

Ministério da Saúde
SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE
INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA JAMIL HADDAD

Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético

AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO DAN29 EM CÉLULAS HUMANAS *IN VITRO*:
CONDRÓCITOS, CÉLULAS ESTROMAIS DA MEDULA E CÉLULAS CANCERÍGENAS
HEP-2

Márcio Machado Sobral de Sousa

Rio de Janeiro
2021

MINISTÉRIO DA SAÚDE
SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE
INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA JAMIL HADDAD

Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO DAN29 EM CÉLULAS HUMANAS *IN VITRO*:
CONDRÓCITOS, CÉLULAS ESTROMAIS DA MEDULA E CÉLULAS CANCERÍGENAS
HEP-2**

Márcio Machado Sobral de Sousa

Defesa de dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Diego Pinheiro Aguiar

Rio de Janeiro
Dezembro
2021

CATALOGAÇÃO NA FONTE
INTO/BIBLIOTECA SÉRGIO EDUARDO VIANNA

S725a Sousa, Márcio Machado Sobral de.
AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO DAN29 EM CÉLULAS
HUMANAS *IN VITRO*: CONDRÓCITOS, CÉLULAS ESTROMAIS DA
MEDULA E CÉLULAS CANCERÍGENAS HEP-2 / Márcio Machado Sobral
de Sousa. — 2021.
59f.

Orientador: Diego Pinheiro Aguiar.
Dissertação (Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema
Musculoesquelético) — Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia
Jamil Haddad, Rio de Janeiro, 2021.

1. Musculoesquelético. 2. 1H-1,2,3-triazol. 3. DAN29. 4. P2X7. 5.
Anti-inflamatório. 6. Ortopedia. I. Aguiar, Diego Pinheiro, orient. II. Título.

NLM QV 247

MINISTÉRIO DA SAÚDE
SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE
INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA JAMIL HADDAD

Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético

AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO DAN29 EM CÉLULAS HUMANAS *IN VITRO*:
CONDROCITOS, CÉLULAS ESTROMAIS DA MEDULA E CÉLULAS CANCERÍGENAS
HEP-2

Márcio Machado Sobral de Sousa

Banca examinadora:

Prof^ª Dr.^a Jamila Alessandra Perini Machado – CASM – INTO
Prof Dr.^a. Aline Cordeiro Fernandes Ladeira – CASM – INTO
Prof Dr. Bruno de Almeida Carlos de Carvalho Pontes – ICB/UFRJ
Prof Dr. Eduardo Branco de Sousa – CASM – INTO – Suplente
Prof^ª Dr.^a Maria Lucia Fleuss – HU/UFRJ – Suplente

Rio de Janeiro
2021

Dedico este trabalho a toda a minha família, especialmente à minha esposa Márcia, por todo apoio e força durante este período.

AGRADECIMENTOS

À Deus por sua presença constante em minha vida.

À minha família por todo o apoio, amor, incentivo e compreensão das minhas ausências durante este período. A minha esposa Márcia, meus filhos Thaís e Rafael, meus netos Theo e Bento e meu genro Rafael, obrigado por tudo.

À Dr^a. Rhayra Braga que nos cedeu as células estromais da medula para a execução dos experimentos.

A todos os professores do curso de Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético, do INTO, pelos ensinamentos, colaboração e amizade.

À equipe do Laboratório de Controle e Tratamento de Células (CTCels) pelo apoio e suporte técnico durante a execução do projeto.

Ao INTO pela oportunidade de aprimoramento técnico e científico através deste curso de mestrado.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

Ao Dr. Daniel Tadeu Gomes Gonzaga, da UEZO, o criador do DAN29, que me concedeu a honra de poder utilizar este anti-inflamatório neste estudo.

Ao meu orientador Dr. Diego Pinheiro Aguiar, da Divisão de Pesquisas (DIPES), do INTO, pela orientação, confiança, paciência, amizade e apoio durante o desenvolvimento deste trabalho.

Muito Obrigado!

RESUMO

SOBRAL, Marcio Machado Sobral de Sousa. Avaliação da Citotoxicidade do DAN29 em Células Humanas *in vitro*. Rio de Janeiro, 2021. Dissertação (Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético) - Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad, Ministério da Saúde, 2021.

A inflamação é uma resposta em caso de infecções e é a responsável por combater os agentes agressores e promover a recuperação do tecido atingido. O processo inflamatório na osteoartrite (OA) causa a destruição dos condrócitos, que são as células que constituem a cartilagem. A incidência da OA, em escala mundial, é estimada em 300 milhões de pessoas acometidas por esta doença. Existem relatos de um custo anual em torno de 303 bilhões de dólares nos Estados Unidos, com programas de saúde e por perda de renda, para atender aproximadamente 30,8 milhões de adultos acometidos por esta doença. O tratamento medicamentoso é feito com o uso de anti-inflamatórios, sendo os do tipo não esteroidal (AINEs) os mais utilizados. Porém, o tratamento com os AINEs não coíbe a ação de todos os agentes pró-inflamatórios e apresenta efeitos adversos indesejados. Com este pensamento, a comunidade científica está sempre buscando novos anti-inflamatórios. Foi sintetizado o DAN29, que é um potente bloqueador seletivo para o receptor pró-inflamatório P2X7. O objetivo deste projeto foi avaliar a citotoxicidade do DAN29, quanto à morte celular e danos às funções mitocondriais em três tipos de células humanas, sendo elas os condrócitos, as células estromais da medula e as células HEP-2, através de ensaios *in vitro* usando as técnicas *Live and Dead* e MTT. Foram realizados ensaios em que as células humanas foram submetidas à variadas concentrações do DAN29 (10^{-9} M, 10^{-7} M, 10^{-5} M e 10^{-3} M) e diferentes tempos de exposição (24h, 48h e 72h). No ensaio *Live and Dead* com condrócitos, células estromais da medula e células HEP-2 não foi observada alteração estatisticamente significativa na morte celular em exposição de 24h, 48h e 72h ($p > 0,9$). Os ensaios da técnica MTT com os condrócitos e as células estromais não mostraram diferença estatística entre as condições controle e exposição ao DAN29 nos diferentes tempos de exposição ($p > 0,5$). Já para as células HEP-2, todas as concentrações de DAN29 nos tempos de 24h, 48h e 72h apresentaram redução da atividade mitocondrial ($p < 0,05$). Considerando que este tipo celular é uma linhagem cancerígena, tal efeito pode ser relacionado à característica proliferativa desta célula. Em geral, nos demais tipos celulares, o DAN29 apresentou baixa citotoxicidade e indução de morte celular. Assim, apontamos o DAN29 como um composto promissor para ser utilizado no tratamento da OA; porém outros estudos devem ser realizados para corroborar a segurança no uso clínico deste fármaco.

Palavras-chaves: Musculoesquelético. 1H-1,2,3-triazol. DAN29. P2X7. Anti-inflamatório.

ABSTRACT

SOBRAL, Marcio Machado Sobral de Sousa. Cytotoxicity Evaluation of DAN29 in Human Cells *in vitro*. Rio de Janeiro, 2021. Master Thesis. (Master's Degree in Applied Sciences to the Musculoskeletal System) - National Institute of Traumatology and Orthopedics Jamil Haddad, Ministry of Health, 2021.

Inflammation is a response in case of infections and is responsible for fighting the aggressor agents and promoting the recovery of the affected tissue. The inflammatory process in osteoarthritis (OA) causes the destruction of chondrocytes, which are the cells that make up cartilage. The incidence of OA, worldwide, is estimated at 300 million people affected by this disease. There are reports of an annual cost of around 303 billion dollars in the United States, with health programs and for loss of income, to assist approximately 30.8 million adults affected by this disease. The drug treatment is done with the use of anti-inflammatory drugs, the non-steroidal type (NSAIDs) being the most used. However, treatment with NSAIDs does not inhibit the action of all pro-inflammatory agents and has unwanted side effects. With this thought, the scientific community is always looking for new anti-inflammatory drugs. DAN29 was synthesized, which is a potent selective blocker for the pro-inflammatory receptor P2X7. The aim of this project was to evaluate the cytotoxicity of DAN29, regarding cell death and damage to mitochondrial functions in three types of human cells, these being chondrocytes, marrow stromal cells and HEp-2 cells, through *in vitro* assays using Live and Dead and MTT techniques. Assays were carried out in which human cells were subjected to varying concentrations of DAN29 (10^{-9} M, 10^{-7} M, 10^{-5} M and 10^{-3} M) and different exposure times (24h, 48h and 72h). In the Live and Dead assay with chondrocytes, marrow stromal cells and HEp-2 cells, no statistically significant change in cell death was observed in 24h, 48h and 72h exposure ($p > 0.9$). The MTT technique assays with chondrocytes and stromal cells showed no statistical difference between control conditions and exposure to DAN29 at different times of exposure ($p > 0.5$). As for HEp-2 cells, all concentrations of DAN29 at times of 24h, 48h and 72h showed a reduction in mitochondrial activity ($p < 0.05$). Considering that this cell type is a cancerous lineage, this effect can be related to the proliferative characteristic of this cell. In general, in other cell types, DAN29 showed low cytotoxicity and induction of cell death. Thus, we point out DAN29 as a promising compound to be used in the treatment of OA; however, other studies must be carried out to confirm the safety in the clinical use of this drug.

Keywords: Skeletal muscle. 1H-1,2,3-triazole. DAN29. P2X7. Anti-inflammatory.

SUMÁRIO

RESUMO.....	VI
ABSTRACT.....	VII
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	X
LISTA DE FIGURAS	XI
LISTA DE QUADROS E TABELAS	XII
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. A inflamação	1
1.1.1. A inflamação na Osteoartrite	3
1.1.2. Tratamentos da Osteoartrite.....	7
1.2. Anti-inflamatórios.....	9
1.2.1. O receptor P2X7	11
1.3. Compostos heterocíclicos aromáticos	12
1.3.1. 1,2,3-triazol	13
1.3.2. 1,2,3-triazol e atividade anti-inflamatória.....	14
1.4. O DAN29	17
2 JUSTIFICATIVA	19
3 OBJETIVOS.....	20
3.1 Objetivo Principal	20
3.2 Objetivos Específicos	20
4 METODOLOGIA	21
4.1 Solubilização e diluição seriada do DAN29 para uso nos experimentos	21
4.2 Tipos celulares e aspectos éticos	22
4.3 Tipos celulares e seus aspectos fisiológicos.....	23
4.4 Cultura e cultivo dos condrócitos	23

4.5	Cultura e cultivo das células estromais da medula	24
4.6	Cultura e cultivo das células HEp-2.....	24
4.7	Teste de Citotoxicidade por ensaio de MTT	25
4.8	Avaliação da viabilidade e morte celular por ensaio de <i>Live and Dead</i> ..	25
4.9	Análise estatística	27
5	RESULTADOS	28
5.1	Avaliação da influência do DAN29 na morte celular por ensaio de <i>Live and Dead</i>	28
5.2	Análise da citotoxicidade do DAN29 nas células por ensaio de MTT	33
6	DISCUSSÃO.....	37
7	CONCLUSÃO	41
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
ANEXO A - APROVAÇÃO PELO CEP/INTO PROJETO ORIGINAL (COLETA DO MATERIAL DE DESCARTE DOS PACIENTES COM OSTEOARTRITE).....		50
ANEXO B - APROVAÇÃO PELO CEP/INTO PROJETO ORIGINAL (COLETA DO MATERIAL DE DESCARTE DOS PACIENTES COM OSTEOARTRITE).....		52
ANEXO C – APROVAÇÃO PELO CEP/INTO ADENDO AO PROJETO ORIGINAL (COLETA DO MATERIAL DE DESCARTE DOS PACIENTES COM OSTEOARTRITE)		54
ANEXO D – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) ...		58

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADAMTS	<i>A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs</i>
AINEs	anti-inflamatórios não esteroidais
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosina Trifostato
CEM	Células Estromais da Medula
COX	Ciclo-oxigenase
DMEM	<i>Dullbecco modification of Minimum Essential Media</i>
DMSO	dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (ADN, em português: ácido desoxirribonucleico)
ECACC	<i>European Collection of Authenticated Cell Cultures</i>
IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i>
IC ₅₀	Concentração de uma molécula para inibir 50% de um radical
INTO	Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia
LDH	Lactato Desidrogenase
µL	microlitro
mM	milimolar
MTT	brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio
MMP	<i>matrix metalloproteinases</i>
nM	nanomolar
OA	Osteoartrite
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> – solução salina tamponada com fosfato
P2X _{7R}	Receptor P2X ₇
PG	Prostaglandina
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGI ₂	Prostaciclina
SD	<i>Standard Deviation</i> (desvio padrão, em Português)
SFB	Soro Fetal Bovino
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Processo inflamatório	2
Figura 2 - Representação esquemática do joelho saudável e do joelho com osteoartrite.....	3
Figura 3 – Fatores de risco para a ocorrência da osteoartrite (OA).....	4
Figura 4 - Mecanismo de ação dos AINEs.....	10
Figura 5 - Estrutura química dos azóis.....	13
Figura 6 - Fármacos que apresentam núcleo 1,2,3-triazólico.....	14
Figura 7 - 1H-1,2,3-triazol com potente atividade anti-inflamatória por inibir o receptor P2X7.	15
Figura 8 - Avaliação <i>in vivo</i> do éter 1,2,3-triazol anti-inflamatório	16
Figura 9 - DAN29 (1-Aryl-1H-1,2,3-triazol).....	18
Figura 10 - Solubilização do DAN29 granulado e diluição seriada para obter as soluções usadas nos experimentos: 10^{-3} M, 10^{-5} M, 10^{-7} M e 10^{-9} M.....	22
Figura 11 – Fotomicrografia do Ensaio <i>Live and Dead</i>	26
Figura 12 - Avaliação do efeito de DAN29 em diferentes concentrações (10^{-9} M, 10^{-7} M, 10^{-5} M e 10^{-3} M) sobre condrócitos humanos.....	30
Figura 13 - Avaliação do efeito de DAN29 em diferentes concentrações (10^{-9} M, 10^{-7} M, 10^{-5} M e 10^{-3} M) sobre morte das células estromais de medula.	31
Figura 14 - Avaliação do efeito de DAN29 em diferentes concentrações (10^{-9} M, 10^{-7} M, 10^{-5} M e 10^{-3} M) sobre morte das células HEp-2.	32
Figura 15 - Avaliação da citotoxicidade do DAN29 em concentrações crescentes (10^{-9} M, 10^{-7} M, 10^{-5} M e 10^{-3} M) em condrócitos humanos	34
Figura 16 - Avaliação da citotoxicidade do DAN29 em concentrações crescentes (10^{-9} M, 10^{-7} M, 10^{-5} M e 10^{-3} M) em células estromais da medula humana	35
Figura 17 - Avaliação da citotoxicidade do DAN29 em concentrações crescentes (10^{-9} M, 10^{-7} M, 10^{-5} M e 10^{-3} M) em células HEp-2 humanas	36

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Tabela 1 - Citocinas pró-inflamatórias envolvidas na osteoartrite (OA)	6
---	----------

1. INTRODUÇÃO

1.1. A inflamação

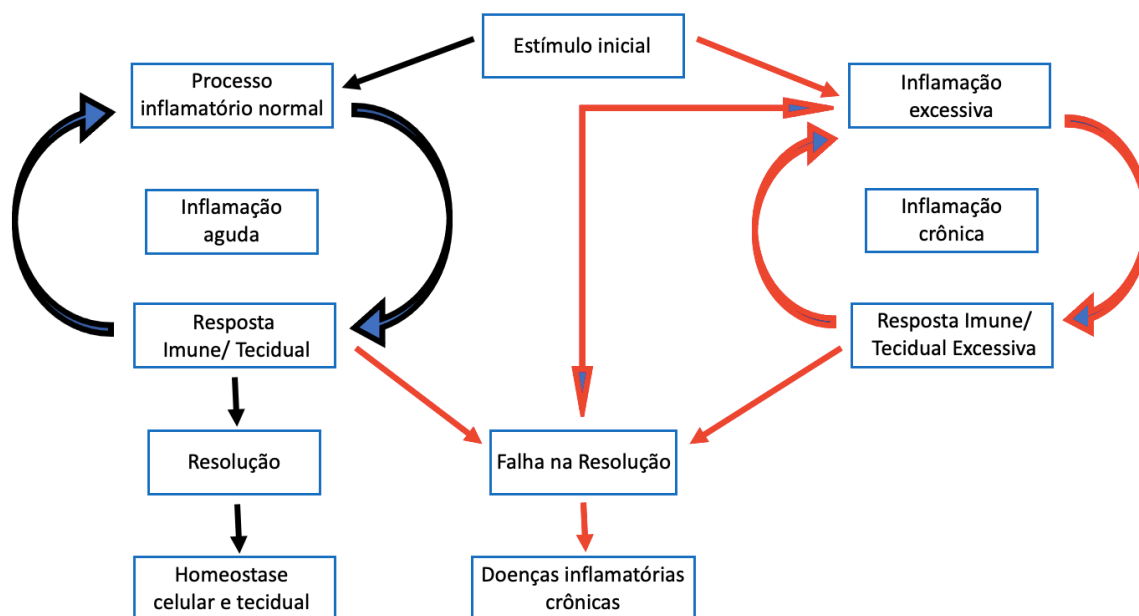
A inflamação é uma resposta, do sistema imunológico, que protege contra infecções ou lesões. As respostas defensivas ativas, pelas vias endógenas, podem promover a contra-regulação da inflamação e alcançar a resolução satisfatória (SERHAN et al., 2007). A inflamação combate os agentes agressores e promove a recuperação do tecido atingido e de suas condições fisiológicas (**Figura 1**). O rubor, o calor, o inchaço e a dor são os sinais do processo de inflamação. As prostaglandinas participam da resposta do processo inflamatório, aumentando a permeabilidade capilar, promovendo a quimiotaxia, atuando como vasodilatadoras e como inibidoras da agregação plaquetária. Tais processos são observados em doenças que acometem o sistema musculoesquelético (OPAL e DEPALO, 2000).

A prostaglandina E2 (PGE2) é mediadora do processo inflamatório e de reações anafiláticas, e a prostaciclina (PGI2) é mediadora da vasoconstrição. Ambas são sintetizadas pela via da ciclo-oxigenase (COX), através da atividade das enzimas COX-1 e COX-2, e são responsáveis por aspectos da inflamação. A COX-1 é uma enzima, presente na maioria das células, relacionada às funções fisiológicas, tais como proteção da mucosa gástrica, manutenção da perfusão renal e também atuação nos processos da coagulação. A COX-2 é sintetizada a partir de estímulos inflamatórios, sendo importante na produção de prostaglandinas na inflamação e acometimento das doenças, sendo responsável pela sensação de dor (RICCIOTTI e FITZGERALD, 2011). Considerando tais efeitos, entende-se que as enzimas COX são alvos do controle da inflamação, como exemplificado pelo uso dos medicamentos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), os quais são inibidores das enzimas COX.

Além disso, nos locais de lesão e inflamação tecidual, a adenosina de trifosfato (ATP) se acumula no interstício. O ATP extracelular atua nos receptores de membrana plasmática chamados de P2 (P2Rs). Destes, o P2X7R é um potente estimulante da inflamação e da imunidade, além de ser um promotor do crescimento de células cancerígenas (DI VIRGILIO et al., 2017). O receptor P2X7 é expresso por células do sistema imunológico e também por células tumorais, modulando citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. Assim, este receptor também é um determinante na promoção e erradicação das respostas inflamatórias e tumorais. Contudo, quando expresso por células tumorais, favorece o metabolismo celular e a

angiogênese, facilitando o crescimento e a progressão do câncer (ADINOLFI et al., 2019). Pelos efeitos desse receptor, ele pode ser um possível alvo no tratamento da inflamação em doenças crônicas.

