



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

JÚLIA ROBERTA DA SILVA FERREIRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DOS
DERIVADOS TIAZOQUINOLÍNICOS NO CONTEXTO DA
ESCLEROSE SISTÊMICA**

Recife
2024

JÚLIA ROBERTA DA SILVA FERREIRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DOS
DERIVADOS TIAZOQUINOLÍNICOS NO CONTEXTO DA
ESCLEROSE SISTÊMICA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Pernambuco, como pré-requisito à obtenção de título de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Maira Galdino da Rocha Pitta

Coorientador: Dr. Anderson Rodrigues de Almeida

Recife
2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Silva Ferreira, Júlia Roberta da .

Avaliação da Atividade Imunomoduladora dos Derivados Tiazolquinolínicos
no Contexto da Esclerose Sistêmica / Júlia Roberta da Silva Ferreira. -
Recife, 2024.

70 : il., tab.

Orientador(a): Maira Galdino da Rocha Pitta

Coorientador(a): Anderson Rodrigues de Almeida

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de
Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Farmácia - Bacharelado, 2024.

Inclui referências, apêndices, anexos.

1. Esclerose Sistêmica. 2. Citocinas. 3. Citotoxicidade. I. Rocha Pitta,
Maira Galdino da . (Orientação). II. Almeida, Anderson Rodrigues de.
(Coorientação). IV. Título.

610 CDD (22.ed.)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CURSO DE BACHARELADO EM FARMÁCIA



Aprovada em: 10/10/2024.

BANCA EXAMINADORA

MAIRA GALDINO
DA ROCHA
PITTA:03997206422

Assinado de forma digital por
MAIRA GALDINO DA ROCHA
PITTA:03997206422
Dados: 2024.10.15 05:33:32
-03'00'

Prof. Dra. Maira Galdino da Rocha Pitta
(Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Documento assinado digitalmente
gov.br RICARDO BRANDAO
Data: 10/10/2024 09:20:18-0300
verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dr. Ricardo Brandão
(Presidente e Examinador)
Universidade Federal de Pernambuco

Documento assinado digitalmente
gov.br HELOISA ISABELA LEAO
Data: 14/10/2024 21:05:22-0300
verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Ma. Heloisa Isabela Leão
(Examinadora)
Núcleo de Inovação Terapêutica

Documento assinado digitalmente
gov.br MARIA EDUARDA DE OLIVEIRA GONCALVES
Data: 15/10/2024 13:12:05-0300
verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Ma. Maria Eduarda de Oliveira Gonçalves
(Suplente)
Núcleo de Inovação Terapêutica

Dedico este trabalho aos meus pais, minha irmã, minha sobrinha e a toda minha família que, com muito amor estiveram sempre ao meu lado e não mediram esforços para que essa etapa acontecesse em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus em primeiro lugar, por ser a minha fortaleza, meu amparo, a razão da minha existência, por trilhar caminhos e realizar os meus sonhos. Obrigada pela tua misericórdia e sempre me amar e dizer: Não tenhas medo, é o teu próprio Deus que diz. Agradeço pelo coração da doce Maria, Nossa Senhora da Imaculada Conceição sobre a intercessão dos meus sonhos e sempre ser o meu colo de mãe.

Aos meus pais, minha mãe Josefa Maria da Silva Ferreira, minha inspiração, exemplo de mulher, a que sempre me incentivou a estudar, estando ao meu lado e acalmando o meu coração. E meu pai, José Cícero Ferreira Filho, por todo apoio, amor e força depositadas em mim. Tudo que construí hoje foi por causa de vocês.

À minha irmã gêmea, Juliana Renata da Silva Ferreira, por todos ensinamentos, críticas e auxílio durante toda a minha trajetória de vida.

À minha mãe-avó Maria Luzia (*in memoriam*), que partiu antes da conclusão de uma das etapas da minha vida, sou grata por todas as vezes que colocou a minha graduação em suas orações e cada conquista minha também é da senhora. Eternas saudades.

Ao meu pai-avô Julião que do seu jeito e simplicidade sempre demonstrou apoio e torcida em tudo da minha vida.

À toda minha grande “Família Julião” por ter sido o meu alicerce em cada vitória de minha vida, sou muito abençoada de vocês fazerem parte de mim.

Aos meus grandes amigos que fiz durante a graduação, Danyele Karla e Gabriel Ferreira por todo carinho e apoio que fizeram com que essa trajetória se tornasse um pouco mais leve.

À minha orientadora Profa. Dra. Maira Pitta pelas oportunidades que contribuíram para a minha formação.

Ao meu co-orientador Dr. Anderson Rodrigues por me acompanhar e transmitir ensinamentos e direcionamentos.

A todos que compõem o LINAT/UFPE em especial a Maria Eduarda e Karen por me auxiliarem e compartilharem experiências durante a realização dos experimentos.

À Universidade Federal de Pernambuco e ao Departamento de Ciências Farmacêuticas por transmitirem conhecimentos, oportunidades e experiências que intensificaram a minha paixão pelo curso.

Por fim, a todas as pessoas que contribuíram nesta minha jornada acadêmica.

“Faça tudo com Amor, por Amor e para o Amor, esse é o segredo.”

- Santa Teresinha do Menino Jesus

RESUMO

A esclerose sistêmica (ES) é uma doença autoimune que afeta o tecido conjuntivo, sendo caracterizada pela soma de três eventos principais: alteração vascular, desregulação imunológica e a fibrose da pele e de vários órgãos internos. Atualmente no tratamento da ES, não há um agente modificador disponível que possa alterar o curso natural da doença. Agonistas do receptor por proliferador de peroxissoma-gama (PPAR γ) possuem uma atividade antiinflamatória e potencialmente antifibrótica. Os derivados tiazolídnicos (ZKDs), são obtidos através da hibridização das Tiazolidina-2,4-dionas (TZDs) e estudos relatam uma boa afinidade com o PPAR γ . Assim, o objetivo do trabalho foi avaliar a atividade imunomoduladora do ZKD-2 em células de pacientes com ES e o ZKD-2 e ZKD-4 em células esplênicas de camundongos. Foram incluídos no estudo 18 pacientes com ES e 8 camundongos da linhagem Balb/c. A partir do sangue coletado dos pacientes foi realizado o isolamento de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) e em seguida foi realizado o ensaio de citotoxicidade pelo MTT. Suspensões de células do baço de camundongos foram isoladas e também submetidas ao ensaio de citotoxicidade pelo MTT. Os sobrenadantes de cultura das PBMCs e células esplênicas foram recolhidos e utilizados para dosagem de citocinas por ELISA sanduíche. Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa GraphPad Prism, versão 8.0. O ZKD-2 em PBMC apresentou uma viabilidade similar ao grupo DMSO 0,1%. Em sobrenadante de PBMC tratado com ZKD-2 apresentou uma redução significativa nos níveis de IL-17A [p<0,0001] e IFN- γ [p<0,0313]. Observou-se em células esplênicas tratadas com ZKD-2 nas concentrações de 1 μ M e 10 μ M reduziu os níveis das citocinas IL-4 [p<0,0156 e p<0,0391], IL-6 [p<0,0156] e IL-13 [p<0,0313], respectivamente. Em paralelo, o ZKD-4 também reduziu significativamente os níveis das citocinas IL-6 nas concentrações 10 μ M e 100 μ M [p<0,0078] e IL-13 nas concentrações de 1 μ M e 10 μ M [p<0,0078], respectivamente. Portanto, com base nos resultados apresentados sugere-se que os ZKDs têm um potencial efeito imunomodulador.

Palavras-chave: ZKDs; Esclerose Sistêmica; Imunomodulação; Citocinas.

ABSTRACT

Systemic sclerosis (SSc) is an autoimmune disease that affects connective tissue and is characterized by the sum of three main events: vascular alteration, immunological dysregulation and fibrosis of the skin and various internal organs. Currently in the treatment of SSc, there is no modifying agent available that can alter the natural course of the disease. Peroxisome proliferator receptor-gamma (PPAR γ) agonists have anti-inflammatory and potentially anti-fibrotic activity. Thiazolidine derivatives (ZKDs) are obtained through the hybridization of Thiazolidine-2,4-diones (TZDs) and studies report a good affinity with PPAR γ . Thus, the objective of the work was to evaluate the immunomodulatory activity of ZKDs in cells from SSc patients and splenic cells from mice. 18 patients with SSc and 8 Balb/c mice were included in the study. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from the blood collected from patients and then the MTT cytotoxicity assay was performed. Mouse spleen cell suspensions were isolated and also subjected to MTT cytotoxicity assay. The culture supernatants of PBMCs and splenic cells were collected and used to measure cytokines by sandwich ELISA. All statistical analyzes were performed using the GraphPad Prism program, version 8.0. ZKD-2 in PBMC showed similar viability to the 0.1% DMSO group. Supernatant from PBMC treated with ZKD-2 showed a significant reduction in the levels of IL-17A [p<0.0001] and IFN- γ [p<0.0313]. It was observed in splenic cells treated with ZKD-2 at concentrations of 1 μ M and 10 μ M reduced levels of the cytokines IL-4 [p<0.0156 and p<0.0391], IL-6 [p<0.0156] and IL -13 [p<0.0313], respectively. In parallel, ZKD-4 also significantly reduced the levels of the cytokines IL-6 at concentrations of 10 μ M and 100 μ M [p<0.0078] and IL-13 at concentrations of 1 μ M and 10 μ M [p<0.0078], respectively. Therefore, based on the results presented, it is suggested that ZKDs have immunomodulatory activity.

Keywords: ZKDs; Systemic Sclerosis; Immunomodulation; Cytokines.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Processo da fisiopatogênese da esclerose sistêmica	26
Figura 2 - Manifestações clínicas em pacientes com ES.....	28
Figura 3 - Desenho esquemático do delineamento do estudo	34
Figura 4 - Avaliação da atividade imunomoduladora em cultura de PBMC de pacientes com ES com o derivado tiazquinolínico ZKD-2 (níveis das citocinas IL-17 A e IFN- γ)	41
Figura 5 - Avaliação da atividade imunomoduladora em cultura de células esplênicas de camundongos com o derivado tiazquinolínico ZKD-2 (níveis das citocinas IL-4, IL-6 e IL-13)	42
Figura 6 - Avaliação da atividade imunomoduladora em cultura de células esplênicas de camundongos com o derivado tiazquinolínico ZKD-4 (níveis das citocinas IL-4, IL-6 e IL-13)	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Citocinas avaliadas pela técnica de ELISA, fabricante e limite de detecção.....37

Tabela 2 - Características clínicas de pacientes com Esclerose Sistêmica do estudo (n=18)..39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS	Ácido Acetil Salicílico
ACR	Colégio Americano de Reumatologia
AINE	Anti-inflamatório não esteroide
ANA	Anticorpo Antinuclear
anti-CENP	Anticorpo anti-centrômero
anti-RNAP	Anti-RNA polimerase
anti-Scl70	Anticorpo anti-topoisomera I
BCC	Bloqueadores de Canais de Cálcio
BRA	Bloqueadores do Receptor de Angiotensina II
CE	Células Endoteliais
ConA	Concanavalina A
CTGF	Crescimento do Tecido Conectivo
DAMPs	Padrões Moleculares Associados ao Dano
DCs	Células Dendríticas
DPI	Doença Pulmonar Intersticial
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
ES	Esclerose Sistêmica

ESdc	Esclerose Sistêmica cutânea difusa
ESlc	Esclerose Sistêmica cutânea limitada
ET-1	Endotelina
EULAR	Liga Europeia Contra o Reumatismo
FR γ	Fenômeno de Raynaud
GC	Glicocorticoides
HAP	Hipertensão Arterial Pulmonar
HLAs	Antígenos Leucocitários Humanos
IBP	Inibidor da Bomba de Prótons
ICAM-1	Adesão Intercelular-1
IECA	Inibidores da enzima conversora de angiotensina
IFN- γ	Interferon Gama
IL	Interleucinas
LINAT	Núcleo de Pesquisa e Inovação Terapêutica
MEC	Matriz Extracelular
MHC	Complexo Histopatológico Principal
NO	Óxido Nítrico
PBMC	Células Mononucleares de Sangue Periférico

PHA	Fitohemaglutinina
PPAR γ	Receptores ativados por proliferadores de peroxissomos
PPRE	Elemento de Resposta Proliferativa do Peroxissomo
RXR	Receptor Retinóide X
SRC	Esclerodermia
TC	Tomografia Computadorizada
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TCZ	Tocilizumabe
TGF- β	Fator de Crescimento Beta (Do inglês <i>transforming growth factor beta</i>)
TGI	Trato Gastrointestinal
Th	Linfócitos T helper
TZDs	Tiazolidina-2,4dionas
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
VCAM	Proteína de Adesão Celular Vascular
ZKDs	Derivados Tiazoquinolínicos
α -SMA	Alfa-Actina do Músculo Liso

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo Geral	18
2.1 Objetivos Específicos	18
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1 Esclerose Sistêmica	19
3.1.1 Epidemiologia.....	19
3.1.2 Etiopatogenia.....	20
3.1.3 Fisiopatologia.....	21
3.1.4 Manifestações Clínicas.....	26
3.1.5 Diagnóstico	29
3.1.6 Tratamento Farmacológico	29
3.1.7 Derivados Tiazoquinolínicos	31
3.1.8 Receptores PPAR γ como alvos terapêuticos	31
4 METODOLOGIA	33
4.1 Tipo de Estudo	33
4.2 Delineamento do Estudo	33
4.3 Derivados Tiazoquinolínicos	33
4.4 Local e período do estudo	34
4.5 População de Estudo	34
4.5.1 Pacientes com Esclerose Sistêmica	34
4.5.2 Coleta de Sangue e Isolamento de PBMC.....	34
4.5.3 Cultivo de esplenócitos	35
4.6 Ensaio de Citotoxicidade	35
4.7 Dosagem de Citocinas	36
4.8 Análise dos Resultados	36
4.9 Aspectos Éticos	37
5 RESULTADOS	38
5.1 Determinação do perfil clínico dos pacientes com Esclerose Sistêmica	38
5.2 Avaliação de atividade citotóxica em PBMCs e cultivo de esplenócitos	39
5.3 Avaliação de atividade imunomoduladora do ZKD-2 em PBMC de pacientes com ES	39

5.4 Atividade imunomoduladora do ZKD-2 e ZKD-4 em cultivo de esplenócitos....	40
6 DISCUSSÃO	44
7 CONCLUSÃO	46
8 PERSPECTIVAS	47
REFERÊNCIAS	48
APÊNDICES	57
ANEXOS	64

1 INTRODUÇÃO

A esclerose sistêmica (ES) é uma doença autoimune complexa do tecido conjuntivo que carrega uma carga significativa de morbidade relacionada à doença, incluindo complicações potencialmente fatais. A fisiopatogênese da ES é composta pela soma de três eventos principais, sendo eles, anormalidades vasculares, a desregulação imunológica e a fibrose da pele e de vários órgãos internos, como pulmões, coração, rins e o trato gastrointestinal. A soma desses eventos resulta na heterogeneidade da expressão fenotípica da doença (Cavazzana *et al.*, 2023; Chrabaszcz *et al.*, 2020; Hughes; Herrick, 2019; Kumar *et al.*, 2017; Zimmermann; Pizzichini, 2013).

A característica mais proeminente da ES é o processo de fibrose progressiva resultante da deposição excessiva de componentes da matriz extracelular em diferentes tecidos e órgãos (Sobolewski *et al.*, 2019).

Pacientes com ES são classificados em dois subconjuntos clínicos diferentes, de acordo com a extensão do envolvimento da pele, são geralmente reconhecidos: ES cutânea difusa (ESdc), na qual o dano da pele se estende proximalmente aos cotovelos e/ou joelhos ou ao tórax e/ou abdômen em qualquer momento durante o curso da doença, e ES cutânea limitada (ESlc), na qual o dano da pele permanece distal aos cotovelos e joelhos sem envolvimento do tórax ou abdômen (Benfaremo *et al.*, 2022).

Embora a patogênese da ES ainda permaneça desconhecida, várias anormalidades imunológicas foram relatadas em pacientes com ES, indicando a natureza autoimune da doença. Em particular, a ativação e a polarização de células T foram extensivamente estudadas tanto em pacientes quanto em modelos animais de ES (Kuzumi *et al.*, 2021). Assim, uma intrincada rede de sinais para células e respostas por células constitui a rede inflamatória que na ES se estende muito além dos componentes "clássicos" do sistema imunológico (Truchetet *et al.*, 2023).

A ES destaca-se um perfil inflamatório, caracterizado por aumento da secreção de citocinas pró-inflamatórias, em conjunto com ação de algumas citocinas específicas, dará origem a novas linhagens, conhecidas como T *helper* (Th): Th1, Th2, Th17 (Cardoneanu *et al.*, 2022; Khana *et al.*, 2022; Lubberts, 2010). Citocinas como IL4, IL-13, IL-6, IL-17A colaboraram para o estado de retroalimentação da fibrose patológica (Henderson; Rieder; Wynn, 2020; Wilson *et al.*, 2010).

