi reduzida via menor marcação de α -SMA, para confirmar a participação das isoformas de PPAR foram realizados experimentos de expressão gênica e proteica que apresentou resultados por PCR (reação em cadeia da polimerase) e *western blot* que em células estimuladas com TGF- β e tratadas com IVA337 teve redução significativa dos genes e proteínas colágeno tipo I e α -SMA.

Também foi descrito que, o tratamento com IVA337 em culturas primárias de fibroblastos de pacientes com ES a reduziu as atividades das proteínas Smad2/3 e das proteínas quinases ativadas por mitógenos p38. Apesar dos resultados antifibróticos promissores, o fármaco apresentou atividades semelhantes a agonistas seletivos de PPAR γ *in vitro* e que não conseguia interferir na cicatrização de feridas. No entanto, os resultados indicam interação simultânea com as isoformas de PPAR, direcionando o caminho para estudos posteriores (RUZEHAJI et al., 2016).

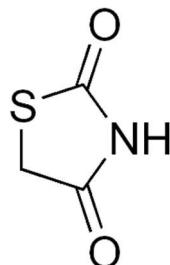
Em 2017 é publicado outro estudo com o IVA337 apresentando sua eficácia em combate a fibrose pulmonar e consequentemente a hipertensão pulmonar. Assim com o estudo anterior, Avouac e equipe utilizaram modelos animais induzidos por bleomicina e Fra-2 transgênico com tratamento em duas doses (30 mg/kg ou 100 mg/kg) ou com veículo de administração oral. Os resultados demonstram que em dose de 100 mg/kg foi indicativo de proteção para o desenvolvimento de fibrose pulmonar em ambos os modelos de camundongos em comparação com a dose de 30 mg/kg ou com veículo de administração oral com redução de marcadores de fibrose. Com cultura primária de fibroblastos primária é relatado inibição por dose-dependência da diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos induzidos por TGF- β e redução da proliferação de fibroblastos quando estimulados pelo fator de crescimento derivado de plaquetas (AVOUAC et al., 2017).

A redução da atividade da diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos e redução de importantes marcadores de fibrose são indicativos da atividade da proteína Smad7 como controle negativo a sinalização TGF- β , em pacientes com ES foi observado redução da atividade dessa proteína (DANTAS et al., 2015).

1.1.6.3. Tiazolidinedionas como alternativa terapêutica na esclerose sistêmica

Desde então novas modalidades terapêuticas estão em estudo em busca de alvos terapêuticos que consigam combater a fibrose, o principal fenótipo da ES (ALLANORE et al., 2015). Uma classe de compostos como os derivados tiazolidínicos ou tiazolidinedionas são ligantes sintéticos ao PPAR γ , que vêm sendo interesse de pesquisas pelo seu grande potencial antifibrótico e anti-inflamatório na fibrose de pele (DANTAS et al., 2015; GHOSH; ASISH GHOSH, 2021). Apresentam, como característica de sua estrutura química, o anel tiazolidina (“2,4-thiazolidinedione - Wikidata”, [s.d.]; DE BRITO GOMES, 2006) (figura 5).

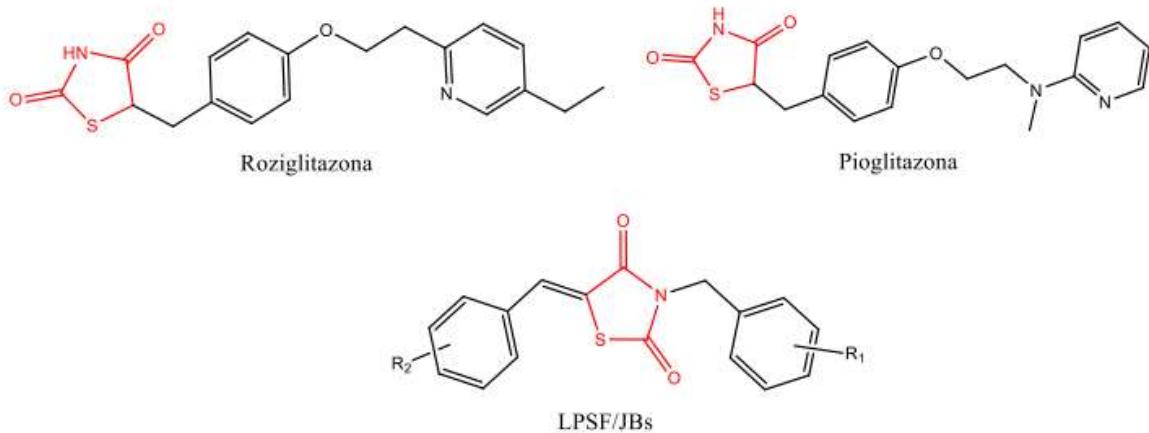
Figura 5 — Anel de tiazolidina.



Fonte: Brito Gomes (2006).

Esta classe de moléculas é conhecida pela sua atividade antiglicêmica e apresenta na sua estrutura química um anel pentamérico heterocíclico com um enxofre na posição 1 e um nitrogênio na posição 3, podendo conter carbonilas na posição 2 e/ou 4 (Figura 6). Os derivados tiazolidínicos disponíveis no mercado (Roziglitazona e Pioglitazona) são TZDs, ou seja, apresentam carbonilas nas posições 2 e 4 do anel (BRANCO JÚNIOR, 2017).

Figura 6 — Estrutura química da Roziglitazona e Pioglitazona com os derivados tiazolidínicos (LPSF/JBs).



Fonte: Branco Júnior (2017).

Em um estudo envolvendo modelo animal, Kohno e colaboradores, induziram a ES em camundongos através da administração de bleomicina, e conseguiram reduzir a inflamação e a fibrose através da rosiglitazona. (KOHNO et al., 2006). Enquanto a redução da expressão de PPAR γ aumenta a suscetibilidade ao desenvolvimento de fibrose em camundongos tratados com bleomicina (KAPOOR et al., 2009). Já em fibroblastos de pacientes com ES, Shin-wen e colaboradores

apresentaram que em células tratadas com RSG houve um aumento da síntese de PPAR γ com a redução de marcadores fibróticos, como o CTGF, a α -SMA e o colágeno tipo I (SHI-WEN et al., 2010). Em fibroblastos da derme saudáveis, em estudo de Antonelli e colaboradores foi observado que células tratadas com RSG reduziu os níveis de citocinas inflamatórias, como o IFNy, sugerindo papel das TZD no controle inflamatória na derme (ANTONELLI et al., 2013).

Observou-se no estudo de Rêgo e colaboradores a potencial atividade anti-inflamatória em novo derivado tiazolidínico, o LPSF/CR-35, ao reduzir os níveis de citocinas IL-6, IL-17A, IL-22 e IFNy em PBMC de crianças com asma e em modelo animal (RÊGO et al., 2018). Além disso, foi descrito por Silva que o derivado LPSF/GQ-16 reduziu os níveis de IFNy e TNF α em PBMC de voluntários saudáveis (SILVA, 2018). O papel de modulador de PPAR γ a nível gênico foi descrito com os derivados LPSF/GQ-16 que aumentou a expressão de PPAR γ em comparação a PBMCs não estimuladas e LPSF/GQ-147 que aumentou a expressão gênica em comparação com a rosiglitazona (BRAYNER CAVALCANTI et al., 2021; RÊGO et al., 2018)

O efeito dos agonistas do PPAR γ na proliferação de fibroblastos também foi investigado em outras doenças. O RSG inibiu de maneira dose-dependente a proliferação de fibroblastos cardíacos em pacientes com fibrose miocárdica (LI; LIU; WEI, 2008). Consistentemente, Mughal e colaboradores confirmaram *in vitro* o papel das ciglitazona, rosiglitazona e troglitazona, mas por meio de um mecanismo independente de PPAR γ (MUGHAL et al., 2009). Também os fibroblastos pulmonares humanos cultivados foram inibidos por RSG no que diz respeito à sua migração, proliferação e diferenciação fenotípica (LIN et al., 2010).

Apesar dos resultados promissores de modelos de ES *in vitro* e *in vivo*, as TZDs disponíveis comercialmente levam ao risco de doenças cardiovasculares, fragilidade óssea e aumento de peso, as interações realizadas dos ligantes em seus respectivos alvos são únicos para cada molécula. Como alternativa, o desenvolvimento e avaliação dos derivados tiazolidínicos LPSF/JBs com menor potencial atividade agonista do PPAR γ e uso de outras vias metabólicas, possibilita sugerir cenários que, pacientes com doenças inflamatórias tenham menos efeitos adversos (BRANCO JÚNIOR, 2017). Além disso, característica estrutural dos derivados tiazolidínicos indicam potencial atividade anti-inflamatória através do PPAR γ e vias alternativas, sugerindo maior efetividade (CÉSAR et al., 2015).

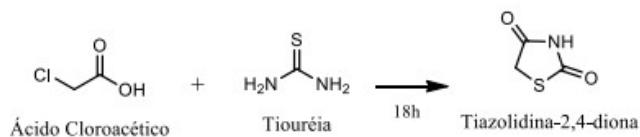
O cenário de desenvolvimento e avaliação dos LPSF/JBs com potencial atividade terapêutica pode representar novas alternativas de tratamento para pacientes com ES, de forma que possa ser eficaz e segura aos pacientes.

1.1.6.4. Rotas de síntese dos LPSF/JBs

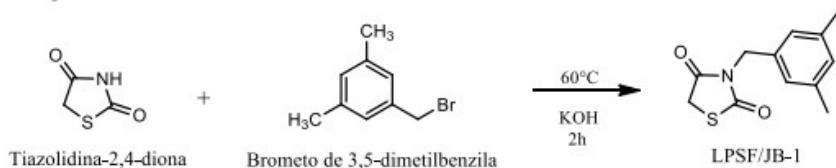
A síntese do LPSF/JB-3 foi descrito em trabalho de Branco Júnior, que foram realizadas em 4 etapas. (1) Síntese do anel de tiazolidina: Ciclização entre ácido monocloroácetico e tioureia; (2) Substituição nucleofílica da TZD pelo brometo de 3,5-dimetilbenzila para formar o intermediário 3-(3,5-dimetilbenzil) tiazolidina-2,4-diona (LPSF/JB-1); (3) Formação do éster de Cope: Condensação de Konevenagel entre o cianoacetato de etila e os aldeídos aromáticos; (4) Adição entre o LPSF/JB-1 e os ésteres de Cope. Em relação ao LPSF/JB-20 foi necessário fazer uma reação alternativa de Condensação de Konevenagel (3^a etapa alternativa) utilizando os respectivos aldeídos aromáticos e o intermediário LPSF/JB-1, representado todo o esquema de síntese do LPSF/JBs na figura 7 (BRANCO JÚNIOR, 2017).

Figura 7 — Rota de síntese dos derivados tiazolidínicos LPSF/JBs

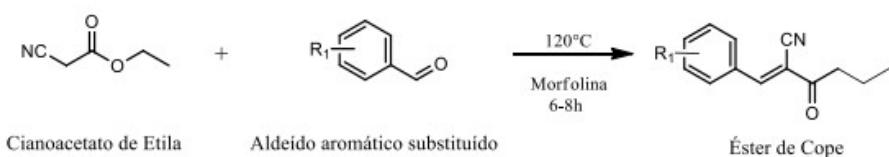
1^a Etapa



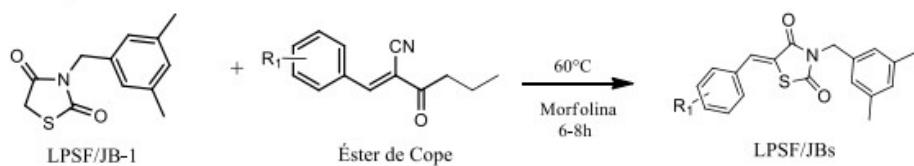
2^a Etapa



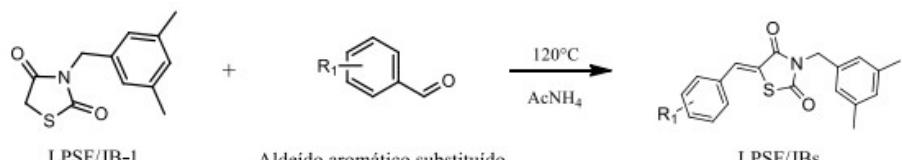
3^a Etapa



4^a Etapa



3^a Etapa Alternativa



Fonte: Branco Júnior (2017).

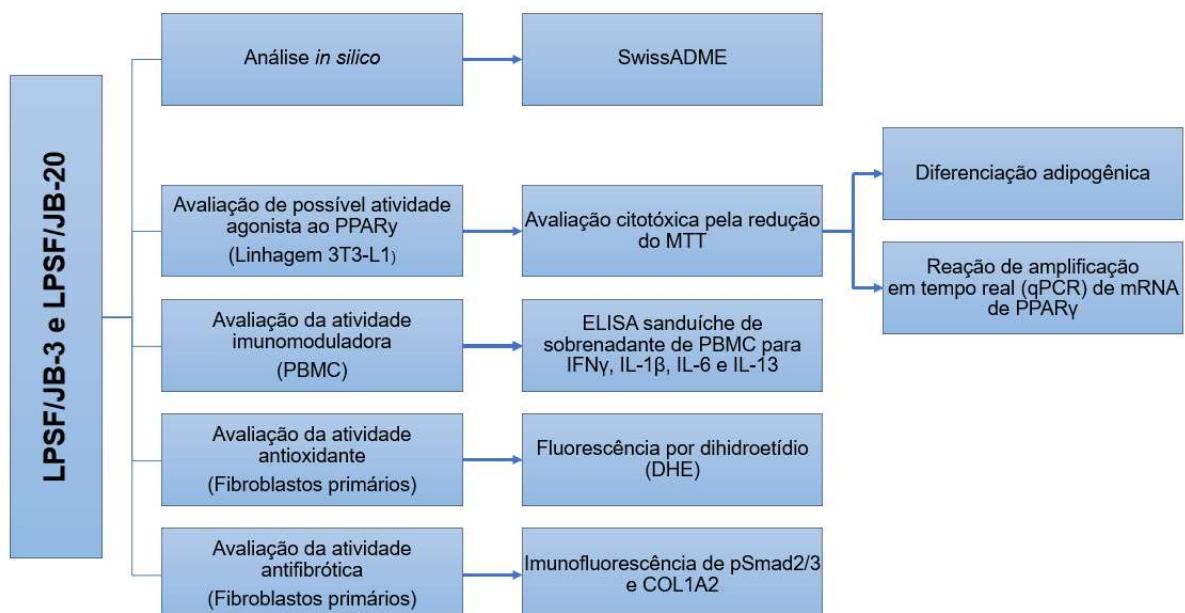
Para formação do LPSF/JB-3 teve a adição do radical 4-OH, na posição R1, e LPSF/JB-20 foi adicionado radical 5-Br-1H-indol, também na posição R1, moléculas com radicais que contêm indol se destacam por potencial atividade farmacológica (KUMAR; RITIKA, 2020).

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Considerações éticas

Seguindo a resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, o uso de amostras foi iniciado após a submissão ética do presente trabalho e sua autorização. Parecer consubstanciado HC/CCS/UFPE (CAAE: 55556222.7.0000.5208; nº do aparecer: 5.628.483).

5.2. Delineamento experimental do estudo

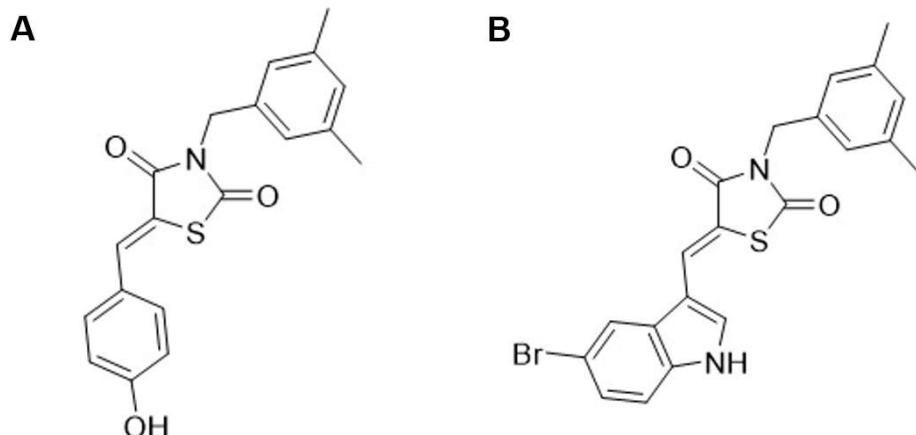


Fonte: O autor (2023).

5.3. Derivados tiazolidínicos

Os derivados tiazolidínicos LPSF/JB-3 (3-(3,5-dimetilbenzil)-5-(4-hidroxibenzoilideno)tiazolidina-2,4-diona) e LPSF/JB-20 (5-((5-bromo-1H-indol-3-il)metileno)-3-(3,5-dimetilbenzil)tiazolidina-2,4-diona) foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos da UFPE (LPSF/UFPE) para os ensaios (Figura 8).

Figura 8 — Derivados tiazolidínicos LPSF/JB-3 (A) e LPSF/JB-20 (B)



Fonte: Branco Júnior (2017).

5.4. Análise *in silico* dos derivados tiazodilínicos

Baseando-se na predição por métodos estatísticos os derivados tiazolidínicos foram avaliados quanto às suas características e propriedades físico-químicas relativas à farmacocinética e *druglikeness* utilizando a plataforma SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>). Na avaliação como potenciais fármacos de via oral os derivados foram submetidos a regra de Lipinski na qual as moléculas devem apresentar peso molecular (g/mol) ≤ 500 g/mol, valor de LogP ≤ 5 ao possuir até 5 grupos doadores de ligação de hidrogênio e até 10 acetores de ligações de hidrogênio (LIPINSKI et al., 2001). Também foi avaliado área total de superfície polar (A°), os valores precisam estar entre 20 e 130, já para solubilidade foi avaliado pelo LogS que não deve ser maior que 6 (DAINA; MICHELIN; ZOETE, 2017). A predição de descobrir potenciais alvos terapêuticos dos compostos LPSF/JB-3 e LPSF/JB-20 foi realizado através da ferramenta Swiss *Target Prediction*, que avalia a probabilidade de interação com alvo a partir de escore de 0 a 1 (GFELLER et al., 2014).

5.5. Critérios de inclusão e exclusão para coleta de amostras de sangue total

Foram incluídos cinco indivíduos saudáveis (n= 5) para coleta de sangue total com no mínimo 18 anos de idade que aceitaram participar voluntariamente do estudo. Por outro lado, foram critérios de exclusão indivíduos que recursaram assinar termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Apêndice G), uso contínuo de medicamentos imunossupressores ou anti-inflamatórios, portadores de doença

autoimune ou imunodeficiência, gestantes e pacientes com câncer. O sangue foi coletado em 3 tubos de heparina por voluntário, cada tubo com volume de 9-10mL.

5.6. Coleta de fragmento de pele

Com objetivo em obter fibroblastos, foi disponibilizado fragmento remanescente de tecido através da autorização de um voluntário saudável (n=1) submetido a cirurgia no bloco de cirurgia plástica do HC/UFPE por meio de explanação do projeto de pesquisa e assinatura de TCLE (Apêndice F) para realização do estudo.

Para inclusão da amostra no estudo foi necessário que o fragmento de pele fosse de origem de procedimentos de mamoplastia ou abdominoplastia, voluntário ter mais de 18 anos e plena assinatura do TCLE. Para exclusão de amostra no estudo o fragmento de pele ser de origem de procedimento estético que não seja mamoplastia ou abdominoplastia, possuir necrose, cicatrização ou qualquer forma de dano e recusa da assinatura do TCLE pelo paciente do serviço de cirurgia plástica do HC/UFPE.

5.7. Isolamento de fibroblastos primários

O fragmento do tecido foi transportado ao laboratório dentro de um tubo Falcon imerso em solução de lavagem (Tampão fosfato-salino (PBS) com 200 U/mL Penicilina/Estreptomicina e 1% de anfotericina B) em caixa de isopor com bateria de gelo congelada. Em cabine de fluxo laminar o fragmento de tecido foi submetido a solução de lavagem, remoção de tecido adiposo e pelos para que apenas a pele esteja disponível, o fragmento foi cortado em pedaços menores e novamente lavado com álcool etílico 70%. É adicionado nos fragmentos de pele, solução de desagregação enzimática com 50 mg/mL Collagenase/Dispase® (MERCK), essa etapa foi repetida três vezes onde cada etapa é intercalada com incubação a 37°C por 20 minutos, centrifugação em 1.500 RPM por 7 minutos e descarte de sobrenadante. Ao final foi adicionado PBS 1x suplementado com cálcio a 10µM, todo o volume com os fragmentos de tecido foi transferido a frasco de cultura celular com DMEM *High glucose* (Gibco®), 10% de soro fetal bovino (Lonza®), 200 U/mL de Penicilina/Estreptomicina (Gibco®) e 1% de anfotericina B (Gibco®) em incubadora de CO₂ 5% a 37°C.