Figura 1 – Processo inflamatório (Adaptado de Active Pharmaceutica, 2021)



A inflamação é classificada em aguda ou crônica, conforme a duração da sua evolução, condições promotoras e capacidade de reparação. A inflamação aguda é caracterizada pelo acúmulo extravascular de leucócitos especializados, como neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) e eosinófilos, bem como pela formação de edema no início da resposta. Estes leucócitos migram para os locais infectados para neutralizar e eliminar os efeitos deletérios da agressão. Sinais endógenos anti-inflamatórios ocorrem com o intuito de contra-regular os processos da inflamação aguda e limitar a duração dessa fase, levando a remoção de células mortas e findando a resolução do quadro inicial (SERHAN et al., 2007). A inflamação crônica pode ocorrer por falha na eliminação do agente agressor, por exposição a um nível tão baixo de um elemento estranho que não pode ser eliminado por quebra enzimática ou fagocitose, por distúrbio autoimune, por defeito nas células responsáveis por mediar a inflamação, por episódios recorrentes de inflamação aguda, dentre outras causas. A inflamação crônica é uma condição que pode perdurar por longos períodos, de meses a anos, e os seus efeitos variam de acordo com a causa da lesão e a capacidade do corpo de corrigir o dano (PAHWA et al., 2020). Desta forma, caso os processos inflamatórios sejam desequilibrados ou permaneçam por longos períodos, podem ter efeitos danosos para o organismo de forma sistêmica ou local.

1.1.1. A inflamação na Osteoartrite

A osteoartrite (OA) é considerada uma doença crônica que tem como características: o desgaste da cartilagem articular, a inflamação do tecido intra-articular e o adensamento do osso subcondral (GOLDRING & GOLDRING, 2007) (**Figura 2**).

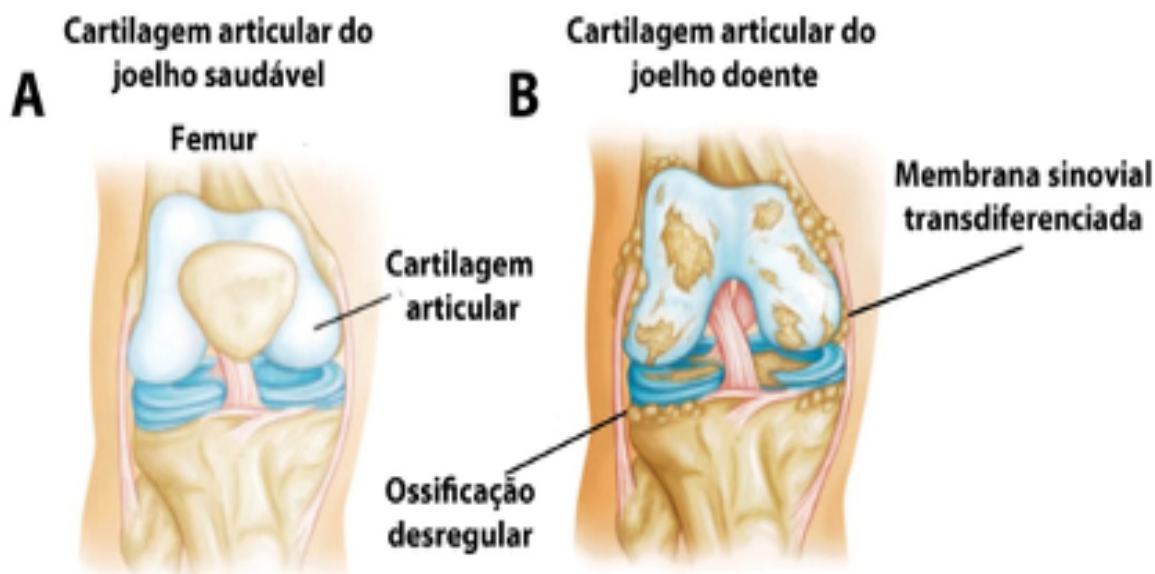


Figura 2 - Representação esquemática do joelho saudável e do joelho com osteoartrite. (A) Joelho saudável apresentando a cápsula articular, a membrana sinovial, e a cartilagem articular íntegras. (B) Joelho que apresenta características clássicas da osteoartrite, com desgaste da cartilagem articular, ossificação desregular e processo inflamatório bem desenvolvido. (Modificada do site da *American Academy of Orthopaedic Surgeons*).

A OA acontece em escala mundial e é estimado que 300 milhões de pessoas convivam com esta doença, em todo o mundo. Nos Estados Unidos relata-se que 30,8 milhões de adultos apresentem a doença e o custo anual atinja a 303 bilhões de dólares, incluindo gastos com saúde e perda de renda (CISTERNAS et al., 2016; JAMES et al., 2018; MURPHY et al., 2018). A OA pode levar o indivíduo ao afastamento das atividades laborais e a uma aposentadoria precoce, além do isolamento social, apresentando impactos negativos ao seu meio de convívio e também para a sociedade (LAIRES et al., 2016). No período de 2009 a 2014 houve um aumento de 203% no número de benefícios por doença e um aumento de 27.8% no número de pensões por incapacidade (MINISTÉRIO DA FAZENDA, 2016). As articulações do joelho e do quadril são as mais afetadas pela OA. Estudos do *US Osteoarthritis Initiative* (OAI) e do *Multicenter OA Study* (MOST) mostram que 80% dos indivíduos com dor nos dois joelhos também apresentam dores distais, incluindo dores nas costas. Estima-se que 242 milhões de

pessoas vivam com OA sintomática no joelho e no quadril, correspondendo a 3,8% da população mundial; acometendo 2,3% do sexo masculino e 4,5% do sexo feminino. Contudo, o alcance total da doença é desconhecido (CROSS et al., 2014; HAWKER, 2019). Os aspectos da OA, da forma como destroem todos os tecidos da articulação, levam a considerá-la como um órgão por resultar em danos na articulação como um todo (LOESER et al., 2012), pois apresenta sinais clínicos característico, tais como dor, dificuldade de locomoção e inchaço, e um conjunto de alterações nos tecidos das articulações, tais como destruição da cartilagem, espessamento do osso subcondral, densidade mineral óssea reduzida, osteófitos e sinovite (DRIBAN et al., 2010). LAWRENCE et al. (2008) estimaram que aproximadamente 27 milhões de pessoas sofriam de OA nos Estados Unidos da América, e que isto gerou um impacto negativo tanto na vida social, quanto laborativa destes indivíduos.

Atualmente, são conhecidos vários fatores de risco (**Figura 3**) que podem levar à OA, tais como a senescência celular, o envelhecimento da matriz da cartilagem, a obesidade, a síndrome metabólica e a aterosclerose, entre outras causas (ABRAMOFF e CALDERA, 2020).

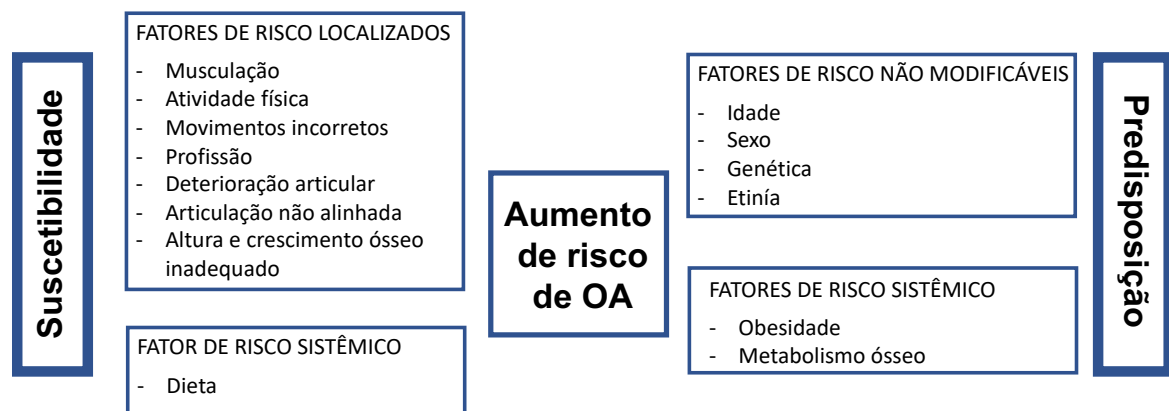


Figura 3 – Fatores de risco para a ocorrência da osteoartrite (OA) (adaptado de ABRAMOFF e CALDERA, 2020)

O desgaste nas articulações, pode se dar em função de sobrecarga e biomecânica prejudicada, levando à destruição da cartilagem articular e à inflamação. A cartilagem articular, constituída por condrócitos em uma matriz extracelular composta por colágeno e proteoglicanas, é o tecido presente nas articulações sinoviais (FILARDO et al., 2016). Este tem como função diminuir o atrito durante o movimento e também proteger as articulações das forças de tensão e compressão. Conforme a cartilagem sofre degradação durante a doença, propicia uma superfície de baixa fricção para articulação ao mesmo tempo em que é capaz de transmitir cargas pesadas. Assim, pode-se observar rigidez, inchaço e perda de mobilidade. É

na cartilagem que as alterações são mais visíveis, porém, toda a articulação é afetada, incluindo a sinóvia, os ligamentos da articulação e o osso subcondral.

A cartilagem degradada induz uma reação, pelas células sinoviais, levando a modulação de metaloproteinases, angiogênese sinovial e liberação de citocinas inflamatórias, acarretando destruição adicional da cartilagem. Isto demonstra que a inflamação tem um papel fundamental na patogênese da OA. As citocinas pró-inflamatórias (**Tabela 1**) são fatores críticos no desenvolvimento da OA, contribuindo para a desestabilização metabólica e no aumento do catabolismo da articulação nesta doença (BONNET e WALSH, 2005; KAPOOR et al., 2011) e regulam negativamente a síntese de componentes da matriz extracelular, estimulam a liberação de metaloproteinases (MMPs) e agrecanases (ADAMTS). As MMPs e ADAMTS são as enzimas responsáveis de degradação da cartilagem articular (GOLDRING et al., 1994; SANTANGELO et al., 2012; XUE et al., 2014; ZHENG et al., 2017).

Tabela 1 – Citocinas pró-inflamatórias envolvidas na osteoartrite (OA)

Citocinas pró-inflamatórias	Expressadas por	Efeitos
Fator de Necrose Tumoral (TNF)- α	Sinoviócitos, Condrócitos	Aumenta a reabsorção da cartilagem e do osso. Inibe a síntese de glicoproteína e colágeno. Regula a expressão de metaloproteinase de matriz (MMP) Estimular outras células a produzir citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento Estimular a liberação de fator pró-angiogênico Estimular outras células a produzir citocinas quimiotáticas Estimular a produção de óxido nítrico (NO) Induzir apoptose de condrócitos
Interleucina (IL)-1 β	Sinoviócitos, Condrócitos, Macrófagos	Aumenta a cartilagem e a reabsorção óssea Inibe a síntese de proteoglicanos Regula para cima a expressão de MMP Produção de enzimas proteolíticas Estimular outras células a produzir citocinas pró-inflamatórias Estimular outras células para produzir citocinas quimiotáticas Estimular a liberação de fator pró-angiogênico Estimular a produção de NO Induzir apoptose de condrócitos
IL-6	Sinoviócitos, Condrócitos	Inibe a síntese de proteoglicanos Reduz a proliferação de condrócitos Aumentar a atividade da MMP-2 Aumentar o catabolismo de proteoglicanos mediado por agreganase
IL-8	Monócitos, Sinoviócitos, Condrócitos, Osteoblastos	Recrutar leucócitos Quimioatraente de neutrófilos Estimular a liberação de citocinas pró-inflamatórias
IL-17	Linfócitos-T ativados	Diferenciação hipertrófica e calcificação de condrócitos Induzir síntese de NO Induzir a síntese de MMP Aumentar a produção de IL-1β, IL-6 e IL-8 Estimular a liberação de fatores pró-angiogênicos
IL-18	Macrófagos, Fibroblastos sinoviais	Estimular a liberação de citocinas pró-inflamatórias Estimular a angiogênese Induzir síntese de NO Hiperplasia sinovial e recrutamento de células inflamatórias Induzir apoptose de condrócitos Reduz a expressão dos componentes da matriz da cartilagem Regula positivamente a fibronectina - um mediador da destruição da cartilagem
Fator de Inibição da Leucemia (LIF)	Fibroblastos sinoviais, Condrócitos	Estimular a expressão de citocinas pró-inflamatórias Aumentar a síntese de pró-MMP-2 Aumenta a síntese e a atividade da MMP-13. Aumenta a reabsorção da cartilagem Diminui a síntese de proteoglicanos Infiltração de leucócitos no líquido sinovial Aumenta a degradação da cartilagem quando em combinação com IL-1 e TNF

Adaptado de SUTTON et al. (2009). MMP – metaloproteinase de matriz; NO – óxido nítrico; IL – interleucina; TNF – fator de necrose tumoral; LIF – fator de inibição da leucina

1.1.2. Tratamentos da Osteoartrite

O tratamento conservador envolve as medidas não farmacológicas e farmacológicas, com o intuito de atenuar a dor e de proporcionar uma melhora na mobilidade dos pacientes acometidos por degeneração articular. As medidas não farmacológicas são dieta para perda ponderal, fisioterapia, órteses, palmilhas e exercícios físicos. E as medidas farmacológicas são baseadas no uso de analgésicos, anti-inflamatórios e fármacos condroprotetores visando a reduzir a dor e melhorar a função articular. Entretanto, até os dias de hoje, nenhum tratamento se mostrou capaz de prevenir, retardar ou reverter a doença (RANNOU & POIRADEAU, 2010; MCALLINDON et al., 2014). O tratamento cirúrgico, que é constituído por artroplastia, é idealizado conforme a gravidade da OA, no caso de o tratamento conservador não se mostrar suficiente (MCALLINDON et al., 2014).

Além disso, as técnicas de reparo da cartilagem, tais como microfratura, implante autólogo de condrócitos e auto-enxerto osteocondral, podem ser utilizadas quando existe lesão articular isolada sem sinais de OA. Vale ressaltar que não existe, até este momento, tratamento capaz de restaurar a estrutura natural e a composição da cartilagem (HUI et al., 2012). O transplante, de diferentes fontes, de células estromais da medula é um recurso bastante atrativo para a terapia celular em cartilagem. Estas células podem ser extraídas do tecido adiposo, de tecidos próximos da cartilagem, do ambiente articular *in vivo*, da medula óssea ou da membrana sinovial. Estas células, isoladas do próprio receptor ou de doadores, têm sido usadas com o objetivo de regenerar a cartilagem lesionada. Diferentes fatores de crescimento e de vias de ativação dessas células podem exigir condições específicas para a indução da condrogênese. Testes *in vitro* mostraram sucesso. Porém, as condições para uma condrogênese eficaz ainda não são entendidas o suficiente. Para a aplicação *in vivo* se faz essencial determinar as condições para uma diferenciação condrogênica efetiva (BOEUF & RICHTER, 2010).

Os experimentos *in vitro* apresentam algumas limitações quando comparados aos *in vivo*. É difícil criar a farmacocinética do elemento a ser testado *in vitro*, em função do tempo de exposição, ativação, excreção, dentre outros aspectos do mesmo. Uma substância não tóxica pode se tornar tóxica após ser metabolizada pelas enzimas no fígado. Além de não ser simples construir respostas teciduais, por exemplo uma reação inflamatória, ou respostas sistêmicas, por exemplo pirexia (FRESHNEY, 2015). Estas limitações nos testes *in vitro*, em relação à OA, levam a comunidade científica a procurar condições mais próximas da realidade desta doença.

Assim, vários modelos animais têm sido utilizado com variados métodos de acometimento da OA. Estes modelos também são utilizados para investigar a patogênese da OA e verificar a eficácia terapêutica de novos tratamentos (YOSHIOKA et al., 1996), fornecendo um passo fundamental no desenvolvimento do conhecimento e nos projetos de revelação de novos medicamentos para o uso clínico (WEHLING, 2009; WENDLER e WEHLING, 2010; WEHLING, 2011). Os modelos de OA podem ser produzidos em espécies diferentes de diferentes linhagens, idade e gênero, com variados métodos de indução (LITTLE e ZAKI, 2012). Camundongos, ratos, coelhos, porquinhos-da-índia e animais grandes foram estudados para simular o modelo de OA humano. A indução do modelo de OA pode ser por: modificação genética (camundongos STR / ort) (MASON et al., 2001; JAEGER et al., 2008); método cirúrgico (transecção do ligamento cruzado anterior, ACLT) (JIMENEZ et al., 1995; SMITH et al. 2005; KIM et al., 2016); meniscectomia medial; MM (GIBSON et al., 2014; OGAWA et al., 2016); ovariectomia bilateral; OVX (HOEGH-ANDERSEN et al., 2004); injeção intra-articular (iodoacetato monossódico); MIA/ collagenase, papaína) (CHOI et al., 2002; GUZMAN et al., 2003; GLYN-JONES et al., 2015; PITCHER et al., 2016); e modelo de OA sem qualquer tipo de indução (KIM et al., 2018).

Os ensaios com modelos animais devem ser bem planejados, controlados, reportados aos Comitês de Ética e respeitar a legislação referente ao uso de animais em experimentos. Estes são pré-requisitos para uma boa prática científica e para o uso adequado e ético de animais, implementando os “3Rs” ((REDUCE) Reduzir o número de animais usados; (REFINE) aperfeiçoar os procedimentos e protocolos para minimizar o sofrimento e maximizar o valor dos resultados; e, quando possível, (REPLACE) substituir os estudos em animais por uma abordagem alternativa). Revisões de literatura encontraram falhas em muitos estudos usando modelos animais para uma variedade de doenças, inclusive para OA (KILKENNY et al., 2010; HOOIJMANS et al., 2010; HOOIJMANS et al., 2011).

Mesmo sendo conhecidos os aspectos degenerativos das articulações na OA, tais como degradação da cartilagem, danos ao osso subcondral, danos à sinóvia, danos aos músculos periarticulares, danos às terminações nervosas sensoriais e danos ao menisco, ainda não foi desenvolvida uma terapêutica capaz de prevenir, retardar ou reverter o quadro da OA (NGUYEN et al., 2017). De forma que é muito comum o uso de anti-inflamatórios pelos pacientes com OA.

1.2. Anti-inflamatórios

Os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) são medicações com ação analgésica, antitérmica e anti-inflamatória. São utilizados nos quadros de inflamação aguda ou crônica, para combater a febre e a dor, sendo muito eficazes. O diclofenaco e o ibuprofeno são os mais usados mundialmente (LITALIEN e JACQZ-IGRAIN, 2001; BADRI et al., 2016)

Os anti-inflamatórios são classificados em: anti-inflamatórios esteroidais (AIEs) e anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) (BATLOUNI, 2010). Os AINEs são divididos em não seletivos, que são os mais antigos, designados tradicionais ou convencionais, e em seletivos para a COX-2, que são designados COXIBEs (CRYER e FELDMAN, 1998). Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) estão entre os medicamentos mais receitados no mundo. São utilizados no tratamento da inflamação, da dor, do edema, das osteoartrites, da artrite reumatóide e dos distúrbios musculoesqueléticos (HOWARD, 2004; BATLOUNI, 2010; SANDOVAL et al., 2017; MELGAÇO et al., 2010).

Foi evidenciada, em 1998, a presença de duas isoformas da enzima ciclo-oxigenase, sendo denominadas COX-1 e COX-2 (CRYER e FELDMAN, 1998). A isoforma COX-1 é expressa na maioria dos tecidos, sendo essencial para a manutenção da fisiologia normal de muitos tecidos, a proteção da mucosa gastrointestinal; controle do fluxo sanguíneo renal; homeostasia; respostas autoimunes; funções pulmonares, cardiovasculares e dos sistemas nervoso central e reprodutivo. A COX-2 é induzida nas inflamações, através de citocinas, endotoxinas e fatores de crescimento, e sintetiza prostaglandinas (PGs) que contribuem para o desenvolvimento do edema, do rubor, da febre e da hiperalgesia (**Figura 4**) (BATLOUNI, 2010).