O tratamento da ES pode ser desafiador devido à sua raridade e manifestações heterogêneas da doença. Antes de iniciar a terapia, uma avaliação pré-tratamento é necessária

para identificar o envolvimento ativo de órgãos e estratificar o risco dos pacientes, a terapia deve ser implementada para atingir complicações específicas de órgãos ativos da doença (Bukiri; Volkmann, 2022).

O receptor ativado por proliferador de peroxissoma-gama (PPAR γ) é um receptor nuclear conhecido por modular a inflamação, ou seja, agonistas de PPAR γ demonstraram inibir a secreção de citocinas pró-inflamatórias e direcionar a diferenciação de células imunes para fenótipos anti-inflamatórios (Avouac *et al.*, 2017; Ferrari *et al.*, 2015).

Nessa perspectiva, sugere-se a possibilidade dos derivados tiazouínicos (ZKDs) agonistas do PPAR γ de apresentar um papel imunomodulador na ES. Este trabalho visa investigar a atividade imunomoduladora das ZKDs em células de pacientes com ES e em esplenócitos de camundongos e os efeitos dessas moléculas envolvidas na atividade das respostas das células no sobrenadante do cultivo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade imunomoduladora dos derivados tiazóquinolínicos ZKD-2 e ZKD-4 como potenciais moléculas no tratamento para esclerose sistêmica.

2.1 Objetivos Específicos

- Avaliar a atividade imunomoduladora *ex vivo* do derivado tiazóquinolínico ZKD-2 em PBMCs de pacientes com esclerose sistêmica na produção das citocinas IL-17A e IFN- γ ;
- Avaliar a atividade imunomoduladora dos derivados tiazóquinolínicos ZKD-2 e ZKD-4 no cultivo de esplenócitos de camundongos na produção das citocinas IL-4, IL-6 e IL-13 envolvidas na patogênese da ES;
- Avaliar a citotoxicidade do ZKD-2 e ZKD-4.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Esclerose Sistêmica

A esclerose sistêmica (ES), também conhecida como esclerodermia, é uma doença reumática imunomediada que afeta o tecido conjuntivo e órgãos vitais, como pulmões, coração, rins e o trato gastrointestinal (TGI) (Cavazzana *et al.*, 2023; Zuo *et al.*, 2017). Existem duas apresentações clínicas da ES: limitada e difusa. Essas duas formas podem ser distinguidas por variações no grau de envolvimento da pele, associação com autoanticorpos específicos e padrão de envolvimento de órgãos (Patnaik *et al.*, 2023). 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.

As manifestações em órgãos internos envolve a fibrose pulmonar, dano cardíaco que está presente em mais de 50% dos pacientes com ES, crise renal esclerodérmica (SRC), incluem hipertensão, edema e anormalidades eletrolíticas, envolvimento gastrointestinal que está associado a altas taxas de morbidade e mortalidade (Battista *et al.*, 2023, Ren *et al.*, 2023). O fenômeno de Raynaud é uma das manifestações mais precoces e frequentes da ES, afetando até 95% dos pacientes e refluxo gastroesofágico está presente entre 50-80% dos pacientes (Lepri *et al.*, 2022, Patnaik *et al.*, 2023).

A ES é uma doença rara, o quadro clínico da doença avançada é altamente característico e de fácil diagnóstico. No entanto, os pacientes com uma fase inicial da doença são frequentemente ignorados, pelo que a doença pode ser consideravelmente mais frequente (Rosendahl *et al.*, 2022). A identificação de autoanticorpos é importante, pois na ES eles podem ser usados para diagnosticar, classificar a doença e definir prognóstico do paciente (Denton; Khanna, 2017, Fiorentino; Rosen, 2022). O Anticorpo Antinuclear (ANA), quando medido por imunofluorescência direta, é positivo em mais de 90% dos casos de ES e os autoanticorpos mais específicos, como anticentrômero, anti-SCL70 e anti-RNA polimerase III, podem ser também detectados (Mehra *et al.*, 2013, Benfaremo *et al.*, 2020, Adigun *et al.*, 2022).

3.1.1 Epidemiologia

A incidência e prevalência da ES variam significativamente em todo o mundo, com taxas mais altas encontradas em populações específicas, como aquelas de ascendência sul-europeia, norte-americana e australiana. A esclerose sistêmica afeta principalmente mulheres, com uma proporção de mulheres para homens de cerca de 3:1. A idade média do diagnóstico é de 33,5 a 59,8 anos. A incidência anual de ES nos EUA e na Europa é estimada entre 7,2 e 33,9 e 13,5–44,3 por 100.000 indivíduos, respectivamente, e a prevalência variou de 3,1 a 144,5 por 100.000 indivíduos. A ES é uma doença com poucos estudos epidemiológicos, o que se deve à grande variabilidade na prevalência e incidência (Jerjen *et al.*, 2022, Lazzaroni *et al.*, 2023, Scheen *et al.*, 2023). Esta patologia tem uma maior mortalidade entre as doenças reumatológicas, devido à fibrose cutânea e ao acometimento nos pulmões, identificados através da doença pulmonar intersticial ou ainda das complicações decorrentes desta (Coi *et al.*, 2021).

No Brasil, um estudo realizado em Campo Grande, capital do estado de Mato Grosso do Sul, relatou taxas de incidência de 11,9 por milhão de habitantes e uma prevalência de 105,6 por milhão de habitantes, resultados inferiores aos observados em países da América e da Europa (Horimoto *et al.*, 2017, Ingegnoli; Ughi; Mihai, 2018).

Em um estudo realizado com 111 pacientes com ES no estado de Pernambuco por Ferreira *et al.*, (2022) e colaboradores no ambulatório de reumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC/UFPE), foi observado uma proporção maior de mulheres com média de idade de 49 anos, como manifestação clínica predominante o fenômeno de Raynaud presente em mais de 83% nos pacientes. A maioria apresentava a forma cutânea limitada (ESlc) com 60,36% e a forma cutânea difusa (ESdc) com 39,63%.

3.1.2 Etiopatogenia

Embora não esteja determinado qual é o principal gatilho para o desenvolvimento da ES, acredita-se que a doença seja resultado de fatores ambientais e predisposição genética. A história familiar desempenha um papel no desenvolvimento da ES e pode amplificar o risco de desenvolver a doença em um indivíduo (Patnaik *et al.*, 2023). A autoimunidade sistêmica é favorecida por uma base genética na qual genes e polimorfismos genéticos associados ao complexo histopatológico principal (MHC) ou antígenos leucocitários humanos (HLAs) são de grande importância, os antígenos leucocitários humanos (HLA) de classe I e II, situada no

cromossomo 6 – revelaram grande impacto na susceptibilidade à ES, sendo o HLA de classe II o mais associado com ES (Murdaca *et al.*, 2016; Salazar, 2015; Truchetet *et al.*, 2023).

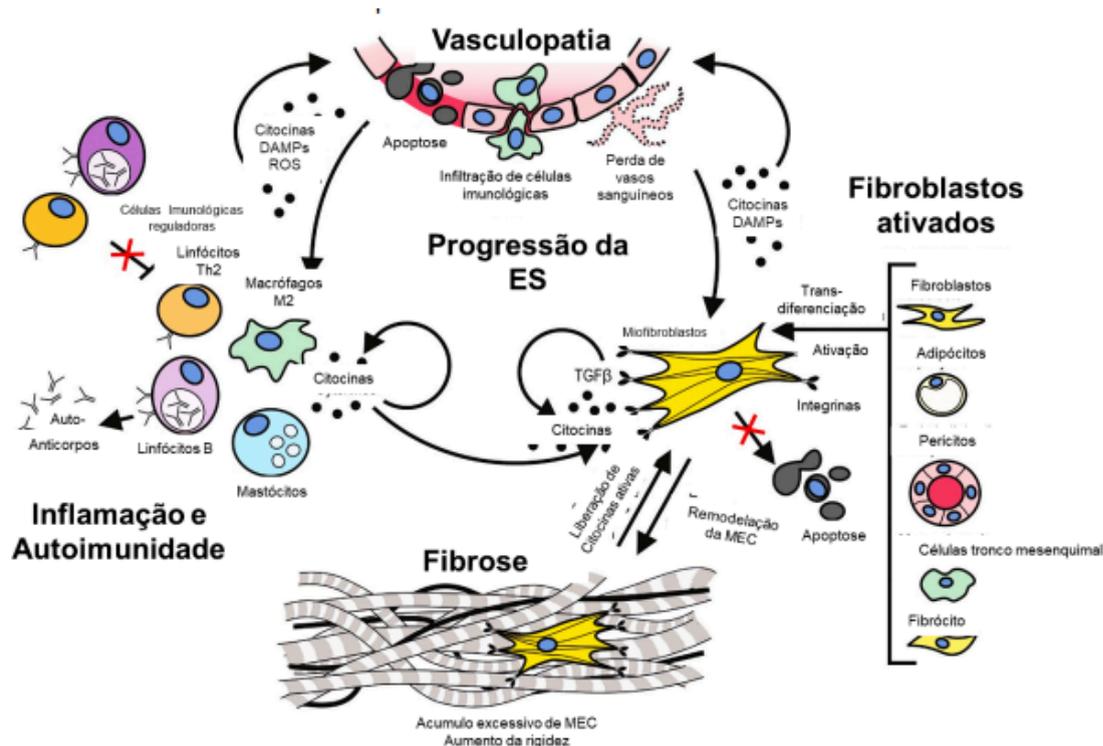
Os agentes infecciosos podem participar na quebra da tolerância das células T e B por mimetismo molecular e pela ativação simultânea de respostas inatas. Estão incluídos também os fatores ambientais ocupacionais (sílica, solventes orgânicos) e não ocupacionais / não infecciosos (drogas, pesticidas, silicones, metais pesados) (Adigun *et al.*, 2022, Truchetet *et al.*, 2023).

3.1.3 Fisiopatologia

A patogênese da ES inclui uma tríade de manifestação, como a ativação imunológica, vasculopatia com ativação de fibroblastos e fibrose como efeito final desses processos levando à deposição excessiva de colágeno e componentes de matriz em vasos e vários órgãos, incluindo a pele (Lazzaroni *et al.*, 2023, Patnaik *et al.*, 2023, Truchetet *et al.*, 2023).

A desregulação imunológica e a inflamação desempenham um papel crucial na patogênese da ES, com desregulação do sistema imunológico inato e adaptativo (Adigun *et al.*, 2022). Macrófagos, monócitos e células dendríticas ativados promovem ainda mais lesão vascular e fibrose, ativando células T e células B e produzindo citocinas pró-fibróticas e pró-inflamatórias, que contribuem para a ativação de fibroblastos e miofibroblasto. As células B ativadas produzem autoanticorpos considerados diretamente patológicos, além de servirem como marcadores que auxiliam no diagnóstico (Figura 1) (Adigun *et al.*, 2022; Kumar; Connors; Faber, 2018, Maehara *et al.*, 2020).

Figura 1: Processo da fisiopatogênese da esclerose sistêmica.



(MEC = matriz extracelular; Th2 = Linfócitos T helper ativado do tipo 2, M2 = Macrófagos de perfil M2, ROS = espécies reativas de oxigênio; TGF-β = fator do crescimento beta; DAMPs = padrões moleculares associados a danos.

Fonte: Modificado de Rosendahl (2022)

As células B que, uma vez ativadas, liberam citocinas pró-fibróticas, promovem a diferenciação pró-fibrótica de Th2 e produzem autoanticorpos. Vários autoanticorpos foram reconhecidos por seu valor no diagnóstico de ES, classificação de subconjuntos clínicos e para prever o envolvimento de órgãos. Vale salientar que a maioria dos anticorpos se liga diretamente a antígenos nucleares, são os anticorpos antinucleares (ANA). Os principais ANA associados com a ES, que são específicos ao diagnóstico, são anti-Scl70 (associado à ES cutânea difusa, fibrose grave e doença pulmonar intersticial), anti-CENP (comumente associado à ES cutânea limitada), anti-RNAP I e III (associado à crise renal de esclerodermia) e o antifibrilarina, e esses quatro diferentes autoanticorpos representam até 80% dos ANA detectados na ES (Benfaremo *et al.*, 2020; Mehra *et al.*, 2013).

Um estudo realizado por Maehara *et al.*, (2020) demonstrou que tanto as células TCD4+ quanto as TCD8+ se acumulam em biópsias de pele de pacientes não tratados com ESdc (Esclerose Sistêmica cutânea difusa), na maioria dos pacientes os linfócitos TCD4+ estão em maior quantidade que se infiltram na pele. Desempenham um papel fundamental na patogênese da ES precoce que pode levar à apoptose endotelial, à produção de autoanticorpos e ao eventual início da fibrose. A interação de células apresentadoras de antígenos com os as

células TCD4⁺ e a liberação de algumas citocinas específicas, irá resultar em novas linhagens conhecidas como T *helper* (Th): Th1, Th2, h17 (Lubberts., 2010, Khana *et al.*,2022).

Pacientes com ES apresentam um desequilíbrio nas citocinas Th1/Th2 com perfil predominante Th2. As células Th1 secretam IFN- γ , TNF- α e IL-2, a maioria dos estudos concluídos sugere que a resposta Th1 pode desempenhar um papel na fase inicial da doença (inflamação), seguida pela resposta Th2 com fibrose ocasionando a síntese de colágeno e transdiferenciação de fibroblastos em miofibroblastos (Adigun *et al.*, 2022; Przemyslaw; Kotyla, 2019).

As células Th17 estão relacionadas com a promoção da inflamação, a diferenciação inicial das células Th17 é induzida pela combinação de IL-6 e TGF- β . Estes linfócitos secretam IL-17A que induz a produção de outras citocinas pró-inflamatórias como (TNF)- α , (IFN)- γ e IL-6, intensificando a resposta imunológica (Baeten *et al.*, 2013, Chizzolini; Boin, 2015). As células Th17 são um importante componente inflamatório cuja principal função fisiológica é induzir a defesa do hospedeiro contra patógenos infecciosos e são promotores positivos de doenças autoimunes. Uma função marcante da IL-17A é a indução de quimiocinas, que atraem células mielóides, como neutrófilos, para o tecido infectado ou lesionado (Chizzolini *et al.*, 2018, McGeachy *et al.*, 2019, Song *et al.*, 2023). Na ES, os níveis séricos de IL-17A e IFN- γ estavam significativamente aumentados e mostraram estreita associação com a atividade da doença (Xing *et al.* , 2020). Entretanto, a IL-17A apresenta um efeito sobre a disfunção vascular da ES através da microangiopatia. O espessamento vascular (através da deposição de colágeno nas pequenas paredes arteriais e arteríolas) e a disfunção endotelial são característicos de pacientes com ES. A IL-17A exibe um efeito complexo sobre as células do músculo liso vascular (Balanescu *et al.*, 2017). De maneira geral, postula-se um desequilíbrio na produção de citocinas por esses subconjuntos de células, induzindo a inflamação nos estágios iniciais da doença (Th1 e Th17 predominante) e fibrose nos estágios mais avançados (Th2 predominante) (Baraut *et al.*, 2010).

Além disso, as células T CD4⁺ ativadas na ES são predominantemente diferenciadas para o perfil Th2, que está implicado na fibrose do tecido. De fato, as principais citocinas Th2, como a interleucina IL-4 e a IL-13, são superexpressas na pele e no soro de pacientes com ES. Citocinas como a IL-4 e a IL-13 participam diretamente na produção de colágeno em fibroblastos. Além disso, a IL-4 impulsiona a diferenciação de células T CD4⁺ ingênuas em células Th2 secretoras de IL-4, perpetuando assim as respostas Th2 e pró-fibróticas (Kuzumi *et al.*, 2021). Tanto a IL-4 quanto a IL-13 podem estar envolvidas em vários níveis do processo fibrótico, uma vez que ativam os fibroblastos que se diferenciam em miofibroblastos

e estimulam a produção e a deposição da matriz extracelular, participando da fibrose da pele e de órgãos internos (Huang *et al.*, 2015).

A IL-6 tem um papel particular na patogênese da ES, tanto no dano vascular quanto no desenvolvimento de fibrose (Cardoneanu *et al.*, 2022). A IL-6, é super expressa em pacientes com ES, contribui para o desenvolvimento da ES ao estimular a diferenciação Th2, bem como promover a produção de colágeno em fibroblastos (Kuzumi *et al.*, 2021).

Os mecanismos imunológicos inatos, incluindo os IFNs, são importantes na ES, é produzido principalmente por células T CD4⁺ Th1 efectoras, células T CD8⁺ citotóxicas e células NK e, em menor extensão, por outros tipos de células, como células dendríticas (DCs), macrófagos e células B. IFN- γ é uma importante citocina pró-inflamatória que regula as funções de várias células importantes do sistema imunológico, incluindo células B e células T, pode promover a diferenciação de células T CD4⁺ ingênuas em células Th1 e Th17 inflamatórias, enquanto inibe sua diferenciação em células Treg e células Th2. O IFN- γ desempenha um papel importante na troca de classe de anticorpos. O IFN- γ é capaz de promover a troca de classe de IgG de células B para autoanticorpos mais patogênicos (Khana *et al.*, 2022; Liu; Zhang; Wang, 2022).

