



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

JULIANA RENATA DA SILVA FERREIRA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IMUNOMODULADOR *EX*
VIVO DO IBPA NA ESCLEROSE SISTÊMICA**

Recife
2023

JULIANA RENATA DA SILVA FERREIRA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IMUNOMODULADOR *EX*
VIVO DO IBPA NA ESCLEROSE SISTÊMICA**

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

Orientador: Dr. Anderson Rodrigues de Almeida.

Co-orientadora: Profa. Dra. Michelly Cristiny Pereira

Recife
2023

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

Silva Ferreira, Juliana Renata da.

Avaliação do potencial imunomodulador ex vivo do IBPA na esclerose sistêmica / Juliana Renata da Silva Ferreira. - Recife, 2023.

79 p. : il., tab.

Orientador(a): Anderson Rodrigues de

AlmeidaCooorientador(a): Michelly

Cristiny Pereira

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal dePernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 2023.

Inclui referências, apêndices, anexos.

1. IBPA. 2. Esclerose sistêmica. 3. Citocinas. 4. Inovação Terapêutica. I. Almeida, Anderson Rodrigues de. (Orientação). II. Pereira, Michelly Cristiny .(Coorientação). IV. Título.

610 CDD (22.ed.)

JULIANA RENATA DA SILVA FERREIRA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IMUNOMODULADOR EX
VIVO DO IBPA NA ESCLEROSE SISTÊMICA**

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

Aprovada em: 19/09/2023

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Dr Anderson Rodrigues de Almeida
Universidade Federal de Pernambuco
Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino (NUPIT-SG)

Prof.(a) Dra. Andréa Tavares Dantas
Universidade Federal de Pernambuco
Hospital das Clínicas - Serviço de Reumatologia

Dr.^a Sayonara Maria Calado Gonçalves
Universidade Federal de Pernambuco
Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino (NUPIT-SG)

Mestranda Maria Eduarda De Oliveira Gonçalves.
(Suplente)
Universidade Federal de Pernambuco
Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino (NUPIT-SG)

Dedico este trabalho aos meus pais, minha irmã, minha filha, meu esposo e a toda minha família que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus em primeiro lugar, por iluminar e abençoar meu caminho durante esta longa caminhada. A razão da minha existência, agradeço por Teu amparo, esta vitória jamais seria possível se não fosse por sua graça e misericórdia! Obrigada por me carregar no colo nos momentos difíceis, por me fazer compreender que TUDO tem o seu TEMPO.

Aos meus pais, minha mãe, Josefa Maria da Silva Ferreira, o meu grande amor e a razão da minha vida. Minha inspiração e a que nunca mediu esforços para oferecer a melhor educação e suporte na minha vida. E meu pai, José Cícero Ferreira Filho, pela força e confiança que em mim sempre depositou. Tudo o que sou hoje devo a vocês.

À minha irmã gêmea, Júlia Roberta, pela ajuda, confiança e apoio que me ajudaram a vencer os inúmeros obstáculos que encontrei pela frente, e que em muito me ajudou e incentivou a prosseguir até ao fim.

À minha filha, Maria Laura da Silva Ferreira, que mesmo pequena e inocente, sempre me dizia: “Mamãe vai dá certo”. Minha pequeninha, iluminou de maneira especial os meus pensamentos me levando a buscar ainda mais o conhecimento. Você se tornou a razão de toda minha luta. Obrigada pelos sorrisos, abraços e tantos momentos maravilhosos que passamos juntas. Quando o cansaço tomava conta em minhas madrugadas de estudo bastava te olhar para ter ânimo e força. Mamãe te ama demais!

Ao meu esposo, Ricardo Severino, que de forma especial e companheira me deu força e coragem, me apoiando nos momentos de dificuldades. Muito obrigado por entender meus momentos de ansiedade e stress. Mesmo em dias sacrificantes as únicas palavras proferidas foram de motivação.

Aos meus avós, minha mãe-avó, Maria Luzia, obrigada por sempre fazer dos meus sonhos os seus, por todas as orações e interseções a Deus e Nossa Senhora. E meu avô, pai-avô, Julião, que do seu jeitinho sempre expressou torcida pelas minhas vitórias.

À toda minha família, tios, tias, primos e primas, sou muito abençoada de ter vocês, e levarei a “Família Julião” comigo por onde eu for.

Aos grandes amigos que fiz nessa graduação, Michelly Lopes e Caíque Tavares. Nosso trio tornou a trajetória mais leve e boa de ser vivida. Muito

obrigada por toda amizade e apoio incondicional.

À Universidade Federal de Pernambuco e ao Centro de Biociências, por possibilitarem que eu desbravasse e me apaixonasse cada vez mais pela profissão que escolhi.

Aos meus professores, grandes mestres, desde o ensino fundamental, ensino médio e durante a graduação, que me proporcionaram a formação necessária para poder alcançar os conhecimentos indispensáveis à conclusão do meu curso.

Ao meu orientador Anderson Rodrigues por me aceitar como orientanda que tanto me ajudou e acompanhou, transmitindo-me o saber e a orientação científica fundamentais.

À minha coorientadora, professora Dr^a Michelly Cristiny Pereira pelo grande apoio, confiança e pelas oportunidades para minha formação.

A todos que compõem o LINAT/NUPIT, em especial a Maria Eduarda, por compartilhar seus conhecimentos e experiências, e pela inestimável ajuda na realização dos experimentos.

Ao Hospital das Clínicas da UFPE pela parceria com o estudo.

A todas as pacientes com esclerose sistêmica que participaram do estudo, pela disponibilidade e colaboração, sem os quais seria impossível a realização do projeto.

Por fim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para minha formação profissional/acadêmica e pessoal, serei eternamente grata.

“Coragem! E sede fortes. Nada vos atemorize, e não os temais, porque é o Senhor, vosso Deus, que marcha à vossa frente: ele não vos deixará nem vos abandonará”.
(Deuteronômio 31:6)

FERREIRA, Juliana Renata da Silva. **AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IMUNOMODULADOR EX VIVO DO IBPA NA ESCLEROSE SISTÊMICA**. 2023. (75). Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2023.

RESUMO

A Esclerose sistêmica (ES) é uma doença do tecido conjuntivo, caracterizada pela fibrose da pele e de órgãos internos, alterações vasculares e presença de autoanticorpos. Poucas terapias eficazes existem até o momento para tratamento da ES, e a maior parte é direcionada para os sintomas. Dessa forma, o objetivo do trabalho é avaliar a atividade imunomoduladora *ex vivo* do híbrido IBPA (ibuprofeno + paracetamol) em células de pacientes com esclerose sistêmica. Foram incluídos no estudo 12 pacientes com ES atendidos no ambulatório de Esclerose Sistêmica do Serviço de Reumatologia, no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco. A cultura de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) foram isoladas a partir do sangue por centrifugação com Ficoll Paque TM Plus (GE HealthcareBio-Sciences). As células isoladas foram cultivadas em placas de 24 poços (10^6 células/1000 μ L) em meio RPMI 1640, suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal em estufa de CO₂ 5% a 37°C. Após o plaqueamento 24 poços, foram estimuladas com anti-CD3 e anti-CD28 (Invitrogen eBioscience™) e foram tratadas ou não com IBPA (50 μ M), Ibuprofeno (28,8 μ M), Paracetamol (21,2 μ M) e Ibuprofeno com Paracetamol em mistura física (28,8 μ M e 21,2 μ M, respectivamente). Após 48 horas, as placas foram centrifugadas para coleta dos sobrenadantes que foram armazenados a -80°C para posterior dosagem por ELISA das citocinas/quimiocinas IL-4, IL-6, IL-8 e CCL-2. Observamos que para IL-6 o grupo estimulado com anti-CD3/CD28 teve secreção aumentada da citocina quando comparado ao grupo que não recebeu estímulo (células) (**p=0,0098). Em seguida, avaliou-se o tratamento com o IBPA, que reduziu significativamente os níveis da IL-6 em comparação com as condições estimuladas com anti-CD3/CD28 (**p=0,005). Para CCL-2, o grupo estimulado não teve diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo que recebeu apenas células. Já o tratamento com o híbrido IBPA reduziu significativamente os níveis da CCL-2 nas condições apenas estimuladas (**p=0,005). Para IL-8 o grupo estimulado com anti-CD3/CD28 foi significativamente maior quando comparado ao grupo que recebeu apenas células (**p=0,005). O tratamento com o híbrido IBPA reduziu significativamente os níveis da IL-8 em comparação com a condição estimulada com CD3/CD28 (**p=0,0093). Para a IL-4, o grupo estimulado com CD3/CD28 não teve diferença estatística quando comparado ao grupo que recebeu apenas células. O tratamento com o IBPA não alterou significativamente a secreção da IL-4 quando comparado com a condição de estímulo. Sendo assim, foi possível verificar que o tratamento com o híbrido IBPA em PBMC de pacientes com ES promoveu redução significativa nos níveis de IL-6, IL-8 e CCL2, evidenciando importante atividade imunomoduladora e sugerindo seu potencial terapêutico na doença. Não foram observados efeitos do tratamento do híbrido IBPA na secreção da citocina IL-4.

Palavras-chave: IBPA. Esclerose sistêmica. Citocinas. Inovação Terapêutica.

FERREIRA, Juliana Renata da Silva. **AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IMUNOMODULADOR EX VIVO DO IBPA NA ESCLEROSE SISTÊMICA**. 2023.(75). Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2023.

ABSTRACT

Systemic sclerosis (SSc) is a connective tissue disease, characterized by fibrosis of the skin and internal organs, vascular changes and the presence of autoantibodies. Few effective therapies exist to date for treating SSc, and most are targeted at symptoms. Therefore, the objective of the work is to evaluate the ex vivo immunomodulatory activity of the hybrid IBPA (ibuprofen + paracetamol) in cells from patients with systemic sclerosis. The study included 12 patients with SSc treated at the Systemic Sclerosis outpatient clinic of the Rheumatology Service, at the Hospital das Clínicas of the Federal University of Pernambuco. Cultured peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from blood by centrifugation with Ficoll Paque TM Plus (GE HealthcareBio-Sciences). The isolated cells were cultivated in 24-well plates (10^6 cells/1000 μ L) in RPMI 1640 medium, supplemented with 10% Fetal Bovine Serum in a 5% CO₂ oven at 37°C. After plating 24 wells, they were stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 (Invitrogen eBioscience™) and were treated or not with IBPA (50uM), Ibuprofen (28.8uM), Paracetamol (21.2uM) and Ibuprofen with Paracetamol in physical mixture (28.8uM and 21.2uM, respectively). After 48 hours, the plates were centrifuged to collect the supernatants, which were stored at -80°C for subsequent measurement by ELISA of the cytokines/chemokines IL-4, IL-6, IL-8 and CCL-2. We observed that for IL-6, the group stimulated with anti-CD3/CD28 had increased secretion of the cytokine when compared to the group that did not receive stimulation (cells) (**p=0.0098). Next, treatment with IBPA was evaluated, which significantly reduced IL-6 levels compared to conditions stimulated with anti-CD3/CD28 (**p=0.005). For CCL-2, the stimulated group had no statistically significant difference when compared to the group that received only cells. Treatment with the hybrid IBPA significantly reduced CCL-2 levels in only stimulated conditions (**p=0.005). For IL-8, the group stimulated with anti-CD3/CD28 was significantly higher when compared to the group that received only cells (**p=0.005). Treatment with the hybrid IBPA significantly reduced IL-8 levels compared to the condition stimulated with CD3/CD28 (**p=0.0093). For IL-4, the group stimulated with CD3/CD28 had no statistical difference when compared to the group that received only cells. Treatment with IBPA did not significantly alter IL-4 secretion when compared to the stimulus condition. Therefore, it was possible to verify that treatment with the hybrid IBPA in PBMC of SSc patients promoted a significant reduction in the levels of IL-6, IL-8 and CCL2, demonstrating important immunomodulatory activity and suggesting its therapeutic potential in the disease. No effects of hybrid IBPA treatment on IL-4 cytokine secretion were observed.

Key words: IBPA. Systemic sclerosis. Cytokines. Therapeutic Innovation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Fisiopatogênese da esclerose sistêmica. Interação entre vasculopatia, desregulação imunológica e fibrose.....	18
Figura 2 – Principais manifestações clínicas da esclerose sistêmica.....	24
Figura 3 – Cascata do ácido araquidônico	31
Figura 4 – Desenho esquemático do delineamento do estudo.....	35
Figura 5 – Avaliação da atividade imunomoduladora em culturas de PBMC de pacientes com ES (Níveis de IL6).....	42
Figura 6 – Avaliação da atividade imunomoduladora em culturas de PBMC de pacientes com ES (Níveis de IL4).....	43
Figura 7 – Avaliação da atividade imunomoduladora em culturas de PBMC de pacientes com ES (Níveis de CCL-2).....	45
Figura 8 – Avaliação da atividade imunomoduladora em culturas de PBMC de pacientes com ES (Níveis de IL-8).....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Critérios de classificação para a esclerose sistêmica.....	.28
Tabela 2 – Citocinas avaliadas pela técnica ELISA, fabricantes e limites de detecção.....	.38
Tabela 3 – Características clínicas de pacientes com Esclerose Sistêmica do estudo (n=12).....	.40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACR	Colégio Americano de Reumatologia (Do inglês <i>American College of Rheumatology</i>)
AINEs	Anti-inflamatórios Não Esteroides
AM404	N-acilfenolamina
ANA	Anticorpo antinuclear
BCC	Bloqueadores dos canais de cálcio BRA
DHE	Dihidroetídio
DPI	Doença Pulmonar Intersticial
EULAR	Liga Europeia Contra o Reumatismo (Do inglês <i>European League Against Rheumatism</i>)
anti-CENP	Anticorpos anti-centrômero
anti-Scl70	Anticorpos anti-topoisomerase I
anti-RNAP	Anti-RNA polimerase
BCC	Bloqueador de Canal de Cálcio
BRA	Bloqueador do receptor de angiotensina
CD	Cutânea Difusa
CL	Cutânea Limitada
COX	Ciclooxigenase
CPU	Capiloscopia periungueal
CRE	Crise renal esclerodérmica
CTGF	Fator de crescimento do tecido conjuntivo (Do inglês <i>connective tissue growth factor</i>)
DPI	Doença Pulmonar Intersticial
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
EULAR	<i>European League Against Rheumatism</i>
ES	Esclerose sistêmica
FAAH	Amido hidrolase do ácido graxo
FRy	Fenômeno de Raynaud
FPI	Fibrose pulmonar idiopática
HAP	Hipertensão arterial pulmonar
GC	Glicocorticóides
IBP	Inibidor de Bomba de Prótons

ICAM	Moléculas de adesão intracitoplasmática
IECA	Inibidor da Enzima Conversora de Angiotensina
IFN- γ	Interferon gama
IL	Interleucinas
IP-10	Proteína induzida por interferon gama (Do inglês <i>Interferon gamma-induced protein</i>)
MEC	Matriz extracelular
MHC	Complexo de histocompatibilidade
MIG	Monocina induzida por interferon gama (Do inglês <i>Monokine induced by interferon gamma</i>)
PBMC	Células mononucleadas do sangue periférico
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas (Do inglês <i>Platelet-derived growth factor</i>)
PGs	Prostaglandinas
PGE2	Prostaglandina E2
ROS	Espécies reativas de oxigênio (Do inglês <i>Reactive oxygen</i>)
SFB	Soro Fetal Bovino
SIL-6R	Receptor solúvel da Il-6
TC	Tomografia Computadorizada
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TGF- β	Fator de crescimento beta (Do inglês <i>transforming growth factor beta</i>)
Th	Linfócitos T <i>helper</i>
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
VCAM-1	Proteína de adesão de célula vascular 1

SUMÁRIO

1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
1.1	ESCLEROSE SISTÊMICA.....	14
1.1.1	Epidemiologia.....	16
1.1.2	Etiopatogenia.....	16
1.1.3	Fisiopatologia.....	17
1.1.4	Manifestações Clínicas.....	23
1.1.5	Diagnóstico.....	26
1.1.6	Tratamento Farmacológico.....	28
1.1.7	Anti-inflamatórios não esteroides (AINES).....	30
2	OBJETIVOS.....	34
2.1	GERAL.....	34
2.2	ESPECÍFICOS.....	34
3	METODOLOGIA.....	35
3.1	TIPO DE ESTUDO.....	35
3.2	LOCAL E PERÍODO DO ESTUDO.....	35
3.3	POPULAÇÃO DO ESTUDO.....	36
3.3.1	Pacientes com Esclerose Sistêmica.....	36
3.3.2	Coleta de dados clínicos.....	36
3.4	ENSAIOS <i>EX VIVO</i>	36
3.4.1	Compostos sintéticos.....	36
3.4.2	Coleta de sangue e cultura de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs).....	37
3.4.3	Dosagem de Citocinas/Quimiocinas	37
3.5	ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	38
3.6	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	38
4	RESULTADOS.....	40
5	DISCUSSÃO.....	48

6	CONCLUSÃO.....	52
7	PERSPECTIVAS.....	53
	REFERÊNCIAS.....	54
	APÊNDICES.....	62
	APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) PARA PORTADORES DA ESCLEROSE SISTÊMICA.....	63
	APÊNDICE B – FICHA CLÍNICA PARA COLETA DE DADOS.....	65
	ANEXOS.....	68
	ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UFPE.....	69

1 INTRODUÇÃO

A esclerose sistêmica (ES) é uma doença reumatológica que acomete o tecido conjuntivo, provocando fibrose não só na pele, mas também de órgãos internos, como nos pulmões, no trato gastrointestinal, nos vasos sanguíneos, no coração e até mesmo nos rins (Benfaremo *et al.*; 2022). É representada por três características principais: lesão vascular, autoimunidade (celular e humoral) e fibrose tecidual, onde a soma desses eventos resulta na heterogeneidade da expressão fenotípica da doença. A fibrose caracteriza-se por deposição excessiva de matriz extracelular (MEC), onde este processo ocorre fisiologicamente no organismo como o resultado final de inflamação ou dano ao tecido, originando em tecido cicatricial. Na ES há desregulação deste processo culminando em fibrose patológica de forma multissistêmica (Henderson; Rieder; Wynn, 2020).