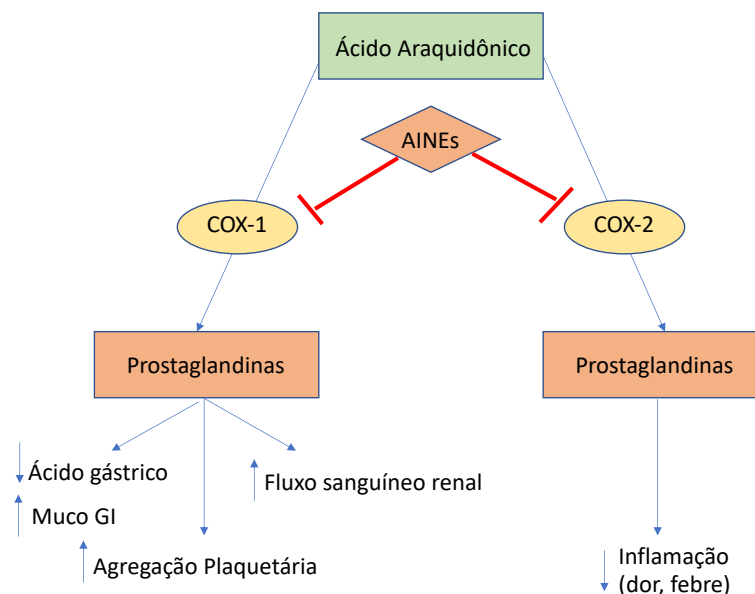


Figura 4 - Mecanismo de ação dos AINEs - a inibição não seletiva das enzimas ciclo-oxigenase (COX) causa redução na produção de prostaglandinas, proporcionando a terapia anti-inflamatória e também efeitos adversos indesejáveis. (adaptado de HALEY e VON RECUM, 2019)

O uso de inibidores da COX-1 pode ter consequências ruins para a fisiologia. As prostaglandinas, sintetizadas pela COX-1, têm efeitos benéficos para o funcionamento dos rins, como vasodilatação, diminuição da resistência vascular, melhora da perfusão renal, com redistribuição do fluxo sanguíneo por todo aparelho renal, mantendo assim o fluxo sanguíneo renal e a taxa de filtração glomerular em níveis adequados. A inibição da COX-1 e consequente ausência das prostaglandinas no aparelho renal leva a vasoconstrição arteriolar renal e consequente redução da taxa de filtração glomerular, podendo acarretar distúrbios hidroeletrólíticos, síndrome nefrótica e insuficiência renal aguda (MELGAÇO et al., 2010). Na mucosa intestinal, o bloqueio da COX-1, causa efeitos adversos indesejáveis, tais como dor abdominal, azia e diarreia. Este bloqueio inibe a produção de PGI₂ e PG no estômago, as quais atuam como citoprotetoras da mucosa gastrointestinal. Esta proteção ocorre pela inibição da secreção ácida pelo estômago, pelo aumento do fluxo sanguíneo no local e pela secreção de muco protetor, evitando úlceras gástricas e duodenais (BATLOUNI, 2010). Segundo SAUL et al. (2007) aproximadamente 15 a 30% dos usuários regulares de AINES têm uma ou mais úlceras. Acredita-se que a estratégia futura da indústria farmacêutica será pela criação *in silico* e posterior testes pré-clínicos e clínicos de compostos heterocíclicos aromáticos, que podem agir como agentes antagonistas citoplasmáticos ou dos receptores implicados na inflamação.

O uso de AINEs seletivos da COX-2 normalmente não provoca os efeitos adversos supracitados, porém pode estar associado à maior risco para o desenvolvimento de infarto do miocárdio ou insuficiência cardíaca, por alterar o balanço funcional de eicosanóides vasoativos, predispondo às condições de trombose e de aterogênese. Assim, faz-se importante uma busca permanente por novos tratamentos (HALEY e VON RECUM, 2019).

1.2.1. O receptor P2X7

O receptor P2X7 regula a intensidade e a duração de várias reações inflamatórias, e promove o influxo de Ca^{2+} e o efluxo de K^{+} induzindo a ativação e liberação de citocinas. Entre estas citocinas está a IL-1 β . Esta pode levar à expressão de enzimas envolvidas com a degradação de proteínas, levando à perda de colágeno tipo II e proteoglicanos, destruindo a estrutura da cartilagem e afetando a função e a estabilidade das articulações (LI et al., 2021^a). Ao que parece, o receptor P2X7 induz inflamação piroptótica nos condrócitos, promovendo a degradação da matriz extracelular e a liberação de IL-1 β , agravando o desenvolvimento e a progressão da OA (LI et al., 2021^b).

A ampla expressão do receptor P2X7, causada por ATP extracelular, em células de origem hematopoiética, tem sido foco de atenção pelo papel que este receptor desempenha na inflamação aguda e crônica (TUTTOLOMONDO et al., 2009; MÜLLER et al., 2011). Esta ativação do receptor P2X7 promove o fluxo de íons (GARGETT et al., 1997) e a formação de um poro reversível na membrana celular que está associado à lise e morte celular (AUGER et al., 2005; GEHRING et al., 2012) e esse receptor também foi associado a condições inflamatórias que modulam a interleucina-1 β (BARBERÀ-CREMADES et al., 2012; DUBYA, 2012).

Assim, este receptor constitui um potencial alvo para a modulação dos processos inflamatórios. Vários antagonistas do receptor P2X7 foram identificados (FARIA et al., 2012; NORTH e JARVIS, 2013), porém a maioria é inadequada para uso terapêutico, o que demonstra a necessidade de se encontrar novos antagonistas desse receptor para o tratamento de inflamação e dor. Alguns compostos heterocíclicos contendo núcleo de estrutura 1,2,3-triazol foram descritos como antagonistas do receptor P2X7 (CARROLL et al., 2007; CARROLL et al., 2009; GONZAGA et al., 2017).

1.3. Compostos heterocíclicos aromáticos

A importância dos compostos heterocíclicos é incontestável, particularmente no que se refere ao fato de que inúmeros deles são empregados como medicamentos. Os compostos heterocíclicos possuem uma estrutura cíclica com dois ou mais tipos diferentes de átomo, onde pelo menos um deles é um átomo de carbono; todos os átomos, exceto carbono, são considerados como heteroátomos. Existe uma grande variedade de heteroátomos e tamanho de anel nos compostos heterocíclicos conhecidos. Os heterociclos se iniciam a partir de três membros adiante e uma vez que os heteroátomos (nitrogênio, oxigênio e enxofre ainda sejam os mais comuns) podem ser desenhados em diferentes combinações, o número de possíveis sistemas heterocíclicos é quase ilimitado (EICHER e HAUPTMANN, 2003). Dessa forma, um grande número de heterocíclicos é conhecido e este número continua a aumentar muito rapidamente (EICHER e HAUPTMANN, 2003). Quando o heterociclo obedece a regra de Hückel ($4n+2$) e possui todos os critérios de aromaticidade como planaridade e orbitais não hibridizados dispostos de modo paralelo, estes passam a ser classificados como heterociclo aromático e apresentam características químicas semelhantes às do benzeno (MONDINO, 2014). Dentro do grupo de heterociclos aromáticos, podemos destacar os azóis. Os azóis são heterociclos aromáticos nitrogenados que contêm no mínimo um átomo de nitrogênio, podendo conter adicionalmente oxigênio e enxofre em diferentes combinações (**Figura 5**).

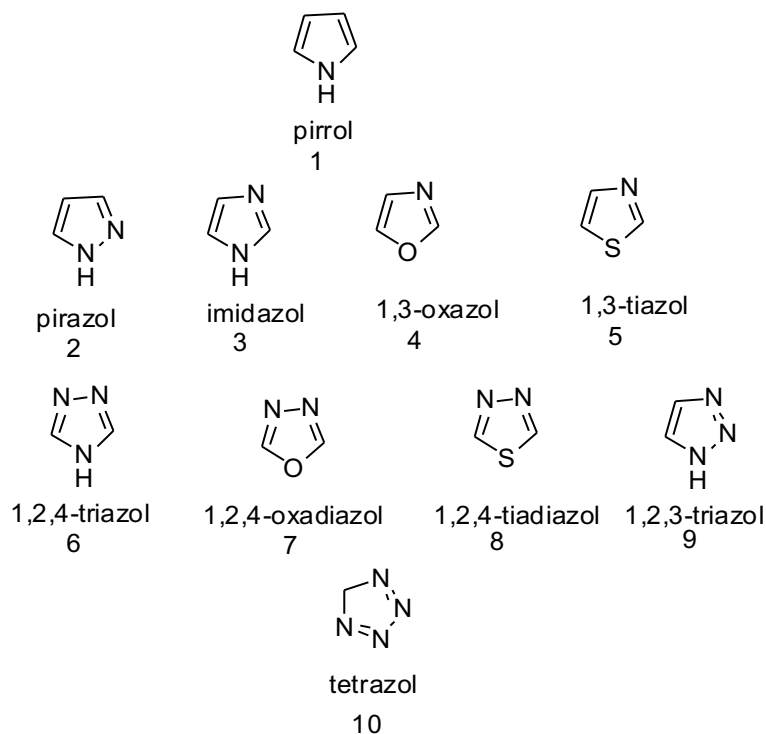


Figura 5 - Estrutura química dos azóis. (1) pirrol, (2) pirazol, (3) imidazol, (4) 1,3-oxazol, (5) 1,3-tiazol, (6) 1,2,4-triazol, (7) 1,2,4-oxadiazol, (8) 1,2,4-tiadiazol, (9) 1,2,3-triazol, (10) tetrazol. (Adaptado de Mondino, 2014).

1.3.1. 1,2,3-triazol

Os triazóis são compostos pertencentes ao grupo de compostos classificados como azóis. Estes apresentam três átomos de nitrogênio dispostos em um anel ciclopentadieno. (MELO et al., 2006).

Na literatura científica há uma enorme variedade de atividades biológicas para compostos que contêm o núcleo 1,2,3-triazólico. No entanto o número destes compostos em produtos comerciais e em fase clínica III ou IV é pouco expressivo. Mesmo assim, temos alguns exemplos de fármacos que contêm 1,2,3-triazóis como, por exemplo, os antibióticos beta-lactâmicos como a tazobactam (11), a cefalosporina cefatrizina (12) e a Rufinamida (13), um fármaco antiepilético (**Figura 6**) (AGALAVE et al., 2011).

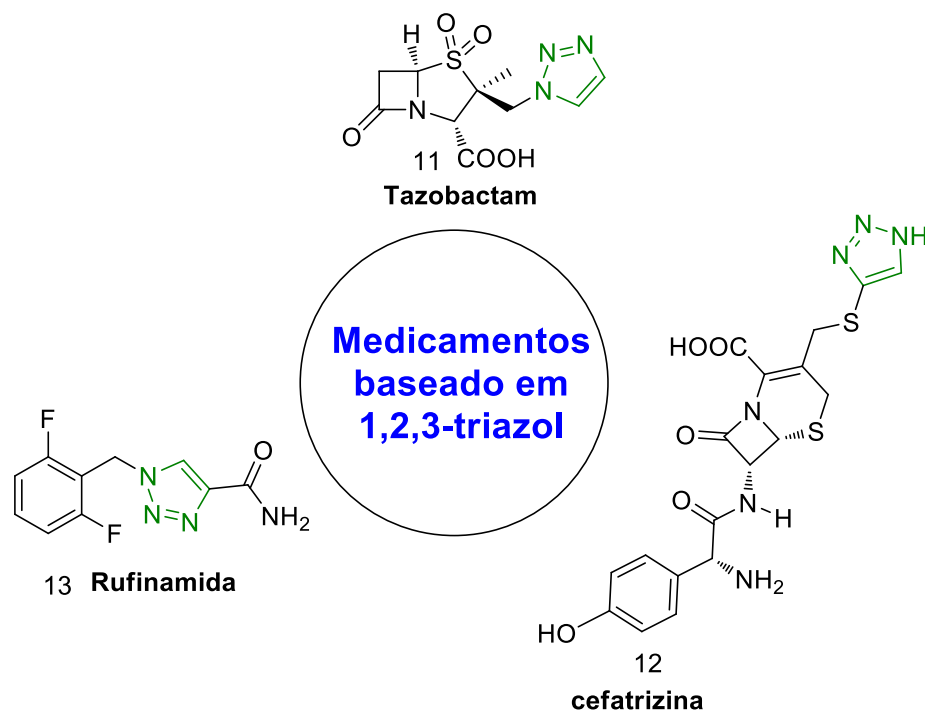


Figura 6 - Fármacos que apresentam núcleo 1,2,3-triazólico. (11) Tazobactam, (12) cefatrizina, (13) Rufinamida (Adaptado de Mondino, 2014).

Além dos compostos que já se tornaram fármacos, podemos observar relatos de diversos compostos “hits” que apresentam o núcleo triazólico em sua estrutura química, como por exemplo 1,2,3-triazóis antitumorais (SHARMA et al., 2010), anti-inflamatório (GONZAGA et al., 2017), antichagásicos (FARIA et al., 2018) dentre outros.

1.3.2. 1,2,3-triazol e atividade anti-inflamatória

Em trabalho desenvolvido por Gonzaga e colaboradores (2017), foi obtido uma série de 1,2,3-triazóis que foram avaliados quanto ao seu efeito anti-inflamatório. Dentre todos os compostos avaliados, o triazol 05 mostrou alto poder de bloqueio do receptor P2X7 e IC₅₀ de 0,0053 μ M. Já o composto 06 mostrou poder moderado de inibição deste receptor. Os dois componentes foram comparados ao padrão A740003, o qual apresentou IC₅₀ de 0,086 μ M. (Figura 7).

A alteração do ambiente iônico da célula, resultante da ativação do receptor P2X7, desencadeia uma série de vias celulares, dependendo do tipo de célula, implicado nos fenômenos: (i) a inflamação, levando à produção de IL-1 β e IL-18, (ii) no processo de ativação

da proteína quinase ativada por estresse, que resulta em apoptose, (iii) na ativação da proteína quinase ativada por mitógeno, que conduz a geração de intermediários reativos do oxigênio e de derivados nitrogenados, e (iv) na ativação da fosfolipase D, que estimula a atuação do fagossoma-lisossoma (MILLER et al, 2019). Desta forma, o bloqueio do P2X7R poderia controlar eventos de processos inflamatórios.

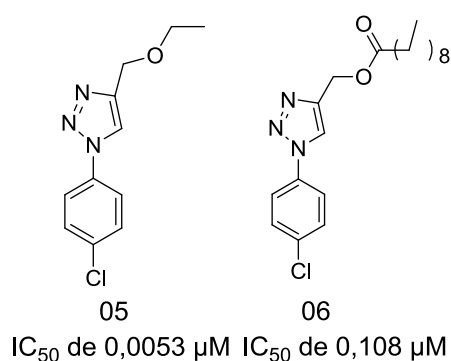


Figura 7 - 1H-1,2,3-triazol com potente atividade anti-inflamatória por inibir o receptor P2X7. (Adaptado de Gonzaga et al., 2017).

Com base nos resultados *in vitro*, a atividade anti-inflamatória foi testada em um modelo de edema de pata de camundongo induzido por ATP ou carragenina. Neste ensaio, para observar um modelo de inflamação estritamente estimulado por um mecanismo purinérgico, 1 mM de ATP foi aplicado às patas e a formação de edema foi medida após 30 minutos. Como esperado, a formação de edema induzido por ATP foi inibida por composto éter 1,2,3-triazol com valor de ID_{50} de 79,84 ng / kg. A formação de edema de pata induzida por carragenina, um agente pró-inflamatório geral, também foi inibida pelo éter 1,2,3-triazol de uma forma dose dependente com um valor de ID_{50} de 94,35 ng / kg. Nos gráficos A e B apresentados abaixo, a via de administração foi peritoneal enquanto nos gráficos C e D, a via foi oral. A administração oral do composto inibiu a formação de pata induzida por ATP e carragenina com maior potência do que o tratamento intraperitoneal padrão. Os valores de ID_{50} para tratamento oral foram 68,59 ng / kg e 80,49 ng / kg, respectivamente. Todos os tratamentos com o composto promoveram a inibição do edema da pata mais potente do que o antagonista A740003 P2X7R (**Figura 8**) (GONZAGA et al., 2017).

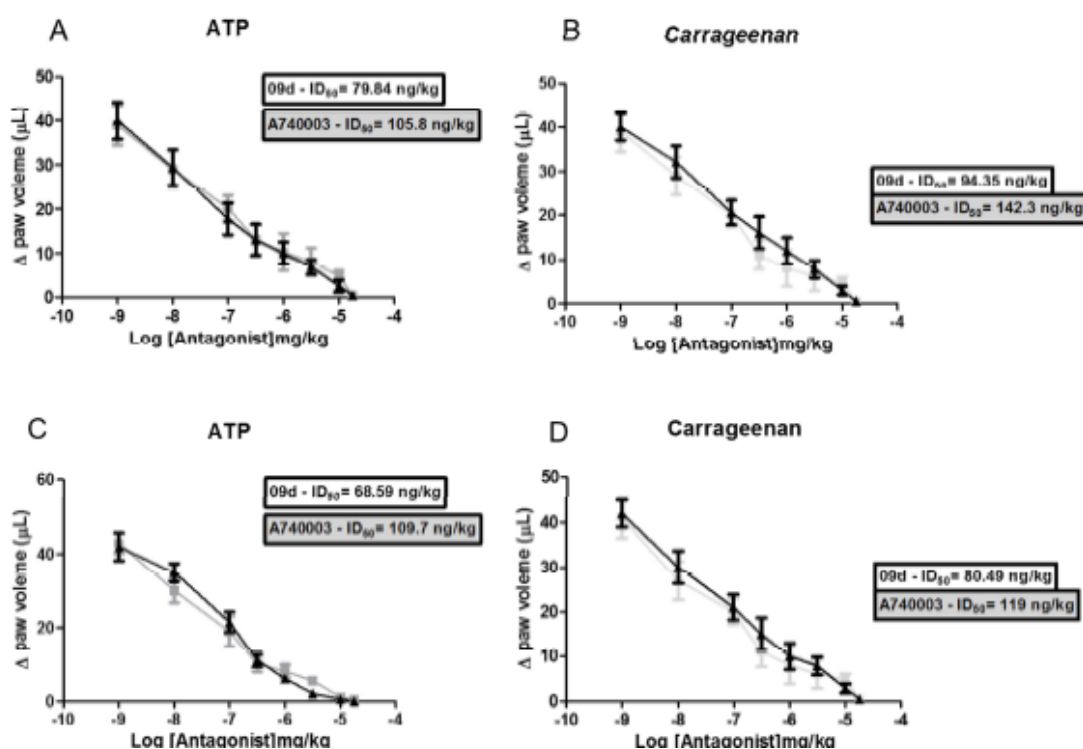


Figura 8 - Avaliação *in vivo* do éter 1,2,3-triazol anti-inflamatório. (GONZAGA et al., 2017).

A criação e o aperfeiçoamento de novos medicamentos é um processo demorado e que consome recursos financeiros. A busca por diminuir o tempo gasto e os gastos é um esforço empreendido em qualquer processo. A necessidade de conhecer o perfil de absorção, a distribuição, o metabolismo, as vias de excreção, o grau de toxicidade dos elementos, é muito importante para se abordar uma utilização terapêutica. Porém, sem o auxílio de um sistema computacional, o levantamento destes conhecimentos é muito demorado, demandando pesquisas e experimentos. Para atender esta necessidade surgiu o *Computer Aided Drug Designing* (CADD), que é um conjunto de dados e de *softwares*. Os dados são agrupados por diversas funções, dentre elas podemos destacar projeto de fármacos baseado em ligante, projeto de fármacos baseado em estrutura e relações quantitativas estrutura-atividade e quantitativas estrutura-propriedade. O *software* permite executar várias formas de pesquisa, aplicada e básica, relacionada a estes elementos e outros componentes que também se encontrem nestas bases de dados. Este tipo de pesquisa é conhecida como *docking* e é nomeada como *in silico* (SEHGAL et al., 2017).