A lesão vascular e lesões repetitivas de células endoteliais, quando ativadas e danificadas libera padrões moleculares associados a danos (DAMPs), que mantêm a inflamação e a autoimunidade, possivelmente devido a ataques autoimunes desencadeados por fatores ambientais, é o principal evento de uma cascata patológica comum (Cardoneanu *et al.*, 2022; Khanna *et al.*, 2020, Lazzaroni *et al.*, 2023).

A vasculopatia na ES, afeta principalmente a microcirculação, mas também a macrocirculação. A disfunção e os danos às células endoteliais (CE) são considerados pilares da vasculopatia na ES (Truchetet *et al.*, 2023). Agentes infecciosos, células T citotóxicas, autoanticorpos contra as células endoteliais e radicais livres relacionados ao óxido nítrico (NO) foram citados para o dano às células endoteliais (Patanaik *et al.*, 2023).

A desregulação do tônus vascular, levando ao vasoespasmo e ao comprometimento do fluxo sanguíneo, é o mecanismo subjacente da disfunção vascular. Essa desregulação do tônus vascular resulta dos desequilíbrios dos mediadores vasodilatadores, o desequilíbrio entre agentes vasodilatadores e vasoconstritores com produção reduzida de NO e produção aumentada de endotelina-1 (ET-1) pode levar à isquemia (Patanaik *et al.*, 2023; Truchetet *et al.*, 2023). Um comprometimento da liberação de NO também contribui para a patogênese da ES, aumentando a agregação plaquetária, a proliferação de células musculares lisas vasculares e a liberação de TGF- β (Colletti *et al.*, 2019). ET-1 é um polipeptídeo de 21 aminoácidos

expresso principalmente por células endoteliais, mas também foi encontrado expresso por células epiteliais, macrófagos e fibroblastos. Ele atua localmente, ligando-se à superfície das células musculares lisas e atua no próprio endotélio vascular de maneira autócrina. Foi descoberto que os níveis de ET-1 estão aumentados no soro de pacientes com FRy e ES (Arefiev *et al.*, 2011). A transição para eventos inflamatórios ocorre então com abertura de junções CE estreitas, vazamento de fluido no espaço extravascular e expressão aumentada de moléculas de adesão, como a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1), proteína de adesão de célula vascular 1 (VCAM-1) e E-selectina, tudo favorecendo o recrutamento de células mononucleares (Segura; Ferraz-Amaro, 2015, Truchetet *et al.*, 2023).

O terceiro mecanismo é a fibrose um termo patológico que descreve o acúmulo excessivo de matriz extracelular, como colágeno, elastina, glicosaminoglicano e fibronectina, além de enzimas que resulta em produções cruzadas do colágeno, como consequência um tecido rígido. Este processo normalmente resulta de lesão tecidual seguida de reparo desregulado e excessivamente exuberante. A substituição de células funcionais e a indução de arquitetura tecidual desordenada induzida por “cicatrices” ricas em colágeno normalmente comprometem a função dos órgãos (Allanore *et al.*, 2015; Mattoo; Pillai, 2021; Zimmermann; Pizzichini, 2013).

As citocinas pró fibrogênicas produzidas pelos fibroblastos como a IL-6 desempenha um papel importante no desenvolvimento de alterações fibróticas ao mediar a transformação de fibroblastos em miofibroblastos, com estes últimos produzindo uma quantidade excessiva de colágeno que se infiltra em vários órgãos e tecidos, incluindo o coração. Durante a cicatrização de feridas ou reparo tecidual, esses miofibroblastos funcionam como células profissionais de reparo ou formação de cicatrizes (Figura 1). Os miofibroblastos são geralmente considerados células plásticas que possuem fibras de estresse positivas de alfa-actina do músculo liso (α -SMA) e propriedades contráteis que auxiliam no fechamento da ferida. Eles secretam mediadores pró-fibróticos, como TGF β , e componentes da MEC, como colágenos, elastina, glicoproteínas e proteoglicanos. Os miofibroblastos há muito são considerados os principais culpados da fibrose da ES. A presença de miofibroblastos em tecido normal é rara, em contraste, o número de miofibroblastos na ES está aumentado devido à diminuição da apoptose e ao aumento da transdiferenciação (Cardoneanu *et al.*, 2022, Rosendahl *et al.*, 2022; Zimmermann; Pizzichini, 2013).

As principais proteínas efetoras envolvidas nos mecanismos de fibrose na ES são citocinas, quimiocinas e a família dos fatores de crescimento da MEC. O TGF- β é um importante regulador da fibrogênese fisiológica para a cicatrização de lesões e reparo tecidual,

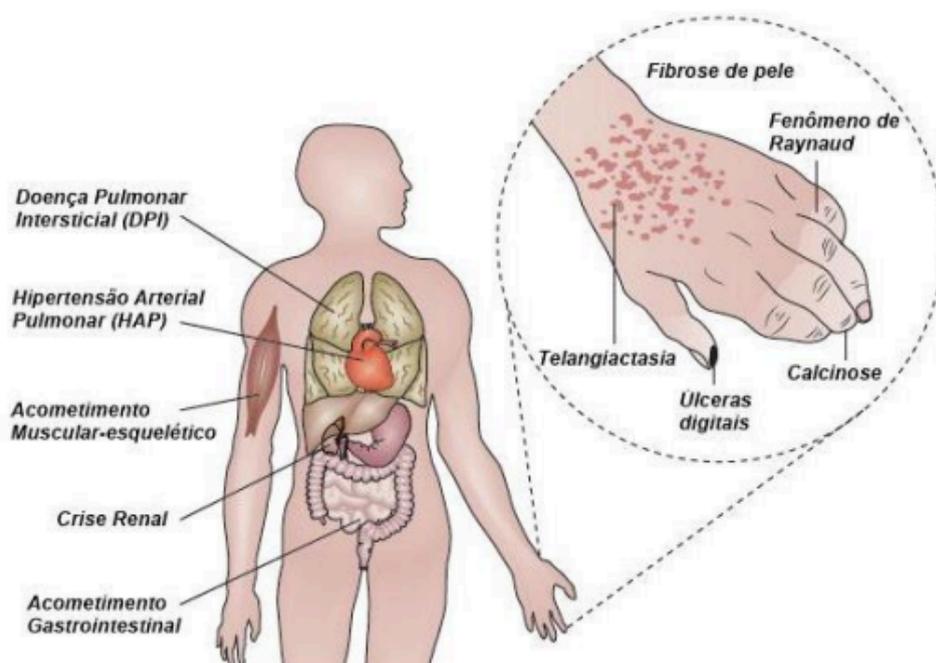
é o principal fator de crescimento que induz a transdiferenciação de outras células em miofibroblastos e, como resultado, expressão de genes como colágeno tipo I, fator de crescimento do tecido conectivo (CTGF) e outros. O TGF- β é secretado por diferentes células do sistema imunológico e induz a resposta profibrótica ativando diferentes vias, exemplo SMAD, a via SMAD é considerada o principal sinal que é desregulado nos fibroblastos da ES e contribui para o início e desenvolvimento da resposta fibrótica patológica. (Collett *et al.*, 2019; Leask, 2010, Rosendahl *et al.*, 2022; Zimmermann; Pizzichini, 2015).

3.1.4 Manifestações Clínicas

A ES é uma doença multissistêmica, com variação significativa na apresentação clínica entre os indivíduos afetados (Adigun *et al.*, 2022). Os dois subgrupos clínicos diferentes, a ES cutânea difusa (ESdc) e a cutânea limitada (ESlc), podem apresentar as mesmas manifestações, mas diferem em relação à frequência ou à região do corpo acometida. A ESdc, na qual o dano cutâneo se estende proximalmente aos cotovelos e/ou joelhos e pode envolver áreas do tronco, também apresentam envolvimento vascular, como o fenômeno de raynaud (FRy) (Figura 2) que costuma preceder as outras manifestações da doença de meses a anos, frequentemente associado a úlceras digitais e ESlc, na qual o dano cutâneo permanece restrito às mãos, face e pés, sem envolvimento do tórax ou abdômen, associado a evolução mais lenta, com problemas pulmonares, presença do anticorpo centrômero e manifestações denominadas como CREST (calcinose, Fry, doença esofágica, esclerodactilia (Benfaremo *et al.*, 2022; Gumkowska-Sroka *et al.*, 2023; Zuo *et al.*, 2017).

As manifestações baseadas em múltiplos órgãos são uma marca registrada da ES e são importantes no diagnóstico e classificação da doença. Nos casos de doença difusa, a rigidez da pele e a coceira são características iniciais. Alguns pacientes apresentam dor musculoesquelética que pode mimetizar doença inflamatória articular (Denton; Khanna, 2017). A ES afeta o tecido conjuntivo e órgãos vitais, como pulmões, coração, rins e o trato gastrointestinal. Ocasionalmente, outros sintomas sensoriais regionais estão presentes, como neuralgia. Podem ser relatados inchaço dos membros inferiores e fraqueza ou fadiga muscular, especialmente na esclerose sistêmica cutânea difusa em estágio inicial. A perda de peso, frequentemente associada à redução do apetite ou da ingestão de alimentos, e a falta de ar por esforço são sintomas comuns (Cavazzana *et al.*, 2023; Denton; Khanna, 2017; Silvia *et al.*, 2014, Zuo *et al.*, 2017).

Figura 2 - Manifestações clínicas em pacientes com ES



Fonte: Modificado de Allanore (2015)

O fenômeno de Raynaud (FRy) é uma característica precoce da ES e é observado em mais de 95% dos pacientes (Adigun *et al.*, 2022). O FRy é resultado dos mecanismos vasoconstritores desencadeados por baixas temperaturas e/ou estresse, sendo observado nas mãos e pés com aparência pálida, seguida por cianose e eritema (Allanore *et al.*, 2015, Denton; Khanna, 2017; Flavaham *et al.*, 2003). A série estereotipada de alterações de cor que ocorre durante um episódio do FRy é uma cor branca ou palidez inicial (causada por vasoconstrição ou oclusão de arteríolas pré capilares) seguida de azul ou roxo (indicando cianose da desoxigenação do sangue sequestrado) e, finalmente, vermelho (causado por pós-isquêmico hiperemia) (Hughes *et al.*, 2020).

O envolvimento da pele é a característica mais evidente da ES e está presente em quase todos os pacientes com ES em graus e gravidade variados (Adigun *et al.*, 2022). Incluindo alterações distais e proximais, edema proeminente com rigidez da pele, artropatia e prurido generalizado, são características principais (Abraham; Lescoat; Stratton, 2024). O envolvimento da pele começa distalmente, geralmente afetando primeiro os dedos, que muitas vezes ficam inchados e doloridos (Herrick; Assassi; Denton, 2022). Telangiectasias, atribuídas à dilatação capilar, são uma característica comum da ES e são frequentemente observadas nas mãos, rosto, superfícies mucosas e, ocasionalmente, no tronco (Figura 2). O envolvimento facial se manifesta com o afilamento do nariz e lábios. A calcinose surge de depósitos

localizados de hidroxapatita de cálcio no tecido subcutâneo, pode causar ulceração da pele e infecção secundária (Figura 2) (Adigun *et al.*, 2022). A partir disso, foi desenvolvido escore de Rodnan que visa a avaliação em 17 áreas da espessura da pele, que atribui escores que variam de 0 a 3, com 0 indicando áreas não envolvidas e 3 indicando espessamento severo da pele (Adigun *et al.*, 2022; Flavahan *et al.*, 2003; Sampaio-Barros, 2013).

A doença pulmonar é a principal causa de mortalidade em pacientes com ES, está presente em 80% dos pacientes com ES. A doença pulmonar é uma complicação precoce, com a maioria dos pacientes desenvolvendo doença pulmonar restritiva grave nos primeiros 5 anos após o início dos sintomas, as complicações resultantes da doença pulmonar intersticial (DPI) são mais comuns no subgrupo ESdc e avaliadas através da tomografia computadorizada (TC) e do teste de função pulmonar. O curso da DPI associada à ES (DPI-ES) é altamente variável; alguns pacientes apresentam envolvimento pulmonar limitado ou estável, enquanto em outros a doença pulmonar progride inexoravelmente. Ao contrário do envolvimento de outros órgãos internos, que geralmente é mais comum e grave no subgrupo difuso. A doença pulmonar na ES pode variar desde doença clinicamente assintomática até insuficiência respiratória progressiva com morbidade grave (Adigun *et al.*, 2022; Allamore *et al.*, 2015, Denton; Khanna, 2017, Khanna *et al.*, 2020).

A maioria dos pacientes com ES apresentará envolvimento gastrointestinal ao longo da doença (Volkman; McMahan, 2022). Os sintomas podem ser leves a graves e qualquer segmento do trato gastrointestinal pode estar envolvido (Adigun *et al.*, 2022). As complicações gastrointestinais na esclerodermia difusa ou limitada impactam negativamente o funcionamento dos órgãos viscerais. Essas manifestações emanam do impacto da fibrose do trato gastrointestinal (GI), dano vascular e processos inflamatórios. Os sintomas da esclerodermia geralmente incluem dismotilidade do esôfago, azia, disfagia, náusea, vômito, diarreia e constipação (Nassar *et al.*, 2022).

O envolvimento cardíaco está presente em mais de 50% dos pacientes com ES, as manifestações cardíacas incluem pericardite, derrame pericárdico, cardiomiopatia dilatada e arritmias. A disfunção diastólica do ventrículo esquerdo pode ocorrer secundária à HAP. O envolvimento cardíaco está associado a um mau prognóstico (Adigun *et al.*, 2022, Hao *et al.*, 2023).

Sintomas musculoesqueléticos são observados em quase todos os pacientes com ES. Artralgia e mialgia estão comumente presentes. Nos casos mais graves, há perda progressiva da força motora, diminuindo ainda mais a qualidade de vida dos pacientes (Adigun *et al.*, 2022; Morrisroe, Nikpour; Proudman, 2015).

O envolvimento renal ocorre em uma proporção significativa de pacientes com esclerose sistêmica, até 50%, e está associado ao aumento da mortalidade. A crise renal da esclerodermia (SRC) é a complicação renal mais estudada e temida associada à esclerose sistêmica. Com o advento dos inibidores da ECA, a mortalidade relacionada ao SRC diminuiu significativamente e as mortes dos pacientes são agora atribuídas mais à fibrose pulmonar e à hipertensão arterial pulmonar (Marc *et al.*, 2023).

3.1.5 Diagnóstico

O diagnóstico da ES é um diagnóstico clínico que evoluiu significativamente nos últimos anos, impulsionado pelos avanços nos marcadores sorológicos e nas técnicas de imagem. O perfil de autoanticorpos, especialmente anticorpos antinucleares (ANA) e autoanticorpos específicos associados à esclerodermia, auxilia na identificação de subconjuntos de esclerodermia e na previsão da progressão da doença (Adigun *et al.*, 2022, David; Alain; Richard, 2024). O diagnóstico diferencial da esclerose sistêmica envolve a consideração de manifestações cutâneas, características vasculares e complicações de órgãos (Denton; Khanna, 2017). Desde 2013 existem novos critérios de classificação para ES, que foram desenvolvidos pelo American College of Rheumatology (ACR)/European League against Rheumatism (EULAR), deve-se notar que os critérios não devem ser usados se os pacientes apresentarem apenas espessamento da pele fora dos dedos, nem em pacientes que tenham uma doença semelhante à esclerodermia (Becker; Distler; Maurer, 2019). Foi determinado que o espessamento da pele dos dedos que se estende proximalmente às articulações metacarpofalângicas é suficiente para que o paciente seja classificado como portador de ES; se isso não estiver presente, sete itens aditivos se aplicam, com pesos variados para cada um: espessamento da pele dos dedos, lesões nas pontas dos dedos, telangiectasia, capilares anormais da prega ungueal, doença pulmonar intersticial ou hipertensão arterial pulmonar, fenômeno de Raynaud e autoanticorpos relacionados à ES (Van *et al.*, 2013).

3.1.6 Tratamento Farmacológico

Não existe tratamento definitivo ou agente modificador da doença universalmente aceito que possa alterar o curso natural da doença (Adigun *et al.*, 2022). A abordagem terapêutica visa tratar e preservar a função dos órgãos internos, e esta abordagem é

comumente referida como tratamento baseado em órgãos (Gumkowska-Sroka *et al.*, 2023). Vários agentes foram investigados para diferentes manifestações de ES, o espectro de medicamentos geralmente utilizados por pacientes com ES compreende os: 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) (Adigun *et al.*, 2022; Sampaio-Barros, 2013).

Os glicocorticoides (GC) é uma classe terapêutica com medicamentos anti-inflamatórios e também considerados imunossupressores. Eles exercem a maior parte de seus efeitos biológicos por meio de uma ação genômica, resultando em aumento da expressão de proteínas reguladoras (transativação) ou diminuição da produção de proteínas pró-inflamatórias (transrepressão), mas devem ser geralmente evitados na ES devido ao risco de precipitar SRC (Adigun *et al.*, 2022; Dantas *et al.*, 2017, Timmermans; Souffriau; Libert, 2019). Os antagonistas do receptor de endotelina são uma classe de medicamentos específicos para HAP que bloqueiam a interação da ET-1 com seus receptores (Arefiev *et al.*, 2011). O fRy e as úlceras digitais são tratados com bloqueadores dos canais de cálcio *di-hidropiridínicos* (especialmente nifedipina), depois inibidores da fosfodiesterase 5 que ambos reduzem a frequência e a gravidade das crises de FRy (Kowal *et al.*, 2017, Pope *et al.*, 2023). Na SRC terapia com inibidor da enzima de conversão da angiotensina (IECA) e e os bloqueadores do receptor da angiotensina II (BRA) tenham melhorado significativamente quadros de pacientes com crise renal e utilizados como terapia alternativa (Cole *et al.*, 2023; Kowal *et al.*, 2017).