Os mecanismos fisiopatológicos da ES envolvem alterações vasculares e desregulação autoimune, com participação de múltiplas citocinas. Os linfócitos T e os macrófagos/ monócitos atuam como importantes reguladores na fibrose tecidual por influenciar na iniciação, manutenção e reparo do tecido lesionado. A regulação dessas células é mediada por meio da produção de citocinas e quimiocinas inflamatórias por linfócitos T *helper* (Th) que possui diferentes perfis de respostas no organismo, em destaque, os perfis Th1, Th2 e Th17 (Cutolo; Soldano; Smith, 2019). Várias citocinas e quimiocinas (IL-4, IL-6, IL-8 e CCL2) são moléculas envolvidas na patogênese da ES, no entanto não há ainda uma caracterização do perfil de citocinas, e isto implica em dificuldade de se descobrir novos alvos terapêuticos, o que por sua vez implica em escassez de terapias específicas para a doença.

Os pacientes acometidos pela ES são classificados em dois fenótipos diferentes de acordo com a extensão do comprometimento de pele: cutânea limitada (CL) e cutânea difusa (CD). Em linhas gerais, os pacientes CL exibem fibrose limitada a face, pescoço, extremidades distais dos joelhos e cotovelos, e eventuais lesões em órgãos internos. Já os pacientes com a forma CD, possuem um grau fibrótico mais elevado, possuindo tecido fibrótico que se estende por todo o tegumento, bem como, graves lesões em órgãos internos (Benfaremo *et al.*, 2022)

Atualmente, não existe uma cura para a ES e o tratamento é geralmente baseado no controle dos sintomas e na prevenção de suas complicações. Isso se deve à ausência de agentes farmacológicos que possuam atividade direta no bloqueio da fibrose, a manifestação mais importante da ES (Volkman; Bukiri, 2022)

Os anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) tem como efeito principal diminuir a síntese de prostaglandinas através da inibição reversível da COX, seu uso está vinculado ao controle da inflamação e alívio dos sintomas propiciando retardo da evolução da doença. Neste contexto, o híbrido IBPA, através dos mecanismos de ação do ibuprofeno e paracetamol, sugere efeito farmacológico imunomodulador. O Ibuprofeno, é um AINE que inibe a produção de prostaglandinas por ter maior seletividade pela COX2, reduzindo assim, a inflamação (Rang *et al*, 2019). Já o paracetamol, que também é um AINE, por meio do sistema endocanabinoide propicia a inibição da recaptção da anandamida e sua subsequente acumulação no organismo, resultando em um aumento das concentrações desse endocanabinóide, potencializando seus efeitos fisiológicos, corroborando para ação antinociceptivo no sistema nervoso (Rang *et al*, 2019). Evidências mostram que os pacientes que usam uma combinação de AINEs demonstram uma melhor atividade anti-inflamatória e analgésica em comparação com seus medicamentos originais (Abualhasan, *et al* 2020). Além disso, estudos apontam ainda, que a terapêutica combinada através dos compostos híbridos, em que dois ou mais fármacos são administrados simultaneamente é mais eficiente do que seria esperado pela adição da atividade de cada fármaco, tendo como estratégia a redução da dose administrada e o alcance de diferentes alvos (Viegas-Junior; Barreiro; Fraga, 2007). Espera-se assim, que o híbrido IBPA possa demonstrar uma janela terapêutica com um maior índice de eficácia.

Nessa perspectiva, sugere-se a possibilidade do uso do híbrido IBPA como agente imunomodulador no tratamento da ES. Este trabalho visa investigar a atividade imunomoduladora do híbrido IBPA em sobrenadante de células mononucleadas do sangue periférico de pacientes com Esclerose Sistêmica, através da avaliação *ex vivo* do seu efeito na secreção de moléculas envolvidas na patogênese da doença (IL-4, IL-6, IL-8 e CCL2), uma vez que há uma limitação nas opções terapêuticas para esta doença.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 ESCLEROSE SISTÊMICA

A esclerose sistêmica (ES) é uma doença autoimune sistêmica que afeta o tecido conjuntivo, caracterizada por fibrose progressiva da pele e órgãos internos vitais, como pulmões, coração, rins e trato gastrointestinal (TGI), associada a alterações vasculares e processo inflamatório/autoimune (Benfaremo *et al.*, 2022). Trata-se de uma doença de extrema importância, tendo em vista seu prognóstico reservado, com altas taxas de morbimortalidade, sendo considerada uma das mais graves doenças reumatológicas. A patogênese da ES é complexa e ainda incompletamente entendida, caracterizada por três pilares principais: o dano vascular de pequenas artérias e arteríolas, a desregulação imunológica e a fibrose da pele e de vários órgãos internos que representa a via final comum (Benfaremo *et al.*, 2022). A totalidade de cada um desses três mecanismos refletem a heterogeneidade clínica da doença. Concisamente, o dano microvascular parece ser o gatilho responsável por estimular as células do sistema imunológico a produzirem anticorpos, citocinas pró-inflamatórias, além de quimiocinas (Kumar *et al.*, 2017).

O sintoma mais precoce da doença costuma ser o Fenômeno de Raynaud (FRy - constrição das pequenas artérias faz com que os dedos fiquem pálidos ou azulados, dormentes e com formigamento) podendo este preceder em anos as demais manifestações clínicas (Allanore *et al.*, 2015; Denton; Khanna, 2017). Contudo, a manifestação mais característica, consiste no comprometimento cutâneo, caracterizado principalmente por um endurecimento progressivo da pele. A partir da natureza e extensão desse envolvimento cutâneo, a ES classifica-se em duas formas clínicas: a cutânea limitada (CL) e a cutânea difusa (CD). A CL é a forma de maior ocorrência e o espessamento da pele é restrito à face e às extremidades, essa forma clínica costuma ter uma progressão mais lenta. Enquanto que a CD tem um início mais rápido, e se caracteriza por um comprometimento mais extenso da pele, acometendo além da face e extremidades, os membros e o tronco (Zuo *et al.*, 2017).

O diagnóstico, designação 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 metacarpolngeanas. Na ausência desses achados, outras alterações frequentemente encontradas na ES devem ser identificadas e pontuadas: telangiectasias (pequenas veias que se desenvolvem logo abaixo da pele), calcinose, microstomia (limitação da abertura da boca), alterações da pigmentação (leucomelanodermia) e autoanticorpos relacionados a ES (Hughes; Herrick, 2019). As manifestações em órgãos internos envolvem a fibrose pulmonar, falência renal (acompanhada de quadros de hipertensão e micro angiopatia trombótica), complicações gástricas, que estão vinculadas as altas taxas de mortalidade da doença, além de acometimentos articulares e cardíacos (Rosendahl; Schönborn; Krieg, 2022).

O perfil de autoanticorpos revela sua importância na doença por auxiliar no diagnóstico, além de ajudarem no rastreio precoce da doença e no direcionamento do prognóstico (Denton; Khanna, 2017). Úteis no diagnóstico clínico e subclassificação da ES, muitos dos autoanticorpos descritos na ES têm como alvo antígenos nucleares, são os anticorpos antinucleares (ANA) com frequência de 85 a 99% (ALLANORE *et al.*, 2015; YOSHIZAKI, 2018). Entre os anticorpos considerados mais específicos para a doença, destacam-se o anticentrômero (anti-CENP), o anti-DNA topoisomerase I (anti-Scl70) e anti-RNA polimerase (ARA) I e III. Embora o papel patogênico desses autoanticorpos não esteja definido, eles têm sido considerados como biomarcadores da doença (Allanore *et al.*, 2015). O anti-Scl70 revela um pior prognóstico para os pacientes, estando relacionado com envolvimento cardíaco, fibrose pulmonar, crise renal, além de estarem associados ao fenótipo CD numa frequência que varia de 15 a 42% e possuir maior índice de mortalidade dentre os pacientes com ES (Mehra *et al.*, 2013; Kayser; Fritzler, 2015). A presença dos autoanticorpos anti-CENP são mais frequentes na forma CL, ocorrendo em 55 a 80% desses pacientes. Embora considerado marcador de melhor prognóstico em relação ao anti-Scl70, sua presença está associada a risco aumentado de hipertensão arterial pulmonar (HAP) (Kayser; Fritzler, 2015). Anticorpos ARA I, II e III são encontrados na ES, embora os tipos I e III sejam mais específicos para a doença. A presença de

ambos está associada ao acometimento CD e ao maior risco de crise renal (Denton; Khanna, 2017).

1.1.1 Epidemiologia

A ES pode ocorrer em todas as faixas etárias, variando em função da região geográfica e grupo étnico (Horimoto *et al.*, 2017; Ingegnoli; Ughi; Mihai, 2018). Atinge mais pessoas do sexo feminino em detrimento do masculino, na proporção de 7 mulheres: 1 homem, com pico de incidência dos 35 e 50 anos. Apresenta alta morbidade e mortalidade, com risco de óbito 3,5 a 7 vezes maior que o verificado na população em geral. Negros desenvolvem a doença mais precocemente, com predomínio da forma CD e prognóstico mais severo (Melsens *et al.*, 2017; Brasil, 2022)

Ainda não há dados nacionais sobre a prevalência da ES no Brasil, mas há um estudo realizado na capital do estado de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, onde foram relatadas taxas de incidência de 11,9 por milhão de habitante e de prevalência de 105,6 por milhão de habitantes, dados que estão inferiores aos encontrados em estudos americanos, 25 casos por milhão/habitantes, e próximo dos estudos europeus, que tem de 7 a 19 casos por milhão/habitantes (Horimoto *et al.*, 2016). Um estudo desenvolvido por Ferreira e adjuntos, no estado de Pernambuco, com 111 pacientes com ES no serviço de referência estadual, o ambulatório de reumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC/UFPE), foi observado que 94% dos pacientes atendidos são mulheres com média de idade de 49 anos, a maioria dos pacientes foram acometidos com a CL (61%) e que vivem em região urbana (92%) (Ferreira; Lima, 2022).

1.1.2 Etiopatogenia

Ainda não está esclarecido qual o gatilho para o desenvolvimento da doença, contudo acredita-se que fatores ambientais combinados com carga genética sejam os grandes responsáveis pelo aparecimento da doença. Além disso, o histórico familiar da doença é considerado um fator de risco importante, os parentes de primeiro

grau parecem ser os mais predisponentes ao desenvolvimento da doença em relação a população geral (Sticherling, 2012; Denton; Khanna, 2017).

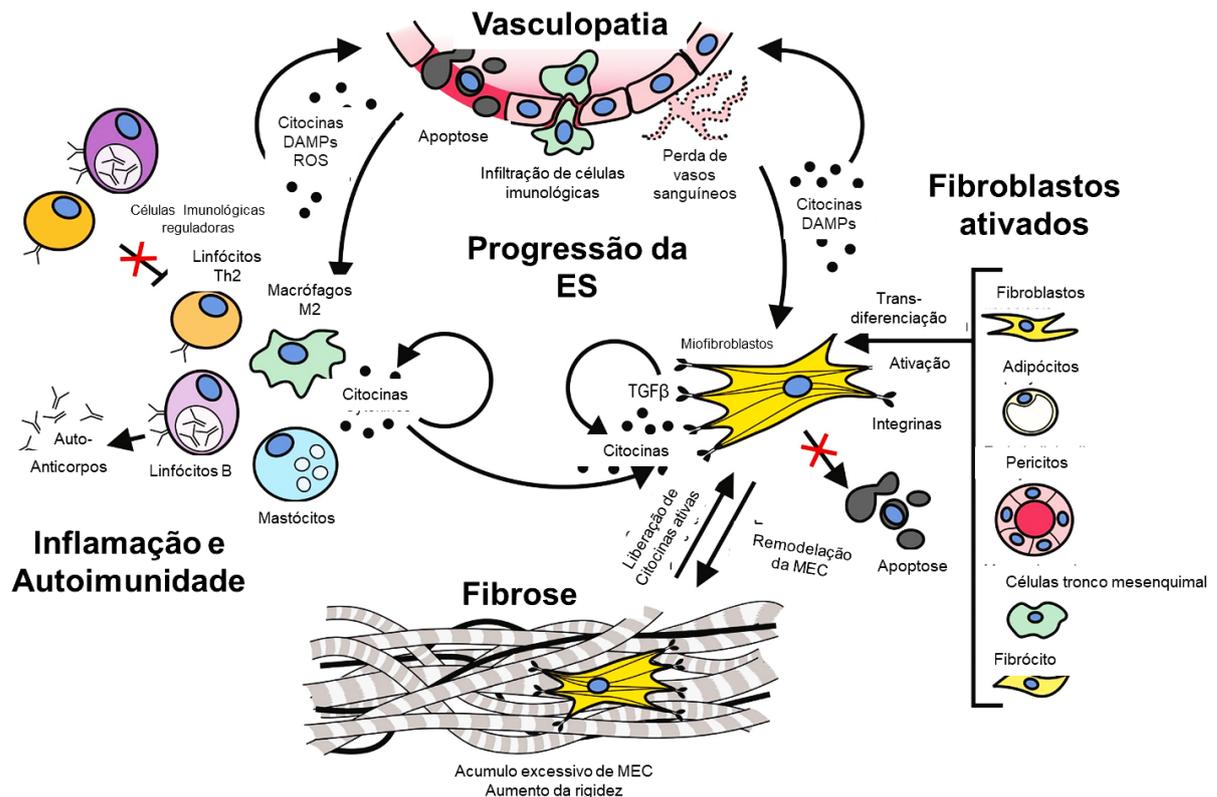
Polimorfismos na região do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) – considerada a mais polimórfica do genoma humano e conhecido por codificar os antígenos leucocitários humanos (HLA) de classe I e II, situada no cromossomo 6 – revelaram grande impacto na susceptibilidade à ES, sendo o HLA de classe II o mais associado com ES (Salazar; Mayes, 2015; Murdaca *et al.*, 2016).

Além disso, alguns gatilhos ambientais sugerem-se como agentes relacionados à ES, como por exemplo, a exposição à sílica e aos solventes orgânicos (Zimmermann; Pizzichini, 2013). Ainda compõem a lista de fatores: infecções virais por papilomavírus humano (HPV), hepatite B (HBV), parvovirus B19, citomegalovirus (CMV), pesticidas, quimioterápicos e, até mesmo, radiação ultravioleta (Zimmermann; Pizzichini, 2013; Denton; Khanna, 2017). Em adição, amianto, tabagismo, e partículas de diesel são também apontados como possíveis gatilhos para a doença (De Martinis *et al.*, 2016). Embora não se tenha certeza sobre a influência de alguns destes fatores no desencadeamento dos primeiros sintomas, acredita-se que possa existir uma ação positiva ao desenvolvimento da doença por parte destes fatores.

1.1.3 Fisiopatologia

O processo patológico da ES é bastante complexo e envolve muitas células do sistema imune, células vasculares, bem como células e componentes da matriz extracelular (MEC). Os três tipos de acometimentos: vascular, autoimune e fibrótico (Figura 1), são os três braços da doença, onde esses eventos causam os diferentes fenótipos. Caracteriza-se por inflamação e hiperreatividade vascular da micro e macro circulação associadas à deposição excessiva de colágeno nos tecidos, com conseqüente fibrose da pele e órgãos internos, apresentando gravidade e prognóstico variáveis (Bukiri; Volkmann, 2022).