1.4. O DAN29

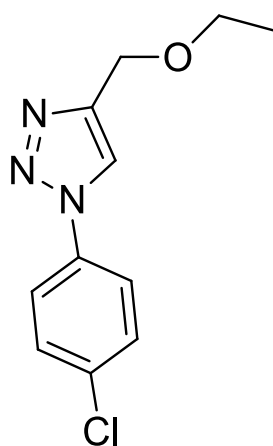
O DAN29 faz parte de um conjunto de moléculas projetadas contra uma série de receptores que estão *up stream* aos efeitos inflamatórios, através de um estudo *in silico* com várias moléculas, que combinou os carbonos, os anéis aromáticos em ligações de hidrogênio. O DAN29 é um composto heterocíclico pertencente à classe dos 1H-1,2,3-triazóis, possuindo o grupamento éter como grupo funcional. Sua estrutura química foi elucidada empregando as técnicas de infravermelho, ressonância magnética de hidrogênio ^1H e carbono ^{13}C (GONZAGA et al., 2017). Para avaliar sua pureza foi utilizado a técnica de análise elementar. Além disso, a interação com o receptor foi verificada com sucesso, através de *software* e assim, tal composto foi elencado para outros testes. Este foi avaliado *in vitro* frente à sua capacidade de inibir o receptor purinérgico P2X7 que estaria relacionado à possível modulação da resposta inflamatória, câncer, entre outras doenças.

O DAN29 é um bloqueador não esteroideal, entretanto não se pode afirmar que ele não age fora da via da coxigenase (GONZAGA et al., 2017). O composto DAN29 apresentou alto potencial de inibição do receptor P2X7 em baixas dosagens, apresentou baixa citotoxicidade medida pelo método LDH, resultando assim em alto índice de seletividade (**Figura 9**). Os testes demonstraram que o composto DAN29 diminuiu o edema da pata de camundongos em baixa concentração sendo mais ativo que o padrão diclofenaco.

O DAN29 (1-Aryl-1H-1,2,3-triazol) bloqueia o receptor P2X7 e com isso inibe a secreção de IL-1 β em células de origem hematopoiéticas (GONZAGA et al., 2017). O receptor P2X7 é encontrado em macrófagos e tem papel no controle do fluxo de íons pela membrana e controla desta forma a morte celular (AUGER et al., 2005; SUGIYAMA et al., 2005; GEHRING et al., 2012). Além disso, a cooperação do receptor P2X7 com o metabolismo do glutamato está envolvida com a atividade de doenças inflamatórias crônicas (TEIXEIRA et al., 2017), doenças neurodegenerativas (APOLLONI et al., 2014) e dores neuropáticas (MONIF et al., 2016). As células foram tratadas por 1 h, 24 h e 72 h com os derivados 1,2,3-triazol e a citotoxicidade foi verificada, em cada experimento, utilizando o kit, da Sigma, de detecção da presença de LDH em sobrenadante (GONZAGA et al., 2017).

Nos camundongos *knockout* para P2X7, há uma diminuição no desenvolvimento de sintomas inflamatórios e dor neuropática em um modelo de OA (ARULKUMARAN et al., 2011). Ensaios clínicos usando antagonistas do receptor P2X7 em pacientes com artrite reumatoide mostrou eficácia e segurança dos AZD9056 e CE-224,535, semelhantes ao DAN29

(KEYSTONE et al., 2012; STOCK et al., 2012; GONZAGA et al., 2017). Diversos fármacos têm sido apresentados à comunidade científica, entre eles o DAN29, que é um potente agente anti-inflamatório e que pode sim ser usado no futuro para tratar a OA (GONZAGA et al., 2017). O receptor P2X7 regula várias reações inflamatórias, promove o influxo de Ca^{2+} e efluxo de K^{+} e modula a citocina pró-inflamatória IL-1 β . Esta citocina pode levar à destruição da cartilagem podendo agravar o desenvolvimento e a progressão da OA (LI et al., 2021^a; 2021^b). Haja vista, a necessidade de identificar se o DAN29 perturba a viabilidade celular, para que futuramente possa ser usado no tratamento da OA.



DAN29

1-(4-clorofenil)-4-(etóximetil)-1*H*-1,2,3-triazol

Figura 9 - DAN29 (1-Aryl-1*H*-1,2,3-triazol). O composto 1,2,3-triazólico codificado como DAN29 consiste em um 1,2,3-triazol 1,4-disubstituído apresentando a substituição de um anel 4-clorofenil e a substituição de uma cadeia de éter etóximetil no nitrogênio 1 e no carbono 4 do anel 1,2,3-triazólico, respectivamente. (Adaptado de Mondino, 2014 ; GONZAGA et al., 2017)

Diante do desafio de encontrar uma molécula que seja capaz de controlar doenças inflamatórias, como a OA, sem que promova morte celular ou alteração na viabilidade das células, entender o grau de toxicidade do DAN29 é fundamental. Já que ele se apresenta como um excelente candidato para este fim.

2 JUSTIFICATIVA

A OA é uma doença prevalente na nossa população. Esta doença causa uma série de impactos negativos nos aspectos sociais, econômicos e na saúde em geral dos indivíduos. Em função da dor e da dificuldade de locomoção estes indivíduos se isolam, impactando negativamente o seu convívio social, e podem ter a sua capacidade laborativa impactada, causando perda do seu poder aquisitivo. Estes impactos negativos somados levam a uma sobrecarga do sistema de saúde e podem sobrecarregar também o sistema previdenciário, uma vez que estes indivíduos podem ser aposentados precocemente. Entretanto, até o momento, nenhum tratamento se mostrou capaz de prevenir, estabilizar ou mesmo reverter o curso natural da doença. Deste modo, todas as formas de tratamento disponíveis visam apenas melhorar a qualidade de vida e a função dos pacientes acometidos até o momento da realização da substituição da articulação envolvida por uma prótese.

O INTO tem como foco importante o tratamento e o acompanhamento, durante o acometimento e, se necessário, durante o processo operatório e no pós-operatório, do quadro evolutivo da OA.

A ativação das vias inflamatórias tem relação com a fisiopatologia da OA, porém, grande parte dos tratamentos não altera os mediadores dessas vias. Desta forma, faz-se necessária a busca por novos bloqueadores, mais potentes e seguros, dos agentes promotores da inflamação, para o tratamento da OA.

O DAN29 é um novo fármaco sintetizado (GONZAGA et al., 2017), apresentado para a comunidade científica e promete ser um excelente inibidor dos ativadores da inflamação que tanto comprometem a viabilidade das células da cápsula articular. Recentemente, foi mostrado que o DAN29 inibe o receptor P2X7 que é um importante ativador da inflamação em pacientes acometidos com OA. Isto nos permite imaginar que o DAN29 pode ajudar também no controle da inflamação durante as etapas iniciais de desenvolvimento da OA. É nestas etapas que surgem os primeiros sinais de inflamação, tais como: aumento da temperatura no local ao redor da articulação acometida, o aparecimento de rubor, sensação de dor e tem início o processo de dificuldade na locomoção. Assim, o DAN29 apresenta-se fortemente como uma possível molécula a ser usada para o tratamento da OA. Contudo, é preciso conhecer melhor a atividade citotóxica do DAN29. Assim, poderemos embasar futuros estudos para uma proposta de experimentos em modelos animais para o tratamento da OA.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Principal

Avaliar a citotoxicidade do DAN29 em células humanas.

3.2 Objetivos Específicos

- Identificar o efeito do DAN29 sobre a morte celular através do ensaio de *Live and Dead* em condrócitos, células estromais da medula e células HEp-2 humanas.
- Testar a citotoxicidade, pela técnica de redução do MTT, do DAN29 em condrócitos, células estromais da medula e células HEp-2 humanas.

4 METODOLOGIA

4.1 Solubilização e diluição seriada do DAN29 para uso nos experimentos

O DAN29, granulado, estava acondicionado em um tubo de ensaio de 15ml (Nest[®]). O peso molecular do DAN29 é 237,5 Dalton (Da) e 10^{-3}M é a condição de eluição mais concentrada possível. O tubo foi protegido da incidência de luz, tendo sido envolvido por papel alumínio. Para utilizar o DAN29 foi necessário inicialmente fazer a sua diluição em 1ml de DMSO 1%. Para a diluição do granulado, foram executados os passos a seguir:

Diluição do composto granulado DAN29 (**Figura 10**):

- a. Foram pesados 0,029g do DAN29 granulado (balança KN 320/3 KNWAAGEN);
- b. O DAN29 granulado, pesado no passo “a”, foi acondicionado em um tubo de ensaio de 50ml (Nest[®]), sendo adicionados nesse tubo 1ml DMSO 1% e 49,5ml de DMEM suplementado com 1% SFB e 1%PS, ficando na concentração 10^{-3}M ;
- c. Este tubo serviu de base para a diluição seriada do DAN29 para as seguintes concentrações: 10^{-5}M , 10^{-7}M e 10^{-9}M .

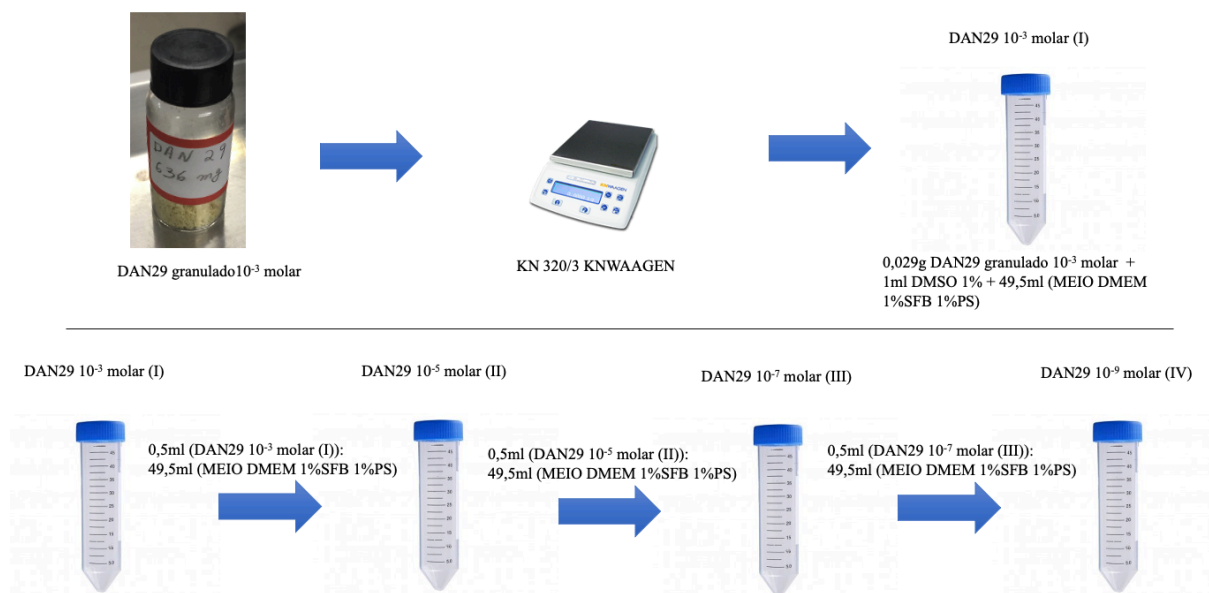


Figura 10 – Solubilização do DAN29 granulado e diluição seriada para obter as soluções usadas nos experimentos: 10^{-3} M, 10^{-5} M, 10^{-7} M e 10^{-9} M.

O conteúdo de cada tubo de 50ml foi dividido em porções de 10ml em tubos de ensaio de 15ml (Nest[®]). Todos os tubos de ensaio de 15ml (Nest[®]) foram identificados com a respectiva concentração do DAN29 e foram acondicionados em uma caixa, a qual foi armazenada a -86° (INDREL) para congelamento.

4.2 Tipos celulares e aspectos éticos

No presente estudo foram usadas células humanas vislumbrando uma possível aplicação futura. A escolha dos tipos celulares foi pautada no conhecimento das suas funções, atividade proliferativa e grau de diferenciação, sendo selecionadas células de condrócito, células estromais de medula óssea e células HEP-2. O uso de todos os tipos celulares foi submetido à aprovação ética antes da realização dos experimentos.

O condrócito é uma célula da cartilagem em estado final de diferenciação e tem importância no foco da degeneração na OA. Para o presente estudo, foram utilizadas células de condrócitos armazenadas oriundas de cartilagem advinda de fragmentos osteocondrais retirados de pacientes com OA, que foram submetidos à artroplastia total de joelho no Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad (INTO), do projeto inscrito sob o número **CAAE: 08663912.3.0000.5273 (Anexos A e B)**.

As células estromais da medula são células precursoras com potencial de proliferação e diferenciação. As células estromais da medula foram obtidas pela emenda ao projeto aprovado inscrito sob o número **CAAE: 41660415.3.0000.5273 (Anexo C)**, e em andamento, com o título “Isolamento e expansão de células-tronco mesenquimais humanas derivadas de medula óssea no Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad”, Instituto Nacional de Traumatologia - Ortopedia / INTO / SAS/ MS – RJ. Tal emenda inclui as avaliações: citotoxicidade por MTT e por *Live and Dead*. Todos os pacientes que concordaram em doar os fragmentos para o nosso estudo assinaram um Termo de Compromisso Livre e Esclarecido (TCLE) (**Anexo D**).

As células HEP-2 são uma linhagem de epiteloma da laringe, apresentam alta atividade metabólica, inflamatória e proliferativa. As células HEP-2 são células de linhagem imortalizada oriundas de epitélio humano, contaminadas com HPV (Human papillomavirus). As células são mantidas congeladas imersas em nitrogênio líquido e destinam-se apenas ao uso em pesquisas de laboratório. Tal cultivo foi depositado no *American Type Culture Collection (ATCC) Patent Depository* para cumprir os requisitos de patentes internacionais ou dos EUA. As células foram adquiridas da ECACC (*European Collection of Authenticated Cell Cultures*) (ATCC).

4.3 Tipos celulares e seus aspectos fisiológicos

As células foram escolhidas de forma a se ter aspectos fisiológicos diferenciados. Os condrócitos são células da cartilagem e têm grande importância no foco da degeneração na OA; as células estromais da medula têm um grande potencial de uso em terapia celular; e as células cancerígenas Hep-2, que são derivadas das células HeLa, apresentam alta atividade metabólica e inflamatória.

4.4 Cultura e cultivo dos condrócitos

A cartilagem foi separada do osso subcondral, com o auxílio de bisturi, seguida por trituração mecânica até que atingisse uma dimensão de aproximadamente 0,2 cm². Esses fragmentos foram depositados em tubo de polipropileno de 50 ml (*Sarstedt*), imersos em Colagenase tipo II (*Sigma-Aldrich*) a 0,5% e deixados por 18 horas em estufa umidificada à 37°C em 5% de CO₂. Após esse período de tempo, os fragmentos foram triturados novamente com auxílio de uma tesoura. A amostra passou por um filtro de 70 µm e foi então centrifugada

por 5 minutos, a 362g . O sobrenadante foi retirado e a massa celular homogeneizada com 1 ml de meio de cultivo IMDM (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*) (*Thermo Fisher Scientific*), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (*Sigma-Aldrich*) e 1% de Penicilina-Streptomicina (*Gibco*). As células foram contadas em câmara de Neubauer, sendo semeadas da seguinte forma: 1×10^5 células em garrafas de 25 cm²; 2×10^6 células em garrafas de 75cm²; e 3×10^6 células em garrafas de 175cm². Após a semeadura das células, foram adicionados 5 ml de meio de cultivo IMDM 10% SFB 1% PS para garrafas de 25 cm², 12 ml para garrafas de 75 cm² e 25 ml para garrafas de 125 cm². As garrafas foram armazenadas em estufa umidificada à 37°C e 5% de CO₂ e após 24h foi avaliada a evolução da aderência celular. Os condrócitos usados no estudo foram de 1^a e 2^a passagem, sendo posteriormente colocados em placas de 24 ou 96 poços para os experimentos de *Live and Dead* e MTT, respectivamente, realizados após a aderência das células (24h).

4.5 Cultura e cultivo das células estromais da medula

As células, utilizadas para os testes, foram acondicionadas em frascos para cultura celular (25 cm², 75 cm² e/ou 175 cm², Greiner – Bio One, CELLSTAR®), guardados em estufa de CO₂ umidificada, sendo posteriormente colocadas em poços em placas de 24 poços (CLS3524, Corning® Costar® TC-Treated Multiple Well Plates, *Sigma-Aldrich*®) ou em placas de 96 poços (CLS3603, Corning® 96-well Clear Polystyrene Microplates, *Sigma-Aldrich*®). A placa de 24 poços foi utilizada para o teste *Live and Dead* e a placa de 96 poços foi utilizada para o teste de MTT. As placas, com as culturas, foram colocadas em estufa de CO₂ umidificada, por 24 horas, para a aderência das células, antes da aplicação das concentrações do DAN29 para o início dos testes MTT e *Live and Dead*.

4.6 Cultura e cultivo das células HEp-2

As células de linhagem celular HEp-2, estabelecida há décadas, utilizadas para os testes, foram acondicionadas em frascos para cultura celular (25 cm², 75 cm² e/ou 175 cm², Greiner – Bio One, CELLSTAR®), em estufa de CO₂ umidificada. Para os experimentos, as células foram colocadas em poços em placas de 24 poços (CLS3524, Corning® Costar® TC-Treated Multiple Well Plates, *Sigma-Aldrich*®) ou em placas de 96 poços (CLS3603, Corning® 96-well Clear Polystyrene Microplates, *Sigma-Aldrich*®). A placa de 24 poços foi utilizada para o

teste *Live and Dead*, a placa de 96 poços foi utilizada para o teste de MTT. As placas, com as culturas, foram colocadas em estufa de CO₂ umidificada, por 24 horas, para a aderência das células, antes da aplicação das concentrações do DAN29 para o início dos testes MTT e *Live and Dead*.

4.7 Teste de Citotoxicidade por ensaio de MTT

O MTT é um teste colorimétrico, baseado na incorporação do brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) pelas mitocôndrias, em que este é reduzido apenas por mitocôndrias viáveis. A redução do MTT, que ocorre pela atividade da enzima mitocondrial succinato desidrogenase, de cor amarelada a azul de formazana, acontece apenas em células viáveis, sendo sua intensidade diretamente proporcional ao número de células presentes (DENIZOT e LANG, 1986; SEHNEM et al., 2012). Células (condrócitos, CEM e HEp-2) foram semeadas em placa de 96 poços, usando 2×10^3 células por poço, em triplicata técnica. Após a adesão das células (24h), o meio de cultura foi substituído pelo meio contendo as concentrações específicas para cada tratamento. As células foram expostas à diferentes concentrações de DAN29 (10^{-9} M, 10^{-7} M, 10^{-5} M e 10^{-3} M) por 24h, 48h e 72h. O veículo de diluição foi o meio *Iscove's* (*Sigma-Aldrich*®) em 1% de soro fetal bovino (*Sigma-Aldrich*®). Após os respectivos períodos de incubação, as células foram lavadas duas vezes com 200 µL de PBS estéril à 37°C, e 100 µL da solução de MTT (0,5mg/mL) foi adicionada a cada poço. A placa foi incubada em estufa de CO₂ por 4 horas. Após este período a solução de MTT foi retirada e foram adicionados 100 µL de DMSO. A placa foi colocada sobre agitação por 20 minutos antes da leitura em espectrofotômetro (Glomaxmulti, detection System, Promega), usando o comprimento de onda de 540 nm.

4.8 Avaliação da viabilidade e morte celular por ensaio de *Live and Dead*

O kit de teste *Live Dead* é um ensaio de viabilidade celular de fluorescência de duas cores que é baseado na determinação simultânea de células vivas e mortas com duas sondas. Mensuram-se parâmetros reconhecidos de viabilidade celular: atividade esterase intracelular e integridade da membrana plasmática. As células, vivas e mortas, são marcadas com corantes fluorescentes, sendo analisadas em citometria de fluxo ou microscopia fluorescente. As células viáveis (que são as vivas) ficam com a coloração verde e as células que têm a membrana

plasmática comprometida (que são as mortas) ficam com a coloração vermelha (LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit, Molecular Probes Inc.) (**Figura 11**).