Os medicamentos antifibróticos representam outra classe que pode ser considerada uma opção potencial de tratamento. O tocilizumabe (TCZ), um inibidor da interleucina-6, que apresentou benefícios na fibrose dérmica, úlceras digitais e alterações de capilares em pacientes com ES, o romilkimab é um anticorpo IgG4 humanizado que se liga e neutraliza IL-4/IL-13, interrompendo a promoção da fibrose, o rituximabe é um anticorpo monoclonal anti-CD20 quimérico humanizado que esgota as células B periféricas por meio de citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos e o nintedanibe que bloqueia a tirosina quinase de receptores proangiogênicos como os receptores de fator de crescimento de fibroblastos impedindo a sinalização (Heater, Volkmann, 2022; Hilberg *et al.*, 2008; Pope *et al.*, 2023; Rahaghi *et al.*, 2023; Taniguchi *et al.*, 2017).

O transplante de células-tronco hematopoiéticas também pode ser considerado em pacientes com ES rapidamente progressiva com risco de falência de órgãos, embora seja

necessária uma seleção cuidadosa dos pacientes devido ao alto risco de efeitos colaterais e mortalidade relacionados ao tratamento (Rahaghi *et al.*, 2023). Neste contexto, torna-se claro que é essencial realizar estudos para descobrir novos medicamentos e potenciais moléculas que possam ser usados no tratamento da ES.

3.1.7 Derivados Tiazoquinolínicos

Tiazolidina-2,4-dionas (TZDs), representam uma classe muito importante de compostos heterocíclicos que é altamente explorada na literatura, TZDs possuem um amplo espectro de atividades biológicas, tais como anti-inflamatória. As TZDs tem uma ligação direta ao receptor ativado por proliferador de peroxissoma-gama (PPAR γ), ou seja, a ligação do núcleo da quinolina ao PPAR γ bloqueia a cascata de reações que resultam na inflamação (Hussein *et al.*, 2020; Lebovitz, 2019; Silva *et al.*, 2024; Shuibang *et al.*, 2016). Wu *et al.*, (2009) descobriram que o ligante sintético PPAR γ rosiglitazona, que é amplamente utilizado como um sensibilizador de insulina, também poderia atenuar a inflamação, fibrose dérmica e lipoatrofia subcutânea em um modelo animal de esclerodermia. Os agonistas do PPAR γ têm um papel na limitação da fibrose, além de seus efeitos anti-inflamatórios e imunomoduladores (Dantas *et al.*, 2015).

Segundo um estudo realizado por Silva *et al.*, (2024) os derivados tiazoquinolínicos (ZKDs) são obtidos através da hibridização molecular de TZDs, ou seja, pela combinação de dois produtos químicos ativos, além disso, produtos derivados do núcleo da quinolina despertam interesses farmacológicos, principalmente no desenvolvimento de agentes anti-inflamatórios. Neste contexto, os agonistas o PPAR γ tem um potencial papel antifibrótico e anti inflamatório. No entanto, estudos adicionais dos ZKDs são essenciais para a avaliação da atividade terapêutica e apresentar novas alternativas de tratamento para os pacientes com ES.

3.1.8 Receptores PPAR γ como alvos terapêuticos

Os receptores ativados por proliferadores de peroxissomos (PPARs) são um subconjunto da superfamília de receptores nucleares (Harry, 2010), três subtipos de PPARs são conhecidos: PPAR α , PPAR δ e PPAR γ (Ferrari *et al.*, 2015).

O receptor ativado por proliferador de peroxissoma-gama (PPAR γ) é um receptor nuclear expresso em muitos tecidos e células inflamatórias diferentes, incluindo macrófagos,

linfócitos e células dendríticas. O PPAR γ é um receptor nuclear e após a ligação com seu agonista, o PPAR γ heterodimeriza com o receptor retinóide X (RXR) e posteriormente se liga ao elemento de resposta proliferativa do peroxissomo (PPRE), conhecido como uma sequência de DNA específica na região promotora dos genes alvo do PPAR γ , para ligar ou desligar a transcrição de diferentes genes, incluindo genes associados a inflamação (Avouac *et al.*, 2017; Dantas *et al.*, 2015, Liu *et al.*, 2020).

A proteína PPAR γ foi identificada em células apresentadoras de antígenos e macrófagos, atua como um trans-repressor de genes inflamatórios de macrófagos. Agonistas sintéticos de PPAR γ (pioglitazona, troglitazona) demonstraram inibir a secreção de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-6 e o TGF β . Mais recentemente, foi demonstrado que o PPAR γ desempenha um papel importante na diferenciação de células imunes para fenótipos anti-inflamatórios, por exemplo agonistas do PPAR γ inibiram significativamente a expressão induzida pelo IFN- γ do ligante de quimiocinas, esses estudos fornecem fortes evidências da função anti-inflamatória do PPAR γ por meio de sua capacidade de suprimir a produção de citocinas do tipo Th1 em macrófagos e células dendríticas (Ferrari *et al.*, 2015; Harry, 2010; Marx *et al.*, 2000).

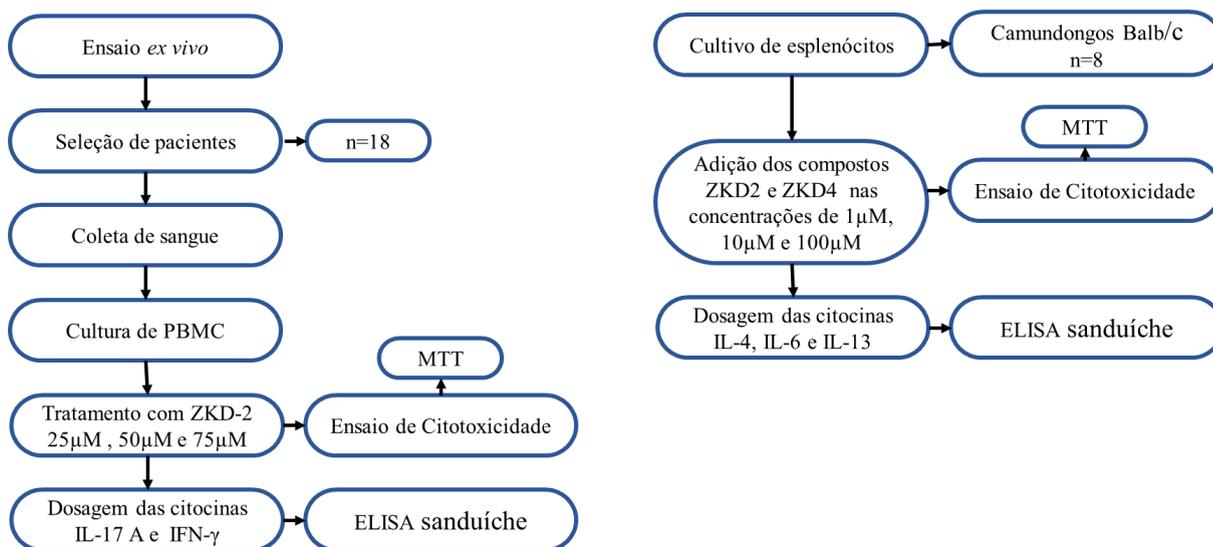
4 METODOLOGIA

4.1 Tipo de Estudo

O presente estudo trata-se de uma pesquisa experimental translacional *ex vivo* para avaliação do potencial imunomodulador do derivado tiazoloquinolínico ZKD-2 em células de pacientes com esclerose sistêmica e avaliação da atividade imunomoduladora do ZKD-2 e ZKD-4 no cultivo de esplenócitos.

4.2 Delineamento do Estudo

Figura 3 : Desenho esquemático do delineamento do estudo



4.3 Derivados Tiazoloquinolínicos

Os derivados tiazoloquinolínicos LPSF/ZKD-2 ((Z)-5-(4-bromobenzilideno)-3-(quinolin-2-ilmetil)tiazolidina-2,4-diona) e LPSF/ZKD-4 ((Z)-5-(furan-3-ilmetileno)-3-(quinolin-2-ilmetil)tiazolidina-2,4-diona) foram sintetizados conforme descrito no estudo realizado por Silva *et al.*, (2024) e disponibilizados pelo Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos da UFPE (LPSF/UFPE) para os ensaios.

4.4 Local e período do estudo

O estudo foi realizado no período de Julho/2024 a Outubro/2024. No Ambulatório de Reumatologia do HC-UFPE ocorreu seleção e avaliação clínica dos pacientes, enquanto os procedimentos experimentais foram conduzidos no Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT), pertencente ao Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica (NUPIT-SG) da UFPE

4.5 População de Estudo

4.5.1 Pacientes com Esclerose Sistêmica

O presente estudo foi realizado com 18 pacientes com esclerose sistêmica que foram atendidos e acompanhados no Ambulatório de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco do (HC/UFPE), selecionados aleatoriamente de acordo com o atendimento do Ambulatório, através dos critérios de inclusão e exclusão.

Critérios de inclusão: idade entre 18 e 65 anos; ser diagnosticado com esclerose sistêmica de acordo com os critérios do American College of Rheumatology ou os critérios do American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism (ACR/EULAR); estar em acompanhamento no Ambulatório de Reumatologia do HC/UFPE; assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Critérios de exclusão: síndrome de sobreposição, gestantes e impossibilidade de coleta.

4.5.2 Coleta de Sangue e Isolamento de PBMC

Foram realizadas coletas de sangue venoso de pacientes com ES (n=18) utilizando tubos à vácuo contendo o anticoagulante heparina. O isolamento das PBMCs (células mononucleares do sangue periférico) foi realizado através da centrifugação com Ficoll Paque™ Plus (GE HealthcareBio-Sciences). As células isoladas foram cultivadas em placas de 24 poços (106 células/1000 μ L) em meio RPMI 1640, suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal em estufa de CO_2 de 5% a 37°C e, posteriormente, as células foram estimuladas com PHA (fitohemaglutinina) e tratadas com ZKD-2 segundo o estudo realizado por Silva *et*

al., (2024) nas concentrações de 25 μ M, 50 μ M e 75 μ M. Para o controle positivo utilizou a metilprednisolona (Mp) na concentração padrão de 100 μ M. Após 48 horas em atmosfera de 5% CO₂ a 37°C as placas foram centrifugadas para coleta dos sobrenadantes que foram armazenados a -80°C para posterior dosagem de citocinas.

4.5.3 Cultivo de esplenócitos

Foram realizados em camundongos (n=8) fêmeas das linhagens Balb/c com 8 semanas de idade. Os animais foram mantidos em gaiolas ventiladas com um ciclo dia – noite de 12 horas e livre acesso a água e alimentos.

Suspensões de células do baço de camundongos foram obtidas após a lise hipotônica de eritrócitos em solução de acetato de potássio, duas lavagens em meio RPMI e filtração (filtro de 70 μ m). Utilizou a câmara de Neubauer para a contagem das células isoladas de cada camundongo. 3x10⁶ esplenócitos de cada camundongo foram incubados em placas de 12 poços e meio RPMI 1640 completo (10% FBS, 1% penicilina/estreptomicina, 1% anfotericina B) com 5 μ g/ml de concanavalina A (Sigma Aldrich), depois adicionou os compostos ZKD2 e ZKD4 nas concentrações de 1 μ M, 10 μ M e 100 μ M, respectivamente, em seguida incubou por 48 horas a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂. Após esse tempo os sobrenadantes da cultura foram armazenados no freezer a -80°C até as dosagens de citocinas.

4.6 Ensaios de Citotoxicidade

Para avaliar a atividade citotóxica dos derivados tiazoloquinolínicos foram realizados testes de redução do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio). Em PBMC (1x10⁶ células/poço) foram plaqueados e incubados em estufa de atmosfera úmida a 37°C com 5% de CO₂. O ensaio possui três condições: Células não tratadas, DMSO 0,1%, e o derivado ZKD-2 (25 μ M, 50 μ M e 75 μ M).

Para o cultivo de esplenócitos (3x10⁶ células/poço) foram plaqueados e incubados em estufa de atmosfera úmida a 37°C com 5% de CO₂. O ensaio possui quatro condições: Células não tratadas, DMSO 0,1%, o derivado ZKD-2 (1 μ M, 10 μ M e 100 μ M) e ZKD-4 (1 μ M, 10 μ M e 100 μ M).

Após tratamento 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, a viabilidade calculada a partir dos poços tratados apenas com DMSO 0,1%.

4.7 Dosagem de Citocinas

As citocinas presentes no sobrenadante das culturas de PBMCs e cultivo de esplenócitos foram quantificadas por ELISA sanduíche (Enzyme-linked immunosorbent assay), foram realizadas utilizando kits específicos de ELISA Human para IL-17A e IFN- γ (BD Biosciences) e e kits Mouse (Invitrogen) para IL-4, IL-6 e IL-13 seguindo as informações recomendadas pelos fornecedores.

Após realização da técnica, as leituras das absorbâncias foram realizadas em uma leitora de microplacas AccuSkan FC (Fisher Scientific), no comprimento de onda de 450nm.

Tabela 1 : Citocinas avaliadas por ELISA, fabricantes e limites de detecção

Citocina	Fabricante	Limites de Detecção (pg/ml)
IL-17A	BD Biosciences	3,9 - 500
IFN- γ	BD Biosciences	3,9 - 500
IL-4	Invitrogen	3,9 - 500
IL-6	Invitrogen	4,6 - 500
IL-13	Invitrogen	3,9 - 500

Fonte: A Autora (2024)

4.8 Análise dos Resultados

Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa GraphPadPrism, versão 8.0. A expressão dos resultados das variáveis contínuas foi feita pelas médias/desvios-padrão. Para comparação dos níveis de citocinas entre duas condições foi utilizado o teste Wilcoxon's signed rank. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

4.9 Aspectos Éticos

O protocolo do projeto que envolveu coleta de sangue e de dados clínicos de seres humanos foi avaliado e aprovado pelo comitê de ética em pesquisa com seres humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, sob CAAE nº: 96111118.0.0000.5208 e nº do parecer: 2.937.516 (Anexo A). Todos os pacientes incluídos no presente estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para pacientes com esclerose sistêmica (Apêndice A). Os dados clínicos, terapêuticos e demográficos foram obtidos através dos prontuários e aplicações de questionários aos pacientes (Apêndice B). O protocolo do estudo envolvendo animais foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Pernambuco, processo nº 0067/2022 (Anexo B).

5 RESULTADOS

5.1 Determinação do perfil clínico dos pacientes com Esclerose Sistêmica

Foram avaliados 18 pacientes com ES do ambulatório do HC-UFPE, dentre eles 17 do sexo feminino e 1 do sexo masculino. Na caracterização clínica, foram avaliadas as manifestações clínicas, escore de Rodnan e tratamentos utilizados pelos pacientes. Na tabela 2 seguem as informações.

Tabela 2: Características clínicas de pacientes com Esclerose Sistêmica do estudo (n=18)

Características	Total (n=18)	Cutânea Difusa (n=9)	Cutânea Limitada (n=9)
Idade (anos) média ± DP (mín-máx)	46.5 ± 12.3 (30-71)	45.6 ± 10.34 (34-63)	47.3 ± 14.5 (30-71)
Sexo feminino N (%)	17 (94.4)	9 (49.9)	8 (44.5)
Sexo Masculino N (%)	1 (5.6)	0	1 (5.6)
Manifestações clínicas N (%)			
Fenômeno de Raynaud	15 (83.3)	9 (49.98)	7 (33.3)
Comprometimento esofágico	6 (33.3)	4 (22.2)	2 (11.1)
HAP	1 (5.5)	1 (5.5)	0
Telangiectasias	10 (55.5)	2 (11.1)	8 (44.4)
Miopatia	4 (22.2)	1 (5.5)	3 (16.7)
Calcinose	2 (11,1)	1 (5,5)	1 (5.5)
Artrite	6 (33.3)	3 (16.6)	3 (16.6)
Úlceras Digitais	6 (33.3)	3 (16.6)	3 (16.6)

Escore de Rodnan	20.5 (0 - 45)	13 (0 – 36)	28.1 (0 – 45)
Mediana (mín-máx)			
Tratamentos N(%)			
IBP	12 (66.6)	5 (27.7)	7 (38.9)
BCC	10 (55.5)	5 (27.7)	5 (27.7)
Corticoide	10 (55.5)	4 (22.2)	6 (33.3)
AAS	6 (44.4)	4 (33.3)	2 (11.1)
BRA	4 (22.2)	3 (16.6)	1 (5.6)
Metotrexato	4 (22.2)	0	4 (22.2)
IECA	2 (11.1)	0	2 (11.1)

DP: desvio-padrão; HAP: hipertensão arterial pulmonar; BCC: bloqueadores dos canais de cálcio; IBP: inibidores da bomba de prótons; IECA: inibidores da enzima conversora de angiotensina; AAS: ácido acetil salicílico; BRA: bloqueadores de receptores da angiotensina.