Figura 1: Fisiopatogênese da esclerose sistêmica. Interação entre vasculopatia, desregulação imunológica e fibrose. (MEC = matriz extracelular; Th2 = Linfócitos T helper ativados 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)

A desregulação do sistema imunológico envolve tanto a resposta humoral quanto a resposta celular. Os linfócitos T, representam a imunidade celular, onde são responsáveis pela produção de diversas citocinas/quimiocinas que desempenham papéis importantes, incluindo alterações nas funções das células endoteliais e fibroblastos. Já, os autoanticorpos estão presentes na ES e são importantes componentes da imunidade humoral, caracterizam as formas clínicas da doença e apresentam associações prognósticas.

Na imunidade celular, o linfócito T exerce um importante papel na fisiopatologia da doença por impactar no acúmulo de MEC e nas vasculopatias (Kumar; Connors; Farber, 2018). Várias subpopulações de linfócitos T *helper* (Th) possuem diferentes perfis de respostas no organismo, em destaque, se tem os perfis

Th1, Th2 e Th17. Acredita-se que as citocinas pró-inflamatórias Th1 e Th17 participem mediando um processo inflamatório em fases precoces da doença, enquanto as Th2 promovem ativamente a resposta fibrótica.

A subpopulação de linfócitos Th1, por exemplo, secreta altos níveis de interferon-gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina-2 (IL-2), citocinas importantes na fisiopatologia da doença (Gizinski; Fox, 2014). O IFN- γ possui papel regulador da produção de quimiocinas, além de estar relacionado com manifestações específicas da ES (Balanescu, 2015; Chizzolini *et al.*, 2006; Dantas *et al.*, 2015). As células Th2 caracterizam-se pela produção de interleucinas (IL) como IL-4, IL-5, IL-13 e IL-21, onde as principais implicadas na ES são IL-4 e IL-13, que mais se relacionam com o processo de fibrose. A responsável por ampliar a resposta Th2 e suprimir as demais subpopulações, a IL-4 age favorecendo o processo de fibrose (Gizinski; Fox, 2014), estimula a proliferação, quimiotaxia, síntese de colágeno e produção de fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) e fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF). Em pacientes com ES foram identificados níveis séricos elevados de IL-4, assim como aumento no número de linfócitos T produtores de IL-4 (Kanellakis *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2015). A IL-6 se mostrou em níveis elevados em pacientes com ES, especialmente no fenótipo CD. Seu papel envolve desde a diferenciação de células Th0 (naïve) em Th17 à promoção da fibrose por estimulação de fibroblastos (Geyer; Müller-Ladner, 2010). É uma citocina produzida por monócitos, linfócitos T, fibroblastos e células endoteliais, com propriedades pró-inflamatória e pró-fibrótica. Atua estimulando a diferenciação de miofibroblastos e síntese de colágeno (BARNES *et al.*, 2011). As células Th17, estão mais relacionadas com a promoção da inflamação. Estes linfócitos têm a IL-17 como sua citocina de assinatura e, ainda, produz e secreta outras interleucinas como a IL-21, IL-22 e IL-23 (Chizzolini; Boin, 2015). A IL-17 foi relacionada com a promoção da produção de sinalizadores pró-inflamatórios (Brembilla; Chizzolini, 2012)

As Quimiocinas também estão envolvidas no desenvolvimento da ES. Além de sua função como quimioatraentes de células T e células inflamatórias nos tecidos, eles desempenham um papel na angiogênese e na regulação da fibrose. Alguns estudos demonstraram expressão aumentada de CCL2/MCP-1, CXCL8/IL-8,

no soro de pacientes com ES (Denton; Ong, 2013). A CCL2/MCP-1 é um quimioatraente de monócitos predominante e ativador de células mononucleares, promovendo a migração de células inflamatórias do sangue para os tecidos envolvidos. Além de suas atividades quimioatraentes, esta quimiocina induz uma diferenciação Th2 e estimula a síntese de proteínas da matriz extracelular em fibroblastos ES. A CXCL8/IL-8 é um potente quimioatraente e ativador de neutrófilos, mas também induz fenótipo migratório de fibroblastos, promove quimiotaxia de fibroblastos e estimula a angiogênese; alguns estudos relataram sua associação com doença pulmonar (Furuse, *et al.* 2003) e hipertensão arterial pulmonar (Codullo *et al.* 2011). Outras quimiocinas, também presentes e implicadas na patogênese da fibrose na ES: a proteína inflamatória de macrófagos-1 α (MIP-1 α) ou CCL3 onde sugere-se que estimule a produção de TGF- β por macrófagos, promovendo assim a expressão de colágeno tipos I e III (Zhang *et al.* 2002). A MCP-3 ou CCL7, que estimula produção de colágeno dependente de TGF- β (Distler *et al.* 2009). A proteína induzida por IFN- γ (IP-10) ou CXCL10 e a monócina induzida por IFN- γ (MIG) ou CXCL9 são quimiocinas que apresentam função quimioatrativa para linfócitos produtores de IFN- γ (linfócitos Th1) e propriedades antiangiogênicas (Rabquer *et al.*, 2011; Antonelli *et al.*, 2011).

A lesão vascular e o dano endotelial são os primeiros eventos patogênicos na ES em um indivíduo susceptível (paciente que tiveram contato com vírus, solventes orgânicos, amianto, sílica), onde as células endoteliais danificadas liberam padrões moleculares associados a danos (DAMPs) que ativam e recrutam células imunológicas. A vasculopatia é causada pelo desequilíbrio entre substâncias vasodilatadoras e vasoconstritoras, e devido às alterações sofridas pelas células responsáveis pela vascularização (Sticherling, 2012, Bukiri; Volkmann, 2022).

O mecanismo pelo qual ocorre o comprometimento vascular envolve espécies reativas de oxigênio, moléculas de adesão (ICAM-1 e E-selectina), vasoconstritores (endotelina-1) e vasodilatadores (óxido nítrico e prostaciclina), proteases - como a granzima A -, autoanticorpos e diversas células que os produzem. Em conjunto, estas células e seus produtos provocam nos microvasos aumento dos

espaços intercelulares, aumento de permeabilidade facilitando a diapedese, ativação da coagulação e fatores fibrinolíticos, aumentando o risco a trombose, e edema no espaço extracelular (Sticherling, 2012; Stern; Denton, 2015).

Devido às funções alteradas das células envolvidas, a dificuldade de neovascularização é um ponto importante a ser observado. Patologicamente, as células vasculares endoteliais aumentam o nível de expressão de moléculas de adesão em sua superfície. como a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1), proteína de adesão de célula vascular 1 (VCAM-1) e E-selectina, que facilitam a migração de células inflamatórias das paredes dos vasos para o interior dos tecidos (Segura; Ferraz-Amaro, 2015; Sticherling, 2012). Elas também expressam outros mediadores pró-inflamatórios e pró-fibróticos, como a endotelina-1 e o fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF) (Allanore *et al.*, 2015; Trojanowska, 2010).

A fibrose representa a via final comum na patogênese da ES, e é responsável por grande parte do prognóstico atribuído à doença. É caracterizada pela substituição da arquitetura normal por tecido conjuntivo denso, composto por colágeno e outras proteínas da matriz extracelular. Ela é o resultado do acúmulo progressivo de proteínas da MEC, como colágeno, elastina, glicosaminoglicano e fibronectina, além de enzimas que impulsionam as produções cruzadas do colágeno, isso resulta em cicatrização permanente tendo um tecido rígido e estressado (Allanore *et al.*, 2015; Zimmermann; Pizzichini, 2013). A extensão da fibrose está associada à mortalidade pela ES, tudo isso se deve a uma interação complexa entre células do sistema imune, citocinas, quimiocinas e moléculas de sinalização intracelular (Allanore *et al.*, 2015; Zimmermann; Pizzichini, 2013).

Em condições normais, os fibroblastos são células responsáveis pela produção e remodelação da MEC. Na ES, o fibroblasto permanece em estado permanente de hiperatividade, com expressão alterada de genes que determinam a produção abundante de MEC. A medula óssea é uma grande contribuidora para o crescimento populacional de fibroblastos com liberação de células pluripotentes como os fibrócitos. Os diferentes fatores pró-fibróticos envolvidos, como IL-4, IL-6, IL-8 CCL2/MCP-1, que sinergicamente se ocupam em promover o quadro inflamatório e favorecem o depósito de MEC no tecido conjuntivo. Os miofibroblastos são

fibroblastos ativos, é provável que sejam derivados de pelo menos três fontes: fibroblastos locais, transdiferenciação e outros tipos de células. Mediadores solúveis circulantes e produzidos localmente regulam esse processo (Allanore *et al.*, 2015; Chizzolini *et al.*, 2011; Zimmermann; Pizzichini, 2013).

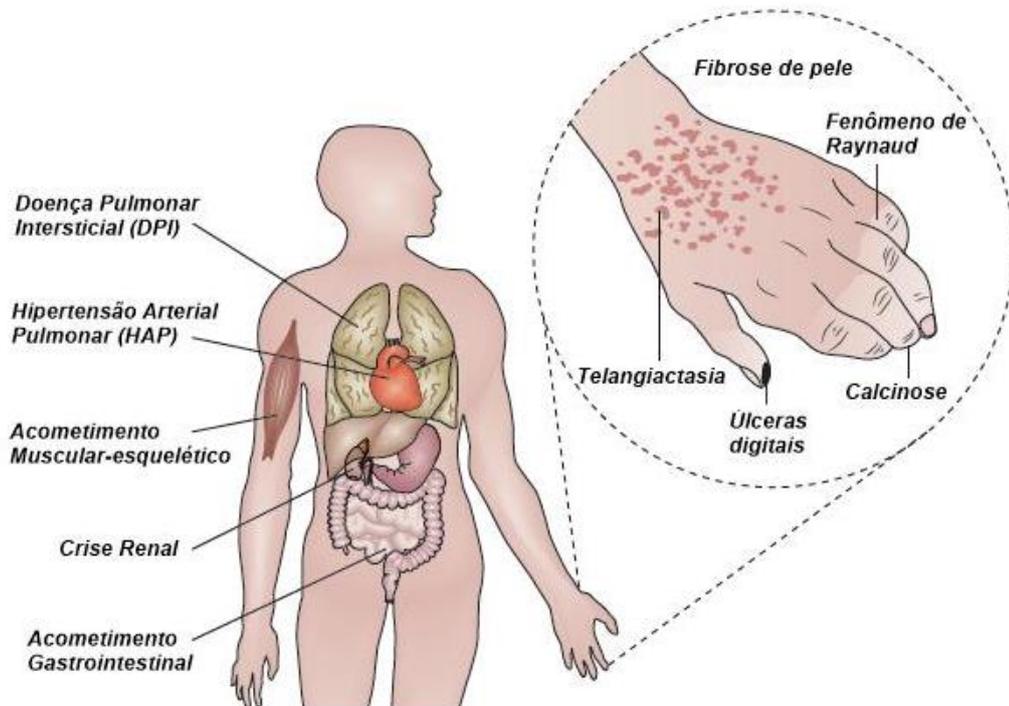
Os diferentes fatores pró-fibróticos implicados na patogênese da ES, o fator de transformação do crescimento beta (TFG- β) é considerado o principal regulador da fibrogênese fisiológica e da fibrose patológica. É produzido por fibroblastos, células T, monócitos e plaquetas, e exerce sua função por meio da ligação com o seu receptor (TGF β RII). Essa ligação promove a expressão de genes como colágeno tipo I, fator de crescimento do tecido conectivo (CTGF) e outros (Zimmermann; Pizzichini, 2013).). Outro importante mediador é o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), que participa do processo fisiológico de cicatrização de tecidos, promovendo a quimioatração de neutrófilos e macrófagos e na quimiotaxia e proliferação de fibroblastos. Também atua promovendo a síntese de colágeno, fibronectina e proteoglicanos, além de estimular a secreção de TGF- β , CCL2/MCP-1 e IL-6 (Trojanowska, 2010). O CTGF age como cofator, aumentando a resposta ao TGF- β , promovendo a quimiotaxia e proliferação de fibroblastos e estimulando a síntese de colágeno e fibronectina (Leask, 2010; Zimmermann; Pizzichini, 2013).

No que tange, a imunidade humoral, a alta atividade dos linfócitos B provoca a produção de autoanticorpos que interferem na regulação da atividade inflamatória. Ainda não se sabe como essas células progridem e regulam as manifestações específicas da ES (Yoshizaki, 2018). A presença de autoanticorpos circulantes tem sido usada no diagnóstico de indivíduos afetados pela ES. Sua presença é uma característica central na ativação da imunidade em pacientes, mas sua influência na patogênese não está esclarecida (Allanore *et al.*, 2015; Yoshizaki, 2018). Vale salientar que a maioria dos anticorpos se ligam diretamente a antígenos nucleares, são os anticorpos antinucleares (ANA). Os principais ANA associados com a ES, que são específicos ao diagnóstico, são anti-Scl70, anti-CENP, anti-RNAP I e III e o antifibrilarina, e esses quatro diferentes autoanticorpos representam até 80% dos ANA detectados na ES (Mehra *et al.*, 2013).

1.1.4 Manifestações Clínicas

A ES se apresenta clinicamente na forma difusa e na forma limitada. As duas formas podem apresentar as mesmas manifestações, mas diferem em relação à frequência ou à região do corpo acometida. Primeiramente, o fenótipo cutâneo limitado (CL) está associado a evolução mais lenta, com problemas pulmonares, presença do anticorpo centrômero e manifestações denominadas como CREST (calcinose, Fry, doença esofágica, esclerodactilia — fibrose limitada aos dedos e telangiectasias), representado na figura 2 (Zuo *et al.*, 2017). Em pacientes com a forma difusa (CD) também apresentam envolvimento vascular, como o FRy que costuma preceder as outras manifestações da doença de meses a anos, frequentemente associado a úlceras digitais, a fibrose nesses pacientes é observada na pele das regiões do tronco e extremidades (Denton, Khanna, 2017). Do ponto de vista sistêmico as manifestações clínicas da ES são: Fry, fadiga, manifestações musculoesqueléticas (artralgia, artrite, rigidez matinal, fraqueza muscular, osteoporose), manifestações cutâneas (espessamento cutâneo, hipo e hiperpigmentação da pele, telangiectasias, calcinose, úlceras isquêmicas), manifestações pulmonares (doença intersticial, hipertensão arterial pulmonar (HAP)), acometimento do trato gastrointestinal (má absorção, disfunção do esfíncter interno do ânus), derrame pericárdico, crise renal. (Bos *et al.*, 2009).

Figura 2 – Principais manifestações clínicas vistas em pacientes com ES.



Fonte: Modificado de Allanore (2015)

O FRy é bastante comum nos pacientes com ES podendo ser um dos primeiros sintomas, sendo possível auxiliar no diagnóstico precoce da doença (Flavahan et al., 2003). 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 (Flavahan et al., 2003; Allanore, et al., 2015; Denton; Khanna, 2017). Na CL, o Fry pode ser a única queixa por longo período de tempo. Na CD, o Fry está acompanhado de outros sinais da doença ou é um sinal isolado por curto período de tempo. (Bos et al.,2009).

A pele é o órgão mais atingido pela ES. (Real et al., 2018). O comprometimento da pele ocorre inicialmente nas mãos e é caracterizado por uma fase inicial edematosa, seguida por uma fase de espessamento cutâneo na doença bem estabelecida e pode tardiamente evoluir para a forma atrófica. (Guidolin; Esmanhotto; Skare, 2005; Bos et al.,2009). O endurecimento da pele inicia nos dedos (esclerodactilia) e pode causar intensa retração e evolução para mão em garra. Ocorre afilamento de nariz e lábios e a boca torna-se reduzida (microstomia). Uma

manifestação cutânea característica da ES é a associação de hiper e hipopigmentação. Geralmente ocorre depósitos anômalos de cálcio (calcinose) em regiões periarticulares, como, ponta dos dedos, cotovelo e superfície extensora do antebraço. Também é comum o desenvolvimento de úlceras isquêmicas, principalmente em regiões periungueais e região maleolar, que têm cicatrização lenta e podem evoluir para gangrena. (Bos *et al.*,2009). A partir disso, foi desenvolvido escore de Rodnan que visa quantificar a extensão da fibrose na pele, na qual delimita espessamento na pele em 17 áreas a serem avaliadas, e em cada área é dado um valor de 0 a 3, onde o “0” representa pele normal e “3” representa a pele tensa, bem aderida (Flavahan *et al.*2003; Sampaio-Barros, 2013).