As células (condrócitos, CEM e HEp-2) foram semeadas 2×10^4 por poço, em triplicata técnica, de placa de 24 poços, tendo sido tratadas com diferentes concentrações de DAN29 (10^{-9} M, 10^{-7} M, 10^{-5} M e 10^{-3} M) por 24h, 48h e 72h. Cada placa foi analisada após os respectivos períodos de exposição. Foi preparada uma solução, em tubo de ensaio de 15ml (Nest®), para o ensaio, com a seguinte composição: 4ml de PBS 1x, 8µl de Homodímero de Etídio e 2µl de calceína AM (*Molecular Probes*®). Este tubo foi coberto com papel alumínio, para proteger o conteúdo da incidência de luz. Após a exposição ao DAN29, as células foram lavadas com PBS 1X, por 5 minutos, sendo a placa coberta com papel alumínio, para proteger o conteúdo da incidência de luz. Ao final deste ciclo, o PBS 1X foi retirado de todos os poços. Em seguida, as células foram incubadas, sem agitação, com 220 µl da solução previamente preparada de *Live and Dead*, por 20 minutos com a placa coberta com papel alumínio, para proteger o conteúdo da incidência de luz. Após esta exposição, foi retirado o conteúdo dos poços e as células foram lavadas com PBS 1X em 3 ciclos de 10 minutos. Nestes períodos, a placa permaneceu coberta com papel alumínio, para proteger o conteúdo da incidência de luz. Ao final do 3º ciclo, o PBS 1X foi mantido e em seguida, as imagens das gotas, nos poços, foram adquiridas por um microscópio estereoscópico de fluorescência (EVOS M5000 Imaging System, Invitrogen™) (**Figura 11**), usando a objetiva 4X.

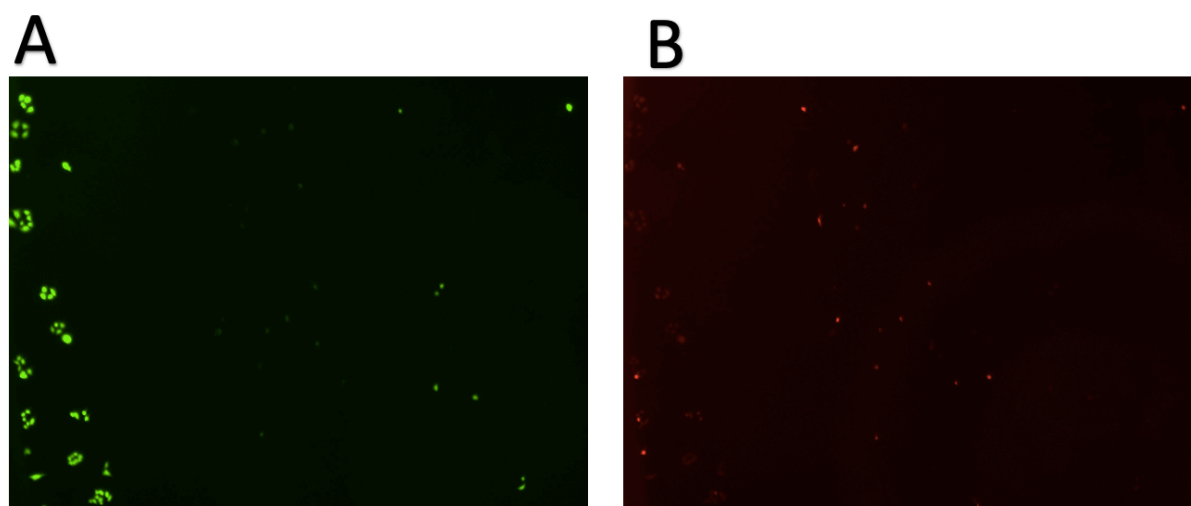


Figura 11 – Fotomicrografia do Ensaio *Live and Dead*. Células HEp-2 expostas, por 72 horas, ao DAN29 a 10^{-3} M. **(A)** células vivas, mostradas em verde e **(B)** células mortas, em vermelho. Na Figura 11B as células mortas estão com brilho mais intenso, quando comparadas às outras células na mesma figura.

O processo de contagem das células vivas e mortas foi executado retirando fotos dos poços no microscópio de fluorescência e utilizando o *software* GIMP 2.10.14 (GNU Image Manipulation Program, Spencer Kimball, Peter Mattis and the GIMP Development Team) para efetivamente contar as células. As células vivas são visualizadas em verde (**Figura 11A**) e as mortas em vermelho (**Figura 11B**). Cada célula contada, na foto, era marcada com uma cor diferente para que não fosse recontada indevidamente.

4.9 Análise estatística

Os dados estatísticos foram analisados pelo *software* GraphPad Prism 8.4.3 (GraphPad, Inc., San Diego, CA, EUA), utilizando os testes *t* de *student*, *two-way* ANOVA para analisar as diferenças entre os grupos, com $p < 0,05$, e um pós-teste de Tukey. Os resultados foram expressos como as médias $\pm$ desvios padrão da média (SD) medidas em duplicata experimental, compostas por triplicata técnica, e executadas de modo independente.

5 RESULTADOS

Os experimentos, *in vitro*, usando as células de condrócitos, células estromais da medula e células HEp-2, como modelo, para os ensaios *Live and Dead* e MTT, nos períodos de exposição 24h, 48h e 72h apresentaram as seguintes condições:

- a. Controle – composta por Meio DMEM suplementado com 1% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de penicilina/estreptomicina (P/S) na concentração de 10000 unidades por mL (meio base);
- b. DMSO – meio base acrescido de 1% de DMSO;
- c. meio base acrescido de DAN29 10^{-9} M;
- d. meio base acrescido de DAN29 10^{-7} M;
- e. meio base acrescido de DAN29 10^{-5} M;
- f. e meio base acrescido de DAN29 10^{-3} M.

5.1 Avaliação da influência do DAN29 na morte celular por ensaio de *Live and Dead*

Para os condrócitos, os resultados mostram que ao compararmos a condição Controle com a condição DMSO e com as quatro concentrações crescentes do DAN29 não foi possível observar nenhuma alteração na morte celular em 24h de exposição (**Figura 12A**). Contudo, em 48h de exposição das células ao DAN29 (**Figura 12B**), e também em 72h (**Figura 12C**), observamos que as demais condições experimentais, incluindo a condição de controle experimental denominada DMSO, apresentaram redução da morte celular quando comparadas às respectivas condições Controle. Ao compararmos a condição DMSO com as demais condições das células expostas ao DAN29, não observamos nenhuma diferença estatística em relação à morte celular. O experimento foi executado uma única vez, em triplicata técnica. Acreditamos que é importante repetir esse experimento para confirmar o percentual de morte de cerca de 40% nas condições controle deste tipo celular nos tempos de 48h e 72h (**Figura 12B e 12C**).

Para as CEM, os resultados mostram que ao compararmos a condição Controle com a condição DMSO e com as 4 concentrações crescentes de DAN29 não foi possível observar nenhuma alteração na morte celular em 24h de exposição (**Figura 13A**). Entretanto, em 48h e 72h de exposição, das CEM ao DAN29, observamos um aumento de morte celular, em torno de 20% das células contabilizadas, expostas ao DAN29 nas concentrações 10^{-7} M à 10^{-3} M

(Figura 13B e 13C). Os experimentos foram feitos em duplicata experimental, tendo cada experimento sido composto por triplicata técnica.

Para as células HEP-2, os nossos achados mostram que ao compararmos a condição Controle com a condição DMSO e com as 4 concentrações crescentes de DAN29 não foi possível observar qualquer alteração na morte celular em 24h de exposição. É importante ressaltar que na condição do DAN29 mais concentrado (10^{-3}M) o percentual de morte celular foi de 42,7%, 51,7% e 72,1% nas exposições de 24h, 48h e 72h, respectivamente **(Figura 14A-C)**. Os ensaios foram realizados em triplicata técnica.

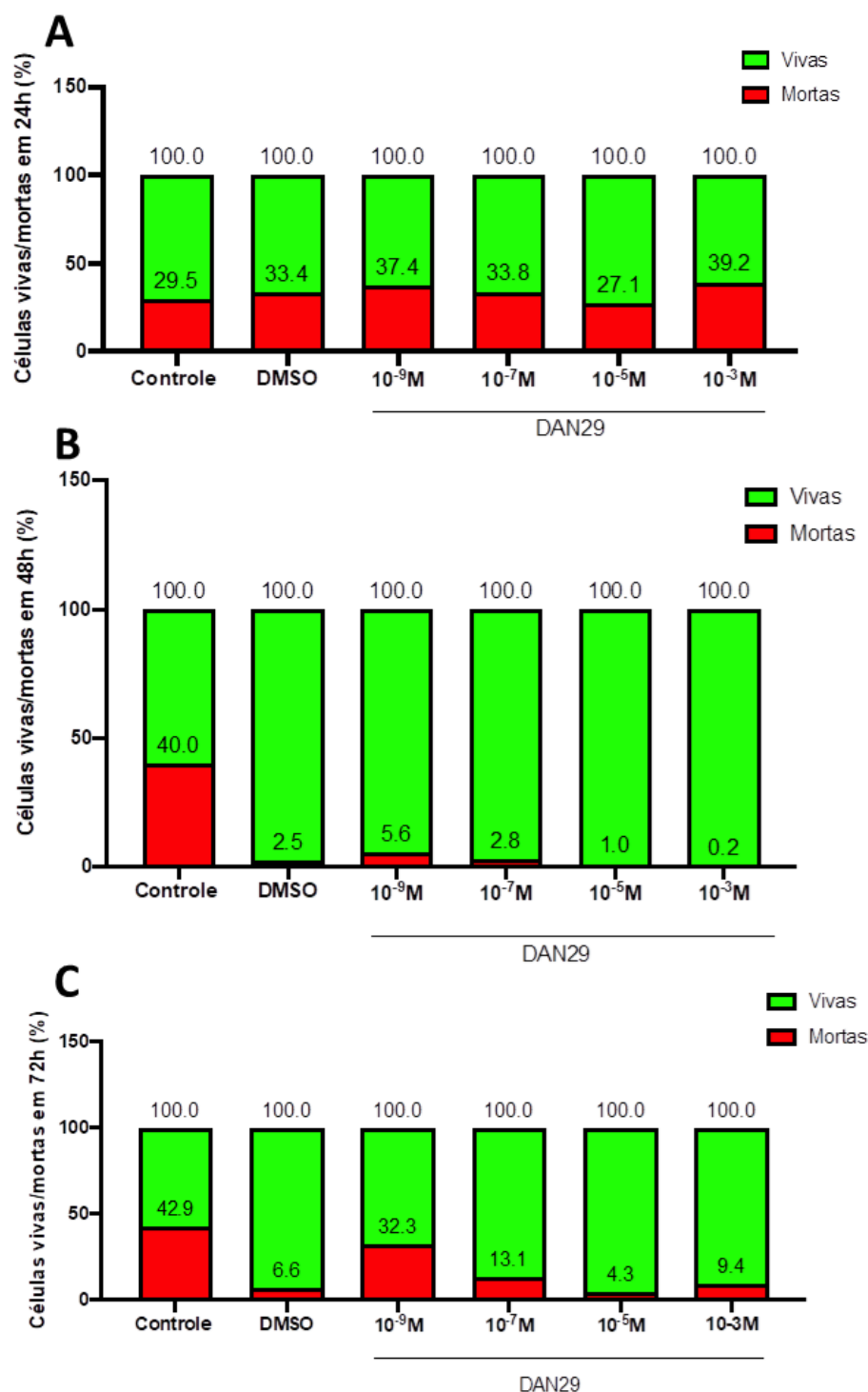


Figura 12 - Avaliação do efeito de DAN29 em diferentes concentrações (10⁻⁹M, 10⁻⁷M, 10⁻⁵M e 10⁻³M) sobre condrócitos humanos. (A) Porcentagem do número de condrócitos vivos e mortos expostos a concentrações crescentes de DAN29 após 24 horas. (B) Porcentagem do número de condrócitos vivos e mortos expostos a concentrações crescentes de DAN29 após 48 horas. (C) Porcentagem do número de condrócitos vivos e mortos expostos a concentrações crescentes de DAN29 após 72 horas. Este experimento foi feito em 3 momentos diferentes em triplicata técnica.

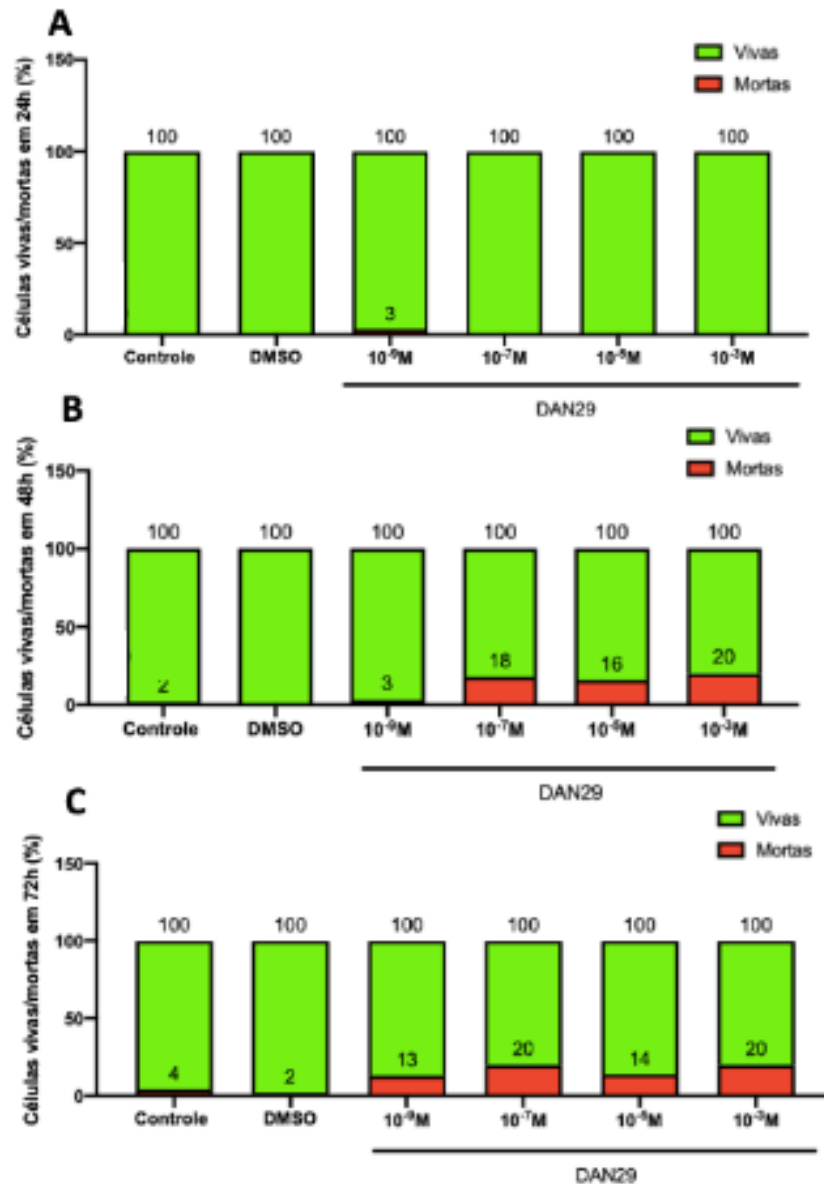


Figura 13 – Avaliação do efeito de DAN29 em diferentes concentrações (10⁻⁹M, 10⁻⁷M, 10⁻⁵M e 10⁻³M) sobre morte das células estromais de medula. (A) Porcentagem do número de CEM vivas e mortas expostas a concentrações crescentes de DAN29 após 24 horas. (B) Porcentagem do número de CEM vivas e mortas expostas a concentrações crescentes de DAN29 após 48 horas. (C) Porcentagem do número de CEM vivas e mortas expostas a concentrações crescentes de DAN29 após 72 horas. Este experimento foi feito em 3 momentos diferentes em triplicata técnica.

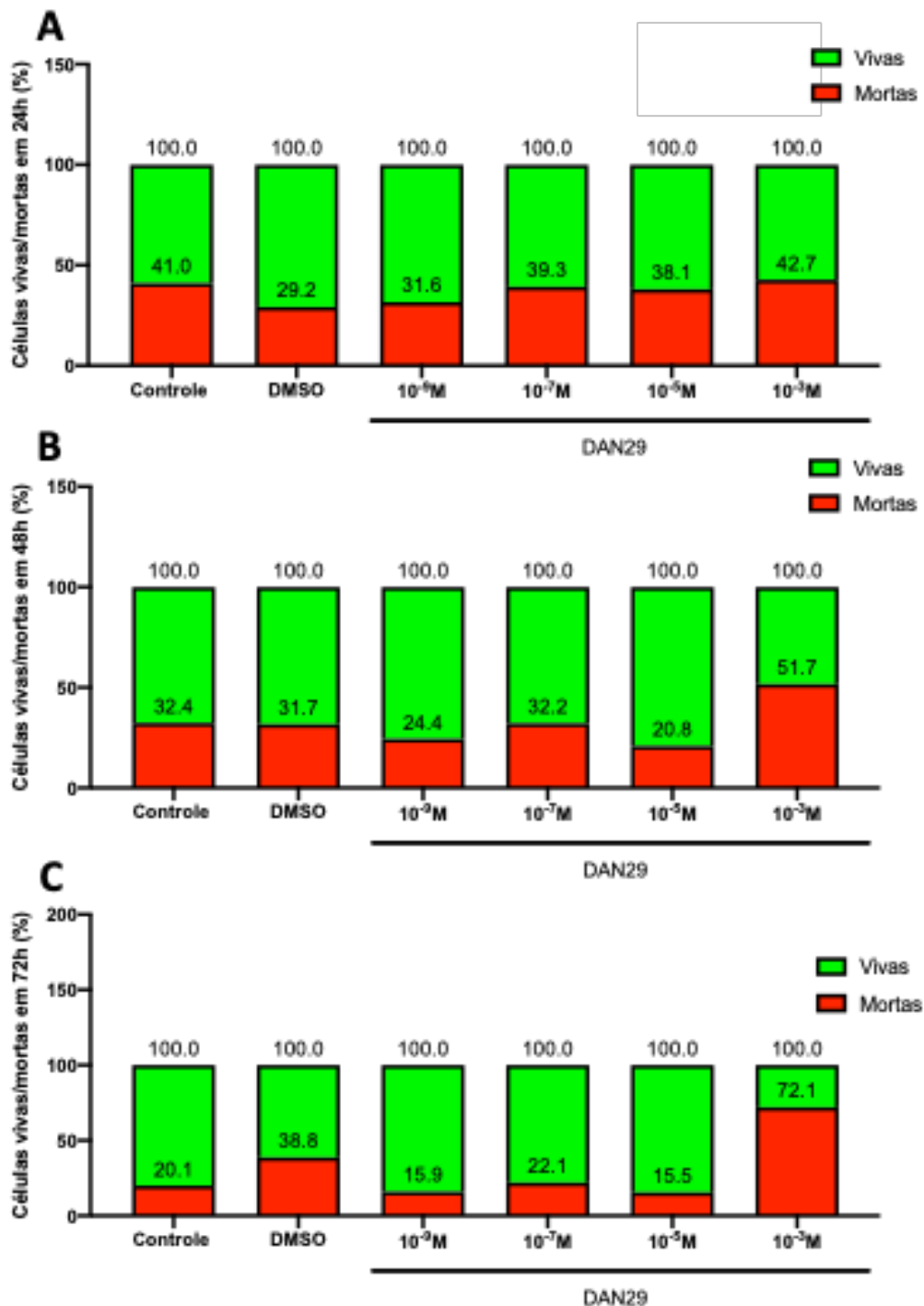


Figura 14 – Avaliação do efeito de DAN29 em diferentes concentrações ($10^{-9}M$, $10^{-7}M$, $10^{-5}M$ e $10^{-3}M$) sobre morte das células Hep-2. (A) Porcentagem do número de células Hep-2 mortas expostas a concentrações crescentes de DAN29 após 24 horas. (B) Porcentagem do número de células Hep-2 vivas e mortas expostas a concentrações crescentes de DAN29 após 48 horas. (C) Porcentagem do número de células Hep-2 vivas e mortas expostas a concentrações crescentes de DAN29 após 72 horas. Este experimento foi feito em 3 momentos diferentes em triplicata técnica.