Fonte: A Autora (2024)

5.2 Avaliação de atividade citotóxica em PBMCs e cultivo de esplenócitos

Na avaliação da atividade citotóxica em PBMC após o tratamento com ZKD-2 em comparação com o grupo tratado com DMSO 0,1% [média ± DP] [92,01± 6,61], o ZKD-2 nas concentrações de 50µM [91,34 ± 14,05] e 100µM [88,32 ± 12,33] apresentou viabilidade similar ao grupo DMSO 0,1%.

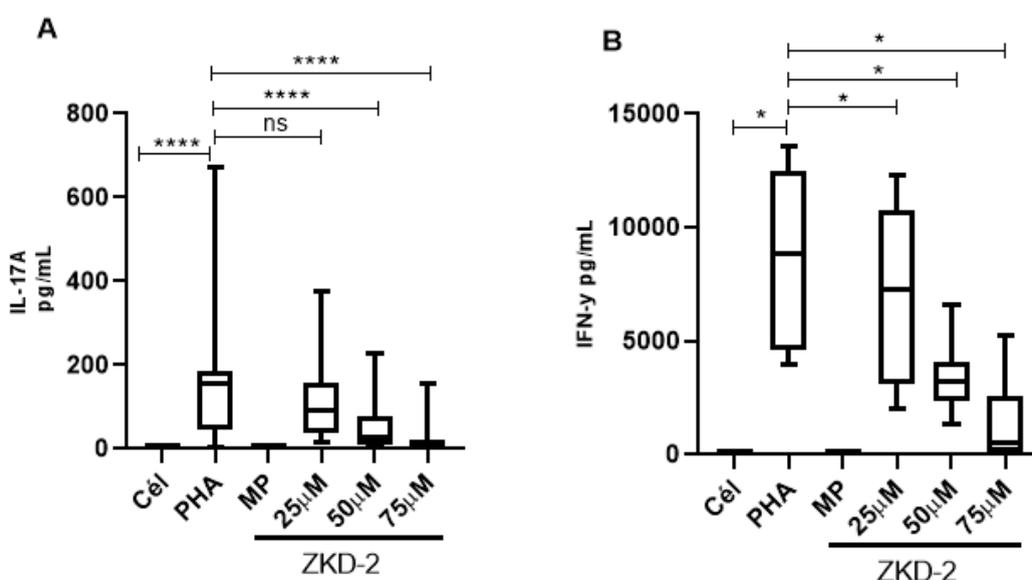
Para a avaliação da atividade citotóxica em de cultivo de esplenócito em comparação com o grupo tratado com DMSO 0,1% [100 ± 34,83] o ZKD-2 nas concentrações de 1µM [89,83 ± 20,30], 10µM [79,20 ± 10,07] e 100µM [62,14 ± 15,76] e ZKD-4 1µM [86,37 ± 30,86], 10µM [88,27 ± 39,37] e 100µM [93,00 ± 15,47]. O ZKD-2 nas concentrações de 10µM e 100µM não apresentaram viabilidade similar ao grupo DMSO 0,1%. Conforme esses dados, as concentrações 1µM, 10µM e 100µM dos ZKDs foram determinadas para os ensaios de imunomodulação.

5.3 Avaliação de atividade imunomoduladora do ZKD-2 em PBMC de pacientes com ES

A atividade imunomoduladora foi avaliada em PBMC de pacientes com ES. Observou-se que o ZKD-2 nas concentrações de 50 μ M e 75 μ M reduziu significativamente a secreção da IL-17A [**** p <0,0001 e **** p <0,0001], respectivamente. Observou-se que a condição célula estimulada com PHA teve aumento significativo na secreção da IL-17A quando comparada com células sem estímulo [**** p <0,0001] (Figura 4A).

Para o IFN- γ , o ZKD-2 reduziu significativamente a produção da citocina nas concentrações de 25 μ M [$*p$ <0,0313], 50 μ M [$*p$ <0,0313] e 75 μ M [$*p$ <0,0313] e uma diferença significativa em comparação a condição célula e célula estimulada com PHA [$*p$ <0,0313] (figura 4B).

Figura 4 - Atividade imunomoduladora do ZKD-2 em PBMC de pacientes com ES.



O grupo PHA 5 μ M representa as PBMC estimuladas na produção de citocinas inflamatórias, o grupo MP representa sobrenadantes de PBMC estimuladas com PHA e tratadas com anti-inflamatório metilprednisolona 100 μ M. Cél= células não estimuladas, PHA= fitohemaglutinina, MP= Metilprednisolona. IL-17A (n=18) e IFN- γ (n=6).

Fonte: A Autora (2024)

5.4 Atividade imunomoduladora do ZKD-2 e ZKD-4 em cultivo de esplenócitos

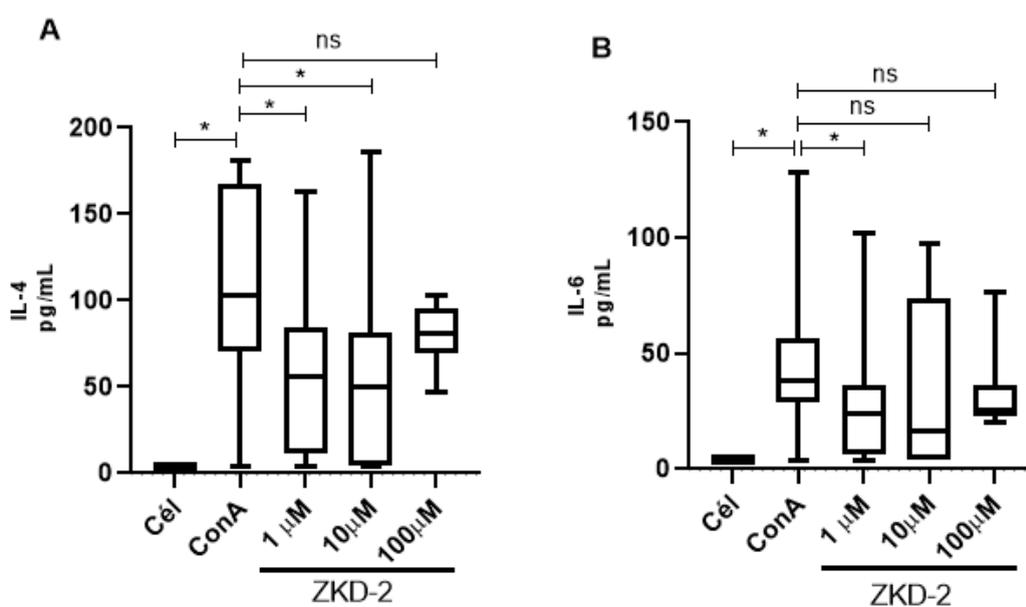
A atividade imunomoduladora foi avaliada em cultivo de células esplênicas de camundongos, observou-se que o ZKD-2 nas concentrações de 1 μ M e 10 μ M reduziu significativamente a secreção da IL-4 [$*p$ <0,0156 e $*p$ <0,0391], respectivamente. Sobre a

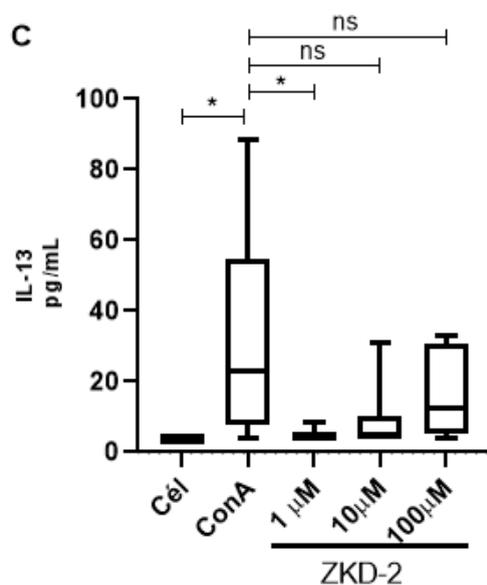
condição célula estimulada com ConA teve um aumento significativo na secreção da IL-4 quando comparada com célula sem estímulo [$*p<0,0156$] (Figura 5A).

Em relação a IL-6 é possível observar na figura 5B que houve uma redução significativa na secreção da citocina na concentração de $1\mu\text{M}$ [$*p<0,0156$]. E a condição célula estimulada com ConA teve um aumento significativo na secreção da IL-6 comparada com célula sem estímulo [$*p<0,0156$].

Para a citocina IL-13 observa-se uma redução significativa na citocina na concentração $1\mu\text{M}$ [$*p<0,0313$] e um aumento significativo na secreção da IL-13 quando comparada com a condição célula estimulada com ConA e célula sem estímulo [$*p<0,0156$] (Figura 5C).

Figura 5 - Atividade imunomoduladora do ZKD-2 em cultivo de células esplênicas de camundongos.





O grupo ConA 5μM representa as células estimuladas na produção de citocinas inflamatórias. Cél= células não estimuladas, ConA= concanavalina, ns= não significativo. IL-4 (n=8), IL-6 (n=8), IL-13 (n=8).

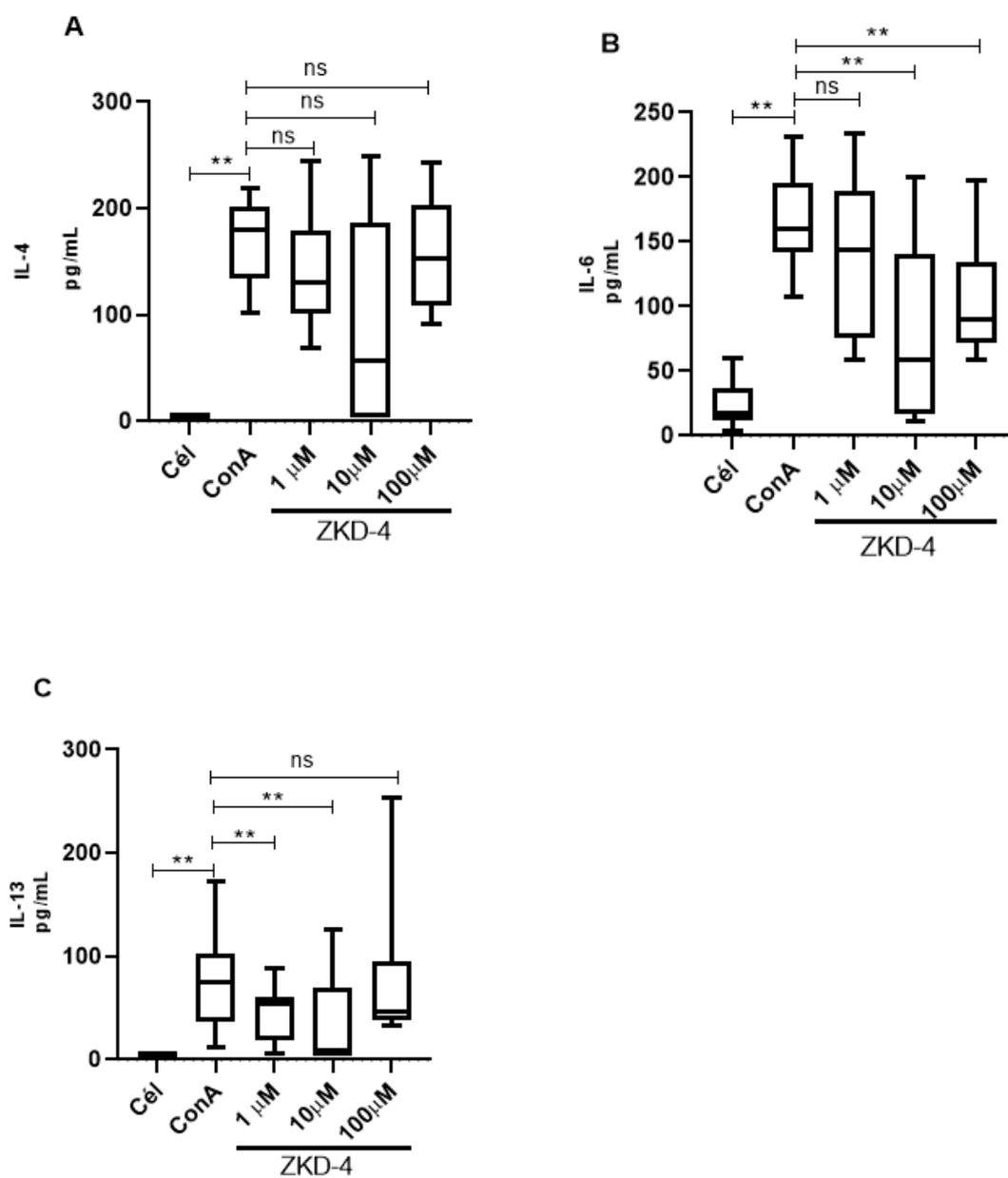
Fonte: A Autora (2024)

A atividade imunomoduladora avaliada em cultivo de células esplênicas de camundongos tratadas com ZKD-4 observou-se que não houve uma redução significativa da secreção da IL-4 nas concentrações de 1μM, 10μM e 100μM (Figura 6A).

Para a citocina IL-6 observa-se na figura 6B que ocorreu uma redução significativa na secreção da citocina nas concentrações 10μM e 100μM [$**p < 0,0078$ e $**p < 0,0078$], respectivamente. Observou-se que a condição célula estimulada com ConA teve um aumento significativo na secreção da IL-6 quando comparada com células sem estímulo [$**p < 0,0078$].

Em relação a IL-13 observa-se uma redução significativa na secreção da citocina nas concentrações 1μM e 10μM [$**p < 0,0078$ e $**p < 0,0078$], respectivamente e houve um aumento significativo na secreção da IL-13 quando comparada com a condição célula estimulada com ConA e células sem estímulo [$**p < 0,0078$] (Figura 6C).

Figura 6 - Atividade imunomoduladora do ZKD-4 em cultivo de células esplênicas de camundongos.



O grupo ConA 5 μ M representa as células estimuladas na produção de citocinas inflamatórias. Cél= células não estimuladas, ConA= concanavalina, ns= não significativo. IL-4 (n=8), IL-6 (n=8), IL-13 (n=8).

Fonte: A Autora (2024)

6 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo indicaram que o ZKD-2 demonstrou atividade imunomoduladora *ex vivo* em PBMCs de pacientes com ES, ao reduzir significativamente a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-17A e IFN- γ). Adicionalmente, os resultados do ZKD-2 em culturas de células esplênicas de camundongos demonstraram uma redução expressa na secreção das citocinas IL-4, IL-6 e IL-13, em paralelo o ZKD-4 reduziu significativamente os níveis das citocinas IL-6 e IL-13. Em conjunto, esses resultados demonstram o potencial terapêutico de derivados tiazolínicos (ZKD-2 e ZKD-4) para a esclerose sistêmica e condições autoimunes ou inflamatórias.

Um estudo conduzido por Derrett-Smith *et al.*, (2021) em um modelo animal de ES induzido por bleomicina, com o tratamento utilizando lanifibranor, um agonista dos receptores ativados por proliferadores de peroxissomos (PPARs) demonstrou proteção contra a fibrose pulmonar. Entretanto, moléculas que possuem atividades nesses receptores são de grande importância para a clínica.

Contudo, os derivados tiazolínicos (ZKDs) são obtidos por meio da hibridização molecular, uma estratégia promissora para o desenvolvimento de novos compostos ativos que podem resultar na potencialização da atividade terapêutica, essas moléculas pertencem a uma classe de drogas que são agonistas do receptor ativado por proliferador de peroxissoma-gama (PPAR γ). O PPAR γ quando ativado apresenta uma atividade imunomoduladora, pois é um regulador negativo da transcrição de genes associados a inflamação o que explica em parte o mecanismo de ação de suas atividades (Avouac *et al.*, 2017; Ghosh *et al.*, 2009). Segundo Silva *et al.*, (2024) os ZKDs são obtidos através da hibridização molecular das Tiazolidina-2,4-dionas (TZDs), apresentam ligações de hidrogênio com os resíduos de aminoácidos e interações hidrofóbicas com o PPAR γ , ou seja, indicam uma boa afinidade com este receptor. Além disso, a afinidade dos ZKDs é superior comparada com a rosiglitazona, um medicamento da classe das TZDs.

Os resultados obtidos evidenciaram a redução da secreção da IL-17A e IFN- γ após o tratamento com o ZKD-2 em PBMCs de pacientes com ES. A IL-17A atua indiretamente favorecendo mais inflamação, recrutando células inflamatórias, ativando e/ou estimulando a produção de TGF- β que ativam os linfócitos TCD4⁺ promovendo a diferenciação da resposta para o perfil Th17 (Akhter *et al.*, 2023; Chizzolini *et al.*, 2018, Schinocca *et al.*, 2021; Wei; Abraham; Ong, 2022). Enquanto o IFN- γ , é uma importante citocina para autoimunidade da

ES, pois induz a troca de classe de IgG de células B para autoanticorpos mais patogênicos (Khana *et al.*, 2022).