Então o frasco foi monitorado por 7 dias para conferir adesão dos fibroblastos e possível contaminações de microrganismos. Após esse período os fragmentos são removidos, o sobrenadante do frasco de cultura é centrifugado a 1.500 RPM por 7

minutos, pellet ressuspendido com DMEM *High glucose* e 10% de soro fetal bovino e devolvido ao frasco, em 72 horas foi observado os primeiros fibroblastos aderidos.

5.8. Linhagem imortalizada

A linhagem utilizada foi 3T3-L1 (ATCC®) com fenótipo de fibroblastos. A 3T3-L1 tem o organismo de origem *mus musculus* de tecido embrionário, célula com propriedade de crescimento aderente. As células foram cultivadas em DMEM *Low Glucose* (Gibco®) com 10% de soro fetal bovino (Gibco®).

5.9. Avaliação de atividade citotóxica na linhagem 3T3-L1 em tratamento com derivados tiazolidínicos

Para avaliar a atividade citotóxica dos derivados tiazolidínicos foram realizados testes de redução do MTT ou brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio em fibroblastos 3T3-L1 que foram plaqueadas em placas de 96 poços (5×10^4 células/poço) com o meio DMEM (Gibco®) suplementado com suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (Lonza®), 200 U/mL de Penicilina/Estreptomicina (Gibco®) e 1% de antifúngico (Gibco®) em incubadora de CO₂ 5% a 37°C. O ensaio possui três condições: Células não tratadas, DMSO 0,1%, e os derivados LPSF/JBs (10µM, 25µM e 50µM).

Após tratamento com os derivados tiazolidínicos as células foram incubadas durante 48 horas em estufa a 37° C e 5% de CO₂. Posteriormente foi adicionado 20 µL da solução de MTT-sal tetrazolium (0,5 mg/ml) e as placas voltaram a estufa por 3 horas. Em seguida, foi adicionado 130 µL de SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) 20% para dissolução do precipitado. Após 24 horas, a absorbância foi lida em um espectrofotômetro accuSkan FC (Fisher Scientific) com comprimento de onda de 570nm após a dissolução completa do precipitado. Os compostos foram diluídos em DMSO, concentração foi considerada tóxica àqueles com viabilidade celular abaixo de 75% através de viabilidade calculada a partir dos poços tratados apenas com DMSO 0,1% (BRANCO JÚNIOR, 2017).

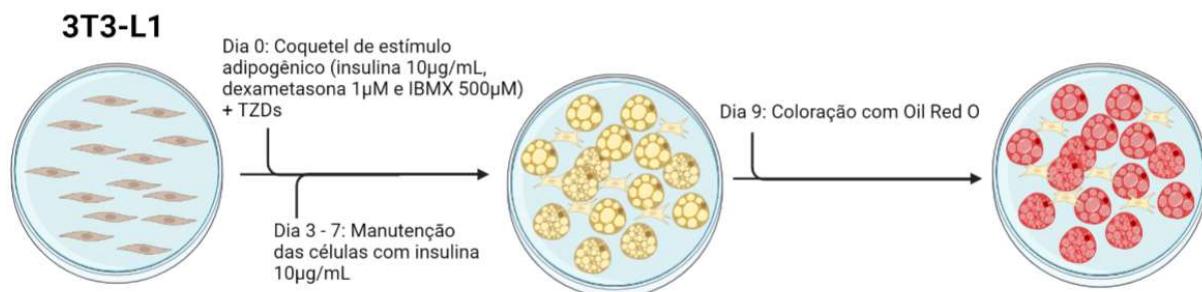
Já citotoxicidade em PBMC de voluntários saudáveis foi realizada em trabalho de Branco Júnior, em que concentração de LPSF/JB-3 e LPSF/JB-20 atingiram 98% e 78% de viabilidade, respectivamente. (BRANCO JÚNIOR, 2017)

5.10. Efeitos dos derivados tiazolidínicos na diferenciação adipogênica em 3T3-L1

A linhagem de pré-adipócitos 3T3-L1 foi plaqueada em placa de 12 poços (1×10^4 células/poço) e então cultivadas nas seguintes condições: meio de cultura DMEN Low glucose (Gibco®), 10% de soro fetal bovino (Lonza®), 200 U/mL de Penicilina/Estreptomicina (Gibco®) e 1% de anfotericina B (Gibco®) em incubadora de CO₂ 5% a 37°C. As condições para o ensaio foram: Células não tratadas, Coquetel de estímulo (CE), CE + Rosiglitazona, CE + LPSF/JBs.

Após 48 horas do plaqueamento, no dia 0 as células foram estimuladas com coquetel de estímulo de diferenciação adipogênica, composto de insulina 10µg/mL (Sigma-Aldrich), dexametasona 1µM (Sigma-Aldrich) e 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) 500µM (Sigma-Aldrich), por 72 horas (ZHAO et al., 2019). Os grupos com CE tiveram adição dos derivados LPSF/JB-3 (10µM, 25µM e 50µM), LPSF/JB20 (10µM e 25µM) e como controle positivo a rosiglitazona 10µM (Sigma-Aldrich). No dia 3, o meio com estímulos e compostos foram retirados para adição de meio de cultura suplementado com insulina 10ug/mL, no dia 5 ao dia 7 foi realizada nova manutenção com troca de meio suplementado com insulina 10ug/mL. No dia 9, foi realizada a coloração das células com *Oil Red O* (Sigma-Aldrich) com o objetivo de corar os lipídios e então quantificar o conteúdo lipídico presentes em cada condição (figura 9).

Figura 9 — Diferenciação adipogênica com linhagem 3T3-L1. IBMX= 3-isobutil-1-metilxantina; TZDs= Tiazolinedionas.



Fonte: O autor (2023).

As células foram lavadas duas vezes com PBS, fixadas com formaldeído 4% (NEON) por 15 minutos em temperatura ambiente e seguida cada poço com células é lavado duas vezes com água destilada. Em seguida foi adicionado solução de trabalho *Oil Red O* por 30 minutos (diluição 3:2 com *Oil Red O* e água destilada), da solução

estoque de 0.2g do corante em 40mL de álcool isopropílico 99% (Química Moderna). Nova lavagem é feita com água destilada por três vezes e então os adipócitos maduros foram observados em microscópio Nikon Eclipse na objetiva de 20x. Após observação no microscópio, em cada condição de tratamento foi adicionado 0.5mL de álcool isopropílico 99% e a placa foi submetida para um agitador mecânico por 20 minutos para completa diluição do corante.

Com a finalidade de se obter a quantificação do acúmulo de corante nas diferentes condições, foram coletados 100µL por condição em triplicata em uma placa de 96 poços e levado para o espectrofotômetro accuSkan FC (Fisher Scientific) na absorbância de 570nm. O conteúdo lipídico relativo (%) foi calculada a partir da percentagem dos poços de células não tratadas, que depois foi gerado uma média de leituras de três experimentos independentes.

5.11. Avaliação da atividade agonista ao PPAR γ dos derivados tiazolidínicos por qPCR em 3T3-L1

A linhagem 3T3-L1 foi plaqueada em placa de 6 poços (1×10^5 células/poço) e então cultivadas nas seguintes condições: meio de cultura RPMI 1640 (Gibco®), 10% de soro fetal bovino (Lonza®), 200 U/mL de Penicilina/Estreptomicina (Gibco®) e 1% de anfotericina B (Gibco®) em incubadora de CO₂ 5% a 37°C. Após plaqueamento, foi designado as condições de tratamento: Células não tratadas; Coquetel de estímulo (CE), CE + LPSF/JB-3 (10µM e 25µM); CE + LPSF/JB-20 (10µM e 25µM) por 72h. Após submetidas em diferentes condições, as células tiveram seu RNA extraído através de TRI reagente (Sigma), para posterior síntese de cDNA e reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) com objetivo de avaliar a expressão relativa do mRNA de PPAR γ (Mm00440940_m1) (TaqMan® ThermoFischer).

Após preparação e transferência das amostras para a microplaca, esta foi levada ao equipamento QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific Inc.), onde foi corrida a reação. O primeiro processo a ser realizado é a desnaturação da fita dupla do cDNA por aquecimento a uma temperatura de 95°C, tornando todo material em fita simples. Por conseguinte, um par de primers (iniciadores) complementam as fitas opostas do segmento específico do DNA. Este anelamento ocorre a 60°C. A terceira etapa, que ocorre a 72°C, consiste na extensão do molde, complementada pela enzima Taq DNA polimerase, que acrescenta as dNTPs correspondentes (presentes no Master Mix), formando, assim, um DNA de fita

dupla. Como controle endógeno foi utilizado 45s RNA pré-ribossômico (Rn45s, Mm03928990_g1) (TaqMan® ThermoFischer).

5.12. Atividade imunomoduladora dos derivados tiazolidínicos em PBMC

As células mononucleadas de sangue periférico (PBMC, sigla em inglês) foram isoladas do sangue coletado com anticoagulante heparina de voluntários sadios (n=5), através da centrifugação com Ficoll Paque™ Plus (GE HealthcareBio-Sciences). As células isoladas foram então cultivadas em placas de 24 poços em meio RPMI 1640 (Gibco®), suplementado com L-Glutamina, 10% de Soro Bovino Fetal (Lonza®), 200 U/mL de Penicilina/Estreptomicina (Gibco®) e 1% de antifúngico (Gibco®) em incubadora de CO₂ 5% a 37°C. As PBMC foram plaqueadas em placas de 24 poços (1x10⁶ células/poço) em condições experimentais com e sem adição dos derivados tiazolidínicos LPSF/JB3 e LPSF/JB20 a 37°C com CO₂ em 5% por 48h. As PBMC foram estimuladas com fitohemaglutinina 5µM (Gibco®) e tratadas ou não com os derivados tiazolidínicos na concentração de 50µM, concentração definida baseado em ensaio de citotoxicidade por estudo de Branco Júnior (BRANCO JÚNIOR, 2017). A metilprednisolona (Mp) foi usada como controle positivo na concentração padrão de 100µM. Após 48 horas, as placas foram centrifugadas a 1.500 rpm por 7 minutos para coleta e armazenamento do sobrenadante a -80°C para posterior dosagem das citocinas inflamatórias relacionadas com a patogênese da ES (HENDERSON; RIEDER; WYNN, 2020).

5.13. Dosagem de citocinas inflamatórias por ELISA em sobrenadante de cultura de PBMC

A avaliação da atividade imunomoduladora dos compostos LPSF/JB-3 e LPSF/JB-20 foi realizada através da dosagem das citocinas IFNy [limite de detecção: 250pg/mL - 1,95pg/mL] (Cat. Nº 555142 - BD®), IL-1β [limite de detecção: 250pg/mL - 1,95pg/mL] (Cat. Nº 557953 - BD®), IL-6 [limite de detecção: 600pg/mL - 4,68pg/mL] (Cat. Nº 555220 - BD®) presentes no sobrenadante dos cultivos de PBMC, por meio da técnica de ELISA sanduíche (*Enzyme-linked immunosorbent assay*), seguindo as recomendações dos fabricantes. O ensaio foi iniciado com a adição dos anticorpos de captura nos poços da placa de ELISA com incubação noturna (overnight) para maior sensibilização dos anticorpos. No dia seguinte, o excesso de anticorpos foi retirado

com o tampão de lavagem (PBS 1x com Tween-20 a 0.05%) para proceder com a saturação da placa com o diluente de ensaio (BSA 1% com PBS 1x) com 2 horas de incubação à temperatura ambiente. Sequencialmente, a placa foi novamente submetida a lavagem com o tampão de lavagem. Assim, as amostras, bem como, o padrão e o branco foram adicionados e incubados por 2 horas à temperatura ambiente. Por conseguinte, a placa foi novamente lavada com o tampão de lavagem e então foi adicionado o anticorpo de detecção. Depois de 2 horas de incubação à temperatura ambiente e a remoção do excesso de anticorpo pelo tampão de lavagem, foi adicionado em cada poço da placa a enzima conjugada streptavidin-HRP (Streptavidin-Horseradish Peroxidase) em solução com o diluente de ensaio com incubação sequencial de 20 minutos à temperatura ambiente em local escuro. Passados os 20 minutos, a placa foi lavada com o tampão de lavagem para a adição de 50µL do substrato (Tetramethylbenzide TMB 1x). Ao adicioná-lo, esperou-se 20 minutos para que a enzima pudesse converter o substrato adicionado e subsequentemente, a reação foi parada com 25µL da solução de parada (H₂SO₄ 2N). Foram utilizadas 5 amostras de sobrenadante de PBMC de voluntários saudáveis para os ensaios, amostras que extrapolaram o limite de detecção dos kits foram excluídas das análises.

5.14. Avaliação de atividade antioxidante dos derivados tiazolidínicos em fibroblastos primários

A detecção de ROS foi realizado através do dihidroetídio (DHE), que ao ser oxidado pelo radical superóxido produzido pelos grupos de tratamento, se intercala no DNA da célula, marcando seu núcleo com um vermelho fluorescente brilhante. Os fibroblastos primários foram plaqueados em placa de 12 poços (1×10^5 células/poço) e então cultivadas nas seguintes condições: meio de cultura DMEM *High glucose* (Gibco®), 10% de soro fetal bovino (Lonza®), 200 U/mL de Penicilina/Estreptomicina (Gibco®) e 1% de anfotericina B (Gibco®) em incubadora de CO₂ 5% a 37°C. Após aderência a placa, as células foram pré-tratadas por 48h com LPSF/JB-3 e LPSF/JB-20 nas concentrações de 10µM e 25µM. Após 48h, as células foram tratadas ou não pôr 1 hora com peróxido de hidrogênio a 100µM em novo meio de cultura, em seguida foi adicionado DHE por 30 minutos e os fibroblastos foram lavados em PBS 1x. As microfotografias foram realizadas imediatamente ao fim do ensaio em Nikon Eclipse na objetiva de 20x.

A quantificação da fluorescência vermelha pelo software ImageJ se inicia com a conversão da imagem em tons de cinza em 8-bit, as regiões de interesse (ROIs, original em inglês) são denominadas de acordo com a morfologia celular e descartando células que não estejam completas na imagem, para facilitar a visualização dos valores em cinza é selecionado o filtro 3-3-2 RGB e foram selecionados três campos com seis células por campo (“Determining Fluorescence Intensity and Signal – Keith R. Porter Imaging Facility - UMBC”, [s.d.]). Os parâmetros selecionados para mensuração foram *area*, *integrated density* e *mean gray value*, para que então seja usando a fórmula para calcular a fluorescência celular total corrigida (CTCF, sigla em inglês), com a seguinte fórmula:

$$\text{Corrected total cell fluorescence (CTCF)} = \text{Integrated Density} - (\text{Area of Selected Cell} \times \text{Mean Fluorescence of Background readings})$$

5.15. Avaliação da atividade antifibrótica dos derivados tiazolidínicos em fibroblastos primários

Os fibroblastos primários foram plaqueadas em placas de 24 poços na densidade de 1×10^4 células/poço. Após aderência e avaliação de confluência em 70% as células foram incubadas em condições experimentais com o TGF-β por 24h. No dia seguinte, foi removido meio de cultura com TGF-β para adição dos derivados tiazolidínicos LPSF/JB-3 25µM e LPSF/JB-20 25µM a 37°C em 5% de CO₂ por 24h (HINZ; LAGARES, 2021). Logo após a incubação, as células foram lavadas com tampão fosfato-salino (PBS) 1X, fixadas com acetona e metanol na proporção 1:1 por 10 minutos na temperatura de -20°C. Logo depois desses procedimentos, as células foram incubadas *overnight* com os anticorpos primários anti-pSmad2/3 (Invitrogen; Cat. PA5-3602) e anti-COL1A2 (Santa Cruz Biotechnology; Cat. Sc-8788). Em seguida a incubação, as células foram lavadas com solução tampão fosfato-salino/albumina de soro bovino (PBS/BSA) 0,5% e incubadas com os anticorpos secundário green-FITC (Sigma-Aldrich) e Cy3 red (Jackson ImmunoResearch), que estabelecem ligação com os anticorpos primários anti-pSmad2/3 e anti-COL1A2, respectivamente. Posteriormente os fibroblastos foram submetidos a lavagem e incubados com o marcador nuclear DAPI (4'6-diamidino-2-fenilindol). Em seguida as células foram submetidas à lavagem para subsequente análise das lamínulas no microscópio óptico de fluorescência. As imagens foram analisadas utilizando o

software TS II Eclispe (Nikon™). Todas as imagens de imunofluorescência foram observadas nas objetivas de 20x.

A quantificação da fluorescência verde (COL1A2) e vermelho (pSmad2/3) pelo software ImageJ se inicia com a conversão da imagem em tons de cinza em 8-bit, as ROI são denominadas de acordo com a morfologia celular e descartando células que não estejam completas na imagem, para facilitar a visualização dos valores em cinza é selecionado o filtro 3-3-2 RGB e foram selecionadas seis células por campo para quantificação (“Determining Fluorescence Intensity and Signal – Keith R. Porter Imaging Facility - UMBC”, [s.d.]). Os parâmetros selecionados para mensuração foram *area*, *integrated density* e *mean gray value*, para que então seja usando a fórmula para calcular a fluorescência celular total corrigida (CTCF, sigla em inglês), com a seguinte fórmula:

$$\text{Corrected total cell fluorescence (CTCF)} = \text{Integrated Density} - (\text{Area of Selected Cell} \times \text{Mean Fluorescence of Background readings})$$

5.16. Análise dos resultados

A expressão dos resultados das variáveis contínuas foi feita pelas médias/desvios-padrão ou mediana/variação interquartil. Comparação entre grupos foi realizada pelo teste t de student de amostras não pareadas em dados que não seguem distribuição normal. Para validação de controles e demais grupos foi utilizado ANOVA com pós-Tukey.

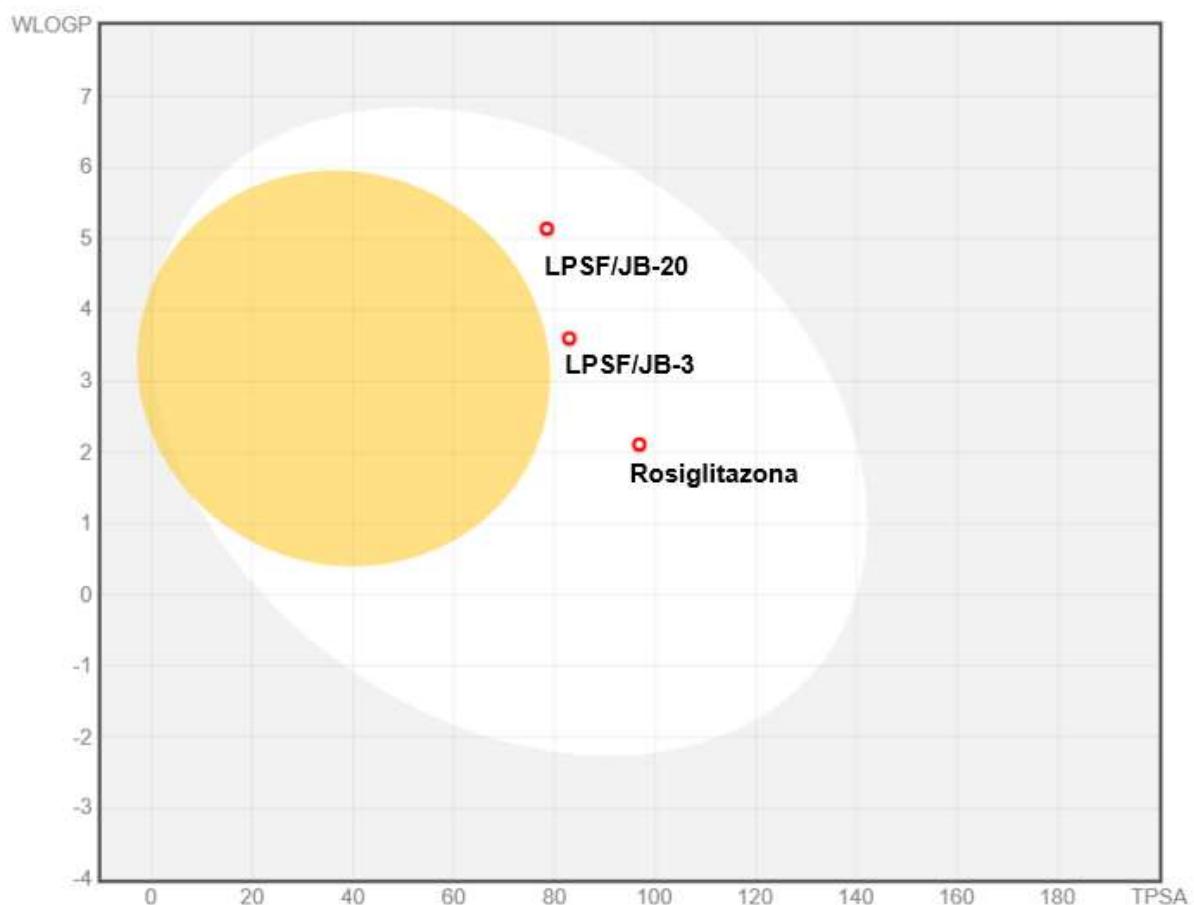
Análise da expressão gênica foi realizada pelos diferentes grupos através do método de 2- $\Delta\Delta Ct$ com adição dos valores de *cycle threshold* (Ct). A expressão gênica relativa geralmente é definida como 1 para amostras de referência porque $\Delta\Delta Ct$ é igual a 0 e, portanto, 20 é igual a 1. O método 2- $\Delta\Delta Ct$ assume uma eficiência de amplificação de PCR uniforme de 100% em todas as amostras (AROCHO et al., 2006). Valores de $p < 0,05$ serão considerados significantes. Todos os testes estatísticos foram realizados no programa GraphPadPrism, versão 8.0.