Um envolvimento muito comum nos portadores da ES é o gastrointestinal, e geralmente é o primeiro sintoma que não o fenômeno de Raynaud. Pode acometer todo o trato gastrointestinal, e mesmo na ausência de sintomas, há alterações de mobilidade. Tanto a fibrose, com atrofia da musculatura lisa têm um papel na dismotilidade gastrointestinal. Não há predileção de acometimento para pacientes com envolvimento de pele difuso ou limitado, mas interfere na qualidade de vida do paciente (Savarino *et al.*, 2014). Possui frequência maior que 80% dentre os pacientes com ES, sendo evidenciado no surgimento dos sinais clínicos disfagia, constipação, diarreia, e refluxo gastroesofágico, causador da esofagite (Allanore *et al.*, 2015).

A fibrose pulmonar, desencadeia o comprometimento das funções pulmonares em pacientes com ES, tem sido a maior preocupação pelas equipes da saúde atualmente. Fibrose pulmonar ou doença pulmonar intersticial (DPI) e hipertensão arterial pulmonar (HAP) são os principais acometimentos a nível de pulmão e somam quase 50% das causas de morte dos pacientes (Allanore *et al.*, 2015). As complicações resultantes da DPI são mais comuns no subgrupo CD e avaliadas através da tomografia computadorizada (TC) e do teste de função pulmonar (Allanore *et al.*, 2015; Denton; Khanna, 2017). Por outro lado, a HAP é resultante das complicações vasculares e mais comum em pacientes que expressam o fenótipo CL. Cerca de 15% dos pacientes com ES apresentam HAP, resultante de fatores de risco como maior duração da doença, presença marcante de telangiectasia e presença de

autoanticorpos anti-centrômero (Benfaremo *et. al.*,2022). Ambos acometimentos, DPI e HAP, são grandes responsáveis pela perda da capacidade respiratória e piora significativa da qualidade de vida, bem como a principal causa de mortalidade entre os pacientes (Nikpour; Baron, 2014; Benfaremo *et. al.*,2022).

Na ES, os problemas renais, estão associados a crise renal esclerodérmica (CRE), e já foi considerada a complicação mais grave da doença, por ter sido a principal causa de morte nos pacientes. Com o desenvolvimento de inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECA), a crise renal esclerodérmica se tornou uma manifestação passível de tratamento, embora alguns pacientes tenham resultados desfavoráveis e evoluam com necessidade de terapia substitutiva renal (Stern; Denton, 2015).

O comprometimento cardíaco é observado em 5-20% dos casos e ocorre mais na forma difusa. A principal manifestação é o derrame pericárdico, que está associado ao risco de tamponamento cardíaco e a um mau prognóstico. Os principais sintomas são dispneia progressiva e palpitações. (Bos *et al.*,2009; Sousa *et al.*, 2017).

O comprometimento músculo-esquelético faz-se presente entre os pacientes com ES, causando artropatia ou miosite com uma notável frequência. Nos casos mais graves, há perda progressiva da força motora, diminuindo ainda mais a qualidade de vida dos pacientes (Morrisroe; Nikpour; Proudman, 2015).

1.1.5 Diagnóstico

O diagnóstico da ES é estabelecido a partir das manifestações clínicas, associadas a alterações laboratoriais. Os critérios do *American College of Rheumatology* (ACR) que são utilizados até agora para classificação da ES foram desenvolvidos em 1980, e incluem o espessamento simétrico da pele dos dedos, fibrose pulmonar e perda de tecido. O diagnóstico era fechado, quando se constatava a presença do critério maior: espessamento cutâneo simétrico proximal da pele (proximal às metacarpofalangeanas); ou dois critérios menores: esclerodactilia,

úlceras digitais ou reabsorção de falanges distais, e fibrose bilateral na base pulmonar (MASI, 1980; Leroy *et al.*, 1988; Sampaio-Barros *et al.*, 2013). Foi reconhecido que os critérios classificatórios do ACR de 1980 não são sensíveis para diagnóstico precoce da doença, particularmente para aqueles pacientes com a forma CL (Masi *et al.*, 1980; Walker *et al.*, 2007).

Com propósito de desenvolver critérios mais sensíveis que considerassem também a utilização de diagnósticos mais modernos, em 2013, a *European League Against Rheumatism* (EULAR) em conjunto com a ACR objetivaram a melhor classificação dos pacientes otimizando a lista de critérios (Tabela 1). Isto foi necessário devido à baixa sensibilidade para incluir pacientes com ES precoce e ES cutâneo limitada (CL). A lista passou a compreender os três braços de manifestações da doença, vasculopatia, autoimunidade e fibrose; pacientes na fase precoce, bem como os que apresentavam o fenótipo CL; ser viável para o uso na prática clínica e estar de acordo com os critérios utilizados para diagnóstico da ES na prática clínica. Os critérios incluem: lesões isquêmicas nas pontas dos dedos (úlceras ou microcicatrizes), FRy e presença de autoanticorpos específicos, *puffy fingers* ou esclerodactilia, espessamento bilateral da pele dos dedos, telangiectasias, capilaroscopia alterada, HAP ou DPI. O caso é classificado como ES se preencher 9 pontos ou mais (Van De Hoogen *et al.*, 2013).

Tabela 1 - Critérios de classificação para a esclerose sistêmica.

CRITÉRIOS	Maiores	Menores
ACR	Espessamento cutâneo proximal às MCF	Esclerodactilia; Microcicatrices digitais ou perda de substância; Fibrose pulmonar bibasal.
ACR/EULAR	Espessamento cutâneo proximal às MCF	<i>Puffy fingers</i> ou Esclerodactilia; Úlceras digitais ou Microcicatrices de polpa digital; Telangiectasias; Capilaroscopia alterada; HAP ou DPI; FRy; Autoanticorpos.

ACR= American College of Rheumatology; DPI= doença pulmonar intersticial; EULAR= European League Against Rheumatism; FRy= fenômeno de Raynaud; HAP= hipertensão arterial pulmonar; MCF= metacarpofalangeanas.

1.1.6 Tratamento Farmacológico

O tratamento da ES é determinado pela extensão e gravidade das manifestações clínicas. Até o momento, a maioria das terapias disponíveis baseia-se no alívio sintomático, havendo poucas opções consideradas eficazes. A conduta terapêutica não é padronizada na ES devido à baixa prevalência e curso clínico variável. O tratamento depende do quadro clínico e do acometimento visceral, assim como se a doença está ativa e reversível (vasoconstrição e inflamação) ou irreversível (fibrose ou necrose) (Allanore *et al.*, 2015; Pope *et al.*, 2023).

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)) (Sampaio-Barros, 2013)

Os GC são utilizados por pacientes em tratamento da sinovite, miosite

e doença pulmonar intersticial. Contudo, apesar da ação imunomoduladora dos GC, um maior risco à crise renal esclerodérmica foi constatado (Pope *et al.*, 2023). No combate aos sintomas causados pelo FRy e as úlceras digitais, são administrados aos pacientes os antagonistas da endotelina, BCC ou inibidores da fosfodiesterase (Sampaio-Barros, 2013; Pope *et al.*, 2023). Os imunossupressores são drogas bastante utilizadas em doenças inflamatórias crônicas e autoimunes, entretanto um percentual significativo de pacientes não apresenta resposta, dificultando ainda mais o tratamento (Manno; Boin, 2010; Pope *et al.*, 2023). Em casos de hipertensão arterial causada pela crise renal, os pacientes fazem uso dos IECA, além dos BRA como tratamento alternativo (Denton *et al.*, 2009; Pope *et al.*, 2023)

Estudos recentes avaliam o uso de anticorpos monoclonais para terapias de alvos moleculares na ES. O tocilizumabe é um anticorpo monoclonal (anti-receptor de IL-6) que apresentou benefícios na fibrose dérmica, úlceras digitais e alterações de capilares em pacientes com ES (Taniguchi *et al.*, 2017; Pope *et al.*, 2023). Tendo como alvo as células B, o rituximabe (anti-CD20) promoveu diminuição de miofibroblastos e das células B infiltradas na pele de pacientes com ES (Pope *et al.*, 2023), além disso existem outros relatos dos benefícios oferecidos pelo rituximabe em pacientes com ES, como melhora da calcinose e de úlceras digitais (Khor *et al.*, 2014). O fresolimumabe (anti-TGF- β) também mostrou benefícios na ES (Rice *et al.*, 2015), embora efeitos adversos como sangramento e anemia tenham sido relatados (Asano, 2017).

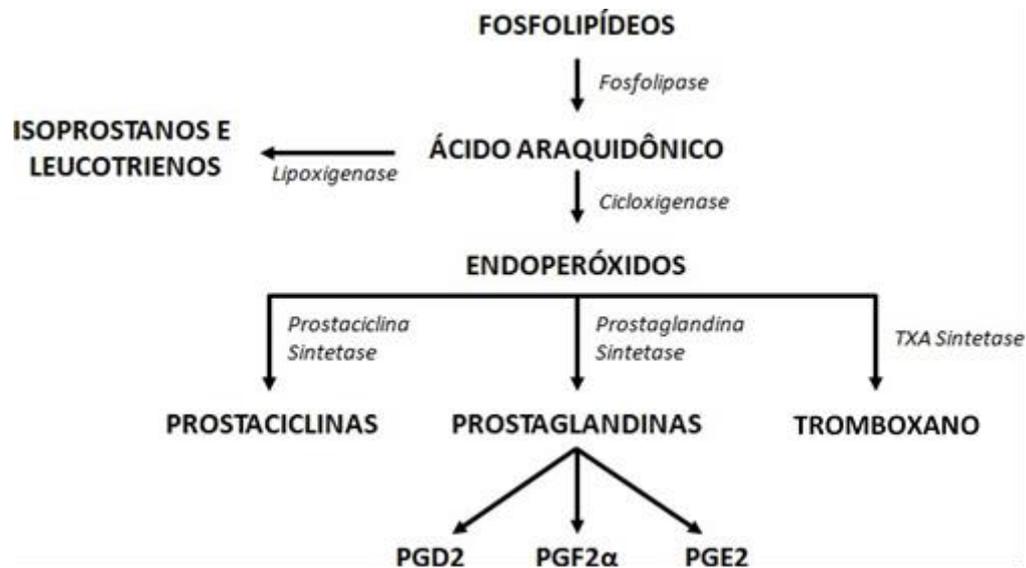
Por fim, estudos com o transplante autólogo de células tronco têm apresentado resultados promissores, com reversão da fibrose cutânea, melhora da função pulmonar e da qualidade de vida. A estratégia consiste em promover uma ablação do sistema imune disfuncional, com a erradicação de células B e T autoagressivas e aumento de linfócitos T regulatórios, tentando reestabelecer uma resposta imune normal (Van Laar; Varga, 2015). Neste cenário, fica evidente a necessidade de estudos que visem à descoberta de novos fármacos a serem utilizados no tratamento desta enfermidade

1.1.7 Anti-inflamatórios não esteroides (AINES)

Os anti-inflamatórios não esteróides (AINEs), representa um vasto grupo de fármacos que atuam principalmente no local de iniciação do estímulo nociceptivo. O principal mecanismo de ação é a inibição da ação das cicloxigenases, (COXs), diminuindo a síntese de prostaglandinas (Lucas *et al.*, 2018). Estes compostos endógenos estão envolvidos em mecanismos de hemóstase e em diversos processos fisiopatológicos. Conhecem-se atualmente três tipos de COXs. COX1, COX2 e COX1b. A maioria das células do organismo expressa a COX1, esta enzima está sobretudo relacionada com aspetos de homeostasia. A COX2 possui um papel muito mais ativo em processos inflamatórios, sendo expressa principalmente por macrófagos e fibroblastos. A COX1b tem maior expressão no sistema nervoso central. A ação dos AINEs é conseguida através da diminuição da resposta inflamatória (Conaghan, 2012; Theken, 2018).

O Ibuprofeno, é um AINE que inibe a produção de prostaglandinas por ter maior seletividade pela COX2. Tem ação intimamente relacionada com a sua capacidade de inibir a produção de prostaglandinas (PGs), segundo um mecanismo competitivo pelo local ativo da COX. Basicamente, o início da cascata se dá quando os fosfolípidios sofrem ação da fosfolipase A2 dando origem ao ácido araquidônico (figura 3). O ácido sofre oxidação sendo dividido em duas vias: a da ciclooxigenase (COX) e a da lipooxigenase (LOX). Porém seu papel mais conhecido está em sua ação na via pró-inflamatória, sendo responsável devido à síntese de prostaglandinas responsável pelo processo inflamatório, que se dá pela conversão de ácido araquidônico através da COX-2 (induzida), em prostaglandinas, entre elas a PGE2 responsável pelos processos de dor e febre. O bloqueio da COX-2 promovido pelo ibuprofeno faz dele um potente fármaco anti-inflamatório, e, portanto, muito utilizado (Ha; Paek, 2021).

Figura 3 – Cascata do ácido araquidônico.



Fonte: Modificado de Hilário; Terreri; Len (2006)

PGD2= Prostaglandina D₂; PGE2= prostaglandina E₂; PGF2α= Prostaglandina F_{2α}

Já o paracetamol, que também é um AINE, é geralmente classificado nesse grupo em razão de sua capacidade de inibir a enzima COX1b; preferencialmente no SNC. Se efeito se dá pelo aumento dos níveis de canabinoides endógenos (Anandamida) no SNC por meio do sistema endocanabinoide que propicia a inibição da recaptação dessa anandamida e sua subsequente acumulação no organismo, resultando em um aumento das concentrações desse endocanabinóide, potencializando seus efeitos fisiológicos, corroborando para ação. Isso acontece, pois o paracetamol é metabolizado, principalmente no fígado, à p-aminofenol. Esse, por sua vez, sofre conjugação intracelular com o ácido aracdônico pela ação da amido hidrolase do ácido graxo (FAAH) no SNC, gerando N-acilfenolamina (AM404) (Ohashi; Kohno,2020). O metabólito ativo AM404 inibe o transportador celular pré-sináptico de anandamida e reduz sua degradação intracelular, resultando em um aumento das concentrações desse endocanabinóide, potencializando, dessa forma, seus efeitos fisiológicos (Ayoub, 2021).

Recapitulando a patogênese da ES, o processo de reparo envolve duas fases distintas: uma fase inflamatória regenerativa, em que o microambiente tenta substituir as células lesadas, e uma fase fibrótica, em que o tecido conjuntivo

substitui o tecido parenquimatoso normal (Benfaremo *et al.*,2022). Nesse contexto, a COX-2 está em maior número nos tecidos inflamados, concentrando um aumento de citocinas, e por isso responsável pela liberação de diversas substâncias relacionadas a inflamação. A inibição da COX-2 é capaz de reduzir as respostas inflamatórias (edema e migração celular) indicando esta enzima como um potencial alvo para o tratamento de patologias inflamatórias, no caso da ES. Portanto, a preferência pela utilização de fármacos inibindo a ação da COX-2, tem sido bastante abordada, pois pode-se combater a inflamação (Ferrer *et al.*; 2019). Um estudo mostrou que a proporção de células em septos alveolares com imunomarcagem positiva para COX-1 e COX-2 foi significativamente maior em tecido pulmonar com padrão histológico de fibrose do que em tecido pulmonar normal. A maior expressão de COX-1 é esperada, pois a COX-1 é expressa constitutivamente na maioria das células e tecidos, ao passo que a COX-2 é induzida por estímulos inflamatórios (Parra *et al.*, 2013).

O híbrido IBPA, através dos mecanismos de ação do ibuprofeno e paracetamol, expostos anteriormente, apresenta potencial efeito farmacológico imunomodulador. Evidências mostram que os pacientes que usam uma combinação de AINEs demonstram uma melhor atividade anti-inflamatória e analgésica em comparação com seus medicamentos originais (Abualhasan, *et al.*, 2020). Além disso, estudos apontam ainda, que a terapêutica combinada através dos compostos híbridos, em que dois ou mais fármacos são administrados simultaneamente é mais eficiente do que seria esperado pela adição da atividade de cada fármaco (Viegas-Junior; Barreiro; Fraga,2007). A principal explicação para este fato prende-se com a questão da sinergia, onde a combinação de fármacos se torna mais eficiente.

A hibridação molecular é um conceito inovador de desenvolvimento de novos fármacos para a produção de compostos com características superiores aos compostos que lhes deram origem. É uma estratégia de design de fármacos em que a molécula obtida retém algumas particularidades vantajosas dos fármacos originais (Abualhasan, *et al.*, 2020). A hibridação é comparável à terapêutica combinada tradicional, com a ressalva que as duas moléculas se encontram ligadas de forma covalente numa única entidade molecular. Espera-se assim, que o híbrido IBPA possa demonstrar uma janela terapêutica com um maior índice de eficácia na ES (Viegas-

Junior; Barreiro; Fraga,2007; Mendonça Junior, 2017).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade imunomoduladora *ex vivo* do híbrido IBPA em células de pacientes com esclerose sistêmica.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a caracterização clínica, demográfica e terapêutica dos pacientes com ES;
- Avaliar a atividade imunomoduladora *ex vivo* do IBPA na produção de citocinas envolvidas na patogênese da ES;
- Avaliar a atividade imunomoduladora *ex vivo* do IBPA na produção de quimiocinas envolvidas na patogênese da ES.