5.2 Análise da citotoxicidade do DAN29 nas células por ensaio de MTT

Para os condrócitos e para as CEM, os resultados obtidos mostram que não há diferença estatística entre as condições: Controle, DMSO e as quatro concentrações crescentes de DAN29, em 24h, 48h ou 72h após a exposição (**Figuras 15 e 16**). Os ensaios foram realizados em triplicata técnica.

Para as células HEp-2, os resultados obtidos mostram que o DAN29 possui efeito citotóxico. Análises estatísticas mostram uma diminuição da atividade mitocondrial, igualmente em todas as condições do DAN29 em relação ao Controle em 24h, 48h ou 72h de exposição ao fármaco (**Figura 17**). Os ensaios foram realizados em triplicata técnica.

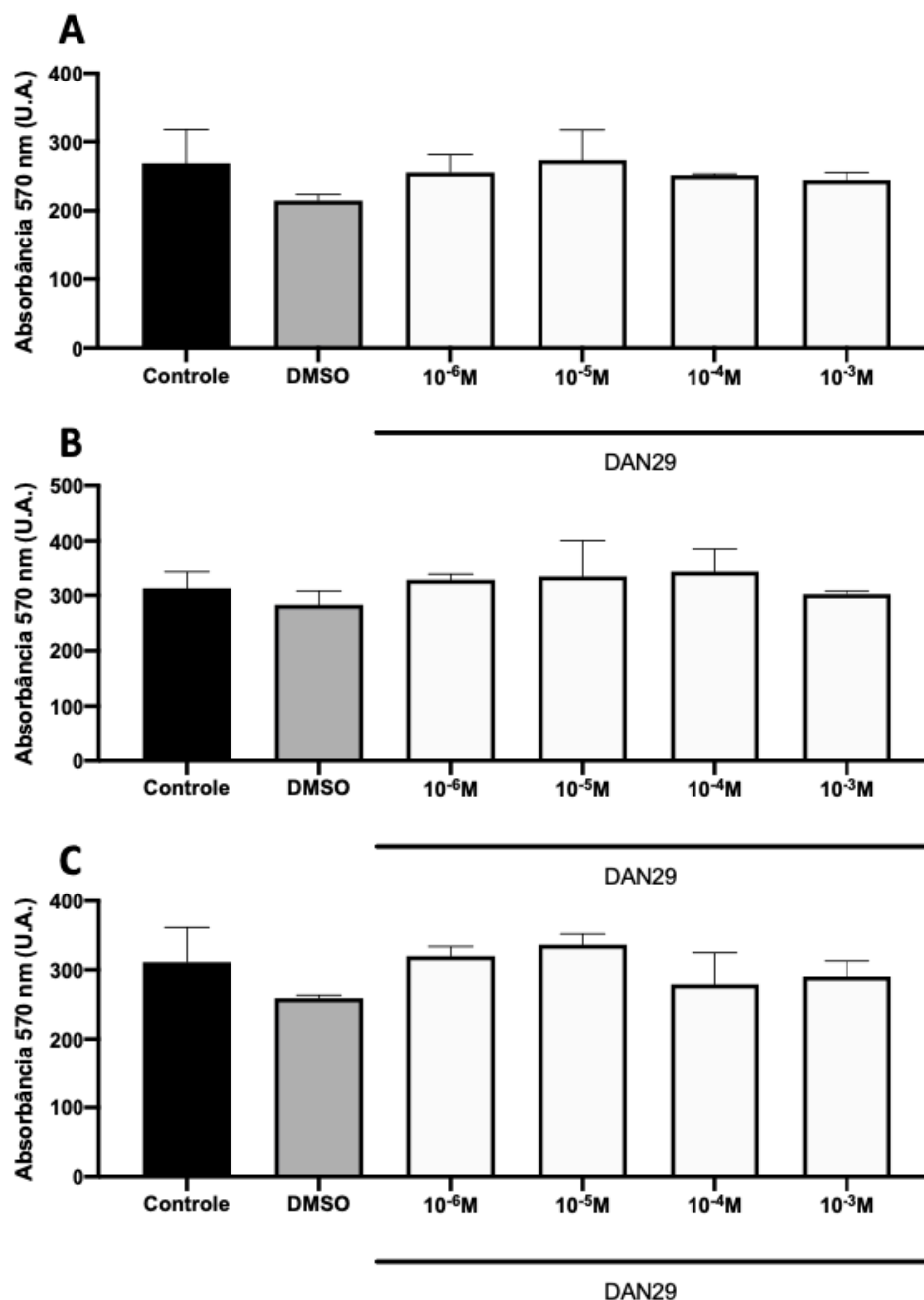


Figura 15 – Avaliação da citotoxicidade do DAN29 em concentrações crescentes ($10^{-9}M$, $10^{-7}M$, $10^{-5}M$ e $10^{-3}M$) em condrócitos humanos. (A) Efeito da citotoxicidade das concentrações crescentes de DAN29 sobre condrócitos humanos após 24 horas de exposição. (B) Efeito da citotoxicidade das concentrações crescentes de DAN29 sobre os condrócitos humanos após 48 horas de exposição. (C) Efeito da citotoxicidade das concentrações crescentes de DAN29 sobre os condrócitos humanos após 72 horas de exposição. Unidade Arbitrária (U.A.). Os valores constituem média $\pm$ desvio-padrão. Este experimento foi feito em 3 momentos diferentes em triplicata técnica.

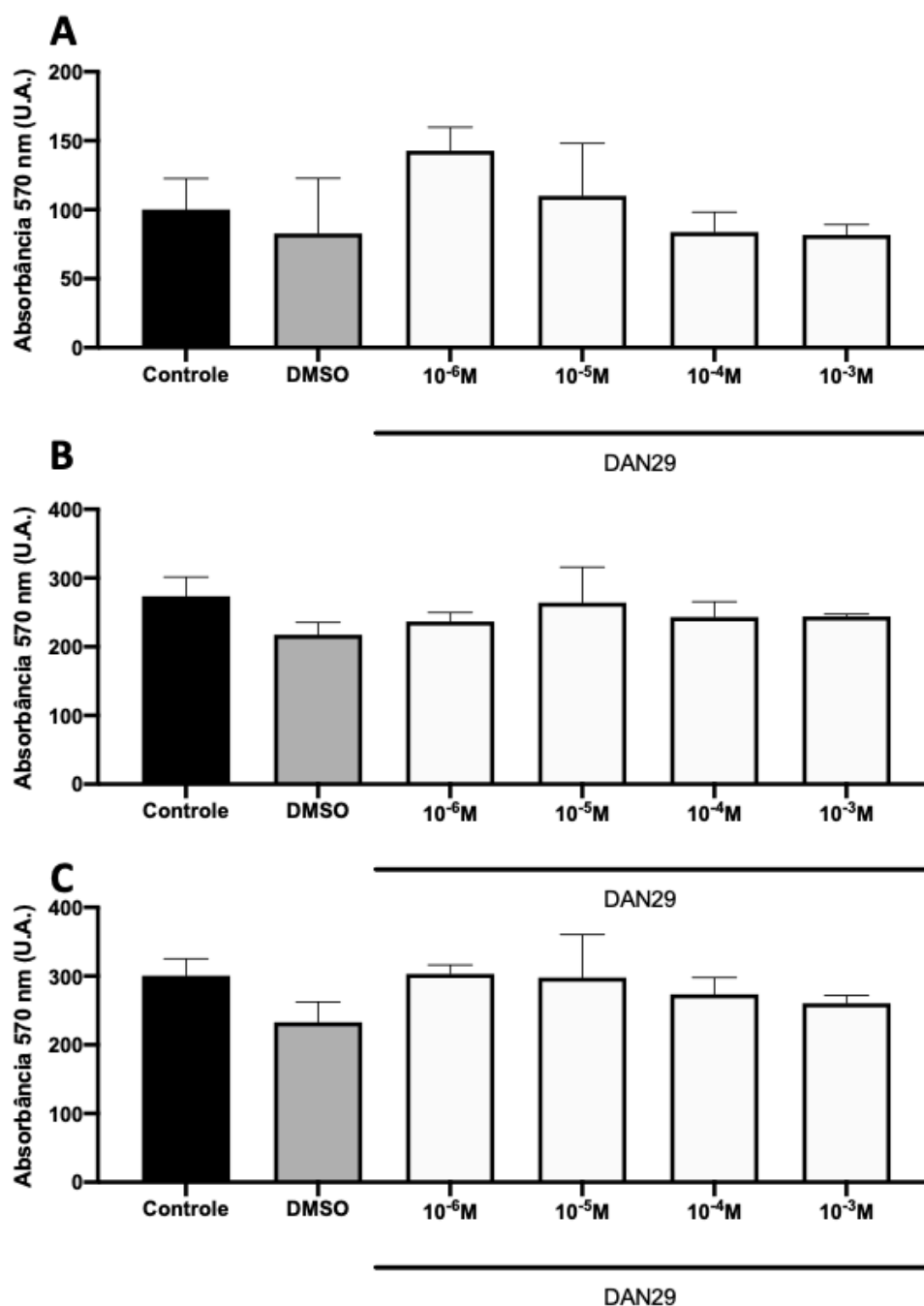


Figura 16 - Avaliação da citotoxicidade do DAN29 em concentrações crescentes ($10^{-9}M$, $10^{-7}M$, $10^{-5}M$ e $10^{-3}M$) em células estromais da medula humana. (A) Efeito da citotoxicidade das concentrações crescentes de DAN29 sobre as CEM humana após 24 horas de exposição. (B) Efeito da citotoxicidade das concentrações crescentes de DAN29 sobre as CEM humana após 48 horas de exposição. (C) Efeito da citotoxicidade das concentrações crescentes de DAN29 sobre as CEM humana após 72 horas de exposição. Unidade Arbitrária (U.A.). Os valores constituem média $\pm$ desvio-padrão. Este experimento foi feito em 3 momentos diferentes em triplicata técnica.

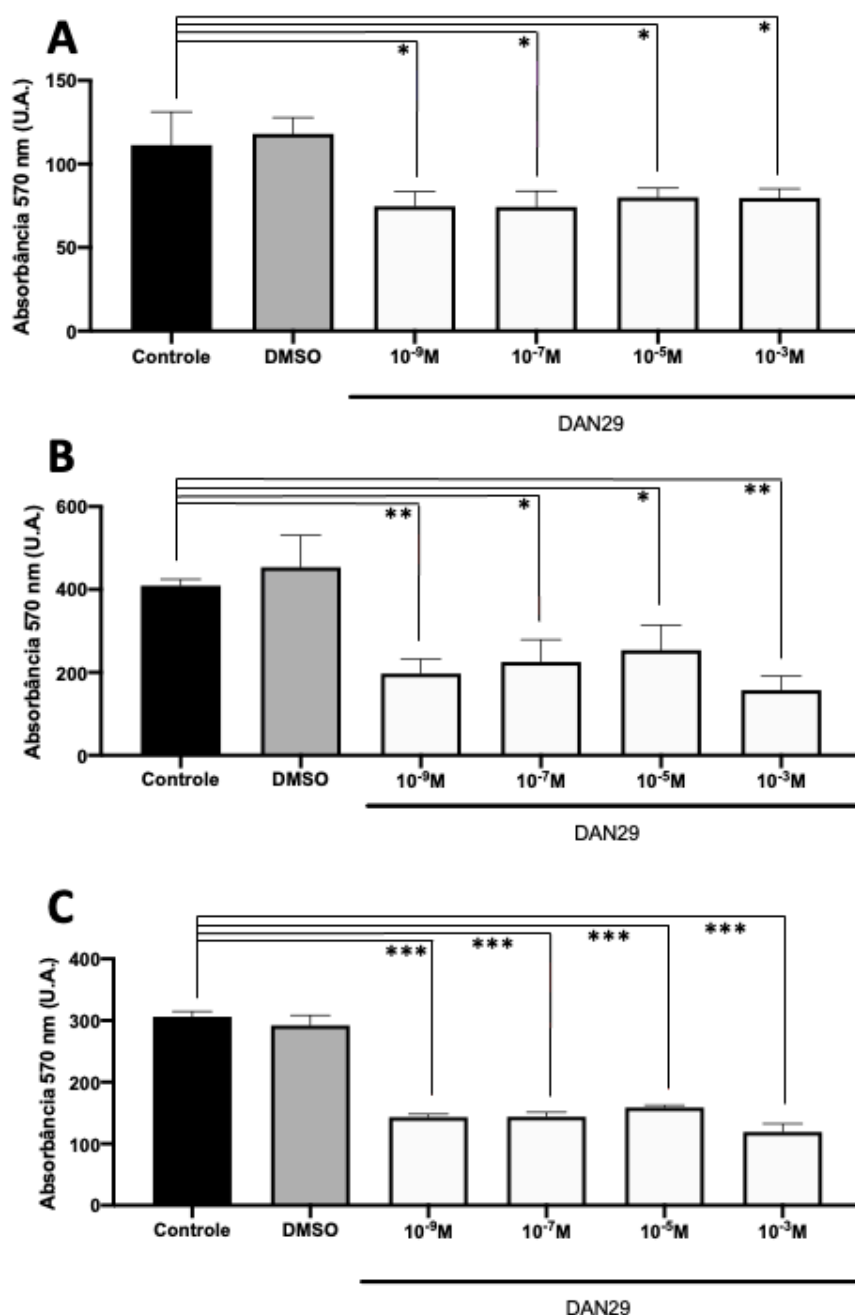


Figura 17 - Avaliação da citotoxicidade do DAN29 em concentrações crescentes (10⁻⁹M, 10⁻⁷M, 10⁻⁵M e 10⁻³M) em células HEp-2 humanas. (A) Efeito da citotoxicidade das concentrações crescentes de DAN29 sobre as células HEp-2 após 24 horas de exposição. (B) Efeito da citotoxicidade das concentrações crescentes de DAN29 sobre as células HEp-2 após 48 horas de exposição. (C) Efeito da citotoxicidade das concentrações crescentes de DAN29 sobre as células HEp-2 após 72 horas de exposição. Foi realizada análise Two-way anova, seguido de pós-teste de Tukey, e foi observado diferença estatística entre a condição controle e as concentrações crescentes de DAN29 (* $p \leq 0,0318$, ** $p \leq 0,0042$ e *** $p \leq 0,0001$). Unidade Arbitrária (U.A.). Os valores constituem média $\pm$ desvio-padrão. Este experimento foi feito em 3 momentos diferentes em triplicata técnica.

A inflamação combate os agentes agressores e promove a recuperação e as condições de homeostase dos tecidos lesionados (BATLOUNI, 2010; RICCIOTTI e FITZGERALD, 2011). A OA é um processo inflamatório que tem como características o desgaste da cartilagem articular, a inflamação do tecido intra-articular e o adensamento do osso subcondral (GOLDRING & GOLDRING, 2007; SAFRAN et al., 2008), sendo as articulações do joelho e do quadril as mais afetadas (GUCCIONE et al., 1994; CROSS et al., 2014). Mesmo sendo conhecidos os aspectos degenerativos das articulações na OA, ainda não foi desenvolvida uma terapêutica capaz de prevenir, retardar ou reverter o quadro da OA (NGUYEN et al., 2017). Esse pensamento tem motivado a busca por novos medicamentos para o tratamento de doenças inflamatórias, como a OA, bem como identificar se o uso dos mesmos é seguro.

Dentre as citocinas inflamatórias envolvidas na patogênese da OA, podemos citar a IL-18 e a IL-1 β , as quais são moduladas pela ativação do P2X7R. Tal sinalização gera um potente estímulo à inflamação e à imunidade, além de promover o crescimento de células cancerígenas. Especificamente quanto ao desenvolvimento e a progressão da OA, parece que o P2X7R induz inflamação piroptótica nos condrócitos, promovendo a degradação da matriz extracelular e a liberação de IL-1 β (LI et al., 2021^b). Tais efeitos indicam este receptor como um possível alvo para os tratamentos anti-inflamatório e anticâncer (DI VIRGILIO et al., 2017). Diversos fármacos têm sido apresentados à comunidade científica, entre eles o DAN29, que é um potente agente anti-inflamatório, em parte por ser um bloqueador seletivo do P2X7R (GONZAGA et al., 2017).

Inicialmente, o DAN29 foi avaliado *in vitro* quanto ao grau da sua capacidade de inibir o P2X7R (GONZAGA et al., 2017). Este mesmo estudo, realizou análises *in vivo*, nas quais tal composto diminuiu o edema na pata de camundongo em baixa concentração, sendo mais eficaz que o padrão diclofenaco. O presente estudo em conjunto com aquele feito por Gonzaga (2017) constituem os únicos trabalhos acerca do DAN29, sendo esta pesquisa a única que contempla testes de toxicidade deste fármaco usando variadas concentrações e diferentes tempos de exposição. Ainda assim, faz-se necessária a realização de novos estudos para melhor compreender a ação anti-inflamatória e segurança desse composto.

Os estudos iniciais da ação desta molécula justificaram a proposta do presente estudo de analisar a citotoxicidade da mesma em diferentes modelos celulares. Nossos experimentos foram executados *in vitro*, em triplicata técnica e utilizando três tipos celulares. As células

foram submetidas à exposição ao DAN29, em concentrações variadas e em três períodos de tempo de exposição. Em seguida, realizou-se avaliação da frequência de morte celular e da citotoxicidade, pelos ensaios *Live and Dead* e MTT, respectivamente. Em geral, nos dois ensaios, os resultados demonstraram baixa citotoxicidade nas diferentes concentrações e tempos avaliados. Nos ensaios *Live and Dead* e MTT pudemos observar que para os Condrócitos e as CEM na exposição em 24h as condições 10^{-3}M e 10^{-9}M apresentaram graus de citotoxicidade próximos sem significância estatística. Já nas exposições em 48h e em 72h, a condição 10^{-3}M apresentou grau de toxicidade menor quando comparada a condição 10^{-9}M , porém não foi verificada significância estatística. Havia expectativa que o DAN29 pudesse gerar maior morte e citotoxicidade na dose mais concentrada (10^{-3}M) e/ou no maior tempo de exposição. Contudo, isto não foi observado em todos os tipos celulares. Isto sugere que o DAN29 apresenta baixa toxicidade mesmo nas doses mais elevadas e assim, indica de forma preliminar a segurança para a utilização do fármaco.

O uso de diferentes tipos de células pode informar quanto ao efeito geral no organismo e assim, adotou-se três tipos celulares com características bem diferentes em relação à proliferação, atividade e função. De forma preliminar, esta análise, possibilitou constatar efeito ligeiramente variável entre os tipos celulares usados. No geral, o presente trabalho sugere que a exposição ao DAN29 gera baixa toxicidade e promoção de morte celular. No entanto, vale reforçar que outros estudos com outros tipos celulares são necessários para atestar risco mínimo para o uso do DAN29 como terapia.

Previamente, nos ensaios *in vitro* e *in vivo* realizados no estudo de GONZAGA (2017) e colaboradores, foram usadas diferentes concentrações de DAN29. Observou-se efeito dose-dependente em relação à regressão do edema pós-inflamação na pata de roedores, sendo as concentrações testadas de 10^{-9}M a 10^{-5}M . Já para ensaios *in vitro*, usou-se de 10^{-9}M a 10^{-4}M . A presente pesquisa usou esta mesma faixa de concentrações acrescida de um ponto mais concentrado (10^{-3}M) pois almejava-se determinar se as doses eficazes para a resolução não seriam tóxicas em período curto e prolongado de exposição. Este é o primeiro estudo a analisar a toxicidade de variadas concentrações do DAN29, em períodos de tempo distintos e assim, não há outros trabalhos que possam ser usados para comparação. Tais dados irão embasar outros estudos com este fármaco.

Nossos achados, provenientes dos ensaios de MTT, mostraram que as células cancerígenas HEp-2 foi constatado um aumento da morte na dose 10^{-3}M após 72h de exposição ao DAN29 em comparação ao grupo controle, bem como houve diminuição das atividades mitocondriais em todas as doses (10^{-9}M a 10^{-3}M) após 24h, 48h e 72h de exposição ao DAN29

em relação ao grupo controle. Observou-se que o DAN29 proporcionou maior citotoxicidade nas células HEp-2 quando comparado aos graus de toxicidade encontrados nos experimentos com condrócitos e CEM. Isto pode ser devido ao fato das células HEp-2, de origem cancerígenas, apresentarem alta atividade metabólica e inflamatória. Considerando que o DAN29 apresenta efeito anti-inflamatório e atividade anticancerígena, isto poderia contribuir para o efeito diferenciado especificamente neste tipo celular.