6 RESULTADOS

6.1. Dados *in silico* de LPSF/JB-3 e LPSF/JB-20

Através do gráfico de *boiled-egg*, baseado na A°/WLogP, foi possível ilustrar a análise farmacocinética pela plataforma SwissADME, mostrou que LPSF/JB-3 e LPSF/JB-20 possuem absorção pelo trato gastrointestinal e não sofrem efluxo pela glicoproteína P (gp-P), semelhante a outra TZD, a rosiglitazona (Figura 10).

Figura 10 — Gráfico *boiled-egg* para farmacocinética de LPSF/JB-3, LPSF/JB-20 e Rosiglitazona. Circunferência em amarelo representa faixa de absorção pela barreira hematoencefálica e elipse branca representa faixa de absorção pelo trato gastrointestinal. Ponto em vermelho representa que os derivados não são substratos da glicoproteína-P.



Fonte: O autor (2023).

Já o *druglikeness* revelou que o LPSF/JB-3 e LPSF/JB-20, assim como a rosiglitazona, respeitam a regra de Lipinski ao exibirem massa molecular (g/mol)≤ 500, doadores de ligação de hidrogênio≤ 5, acetores de ligação de hidrogênio≤ 5 e MLOGP estimado de 2,36 e 3,25, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1 – Comparação entre os derivados tiazolidínicos com rosiglitazona após análise *in silico* pelo SwissADME.

Propriedades físico-químicas dos derivados tiazolidínicos								
Código	Peso molecular (g/mol)	Doadores de ligação H	Aceptores de ligação H	Num. de ligações rotáveis	Área total de superfície polar (A°)	Log P (MLOGP)	Log S (ESOL)	Respeita as regras de Lipinski?
LPSF/JB-3	339,41	1	3	3	82,91	2,36	-4,79	Sim
LPSF/JB-20	441,34	1	2	3	78,47	3,25	-6,29	Sim
Rosiglitazona	357,43	1	4	7	96,83	1,64	-4,81	Sim

Fonte: O autor (2023).

Além disso, com o objetivo de predizer os potenciais alvos moleculares dos compostos foi utilizado o *Swiss Target Prediction*. A ferramenta apresentou o escore de predição ao PPARy para o LPSF/JB-3 e LPSF/JB-20 de 0,11. O escore para rosiglitazona teve valor de 1 (tabela 2).

Tabela 2 – Predição ao PPARy de LPSF/JB-3 e LPSF/JB-20 em comparação com rosiglitazona pelo Swiss Target Prediction.

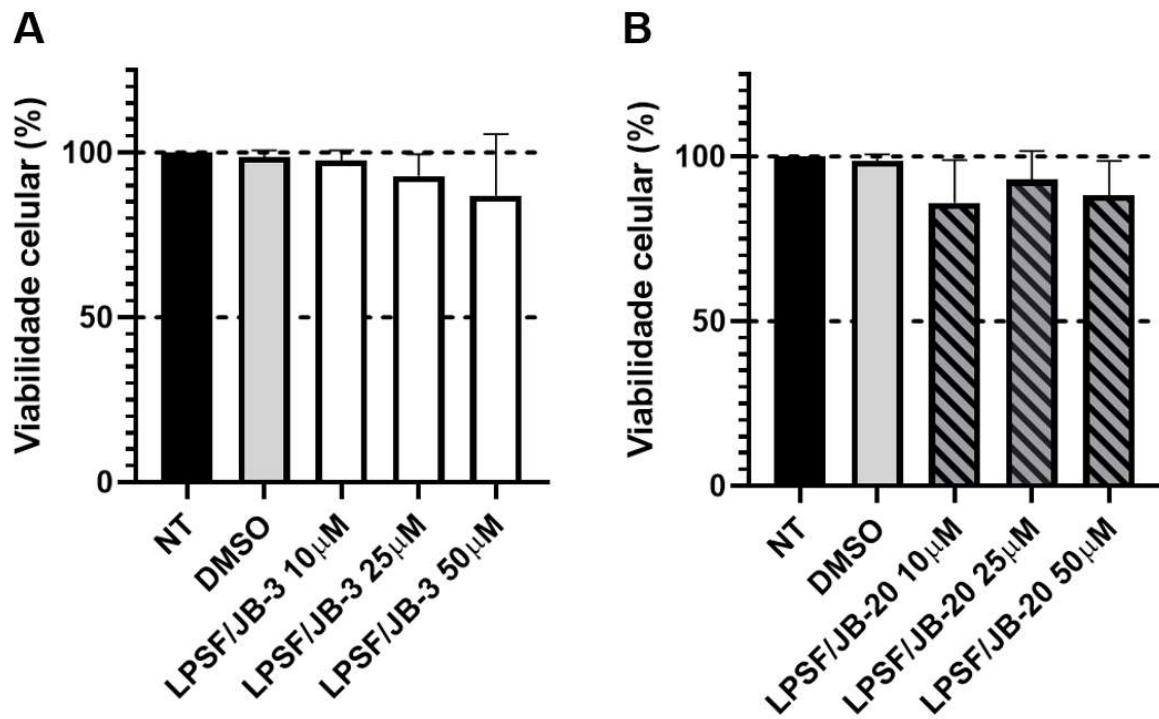
Código do composto	Potencial alvo	Classe do alvo	Probabilidade de ligação a classe do alvo	Escore de previsão (0 - 1)
LPSF/JB-3	Receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama (PPARy)	Receptor nuclear	6,7%	0,11
LPSF/JB-20	Receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama (PPARy)	Receptor nuclear	6,7%	0,11
Rosiglitazona	Receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama (PPARy)	Receptor nuclear	26,7%	1

Fonte: O autor (2023).

6.2. Avaliação de atividade citotóxica na linhagem 3T3-L1 em tratamento com os derivados tiazolidínicos

Na avaliação de atividade citotóxica em comparação ao grupo tratado com DMSO 0,1% [97,33% \pm 1,94], o LPSF/JB-3 entre as concentrações de 10 μ M [97,67% \pm 2,99], 25 μ M [92,87% \pm 6,646] e 50 μ M [86,99% \pm 18,55] apresentou viabilidade similar ao grupo DMSO 0,1% (Figura 11A). Assim como o LPSF/JB-20, que em 10 μ M [86,03% \pm 12,83], 25 μ M [93,09% \pm 8,63], 50 μ M [88,25% \pm 10,42] também apresentaram viabilidade similar ao grupo DMSO 0,1% (figura 11B).

Figura 11 — Viabilidade celular da linhagem 3T3-L1 em ensaio de MTT. (A) Viabilidade de 3T3-L1 em tratamento com LPSF/JB-3; (B) Viabilidade de 3T3-L1 em tratamento com LPSF/JB-20. NT= Não tratado, DMSO= Controle de veículo em DMSO 0,1%.



Fonte: O autor (2023).

6.3. Efeito dos derivados tiazolidínicos no acúmulo de lipídios em linhagem 3T3-L1

Primeiramente foi necessário avaliar se o coquetel de estímulo (CE) de diferenciação exclusivamente era responsável pelo acúmulo de lipídeos em comparação ao grupo NT. Foi observado que o grupo que apenas recebeu o CE teve conteúdo lipídico significativamente maior em comparação quando comparado ao grupo NT (**p= 0,0001).

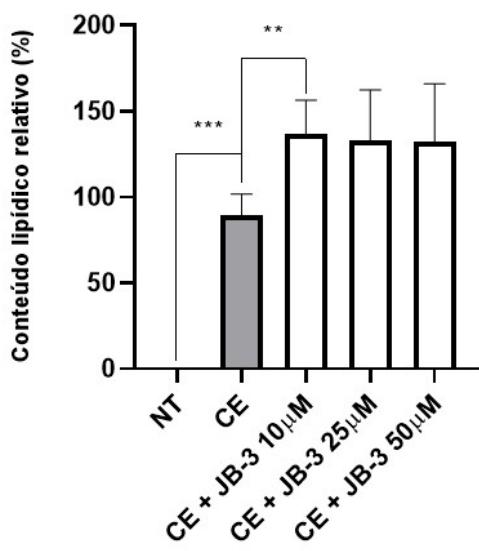
Em seguida avaliou-se se a diferenciação de adipócitos, estava sendo influenciada pela presença dos derivados tiazolidínicos, quando comparado ao grupo que recebeu somente CE. Através da quantificação do corante *Oil Red O*, LPSF/JB-3 10 μ M [112,5% \pm 10,04 **p=0,0076] apresentou conteúdo lipídico relativo significativamente maior em comparação ao grupo somente CE [89,08% \pm 12,65]. No entanto, não houve diferença significativa no conteúdo lipídico relativo do LPSF/JB-3 25 μ M [132,8% \pm 29,72; p= 0,0529] e LPSF/JB-3 50 μ M [132,4% \pm 33,62; p= 0,0832] comparado ao grupo CE (figura 12A). Ao comparar LPSF/JB-3 10 μ M (p= 0,1664), 25 μ M (p= 0,4985) e 50 μ M (p= 0,5864) com rosiglitazona 10 μ M [112,5% \pm 10,04] não foi observado diferença significativa (figura 12C).

Quanto ao LPSF/JB-20 10 μ M [146,1% \pm 20,97; **p=0,0033] e 25 μ M [149,3% \pm 10,47; ***p= 0,0003] comparado ao grupo que somente recebeu CE, foi demonstrado que ambas as concentrações possuem maior conteúdo lipídico relativo, com diferença significativa (figura 12B). Quando comparados com rosiglitazona [112,5% \pm 10,04], o LPSF/JB-20 10 μ M (p= 0,0574) apresentaram conteúdo lipídico relativo semelhante, sem diferença estatística, mas na concentração de 25 μ M (**p= 0,0069) foi demonstrado que esse grupo acumulou mais lipídeos que o grupo tratado com rosiglitazona (figura 12C). As microfotografias revelaram que o LPSF/JB-3 e LPSF/JB-20 diferenciaram a linhagem 3T3-L1 em adipócitos pelo acúmulo de lipídios corados de vermelho (figura 13).

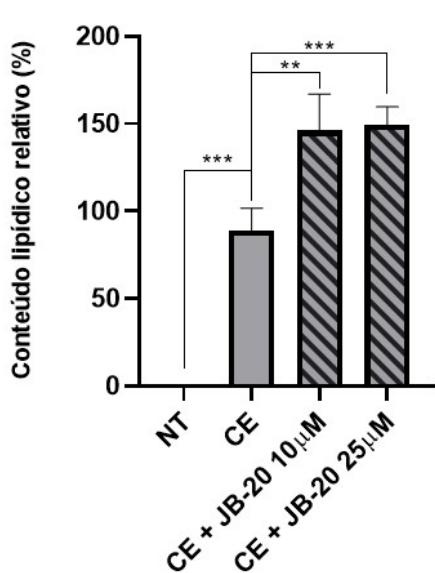
Figura 12 — Gráfico de comparação do conteúdo lipídico relativo (%) entre os grupos controles e diferentes concentrações dos derivados tiazolidínicos. (A e B) Grupo NT vs. Estímulo com diferença significativa ($***p= 0,0001$); (A) CE vs. LPSF/JB-3, com diferença significativa do derivado na concentração de $10\mu M$ ($**p= 0,0076$); (B) CE vs. LPSF/JB-20, nas concentrações de $10\mu M$ e $25\mu M$ com diferença significativa ($**p= 0,0033$ e $***p= 0,0003$, respectivamente); (C) RSG vs. LPSF/JBs, LPSF/JB-20 $25\mu M$ houve diferença significativa ($**p= 0,0069$). Dados distribuídos em média e desvio padrão. NT= Não tratado; CE= Coquetel de estímulo. Teste estatístico: ANOVA pós-turkey.

A

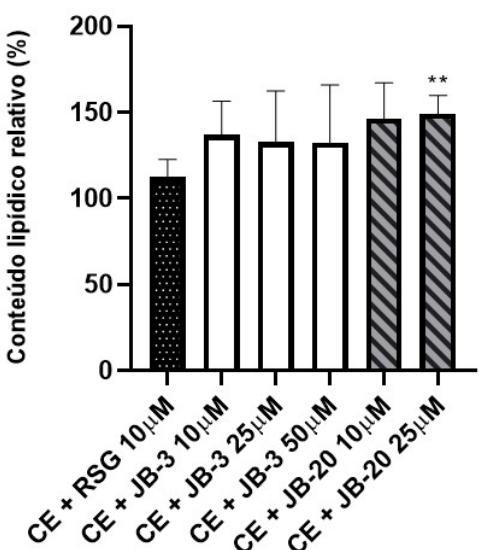
Coquetel de estímulo vs. LPSF/JB-3

**B**

Coquetel de estímulo vs. LPSF/JB-20

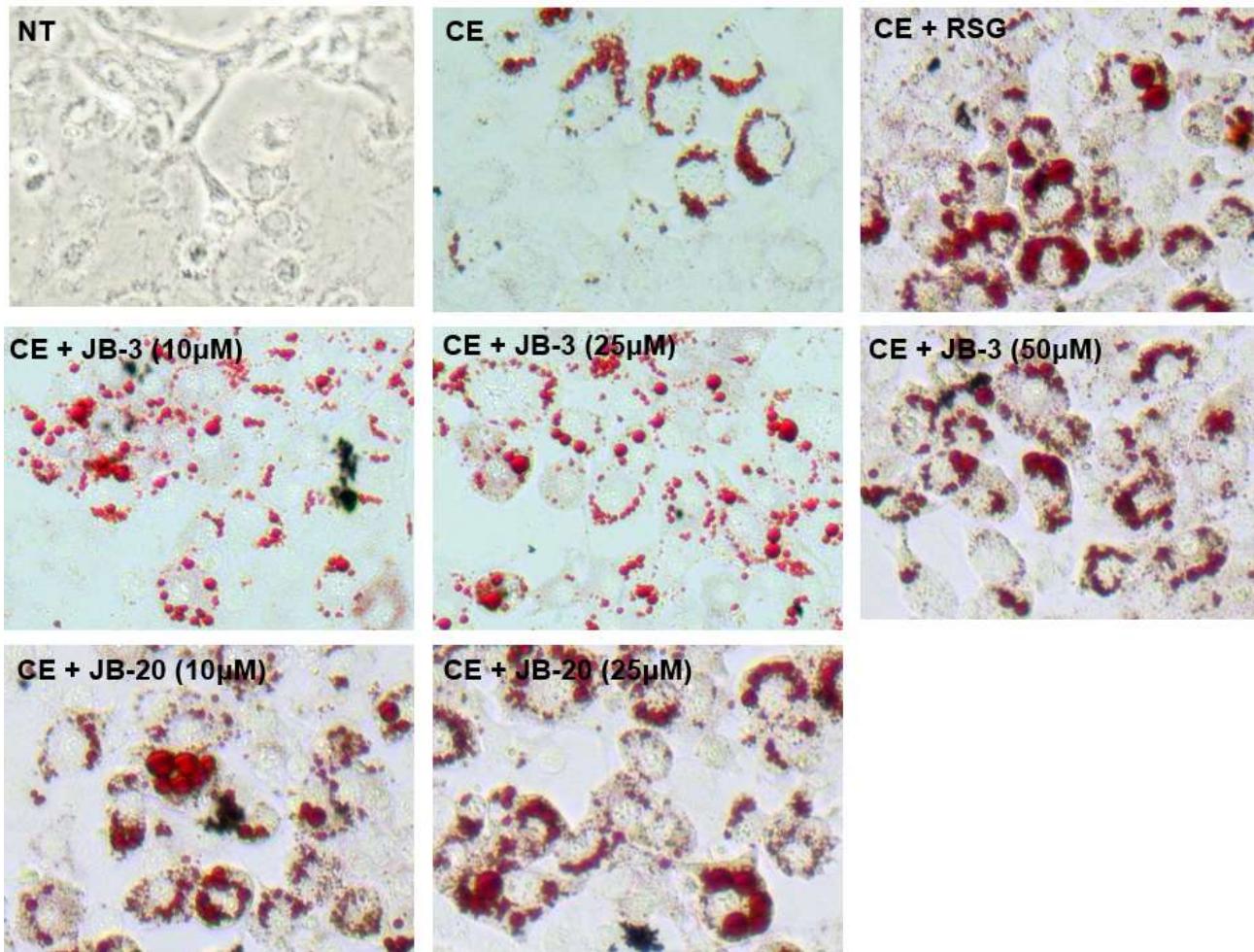
**C**

RSG vs. LPSF/JBs



Fonte: O autor (2023).

Figura 13 — Microfotografias da diferenciação adipogênica após adição de CE e derivados tiazolidínicos em diferentes concentrações. O grupo NT não recebeu estímulo algum. O grupo CE foi tratado apenas com coquetel de estímulo para diferenciação adipogênica (dexametasona 1 μ M, insulina 10mg/mL e IBMX 500 μ M). Os outros grupos foram condicionados com CE combinado a um tratamento. NT= Não tratado; CE= Coquetel de estímulo; RSG= Rosiglitazona.



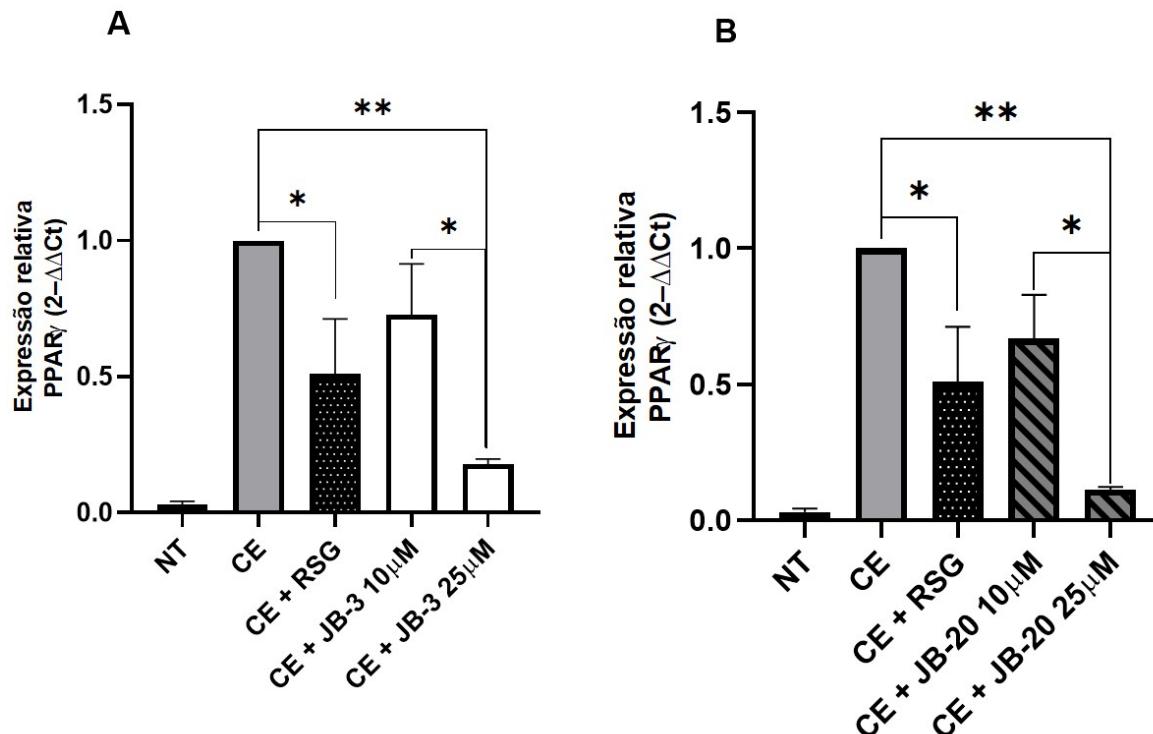
Fonte: O autor (2023).