3 METODOLOGIA

3.1 TIPO DE ESTUDO

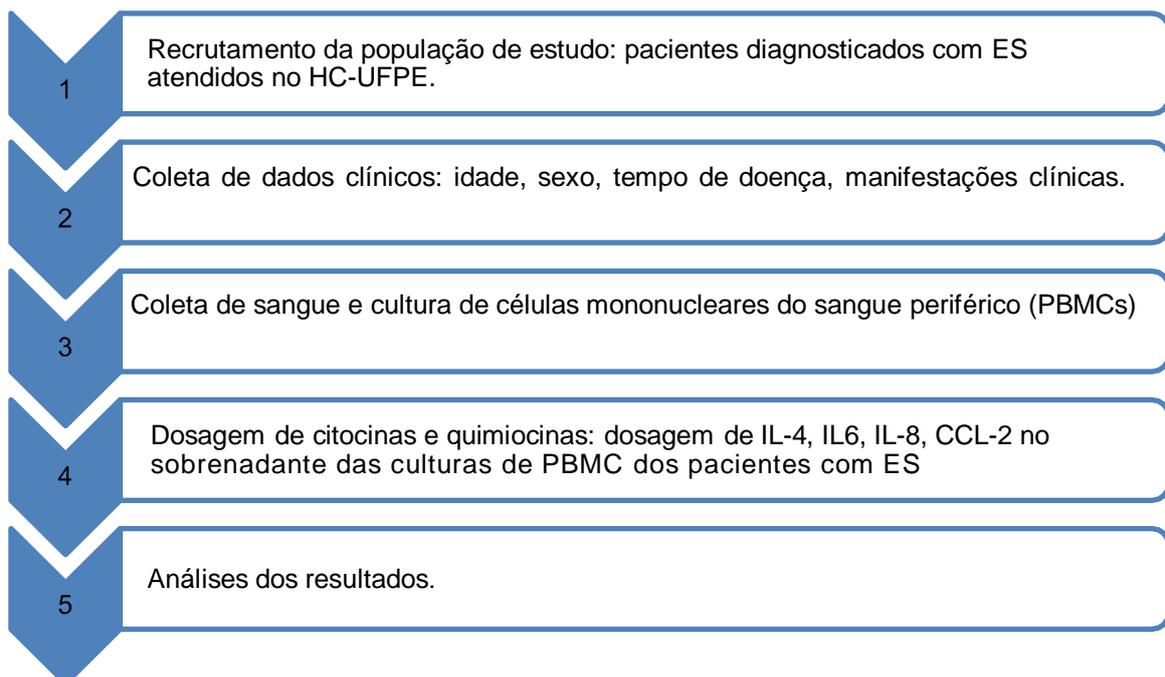
O presente estudo trata-se de uma pesquisa experimental translacional *ex vivo* para avaliação do potencial imunomodulador do híbrido IBPA em células de pacientes com esclerose sistêmica.

3.2 LOCAL E PERÍODO DO ESTUDO

O estudo foi realizado no período de Junho/2023 a Setembro/2023. A etapa de seleção e avaliação clínica dos pacientes foi realizada no ambulatório de Reumatologia do HC-UFPE e os procedimentos experimentais foram realizados no Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT) do Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica (NUPIT-SG) da UFPE.

Abaixo há a ilustração do fluxograma do estudo de forma resumida (figura 3).

Figura 4- Desenho esquemático do delineamento do estudo



3.3 POPULAÇÃO DE ESTUDO

3.3.1 Pacientes com Esclerose Sistêmica

Foram incluídos no estudo 12 pacientes com esclerose sistêmica atendidos e acompanhados no Ambulatório de Pesquisa Clínica do Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco – 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; aceitar voluntariamente participar do estudo; 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) (Apêndice A).

Critérios de exclusão: síndrome de sobreposição, gestantes, não consentimento em participar do estudo, impossibilidade de coleta

3.3.2 Coleta de dados clínicos

Após esclarecimento sobre o estudo e seus objetivos, os pacientes com ES que aceitarem participar da pesquisa assinaram o TCLE (Apêndice A). Os dados clínicos dos pacientes foram coletados em seus respectivos prontuários no ambulatório de pesquisa clínica do Serviço de Reumatologia do HC/UFPE, como no local da pesquisa, através de uma ficha clínica (Apêndice B) elaborada conforme protocolos utilizados pelo ambulatório de Reumatologia do HC/UFPE.

3.4 ENSAIOS *EX VIVO*

3.4.1 Compostos sintéticos

O híbrido IBPA (4-acetamidophenyl-2-(4-isobutylphenyl)-propanoate) foi sintetizado a partir do ibuprofeno e paracetamol no Laboratório de Síntese e

Vetorização de Moléculas da Universidade Estadual da Paraíba e cedido para realização dos experimentos. A avaliação da citotoxicidade do composto foi realizada previamente e a concentração utilizada no presente estudo não demonstrou efeito citotóxico em PBMC.

O ibuprofeno e paracetamol isoladamente foram testados para comparação dos efeitos imunomoduladores em concentrações que não apresentaram citotoxicidade em PBMC.

3.4.2 Coleta de sangue e cultura de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs)

Foram recrutados 12 pacientes com ES atendidos no ambulatório de Esclerose Sistêmica do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco para coleta de sangue em tubos contendo o anticoagulante heparina (18 mL) e para realização da cultura de células do sangue periférico (PBMCs). As coletas foram feitas por profissionais competentes e devidamente treinados para reduzir os riscos para os 12 participantes da pesquisa. Todas as coletas foram realizadas com autorização prévia dos participantes e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

As PBMCs foram isoladas a partir do sangue por centrifugação com Ficoll Paque TM 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 CO₂ de 5% a 37°C e, posteriormente, as células foram estimuladas com anti-CD3 e anti-CD28 e tratadas ou não com IBPA (50 μ M), Ibuprofeno (28,8 μ M), Paracetamol (21,2 μ M) e Ibuprofeno com Paracetamol em mistura física (28,8 μ M e 21,2 μ M). Após 48 horas, as placas foram centrifugadas para coleta dos sobrenadantes que foram armazenados a -80°C para posterior dosagem de citocinas e quimiocinas.

3.4.3 Dosagem de Citocinas/Quimiocinas

O ELISA do tipo sanduíche foi utilizado para dosagem das citocinas/quimiocinas IL-6, IL-4, CCL-2, IL-8 (Tabela 1) no sobrenadante das culturas de células, seguindo as instruções recomendadas pelos fornecedores. A leitura da absorbância foi realizada em leitora de microplacas de 96 poços (Biotek) devidamente calibrada.

A tabela abaixo apresenta as citocinas avaliadas por ELISA, seus fabricantes e limites de detecção.

Tabela 2. Citocinas avaliadas pela técnica ELISA, fabricantes e limites de detecção.

CITOCINA/ QUIMIOCINA	FABRICANTE	LIMITES DE DETECÇÃO
		(pg/ml)
IL-6	BD Biosciences	4,69 – 600
IL-4	BD Biosciences	3,90 – 500
CCL-2	BD Biosciences	3,90 – 500
IL-8	BD Biosciences	1,56 – 200

3.5 ANÁLISE DOS RESULTADOS

As análises dos dados foram realizadas no software GraphPad Prism, versão 8.0 (San Diego, CA) e as análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste Wilcoxon's signed rank. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

3.6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O presente projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE) (CAAE: 58725722.8.0000.5208) (Anexo A) de acordo com a Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. Todos os indivíduos participantes do estudo deverão assinar o

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para pacientes com esclerose sistêmica (Apêndice A), conforme exigência da referida resolução.

4 RESULTADOS

4.1 DETERMINAÇÃO DO PERFIL CLÍNICO DOS PACIENTES COM ESCLEROSE SISTÊMICA

Foram avaliados 12 pacientes com ES do ambulatório do HC-UFPE, todos do sexo feminino. Na caracterização clínica dos pacientes, foram avaliados comprometimento de órgãos-alvo (presença de úlceras digitais, dismotilidade esofagiana, fibrose pulmonar, hipertensão arterial pulmonar). Na tabela 2 seguem as informações clínicas dos pacientes selecionados

Tabela 3. Características clínicas de pacientes com Esclerose Sistêmica do estudo (n=12).

CARACTERÍSTICAS	TOTAL (n=12)	CUTÂNEA DIFUSA (n=7)	CUTÂNEA LIMITADA (n=5)
Idade (anos)			
média ± DP (mín-máx)	56.6 ± 11.5 (38 – 73)	49.71 ± 8.92 (38 –62)	56 ± 14.03 (39 – 73)
Sexo feminino			
N (%)	12 (100)	7 (100)	5 (100)
Duração da doença (meses)			
Média ± DP (mín-máx)	162 ± 114.4 (48 – 336)	176 ± 126 (60 – 336)	148 ± 111.5 (48 – 300)
Manifestações clínicas N(%)			
Fenômeno de Raynaud	12 (100)	7 (100)	5(100)
Comprometimento esofageano	12 (100)	7 (100)	5 (100)
Pele	12 (100)	7 (100)	5 (100)
Doença Pulmonar	6 (50)	4 (57.1)	2 (40)
Intersticial			
Telangiectasias	5 (41.6)	1 (14.2)	4 (80)
Miopatia	3 (25)	0	3(60)
Calcinose	3 (25)	2 (28.5)	1 (20)
HAP	2 (16.6)	1 (14.2)	1 (20)
Artrite	2 (16.6)	2 (28.5)	0
Escore de Rodnan			
Mediana (mín-máx)	14.5 (3 - 29)	15.71 (3 – 26)	12.8 (3 – 29)
Autoanticorpos N(%)			
Anti-Scl70 positivo	3/12 (25)	2/7 (28.5)	1/5 (20)
Tratamentos N(%)			
IBP	9 (75)	6 (85.7)	3 (60)

Procinético	7 (58.3)	5 (71.4)	2 (40)
BCC	7 (58.3)	3 (42.8)	4 (80)
Colecalciferol	5 (41.6)	2 (28.5)	3 (60)
Micofenolato	4 (33.3)	1 (14.2)	3 (60)
AAS	4 (33.3)	1 (14.2)	3 (60)
IECA	3 (25)	2 (28.5)	1 (20)
BRA	3 (25)	1 (14.2)	2 (40)
Metrotexato	3 (25)	2 (28.5)	1 (20)
Corticoide	3 (25)	1 (14.2)	2 (40)

Fonte: Dados da Pesquisa

DP: desvio-padrão; HAP: hipertensão arterial pulmonar; IBP: inibidor da bomba de prótons; BCC: bloqueadores dos canais de cálcio; AAS: ácido acetilsalicílico; IECA: inibidores da enzima de conversão de angiotensina; BRA: bloqueador do receptor de angiotensina

4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DO IBPA EM CULTURA DE PBMC DE PACIENTES COM ES

Para testar o efeito imunomodulador do tratamento com o híbrido IBPA (50uM) sobre a secreção de citocinas em PBMCs de pacientes com ES foram avaliados os sobrenadantes das culturas de 12 pacientes e analisadas as seguintes citocinas/quimiocinas: IL-6, IL-4, CCL-2 e IL-8.

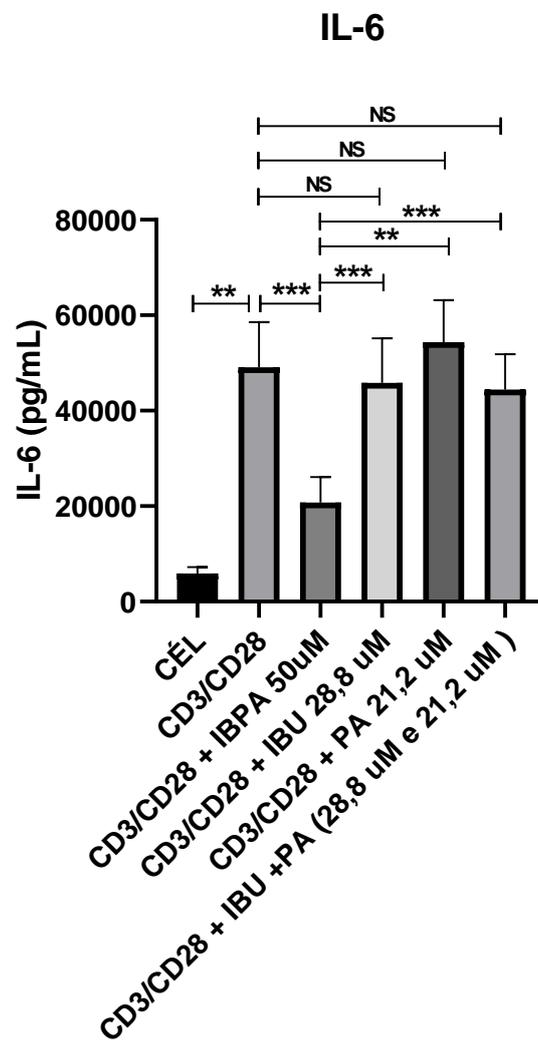
Para IL-6, foi observado que o grupo estimulado com anti-CD3/CD28 teve secreção aumentada da citocina quando comparado ao grupo que não recebeu estímulo (células) (**p=0,0098). Em seguida, avaliou-se o tratamento com o IBPA (50uM), que reduziu significativamente os níveis da IL-6 [Média±DP] [20740 ± 18625 pg/mL] em comparação com as condições estimuladas com anti-CD3/CD28 [49133 ± 322779 pg/mL; ***p=0,005]

No entanto, as condições tratadas com Ibuprofeno (28,8uM) [45847 ± 32287pg/mL; p=0,2783], Paracetamol (21,2 uM) [543665 ± 30529pg/mL; p>0,9999] e Ibuprofeno com Paracetamol e mistura física (28,8uM e 21,2uM) [44454 ± 25540pg/mL; p=0,0771], não alterou significativamente a secreção de IL-6 em comparação com a condição estimulada com anti-CD3/CD28,

Adicionalmente, em comparação com a condição tratada com Ibuprofeno (28,8uM) (***p=0,005), Paracetamol (21,2 uM) (**p=0,0034) e a mistura física de

Ibuprofeno com Paracetamol (28,8uM e 21,2uM) (** $p=0,005$), a condição com o IBPA apresentaram redução na secreção da IL-6 (figura4).

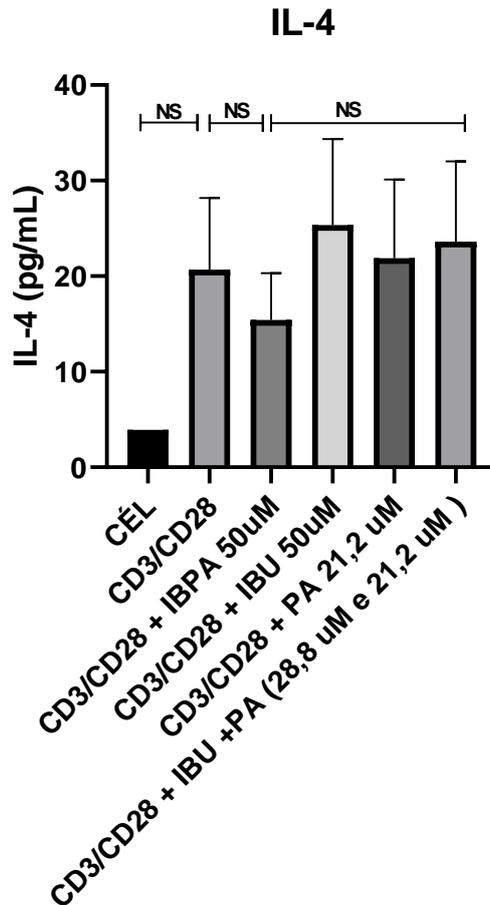
Figura 5: – Avaliação da atividade imunomoduladora em culturas de PBMC de pacientes com ES (Níveis de IL6). NS= Não Significativo



Fonte: Dados da Pesquisa

Quanto a IL-4, foi observado que o grupo estimulado com anti-CD3/CD28 não teve diferença estatística quando comparado ao grupo que recebeu apenas células ($p=0,0625$). Posteriormente avaliou-se o tratamento com o híbrido IBPA (50uM) [Média±DP] [15,45 ± 16,95 pg/mL] não foi observada alteração significativa nos níveis de IL-4 em comparação com as condições apenas estimuladas anti-CD3/CD28 [20,70 ± 25,94 pg/mL; $p=0,3750$], tratadas com Ibuprofeno (28,8uM) [25,36 ± 31,10 pg/mL; $p=0,1484$], Paracetamol (21,2 uM) [21,9 ± 28,45 pg/mL; $p=0,3750$] e mistura física de Ibuprofeno com Paracetamol (28,8uM e 21,2uM) [23,63 ± 29,02 pg/mL; $p=0,1953$] (figura 5).