Na análise dos resultados de viabilidade celular de condrócitos, pelo ensaio *Live and Dead*, observamos em 48h e 72h, de exposição ao DAN29, um baixo nível de morte celular nas demais condições experimentais, incluindo a condição de controle DMSO, comparadas à condição Controle. Esta última condição apresentou aproximadamente 40% de células mortas. À título de comparação, as condições controles dos experimentos com CEM não ultrapassaram 5% de morte celular; enquanto que as condições controles dos ensaios com HEp-2 apresentaram morte celular variável entre 20-40%. Isto mostra que a taxa de morte pode ser específica de cada tipo celular. Contudo, no caso dos condrócitos, ao compararmos a condição DMSO com as demais condições não observamos nenhuma diferença estatística em relação à morte celular. Assim, acreditamos que os valores de morte celular na condição Controle deste experimento possa não ser real e que seria importante repeti-los para validação dos dados.

Dentre os pontos fortes do estudo, destacamos que foram realizados dois tipos de ensaio de citotoxicidade (MTT e *Live and Dead*), com a presença de 2 condições controle (Controle [meio base] e Controle DMSO [meio base acrescido de DMSO]), 4 concentrações diferentes do DAN29 (1×10^{-9} , 1×10^{-7} , 1×10^{-5} e 1×10^{-3} M), 3 tipos de células humanas (condrócitos articulares humanos, CEM humana e células HEp-2), 3 períodos de exposição às condições controle e ao DAN29 (24h, 48h e 72h). Já como limitações, pode-se apontar a necessidade de aumentar o n dos experimentos e a utilização de outras técnicas de avaliação de toxicidade celular que tragam informações adicionais acerca do grau de citotoxicidade do fármaco. Em estudo anterior de GONZAGA (2017) e colaboradores, foi realizado o ensaio de citotoxicidade LDH, que avalia a presença da enzima intracelular lactato desidrogenase no meio de cultura exposto ao DAN29. Tal experimento corrobora baixa citotoxicidade do DAN29, a qual aumentou de forma dose-dependente, especialmente nas concentrações a partir de 10^{-4} M. Contudo, o estudo de GONZAGA (2017) não avaliou a citotoxicidade em diferentes tipos celulares e tempos de exposição ao DAN29, como foi realizado neste estudo. Ademais, vale ressaltar que, até o momento atual, não foram encontrados outros relatos sobre o uso do DAN29.

Por fim, para melhor compreender a ação do DAN29, faz-se necessário a realização de outros estudos que se proponham a realizar ensaios experimentais que permitam identificar os

mecanismos moleculares controlados pelo DAN29, bem como avaliações complementares *in vivo* em modelos animais que atestem a segurança do uso do medicamento. Nossa expectativa é que este estudo sirva de base para novas pesquisas com o intuito de elaborar um protocolo de avaliações tóxicas de componentes com potencial função terapêutica. Tal protocolo visaria a fornecer dados para uma análise que indique se o potencial tóxico da molécula não é tão danoso a ponto de não compensar a sua função terapêutica. No presente estudo, foram observados resultados positivos quanto a avaliação da toxicidade do DAN29 em condrócitos, em CEM e em células HEp-2, usando estudos *in vitro*. Isto, em conjunto às pesquisas adicionais supracitadas possibilitará embasar o desenho de um teste pré-clínico do DAN29 em modelo de OA.

7 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que foi detectada baixa toxicidade do DAN29, nos ensaios por MTT e *Live and Dead*, em culturas tratadas em diferentes concentrações do DAN29. Foi verificada uma diminuição da atividade mitocondrial em células cancerígenas HEP-2. Assim, este é um componente promissor para ser utilizado futuramente no tratamento da OA, com o objetivo de combater os sintomas da inflamação nesta doença provocados pelo receptor P2X7.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAMOFF, B.; CALDERA, F.E. **Osteoarthritis: Pathology, Diagnosis, and Treatment Options.** Med. Clin. North Am. 2020, 104, 293–311.
- ADINOLFI E.; DE MARCHI E.; ORIOLI E.; PEGORARO A.; DI VIRGILIO, F. (2019). **Role of the P2X7 receptor in tumor-associated inflammation.** Curr. Opin. Pharmacol. 47, 59–64.
- AGALAVE S.A.; MAUJAN S.R.; PORE V.S. **Click Chemistry: 1,2,3- Triazoles as Pharmacophores,** Chem. Asian J., 6, 2696 – 2718, 2011.
- APOLLONI S.; AMADIO S.; PARISI C.; MATTEUCCI A.; POTENZA R.L.; ARMIDA M.; POPOLI P.; D’AMBROSI N.; VOLONTE C. **Spinal cord pathology is ameliorated by P2X7 antagonism in a SOD1-mutant mouse model of amyotrophic lateral sclerosis,** Dis. Model Mech. 7 (2014) 1101e1109.
- ARULKUMARAN N.; UNWIN R.J.; TAM FREDERICK W. K. **A potential therapeutic role for P2X7 receptor (P2X7R) antagonists in the treatment of inflammatory diseases.** Expert Opin Investig Drugs. 2011; 20(7): 897–915.
- ATCC. <https://www.atcc.org/api/pdf/product-sheet?id=CCL-23> - acessado em 01/05/2021
- AUGER R.; MOTTA I.; BENIHOUD K.; OJCIUS D.M.; KANELLOPOULOS J.M., **A role for mitogen-activated protein kinase (Erk1/2) activation and non-selective pore formation in P2X7 receptor-mediated thymocyte death,** J. Biol. Chem. 280 (2005) 28142e28151.
- BADRI W.; MILADI K.; NAZARI Q.A.; GREIGE-GERGES H.; FESSI H.; ELAISSARI A. **Encapsulation of NSAIDs for inflammation management: overview, progress, challenges and prospects.** Int J Pharm 2016;515:757–73
- BARBERÀ-CREMADES M.; BAROJA-MAZO A.; GOMEZ A.I.; MACHADO F.; DI VIRGILIO F.; PELEGRÍN P. **P2X7 receptor-stimulation causes fever via PGE2 and IL-1b release.** FASEB J. 26 (2012) 2951e2962.
- BOEUF, S.; RICHTER, W. **Chondrogenesis of mesenchymal stem cells: role of tissue source and inducing factors.** Stem Cell Res Ther 1, 31 (2010). <https://doi.org/10.1186/scrt31>
- CAPLAN A.I. **“Mesenchymal stem cells: time to change the name”.** Stem Cells Translational Medicine, vol. 6, no. 6, pp. 1445–1451, 2017.
- BATLOUNI M. **Anti-inflamatórios não esteroides: Efeitos cardiovasculares, cerebrovasculares e renais.** Arquivo Brasileiro de Cardiologia, 2010.
- BONNET C.S.; WALSH D.A. **Osteoarthritis, angiogenesis and inflammation.** Rheumatology (Oxford), 44 (2005), pp. 7-16
- CARROLL W.A.; KALVIN D.M.; MEDRANO A.P.; FLORJANCIC A.S.; WANG Y.; DONNELLY-ROBERTS D.L.; NAMOVIC M.T.; GRAYSON G.; HONORÉ P.; JARVIS

M.F. **Novel and potent 3-(2,3-dichlorophenyl)-4-(benzyl)-4H-1,2,4-triazole P2X7 antagonists.** Bioorg. Med. Chem. Lett. 17 (2007) 4044e4048.

CARROLL W.A.; DONNELLY-ROBERTS D.L.; JARVIS M.F. **Selective P2X7 receptor antagonists for chronic inflammation and pain.** Purinergic Signal 5 (2009) 63e73.

CHOI J.H.; CHOI J.H.; KIM D.Y.; YOON J.H.; YOUN H.Y.; YI J.B.; RHEE H.I.; RYU K.H.; JUNG K.; HAN C.K.; KWAK W.J.; CHO Y.B. **Effects of SKI 306X, a new herbal agent, on proteoglycan degradation in cartilage explant culture and collagenase-induced rabbit osteoarthritis model.** Osteoarthritis and cartilage. 2002; 10(6):471–8.

CISTERNAS M.G.; MURPHY L.; SACKS J.J.; et al. **Alternative methods for defining osteoarthritis and the impact on estimating prevalence in a US population-based survey.** Arthritis Care Res 2016;574–80

CROSS M.; SMITH E.; HOY D.; NOLTE S.; ACKERMAN I.; FRANSEN M.; BRIDGETT L.; WILLIAMS S.; GUILLEMIN F.; HILL C.L.; LASLETT L.L.; JONES G.; CICUTTINI F.; OSBORNE R.; VOS T.; BUCHBINDER R.; WOOLF A.; MARCH L. (2014). **The global burden of hip and knee osteoarthritis: estimates from the Global Burden of Disease 2010 study.** *Ann Rheum Dis* 73: 1323–1330.

CRYER B.; FELDMAN M. **Cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 selectivity of widely used nonsteroidal anti-inflammatory drugs.** Am J Med. 1998; 104: 413-21.

FRESHNEY R.I. **Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications.** John Wiley & Sons, 2015. p.365-366.

DENIZOT F.; LANG R. **Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability.** J. Immunol. 1986; Methods., May 22, 89(2):271-7.

DI VIRGILIO F.; BEN D.D.; SARTI A.C.; GIULIANI A.L.; FALZONI S. **The P2X7 Receptor in Infection and Inflammation.** Immunity 47, 15-31 (2017).

DRIBAN J.B.; SITLER M.R.; BARBE M.F.; BALASUBRAMANIAM E. **Is osteoarthritis a heterogeneous disease that can be stratified into subsets?** Clin Rheumatol 2010;29:123e31

DUBYA G.R. **P2X7 receptor regulation of non-classical secretion from immune effector cells.** Cell Microbiol. 14 (2012) 1697e1706.

ECACC. https://www.phculturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=86030501&collection=ecacc_gc - acessado em 01/05/2021

EICHER T.; HAUPTMANN S. **The Chemistry of Heterocycles: Structure, Reactions, Syntheses, and Applications**, ed. Willey, 2a ed., 2003

FARIA R.; FERREIRA L.; BEZERRA R.; FRUTUOSO V.; ALVES L. **Action of natural products on p2 receptors: a reinvented era for drug discovery.** Molecules 17 (2012) 13009e13025.

FARIA, R.X.; GONZAGA, D.T.G.; PACHECO, P.A.F.; SOUZA, A.L.A.; FERREIRA, V.F.; DA SILVA, F.C. **Searching for new drugs for Chagas diseases: triazole analogs display high in vitro activity against *Trypanosoma cruzi* and low toxicity toward mammalian cells.** Journal of Bioenergetics and Biomembranes., v. 50, n. 2, p. 81-91, 2018.

FILARDO G.; PERDISA F.; ROFFI A.; MARCACI M.; KON E. (2016). **Stem cells in articular cartilage regeneration.** *J Orthop Surg Res* 11: 42.

FREITAS L.B.O.; RUELA F.A.; PEREIRA G.R.; ALVES R.B.; DE FREITAS R.P.; “A reação “click” na síntese de 1,2,3-triazóis: Aspectos químicos e aplicações”. Química Nova, 2011, 34(10), 1791-1804.

GARGETT C.E.; CORNISH J.E.; WILEY J.S. **ATP, a partial agonist for the P2Z receptor of human lymphocytes.** Br. J. Pharmacol. 122 (1997) 911e917.

GEHRING M.P.; BRANDÃO PEREIRA T.C.; ZANIN R.F.; BORGES M.C.; FILHO A.B.; BATTASTINI A.M.O.; BOGO M.R.; LENZ G.; CAMPOS M.M.; MORRONE F.B., **P2X7 receptor activation leads to increased cell death in a radiosensitive human glioma cell line,** Purinergic Signal 8 (2012) 729e739.

GIBSON M.; LI H.; COBURN J.; MORONI L.; NAHAS Z.; BINGHAM C. 3rd; YAREMA K.; Elisseff J. **Intra-articular delivery of glucos- amine for treatment of experimental osteoarthritis created by a medial meniscectomy in a rat model.** Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society. 2014; 32 (2):302–9.

GLYN-JONES S.; PALMER A.J.; AGRICOLA R.; PRICE A.J.; VINCENT T.L.; WEINANS H.; CARR A.J. **Osteoarthritis.** Lancet. 2015; 386(9991):376–87.

GOLDRING M.B.; GOLDRING S.R. **Osteoarthritis.** (2007). *J. Cell. Physiol* 213: 626–634.

GOLDRING M.B.; FUKUO K.; BIRKHEAD J.R.; DUDEK E.; SANDELL L.J. **Transcriptional suppression by interleukin-1 and interferon-gamma of type II collagen gene expression in human chondrocytes.** J. Cell. Biochem., 54 (1994), pp. 85-99

GONZAGA D.T.G.; FERREIRA L.B.G.; MOREIRA MARAMALDO COSTA T.E.; VON RANKE N.L.; ANASTÁCIO FURTADO PACHECO P.; SPOSITO SIMÕES A.P.; ARRUDA J.C.; DANTAS L.P.; DE FREITAS H.R.; DE MELO REIS R.A.; PENIDO C.; BELLO M.L.; CASTRO H.C.; RODRIGUES C.R.; FERREIRA V.F.; FARIA R.X. e DA SILVA F.C. **1-Aryl-1H- and 2-aryl-2H-1,2,3-triazole derivatives blockade P2X7 receptor in vitro and inflammatory response in vivo.** Eur J Med Chem. 2017 Oct 20;139:698-717. doi: 10.1016/j.ejmech.2017.08.034. Epub 2017 Aug 16.

GUCCIONE A.A.; FELSON D.T.; ANDERSON J.J.; ANTHONY J.M.; ZHANG Y.; WILSON P.W. (1994). **The effects of specific medical conditions on the functional limitations of the elders in the Framingham Study.** *Am J Public Health* 84(3):351-8.

GUZMAN R.E.; EVANS M.G.; BOVE S.; MORENKO B.; KILGORE K. **Mono-iodoacetate-induced histologic changes in subchondral bone and articular cartilage of rat femorotibial joints: an animal model of osteoarthritis.** Toxicologic pathology. 2003; 31(6):619–24.

HALEY R.M.; VON RECUM H.A. **Localized and targeted delivery of NSAIDs for treatment of inflammation: A review.**Exp Biol Med (Maywood) 2019 Apr; 244(6): 433–444. Published online 2018 Jul 12. doi: 10.1177/1535370218787770

- HAWKER G.A. **Osteoarthritis is a serious disease.** *Clin Exp Rheumatol.* 2019;37(suppl 120) : 3–6
- HOEGH-ANDERSEN P.; TANKO L.B.; ANDERSEN T.L.; LUNDBERG C.V.; MO J.A.; HEEGAARD A.M.; DELAISSÉ J.M.; CHRISTGAU S. **Ovariectomized rats as a model of postmenopausal osteoarthritis: validation and application.** *Arthritis Res Ther.* 2004; 6(2):R169–R80.
- HOOIJMANS C.R.; LEENAARS M.; RITSKES-HOITINGA M. **A gold standard publication checklist to improve the quality of animal studies, to fully integrate the three Rs, and to make systematic reviews more feasible.** *Altern Lab Anim* 2010;38:167e82
- HOOIJMANS C.R.; DE VRIES R.; LEENAARS M.; CURFS J.; RITSKES-HOITINGA M. **Improving planning, design, reporting and scientific quality of animal experiments by using the Gold Standard Publication Checklist, in addition to the ARRIVE guidelines.** *Br J Pharmacol* 2011;162:1259e60
- HOWARD P.A. **Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cardiovascular Risk.** *J Am Coll Cardiol.* 2004; 43: 519-25.
- HUI A.I.; MCCARTY W.J.; MASUDA K.; FIRESTEIN G.S.; and SAH R.L. (2012). **A systems biology approach to synovial joint lubrication in health, injury and disease.** *WIREs Syst Biol Med* 4:15-37.
- JAEGER K.; SELENT C.; JAEHME W.; MAHR S.; GOEBEL U.; IBRAHIM S.; VOLLMAR B.; MUELLER-HILKE B. **The genetics of osteoarthritis in STR/ort mice.** *Osteoarthritis and cartilage.* 2008; 16(5):607–14.
- JAMES S.L.; ABATE D.; ABATE K.H.; et al. **Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 Diseases and Injuries for 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017.** *Lancet* 2018;392(10159):1789–858.
- JIMENEZ P.A.; HARLAN P.M.; CHAVARRIA A.E.; HAIMES H.B. **Induction of osteoarthritis in guinea pigs by transection of the anterior cruciate ligament: radiographic and histopathological changes.** *Inflammation research: official journal of the European Histamine Research Society [et al].* 1995; 44 Suppl 2:S129– 30.
- KAPOOR M.; MARTEL-PELLETIER J.; LAJEUNESSE D.; PELLETIER J.P.; Fahmi H. **Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis.** *Nat. Rev. Rheumatol.*, 7 (2011), pp. 33-42
- KEYSTONE E.C.; WANG M.M.; LAYTON M.; HOLLIS S.; MCINNES I.B., **Clinical evaluation of the efficacy of the P2X7 purinergic receptor antagonist AZD9056 on the signs and symptoms of rheumatoid arthritis in patients with active disease despite treatment with methotrexate or sulphasalazine,** *Ann. Rheum. Dis.* 71 (2012) 1630e1635.
- KILKENNY C.; BROWNE W.J.; CUTHILL I.C.; EMERSON M.; ALTMAN D.G. **Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research.** *PLoS Biol* 2010;8:e1000412
- KIM S.J.; KIM J.E.; KIM S.H.; KIM S.J.; JEON S.J.; KIM S.H.; JUNG Y. **Therapeutic effects of neuropeptide substance P coupled with self-assembled peptide nanofibers on the progression of osteoarthritis in a rat model.** *Biomaterials.* 2016; 74:119–30.
- KIM J.E.; SONG D.H.; KIM S.H.; JUNG Y.; KIM S.J. **Development and characterization of various osteoarthritis models for tissue engineering.** *PLoS One*, v. 13, n. 3, p. e0194288, 2018.

LAIRES P.A.; GOUVEIA M.; CANHÃO H.; BRANCO J.C. **The economic impact of early retirement attributed to rheumatic diseases: results from a nationwide population-based epidemiologic study.** Public Health. 2016;140:151-62.

LAWRENCE R.C.; FELSON D.T.; HELMICK C.G.; ARNOLD L.M.; CHOI H.; DEYO R.A.; GABRIEL S.; HIRSCH R.; HOCHBERG M.C.; HUNDER G.G.; JORDAN J.M.; KATZ J.N.; KREMERS H.M.; WOLFE F. (2008). **Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States. Part II.** *Arthritis Rheum* 58(1): 26-35.

LI Z.; HUANG Z.; BAI L. (2021^a). **The P2X7 receptor in osteoarthritis.** Front. Cell Dev. Biol. 9:628330.

LI Z.; HUANG Z.; ZHANG H.; LU J.; TIAN Y.; WEI Y.; et al. (2021^b). **P2X7 receptor induces pyroptotic inflammation and cartilage degradation in osteoarthritis via NF- κ B/NLRP3 crosstalk.** Oxid. Med. Cell. Longev. 2021:8868361.

LITALIEN C.; JACQZ-AIGRAIN E. **Risks and benefits of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in children: a comparison with paracetamol.** Paediatr Drugs. 2001;3:817-58.

LITTLE C.B.; ZAKI S. **What constitutes an "animal model of osteoarthritis"—the need for consensus?** Osteoarthritis and cartilage. 2012; 20(4):261–7.

LIVE/DEAD[®] Viability/Cytotoxicity Kit *for mammalian cells*, Molecular Probes™ invitrogen detetion technologies, Revised: 21-december-2005

LOESER R.F.; GOLDRING S.R.; SCANZELLO C.R.; GOLDRING M.B. (2012). **Osteoarthritis: A disease of the joint as an organ.** *Arthr Rheum* 64(6): 1697-1707.