6.4. Expressão de mRNA de PPAR γ após tratamento com derivados tiazolidínicos na linhagem 3T3-L1

Os resultados preliminares demostraram que o grupo tratado apenas com CE teve maior expressão de PPAR γ [$1,00 \pm 0$; * $p= 0,0412$] em comparação com as células tratadas com rosiglitazona [$0,51Ct \pm 0,20$] (figura 14). Os derivados LPSF/JB-3 10 μ M [$0,72Ct \pm 0,18$; $p= 0,3099$] e LPSF/JB-20 10 μ M [$0,66Ct \pm 0,16$; $p= 0,1558$] apresentaram expressão de PPAR γ similar ao grupo CE (figura 14).

Na concentração de 25 μ M, LPSF/JB-3 [$0,17Ct \pm 0,01$; ** $p= 0,0061$] e LPSF/JB-20 [$0,11Ct \pm 0,009$; ** $p= 0,0033$] apresentaram expressão de PPAR γ menor em comparação ao grupo CE [$1,0Ct \pm 0$] (figura 14A e 14B). Ao comparar a expressão do PPAR γ nas diferentes concentrações dos derivados tiazolidínicos, foi possível observar que LPSF/JB-3 10 μ M houve expressão significativamente maior de PPAR γ do que na concentração de 25 μ M (* $p= 0,0330$) (Figura 14A). De forma semelhante, o LPSF/JB-20 10 μ M expressou significativamente mais PPAR γ do que na concentração de 25 μ M (* $p= 0,0253$) (figura 14B).

Figura 14 — Expressão gênica de PPAR γ em tratamento de 3T3-L1 com LPSF/JB-3 e LPSF/JB-20. (A) CE vs. RSG (*p= 0,0412); CE vs. LPSF/JB-3 10 μ M (p= 0,3099); CE vs. LPSF/JB-3 25 μ M (**p= 0,0061); LPSF/JB-3 10 μ M vs. LPSF/JB-3 25 μ M (*p= 0,0330). (B) CE vs. LPSF/JB-20 10 μ M (p= 0,1558); CE vs. LPSF/JB-20 25 μ M (**p= 0,0033); LPSF/JB-20 10 μ M vs. LPSF/JB-20 25 μ M (*p= 0,0253). NT= Não tratado; CE= Coquetel de estímulo; RSG= Rosiglitazona. Teste estatístico: ANOVA pós-Tukey.



Fonte: O autor (2023).

6.5. Imunomodulação de citocinas em sobrenadante de PBMC de voluntários saudáveis tratadas com os derivados tiazolidínicos

Para detecção de citocinas após ensaio de atividade imunomoduladora dos derivados LPSF/JB-3 e LPSF/JB-20 foi realizado o ensaio de ELISA sanduíche para citocinas inflamatórias IFN γ , IL-1 β , IL-6 e IL-13. As PBMC foram tratadas com os dois compostos na mesma concentração de 50 μ M.

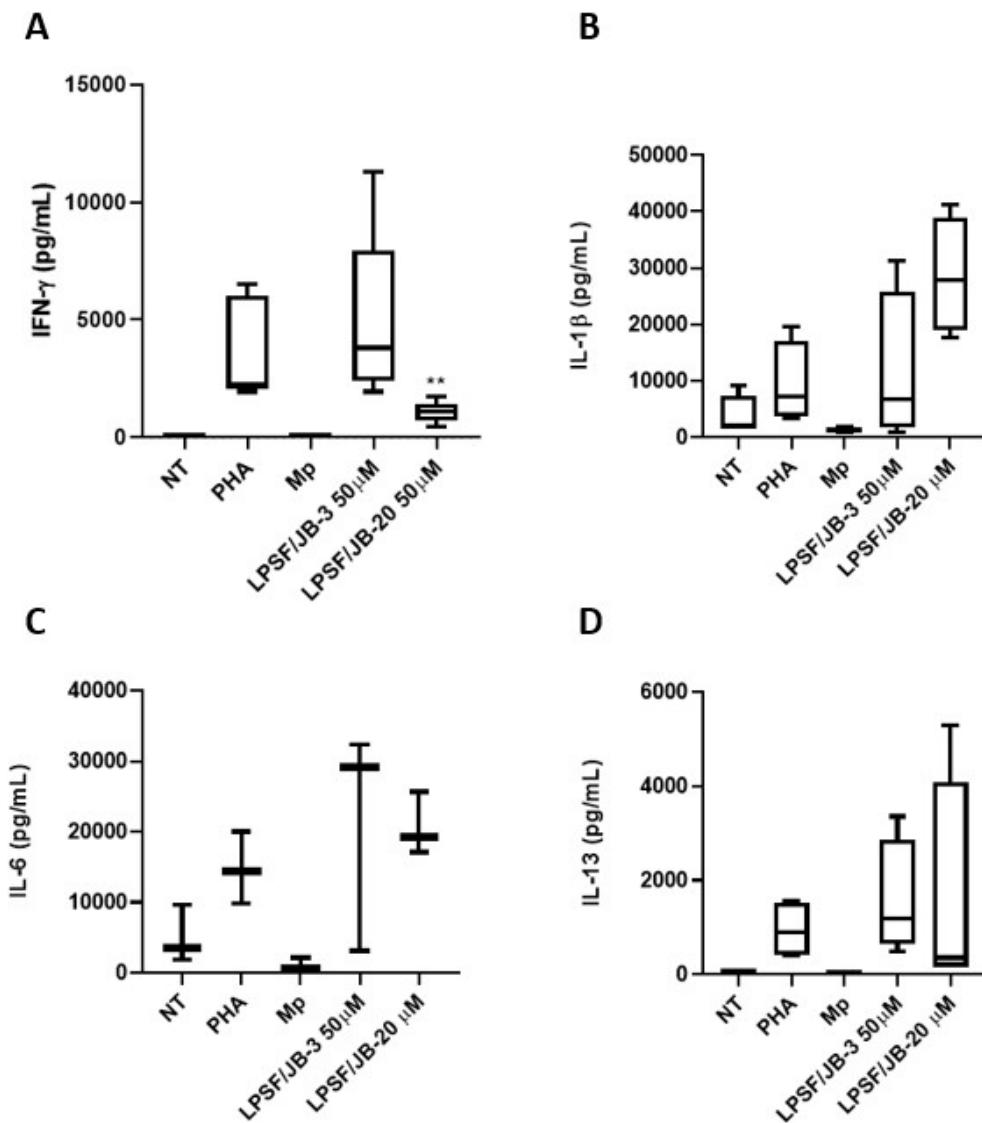
É possível observar na figura 15A, que o LPSF/JB-20 reduziu significativamente os níveis de IFN γ [1082 ± 460,4pg/mL; **p= 0,0079], mas o LPSF/JB-3 não promoveu redução significativa [4893 ± 3706pg/mL; p= 0,7460] em sobrenadante de cultura de PBMC, quando comparados ao controle PHA [3690 ± 2165pg/mL] (n=5).

Para IL-1 β , em comparação com PHA [9352 ± 7365pg/mL], o LPSF/JB-3 [11454 ± 13616pg/mL; p= 0,7951] e LPSF/JB-20 [28654 ± 10379pg/mL; p= 0,977] não reduziram os níveis da citocina (n=4) (figura 15B).

Para IL-6, em comparação com PHA [14739 ± 5138 pg/mL], o LPSF/JB-3 [21522 ± 16025 pg/mL; $p= 0,5236$] e LPSF/JB-20 [20696 ± 4421 pg/mL; $p= 0,7974$] não reduziram os níveis da citocina ($n=3$) (figura 15C).

Com IL-13, em comparação com PHA [$943,4 \pm 592,9$ pg/mL], o LPSF/JB-3 [1563 ± 1247 pg/mL; $p= 0,4044$] e LPSF/JB-20 [1541 ± 2500 pg/mL; $p= 0,6583$] não reduziram os níveis da citocina ($n=4$) (figura 15D).

Figura 15 — Avaliação de imunomodulação de IFN γ , IL-1 β , IL-6 e IL-13 com derivado tiazolidinico LPSF/JB-3 e LPSF/JB-20. O grupo PHA 5 μ M representa as PBMC estimuladas na produção de citocinas inflamatórias no sobrenadante; O grupo Mp representa sobrenadantes de PBMC estimuladas com PHA e tratadas com anti-inflamatório metilprednisolona 100 μ M. NT= Não tratado; PHA= Fitohemaglutinina; Mp= Metilprednisolona. IFN γ : ($n= 5$); IL-1 β ($n= 4$); IL-6 ($n= 3$); IL-13 ($n= 4$). Teste estatístico: Teste t não pareado.



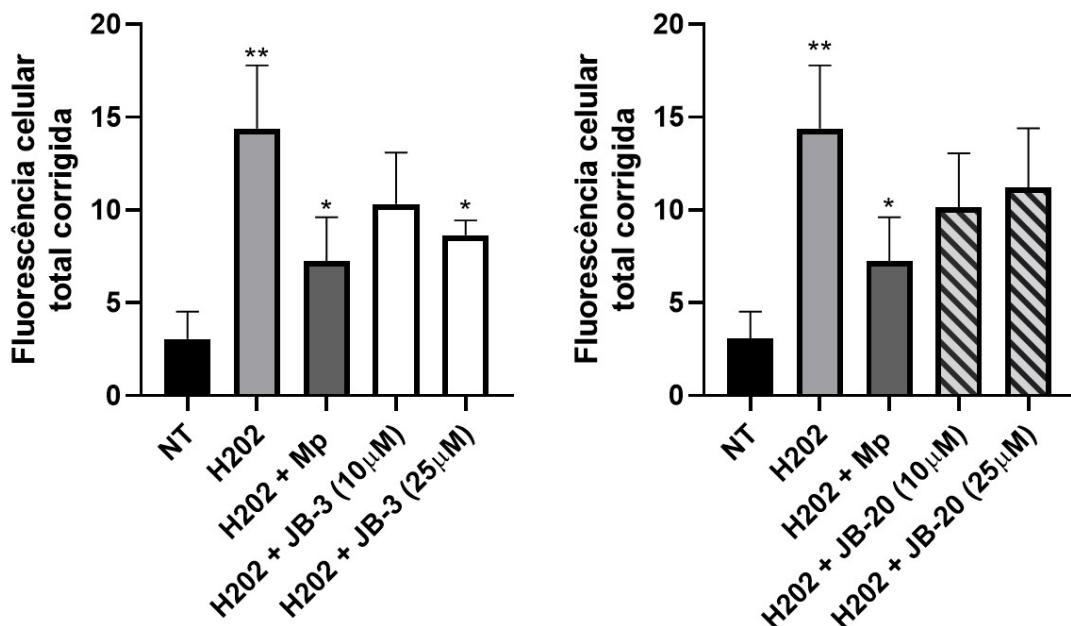
Fonte: O autor (2023).

6.6. Avaliação da atividade antioxidante dos derivados tiazolidínicos em fibroblastos primários

O grupo não tratado [3,05 ± 1,47] teve intensidade de fluorescência menor significativamente que o grupo H₂O₂ [14,39 ± 3,39; **p= 0,0061]. Ao comparar grupo de células que foram tratadas apenas com H₂O₂ [14,39 ± 3,39], o grupo H₂O₂ + LPSF/JB-3 10µM [10,32 ± 2,77; p= 0,1835] não teve diferença significativa entre os grupos. O H₂O₂ + LPSF/JB-3 25µM [8,636 ± 0,8053; *p= 0,0463] houve redução significativa de fluorescência celular (figura 16A). Em comparação ao grupo de células que foram tratadas apenas com H₂O₂, o grupo H₂O₂ + LPSF/JB-20 nas concentrações de 10µM [10,14 ± 2,92; p= 0,1761] e 25µM [11,23 ± 3,183; p= 0,3053] não tiveram redução significativa da fluorescência celular (figura 16B). As microfotografias revelam a detecção de ROS pelo DHE, marcando os fibroblastos com vermelho fluorescente brilhante (figura 17).

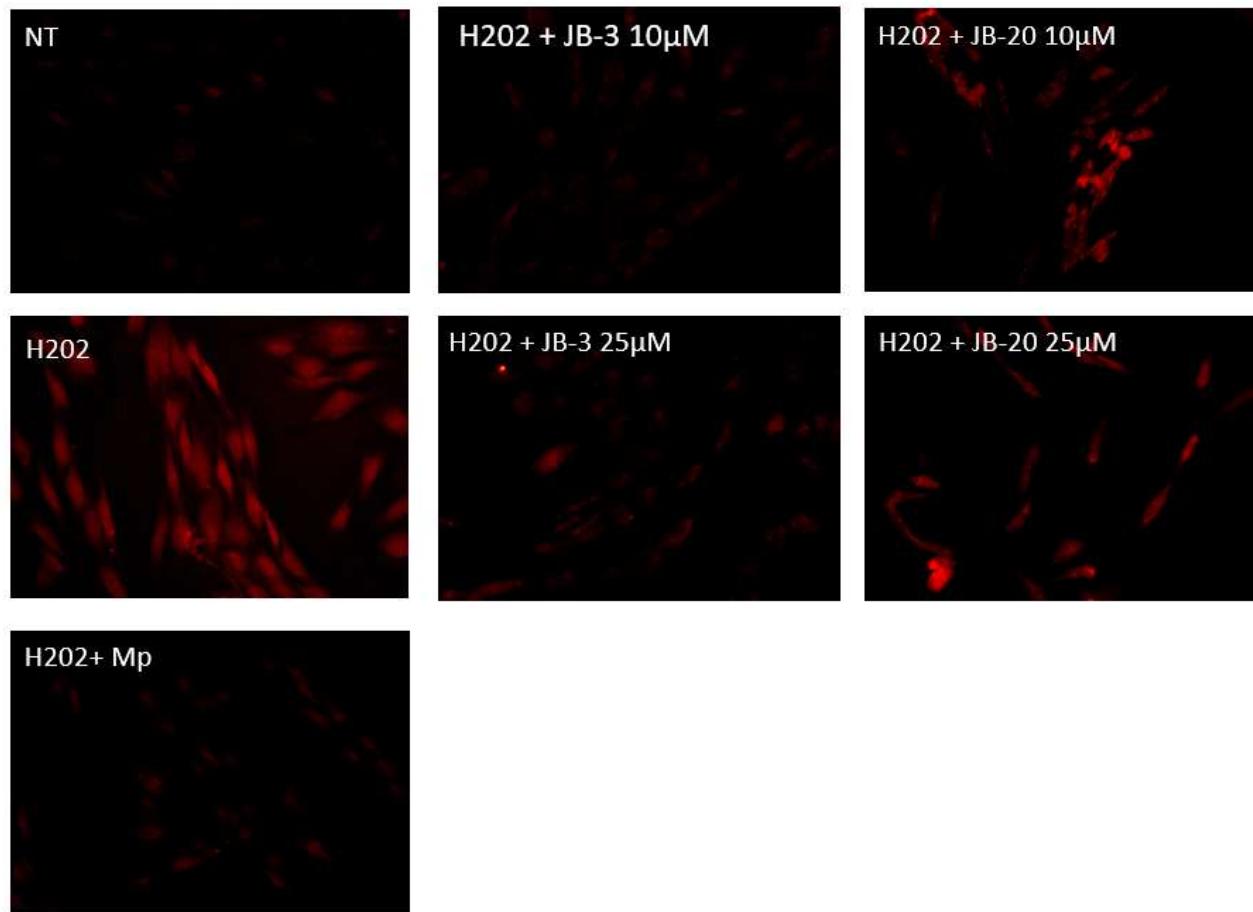
A H₂O₂+ metilprednisolona [7,25 ± 2,34; *p= 0,0404] foi utilizada como controle positivo, reduziu fluorescência celular em comparação com o grupo H₂O₂ (figura 16). Também foi observado que LPSF/JB-3 (25µM) apresentou atividade semelhante ao Mp (p= 0,3910).

Figura 16 — Fluorescência celular total corrigida de DHE em fibroblastos primários pré-tratados com derivados tiazolidínicos (48h) e posterior adição de H₂O₂ (1h). (A e B) H₂O₂ vs NT (**p= 0,006) e H₂O₂ vs H₂O₂+ Mp (*p= 0,0404). (A) H₂O₂ vs. LPSF/JB-3 25µM (*p= 0,0463). NT= Não tratado; H₂O₂= Peróxido de hidrogênio; Mp= Metilprednisolona. Teste estatístico: Teste t não pareado.



Fonte: O autor (2023).

Figura 17 — Microfotografias de fluorescência de DHE em fibroblastos primários pré-tratados com derivados tiazolidínicos (48h) e posterior adição de H_2O_2 (1h). O grupo NT são fibroblastos que não foram pré-tratados com nenhum medicamento ou derivado e não teve tratamento com H_2O_2 ; O grupo H_2O_2 não foi pré-tratado com algum medicamento ou composto e foi adicionado H_2O_2 100 μ M; O grupo Mp foi pré-tratado com o anti-inflamatório por 48h e posterior tratamento com H_2O_2 100 μ M; O grupo experimental com LPSF/JBs + H_2O_2 nas concentrações de 10 μ M e 25 μ M foi adicionado os derivados como pré-tratamento por 48h com posterior adição de H_2O_2 100 μ M. Microfotografias registradas com objetiva no aumento de 20x. NT= Não tratado; H_2O_2 = Peróxido de hidrogênio.



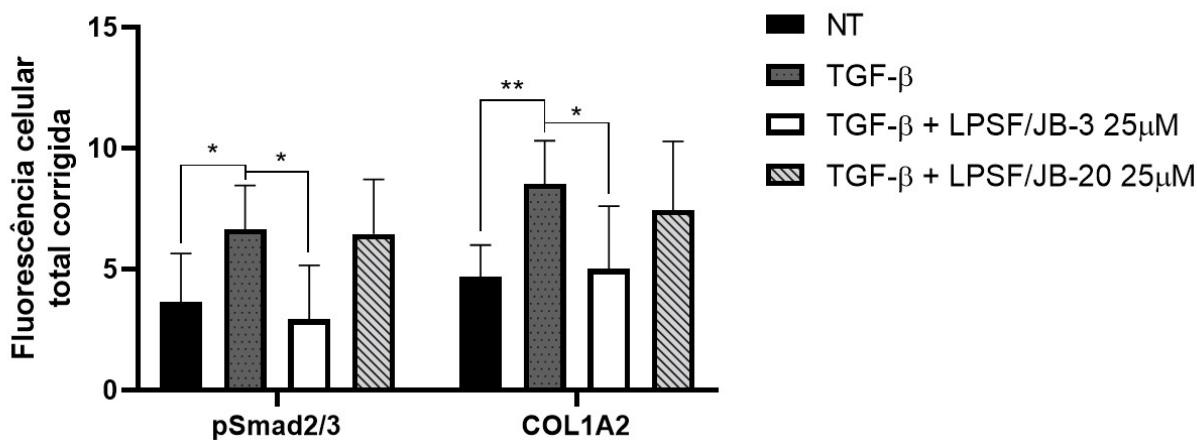
Fonte: O autor (2023).

6.7. Avaliação da atividade antifibrótica dos derivados tiazolidínicos em fibroblastos primários

Na avaliação da possível atividade antifibrótica dos derivados tiazolidínicos, a expressão da pSmad2/3 e COL1A2 foi avaliada por imunofluorescência. Na marcação de pSmad2/3 observou que os fibroblastos tratados com LPSF/JB-3 25 μ M [2,95 ± 2,28; *p= 0,0197] apresentaram a fluorescência celular menor que o grupo de fibroblastos tratados apenas com TGF- β [6,657 ± 1,37] (figura 18A). Por outro lado, o grupo tratado com LPSF/JB-20 25 μ M [6,47 ± 2,24; p= 0,8794] apresentou fluorescência celular semelhante ao grupo tratado apenas com TGF- β (figura 18B).