Figura 6: – Avaliação da atividade imunomoduladora em culturas de PBMC de pacientes com ES (Níveis de IL4) . NS= Não Significativo.



Fonte: Dados da Pesquisa

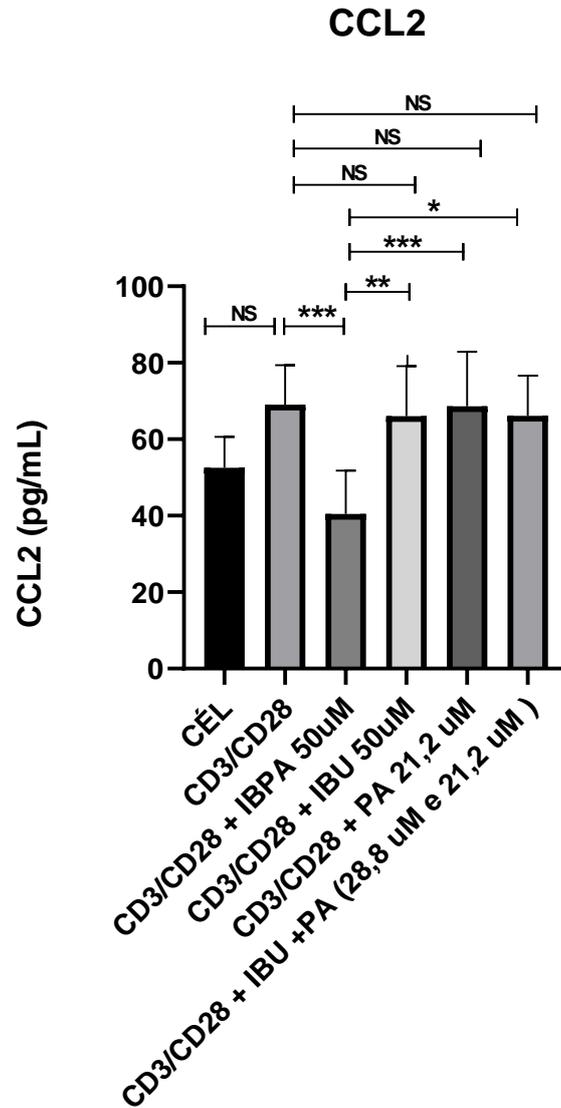
É possível observar na figura 6, que o tratamento com o híbrido IBPA (50uM) [Média±DP] [40,5 ± 39,25 pg/mL] reduziu significativamente os níveis da CCL-2 em comparação com as condições apenas estimuladas anti-CD3/CD28 [69,01 ± 35,82 pg/mL; ***p=0,005].

Para as condições tratadas com Ibuprofeno (28,8uM) [66,04 ± 45,47 pg/mL ; p=0,6221], Paracetamol (21,2 uM) [68,66 ± 49,14 pg/mL; p=0,7334] e mistura física Ibuprofeno com Paracetamol (28,8uM e 21,2uM) [66,11 ± 36,45pg/mL; p=0,8501], não alterou significativamente a secreção de CCL-2 em comparação com a condição estimulada com anti-CD3/CD28.

No entanto, em comparação com a condição tratada com Ibuprofeno (28,8uM) (**p=0,0024), Paracetamol (21,2 uM) (***p=0,0010) e mistura física de Ibuprofeno com Paracetamol (28,8uM e 21,2uM) (*p=0,161) a condição com o IBPA apresentaram redução na secreção da CCL-2 .

Foi observado, ainda, que o grupo estimulado com anti-CD3/CD28 não teve diferença estatística quando comparado ao grupo que recebeu apenas células (p=0,4648), embora se observe uma tendência.

Figura 7: – Avaliação da atividade imunomoduladora em culturas de PBMC de pacientes com ES (Níveis de CCL-2) . NS= Não Significativo.



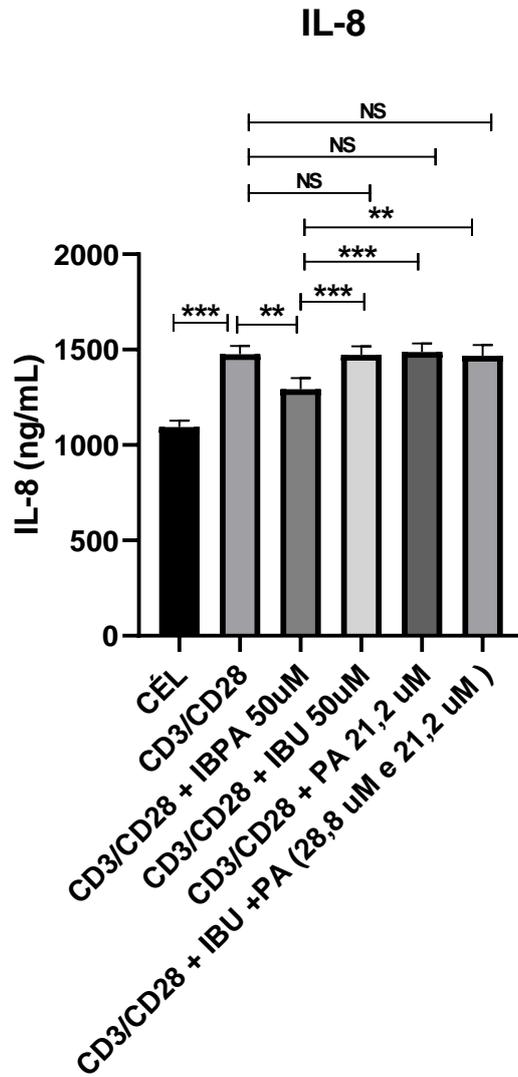
Fonte: Dados da Pesquisa

Para IL-8, foi observado que o grupo estimulado com anti-CD3/CD28 foi significativamente maior quando comparado ao grupo que recebeu apenas células (**p=0,005) (figura 7). O tratamento com o híbrido IBPA (50uM) [Média±DP] [1293 ±

202,7 ng/mL] reduziu significativamente os níveis da IL-8 em comparação com a condição estimulada com CD3/CD28 [1476 ± 146,0 ng/mL; **p=0,0093]. Por sua vez, foi evidenciado que as condições tratadas com Ibuprofeno (28,8uM) [1472 ± 158,3 ng/mL; p=0,9097], Paracetamol (21,2 uM) [1487 ± 156,3 ng/mL; p=0,6772] e mistura física de Ibuprofeno com Paracetamol (28,8uM e 21,2uM) [1468 ± 191,4 ng/mL; p=0,4238], não teve diferença estatística em comparação com o grupo estimulado com anti-CD3/CD28.

Seguidamente, constatou-se que quando comparadas com as condições tratadas com Ibuprofeno (28,8uM) (***p=0,0010), Paracetamol (21,2 uM) (***p=0,005] e mistura física de Ibuprofeno com Paracetamol (28,8uM e 21,2uM) (**p=0,0049), a condição tratada com o IBPA apresentaram redução na secreção da IL-8.

Figura 8: – Avaliação da atividade imunomoduladora em culturas de PBMC de pacientes com ES (Níveis de IL8). NS= Não Significativo



Fonte: Dados da Pesquisa

5 DISCUSSÃO

No presente estudo avaliamos o efeito imunomodulador do híbrido IBPA em cultivos de PBMC de pacientes com esclerose sistêmica. Observou-se que o IBPA reduziu significativamente a secreção de IL-6, CCL-2 e IL-8. Os efeitos observados nas condições de cultura estimuladas com anti-CD3/CD28 tratadas com o IBPA não foram identificados nas condições de cultura estimuladas com anti-CD3/CD28 tratadas com o ibuprofeno, paracetamol e a mistura física de ibuprofeno com paracetamol, demonstrando que a hibridização dos dois fármacos promoveu melhora significativa na atividade do novo composto em comparação aos fármacos isoladamente e misturados fisicamente. O IBPA apresentou resposta em todas as citocinas (50 μ M), com exceção da IL-4, onde nenhum efeito foi observado.

Os AINEs são a classe de medicamentos mais prescritos e vendidos no mundo. Comumente, eles são utilizados no tratamento de dor aguda, moderada e crônica decorrente do processo inflamatório (Melo *et al.*, 2019). Além disso, possuem ação anti-inflamatória e analgésica, devido ao bloqueio das enzimas ciclooxigenases (COX), que são responsáveis pela conversão do ácido araquidônico em prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos, mediadores do processo inflamatório, impedindo que o mesmo aconteça (Silva *et al.*, 2019).

O híbrido IBPA foi sintetizado a partir da combinação do ibuprofeno e paracetamol e apresentou efeito farmacológico imunomodulador, através da redução da secreção de importantes mediadores relacionados com inflamação e fibrose na patogênese da ES (Abualhasan, *et al.* 2020; González-Trujano *et al.*, 2018). A hibridização molecular é uma estratégia da química medicinal que visa combinar duas moléculas para formar um novo composto químico, com o objetivo de modular diferentes alvos e fornecer estratégias terapêuticas eficientes para o tratamento de doenças complexas. Os nossos resultados evidenciaram que a estratégia utilizada para a síntese do IBPA foi bem sucedida, uma vez que o composto apresentou atividade significativamente superior com relação aos fármacos isoladamente e a mistura física dos dois fármacos (Pedrosa *et al.*, 2017; Ivasiv *et al.* 2019).

O IBPA reduziu significativamente a secreção da citocina IL-6, em

comparação com a condição estimulada com anti-CD3/CD28, em PBMC de pacientes com ES. O tratamento individual do Ibuprofeno e Paracetamol e até em mistura física não promoveu alteração significativa na secreção da citocina em PBMC de pacientes com ES. IL-6 encontra-se elevada no soro de pacientes com ES e tem sido associada ao envolvimento de múltiplos órgãos, incluindo a pele (Benfaremo *et al.*; 2022; Rosendahl, 2022), além de ter sido associada com presença de fibrose pulmonar (Bukiri; Volkmann *et al.*, 2022), e aumento de mortalidade. Estes estudos demonstram que a IL-6 está envolvida na patogênese da ES, e pode contribuir para a progressão da fibrose e severidade da doença. Dessa forma, tendo em vista o papel crucial da IL-6 no desenvolvimento e evolução da ES, essa citocina é um importante alvo terapêutico para a doença. O Tocilizumabe é um anticorpo monoclonal humanizado que inibe a ligação da IL-6 ao seu receptor de membrana (mIL-6R) e bloqueia os seus efeitos pró-inflamatórios e pró-fibróticos, e que tem demonstrado benefícios na fibrose cutânea e pulmonar em ensaios clínicos (Khanna, *et al.* 2016).

Foi observada significativa redução dos níveis de CCL2/MCP-1, e CXCL8/IL-8 em PBMC de pacientes com ES tratadas com o híbrido IBPA. Como discutido anteriormente, essas quimiocinas têm sido implicadas na fisiopatologia da doença e sua redução poderia se traduzir em benefício clínico (Bremilla *et al.*, 2012). CCL2/MCP-1 e CXCL8/IL-8 representam potenciais alvos terapêuticos na ES tendo em vista suas ações pró-inflamatórias e pró-fibróticas. Nos últimos anos, o bloqueio da sinalização de quimiocinas ganhou interesse crescente como uma potencial nova estratégia terapêutica. CCL2/MCP-1 é um quimioatraente de monócitos predominante e ativador de células mononucleares, promovendo a migração de células inflamatórias do sangue para os tecidos envolvidos. Além de seus efeitos pró-fibróticos, como estímulo à secreção de IL-4 por linfócitos T e, indiretamente, pois induz a proliferação de fibroblastos, a diferenciação de miofibroblastos e estimula a biossíntese de colágeno (Galluccio *et al.*, 2011.) Embora os resultados com o tratamento com anticorpo monoclonal humano anti-MCP-1 e antagonista de CCR2 na artrite reumatóide em ensaios clínicos não tenham sido encorajadores (Haringman *et al.*;2006; Vergunst *et al.* 2008), essas moléculas não foram avaliadas em pacientes com ES. Além disso, a descoberta de novas moléculas capazes de modular a

produção de CCL2/MCP-1 que pode representar papel promissor na terapêutica da ES, tendo em vista a atuação destes mediadores na patogênese da doença.

Estudos também têm sugerido um papel das citocinas da via Th17, como IL-17A e F, na patogênese da fibrose na ES. A IL-17A tem sido implicada na ativação de fibroblastos, estimulando-os a secretar citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e CXCL8/IL-8, além de aumentar a expressão de ICAM-1 e estimular a secreção de IL-6 por células endoteliais. Nessa perspectiva, existem muitos tipos de anticorpos que bloqueiam uma ampla gama de áreas na via da IL-17 em uso clínico. Dentre eles, se tem o Secukinumab, aprovado em 2015 (Kurschus; Moos, 2017), que antagoniza a IL-17A. Secuquinumabe e Ixequizumabe inibem tanto IL-17A e IL-17A/F e podem ser usados no tratamento de doenças autoimunes. Sendo assim, os resultados positivos emergentes de ensaios clínicos recentes direcionados às principais vias imunitárias da IL-17 são testemunhos do papel fundamental da autoimunidade na patogênese da ES e expressa benefício terapêutico (Wei; Abraham; Ong, 2022; Aung; Hamaguchi; Matsushita, 2023) .

Entretanto, foi demonstrado que o híbrido IBPA não reduziu os níveis de IL-4 no sobrenadante de PBMC de pacientes com ES. É importante ressaltar que o reduzido número de amostras para análise estatística com essas citocinas pode estar influenciando o resultado, uma vez que a variação interindividual pode ser significativa e o poder estatístico ser limitado. Para uma melhor compreensão do possível papel imunomodulador do IBPA é necessário número maior de amostras de pacientes com ES. Uma vez que a IL-4 estimula a proliferação, quimiotaxia, síntese de colágeno e produção de TGF- β e CTGF em fibroblastos normais (Chizzolini *et al.*, 2011; Baraut *et al.*, 2012; Gizinski; Fox, 2014). Em pacientes com ES foram identificados níveis séricos elevados de IL-4, assim como aumento no número de linfócitos T produtores de IL-4 (Denton; Khanna, 2017; Benfaremo *et al.*, 2022).

Assim, estes resultados em conjunto evidenciam o potencial imunomodulador do IBPA para a ES, além de demonstrarem a eficácia da hibridização do ibuprofeno e paracetamol. Cabe ressaltar que o estudo apresenta algumas limitações, como o pequeno número de pacientes com ES incluídos e o baixo número de citocinas avaliadas. Destarte, estudos futuros precisam ser realizados a fim de

reduzir as limitações apresentadas e de explorar de maneira ampla os efeitos imunomoduladores do IBPA na ES.

6 CONCLUSÃO

No presente estudo, foi possível verificar que o tratamento com o híbrido IBPA em PBMC de pacientes com ES promoveu redução significativa nos níveis de IL-6, IL-8 e CCL2, evidenciando importante atividade imunomoduladora e sugerindo seu potencial terapêutico na doença. Não foram observados efeitos do tratamento do híbrido IBPA na secreção da citocina IL-4.

7 PERSPECTIVAS

- Aumentar o grupo de pacientes para uma melhor análise dos efeitos imunomoduladores do IBPA;
- Avaliar a atividade antifibrótica do híbrido IBPA em pacientes com ES em comparação com o ibuprofeno e paracetamol isoladamente e misturado fisicamente;
- Avaliar a atividade imunomoduladora do híbrido IBPA na produção de outras citocinas/quimiocinas em PBMC de pacientes com ES;

REFERÊNCIAS

- Abualhasan, M. N. *et al.* Anti-inflammatory and anticoagulant activities of synthesized NSAID prodrug esters. **Scientifica**, v. 2020, p. 9817502, 2020.
- Allanore, Y. *et al.* Systemic sclerosis. **Nature reviews. Disease primers**, v. 1, n. 1, 2015.
- Antonelli, A. *et al.* Increase of circulating CXCL9 and CXCL11 associated with euthyroid or subclinically hypothyroid autoimmune thyroiditis. **The journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 96, n. 6, p. 1859–1863, 2011.
- Asano, Y. **Recent advances in the treatment of skin involvement in systemic sclerosis. Inflammation and Regeneration**. [s.l: s.n.].
- Aung, W. W.; Hamaguchi, Y.; Matsushita, T. Targeting cytokines and potentiality of JAK–STAT inhibition in systemic sclerosis. **Journal of cutaneous immunology and allergy**, v. 6, n. 1, p. 4–12, 2023.
- Ayoub, S. S. Paracetamol (acetaminophen): A familiar drug with an unexplained mechanism of action. **Temperature (Austin, Tex.)**, v. 8, n. 4, p. 351–371, 2021.
- Balanescu, P. IL-17, IL-6 and IFN-gamma in Systemic Sclerosis Patients. **Romanian journal of internal medicine = Revue roumaine de medecine interne**, p. 44–49, 2015.
- Baraut, J. *et al.* Les cytokines dans la sclérodémie systémique. **Pathologie-biologie**, v. 60, n. 2, p. 127–139, 2012.
- Benfaremo, D. *et al.* Systemic sclerosis: From pathophysiology to novel therapeutic approaches. **Biomedicines**, v. 10, n. 1, p. 163, 2022.
- Bos, C. L. *et al.* Molecular subtypes of systemic sclerosis in association with anti-centromere antibodies and digital ulcers. **Genes and immunity**, v. 10, n. 3, p. 210–218, 2009.
- Brasil, F. A. F. Secretaria de Atenção à Saúde. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Esclerose Sistêmica: PORTARIA CONJUNTA Nº 09**. Brasília: Ministério da Saúde. 39p, 2022
- Brembilla, N. C.; Chizzolini, C. Ecs-Ecn Junior Review Award -T cell abnormalities in systemic sclerosis with a focus on Th17 cells. **European Cytokine Network**, n. 23, p. 128–139, 2012.