Um estudo realizado por Aprahamian *et al.*, (2009) investigou o efeito anti-inflamatório em um modelo de rato de Lúpus Eritematoso Sistêmico e a rosiglitazona agonista do PPAR γ reduziu a produção de autoanticorpos. Além disso, Kawai *et al.*, (2009) investigou o efeito antifibrótico e antiinflamatório da troglitazona agonista do PPAR γ em um modelo *in vivo* e foi descrito a redução de genes associados com a inflamação.

Adicionalmente, no presente estudo observou-se a redução das citocinas IL-4, IL6 e IL-13 em células esplênicas de camundongos tratadas com ZKD-2 e ZKD-4. Um estudo realizado por Silva *et al.*, (2024) em cultura de PBMCs de indivíduos saudáveis estimuladas com PHA (fitohemaglutinina) e posteriormente tratadas com os ZKDs foi evidenciado a redução da IL-6. O envolvimento da IL-6 na fibrose tecidual associada a ES a torna um alvo terapêutico racional, um estudo realizado com fibroblastos cultivados de biópsias de pele de pacientes com ES o bloqueio da IL-6 resultou a baixa produção de fibras de colágeno (Kawaguchi, 2017, Cardoneanu *et al.*, 2022).

Citocinas do perfil Th2, como IL-4, IL-6 e IL-13 são expressas na pele e no soro de pacientes com ES e induzem diretamente a produção de colágeno em fibroblastos (Cardoneanu *et al.*, 2022; Kuzumi *et al.*, 2021). Um estudo em camundongos em um modelo de ES, tratados com anticorpos que neutralizam a IL-4, demonstrou a prevenção do desenvolvimento de fibrose dérmica (Rueda *et al.*, 2009). Segundo Gasparini *et al.*, (2020) o eixo IL-4/IL-13 podem constituir potenciais alvos terapêuticos, pois representam os principais mediadores das respostas Th2 e da atividade pró-fibrótica.

Contudo, o ZKD-4 não diminuiu a expressão da citocina IL-4, o que sugere que o composto pode não afetar a sinalização da citocina. Outra possibilidade é que a concentração utilizada no estudo tenha sido insuficiente para provocar a redução nos níveis da citocina.

Assim, nossos resultados evidenciam o papel imunomodulador, avaliação do mecanismo de ação e investigação da atividade antifibrótica dos ZKDs na ES. Cabe ressaltar que o estudo apresenta algumas limitações, como por exemplo o baixo número de citocinas avaliadas. Por fim, faz-se necessário estudos futuros para uma melhor compreensão dos efeitos dos ZKDs e reduzir as restrições apresentadas.

7 CONCLUSÃO

- Portanto, no presente estudo, nota-se que o ZKD- 2 apresentou atividade imunomoduladora em PBMCs de pacientes com ES, uma vez que reduziu as citocinas IL-17 e IFN- γ que estão envolvidas na patogênese da ES ;
- o ZKD-2 apresentou atividade imunomoduladora, pois reduziu os níveis das citocinas IL-4, IL-6 e IL-13 em células esplênicas de camundongos;
- e o ZKD-4 reduziu os níveis das citocinas IL-6 e IL-13 em células esplênicas de camundongos.

8 PERSPECTIVAS

- Aumentar o número de cultivos para as análises dos ZKDs;
- Realizar cultivos de controles saudáveis;
- Realizar estudos em outras concentrações dos ZKDs;
- Avaliar a atividade imunomoduladora dos ZKDs na produção de outras citocinas tanto em PBMCs como também em cultura de esplenócitos.

REFERÊNCIAS

- Abraham, D; Lescoat, A; Stratton, R. Emerging diagnostic and therapeutic challenges for skin fibrosis in systemic sclerosis. **Mol Aspects Med**, 2024.
- Adigun, R. *et al.* Systemic Sclerosis. **In: StatPearls**, 2022.
- Akhter, S. *et al.* Role of Th17 and IL-17 Cytokines on Inflammatory and Auto-immune Diseases. **Curr Pharm Des**, v. 29, n. 26, p. 2078- 2090, 2023.
- Allanore, Y. *et al.* Systemic sclerosis. **Nature reviews**, v. 1, n. 1, 2015.
- Aprahamian, T. *et al.* O agonista do receptor γ ativado por proliferador de peroxissoma rosiglitazona melhora o lúpus murino pela indução de adiponectina. **Journal of Immunology**, v. 182, n. 1, p. 340-346, 2009.
- Arefiev, K. *et al.* Endothelin Receptor Antagonists for the Treatment of Raynaud's Phenomenon and Digital Ulcers in Systemic Sclerosis. **Int J Rheumatol**, 2011.
- Avouac, J. *et al.* Pan-PPAR agonist IVA337 is effective in experimental lung fibrosis and pulmonary hypertension. **Ann Rheum Dis**. v. 76, n. 11, p. 1931-1940, 2017.
- Baeten D. L. *et al.* How cytokine networks fuel inflammation: Interleukin-17 and a tale of two autoimmune diseases. **Nat Med**, v. 19, p. 824-25, 2013.
- Balanescu, P. *et al.* IL-17 and Th17 cells in systemic sclerosis: a comprehensive review. **Rom J Intern Med**. v. 55, n. 4, p. 198-204, 2017.
- Baraut, J. *et al.* Relationship between cytokine profiles and clinical outcomes in patients with systemic sclerosis. **Autoimmunity Reviews**, v. 10, n. 2, p. 65–73, 2010.
- Battista. *et al.* Autonomic dysfunction in systemic sclerosis: A scoping. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 63, 2023.
- Becker, M.O.; Distler, O.; Maurer, B. Systemische Sklerose – klinisches Bild, Diagnostik und Therapie [Systemic sclerosis-clinical picture, diagnosis, and treatment]. **Z Rheumatol**, v. 78, n. 5, p. 439-457, 2019.

Benfaremo, D. *et al* . Putative functional pathogenic autoantibodies in systemic sclerosis. **Eur J Rheumatol**, p. 181-186, 2020.

Benfaremo, D. *et al*. Systemic Sclerosis: From Pathophysiology to Novel Therapeutic Approaches. **Biomedicines**, v. 10, n. 1, p. 163, 2022.

Brasil, F. A. F. Secretaria de Atenção à Saúde. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Esclerose Sistêmica: Portaria nº 99. **Brasília: Ministério da Saúde**, 2017.

Bukiri H.; Volkman E. R. Current advances in the treatment of systemic sclerosis. **Curr Opin Pharmacol**, 2022.

Cardoneanu, A. *et al* Targeting Systemic Sclerosis from Pathogenic Mechanisms to Clinical Manifestations: Why IL-6? **Biomedicines**, v. 10, n. 2, p. 318, 2022.

Cavazzana, I. *et al*. Systemic Sclerosis-Specific Antibodies: Novel and Classical Biomarkers. **Clin Rev Allergy Immunol**, v. 64, n. 3, p. 412-430, 2023.

Chizzolini, C. *et al*. Is there a role for IL-17 in the pathogenesis of systemic sclerosis? **Immunol Lett**, v. 195, p. 61-67, 2018.

Chizzolini, C.; Boin, F. The role of the acquired immune response in systemic sclerosis. **Seminars in immunopathology**, v. 37, n. 5, p. 519–528, 2015.

Chrabaszcz, M. *et al*. Renal Involvement in Systemic Sclerosis: An Update. **Kidney Blood Press Res**, v. 45, n. 4, p. 532-548, 2020.

Coi *et al*. Epidemiology of systemic sclerosis: a multi-database population-based study in Tuscany. **BMC Medicine**, v. 16, n. 90, 2021.

Cole, A. *et al*. Renal Disease and Systemic Sclerosis: an Update on Scleroderma Renal Crisis. **Clin Rev Allergy Immunol**, v. 64, n. 3, p. 378-391, 2023.

Colletti, M. *et al*. Exosomes in Systemic Sclerosis: Messengers Between Immune, Vascular and Fibrotic Components? **Int J Mol Sci**, v. 20, n. 18, 2019.

Dantas, A.T. *et al*. Corticosteroid inhibits chemokines production in systemic sclerosis patients. **Steroids**. v.127, p.24-30, 2017.

Dantas, A.T. *et al.* The Role of PPAR Gamma in Systemic Sclerosis. **Review Article**, 2015.

David, A.; Alain, L.; Richard, S. Emerging diagnostic and therapeutic challenges for skin fibrosis in systemic sclerosis. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 96, 2024.

Deng, Y.L. *et al.* Organ fibrosis inhibited by blocking transforming growth factor- β signaling via peroxisome proliferator-activated receptor γ agonists. **Hepatobiliary Pancreat Dis Int.** v, 5, p. 467-78, 2012.

Denton, C. P.; Khanna, D. Systemic sclerosis. **The Lancet**, v. 390, n. 10103, p. 1685–1699, 2017.

Denton, C.P. Esclerose sistêmica: da patogênese à terapia direcionada. **Clinical and Experimental Rheumatology** , v. 33, n.92, p. 3–7, 2015.

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 Res Ther**, v. 23, n. 1, 2021.

Ferrari et al. S.M. Peroxisome proliferator-activated receptor γ in thyroid autoimmunity. **Review Article**, 2015.

Ferreira, L.; Lima, D. E. Perfil sócio epidemiológico de pacientes com esclerose sistêmica atendidos em Centro de Referência no estado de Pernambuco, 2022.

Flavahan, N. A. *et al.* The vasculopathy of Raynaud's phenomenon and scleroderma. **Rheumatic diseases clinics of North America**, v. 29, n. 2, p. 275–91, 2003.

Gasparini, G.; Cozzani, E.; Parodi, A. Interleukin-4 and interleukin-13 as possible therapeutic targets in systemic sclerosis. **Cytokine**, 2020.

Ghosh, A. K. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma abrogates Smad-dependent collagen stimulation by targeting the p300 transcriptional coactivator. **FASEB J.** v. 23, n. 9, 2009.

Gumkowska-Sroka, O. *et al.* Novel Therapeutic Strategies in the Treatment of Systemic Sclerosis. **Pharmaceuticals (Basel)**, v.16, n. 8, p. 1066, 2023.

Hao, R. *et al.* Further insight into systemic sclerosis from the vasculopathy perspective. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 166, 2023.

Harry, M. Role of PPAR-gamma in inflammation. Prospects for therapeutic intervention by food components Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. **Mutat Res**, v. 690, p. 57-63, 2010.

Heather, B.; Volkmann, E. R. Current advances in the treatment of systemic sclerosis. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 64, 2022.

Henderson, N. C.; Rieder, F.; Wynn, T. A. Fibrosis: from mechanisms to medicines. **Nature**, v. 587, n. 7835, p. 555–566, 2020.

Herrick, AL; Assassi, D; Denton, CP. Skin involvement in early diffuse cutaneous systemic sclerosis: an unmet clinical need. **Nat Rev Rheumatol**, v. 18, n. 5, p. 276-285, 2022.

Hilberg, F. *et al.* BIBF 1120: triple angiokinase inhibitor with sustained receptor blockade and good antitumor efficacy. **Cancer Res**, 2008.

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.

Huang, X.L. *et al.* Role of anti-inflammatory cytokines IL-4 and IL-13 in systemic sclerosis. **Inflamm Res**, v. 64, 2015.

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

Hughes, M. *et al.* Raynaud phenomenon and digital ulcers in systemic sclerosis. **Nat Rev Rheumatol**, v. 16, n. 4, p. 208-221, 2020.

Hussein, K. *et al.* Synthesis of a novel series of (Z)-3,5-disubstituted thiazolidine-2,4-diones as promising anti-breast cancer agents. **Bioorganic Chemistry**, v. 96, 2020.

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, 2018.

- Jerjen, R. *et al.* Systemic sclerosis in adults. Part I: Clinical features and pathogenesis. **J Am Acad Dermatol**, v. 87, n. 5, p. 937-954, 2022.
- Jin, J. *et al.* Pirfenidone attenuates lung fibrotic fibroblast responses to transforming growth factor- β 1. **Respir Res**, 2019.
- Kawai T. *et al.* O agonista PPAR- γ atenua a fibrose intersticial renal e a inflamação por meio da redução do TGF- β . **Investigação laboratorial**, v. 89, n. 1, p. 47-58, 2009.
- Kawaguchi Y. Contribuição da interleucina-6 para a patogênese da esclerose sistêmica. **Journal of Scleroderma and Related Disorders**, 2017.
- Khanna D. *et al.* Tofacitinib blocks IFN-regulated biomarker genes in skin fibroblasts and keratinocytes in a systemic sclerosis trial. **JCI Insight**, v. 7, n. 17, 2022.
- Khanna, D. *et al.* Etiology, Risk Factors, and Biomarkers in Systemic Sclerosis with Interstitial Lung Disease. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 201, n. 6, p. 650-660, 2020.
- 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, 2005.
- Kowal, B. O. *et al.* Update of EULAR recommendations for the treatment of systemic sclerosis. **Ann Rheum Dis**, v. 76, n. 8, p. 1327-1339, 2017.
- 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, 2018.
- Kumar, S. *et al.* Review article: pathogenesis and clinical manifestations of gastrointestinal involvement in systemic sclerosis. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 45, n. 7, p. 883–898, 2017.
- Kuzumi, A. *et al.* Interleucina-31 promove fibrose e polarização do T helper 2 na esclerose sistêmica. **Nat Commun**, v.12, 2021.

- Lazzaroni, M.G. *et al.* A Narrative Review of Pathogenetic and Histopathologic Aspects, Epidemiology, Classification Systems, and Disease Outcome Measures in Systemic Sclerosis. **Clin Rev Allergy Immunol**, v. 64, n. 3, p. 358-377, 2023.
- Leak, A. Towards an anti-fibrotic therapy for scleroderma: targeting myofibroblast differentiation and recruitment. **Fibrogenesis & tissue repair**, v. 3, n. 1, p. 8, 2010.
- Lebovitz, H.E. Thiazolidinediones: the Forgotten Diabetes Medications. **Curr Diab Rep**, v. 19, n. 12, p. 151, 2019.
- Lepri, G. *et al.* Systemic sclerosis: one year in review 2022. **Clin Exp Rheumatol**, v. 40, n. 10, p. 1911-1920, 2022.
- Liu, W; Zhang, S; Wang, J. IFN- γ , should not be ignored in SLE. **Front Immunol**, 2022.
- Liu, Y. *et al.* The roles of PPAR γ and its agonists in autoimmune diseases: A comprehensive review. **J Autoimmun**, 2020.
- Lubberts E. Th17 cytokines and arthritis. **Semin Immunopathol**, v. 32, n. 1, p. 43-53, 2010.
- Maehara, T. *et al.* Cytotoxic CD4⁺ T lymphocytes may induce endothelial cell apoptosis in systemic sclerosis. **J Clin Invest**, v130, n.5, p.2451-2464, 2020.
- Marc, S. *et al.* Renal involvement in systemic sclerosis. **Autoimmunity Reviews**, v. 22, n.6, 2023.
- Matoo, H; Pillai, S. Idiopathic pulmonary fibrosis and systemic sclerosis: pathogenic mechanisms and therapeutic interventions. **Cell Mol Life Sci**, v.78, n. 14, p. 5527-5542, 2021.
- Marx, N. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activators inhibit IFN-gamma-induced expression of the T cell-active CXC chemokines IP-10, Mig, and I-TAC in human endothelial cells. **J Immunol**, 2000.
- McGeachy, M.J. *et al.* The IL-17 Family of Cytokines in Health and Disease. **Immunity**, v. 50, n. 4, p. 892-906, 2019.
- Mehra, S. *et al.* Autoantibodies in systemic sclerosis. **Autoimmunity reviews**, v. 12, n. 3, p. 340–354, 2013.

- Melsens, K. *et al.* Two years follow-up of an open-label pilot study of treatment with rituximab in patients with early diffuse cutaneous systemic sclerosis. **Acta Clinica Belgica**, v. 73, n. 2, p. 119-125, 2017.
- Morrisroe, K. B.; Nikpour, M.; Proudman, S. M. Musculoskeletal manifestations of systemic sclerosis. **Rheumatic diseases clinics of North America**, v. 41, n. 3, p. 507–518, 2015.
- Murdaca, G. *et al.* Genetic factors and systemic sclerosis. **Autoimmunity reviews**, v. 15, n. 5, p. 427–432, 2016.
- Nassar, M. *et al.* Gastrointestinal involvement in systemic sclerosis: An updated review. **Medicine (Baltimore)**, v. 101, n. 45, 2022.
- 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, 2012.
- Patanaik, E. *et al.* Endothelial Dysfunction in Systemic Sclerosis. **Int J Mol Sci**, v. 24, n. 18, p. 14385, 2023.
- Pope, J.E. *et al.* State-of-the-art evidence in the treatment of systemic sclerosis. **Nat Rev Rheumatol**, v. 19, n. 4, p. 212-226, 2023.
- Przemyslaw, J; Kotyla. Systemic Sclerosis: An Autoimmune Disease Without a Known Pathology and to Be Conquered. **Mosaic of Autoimmunity**, p. 549-558, 2019.
- Rahaghi FF. *et al.* Expert consensus on the management of systemic sclerosis-associated interstitial lung disease. **Respir Res**, v. 24, n.1, 2023.
- Ren, H. *et al.* Further insight into systemic sclerosis from the vasculopathy perspective, **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 166, 2023.
- Roofeh, D.; Lescoat, A.; Khanna, D. Medicamentos emergentes para o tratamento da esclerodermia: uma revisão dos ensaios recentes de fase 2 e 3. **Opinião de especialistas sobre drogas emergentes**, v. 25, n. 4, p. 455-466, 2020.
- Rosendahl, A.H. *et al.* Pathophysiology of systemic sclerosis (scleroderma). **Kaohsiung J Med Sci**, v. 38, n. 3, p. 187-195, 2022.