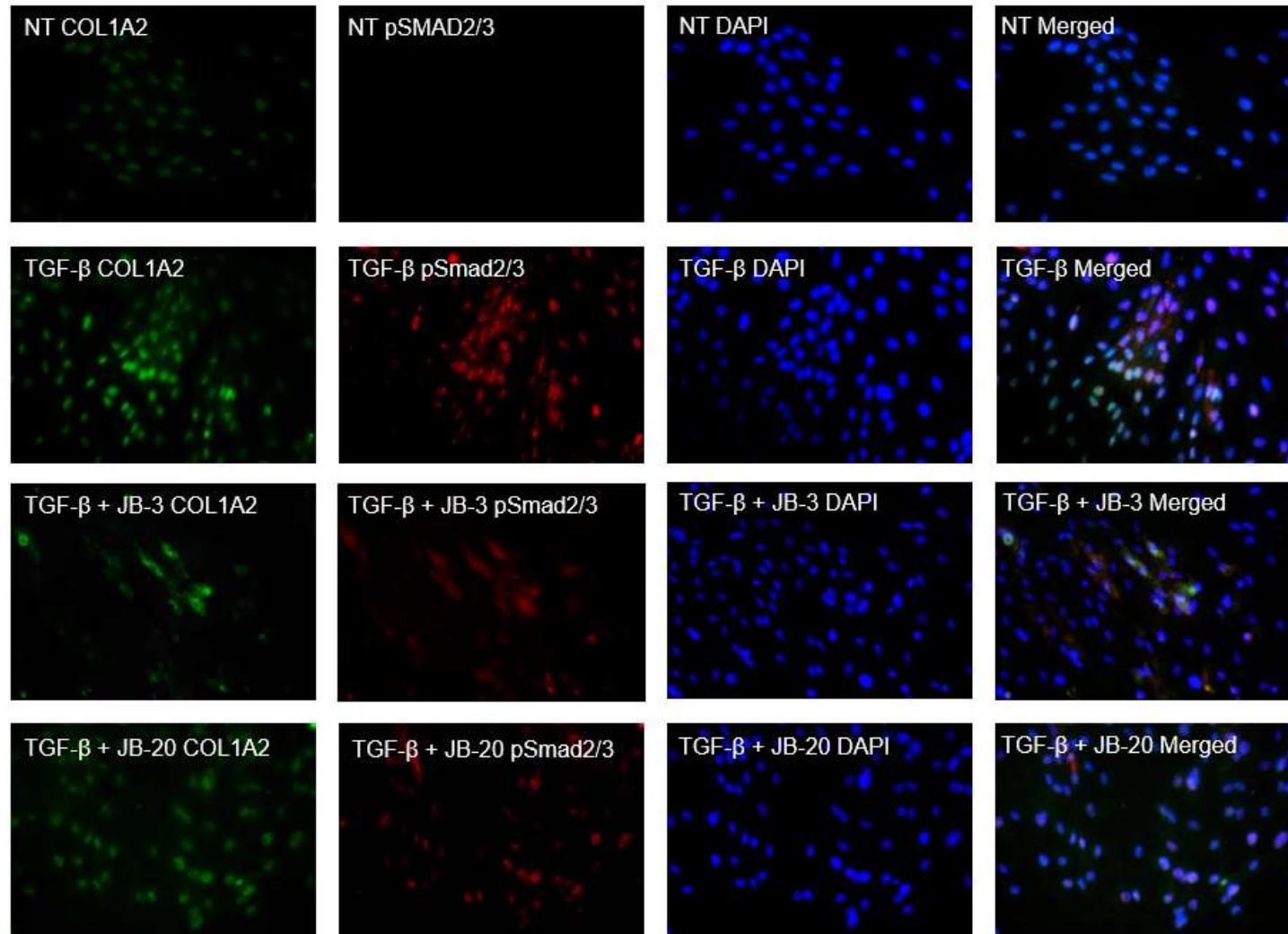
Já a avaliação da fluorescência de COL1A2, o grupo tratado com LPSF/JB-3 25 μ M [5,01 ± 2,59; *p= 0,0212] foi observado a redução da fluorescência celular em comparação com o grupo apenas tratado com TGF- β [8,53 ± 1,37]. O LPSF/JB-20 25 μ M [7,45 ± 2,83; p=0,6960] não demonstrou redução na fluorescência celular em comparação ao grupo tratado apenas com TGF- β (figura 18). As microfotografias revelam marcação de pSmad2/3 e COL1A2 entre diferentes grupos tratados com os derivados tiazolidínicos ou não, após adição prévia de TGF- β (figura 19).

Figura 18 — Fluorescência celular total corrigida de fibroblastos primários estimulados com TGF- β com tratamento com derivados tiazolidínicos. Avaliação de pSmad2/3, fibroblastos estimulados com TGF- β vs. NT (*p= 0,0214), TGF- β vs. TGF- β + LPSF/JB-3 (*p= 0,0197) e TGF- β vs. TGF- β + LPSF/JB-20 (p= 0,8794). Avaliação de COL1A2 TGF- β vs. NT (**p=0,0034), TGF- β vs. TGF- β + LPSF/JB-3 (*p= 0,0212) e TGF- β vs. TGF- β + LPSF/JB-20 (p= 0,6960). NT= Não tratado; TGF- β = Fator de crescimento beta. Teste estatístico: Múltiplos teste t.



Fonte: O autor (2023).

Figura 19 — Microfotografias de imunofluorescência de pSmad2/3 e COL1A2 em fibroblastos primários estimulados com TGF- β com posterior tratamento com LPSF/JB-3 e LPSF/JB-20. NT = Não tratado; COL1A2 = Colágeno, tipo I, alfa 2.



Fonte: O autor (2023)

7 DISCUSSÃO

As TZDs pertence a uma classe de drogas usadas principalmente como agentes hipoglicemiantes para tratar a diabetes mellitus tipo 2. Pesquisas sugerem que esses medicamentos também podem ser úteis no tratamento de outras doenças, como a ES, com potencial atividade terapêutica. Logo, o desenvolvimento e a avaliação de novos derivados tiazolidínicos despertam o interesse da comunidade científica. Nossa pesquisa avaliou as atividades dos derivados tiazolidínicos LPSF/JB-3 e LPSF/JB-20 como possíveis agentes imunomoduladores, antifibróticos e antioxidantes, com possível ligação ao PPAR γ e propriedades farmacocinéticas na perspectiva de tratamento para a ES.

Foi observado que *in silico* os derivados, possivelmente, não sofrerão efluxo *via* gp-P ao serem absorvidos pelo trato gastrointestinal. Além disso, as análises demonstraram que os derivados avaliados não ultrapassam a BHE, indicando que estas moléculas não estariam relacionadas à resistência a fármacos, e por não interagir com o SNC, na perspectiva de ensaios *in vivo* e se apresentam como seguros para o tratamento com pacientes (HUBER; MARUIAMA; ALMEIDA, 2010). Além disso, respeitam os critérios moleculares da regra de *Lipinski*, indicando atividade biológica, e que estas moléculas são boas candidatas a fármacos por via oral, facilitando assim a atividade de múltiplas enzimas metabólicas, princípios aceitos pela indústria farmacêutica (BENET et al., 2016). A predição *in silico* dos alvos terapêuticos também demonstrou a possibilidade do LPSF/JB-3 e LPSF/JB-20 de serem ligantes da classe de receptores nucleares, em especial ao PPAR γ , a simulação que os derivados não teriam ligação com as isoformas PPAR α e PPAR β pode ser baseado em estudos clínicos da ES que sugerem que a atividade de candidatos pan-agonistas as outras isoformas de PPAR não seja tão eficiente de como seria a um agonista seletivo ao PPAR γ (DENTON; YEE; ONG, 2020). O valor do PPAR γ na fisiopatologia da ES sugere um potencial alvo terapêutico, pois em estudo de associação genômica indica que a variante no gene do PPAR γ pode estar associada à suscetibilidade aos dois subtipos da ES, que leva redução do receptor e sua atividade em células relacionadas aos processos inflamatórios e fibróticos, e o uso de ligantes sintéticos podem amenizar esse quadro (MARANGONI et al., 2015).

Foi observado o aumento do acúmulo de lipídeos promovido pelos derivados LPSF/JB-3 e LPSF/JB-20, assim como agirem similarmente a rosiglitazona, sugere

que eles sejam potenciais ligantes de PPAR γ , induzindo sua ativação e atividade (PU; VEIGA-LOPEZ, 2017). No entanto, é importante lembrar que o acúmulo de lipídeos não é o único critério para avaliar o efeito de um derivado na pesquisa de novos ligantes a PPAR γ , pois outras biomoléculas podem estarão envolvidas no metabolismo lipídico, incluindo a proteína adipogênica 2 (aP2), CCAAT/proteína de ligação ao intensificador alfa (cEBP α) e a proteína de ligação a ácidos graxos (MASUMI et al., 2020). Outro importante fator a ser considerado é que as células tratadas com o derivado LPSF/JB-20 (25 μ M) demonstrou ter mais conteúdo lipídico do que o grupo de células tratadas com rosiglitazona. Isso sugere um efeito adverso LPSF/JB-20, dose dependente semelhante à rosiglitazona, que precisou ser removida do quadro de medicamentos pela *Food and Drugs Association* (FDA) devido ao aumento de depósitos de gordura subcutânea em pacientes medicados nos Estados Unidos (“FDA Drug Safety Communication: Updated Risk Evaluation and Mitigation Strategy (REMS) to Restrict Access to Rosiglitazone-containing Medicines including Avandia, Avandamet, and Avandaryl | FDA”, [s.d.]). Também é importante considerar que o LPSF/JB-20 pode estar agindo em outras vias metabólicas, que não são afetadas pela rosiglitazona, resultando em um acumulo de lipídios diferente.

Os dados preliminares de expressão gênica de PPAR γ apontam outro caminho sobre a metodologia de diferenciação adipogênica. A linhagem celular 3T3-L1 com o uso de TZDs, como a rosiglitazona e o LPSF/JBs, apesar de ter efeito com coquetel de estímulo para diferenciar as células em adipócitos maduros, não conseguiram, isoladamente, aumentar a expressão de PPAR γ tão bem quanto células que tratadas exclusivamente com coquetel de estímulo, sugerindo que a diferenciação adipogênica tenha ocorrido também por influência de outros genes, como o cEBP α e aP2, como mostrado em um estudo com 3T3-L1 de Masumi e colaboradores (CAMP; WO HITTON; TAFURI, 1999; MASUMI et al., 2020). Os dados que os LPSF/JBs não terem aumento significativo da expressão de mRNA de PPAR γ contrastam resultados observados por Rocha Junior e colaboradores. Nesse estudo, os autores analisaram a ação dessas moléculas em PBMC de pacientes com artrite reumatoide e constataram que o derivado tiazolidínico TM-17 aumentou os níveis de mRNA de PPAR γ , e esses resultados sugerem que os derivados tiazolidínicos possam regular o PPAR γ em doenças autoimunes (DA ROCHA JUNIOR et al., 2013).

O derivado tiazolidínico LPSF/JB-20 conseguiu reduzir os níveis da citocina inflamatória de perfil Th1, IFN γ , que é associada a hipertensão pulmonar na ES e

redução da expressão de PPAR γ (BĂLĂNESCU et al., 2015; DANTAS et al., 2015). Os mecanismos da atividade da IFN γ na autoimunidade ainda não foram estabelecidos. No entanto, em um estudo com um modelo animal, foi possível observar que essa citocina é capaz de diferenciar linfócitos T e alterar a classe de imunoglobulinas IgG para autoanticorpos patogênicos, ativando regiões Fc e de proteínas do complemento, o que se relaciona à severidade da autoimunidade (HU; IVASHKIV, 2009; POLLARD et al., 2013). Também foi observado que os níveis IFN γ são mais elevados em cultura de PBMC de pacientes com doenças autoimunes que desenvolveram FRy, um sinal clínico importante na investigação clínica da ES (WILLEKE et al., 2009). O papel de imunomodulador da metilprednisolona também pode ser influenciado por potencializar a atividade de PPAR γ para o controle de citocinas inflamatórias. Isso foi sugerido em um estudo de Palma e colaboradores que observaram que o medicamento aumentou a expressão de mRNA de PPAR γ em PBMC de voluntários saudáveis, mas pacientes com ES o uso não é recomendado devido ao aumento da incidência de crise renal (PALMA et al., 2012; WYETH INDÚSTRIA FARMACÊUTICA, 2020).

No entanto, foi demonstrado que LPSF/JB-3 e LPSF/JB-20 não reduziram os níveis de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e IL-13 no sobrenadante de PBMC de voluntários saudáveis. É importante ressaltar que o reduzido número de amostras para análise estatística com essas citocinas influenciou o resultado, uma vez que a variação interindividual pode ser significativa e o poder estatístico ser limitado. Para uma melhor compreensão do possível papel imunomodulador dos derivados é necessário número maior de amostras de voluntários saudáveis assim como de pacientes com ES e estudos *in vivo* com modelos animais da doença. Também deve ser possível que esses derivados não tenham efeitos diretos sobre a produção dessas citocinas, sugerindo que seu mecanismo de ação seja específico para a regulação da fibrose.

Nosso trabalho demonstrou que fibroblastos primários de pele pré-tratados com LPSF/JB-3 (25 μ M) reduziu significativamente a fluorescência induzida pelo DHE, sugerindo papel protetor ao radical superóxido (O_2^-), ratificando o papel antioxidante de moléculas com o anel de tiazolidína (SAMEEH et al., 2022; SHAHNAZ; KANNU BHAI; BHAI, 2013). Em um estudo realizado por Blaquicett e colaboradores foi observado que estresse o oxidativo estimulado através do H₂O₂ é capaz de atenuar a transcrição de PPAR γ *in vitro*, existindo a possibilidade de que o tratamento com

LPSF/JB-3 possa aumentar a transcrição do receptor (BLANQUICETT et al., 2010). O O_2^- é um potente agente de deprotonação de compostos orgânicos, como DNA e proteínas. A potencial atividade do LPSF/JB-3 como agente antioxidante sugere que o derivado doe elétrons para a estabilização do O_2^- e posteriormente o DMSO utilizado como solvente do derivado atue como doador de prótons para estabilização do O_2^- que na forma de H_2O_2 tem um período de meia vida curto em seres vivos (BERCZYŃSKI et al., 2013; KUMAR et al., 2022).

No entanto, isso não foi observado com o derivado LPSF/JB-20 ($10\mu M$ e $25\mu M$), a possível explicação para isso pode ser pela incapacidade do derivado em doar elétrons para o O_2^- , logo não reduzindo o sinal de fluorescência do DHE. Esse achado pode ser devido a vários fatores, como a falta de grupos funcionais que possam doar elétrons ou a incompatibilidade do composto com o ambiente em que as ROS estão presentes. É importante ressaltar que muitos fatores que podem influenciar a eficácia de um derivado antioxidante, incluindo a concentração, biodisponibilidade, capacidade de penetrar em tecidos e células específicos e afinidade por ROS específicas (PIZZINO et al., 2017; SIES, 2017).

O trabalho também sugere que o LPSF/JB-3 reduziu a ativação do TGF- β em fibroblastos primários de indivíduos saudáveis, resultando na diminuição da marcação de pSmad2/3 e COL1A2, empregados como marcadores da fibrose. Esses dados são promissores, uma vez que a fibrose é um dos principais aspectos patológicos da ES, sugerindo que o LPSF/JB-3 ao ativar PPAR γ , o transloca para o núcleo da célula, suprime a atividade fibroblasto primário induzido por TGF- β e anula a síntese de colágeno, a inibição do TGF- β tem sido apontada como uma estratégia terapêutica promissora para o tratamento da fibrose na ES (GHOSH; ASISH GHOSH, 2021; MAKINO et al., 2013). Além disso, a transcrição de PPAR γ pode participar da regulação e do controle da fibrogênese, enquanto a disfunção do PPAR γ parece estar associada as fibroses patológicas, como observado na ES (DANTAS et al., 2015). O uso do LPSF/JB-3 como potencial agonista de PPAR γ aponta um possível papel antifibrótico desse derivado. A ativação de PPAR γ têm sido sugerida como papel-chave na inibição do recrutamento do coativador p300 em sítios de ligação de Smad, como demonstrado no estudo de Ghosh e colaboradores com modelos animais da ES (DISTLER et al., 2017; GHOSH et al., 2009). Assim, o derivado LPSF/JB-3 pode ter potencial em reduzir os marcadores de fibrose. No entanto estudos são necessários

para avaliar sua eficácia em fibroblastos de pacientes com ES e *in vivo* com modelos animais da doença.

Contudo, o LPSF/JB-20 não diminuiu a atividade e expressão de pSmad2/3 e COL1A2, e isso sugere que o derivado não consiga afetar diretamente a via de sinalização do TGF- β em fibroblastos primários. Outra possibilidade é que a concentração utilizada do LPSF/JB-20 (25 μ M) não tenha sido suficiente para produzir um efeito antifibrótico, sendo necessário mais estudos. É importante ser mencionado o papel que derivados tiazolidínicos possa ter como agentes antifibróticos na ES, um estudo de Bogatkevich e colaboradores demonstrou que fibroblastos de pulmão oriundos de pacientes com ES tratados com rosiglitazona reduziu a expressão de colágeno tipo I *in vitro* (BOGATKEVICH et al., 2012). Resultados similares foram observados em um trabalho de Pardo-Jiménez e colaboradores que demostrou que a síntese e avaliação de derivados com o anel de tiazolidína em sua estrutura química têm sido importantes no desenvolvimento de possíveis agentes antifibróticos, ao observar a redução da expressão de procolágeno do tipo I e α -SMA, marcador de miofibroblasto (PARDO-JIMÉNEZ; NAVARRETE-ENCINA; DÍAZ-ARAYA, 2019).

8 CONCLUSÕES

- Os derivados LPSF/JB-3 e LPSF/JB-20 ao serem absorvidos pelo TGI, provavelmente, não sofrerão resistência e não violam as regras de *Lipinski*, tornando-os possíveis candidatos a fármacos de via oral;
- Os derivados LPSF/JB-3 e LPSF/JB-20 se apresentam, até o momento, como potenciais agonistas sintéticos ao PPAR γ ;
- O LPSF/JB-20 apresentou atividade imunomoduladora em IFN γ no sobrenadante de PBMC de voluntários saudáveis;
- O LPSF/JB-3 apresentou potencial atividade antioxidante em fibroblastos primários;
- O LPSF/JB-3 apresentou potencial atividade antifibrótica em fibroblastos primários.

REFERÊNCIAS

2,4-thiazolidinedione - Wikidata. Disponível em: <<https://www.wikidata.org/wiki/Q1393556>>. Acesso em: 18 fev. 2023.

ABE, Y. et al. TGF- β 1 stimulates mitochondrial oxidative phosphorylation and generation of reactive oxygen species in cultured mouse podocytes, mediated in part by the mTOR pathway. **American journal of physiology. Renal physiology**, v. 305, n. 10, 15 nov. 2013.

ALLANORE, Y. et al. Systemic sclerosis. **Nature Reviews Disease Primers** 2015 1:1, v. 1, n. 1, p. 1–21, 23 abr. 2015.

ANAGNOSTOPOULOS, I. et al. The prevalence of rheumatic diseases in central Greece: A population survey. **BMC Musculoskeletal Disorders**, v. 11, n. 1, p. 1–8, 26 maio 2010.

ANTONELLI, A. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor γ agonists reduce cell proliferation and viability and increase apoptosis in systemic sclerosis fibroblasts. **British Journal of Dermatology**, v. 168, n. 1, p. 129–135, 1 jan. 2013.

AROCCHO, A. et al. Validation of the 2-DeltaDeltaCt calculation as an alternate method of data analysis for quantitative PCR of BCR-ABL P210 transcripts. **Diagnostic molecular pathology : the American journal of surgical pathology, part B**, v. 15, n. 1, p. 56–61, mar. 2006.

AVOUAC, J. et al. Pan-PPAR agonist IVA337 is effective in experimental lung fibrosis and pulmonary hypertension. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 76, n. 11, p. 1931–1940, 1 nov. 2017.

BAJRAKTARI, I. H. et al. Incidence, Prevalence and Clinical Manifestations of Systemic Sclerosis in Dukagjini Plain. **Materia Socio-Medica**, v. 25, n. 1, p. 14, 2013. BĂLĂNESCU, P. et al. IL-17, IL-6 and IFN- γ in systemic sclerosis patients. [s.d.]

BARAUT, J. et al. Transforming growth factor- β increases interleukin-13 synthesis via GATA-3 transcription factor in T-lymphocytes from patients with systemic sclerosis. **Arthritis Research and Therapy**, v. 17, n. 1, p. 1–15, 31 jul. 2015.

BARTOLI, F. et al. Calcinosis in systemic sclerosis: subsets, distribution and complications. **Rheumatology**, v. 55, n. 9, p. 1610–1614, 1 set. 2016.