Bukiri, H.; Volkmann, E. R. Current advances in the treatment of systemic sclerosis. **Current opinion in pharmacology**, v. 64, n. 102211, p. 102211, 2022.

Chizzolini, C. **Polarized subsets of human T-helper cells induce distinct patterns of chemokine production by normal and systemic sclerosis dermal fibroblasts. Arthritis research & therapy.** [s.l: s.n.].

Chizzolini, C. *et al.* Fibrosis and immune dysregulation in systemic sclerosis. **Autoimmunity reviews**, v. 10, n. 5, p. 276–281, 2011.

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.

Codullo, V. *et al.* An investigation of the inflammatory cytokine and chemokine network in systemic sclerosis. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 70, n. 6, p. 1115–1121, 2011.

Conaghan, P. G. A turbulent decade for NSAIDs: update on current concepts of classification, epidemiology, comparative efficacy, and toxicity. **Rheumatology international**, v. 32, n. 6, p. 1491–1502, 2012.

Cutolo, M.; Soldano, S.; Smith, V. Pathophysiology of systemic sclerosis: current understanding and new insights. **Expert review of clinical immunology**, v. 15, n. 7, p. 753–764, 2019.

Dantas, A. T. *et al.* Interferons and systemic sclerosis: correlation between interferon gamma and interferon-lambda 1 (IL-29). **Autoimmunity**, v. 48, n. 7, p. 429–433, 2015.

De Martinis, M. *et al.* An overview of environmental risk factors in systemic sclerosis. **Expert review of clinical immunology**, v. 12, n. 4, p. 465–478, 2016.

Denton, C. P. *et al.* Renal complications and scleroderma renal crisis. **Rheumatology (Oxford, England)**, v. 48 Suppl 3, n. suppl_3, p. iii32-5, 2009.

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

Denton, C. P.; Ong, V. H. Targeted therapies for systemic sclerosis. **Nature reviews. Rheumatology**, v. 9, n. 8, p. 451–464, 2013.

Distler, J. H. W. *et al.* Monocyte chemoattractant proteins in the pathogenesis of systemic sclerosis. **Rheumatology (Oxford, England)**, v. 48, n. 2, p. 98–103, 2009.

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

Ferrer, M. D. *et al.* Cyclooxygenase-2 inhibitors as a therapeutic target in inflammatory diseases. **Current medicinal chemistry**, v. 26, n. 18, p. 3225–3241, 2019.

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, vi, 2003.

Furuse, S. *et al.* Serum concentrations of the CXC chemokines interleukin 8 and growth-regulated oncogene-alpha are elevated in patients with systemic sclerosis. **The journal of rheumatology**, v. 30, n. 7, p. 1524–1528, 2003.

Galluccio, F. *et al.* Registries in systemic sclerosis: a worldwide experience. **Rheumatology (Oxford, England)**, v. 50, n. 1, p. 60–68, 2011.

Geyer, M.; Müller-Ladner, U. Clinical reviews in allergy & immunology, v. 40, n. p. 92–103, 2010.

Gizinski, A. M.; Fox, D. A. T cell subsets and their role in the pathogenesis of rheumatic disease. **Current opinion in rheumatology**, v. 26, n. 2, p. 204–210, 2014.

González-Trujano, M. E. *et al.* Synthesis and antinociceptive evaluation of bioisosteres and hybrids of naproxen, ibuprofen and paracetamol. **Biomedecine & pharmacotherapie [Biomedicine & pharmacotherapy]**, v. 101, p. 553–562, 2018.

Guidolin, F.; Esmanhotto, L.; Skare, T. L. Prevalência de achados cutâneos em portadores de esclerose sistêmica - Experiência de um hospital universitário. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 80, n. 5, p. 481–486, 2005.

Ha, M.-W.; Paek, S.-M. Recent advances in the synthesis of ibuprofen and naproxen. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 26, n. 16, p. 4792, 2021.

Haringman, J. J. *et al.* A randomized controlled trial with an anti-CCL2 (anti-monocyte chemotactic protein 1) monoclonal antibody in patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis and rheumatism**, v. 54, n. 8, p. 2387–2392, 2006.

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

HILÁRIO, M. O. E.; TERRERI, M. T.; LEN, C. A. Antiinflamatórios não-hormonais: inibidores da ciclooxygenase 2. **Jornal de pediatria**, v. 82, n. 5, p. S206–S212, 2006.

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. **et al [Inflammation research]**, v. 64, n. 3–4, p. 151–159, 2015.

Hughes, M.; Herrick, A. L. Systemic sclerosis. **British journal of hospital medicine (London, England: 2005)**, v. 80, n. 9, p. 530–536, 2019.

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.

Ivasiv, V. *et al.* Molecular hybridization as a tool for designing multitarget drug candidates for complex diseases. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 19, n. 19, p. 1694–1711, 2019.

Kanellakis, P. *et al.* A pro-fibrotic role for interleukin-4 in cardiac pressure overload. **Cardiovascular research**, v. 95, n. 1, p. 77–85, 2012.

Kayser, C.; Fritzler, M. J. Autoantibodies in systemic sclerosis: unanswered questions. **Frontiers in immunology**, v. 6, p. 167, 2015.

Khanna, D. *et al.* Safety and efficacy of subcutaneous tocilizumab in adults with systemic sclerosis (faSScinate): a phase 2, randomised, controlled trial. **Lancet**, v. 387, n. 10038, p. 2630–2640, 2016.

Khor, C.-G. *et al.* Rituximab for refractory digital infarcts and ulcers in systemic sclerosis. **Clinical rheumatology**, v. 33, n. 7, p. 1019–1020, 2014.

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 & therapeutics**, v. 45, n. 7, p. 883–898, 2017.

Kurschus, F. C.; Moos, S. IL-17 for therapy. **Journal of dermatological science**, v. 87, n. 3, p. 221–227, 2017.

Leask, A. Towards an anti-fibrotic therapy for scleroderma: targeting myofibroblast differentiation and recruitment. **Fibrogenesis & tissue repair**, v. 3, n. 1, p. 8, 2010.

Leroy, E. C. *et al.* Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. **The journal of rheumatology**, v. 15, n. 2, p. 202–205, 1988.

Lucas, G. *et al.* Aspectos fisiopatológicos da nefropatia por antiinflamatórios não esteroidais. **J Bras Nefrol**, v. 41, n. 1, p. 124–130, 2018.

Manno, R.; Boin, F. Immunotherapy of systemic sclerosis. **Immunotherapy**, v. 2, n. 6, p. 863–878, 2010.

Masi, A. T. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). **Arthritis & Rheumatology**, p. 581–590, 1980.

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

Melo, L.G. de A. et al. Automedicação: o uso indiscriminado de anti-inflamatórios não esteroidais e suas implicações para a saúde. **Revista Científica: Faculdade Atenas**, v.11,n.4,2019

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*, [s.l.]v.73,n.2,p.119-125,11 set.2017.

Mendonça Junior, F. J. Hybrid Compounds as Direct Multitarget Ligands: A Review. **Curr. Med. Chem.**, v. 17, p. 1044–1079, 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.

Nikpour, M.; Baron, M. Mortality in systemic sclerosis: lessons learned from population-based and observational cohort studies. **Current opinion in rheumatology**, v. 26, n. 2, p. 131–137, 2014.

Ohashi, N.; Kohno, T. Analgesic effect of acetaminophen: A review of known and novel mechanisms of action. **Frontiers in pharmacology**, v. 11, 2020.

Parra, E. R. et al. Immunohistochemical and morphometric evaluation of COX 1 and COX-2 in the remodeled lung in idiopathic pulmonary fibrosis and systemic sclerosis. **Jornal brasileiro de pneumologia: publicação oficial da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia**, v. 39, n. 6, p. 692–700, 2013.

Pedrosa, M. O. et al. Hybrid Compounds as Direct Multitarget Ligands: A Review. **Curr. Med. Chem.**, v. 17, p. 1044–1079, 2017.

Pope, J. E. et al. State-of-the-art evidence in the treatment of systemic sclerosis. **Nature reviews. Rheumatology**, v. 19, n. 4, p. 212–226, 2023.

Rabquer, B. J. *et al.* Dysregulated expression of MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10 and CXCL16 and their receptors in systemic sclerosis. **Arthritis research & therapy**, v. 13, n. 1, p. R18, 2011.

Rang, H. P. *et al.* Farmacologia. 9ª edição. Rio de Janeiro , Elsevier,808p, 2019.

Real, A. *et al.* Envolvimento Gastrointestinal na Esclerose Sistêmica. **Galicia-clinica**, v. 79, n. 1, p. 12, 2018.

Rice, L. M. *et al.* Fresolimumab treatment decreases biomarkers and improves clinical symptoms in systemic sclerosis patients. **The journal of clinical investigation**, v. 125, n. 7, p. 2795–2807, 2015.

Rosendahl, A.-H.; Schönborn, K.; Krieg, T. Pathophysiology of systemic sclerosis (scleroderma). **The Kaohsiung journal of medical sciences**, v. 38, n. 3, p. 187–195, 2022.

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.

Savarino, E. *et al.* Gastrointestinal involvement in systemic sclerosis. **Presse medicale (Paris, France: 1983)**, v. 43, n. 10 Pt 2, p. e279-91, 2014.

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

Silva, L.S.; *et al.* Incidência da automedicação no uso indiscriminado de anti-inflamatórios esteroidais e não esteroidais entre universitários de Imperatriz-MA. **Braz.J. Hea. Rev.**, Curitiba, v.2,n.2,p.862-887, 2019

Sousa, T. C. *et al.* Tamponamento Cardíaco Na Esclerose Sistêmica: Um Achado RarO. **Revista brasileira de reumatologia**, v. 57, p. S103, 2017.

Stern, E. P.; Denton, C. P. The pathogenesis of systemic sclerosis. **Rheumatic diseases clinics of North America**, v. 41, n. 3, p. 367–382, 2015.

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

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.

Theken, K. N. Variability in analgesic response to non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Prostaglandins & other lipid mediators**, v. 139, p. 63–70, 2018.

Trojanowska, M. Cellular and molecular aspects of vascular dysfunction in systemic sclerosis. **Nature reviews. Rheumatology**, v. 6, n. 8, p. 453–460, 2010.

Van Den Hoogen, F. *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.

Van Laar, J. M.; Varga, J. The immunopathology of systemic sclerosis. **Seminars in immunopathology**, v. 37, n. 5, p. 439–441, 2015.

Vergunst, C. E. *et al.* Modulation of CCR2 in rheumatoid arthritis: a double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial. **Arthritis and rheumatism**, v. 58, n. 7, p. 1931–1939, 2008.

Viegas-Junior, C.; Barreiro, E. J.; Fraga, C. A. M. Molecular hybridization: A useful tool in the design of new drug prototypes. **Current medicinal chemistry**, v. 14, n. 17, p. 1829–1852, 2007.

Walker, U. A. *et al.* Clinical risk assessment of organ manifestations in systemic sclerosis: a report from the EULAR Scleroderma Trials And Research group database. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 66, n. 6, p. 754–763, 2007.

Wei, L.; Abraham, D.; Ong, V. The yin and yang of IL-17 in systemic sclerosis. **Frontiers in immunology**, v. 13, 2022.

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

Zhang, Y. *et al.* Murine sclerodermatous graft-versus-host disease, a model for human scleroderma: cutaneous cytokines, chemokines, and immune cell activation. **The journal of immunology**, v. 168, n. 6, p. 3088–3098, 2002.

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: 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 PORTADORES DA ESCLEROSE SISTÊMICA



UFPE
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 **INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS IMUNOMODULADOR E ANTIFIBRÓTICO DA DEXAMETASONA EM CÉLULAS DE PACIENTES COM ESCLEROSE SISTÊMICA E EM MODELO EXPERIMENTAL DA DOENÇA**, que está sob a responsabilidade da pesquisadora Maria Eduarda de Oliveira Gonçalves, residente no endereço Rua Itajai, número 251-A, Capibaribe (São João e São Paulo), São Lourenço da Mata - PE, CEP 54.705-620, Telefone: (81) 98239-1589, e-mail: eduarda.oliveiragoncalves@ufpe.br. Também participam desta pesquisa os pesquisadores: Dr. Anderson Rodrigues de Almeida, e-mail: anderson.ralmeida@ufpe.br, Me. Eudes Gustavo Constantino Cunha, e-mail: eudes.gustavo@ufpe.br, João Victor de Melo Gomes, e-mail: joao.melogomes@ufpe.br, 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 Régio, e-mail: moacyr.rego@gmail.com, Profa. Dra. Michelly Cristiny Pereira, e-mail: michelly.pereira@ufpe.br. Está sob a orientação da Profa. Dra. Maira Galdino da Rocha Pitta, Telefone: (81) 99671-7788, e-mail: maira.pitta@ufpe.br.

Todas as suas dúvidas podem ser esclarecidas com o responsável por esta pesquisa. Apenas quando todos os esclarecimentos forem dados e você concorde com a realização do estudo, pedimos que rubriche as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma via lhe será entregue e a outra ficará com a pesquisadora 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 que afeta principalmente a pele, podendo comprometer também outros órgãos, como pulmão, coração e estômago. 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 fármacos em células do sangue e da pele (em caso de biópsia que consiste na retirada de um fragmento da pele) de pacientes e indivíduos saudáveis não portadores desta doença;
- 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 (18 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 com "punch" de 5mm para retirada do fragmento de pele no antebraço. As biópsias serão realizadas por um médico dermatologista.
- 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 e biópsia de pele, que pode ser desconfortável e o braço pode ficar um pouco dolorido e apresentar hematoma que é uma área arroxeadada no local da coleta ou biópsia. 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 pastas de arquivos, sob a responsabilidade da pesquisadora Maria Eduarda de Oliveira Gonçalves, no Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica – Suely

Galdino, na Universidade Federal de Pernambuco, endereço: Av. Jorn. Aníbal Fernandes - Cidade Universitária, Recife - PE, por um período mínimo de 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 extrajudicial. 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 **INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS IMUNOMODULADOR E ANTIFIBRÓTICO DA DEXAMETASONA EM CÉLULAS DE PACIENTES COM ESCLEROSE SISTÊMICA E EM MODELO EXPERIMENTAL DA DOENÇA**, 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 style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/>	Data de preenchimento ____/____/____	Sexo 1. Masculino 2. Feminino	<input style="width: 20px; height: 20px;" type="checkbox"/>
Registro hospital	Telefone		
Nome do paciente			
Idade (anos) <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/>	Data de Nascimento: ____/____/____		
Início do Fenômeno de Raynaud: ____/____/____ Início do sintoma não-FRy: ____/____/____ Data do diagnóstico: ____/____/____	Tempo FRy (meses): _____ Tempo não-FRy (meses): _____ Tempo diagnóstico (meses): _____	Forma Clínica 1. Cutânea Limitada 2. Cutânea Difusa 3. Sine Escleroderma 4. Overlap (EXCLUIR) 5. Localizada (EXCLUIR)	<input style="width: 20px; height: 20px;" type="checkbox"/>
CLASSIFICAÇÃO (paciente precisa preencher um dos 3 critérios)			
ACR, 1980			
CRITÉRIOS MAIORES () Espessamento cutâneo proximal às MCF ou MTF		CRITÉRIOS MENORES () Esclerodactilia () Cicatrizes digitais ou perda da gordura subcutânea dos dedos () Fibrose pulmonar bibasal	
1 maior OU 2 menores			
ESCLEROSE SISTÊMICA PRECOCE			
() Fenômeno de Raynaudobjetivo + () Capilaroscopia anormal OU () Autoanticorpos específicos		() Fenômeno de Raynaudsubjetivo + () Capilaroscopia anormal E () Autoanticorpos específicos	
CRITÉRIOS EULAR			
() Espessamento da pele dos dedos proximal às MCF			09
() Espessamento da pele dos dedos	() <i>Puffyfingers</i>		02
	() Esclerodactilia (distal às MCF mas proximal às IFPs)		04
() Lesão de polpa digital	() Úlceras digitais		02
	() Pittingscars		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 <input style="width: 20px; height: 20px;" type="checkbox"/>	Anti-Sci70 <input style="width: 20px; height: 20px;" type="checkbox"/>	Anti-centrômero <input style="width: 20px; height: 20px;" type="checkbox"/>	Anti-RNA polimerase III <input style="width: 20px; height: 20px;" type="checkbox"/>
Título: _____ Padrão: _____			

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="text"/> <input type="text"/>		
HAQ:	SHAQ:		

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	BRA <input type="checkbox"/> Losartan <input type="checkbox"/> Valsartan	AAS <input type="checkbox"/>
Pentoxifilina <input type="checkbox"/>	Sildenafil <input type="checkbox"/>	Bosentana <input type="checkbox"/>	Cilostazol <input type="checkbox"/>
Metotrexato <input type="checkbox"/>	Azatioprina <input type="checkbox"/>	Micofenolato <input type="checkbox"/>	Ciclofosfamida VO <input type="checkbox"/>
Ciclofosfamida EV <input type="checkbox"/>	IBP <input type="checkbox"/> Omeprazol <input type="checkbox"/> Pantoprazol	Procinético <input type="checkbox"/> Bromoprida <input type="checkbox"/> Domperidona	Corticoide <input type="checkbox"/> Prednisona <input type="checkbox"/> Prednisolona <input type="checkbox"/>
AINE <input type="checkbox"/>	Rituximabe <input type="checkbox"/>	Leflunomida <input type="checkbox"/>	Colecalciferol <input type="checkbox"/>
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?