Rosendahl, A.H. *et al.* Pathophysiology of systemic sclerosis (scleroderma). **Kaohsiung J Med Sci**, v. 38,n. 3, p. 187-195, 2022.

Rueda, J. *et al.* O gene STAT4 influencia a predisposição genética ao fenótipo da esclerose sistêmica. **Human Molecular Genetics**, v. 18, n. 11, p. 2071–2077, 2009.

Salazar, G. *et al.* Genetics, Epigenetics, and Genomics of Systemic Sclerosis. **Rheumatic Disease Clinics of North America**, v. 41, n. 3, p. 345–366, 2015.

Sampaio-Barros, P. Recommendations for the management and treatment of systemic sclerosis Recomendações sobre diagnóstico e tratamento da esclerose sistêmica. **Revista Brasileira De Reumatologia**, p. 258–275, 2013.

Scheen, M. *et al.* Renal involvement in systemic sclerosis. **Autoimmunity Reviews**, v. 22, n. 6, 2023.

Schinocca, C. *et al.* Role of the IL-23/IL-17 Pathway in Rheumatic Diseases: An Overview. **Front Immunol**, 2021.

Segura, B. T.; Ferraz-Amaro, I. Large vessels vasculopathy in systemic sclerosis Vasculopatía de grandes vasos en la esclerosis sistémica. **Med Clin (Barc)**, n. 11, p. 488–492, 2015.

Shuibang, W. *et al.* PPAR γ signaling and emerging opportunities for improved therapeutics. **Pharmacological Research**.v. 111, 2016.

Silva, P. *et al.* Assessment of light touch sensation in the hands of systemic sclerosis patients. **Clinics**, v. 69, n. 9, p. 585-588.

Silva, S.E.B. *et al.* Synthesis and *In vitro* and *In silico* Anti-inflammatory Activity of New Thiazolidinedione-quinoline Derivatives. **Curr Top Med Chem**, v. 24, n. 14, p. 1264-1277.

Sobolewski, P. *et al.* Systemic sclerosis – multidisciplinary disease: clinical features and treatment. **Rheumatology**, v. 57, n. 4, p. 221-233, 2019.

Song, M. *et al.* IL-17A functions and the therapeutic use of IL-17A and IL-17RA targeted antibodies for cancer treatment. **Int Immunopharmacol**, v. 123, 2023.

Sun, T. *et al.* Isoform-selective TGF- β 3 inhibition for systemic sclerosis. **Med**, v, 5, n. 2, p. 132-147, 2024.

Taniguchi, T. *et al.* Critical contribution of the interleukin-6/signal transducer and activator of transcription 3 axis to vasculopathy associated with systemic sclerosis. **The journal of dermatology**, v. 44, n. 8, p. 967–971, 2017.

Timmermans, S.; Souffriau, J.; Libert, C. A General Introduction to Glucocorticoid Biology. **From Immunol**, 2019.

Truchetet, M.E. *et al.* Atualidades sobre a Patogênese da Esclerose Sistêmica. **Clínica Rev Allerg Immunol**, v.64, p. 262-283, 2023.

Van, D.H. *et al.* 2013 classification criteria for systemic sclerosis: An American college of rheumatology/European league against rheumatism collaborative initiative: ACR/EULAR classification criteria for SSc. **Arthritis and rheumatism**, v. 65, n. 11, p. 2737–2747, 2013.

Volkman, ER; McMahan, Z. Gastrointestinal involvement in systemic sclerosis: pathogenesis, assessment and treatment. **Curr Opin Rheumatol**, v. 34, n. 6, p. 328-336, 2022.

Wei L.; Abraham D.; Ong V. The Yin and Yang of IL-17 in Systemic Sclerosis. **Front Immunol**, 2022.

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, 2010.

Wu, M. *et al.* A rosiglitazone anula a esclerodermia induzida por bleomicina e bloqueia respostas profibróticas por meio do receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma. **Am J Pathol**, v. 2, n. 2, p. 519-533, 2009.

Xing, X. *et al.* IFN- γ + IL-17+ Th17 cells regulate fibrosis through secreting IL-21 in systemic scleroderma. **J Cell Mol Med**, v. 24, n. 23, 2020.

Zimmermann, A. F.; Pizzichini, M. M. M. Atualização na etiopatogênese da esclerose sistêmica. **Revista brasileira de reumatologia**, v. 53, n. 6, p. 516–524, 2013.

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

APÊNDICES

APÊNDICE A- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) PARA PACIENTES COM ESCLEROSE SISTÊMICA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
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 da atividade imunomoduladora e antifibrótica de novos derivados tiazofalimídicos na esclerose sistêmica**, que está sob a responsabilidade do pesquisador Eudes Gustavo Constantino Cunha, residente no endereço Rua Paulo Guerra, número 94, Chã de Cruz, Paudalho - PE, CEP 55.825-000, Telefone: (81) 99786-9635, e-mail: eudesgccunha@outlook.com. Também participam desta pesquisa os pesquisadores: Me. Anderson Rodrigues de Almeida, e-mail: andersonr.almeida@hotmail.com, Dra. Rafaela Silva Guimarães Golçanlves, e-mail: rafa_agg@hotmail.com, Profa. Dra. Andréa Tavares Dantas, e-mail: andreatdantas@gmail.com, Profa. Dra. Angela Luzia Branco Pinto Duarte, e-mail: angelabduarte@hotmail.com, Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo, e-mail: moacyroraculo@gmail.com, disponíveis no telefone: (81) 2126-8346. Está sob a orientação da Profa. Dra. Maira Galdino da Rocha Pitta, Telefone: (81) 99786-9635, e-mail: mgrpitta@gmail.com.

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 rubriche 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.

Você 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. Esta solicitação deverá ser realizada por escrito e assinada.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

- A esclerose sistêmica é uma doença autoimune que acomete principalmente a pele, podendo comprometer também outros órgãos, como pulmão, coração e trato digestivo. Com o passar do tempo, os portadores de esclerose sistêmica podem desenvolver incapacidade para realização de suas atividades tanto de vida diária como profissional. Apesar de rara, a esclerose sistêmica é uma doença grave e ainda sem cura. Por esta razão, nosso objetivo é estudar a ação de novos fármacos em células do sangue e da pele (em caso de biópsia) de pacientes e indivíduos saudáveis.
- Nesta pesquisa serão realizados experimentos com as células presentes no seu sangue que é coletado da sua veia como uma coleta de sangue para exames laboratoriais no dia da consulta médica, sem a necessidade de deslocamento em dia adicional. A coleta de sangue é feita no braço e a quantidade coletada é equivalente a duas colheres de sopa (26 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. As amostras de pele serão obtidas a partir de biópsias que se dará com a uma rápida retirada de 5 milímetros da pele do antebraço. As biópsias serão realizadas por um médico dermatologista. Nenhum medicamento será administrado para realização da pesquisa.
- As coletas serão feitas por profissionais treinados e competentes e orientados para reduzir os 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 amareada no local da coleta. Em caso de danos ocasionados por quaisquer procedimentos envolvendo a pesquisa o paciente terá direito a assistência integral e gratuita.
- Com relação aos benefícios, 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.
- O paciente participante da pesquisa e o médico que o acompanha possui total acesso aos seus dados, bem como resultados de exames, os quais ficarão armazenados sob total sigilo e confidencialidade.

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 (dados clínicos) ficarão armazenados em arquivos no serviço de Reumatologia, sob a responsabilidade da Dra. Andréa Dantas, no ambulatório de Reumatologia do Hospital das Clínicas da UFPE (Av. Prof. Moraes Rêgo, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE, 50670-901), pelo período de mínimo 5 anos.

Nada lhe será pago e nem será cobrado para participar desta pesquisa, pois a aceitação é voluntária, mas fica também garantida a indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extra-judicial. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidas pelos pesquisadores (ressarcimento de transporte e alimentação).

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: (Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br).

(assinatura do pesquisador)

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO (A)

Eu, _____, CPF _____, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e de ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo **Avaliação da atividade imunomoduladora e antifibrótica de novos derivados tiazofalimídicos na esclerose sistêmica**, como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo(a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento/ assistência/tratamento.

Local e data _____

Assinatura do participante: _____

Impressão
digital
(opcional)

Eu sei que posso concordar ou não com o armazenamento de minhas amostras biológicas para pesquisas futuras, sem que minha decisão interfira com meu tratamento. Assim sendo, minha decisão é:

- () Sim, eu concordo com o armazenamento proposto.
() Não, eu não concordo com o armazenamento proposto.

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e o aceite do voluntário em participar. (02 testemunhas não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura:

APÊNDICE B
FICHA CLÍNICA PARA COLETA DE DADOS

FICHA CLÍNICA ESCLEROSE SISTÊMICA

IDENTIFICAÇÃO			
Número da Ficha <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	Data de preenchimento _____/_____/_____	Sexo 1. Masculino 2. Feminino	<input type="checkbox"/>
Registro hospital	Telefone		
Nome do paciente			
Idade (anos) <input type="text"/> <input type="text"/>	Data de Nascimento: _____/_____/_____	CPF _____	
Início do Fenômeno de Raynaud: _____/_____/_____	Tempo FRy (meses): _____	Forma Clínica 1. Cutânea Limitada 2. Cutânea Difusa 3. Sine Escleroderma 4. Overlap (EXCLUIR) 5. Localizada (EXCLUIR)	
Início do sintoma não-FRy: _____/_____/_____	Tempo não-FRy (meses): _____		
Data do diagnóstico: _____/_____/_____	Tempo diagnóstico (meses): _____		
CLASSIFICAÇÃO (paciente precisa preencher um dos 2 critérios)			
ESCLEROSE SISTÊMICA MUITO PRECOCE (VEDOSS)			
Step 1 () Fenômeno de Raynaud () Puffy fingers () FAN positivo		Step 2 () Capilaroscopia anormal () Autoanticorpos específicos	
CRITÉRIOS ACR/EULAR 2013			
() Espessamento da pele dos dedos proximal às MCF			09
() Espessamento da pele dos dedos	() <i>Puffy fingers</i>		02
	() Esclerodactília (distal às MCF mas proximal às IFPs)		04
() Lesão de polpa digital	() Úlceras digitais		02
	() Pitting scars		03
() Telangiectasia			02
() Capilaroscopia alterada			02
() HAP ou DPI	() HAP		02
	() Doença pulmonar intersticial		02
() Fenômeno de Raynaud			03
() Autoanticorpos	() Anticentrômero		03
	() Anti-SCI70		
	() Anti-RNA polimerase III		
TOTAL			
Esclerose Sistêmica se ≥ 9			
AUTOANTICORPOS 1. Positivo 2. Negativo 3. Não realizado			
FAN Título: _____ Padrão: _____	Anti-Sci70 <input type="checkbox"/>	Anti-centrômero <input type="checkbox"/>	Anti-RNA polimerase III <input type="checkbox"/>
Anti-RNP <input type="checkbox"/>	Fator reumatoide <input type="checkbox"/>	Anti-CCP <input type="checkbox"/>	Anti-Ro <input type="checkbox"/>
Anti-DNAs <input type="checkbox"/>	Anti-Sm <input type="checkbox"/>	Outros <input type="checkbox"/>	

FICHA CLÍNICA ESCLEROSE SISTÊMICA

MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS (consultar definições)	
Pele 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/>	Fenômeno de Raynaud 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/>
Úlceras digitais (prévias ou atuais) 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/>	Doença pulmonar intersticial 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/>
Hipertensão arterial pulmonar 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/>	Artrite (prévia ou atual) 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/>
Miopatia 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/>	Comprometimento esofageano 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/>
Crise renal 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/>	Telangiectasias 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/>
Calcinose 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/>	Rodnan: <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
HAQ:	SHAQ:
COMPROMETIMENTO PULMONAR	
TOMOGRAFIA DE TÓRAX DATA: PADRÃO: <input type="checkbox"/> 1. PINE 2. PIU 3. PIU provável 4. Indeterminada para PIU 5. Sem alterações	ESPIROMETRIA DATA: CVF litros: CVF % previsto: DLCO:
ESCALA DE DISPNEIA (MRC) 0 – dispneia com exercícios intensos <input type="checkbox"/> 1 – dispneia quando caminha rápido no plano ou sobe ladeira suave 2 – anda mais devagar que pessoas da mesma idade no plano ou precisa parar para respirar 3- dispneia após andar 90-120m (uma quadra) ou após poucos minutos no plano 4- não sai de casa devido à dispneia ou dispneia ao se vestir	TESTE DE CAMINHADA Data: Distancia percorrida em metros: Distancia percorrida % previsto:
COMPROMETIMENTO VASCULAR PERIFÉRICO	
Fenômeno de Raynaud () Sim () Não	Intensidade do FRy (EVA 0-10 cm)
Úlceras atuais ou prévias () Sim () Não	Número de úlceras em atividade:
Microcicatrices/ pitting scars () Sim () Não	Calcinose () Sim () Não
Necrose/amputação: () Sim () Não	Internamento prévio por comprometimento vascular () Sim () Não
CAPILAROSCOPIA Data: Padrão SD: () Sim () Não Outros achados:	Reabsorção de falanges distais (não decorrente de amputação) () Sim () Não
COMPROMETIMENTO HAP	
ECOCARDIOGRAMA Data: PSAP estimada: Dilatação de câmaras cardíacas: TAPSE:	NT-pro-BNP Data: Valor: () alterado () normal
CATETERISMO Data: PMAP: RVP: Índice cardíaco:	TESTE DE CAMINHADA Data: Distancia percorrida em metros: Distancia percorrida % previsto:
Classe funcional NYHA () Classe I: ausência de sintomas () Classe II: sintomas leves com atividades habituais/ moderados esforços	() Classe III: sintomas com atividades menos intensas que habituais () Classe IV: sintomas mesmo em repouso

FICHA CLÍNICA ESCLEROSE SISTÊMICA

COMPROMETIMENTO TGI			
Esofagite erosiva <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Grau A <input type="checkbox"/> Grau B <input type="checkbox"/> Grau C <input type="checkbox"/> Grau D	Gastroparesia <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não		
Ectasia vascular antral <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	Anemia Data: <input type="checkbox"/> Sim Hb = <input type="checkbox"/> Não Ht =		
Dismotilidade esofageana <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	Supercrescimento bacteriano <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não		
Necessidade de sonda nasoenteral ou gastrostomia <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	Albumina sérica – Data: Resultado:		
COMORBIDADES			
HAS <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	DM <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	Dislipidemia <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	Doença arterial coronariana <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
Hipotireoidismo <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	Doença renal crônica <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	Tabagismo <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não Carga tabágica:	Etilismo <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
MEDICAÇÕES (uso atual)			
1. Sim 2. Não 3. Não sabe informar			
BCC <input type="checkbox"/> Nifedipina <input type="checkbox"/> Anlodipina <input type="checkbox"/> Diltiazem <input type="checkbox"/> Verapamil	IECA <input type="checkbox"/> Captopril <input type="checkbox"/> Enalapril <input type="checkbox"/> Ramipril	BRA <input type="checkbox"/> Losartan <input type="checkbox"/> Valsartan	AAS
Pentoxifilina	Sildenafil ou Tadalafila	Bosentana ou Ambrisentana	Cilostazol
Metotrexato	Azatioprina	Micofenolato	Ciclofosfamida <input type="checkbox"/> oral <input type="checkbox"/> venosa
Hidroxicloroquina	Leflunomida	Corticoide <input type="checkbox"/> Prednisona <input type="checkbox"/> Prednisolona <input type="checkbox"/> Dose atual:	AINE
IBP <input type="checkbox"/> Omeprazol <input type="checkbox"/> Pantoprazol <input type="checkbox"/> Esomeprazol <input type="checkbox"/> Deslanzoprazol <input type="checkbox"/> Vonoprazole	Procinético <input type="checkbox"/> Bromoprida <input type="checkbox"/> Domperidona <input type="checkbox"/> Metoclopramida	Colecalciferol	
Rituximabe	Tocilizumabe	Inibidor de JAK <input type="checkbox"/> Tofacitinibe <input type="checkbox"/> Baricitinibe <input type="checkbox"/> Upadacitinibe	IVIG

FICHA CLÍNICA ESCLEROSE SISTÊMICA

Outros

	DIREITO				ESQUERDO			
	0	1	2	3	0	1	2	3
Dedos								
Dorso das mãos								
Antebraço								
Braço								
Face								
Tórax anterior								
Abdome								
Coxa								
Perna								
Dorso dos pés								

ESCORE DE RODNAN:

FICHA CLÍNICA ESCLEROSE SISTÊMICA

HAQ – Health Assessment Questionnaire

Atividade	Sem dificuldade 0	Pouca dificuldade 1	Muita dificuldade 2	Não consegue 3	Maior valor
1. Vestir-se, inclusive amarrar os cordões dos sapatos e abotoar as roupas					
2. Lavar sua cabeça e seus cabelos					
3. Levantar-se de maneira ereta de uma cadeira de encosto reto e sem braços					
4. Deitar-se e levantar-se da cama					
5. Cortar pedaços de carne					
6. Levar à boca um copo ou xícara cheio de café, leite ou água					
7. Abrir um saco (caixa) de leite comum					
8. Caminhar em lugares planos					
9. Subir 5 degraus					
10. Lavar e secar seu corpo após o banho					
11. Tomar banho de chuveiro					
12. Sentar-se e levantar-se de um vaso sanitário					
13. Levantar os braços e pegar um objeto de aproximadamente 2,5 quilos que está posicionado pouco acima da cabeça					
14. Curvar-se para pegar roupas no chão					
15. Segurar-se em pé no ônibus ou metrô					
16. Abrir potes ou vidros de conservas que tenham sido previamente abertos					
17. Abrir e fechar torneiras					
18. Fazer compras nas redondezas onde mora					
19. Entrar e sair de um ônibus					
20. Realizar tarefas tais como usar vassoura para varrer e ou rodo para a água					
SOMATÓRIO					
SOMATÓRIO DIVIDIDO POR 8 (RESULTADO DO HAQ)					

Na semana passada, quanto os seus problemas com o Fenômeno de Raynaud (dedos que alternam de cor entre roxo, pálido e vermelho pelo frio) interferiram nas suas atividades?