BENET, L. Z. et al. BDDCS, the Rule of 5 and Drugability. **Advanced drug delivery reviews**, v. 101, p. 89, 6 jun. 2016.

BENFAREMO, D. et al. Systemic Sclerosis: From Pathophysiology to Novel Therapeutic Approaches. **Biomedicines 2022, Vol. 10, Page 163**, v. 10, n. 1, p. 163, 12 jan. 2022.

BERCZYŃSKI, P. et al. Antioxidant activities of some new chromonyl-2,4-thiazolidinediones and chromonyl-2,4-imidazolidinediones having chromone cores. **Journal of Fluorescence**, v. 23, n. 6, p. 1319–1327, 17 jul. 2013.

BHATTACHARYYA, S.; WEI, J.; VARGA, J. Understanding fibrosis in systemic sclerosis: shifting paradigms, emerging opportunities. **Nature reviews. Rheumatology**, v. 8, n. 1, p. 42–54, jan. 2011.

BLANQUICETT, C. et al. Oxidative stress modulates PPAR gamma in vascular endothelial cells. **Free radical biology & medicine**, v. 48, n. 12, p. 1618–1625, jun. 2010.

BOGATKEVICH, G. S. et al. The PPAR γ Agonist Rosiglitazone Is Antifibrotic for Scleroderma Lung Fibroblasts: Mechanisms of Action and Differential Racial Effects. **Pulmonary Medicine**, v. 2012, 2012.

BONHOMME, O. et al. Biomarkers in systemic sclerosis-associated interstitial lung disease: review of the literature. **Rheumatology**, v. 58, n. 9, p. 1534–1546, 1 set. 2019.

BOSSINI-CASTILLO, L. et al. Genetics of systemic sclerosis. **Seminars in Immunopathology**, v. 37, n. 5, p. 443–451, 4 set. 2015.

BRANCO JÚNIOR, J. F. Planejamento, síntese e avaliação da atividade Imunomoduladora de novos derivados tiazolidínicos em Células mononucleares de pacientes gotosos. **Atena - Repositório digital da UFPE**, 2017.

BRAYNER CAVALCANTI, M. et al. Evaluation of the action of LPSF/GQ-16 on cytokines and PPAR- γ gene expression after in vitro irradiation of peripheral blood mononuclear cells. <https://doi.org/10.1080/09553002.2021.1987556>, v. 97, n. 12, p. 1649–1656, 2021.

BREMBILLA, N. C.; CHIZZOLINI, C. **T cell abnormalities in systemic sclerosis with a focus on Th17 cells**. European Cytokine Network, out. 2012a.

BREMBILLA, N. C.; CHIZZOLINI, C. 2012 ECS-ECN JUNIOR REVIEW AWARD –T cell abnormalities in systemic sclerosis with a focus on Th17 cells. **European Cytokine Network**, v. 23, n. 4, p. 128–139, 1 out. 2012b.

BRUNI, C. et al. Kidney involvement in systemic sclerosis: From pathogenesis to treatment: <https://doi.org/10.1177/2397198318758607>, v. 3, n. 1, p. 43–52, 4 abr. 2018.

BURT, R. K. et al. Cardiac involvement and treatment-related mortality after non-myeloablative haemopoietic stem-cell transplantation with unselected autologous peripheral blood for patients with systemic sclerosis: a retrospective analysis. **The Lancet**, v. 381, n. 9872, p. 1116–1124, mar. 2013.

CAMP, H. S.; WHITTON, A. L.; TAFURI, S. R. PPAR γ activators down-regulate the expression of PPAR γ in 3T3-L1 adipocytes. **FEBS Letters**, v. 447, n. 2–3, p. 186–190, 26 mar. 1999.

CECCHELLI, R. et al. Modelling of the blood–brain barrier in drug discovery and development. **Nature Reviews Drug Discovery** 2007 6:8, v. 6, n. 8, p. 650–661, 2007.

CÉSAR, F. A. et al. New indole-thiazolidine attenuates atherosclerosis in LDLr^{-/-} mice. **Vascular Pharmacology**, v. 71, p. 174–180, 1 ago. 2015.

CHIZZOLINI, C. et al. Systemic sclerosis Th2 cells inhibit collagen production by dermal fibroblasts via membrane-associated tumor necrosis factor alpha. **Arthritis and rheumatism**, v. 48, n. 9, p. 2593–2604, 1 set. 2003.

CUNARD, R. et al. Repression of IFN-γ Expression by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ. **The Journal of Immunology**, v. 172, n. 12, p. 7530–7536, 15 jun. 2004.

CUTOLO, M.; SOLDANO, S.; SMITH, V. Pathophysiology of systemic sclerosis: current understanding and new insights. **Expert Review of Clinical Immunology**, v. 15, n. 7, p. 753–764, 3 jul. 2019.

DA ROCHA JUNIOR, L. F. et al. Synthesis of a novel thiazolidinedione and evaluation of its modulatory effect on IFN-γ, IL-6, IL-17A, and IL-22 production in PBMCs from rheumatoid arthritis patients. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.

DAINA, A.; MICHELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports 2017 7:1**, v. 7, n. 1, p. 1–13, 3 mar. 2017.

DANTAS, A. T. et al. The Role of PPAR Gamma in Systemic Sclerosis. **PPAR Research**, v. 2015, 2015.

DE BRITO GOMES, M. Glitazonas e síndrome metabólica: mecanismos de ação, fisiopatologia e indicações terapêuticas. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, n. 2, p. 271–280, abr. 2006.

DENTON, C. P. Systemic sclerosis: clinical features and management. **Medicine**, v. 34, n. 11, p. 480–488, 1 nov. 2006.

DENTON, C. P. et al. Renal complications and scleroderma renal crisis. **Rheumatology**, v. 48, n. suppl_3, p. iii32–iii35, 1 jun. 2009.

DENTON, C. P. Advances in pathogenesis and treatment of systemic sclerosis. **Clinical Medicine**, v. 16, n. 1, p. 55, 1 fev. 2016.

DENTON, C. P.; KHANNA, D. Systemic sclerosis. **The Lancet**, v. 390, n. 10103, p. 1685–1699, 7 out. 2017.

DENTON, C. P.; YEE, P.; ONG, V. H. News and failures from recent treatment trials in systemic sclerosis. **European Journal of Rheumatology**, v. 7, n. Suppl 3, p. S242, 28 out. 2020.

DERRETT-SMITH, E. et al. The pan-PPAR agonist lanifibranor reduces development of lung fibrosis and attenuates cardiorespiratory manifestations in a transgenic mouse model of systemic sclerosis. **Arthritis research & therapy**, v. 23, n. 1, 1 dez. 2021.

Determining Fluorescence Intensity and Signal – **Keith R. Porter Imaging Facility - UMBC**. Disponível em: <<https://kpif.umbc.edu/image-processing-resources/imagej-fiji/determining-fluorescence-intensity-and-positive-signal/>>. Acesso em: 19 jan. 2023.

DISTLER, J. H. W. et al. Review: Frontiers of Antifibrotic Therapy in Systemic Sclerosis. **Arthritis and Rheumatology**, v. 69, n. 2, p. 257–267, 1 fev. 2017.

EL ADSSI, H. et al. Estimating the Prevalence of Systemic Sclerosis in the Lorraine Region, France, by the Capture–recapture Method. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 42, n. 5, p. 530–538, 1 abr. 2013.

FARINA, A. et al. Epstein–Barr Virus Infection Induces Aberrant TLR Activation Pathway and Fibroblast–Myofibroblast Conversion in Scleroderma. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 134, n. 4, p. 954–964, 1 abr. 2014.

FDA Drug Safety Communication: Updated Risk Evaluation and Mitigation Strategy (REMS) to Restrict Access to Rosiglitazone-containing Medicines including Avandia,

Avandamet, and Avandaryl | **FDA**. Disponível em: <<https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-drug-safety-communication-updated-risk-evaluation-and-mitigation-strategy-rems-restrict-access>>. Acesso em: 26 jan. 2023.

FEGHALI-BOSTWICK, C.; VARGA, J. Introduction: The Etiopathogenesis of Systemic Sclerosis – An Integrated Overview. **Scleroderma: From Pathogenesis to Comprehensive Management**, p. 133–139, 1 jan. 2017.

FENG, X. H.; DERYNCK, R. Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 21, p. 659–693, 2005.

FERREIRA, L.; LIMA, D. E. Perfil sócio epidemiológico de pacientes com esclerose sistêmica atendidos em Centro de Referência no estado de Pernambuco. 2 set. 2022.

FORMAN, B. M. et al. 15-Deoxy- Δ 12,14-Prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR γ . **Cell**, v. 83, n. 5, p. 803–812, 1 dez. 1995.

FORMAN, H. J.; ZHANG, H. Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. **Nature Reviews Drug Discovery** 2021 **20:9**, v. 20, n. 9, p. 689–709, 30 jun. 2021.

FURST, D. E. et al. Epidemiology of Systemic Sclerosis in a Large US Managed Care Population. **The Journal of Rheumatology**, v. 39, n. 4, p. 784–786, 1 abr. 2012.

GFELLER, D. et al. SwissTargetPrediction: a web server for target prediction of bioactive small molecules. **Nucleic acids research**, v. 42, n. Web Server issue, 1 jul. 2014.

GHOSH, A. K. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma abrogates Smad-dependent collagen stimulation by targeting the p300 transcriptional coactivator. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 23, n. 9, p. 2968–2977, set. 2009.

GHOSH, A. K.; ASISH GHOSH, C. K. Pharmacological activation of PPAR- γ : a potential therapy for skin fibrosis. **International Journal of Dermatology**, v. 60, n. 3, p. 376–383, 1 mar. 2021.

GOTTSCHALK, P. et al. Scleroderma in the Caribbean: Characteristics in a Dominican Case Series. **Reumatología Clínica (English Edition)**, v. 10, n. 6, p. 373–379, 1 nov. 2014.

GUN, D. D. et al. Stimulatory autoantibodies to Platelet-derived growth factor receptors in systemic sclerosis: What functional autoimmunity could learn from receptor biology. **Arthritis and Rheumatism**, v. 60, n. 4, p. 907–911, abr. 2009.

HENDERSON, N. C.; RIEDER, F.; WYNN, T. A. Fibrosis: from mechanisms to medicines. **Nature**, v. 587, n. 7835, p. 555–566, 26 nov. 2020.

HINZ, B.; LAGARES, D. **Myofibroblasts Methods and Protocols Methods in Molecular Biology 2299.** [s.l]: s.n]. Disponível em: <<http://www.springer.com/series/7651>>.

HOFFMANN-VOLD, A. M. et al. Prevalence of systemic sclerosis in south-east Norway. **Rheumatology**, v. 51, n. 9, p. 1600–1605, 1 set. 2012.

HORIMOTO, A. M. C. et al. Incidence and prevalence of systemic sclerosis in campo grande, state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 57, n. 2, p. 107–114, 2017.

HU, X.; IVASHKIV, L. B. Cross-regulation of signaling pathways by interferon-gamma: implications for immune responses and autoimmune diseases. **Immunity**, v. 31, n. 4, p. 539–550, 16 out. 2009.

HUBER, P. C.; MARUIAMA, C. H.; ALMEIDA, W. P. Glicoproteína-P, resistência a múltiplas drogas (MDR) e relação estrutura-atividade de moduladores. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2148–2154, 2010.

HUDSON, M.; FRITZLER, M. J. Diagnostic criteria of systemic sclerosis. **Journal of Autoimmunity**, v. 48–49, p. 38–41, 1 fev. 2014.

HUGHES, M.; HERRICK, A. L. Systemic sclerosis. **British Journal of Hospital Medicine**, v. 80, n. 9, p. 530–536, 9 set. 2019.

IHN, H. Autocrine TGF-beta signaling in the pathogenesis of systemic sclerosis. **Journal of dermatological science**, v. 49, n. 2, p. 103–113, fev. 2008.

INGEGNOLI, F.; UGHI, N.; MIHAI, C. Update on the epidemiology, risk factors, and disease outcomes of systemic sclerosis. **Best practice & research. Clinical rheumatology**, v. 32, n. 2, p. 223–240, 1 abr. 2018.

IUDICI, M. et al. Prevalence and factors associated with glucocorticoids (GC) use in systemic sclerosis (SSc): A systematic review and meta-analysis of cohort studies and registries. **Clinical Rheumatology**, v. 33, n. 2, p. 153–164, 19 fev. 2014.

IYER, S. N.; HYDE, D. M.; GIRI, S. N. Anti-inflammatory effect of pirfenidone in the bleomycin- hamster model of lung inflammation. **Inflammation**, v. 24, n. 5, p. 477–491, 2000.

JIANG, C.; TING, A. T.; SEED, B. PPAR- γ agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. **Nature 1998 391:6662**, v. 391, n. 6662, p. 82–86, 1 jan. 1998.

JIN, J. et al. Systemic Sclerosis is a Complex Disease Associated Mainly with Immune Regulatory and Inflammatory Genes. **The Open Rheumatology Journal**, v. 8, n. 1, p. 29, 30 set. 2014.

KAHALEH, M. B. Raynaud phenomenon and the vascular disease in scleroderma. **Current opinion in rheumatology**, v. 16, n. 6, p. 718–722, nov. 2004.

KANECKI, K. et al. Incidence and prevalence of Systemic Sclerosis (SSc) in Poland - differences between rural and urban regions. **Annals of agricultural and environmental medicine : AAEM**, v. 24, n. 2, p. 240–244, 2017.

KAPOOR, M. et al. Loss of peroxisome proliferator-activated receptor γ in mouse fibroblasts results in increased susceptibility to bleomycin-induced skin fibrosis. **Arthritis & Rheumatism**, v. 60, n. 9, p. 2822–2829, 1 set. 2009.

KATSUMOTO, T. R.; WHITFIELD, M. L.; CONNOLLY, M. K. The Pathogenesis of Systemic Sclerosis. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-pathol-011110-130312>, v. 6, p. 509–537, 24 jan. 2011.

KHANNA, D. et al. An Open-label, Phase II Study of the Safety and Tolerability of Pirfenidone in Patients with Scleroderma-associated Interstitial Lung Disease: the LOTUSS Trial. **The Journal of Rheumatology**, v. 43, n. 9, p. 1672–1679, 1 set. 2016.

KING, T. E. et al. A Phase 3 Trial of Pirfenidone in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. **New England Journal of Medicine**, v. 370, n. 22, p. 2083–2092, 29 maio 2014.

KLOTZ, L. et al. Proinflammatory Stimulation and Pioglitazone Treatment Regulate Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Levels in Peripheral Blood Mononuclear Cells from Healthy Controls and Multiple Sclerosis Patients. **The Journal of Immunology**, v. 175, n. 8, p. 4948–4955, 15 out. 2005.

KNETHEN, A. VON; BRÜNE, B. Activation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ by Nitric Oxide in Monocytes/Macrophages Down-Regulates p47phox and Attenuates the Respiratory Burst. **The Journal of Immunology**, v. 169, n. 5, p. 2619–2626, 1 set. 2002.

KOENIG, M. et al. Autoantibodies and microvascular damage are independent predictive factors for the progression of Raynaud's phenomenon to systemic sclerosis: A twenty-year prospective study of 586 patients, with validation of proposed criteria for early systemic sclerosis. **Arthritis & Rheumatism**, v. 58, n. 12, p. 3902–3912, 1 dez. 2008.

KOHNO, S. et al. Inhibition of skin sclerosis by 15deoxy Δ 12,14-prostaglandin J2 and retrovirally transfected prostaglandin D synthase in a mouse model of bleomycin-induced scleroderma. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 60, n. 1, p. 18–25, 1 jan. 2006.

KORMAN, B. et al. Adipocyte-specific Repression of PPAR-gamma by NCoR Contributes to Scleroderma Skin Fibrosis. **Arthritis research & therapy**, v. 20, n. 1, 11 jul. 2018.

KUMAR, H. et al. **Thiazolidin-2,4-Dione Scaffold: An Insight into Recent Advances as Antimicrobial, Antioxidant, and Hypoglycemic Agents. Molecules**MDPI, , 1 out. 2022.

KUMAR, S.; RITIKA. A brief review of the biological potential of indole derivatives. **Future Journal of Pharmaceutical Sciences 2020 6:1**, v. 6, n. 1, p. 1–19, 12 dez. 2020.

KUMAR, B. V.; CONNORS, T. J.; FARBER, D. L. Human T Cell Development, Localization, and Function throughout Life. **Immunity**, v. 48, n. 2, p. 202–213, 20 fev. 2018.

KUO, C. F. et al. Epidemiology and mortality of systemic sclerosis: a nationwide population study in Taiwan. <https://doi.org/10.3109/03009742.2011.553736>, v. 40, n. 5, p. 373–378, out. 2011.

LEHMANN, J. M. et al. Peroxisome proliferator-activated receptors α and γ are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 6, p. 3406–3410, 7 fev. 1997.

LI, J.; LIU, N. F.; WEI, A. Q. Effect of Rosiglitazone on Cardiac Fibroblast Proliferation, Nitric Oxide Production and Connective Tissue Growth Factor Expression Induced by Advanced Glycation End-products. **The Journal of International Medical Research**, v. 36, p. 329–335, 2008.

LIN, Q. et al. Rosiglitazone inhibits migration, proliferation, and phenotypic differentiation in cultured human lung fibroblasts. <http://dx.doi.org/10.3109/01902140903214659>, v. 36, n. 2, p. 120–128, 2010.

LIPINSKI, C. A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced drug delivery reviews**, v. 46, n. 1–3, p. 3–26, 1 mar. 2001.

LIU, R. M. et al. Transforming growth factor β suppresses glutamate-cysteine ligase gene expression and induces oxidative stress in a lung fibrosis model. **Free radical biology & medicine**, v. 53, n. 3, p. 554–563, 1 ago. 2012.

LIU, Y. et al. The roles of PPAR γ and its agonists in autoimmune diseases: A comprehensive review. **Journal of Autoimmunity**, v. 113, p. 102510, 1 set. 2020.

LÓRÁND, V.; CZIRJÁK, L.; MINIER, T. Musculoskeletal involvement in systemic sclerosis. **La Presse Médicale**, v. 43, n. 10, p. e315–e328, 1 out. 2014.

LUM, H.; ROEBUCK, K. A. Oxidant stress and endothelial cell dysfunction. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 280, n. 4 49-4, 2001.

LUNARDI, C. et al. Antibodies against Human Cytomegalovirus in the Pathogenesis of Systemic Sclerosis: A Gene Array Approach. **PLOS Medicine**, v. 3, n. 1, p. e2, jan. 2005.

MAKINO, K. et al. The downregulation of microRNA let-7a contributes to the excessive expression of type I collagen in systemic and localized scleroderma. **Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 190, n. 8, p. 3905–3915, 15 mar. 2013.

MARANGONI, R. G. et al. A candidate gene study reveals association between a variant of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma (PPAR- γ) gene and systemic sclerosis. **Arthritis Research and Therapy**, v. 17, n. 1, p. 1–8, 19 maio 2015.

MASUMI, A. et al. Thiazolidinediones Downregulate PPAR γ Expression via Induction of aP2 During Mouse 3T3-L1 Preadipocyte Differentiation. **BPB Reports**, v. 3, n. 4, p. 119–125, 2020.

MAYES, M. D.; TROJANOWSKA, M. Genetic factors in systemic sclerosis. **Arthritis Research and Therapy**, v. 9, n. SUPPL. 2, p. 1–7, 15 ago. 2007.

MEHRA, S. et al. Autoantibodies in systemic sclerosis. **Autoimmunity reviews**, v. 12, n. 3, p. 340–354, jan. 2013.

MEISSNER, Y. et al. OP0325 SAFETY AND EFFICACY OF LENABASUM IN AN OPEN-LABEL EXTENSION OF A PHASE 2 STUDY IN DIFFUSE CUTANEOUS SYSTEMIC SCLEROSIS SUBJECTS (DCSSC). **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 78, n. Suppl 2, p. 245–246, 1 jun. 2019.

MEYER, A. et al. Brief Report: Spatial Heterogeneity of Systemic Sclerosis in France: High Prevalence in the Northeast Region. **Arthritis and Rheumatology**, v. 68, n. 7, p. 1731–1737, 1 jul. 2016.

MI, S. et al. Blocking IL-17A Promotes the Resolution of Pulmonary Inflammation and Fibrosis Via TGF- β 1-Dependent and –Independent Mechanisms. **The Journal of Immunology**, v. 187, n. 6, p. 3003–3014, 15 set. 2011.

MIDGLEY, A. C. et al. Transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1)-stimulated fibroblast to myofibroblast differentiation is mediated by hyaluronan (HA)-facilitated epidermal growth factor receptor (EGFR) and CD44 co-localization in lipid rafts. **The Journal of biological chemistry**, v. 288, n. 21, p. 14824–14838, 24 maio 2013.