Nenhum 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?

Nenhum 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?

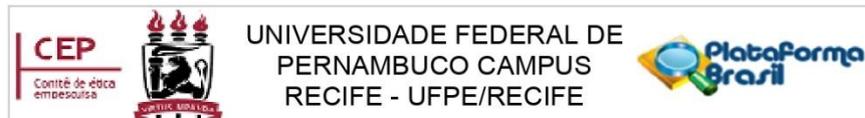
Nenhuma dor 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 Gravidade extrema

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 DA EMENDA

Título da Pesquisa: INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS IMUNOMODULADOR E ANTIFIBRÓTICO DA DEXAMETASONA EM CÉLULAS DE PACIENTES COM ESCLEROSE SISTÊMICA E EM MODELO EXPERIMENTAL DA DOENÇA

Pesquisador: MARIA EDUARDA DE OLIVEIRA GONCALVES

Área Temática:

Versão: 5

CAAE: 58725722.8.0000.5208

Instituição Proponente: Centro de Biosciências

Patrocinador Principal: FUND COORD DE APERFEICOAMENTO DE PESSOAL DE NIVEL SUP

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 6.314.837

Apresentação do Projeto:

Trata-se de uma solicitação de emenda. A pesquisadora apresenta a seguinte justificativa: "Em estudo anterior realizado pelo grupo, foi verificada propriedades imunomoduladoras e antifibrótica do IBPA em um modelo experimental de esclerose sistêmica induzida por ácido hipocloroso. E in vitro o IBPA não apresentou citotoxicidade em PBMCs de voluntários saudáveis. Nessa perspectiva, surge o interesse em transpor a pesquisa e avaliar in vitro a atividade dessa molécula frente a células de pacientes com esclerose sistêmica. A fim de investigar e inseri-lo no hall de possíveis agentes terapêuticos para a esclerose sistêmica. A pesquisadora acrescentou no projeto detalhado o objetivo específico; "Avaliar a atividade imunomoduladora in vitro do IBPA e seus ativos isolados em PBMCs de pacientes com esclerose sistêmica;" Não haverá acréscimo aos riscos já apresentados pela pesquisa.

Objetivo da Pesquisa:

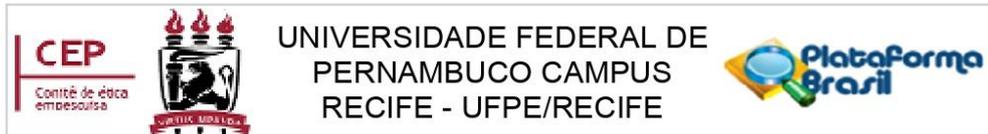
OBJETIVO GERAL:

Avaliar a atividade imunomoduladora e antifibrótica in vitro da Dexametasona em células de pacientes com esclerose sistêmica e in vivo em modelo experimental de ES.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1 - Avaliar a atividade imunomoduladora in vitro da Dexametasona em LT CD4± , LT CD8± , LB e

Endereço: Av. das Engenhasria, s/n, 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 **Fax:** (81)2126-3163 **E-mail:** cephumanos.ufpe@ufpe.br



Continuação do Parecer: 6.314.837

macrófagos na produção de citocinas das vias Th1, Th2 e Th17 e quimiocinas envolvidas na patogênese da esclerose sistêmica;

- 2 - Avaliar a atividade imunomoduladora in vitro do IBPA e seus ativos isolados em PBMCs de pacientes com esclerose sistêmica;
- 3 - Avaliar a atividade antifibrótica in vitro da Dexametasona na expressão de marcadores fibróticos em fibroblastos dérmicos;
- 4 - Avaliar a atividade antifibrótica in vivo da Dexametasona na expressão de marcadores fibróticos e espessamento dérmico em modelo experimental de Esclerose Sistêmica.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

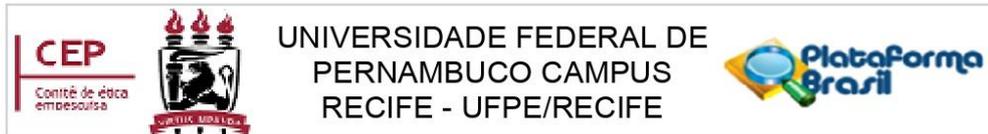
RISCOS: A pesquisadora faz referência aos riscos decorrentes da coleta de sangue e biópsia de pele (em pacientes com esclerose sistêmica) que pode ser desconfortável e o braço pode ficar dolorido e apresentar hematoma no local da coleta. Caso haja formação de hematoma o profissional irá retirar o torniquete e agulha imediatamente e, em seguida, será realizada no local compressão durante dois minutos. A aplicação de gelo será feita no local da coleta com intuito de atenuar a dor. No local da realização da biópsia de pele será feito um curativo. Em caso de danos ocasionados por qualquer procedimentos envolvendo a pesquisa o paciente terá direito a assistência integral e gratuita. Foi anexado termo de compromisso e confidencialidade.

BENEFÍCIOS: a pesquisa poderá trazer um benefício direto para o paciente uma vez será submetido a uma avaliação clínica e, em caso de detecção de alguma alteração sugestiva de doença autoimune, haverá encaminhamento para um acompanhamento adequado, além da contribuição de maneira geral (benefício indireto) para a melhor compreensão do mecanismo da doença, guiando as equipes de saúde para maior sucesso no tratamento da doença tornando as instituições responsáveis mais especializadas no estudo da ES. Com isso, a comunidade de pacientes acometidas pela doença que frequentam o HC/UFPE podem se beneficiar através do bem-estar social que a instituição promove.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O tema é importante. A pesquisadora justifica a pesquisa uma vez que dos poucos estudos realizados, os resultados obtidos sobre sua atividade frente a doença são controversos. Logo, faz-se necessário ensaios in vitro e in vivo que auxiliem na elucidação do papel terapêutico desempenhado pela Dexametasona nas diferentes fases da doença (inflamatória e fibrótica). Será um estudo transversal descritivo e analítico realizado no ambulatório de pesquisa clínica do

Endereço: Av. das Engenhasria, s/n, 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 **Fax:** (81)2126-3163 **E-mail:** cephumanos.ufpe@ufpe.br



Continuação do Parecer: 6.314.837

Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco – HC/UFPE, e o projeto detalhado contempla na sua metodologia todo o delineamento experimental. A pesquisa incluirá 30 pacientes com esclerose O tema é importante. A pesquisadora justifica a pesquisa uma vez que dos poucos estudos realizados, os resultados obtidos sobre sua atividade frente a doença são controversos. Logo, faz-se necessário ensaios in vitro e in vivo que auxiliem na elucidação do papel terapêutico desempenhado pela Dexametasona nas diferentes fases da doença (inflamatória e fibrótica). Será um estudo transversal descritivo e analítico realizado no ambulatório de pesquisa clínica do Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de

Pernambuco – HC/UFPE, e o projeto detalhado contempla na sua metodologia todo o delineamento experimental. A pesquisa incluirá 30 pacientes com esclerose sistêmica atendidos e acompanhados no Ambulatório de Pesquisa Clínica do Serviço de Reumatologia do

Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco – HC/UFPE, selecionados aleatoriamente de acordo com o atendimento do Ambulatório, através dos critérios de inclusão e exclusão. O grupo controle será composto por 10 indivíduos saudáveis, que não tenham história clínica ou diagnóstico de esclerose sistêmica ou de outras doenças inflamatórias autoimunes, escolhidos aleatoriamente na população que frequenta o HC. Nos pacientes com ES além da coleta de sangue será realizada biópsia de pele com punch de 4mm, com retirada de um fragmento do antebraço. A pesquisadora informa que no caso da biópsia o grupo de voluntários saudáveis será composto por indivíduos submetidos à cirurgia plástica no Serviço de Cirurgia Plástica do HC-UFPE, que após esclarecimentos sobre a pesquisa assinaram o TCLE e aceitaram doar as sobras de pele da cirurgia plástica. A pesquisa está orçada em R\$ 45.098,49, com financiamento da CAPES.

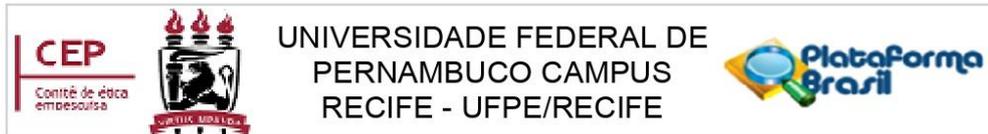
Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram anexados: 1- Folha de rosto; 2 - carta de anuência do HC assinada pela reumatologia (setor onde serão recrutados os pacientes); 3 - Carta de anuência do NUPIT; 4 - Declaração de vínculo da mestranda com a pós; 5 - Lattes dos pesquisadores; 6 - termo de compromisso e confidencialidade; 7 - Projeto detalhado e projeto modelo plataforma; 8 - TCLEs para pacientes e controles; 9 - Justificativa para solicitação da emenda;

Recomendações:

Não há.

Endereço: Av. das Engenhasria, s/n, 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 **Fax:** (81)2126-3163 **E-mail:** cephumanos.ufpe@ufpe.br



Continuação do Parecer: 6.314.837

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências.

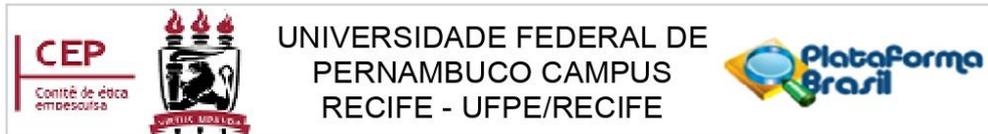
Considerações Finais a critério do CEP:

A emenda foi avaliada e APROVADA pelo colegiado do CEP.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_2187907_E1.pdf	18/09/2023 09:52:43		Aceito
Outros	JUSTIFICATIVADEEMENDA.pdf	18/09/2023 09:51:39	MARIA EDUARDA DE OLIVEIRA GONCALVES	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ModelodeProjetodetalhadoparaoCEP.pdf	11/09/2023 08:38:43	MARIA EDUARDA DE OLIVEIRA GONCALVES	Aceito
Outros	CARTARESPOSTAASPENDENCIASDAEMENDA.pdf	11/09/2023 08:37:57	MARIA EDUARDA DE OLIVEIRA GONCALVES	Aceito
Outros	CARTADERESPOSTAASPENDENCIAS.pdf	11/07/2022 14:28:58	MARIA EDUARDA DE OLIVEIRA GONCALVES	Aceito
Orçamento	orcamento.pdf	15/05/2022 21:54:45	MARIA EDUARDA DE OLIVEIRA GONCALVES	Aceito
Cronograma	cronograma.pdf	15/05/2022 21:51:20	MARIA EDUARDA DE OLIVEIRA GONCALVES	Aceito
Outros	CartaAnuenciaNUPIT.pdf	15/05/2022 21:44:32	MARIA EDUARDA DE OLIVEIRA GONCALVES	Aceito
Outros	cartadeanuenciaHC.pdf	15/05/2022 21:43:19	MARIA EDUARDA DE OLIVEIRA GONCALVES	Aceito
Outros	declaracao_vinculo.pdf	15/05/2022 21:42:48	MARIA EDUARDA DE OLIVEIRA GONCALVES	Aceito
Outros	TermoConfidencialidade.pdf	15/05/2022 21:41:21	MARIA EDUARDA DE OLIVEIRA GONCALVES	Aceito
Outros	LattesMariaEduardadeOliveiraGoncalves.pdf	15/05/2022 21:21:54	MARIA EDUARDA DE OLIVEIRA GONCALVES	Aceito

Endereço: Av. das Engenhasria, s/n, 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 **Fax:** (81)2126-3163 **E-mail:** cephumanos.ufpe@ufpe.br



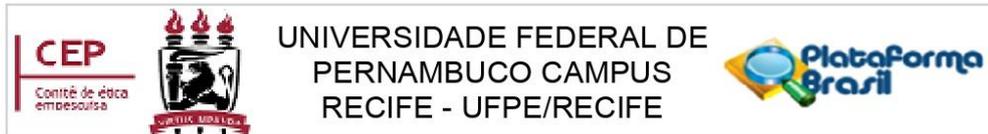
Continuação do Parecer: 6.314.837

Outros	LattesAngelaLuziaBrancoPintoDuarte.pdf	15/05/2022 21:20:34	MARIA EDUARDA DE OLIVEIRA GONCALVES	Aceito
Outros	CurriculodoSistemadeCurriculosLattes_MoacyrJesusBarretodeMeloRego.pdf	15/05/2022 21:19:50	MARIA EDUARDA DE OLIVEIRA GONCALVES	Aceito
Outros	CurriculodoSistemadeCurriculosLattes_MichellyCristinyPereira.pdf	15/05/2022 21:19:25	MARIA EDUARDA DE OLIVEIRA GONCALVES	Aceito
Outros	CurriculodoSistemadeCurriculosLattes_MairaGaldinodaRochaPitta.pdf	15/05/2022 21:18:54	MARIA EDUARDA DE OLIVEIRA GONCALVES	Aceito
Outros	CurriculodoSistemadeCurriculosLattes_JoaoVictordeMeloGomes.pdf	15/05/2022 21:18:05	MARIA EDUARDA DE OLIVEIRA GONCALVES	Aceito
Outros	CurriculodoSistemadeCurriculosLattes_EudesGustavoConstantinoCunha.pdf	15/05/2022 21:17:16	MARIA EDUARDA DE OLIVEIRA GONCALVES	Aceito
Outros	CurriculodoSistemadeCurriculosLattes_AndreaTavaresDantas.pdf	15/05/2022 21:17:01	MARIA EDUARDA DE OLIVEIRA GONCALVES	Aceito
Outros	CurriculodoSistemadeCurriculosLattes_AndersonRodriguesdeAlmeida.pdf	15/05/2022 21:16:39	MARIA EDUARDA DE OLIVEIRA GONCALVES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEMaiores18_Pacientes.pdf	15/05/2022 21:09:52	MARIA EDUARDA DE OLIVEIRA GONCALVES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEMaiores18_Controles.pdf	15/05/2022 21:09:38	MARIA EDUARDA DE OLIVEIRA GONCALVES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Tcle_impossibilitadosdeassinar_pacientes.pdf	15/05/2022 21:09:25	MARIA EDUARDA DE OLIVEIRA GONCALVES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Tcle_impossibilitadosdeassinar_controles.pdf	15/05/2022 21:09:07	MARIA EDUARDA DE OLIVEIRA GONCALVES	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto_MariaEduardaOK.pdf	15/05/2022 20:21:23	MARIA EDUARDA DE OLIVEIRA GONCALVES	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Av. das Engenhasria, s/n, 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 **Fax:** (81)2126-3163 **E-mail:** cephumanos.ufpe@ufpe.br



Continuação do Parecer: 6.314.837

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 21 de Setembro de 2023

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

Endereço: Av. das Engenhasria, s/n, 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 **Fax:** (81)2126-3163 **E-mail:** cephumanos.ufpe@ufpe.br