Nenhum incômodo 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 Gravidade extrema

Na semana passada, quanto os seus problemas com as feridas nos dedos interferiram nas suas atividades?

Nenhuma gravidade 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 Gravidade extrema

Na semana passada, quanto os seus problemas gastrointestinais interferiram nas suas atividades?

Nenhuma gravidade 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 Gravidade extrema

Na semana passada, quanto os seus problemas com os pulmões interferiram nas suas atividades?

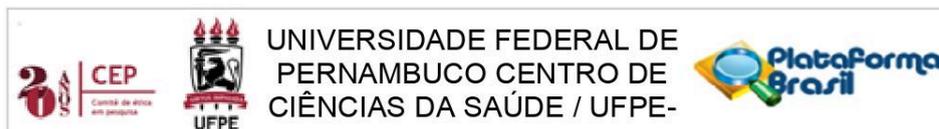
Nenhuma dor 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 Gravidade extrema

Na semana passada, quanto o conjunto de seus problemas causados pela esclerodermia interferiram nas suas atividades?

Nenhuma gravidade 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 Gravidade extrema

ANEXOS

**ANEXO A- PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
DA UFPE**



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOMODULADORA E ANTIFIBRÓTICA DE NOVOS DERIVADOS TIAZOFTALIMÍDICOS NA ESCLEROSE SISTÊMICA

Pesquisador: EUDES GUSTAVO CONSTANTINO CUNHA

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 96111118.0.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Patrocinador Principal: CONS NAC DE DESENVOLVIMENTO CIENTIFICO E TECNOLÓGICO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.937.516

Apresentação do Projeto:

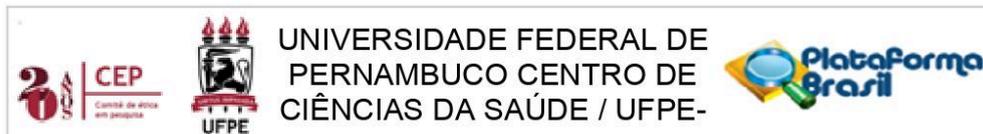
Trata-se de um projeto de pesquisa do Doutorando EUDES GUSTAVO CONSTANTINO CUNHA, cuja finalidade é a obtenção do título de doutorado em inovação terapêutica, do Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco. Orientadora: Profa. Dra. Maira Galdino da Rocha Pitta e Co-orientadores: Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo Profa. Dra. Andréa Tavares Dantas.

O objetivo geral do estudo é avaliar os aspectos imunobiológicos da esclerose sistêmica para a identificação de biomarcadores e de alvos terapêuticos com novos derivados TIAZOFTALIMÍDICOS . (atividade imunomoduladora e antifibrótica)

A esclerose sistêmica (ES) é uma desordem complexa do tecido conjuntivo de natureza autoimune, caracterizada essencialmente por fibrose da pele e de órgãos internos. É considerada uma das mais graves doenças reumáticas autoimunes devido a seu grande impacto na morbimortalidade dos pacientes. Possui maiores índices de incidência em pacientes do sexo feminino entre 30 e 50 anos. O complexo processo patológico da ES é resultado da interação de três mecanismos principais: vasculopatia, autoimunidade e fibrose tecidual.

Atualmente, as opções terapêuticas para a ES se concentram basicamente no tratamento sintomático, evidenciando a necessidade de estudos que objetivem a descoberta de novos fármacos e alvos terapêuticos. O presente estudo se propõe a avaliar IN VITRO a atividade imunomoduladora de novos derivados tiazoftalimídicos, cujos compostos serão sintetizados no

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 2.937.516

Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos da UFPE (LPSF-UFPE) para a realização de testes biológicos pelos pesquisadores no projeto.

Serão incluídos 40 pacientes, maiores de 18 anos, com diagnóstico de Esclerose Sistêmica e em acompanhamento regular no ambulatório de pesquisa clínica do Serviço de Reumatologia do HC-UFPE. O grupo controle será formado por 20 voluntários saudáveis, que não tenham história clínica ou diagnóstico de ES, doença inflamatória crônica de caráter reumatológico autoimune ou histórico familiar. Serão selecionados aleatoriamente na população que frequenta o HC, acompanhando pacientes em atendimento.

Os seguintes procedimentos estão minuciosamente detalhados no projeto: Coleta de sangue e cultura de células mononucleares do sangue periférico, Biópsia de pele e cultura de fibroblastos (O grupo de voluntários saudáveis será constituído por 10 indivíduos submetidos à cirurgia plástica no Serviço de Cirurgia Plástica do HC/UFPE). As sobras de pele serão transportadas ao laboratório para o isolamento dos fibroblastos, Determinação de citocinas (As citocinas presentes no soro e sobrenadante das culturas (PBMCs e fibroblastos cutâneos serão quantificadas) e Imunofluorescência (Fibroblastos cutâneos serão plaqueados sob lamínulas). Após a incubação, as células serão estimuladas com TGF- e expostas ou não aos derivados tiazofalimídicos nas concentrações não tóxicas por 48 horas.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo geral: Avaliar a atividade imunomoduladora e antifibrótica de novos derivados tiazofalimídicos na esclerose sistêmica.

Objetivos específicos

Avaliar a atividade imunomoduladora in vitro de novos derivados tiazofalimídicos na produção de citocinas e quimiocinas envolvidas com o processo fibrótico na ES;

Avaliar a atividade antifibrótica in vitro de novos derivados tiazofalimídicos na produção de citocinas e quimiocinas envolvidas com o processo fibrótico na ES;

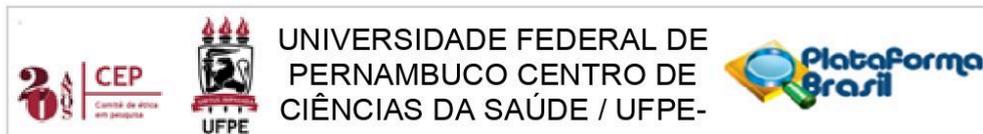
Avaliar a atividade antifibrótica in vitro de novos derivados tiazofalimídicos na expressão de marcadores fibróticos;

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Os riscos envolvidos na pesquisa são referentes às coletas de sangue ou biópsias de pele, como hematomas e dor. As coletas serão feitas por profissionais devidamente treinados para redução dos riscos.

Benefícios: Os benefícios estão relacionados com a possibilidade da identificação de um agente

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 2.937.516

terapêutico para tratamento da ES e novos alvos terapêuticos, além de acrescentar conhecimentos sobre a fisiopatogênese da doença.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um estudo que visa avaliar os aspectos imunobiológicos da esclerose sistêmica para a identificação de biomarcadores e de novos alvos terapêuticos, cujos resultados poderão contribuir para o tratamento de Esclerose Sistêmica.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Folha de Rosto : Preenchida de forma adequada.

TCLE para pacientes com e sem diagnóstico de ES redigido de forma adequada;

Curriculum vitae dos pesquisadores na plataforma lattes;

Cartas de anuência do Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica, Serviço de Reumatologia do HC e Serviço de Cirurgia Plástica do HC anexadas,

Termo de Compromisso anexado;

Cronograma: coleta de dados programada para o período de julho de 2021 a março de 2022;

Orçamento: Estimado em R\$ 27.757,65 referente a insumos laboratoriais e material de escritório sob a responsabilidade do pesquisador principal. O projeto de pesquisa será financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) processo nº427457/2016-5. O NUPIT/LINAT dispõe de equipamentos e demais insumos necessários à pesquisa não relacionados no orçamento apresentado.

Recomendações:

Sem recomendação.

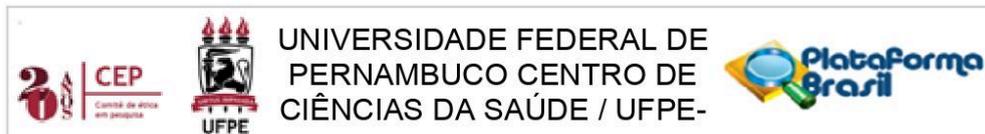
Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

O Protocolo foi avaliado na reunião do CEP e está APROVADO para iniciar a coleta de dados. Informamos que a APROVAÇÃO DEFINITIVA do projeto só será dada após o envio da Notificação com o Relatório Final da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final para enviá-lo via "Notificação", pela Plataforma Brasil. Siga as instruções do link "Para enviar Relatório Final", disponível no site do CEP/UFPE. Após apreciação desse relatório, o CEP emitirá novo Parecer Consubstanciado definitivo pelo sistema Plataforma Brasil.

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 2.937.516

Informamos, ainda, que o (a) pesquisador (a) deve desenvolver a pesquisa conforme delineada neste protocolo aprovado, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao voluntário participante (item V.3., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

Eventuais modificações nesta pesquisa devem ser solicitadas através de EMENDA ao projeto, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

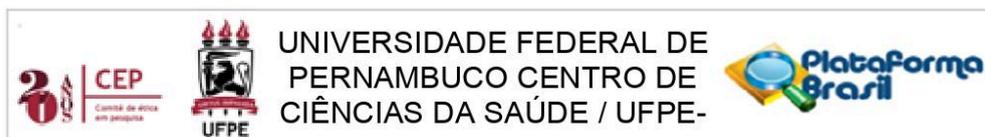
Para projetos com mais de um ano de execução, é obrigatório que o pesquisador responsável pelo Protocolo de Pesquisa apresente a este Comitê de Ética, relatórios parciais das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação (item X.1.3.b., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

O CEP/UFPE deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (item V.5., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). É papel do/a pesquisador/a assegurar todas as medidas imediatas e adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e ainda, enviar notificação à ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, junto com seu posicionamento.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1168343.pdf	17/08/2018 11:03:51		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Doutorado_PPGIT_CEP_Eudes.pdf	14/08/2018 17:36:46	EUDES GUSTAVO CONSTANTINO CUNHA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEMajores18_Pacientes.doc	14/08/2018 17:36:23	EUDES GUSTAVO CONSTANTINO CUNHA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_impossibilitadosassinar_Pacientes.doc	14/08/2018 17:36:08	EUDES GUSTAVO CONSTANTINO CUNHA	Aceito
Outros	AutorizacaoUsodeDados.pdf	14/08/2018 17:33:24	EUDES GUSTAVO CONSTANTINO CUNHA	Aceito
Outros	DeclaracaodeVinculoDoutoradoPPGIT.pdf	13/08/2018 09:23:48	EUDES GUSTAVO CONSTANTINO CUNHA	Aceito
Outros	CurriculoLattesEudesGustavoConstant	13/08/2018	EUDES GUSTAVO	Aceito

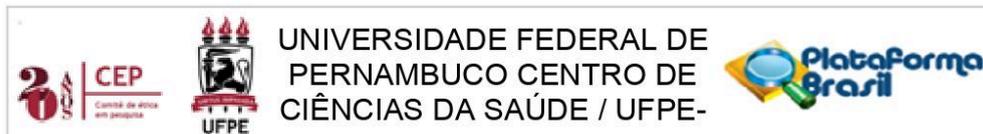
Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 2.937.516

Outros	inoCunha.pdf	09:22:19	CONSTANTINO CUNHA	Aceito
Outros	CurriculoLattesRafaelaGoncalves.pdf	13/08/2018 09:22:04	EUDES GUSTAVO CONSTANTINO CUNHA	Aceito
Outros	CurriculoLattesMoacyrRego.pdf	13/08/2018 09:21:18	EUDES GUSTAVO CONSTANTINO CUNHA	Aceito
Outros	CurriculoLattesMichellyCristinyPereira.pdf	13/08/2018 09:20:44	EUDES GUSTAVO CONSTANTINO CUNHA	Aceito
Outros	CurriculoLattesMarinaGaldinodaRochaPitta.pdf	13/08/2018 09:19:44	EUDES GUSTAVO CONSTANTINO CUNHA	Aceito
Outros	CurriculoLattesMairaGaldinodaRochaPitta.pdf	13/08/2018 09:19:15	EUDES GUSTAVO CONSTANTINO CUNHA	Aceito
Outros	CurriculoLattesIvandaRochaPitta.pdf	13/08/2018 09:18:43	EUDES GUSTAVO CONSTANTINO CUNHA	Aceito
Outros	CurriculoLattesAngelaDuarte.pdf	13/08/2018 09:18:09	EUDES GUSTAVO CONSTANTINO CUNHA	Aceito
Outros	CurriculoLattesAndreaTavaresDantas.pdf	13/08/2018 09:17:06	EUDES GUSTAVO CONSTANTINO CUNHA	Aceito
Outros	CurriculoLattesAndersonRodriguesdeAlmeida.pdf	13/08/2018 09:16:16	EUDES GUSTAVO CONSTANTINO CUNHA	Aceito
Outros	JustificativaUtilizacaoFuturadeAmostras.pdf	13/08/2018 09:10:46	EUDES GUSTAVO CONSTANTINO CUNHA	Aceito
Outros	TermodeCompromissoeConfidencialidade.pdf	13/08/2018 09:08:02	EUDES GUSTAVO CONSTANTINO CUNHA	Aceito
Outros	CartaAnuenciaReumatologia.pdf	13/08/2018 09:06:23	EUDES GUSTAVO CONSTANTINO CUNHA	Aceito
Outros	CartaAnuenciaNUPIT.pdf	13/08/2018 09:04:46	EUDES GUSTAVO CONSTANTINO CUNHA	Aceito
Outros	CartaAnuenciaCirurgiaPlastica.pdf	13/08/2018 09:04:05	EUDES GUSTAVO CONSTANTINO CUNHA	Aceito
Declaração do Patrocinador	DeclaracaoDoPatrocinador.pdf	13/08/2018 09:01:21	EUDES GUSTAVO CONSTANTINO CUNHA	Aceito
Folha de Rosto	FolhadeRosto_Eudes_NAP.pdf	13/08/2018	EUDES GUSTAVO	Aceito

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 2.937.516

Folha de Rosto	FolhadeRosto_Eudes_NAP.pdf	08:58:24	CONSTANTINO CUNHA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_impossibilitadosassinar_Controle s.doc	12/07/2018 14:44:21	EUDES GUSTAVO CONSTANTINO CUNHA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEMaiores18_Controles.doc	12/07/2018 14:44:01	EUDES GUSTAVO CONSTANTINO CUNHA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 04 de Outubro de 2018

Assinado por:
LUCIANO TAVARES MONTENEGRO
 (Coordenador(a))

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br

ANEXO B

PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UFPE



Universidade Federal de Pernambuco
 Centro de Biociências
 Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
 50670-420 / Recife - PE - Brasil
 Fones: 2126 8842
 ceua@ufpe.br

Recife, 30 de outubro de 2022

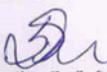
Ofício nº 90/22

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Prof. Michelly Cristiny Pereira
 Departamento de Fisiologia e Farmacologia
 Processo nº0067/2022

Certificamos que a proposta intitulada “**investigação dos efeitos imunomodulador e antifibrótico de novas alternativas terapêuticas na esclerose sistêmica**”. Registrado com o nº0067/2022 sob a responsabilidade da Prof. **Michelly Cristiny Pereira** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 25/10/2022

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da autorização	25/10/2022 a 01/02/2024
Espécie/linhagem/raça	Camundongos swiss, Balb-c, e Black 6 (C57BL/6)
Nº de animais	450 (200 swiss, 100 Balb-c, 150 Black)
Peso/Idade	Swiss: 25-30 g (6-8 semanas) Balb-c: 20-30g (6-8 semanas) Black: 20-30g (8-12 semanas)
Sexo	Swiss (100 machos e 100 fêmeas) Balb-c (100 fêmeas) Black (100 machos e 50 fêmeas)
Origem: Biotério de Criação	Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia UFPE
Destino: Biotério de Experimentação	Departamento de Fisiologia e Farmacologia UFPE

Atenciosamente


 Prof. Sebastião R. F. Silva
 Presidente CEUA/UFPE
 SIAPE 2345691