MINIER, T. et al. Preliminary analysis of the Very Early Diagnosis of Systemic Sclerosis (VEDOSS) EUSTAR multicentre study: evidence for puffy fingers as a pivotal sign for suspicion of systemic sclerosis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 73, n. 12, p. 2087–2093, 1 dez. 2014.

MUGHAL, R. S. et al. PEROXISOME PROLIFERATOR-ACTIVATED RECEPTOR γ -INDEPENDENT EFFECTS OF THIAZOLIDINEDIONES ON HUMAN CARDIAC MYOFIBROBLAST FUNCTION. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 36, n. 5–6, p. 478–486, 1 maio 2009.

NAIK, E.; DIXIT, V. M. Mitochondrial reactive oxygen species drive proinflammatory cytokine production. **Journal of Experimental Medicine**, v. 208, n. 3, p. 417–420, 14 mar. 2011.

NAVARRO, C.; BUSTOS, M. L. Etiopatogenia. Nuevos conceptos. **Reumatología Clínica**, v. 2, n. SPEC. ISS. 3, p. S6–S9, 1 nov. 2006.

NEEDLEMAN, B. W.; WIGLEY, F. M.; STAIR, R. W. Interleukin-1, interleukin-2, interleukin-4, interleukin-6, tumor necrosis factor alpha, and interferon-gamma levels in sera from patients with scleroderma. **Arthritis and rheumatism**, v. 35, n. 1, p. 67–72, 1992.

NHU, Q. M. et al. Antifibrotic Effects of the Thiazolidinediones in Eosinophilic Esophagitis Pathologic Remodeling: A Preclinical Evaluation. **Clinical and Translational Gastroenterology**, v. 11, n. 4, p. e00164, 1 abr. 2020.

NOBLE, P. W. et al. Pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (CAPACITY): Two randomised trials. **The Lancet**, v. 377, n. 9779, p. 1760–1769, 21 maio 2011.

PALMA, A. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma expression in monocytes/macrophages from rheumatoid arthritis patients: relation to disease activity and therapy efficacy—a pilot study. **Rheumatology**, v. 51, n. 11, p. 1942–1952, 1 nov. 2012.

PANTALEÃO, S. Q. et al. Recent Advances in the Prediction of Pharmacokinetics Properties in Drug Design Studies: A Review. **ChemMedChem**, v. 17, n. 1, p. e202100542, 5 jan. 2022.

PARDO-JIMÉNEZ, V.; NAVARRETE-ENCINA, P.; DÍAZ-ARAYA, G. Synthesis and Biological Evaluation of Novel Thiazolyl-Coumarin Derivatives as Potent Histone Deacetylase Inhibitors with Antifibrotic Activity. **Molecules 2019, Vol. 24, Page 739**, v. 24, n. 4, p. 739, 19 fev. 2019.

PENDYALA, S. et al. Role of Nox4 and Nox2 in Hyperoxia-Induced Reactive Oxygen Species Generation and Migration of Human Lung Endothelial Cells. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 11, n. 4, p. 747, 1 abr. 2009.

PIZZINO, G. et al. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2017, 2017.

POLLARD, K. M. et al. Interferon- γ and Systemic Autoimmunity. **Discovery medicine**, v. 16, n. 87, p. 123, 2013.

PORTARIA CONJUNTA Nº 9, DE 28 DE AGOSTO DE 2017 - **Imprensa Nacional**. Disponível em: <https://www.in.gov.br/materia-/asset_publisher/Kujrw0TzC2Mb/content/id/19275374/do1-2017-09-04-portaria-conjunta-n-9-de-28-de-agosto-de-2017-19275362>. Acesso em: 13 fev. 2023.

PU, Y.; VEIGA-LOPEZ, A. PPAR γ agonist through the terminal differentiation phase is essential for adipogenic differentiation of fetal ovine preadipocytes. **Cellular and Molecular Biology Letters**, v. 22, n. 1, p. 1–12, 1 dez. 2017.

RACINE, M. et al. The Impact of Pain and Itch on Functioning and Health-Related Quality of Life in Systemic Sclerosis: An Exploratory Study. **Journal of pain and symptom management**, v. 52, n. 1, p. 43–53, 1 jul. 2016.

RADIĆ, M. et al. Prevalence of systemic sclerosis in Split-Dalmatia county in Southern Croatia. **Clinical Rheumatology**, v. 29, n. 4, p. 419–421, 16 abr. 2010.

RADSTAKE, T. R. D. J. et al. The Pronounced Th17 Profile in Systemic Sclerosis (SSc) Together with Intracellular Expression of TGF β and IFN γ Distinguishes SSc Phenotypes. **PLoS ONE**, v. 4, n. 6, p. e5903, 17 jun. 2009.

RÊGO, M. J. B. DE M. et al. Ability of two new thiazolidinediones to downregulate proinflammatory cytokines in peripheral blood mononuclear cells from children with asthma. **Braz. J. Pharm. Sci. (Online)**, v. 54, n. 3, p. e00049–e00049, 2018.

RICOTE, M. et al. The peroxisome proliferator-activated receptor- γ is a negative regulator of macrophage activation. **Nature** 1998; 391:6662, v. 391, n. 6662, p. 79–82, 1 jan. 1998.

ROSA, J. E. et al. Incidence and prevalence of systemic sclerosis in a healthcare plan in Buenos Aires. **Journal of Clinical Rheumatology**, v. 17, n. 2, p. 59–63, mar. 2011. RUZEHAJI, N. et al. Extended report: Pan PPAR agonist IVA337 is effective in prevention and treatment of experimental skin fibrosis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 75, n. 12, p. 2175, 1 dez. 2016.

SAMEEH, M. Y. et al. Thiazolidinedione Derivatives: In Silico, In Vitro, In Vivo, Antioxidant and Anti-Diabetic Evaluation. **Molecules** 2022, Vol. 27, Page 830, v. 27, n. 3, p. 830, 27 jan. 2022.

SAMPAIO-BARROS, P. D. **Recomendações sobre diagnóstico e tratamento da esclerose sistêmica Recomendações sobre diagnóstico e tratamento da esclerose sistêmica**. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/rbr/a/FbWHs3cjrhMsnq47pwDbVnP/?lang=pt>>. Acesso em: 27 jul. 2022.

SANTOS, L. A. M. DOS; FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES. RECIFE, P. BRASIL. Avaliação do potencial anti-inflamatório dos derivados tiazolidínicos LPSF/GQ-2 e LPSF/RA-4 em modelo de lesão pulmonar aguda. 2018.

SAVARINO, E. et al. Gastrointestinal involvement in systemic sclerosis. **La Presse Médicale**, v. 43, n. 10, p. e279–e291, 1 out. 2014.

SCALA, E. et al. Cytokine and chemokine levels in systemic sclerosis: relationship with cutaneous and internal organ involvement. **Clinical and experimental immunology**, v. 138, n. 3, p. 540–546, dez. 2004.

SHAHNAZ, M.; KANNU BHAI, P.; BHAI, R. SYNTHESIS, CHARACTERIZATION OF 2,4 -THIAZOLIDINEDIONE DERIVATIVES AND EVALUATION OF THEIR

ANTIOXIDANT ACTIVITY. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, v. 3, n. 6, p. 96–101, 14 nov. 2013.

SHI-WEN, X. et al. Rosiglitazone alleviates the persistent fibrotic phenotype of lesional skin scleroderma fibroblasts. **Rheumatology**, v. 49, n. 2, p. 259–263, 1 fev. 2010.

SIES, H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. **Redox biology**, v. 11, p. 613–619, 1 abr. 2017.

SILVA, D. M. A. DE Q. E. Action of LPSF / GQ-16 on the gene expression of PPAR-gamma and cytokines in human cells irradiated in vitro. **International Nuclear Information System**, 2018.

SPIERA, R. et al. OP0006 Safety and efficacy of lenabasum (JBT-101) in diffuse cutaneous systemic sclerosis subjects treated for one year in an open-label extension of trial jbt101-ssc-001. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 77, n. Suppl 2, p. 52–52, 1 jun. 2018.

STEEN, V. et al. Digital ulcers: overt vascular disease in systemic sclerosis. **Rheumatology**, v. 48, n. suppl_3, p. iii19–iii24, 1 jun. 2009.

STEEN, V. D. Autoantibodies in Systemic Sclerosis. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 35, n. 1, p. 35–42, 1 ago. 2005.

STICHERLING, M. Systemic sclerosis – dermatological aspects. Part 1: Pathogenesis, epidemiology, clinical findings. **JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, v. 10, n. 10, p. 705–716, 1 out. 2012.

SZAMOSI, S.; SZEKANECZ, Z.; SZŰCS, G. Gastrointestinal manifestations in Hungarian scleroderma patients. **Rheumatology International**, v. 26, n. 12, p. 1120–1124, 13 jun. 2006.

TASHKIN, D. P. et al. Cyclophosphamide versus Placebo in Scleroderma Lung Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 354, n. 25, p. 2655–2666, 22 jun. 2006.

TROJANOWSKA, M. Cellular and molecular aspects of vascular dysfunction in systemic sclerosis. **Nature Reviews Rheumatology** 2010 6:8, v. 6, n. 8, p. 453–460, 29 jun. 2010.

VAN DEN HOOGEN, F. et al. 2013 Classification Criteria for Systemic Sclerosis: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism Collaborative Initiative. **Arthritis & Rheumatism**, v. 65, n. 11, p. 2737–2747, 1 nov. 2013.

VARGA, J.; PASCHE, B. Transforming growth factor β as a therapeutic target in systemic sclerosis. **Nature Reviews Rheumatology** 2009 5:4, v. 5, n. 4, p. 200–206, 2009.

VERRECCHIA, F.; MAUVIEL, A.; FARGE, D. Transforming growth factor-beta signaling through the Smad proteins: role in systemic sclerosis. **Autoimmunity reviews**, v. 5, n. 8, p. 563–569, out. 2006.

VONA, R. et al. Oxidative stress in the pathogenesis of systemic scleroderma: An overview. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 22, n. 7, p. 3308, 1 jul. 2018.

WANG, Z. et al. In Silico Prediction of Blood–Brain Barrier Permeability of Compounds by Machine Learning and Resampling Methods. **ChemMedChem**, v. 13, n. 20, p. 2189–2201, 22 out. 2018.

WILLEKE, P. et al. Interferon-gamma is increased in patients with primary Sjogren's syndrome and Raynaud's phenomenon. **Seminars in arthritis and rheumatism**, v. 39, n. 3, p. 197–202, dez. 2009.

WILSON, M. S. et al. Bleomycin and IL-1 β –mediated pulmonary fibrosis is IL-17A dependent. **Journal of Experimental Medicine**, v. 207, n. 3, p. 535–552, 15 mar. 2010.

WYETH INDÚSTRIA FARMACÊUTICA. **SOLU-MEDROL ® succinato sódico de metilprednisolona.**, 2020. . Acesso em: 20 mar. 2023

XU, D.; MU, R.; WEI, X. The Roles of IL-1 Family Cytokines in the Pathogenesis of Systemic Sclerosis. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 2025, 13 set. 2019.

YOSHIZAKI, A. Pathogenic roles of B lymphocytes in systemic sclerosis. **Immunology letters**, v. 195, p. 76–82, 1 mar. 2018.

ZHAO, X. et al. A comparison of methods for effective differentiation of the frozen-thawed 3T3-L1 cells. **Analytical Biochemistry**, v. 568, p. 57–64, 1 mar. 2019.

ZIMMERMANN, A. F.; PIZZICHINI, M. M. M. Update on the etiopathogenesis of systemic sclerosis. **Revista Brasileira de Reumatologia (English Edition)**, v. 53, n. 6, p. 516–524, 1 nov. 2013.

ŻÓŁKIEWICZ, J. et al. Circulating peroxisome proliferator-activated receptor γ is elevated in systemic sclerosis. **Postepy dermatologii i alergologii**, v. 37, n. 6, p. 921–926, 2020.

ZUO, X. et al. Systematic approach to understanding the pathogenesis of systemic sclerosis. **Clinical Genetics**, v. 92, n. 4, p. 365–371, 1 out. 2017.

**APÊNDICE A – DADOS DE SWISSTARGETPREDICTION DO DERIVADO
LPSF/JB-3 PARA OS POSSÍVEIS ALVOS**

28/02/23, 22:13

SwissTargetPrediction

SwissTargetPrediction

Target	Common name	Uniprot ID	ChEMBL ID	Target Class	Probability*	Known actives (3D/2D)
Protein-tyrosine phosphatase 1B	PTPN1	P18031	CHEMBL335	Phosphatase	0.128898633299	51 / 71
Autotaxin	ENPP2	Q13822	CHEMBL3691	Enzyme	0.112748418065	4 / 16
Peroxisome proliferator-activated receptor gamma	PPARG	P37231	CHEMBL235	Nuclear receptor	0.112748418065	14 / 7
Aldose reductase	AKR1B1	P15121	CHEMBL1900	Enzyme	0.112748418065	34 / 31
MAP kinase ERK2	MAPK1	P28482	CHEMBL4040	Kinase	0.112748418065	160 / 11
Monoamine oxidase A	MAOA	P21397	CHEMBL1951	Oxidoreductase	0.104671941128	45 / 4
Receptor-type tyrosine-protein phosphatase beta	PTPRB	P23467	CHEMBL2706	Phosphatase	0.104671941128	20 / 2
Monoamine oxidase B	MAOB	P27338	CHEMBL2039	Oxidoreductase	0.104671941128	76 / 8
Low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase	ACP1	P24666	CHEMBL4903	Phosphatase	0.104671941128	3 / 20
Glutathione S-transferase Pi	GSTP1	P09211	CHEMBL3902	Enzyme	0.104671941128	12 / 0
Aldehyde dehydrogenase	ALDH2	P05091	CHEMBL1935	Oxidoreductase	0.104671941128	12 / 0
Serine/threonine-protein kinase TAO1	TAOK1	Q7L7X3	CHEMBL5261	Kinase	0.104671941128	5 / 0
Serine/threonine-protein kinase TAO3	TAOK3	Q9H2K8	CHEMBL5701	Kinase	0.104671941128	4 / 0
Arylamine N-acetyltransferase 1	NAT1	P18440	CHEMBL5101	Enzyme	0.104671941128	0 / 11
Cyclooxygenase-2	PTGS2	P35354	CHEMBL230	Oxidoreductase	0.104671941128	53 / 4
T-cell protein-tyrosine phosphatase	PTPN2	P17706	CHEMBL3807	Phosphatase	0.104671941128	3 / 17
Proto-oncogene tyrosine-protein kinase MER	MERTK	Q12866	CHEMBL5331	Kinase	0.104671941128	2 / 0
Acyl-CoA desaturase	SCD	O00767	CHEMBL5555	Enzyme	0.104671941128	41 / 0
Ribosomal protein S6 kinase alpha 3	RPS6KA3	P51812	CHEMBL2345	Kinase	0.104671941128	17 / 0
Casein kinase I alpha	CSNK1A1	P48729	CHEMBL2793	Kinase	0.104671941128	5 / 0
Macrophage migration inhibitory factor	MIF	P14174	CHEMBL2085	Enzyme	0.104671941128	20 / 0

**APÊNDICE B – DADOS DE SWISSTARGETPREDICTION DO DERIVADO
LPSF/JB-20 PARA OS POSSÍVEIS ALVOS**

28/02/23, 22:14

SwissTargetPrediction

SwissTargetPrediction

Target	Common name	Uniprot ID	ChEMBL ID	Target Class	Probability*	Known actives (3D/2D)
Phosphodiesterase 10A	PDE10A	Q9Y233	CHEMBL4409	Phosphodiesterase	0.113285953487	338 / 0
Focal adhesion kinase 1	PTK2	Q05397	CHEMBL2695	Kinase	0.113285953487	21 / 0
Adenosine A1 receptor	ADORA1	P30542	CHEMBL226	Family A G protein-coupled receptor	0.113285953487	209 / 0
Thrombin and coagulation factor X	F10	P00742	CHEMBL244	Protease	0.113285953487	93 / 0
Metabotropic glutamate receptor 5 (by homology)	GRM5	P41594	CHEMBL3227	Family C G protein-coupled receptor	0.113285953487	279 / 0
Peroxisome proliferator-activated receptor gamma	PPARG	P37231	CHEMBL235	Nuclear receptor	0.113285953487	10 / 6
Adenosine A3 receptor	ADORA3	P0DMS8	CHEMBL256	Family A G protein-coupled receptor	0.113285953487	181 / 0
FK506-binding protein 1A	FKBP1A	P62942	CHEMBL1902	Isomerase	0.113285953487	55 / 0
Leukocyte elastase	ELANE	P08246	CHEMBL248	Protease	0.113285953487	88 / 0
Matrix metalloproteinase 3	MMP3	P08254	CHEMBL283	Protease	0.113285953487	17 / 0
GABA-A receptor; alpha-3/beta-3/gamma-2	GABRB3 GABRA3 GABRG2	P28472 P34903 P18507	CHEMBL2094120	Ligand-gated ion channel	0.113285953487	43 / 0
GABA-A receptor; alpha-1/beta-3/gamma-2	GABRB3 GABRG2 GABRA1	P28472 P18507 P14867	CHEMBL2094121	Ligand-gated ion channel	0.113285953487	35 / 0
GABA-A receptor; alpha-5/beta-3/gamma-2	GABRB3 GABRG2 GABRA5	P28472 P18507 P31644	CHEMBL2094122	Ligand-gated ion channel	0.113285953487	36 / 0
GABA-A receptor; alpha-2/beta-3/gamma-2	GABRA2 GABRB3 GABRG2	P47869 P28472 P18507	CHEMBL2094130	Ligand-gated ion channel	0.113285953487	42 / 0
Adenosine A2a receptor	ADORA2A	P29274	CHEMBL251	Family A G protein-coupled receptor	0.113285953487	150 / 0
Fructose-1,6-bisphosphatase	FBP1	P09467	CHEMBL3975	Enzyme	0.113285953487	4 / 0
Purinergic receptor P2Y1	P2RY1	P47900	CHEMBL4315	Family A G protein-coupled receptor	0.113285953487	13 / 0
Neuropeptide Y receptor type 5 (by homology)	NPY5R	Q15761	CHEMBL4561	Family A G protein-coupled receptor	0.113285953487	66 / 0
Orexin receptor 2	HCRT2	O43614	CHEMBL4792	Family A G protein-coupled receptor	0.113285953487	122 / 0
Orexin receptor 1	HCRT1	O43613	CHEMBL5113	Family A G protein-coupled receptor	0.113285953487	114 / 0
Ghrelin receptor	GHSR	Q92847	CHEMBL4616	Family A G protein-coupled receptor	0.113285953487	16 / 0
Proteasome Macropain subunit MB1	PSMB5	P28074	CHEMBL4662	Protease	0.113285953487	15 / 0
Receptor-type tyrosine-protein phosphatase beta	PTPRB	P23467	CHEMBL2706	Phosphatase	0.113285953487	0 / 2
T-cell protein-tyrosine phosphatase	PTPN2	P17706	CHEMBL3807	Phosphatase	0.113285953487	0 / 15
Low molecular weight phosphotyrosine protein	ACPI	P24666	CHEMBL4903	Phosphatase	0.113285953487	0 / 20

**APÊNDICE C – DADOS DE SWISSTARGETPREDICTION DA ROSIGLITAZONA
PARA OS POSSÍVEIS ALVOS**

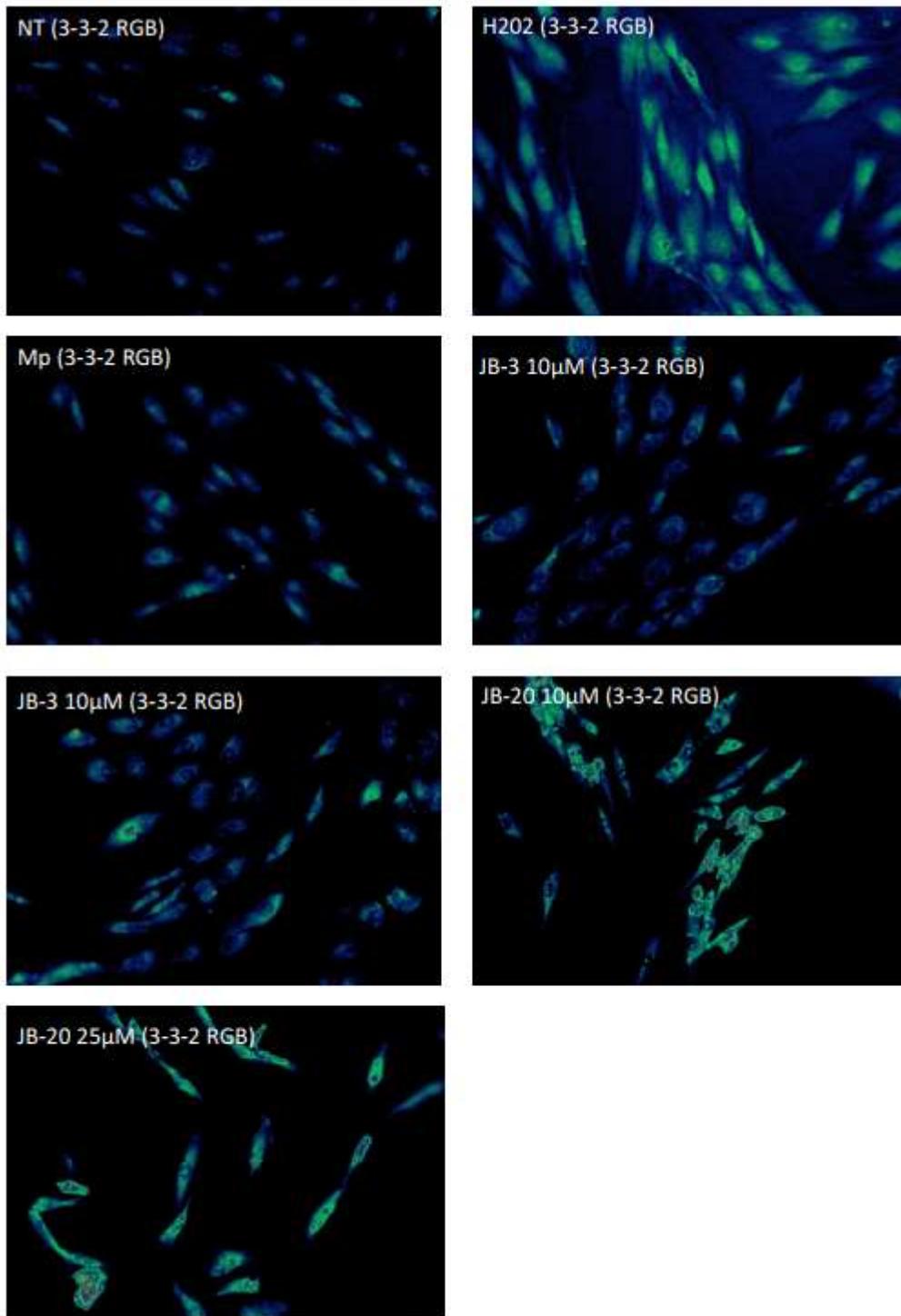
07/03/23, 20:11

SwissTargetPrediction

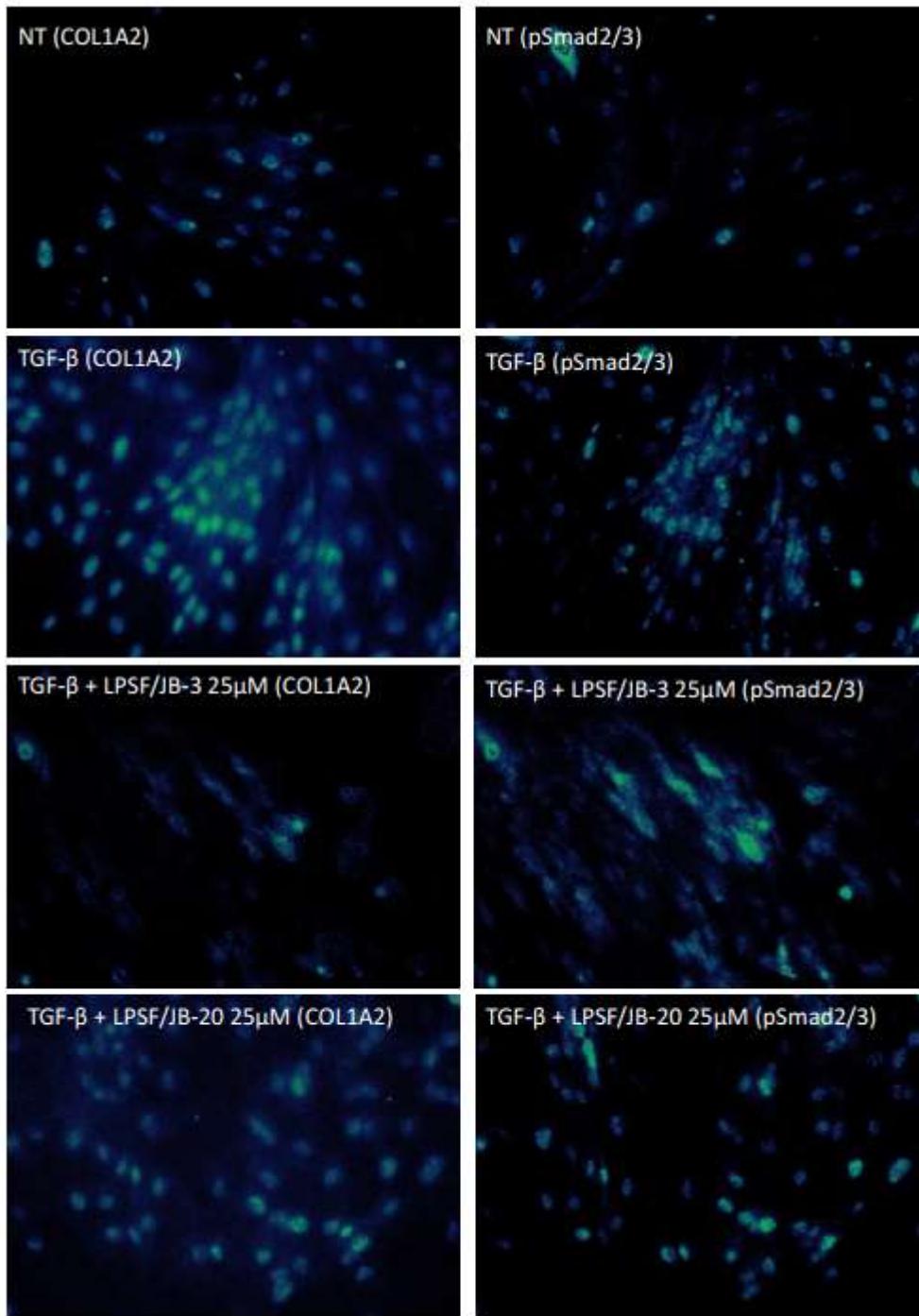
SwissTargetPrediction

Target	Common name	Uniprot ID	ChEMBL ID	Target Class	Probability*	Known actives (3D/2D)
Peroxisome proliferator-activated receptor gamma	PPARG	P37231	CHEMBL235	Nuclear receptor	1.0	527 / 71
Thromboxane-A synthase	TBXAS1	P24557	CHEMBL1835	Cytochrome P450	0.843606914485	101 / 3
Monoamine oxidase B	MAOB	P27338	CHEMBL2039	Oxidoreductase	0.843606914485	7 / 4
Carbonic anhydrase II	CA2	P00918	CHEMBL205	Lyase	0.843606914485	153 / 4
Type-1 angiotensin II receptor (by homology)	AGTR1	P30556	CHEMBL227	Family A G protein-coupled receptor	0.843606914485	175 / 1
Peroxisome proliferator-activated receptor alpha	PPARA	Q07869	CHEMBL239	Nuclear receptor	0.843606914485	262 / 10
Peroxisome proliferator-activated receptor delta	PPARD	Q03181	CHEMBL3979	Nuclear receptor	0.843606914485	114 / 4
Bile salt export pump	ABCB11	O95342	CHEMBL6020	Primary active transporter	0.843606914485	4 / 3
Free fatty acid receptor 1	FFAR1	O14842	CHEMBL4422	Family A G protein-coupled receptor	0.0972399887602	70 / 14
15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase [NAD ⁺]	HPGD	P15428	CHEMBL1293255	Enzyme	0.0972399887602	81 / 1
Matrix metalloproteinase 8	MMP8	P22894	CHEMBL4588	Protease	0.0972399887602	96 / 0
Phospholipase A2 group IIA	PLA2G2A	P14555	CHEMBL3474	Enzyme	0.0972399887602	72 / 0
Macrophage colony stimulating factor receptor	CSF1R	P07333	CHEMBL1844	Kinase	0.0972399887602	34 / 0
Matrix metalloproteinase 3	MMP3	P08254	CHEMBL283	Protease	0.0972399887602	95 / 0
Glucocorticoid receptor	NR3C1	P04150	CHEMBL2034	Nuclear receptor	0.0972399887602	11 / 0
Tyrosine-protein kinase LCK	LCK	P06239	CHEMBL258	Kinase	0.0972399887602	29 / 0
Ileal bile acid transporter	SLC10A2	Q12908	CHEMBL2778	Electrochemical transporter	0.0972399887602	28 / 0
Prostanoid DP receptor	PTGDR	Q13258	CHEMBL4427	Family A G protein-coupled receptor	0.0972399887602	90 / 0
Cyclin-dependent	CDK9	P50750	CHEMBL3116	Kinase	0.0972399887602	24 /

**APÊNDICE D – MICROFOTOGRAFIAS DE FLUORESCÊNCIA DE DHE EM
FIBROBLASTOS PRIMÁRIOS EM 8-BIT (3-3-2 RGB)**



**APÊNDICE E – MICROFOTOGRAFIAS DE IMUNOFLUORESCÊNCIA DE COL1A2
E pSMAD2/3 EM FIBROBLASTOS PRIMÁRIOS EM 8-BIT (3-3-2 RGB)**



APÊNDICE F – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA COLETA DE FRAGMENTO DE PELE SAUDÁVEL



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
NÚCLEO DE PESQUISA EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA – SUELY GALDINO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (PARA MAIORES DE 18 ANOS OU EMANCIPADOS)

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar como voluntário (a) da pesquisa “**Avaliação in vitro de atividade antioxidante e imunomoduladora de derivados tiazolidínicos e perfil de expressão protéica das isoformas de PPAR em pacientes com esclerose sistêmica**” que está sob a responsabilidade do (a) pesquisador (a) João Victor de Melo Gomes, Av. Jorn. Aníbal Fernandes - Cidade Universitária, Recife - PE; CEP: 50740-540 – Telefone para contato: (81) 99525-5924; E-mail: joao.melogomes@ufpe.br

Também participam desta pesquisa os pesquisadores: Dra. Lilian David de Azevedo Valadares, e-mail: lilianlvaladares@hotmail.com, Profa. Dra. Andréa Tavares Dantas, e-mail: andreatdantas@gmail.com. Está sob a orientação do: Profa. Dra. Maira Galdino da Rocha Pitta, Telefone: (81) 99786-9635, e-mail: maira.pitta@ufpe.br.

Todas as suas dúvidas podem ser esclarecidas com o responsável por esta pesquisa. Apenas quando todos os esclarecimentos forem dados e você concorde com a realização do estudo, pedimos que rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma via lhe será entregue e a outra ficará com o pesquisador responsável.

O (a) senhor (a) estará livre para decidir participar ou recusar-se. Caso não aceite participar, não haverá nenhum problema, desistir é um direito seu, bem como será possível retirar o consentimento em qualquer fase da pesquisa, também sem nenhuma penalidade.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

➤ **Descrição da pesquisa e esclarecimento da participação:** A esclerose sistêmica, também conhecida como esclerodermia, é uma rara doença autoimune de origem desconhecida que acomete a pele e diferentes órgãos como pulmões, coração e trato digestivo. A doença costuma aparecer em pacientes a partir dos 30 anos ou até antes e pode prejudicar o rendimento em certas atividades manuais isso pode causar complicações na saúde mental e nas atividades profissionais do portador da doença. Nossa objetivo é expandir os horizontes de conhecimento ao estudarmos a ação de fármacos em células da pele (em caso de biópsia) de pacientes e indivíduos saudáveis. Como você não é portador de esclerose sistêmica e se enquadra nos critérios de inclusão da pesquisa, sua participação é importante para que seja possível a comparação entre os seus resultados clínicos e laboratoriais com os de pacientes. Esta pesquisa busca entender se alguma mudança nas informações das nossas células do nosso organismo pode causar a esclerose sistêmica. Serão utilizados restos de pele retirados da sua cirurgia plástica no Hospital das Clínicas, não havendo necessidade de nenhum procedimento adicional, com prévia autorização do Comitê de Ética em Pesquisa, e/ou da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa. A coleta do material será realizada no bloco cirúrgico de cirurgia plástica do Hospital das Clínicas da UFPE (HC/UFPE) por profissionais treinados e competentes e orientados para reduzir os riscos. Nenhum medicamento será administrado em momento algum. As amostras serão processadas e armazenadas no Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT), pertencente ao Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica – Suely Galdino, da UFPE. O material coletado tem objetivo de aquisição de uma célula conhecida como fibroblasto, a partir disso os fibroblastos serão submetidos a tratamento com os fármacos e logo será realizado ensaio imunoenzimático conhecido como ELISA para detecção de moléculas como citocinas e detectar moléculas específicas que possam estar relacionados a fibrose em pacientes com esclerose sistêmica através do ensaio de imunofluorescência e *western blotting*.

➤ **RISCOS:** O risco ao voluntário da pesquisa é mínimo devido a coleta do material será diretamente do excedente de pele retirada após cirurgia e não do paciente em si. Em caso de danos ocasionados por quaisquer procedimentos envolvendo a pesquisa o paciente terá direito a assistência integral e gratuita.

➤ **BENEFÍCIOS diretos/indiretos:** Quanto aos benefícios na condição de grupo controle, você será submetido a uma avaliação clínica e, caso seja detectada alguma alteração sugestiva de doença autoimune, será encaminhado para um acompanhamento adequado, além de contribuir de maneira geral para a melhor compreensão do mecanismo da doença, favorecendo aos demais pacientes e guiando as equipes de saúde para maior sucesso no tratamento da doença.

Esclarecemos que os participantes dessa pesquisa têm plena liberdade de se recusar a participar do estudo e que esta decisão não acarretará penalização por parte dos pesquisadores. Todas as informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa ficarão armazenados em pastas de arquivo, sob a responsabilidade do pesquisador João Victor de Melo Gomes, Av. Jorn. Aníbal Fernandes - Cidade Universitária, Recife - PE, pelo período de mínimo 5 anos após o término da pesquisa.

APÊNDICE G – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA COLETA DE SANGUE DE VOLUNTÁRIOS SAUDÁVEIS



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
NÚCLEO DE PESQUISA EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA – SUELY GALDINO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (PARA MAIORES DE 18 ANOS OU EMANCIPADOS)

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar como voluntário (a) da pesquisa “**Avaliação in vitro de atividade antioxidante e imunomoduladora de derivados tiazolidínicos e perfil de expressão protéica das isoformas de PPAR em pacientes com esclerose sistêmica**” que está sob a responsabilidade do (a) pesquisador (a) João Victor de Melo Gomes, Av. Jorn. Aníbal Fernandes - Cidade Universitária, Recife - PE; CEP: 50740-540 – Telefone para contato: (81) 99525-5924; E-mail: joao.melogomes@ufpe.br

Também participam desta pesquisa os pesquisadores: Dra. Lilian David de Azevedo Valadares, e-mail: lilianlvaladares@hotmail.com, Profa. Dra. Andréa Tavares Dantas, e-mail: andreatdantas@gmail.com. Está sob a orientação do: Profa. Dra. Maira Galdino da Rocha Pitta, Telefone: (81) 99786-9635, e-mail: maira.pitta@ufpe.br.

Todas as suas dúvidas podem ser esclarecidas com o responsável por esta pesquisa. Apenas quando todos os esclarecimentos forem dados e você concorde com a realização do estudo, pedimos que rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma via lhe será entregue e a outra ficará com o pesquisador responsável.

O (a) senhor (a) estará livre para decidir participar ou recusar-se. Caso não aceite participar, não haverá nenhum problema, desistir é um direito seu, bem como será possível retirar o consentimento em qualquer fase da pesquisa, também sem nenhuma penalidade.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

➤ **Descrição da pesquisa e esclarecimento da participação:** A esclerose sistêmica, também conhecida como esclerodermia, é uma rara doença autoimune de origem desconhecida que acomete a pele e diferentes órgãos como pulmões, coração e trato digestivo. A doença costuma aparecer em pacientes a partir dos 30 anos ou até antes e pode prejudicar o rendimento em certas atividades manuais isso pode causar complicações na saúde mental e nas atividades profissionais do portador da doença. Nossa objetivo é expandir os horizontes de conhecimento ao estudarmos como certas moléculas são capazes de dirigir os rumos da doença em um paciente portador da doença. Como você não é portador de esclerose sistêmica e se enquadra nos critérios de inclusão da pesquisa, sua participação é importante para que seja possível a comparação entre os seus resultados clínicos e laboratoriais com os de pacientes. Esta pesquisa busca entender se alguma mudança nas informações das nossas células do nosso organismo pode causar a esclerose sistêmica. A coleta de sangue é feita no braço e a quantidade coletada é equivalente a duas colheres de sopa (24 mL). O material coletado será processado para isolamento de células para pesquisa e separação do soro, que será armazenado adequadamente em freezers -80°C e poderá ser utilizado em pesquisas futuras, com prévia autorização do Comitê de Ética em Pesquisa, e/ou da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa. A coleta será realizada Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT) por profissionais treinados e competentes e orientados para reduzir os riscos. Nenhum medicamento será administrado em momento algum. As amostras serão processadas e armazenadas no LINAT, pertencente ao Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica – Suely Galdino, da UFPE. Parte do material líquido que foi separado do sangue coletado para testes será submetido ao ensaio imunoenzimático conhecido como ELISA para detecção de moléculas conhecida como citocinas;

➤ **RISCOS:** Os riscos envolvidos nesse projeto se referem à coleta de sangue, que pode ser desconfortável e o braço pode ficar um pouco dolorido e apresentar hematoma que é uma área arroxeadas no local da coleta. Em caso de danos ocasionados por quaisquer procedimentos envolvendo a pesquisa o paciente terá direito a assistência integral e gratuita;

➤ **BENEFÍCIOS diretos/indiretos** para os voluntários: Quantos aos benefícios na condição de grupo controle, você será submetido a uma avaliação clínica e, caso seja detectada alguma alteração sugestiva de doença autoimune, será encaminhado para um acompanhamento adequado, além de contribuir de maneira geral para a melhor compreensão do mecanismo da doença, favorecendo aos demais pacientes e guiando as equipes de saúde para maior sucesso no tratamento da doença.

Esclarecemos que os participantes dessa pesquisa têm plena liberdade de se recusar a participar do estudo e que esta decisão não acarretará penalização por parte dos pesquisadores. Todas as informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa ficarão armazenados em pastas de arquivo,

ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP



UFPE - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DE PERNAMBUCO -
HC/UFPE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação in vitro de atividade antioxidante e imunomoduladora de derivados tiazolidínicos e perfil de expressão protéica das isoformas de ppar em pacientes com esclerose sistêmica

Pesquisador: JOAO VICTOR DE MELO GOMES

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 55556222.7.3001.8807

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.628.483

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de Mestrado, do Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, de João Victor de Melo Gomes, sob a orientação da Profa. Dra. Maira Galdino da Rocha Pitta. Compõem também a equipe as professoras Lilian David de Azevedo Valadares e Andrea Tavares Dantas.

A esclerose sistêmica (ES) é uma doença autoimune reumatológica que acomete a pele e órgãos internos, resultando em altas taxas de morbidade e mortalidade. É considerada uma doença de importância mundial em termos de impacto à saúde pública, tendo a etiologia ainda não elucidada, embora se saiba que fatores genéticos e ambientais agem como gatilho para a doença. O foco do projeto é observar como o tratamento de potenciais fármacos in vitro atuam em fibroblastos de pacientes com esclerose sistêmica e se são capazes de inibir citocinas ou outras proteínas relacionadas ao desenvolvimento da fibrose.

Em tempo, o estresse oxidativo é um mecanismo que envolve o desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, por consequência da geração excessiva de espécies reativas de oxigênio (ERO). As ERO referem-se a radicais livres de oxigênio que possuem um ou dois elétrons desparelhados do átomo. As ERO possuem papel importante no surgimento e na progressão da ES uma vez que fatores como citocinas são capazes de aumentar a geração de ERO em diferentes regiões como células musculares lisas, cardíacas e fibroblastos de pulmão e pele. Devido ao

Endereço: Av. Professor Moraes Rego, 1235, Bloco C, 3º andar do prédio principal, Ala Norte, 1ª sala à esquerda do

Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.670-901

UF: PE **Município:** RECIFE

Telefone: (81)2128-3743

E-mail: cep.hcpe@ebserh.gov.br