MASON R.M.; CHAMBERS M.G.; FLANELLY J.; GAFFEN J.D.; DUDHIA J.; BAYLISS M.T. **The STR/ort mouse and its use as a model of osteoarthritis.** Osteoarthritis and cartilage. 2001; 9(2):85–91.

MCALLINDON T.E.; BANNURU R.R.; SULLIVAN M.C.; ARDEN N.K.; BEREMBAUM F.; BIERMA-ZEINSTRA S.M. (2014). **OARSI guidelines for the non-surgical management of knee Osteoarthritis.** *Osteoarthritis Cartilage* 22:363-388.

MELGAÇO S.S.C.; SARAIVA M.I.R.; LIMA T.T.C.; SILVA JÚNIOR G.B.; DAHER E.F. **Nefrotoxicidade dos anti-inflamatórios não esteroidais.** Medicina (Ribeirão Preto) 2010;43:382-90

MELO J.O.F.; DONNICI C.L.; AUGUSTI R.; FERREIRA V.F.; DE SOUZA M.C.B.V.; FERREIRA M.L.G.; CUNHA A.C. **“Heterociclos1,2,3-triazolicos: histórico, métodos de preparação, aplicações e atividades farmacológicas”;** Química Nova, 2006, 29 (3), 569-579.

MILLER CM, BOULTER NR, FULLER SJ, ZAKRZEWSKI AM, LEES MP, SAUNDERS BM, WILEY JS, AND SMITH NC.; **The role of the P2X7 receptor in infectious diseases.** PLoS Pathog. Bioorg Med Chem Lett, 2011.

MINISTÉRIO DA FAZENDA. Portal da Previdência Social - Dados abertos-Previdência Social e INSS. Brasil. 2016. Disponível em <http://www.previdencia.gov.br/dados-abertos/dados-abertos-previdencia-social/>.

MONDINO, M. G.; **Compostos heterocíclicos: Estudos e aplicações sintéticas**, vol. 16, Ed. Atheneu, São Paulo, 2014.

MONIF M.; REID C.A.; POWELL K.L.; DRUMMOND K.J.; O'BRIEN T.J.; WILLIAMS D.A., **Interleukin-1b has trophic effects in microglia and its release is mediated by P2X7R pore**, J. Neuroinflammation 13 (2016) 173.

MOSMANN T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 65:55-63, 1983)

MÜLLER T.; VIEIRA R.P.; GRIMM M.; DÜRK T.; CICKO S.; ZEISER R.; JAKOB T.; MARTIN S.F.; BLUMENTHAL B.; SORICHTER S.; FERRARI D.; DI VIRGILLIO F.; IDZKO M. **A potential role for P2X7R in allergic airway infammation in mice and humans**. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 44 (2011) 456e464.

MURPHY L.B.; CISTERNAS M.G.; Pasta D.J.; et al. **Medical expenditures and earnings losses among US adults with arthritis in 2013**. Arthritis Care Res 2018;70(6):869–76.

NGUYEN L.T.; SHARMA A.R.; CHKRABORTY C.; SAIBABA B.; AHN M.E.; LEE S.S. **Review of prospects of biological fluid biomarkers in osteoarthritis**. *Int. J. Mol. Sci.* 2017, 18, 601.

NORTH R.A.; JARVIS M.F. **P2X receptors as drug targets**. Mol. Pharmacol. 83 (2013) 759e769.

OGAWA S.; AWAGA Y.; TAKASHIMA M.; HAMA A.; MATSUDA A.; TAKAMATSU H. **Knee osteoarthritis pain following medial meniscectomy in the nonhuman primate**. Osteoarthritis and cartilage. 2016; 24(7):1190–9.

OPAL S.M.; DEPALO V.A. **Anti-Inflammatory Cytokines**, Chest, Volume 117, Issue 4, 2000, Pages 1162-1172,

PAHWA R.; GOYAL A.; BANSAL P.; JIALAL I. **Chronic Inflammation**. In: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL); 2020.

PITCHER T.; SOUSA-VALENTE J.; MALCANGIO M. **The Monoiodoacetate Model of Osteoarthritis Pain in the Mouse**. Journal of visualized experiments: JoVE. 2016;(111).

PRASAD M.P.R.; MUKUNDAN M.A.; KRISHNASWAMY K. **Micronuclei and Carcinogen DNA Adducts as Intermediate End Points in Nutrient Intervention Trial of Precancerous Lesions in the Oral Cavity**. Oral Oncology, European Journal of Cancer, 1995; 31B (3): 155-159.

RANNOU F.; POIRADEAU S. **Non-pharmacological approaches for the treatment of osteoarthritis**. Best Practice Res Clin Rheumatol 2010; 24: 93–106, doi: 10.1016/j.berh.2009.08.013.

RICCIOTTI, E; FITZGERALD, G. A. **Prostaglandins and Inflammation**. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, v. 31, p. 986-1000, 2011.

SAFRAN M.R.; KIM, H.; ZAFFAGNINI S. (2008). **The use of scaffolds in the management of articular injury**. *JAAOS* 16: 306-311.

SANDOVAL A.C.; FERNANDES D.R.; SILVA A.; JUNIOR A.T.T. **Uso indiscriminado dos anti-inflamatórios não esteroidais (AINES)**. v.8 n.2; Revista Científica FAEMA; 2017.

SANTANGELO K.S.; NUOVO G.J.; Bertone A.L. **In vivo reduction or blockade of interleukin-1beta in primary osteoarthritis influences expression of mediators implicated in pathogenesis.** Osteoarthr. Cartil., 20 (2012), pp. 1610-1618

SAUL C.; TEIXEIRA C.R.; PEREIRA-LIMA; JULIO C. and TORRESINI S. RJ. **Redução da prevalência de úlcera duodenal: um estudo brasileiro (análise retrospectiva na última década: 1996-2005).** Arq. Gastroenterol. [online]. vol.44, n.4, pp.320-324, 2007.

SEHGAL V.K.; Das S.; Vardhan A. **Computer aided drug designing.** Int J Med and Dent Sci 2017; 6(1):1433-1437.

SEHNEM D.P.; DE SOUZA E.T.G.; BENAMOR L.; DE JESUS L.D.S.; DE MENEZES VALENTIM R.; ZAMBUZZI, W.F.; TAKAMORI E.R. (2012) **Métodos alternativos para avaliação da citotoxicidade de biomateriais.** Revista Rede de Cuidados em Saúde, 6.

SERHAN C. N.; BRAIN S. D.; BUCKLEY C. D.; GILROY, D. W.; HASLETT C.; O'NEILL L. A. J.; PERRETI M.; ROSSI A. G.; WALLACE J. L. **Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms.** FASEB J. 21, 325–332 (2007)

SHARMA P.; KUMAR, K.A.; UPADHYAY S.; SINGH J.; SAHU, V. **“A novel approach to the synthesis of 1,2,3-triazoles and their SAR studies”.** Medicinal Chemical Research, 2010, 19(6), 589-602.

SMITH G.JR.; MYERS S.L.; BRANDT K.D.; MICKLER E.A.; ALBRECHT M.E. **Effect of intraarticular hyaluronan injection on vertical ground reaction force and progression of osteoarthritis after anterior cruciate ligament transection.** The Journal of rheumatology. 2005; 32(2):325–34.

STOCK T.C.; BLOOM B.J.; WEI N.; ISHAQ S.; PARK W.; WANG X.; GUPTA P.; MEBUS C.A., **Efficacy and safety of CE-224,535, an antagonist of P2X7 receptor, in treatment of patients with rheumatoid arthritis inadequately controlled by methotrexate,** J. Rheumatol. 39 (2012) 720e727.

SUGIYAMA T.; KAWAMURA H.; YAMANISHI S.; KOBATASHI M.; KATSUMURA K.; PURO D.G. **Regulation of P2X7-induced pore formation and cell death in pericyte-containing retinal microvessels,** Am. J. Physiol. Cell Physiol. 288 (2005) C568eC576.

SUTTON S.; CLUTTERBUCK A.; HARRIS P.; GENT T.; FREEMAN S.; FOSTER N.; BARRETT-JOLLEY R.; MOBASHERI A. **The contribution of the synovium, synovial derived inflammatory cytokines and neuropeptides to the pathogenesis of osteoarthritis.** The Veterinary Journal, Volume 179, Issue 1, 2009, Pages 10-24

TEIXEIRA J.M.; DIAS E.V.; PARADA C.A.; TAMBELI C.H., **Intra-articular blockade of P2X7 receptor reduces the articular hyperalgesia and inflammation in the knee joint synovitis especially in female rats,** J. Pain 18 (2017) 132e143.

TUTTOLOMONDO A.; DI SCIACCA R.; DI RAIMONDO D.; RENDA C.; PINTO A.; LICATA G. **Infammation as a therapeutic target in acute ischemic stroke treatment.** Curr. Top. Med. Chem. 9 (2009) 1240e1260.

VSEVOLOD V.R.; LUKE G.G.; FOKIN V.V.; SHARPLESS K.B.; **A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective “Ligation” of Azides and Terminal Alkynes.** *Angewandte Chemie International Edition*, 2002,41(14), 2596-2599.

WEHLING M. **Assessing the translatability of drug projects: what needs to be scored to predict success?** *Nat Rev Drug Discov* 2009;8:541e6.

WEHLING M. **Drug development in the light of translational science: shine or shade?** *Drug Discov Today* 2011;16:1076e83.

WENDLER A.; WEHLING M. **The translatability of animal models for clinical development: biomarkers and disease models.** *Curr Opin Pharmacol* 2010;10:601e6

WU Q.I.; PENG ZHENLING, YANG ZHANG JY. **COACH-D: improved protein–ligand binding sites prediction with refined ligand-binding poses through molecular docking.** *Nucleic Acids Res.* 2018;46:313–38.

XUE M.; MCKELVEY K.; SHEN K.; MINHAS N.; MARCH L.; PARK S.Y.; et al. **Endogenous MMP-9 and not MMP-2 promotes rheumatoid synovial fibroblast survival, inflammation and cartilage degradation.** *Rheumatology (Oxford)*, 53 (2014), pp. 2270-2279

YOSHIOKA M.; COUTTS R.D.; AMIEL D.; HACKER S.A. **Characterization of a model of osteoarthritis in the rabbit knee.** *Osteoarthritis and cartilage.* 1996; 4(2):87–98.

ZHENG W.; TAO Z.; CHEN C.; ZHANG C.; ZHANG H.; YING X.; et al. **Plumbagin prevents IL-1beta-induced inflammatory response in human osteoarthritis chondrocytes and prevents the progression of osteoarthritis in mice.** *Inflammation*, 40 (2017), pp. 849-860

ANEXO A - Aprovação pelo CEP/INTO projeto original (coleta do material de descarte dos pacientes com osteoartrite)

INSTITUTO NACIONAL DE
TRAUMATO - ORTOPEDIA /
INTO / SAS/ MS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA MANUTENÇÃO DA ATIVIDADE CELULAR CONDRÓCITA PELOS SINOVIÓCITOS: MODELO IN VITRO DO ESTUDO PARA OSTEOATRITE EM HUMANOS.

Pesquisador: Diego Aguiar

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 08663912.3.0000.5273

Instituição Proponente: Instituto Nacional de Traumatismo - Ortopedia / INTO / SAS/ MS - RJ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 146.596

Data da Relatoria: 31/10/2012

Apresentação do Projeto:

Adequado.

Objetivo da Pesquisa:

Estabelecimento de metodologia para cultivo de células sinoviais e genes envolvidos na doença articular.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Sem riscos. Com benefícios sobre o entendimento da doença articular.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto muito bem elaborado.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequado.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto Aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Avenida Brasil, nº 500

Bairro: São Cristóvão

CEP: 20.940-070

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)2134-5000

Fax: (21)2134-5228

E-mail: cep.into@into.saude.gov.br

INSTITUTO NACIONAL DE
TRAUMATO - ORTOPEDIA /
INTO / SAS/ MS



Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

RIO DE JANEIRO, 14 de Novembro de 2012

Assinador por:
Marisa Peter Silva
(Coordenador)

Endereço: Avenida Brasil, nº 500
Bairro: São Cristóvão CEP: 20.940-070
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2134-5000 Fax: (21)2134-5228 E-mail: oep.into@into.saude.gov.br

ANEXO B - Aprovação pelo CEP/INTO projeto original (coleta do material de descarte dos pacientes com osteoartrite)

INSTITUTO NACIONAL DE
TRAUMATO - ORTOPEDIA /
INTO / SAS/ MS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA MANUTENÇÃO DA ATIVIDADE CELULAR CONDRÓCITA PELOS SINOVIÓCITOS: MODELO IN VITRO DO ESTUDO PARA OSTEOARTRITE EM HUMANOS.

Pesquisador: Diego Aguiar

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 08663912.3.0000.5273

Instituição Proponente: Instituto Nacional de Traumatismo - Ortopedia / INTO / SAS/ MS - RJ

Patrocinador Principal: Instituto Nacional de Traumatismo - Ortopedia / INTO / SAS/ MS - RJ

DADOS DA NOTIFICAÇÃO

Tipo de Notificação: Outros

Detalhe: Adendo

Justificativa: Para melhor analisarmos os mecanismos moleculares da artrose é necessário a

Data do Envio: 10/03/2014

Situação da Notificação: Parecer Consubstanciado Emitido

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 573.269

Data da Relatoria: 26/03/2014

Apresentação da Notificação:

Adequado.

Objetivo da Notificação:

Adendo bem formulado em relação ao estudo original.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não proporciona riscos.

Comentários e Considerações sobre a Notificação:

Pertinente e relevante.

Endereço: Avenida Brasil, nº 500
Bairro: São Cristóvão **CEP:** 20.940-070
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2134-5000 **Fax:** (21)2134-5228 **E-mail:** cep.into@into.saude.gov.br

INSTITUTO NACIONAL DE
TRAUMATO - ORTOPEDIA /
INTO / SAS/ MS



Continuação do Parecer: 573.269

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequado.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem inadequações

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

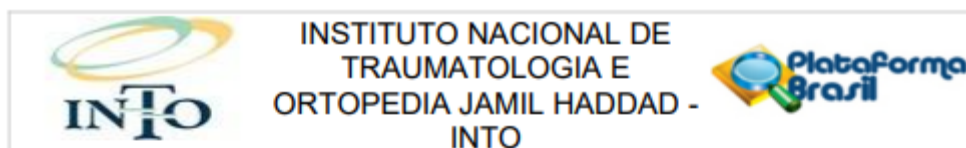
Considerações Finais a critério do CEP:

RIO DE JANEIRO, 28 de Março de 2014

Assinador por:
Marisa Peter Silva
(Coordenador)

Endereço: Avenida Brasil, nº 500
Bairro: São Cristóvão CEP: 20.940-070
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2134-5000 Fax: (21)2134-5228 E-mail: cep.int@into.saude.gov.br

ANEXO C – Aprovação pelo CEP/INTO adendo ao projeto original (coleta do material de descarte dos pacientes com osteoartrite)



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Isolamento e expansão de células-tronco mesenquimais humanas derivadas de medula óssea no Centro de Tecnologia Celular do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia (INTO)

Pesquisador: Maria Eugênia Leite Duarte

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 41660415.3.0000.5273

Instituição Proponente: Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia / INTO / SAS/ MS - RJ

Patrocinador Principal: FUN CARLOS CHAGAS F. DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - FAPERJ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.735.922

Apresentação do Projeto:

Adequada aos interesses do instituto.

Objetivo da Pesquisa:

***Objetivo Primário:**

O objetivo do projeto é estabelecer uma rotina para a produção de células-tronco mesenquimais humanas em condições GMP (good manufacturing practice) e estabelecidas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (RDC 9/ ANVISA) no Centro de Tecnologia Celular (CTC) no Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia – MS/INTO. O Centro deve possibilitar o isolamento, expansão e armazenamento de células-tronco mesenquimais humanas voltadas para utilização pré-clínica e clínica, desenvolvidas nesta instituição e/ou em instituições colaboradoras, através de procedimentos de alta qualidade e segurança.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

***Riscos:**

- Não existe nenhum risco previsível envolvido no estudo. Este estudo não mudará e nem afetará de maneira nenhuma o tratamento do participante de pesquisa. No entanto, cabe ressaltar que há

Endereço: Avenida Brasil, nº 500
Bairro: São Cristóvão **CEP:** 20.940-070
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2134-5000 **Fax:** (21)2134-5228 **E-mail:** cep.into@into.saude.gov.br

riscos associados à cirurgia e anestesia, que o próprio já experimentaria normalmente, mesmo se não estivesse participando do estudo.

***Benefícios:**

- O estudo desenvolvido permitirá o estabelecimento de procedimentos e protocolos padrão para o isolamento e expansão de células-tronco mesenquimais humanas in vitro compatíveis com futura aplicação em testes pré-clínicos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A terapia celular com células-tronco mesenquimais é vista mundialmente como uma estratégia promissora para o desenvolvimento de novos protocolos terapêuticos na área da medicina regenerativa. Essas células possuem alta capacidade proliferativa e potencial de diferenciação em osteoblastos, adipócitos e condrócitos. Além disso, as células-tronco mesenquimais podem ser facilmente isoladas a partir da medula óssea e

subsequentemente expandidas in vitro. Na área ortopédica, as células-tronco mesenquimais vêm sendo exploradas em modelos animais para osteogênese imperfeita, pseudoartrose e consolidação de fraturas ósseas, estando testes clínicos já em andamento. Visto que em geral são utilizados de 1 a 10 milhões de células por quilograma (Kg) de peso corporal do paciente receptor e dada a raridade dessas células na medula óssea (0,01-0,0001% das células nucleadas), a expansão dessas células in vitro após seu isolamento por pelo menos algumas semanas é indispensável antes do transplante. O Centro de Tecnologia Celular (CTC) do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia (INTO) conta com espaço físico adequado à resolução RDC9 emitida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que dispõe sobre o funcionamento de CTC para fins de pesquisa clínica e terapia. Logo, o objetivo desse projeto é estabelecer uma infraestrutura para a produção de células-tronco mesenquimais humanas em condições GMP (good manufacturing practice) e estabelecidas pela RDC 9/ ANVISA. A logística dos procedimentos realizados no CTC/INTO compreenderá as seguintes fases: seleção do conector do material biológico e coleta do material, isolamento das células, expansão in vitro, testes de segurança e de qualidade, seleção de células qualificadas e, por último, criopreservação. Para certificar a qualidade das células que foram manipuladas ex vivo serão realizadas análises de fenotipagem celular por citometria de fluxo, integridade do cariótipo, potencial de diferenciação adipogênico, condrogênico e osteogênico e testes microbiológicos para detecção de bactérias,

Endereço: Avenida Brasil, nº 500		CEP: 20.940-070
Bairro: São Cristóvão		
UF: RJ	Município: RIO DE JANEIRO	
Telefone: (21)2134-5000	Fax: (21)2134-5228	E-mail: cep.into@into.saude.gov.br

endotoxinas e micoplasma. Através do estabelecimento de protocolos operacionais padrões, o Centro deve possibilitar a produção de células-tronco mesenquimais humanas compatíveis com a utilização pré-clínica e clínica, através de procedimentos de alta qualidade e segurança.

Além dos testes citados a presente emenda inclui as seguintes avaliações: citotoxicidade, genotoxicidade (Micronúcleos), Live and Dead e metaboloma. Conforme descrito no projeto todos estes novos testes serão realizados nas amostras já coletadas e no INTO, visto que a emenda não contempla a inclusão/participação de outra instituição no projeto.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

*TCLE

-Todas as adequações solicitadas foram realizadas.

Recomendações:

Sugere-se atualizar o cronograma com os novos prazos para as técnicas incluídas na emenda.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

*Emenda

Além dos testes citados a presente emenda inclui as seguintes avaliações: citotoxicidade, genotoxicidade (Micronúcleos), Live and Dead e metaboloma. Conforme descrito no projeto todos estes novos testes serão realizados nas amostras já coletadas e no INTO, visto que a emenda não contempla a inclusão/participação de outra instituição no projeto.

Considerações Finais a critério do CEP:

Senhor pesquisador, de acordo com o constante da Resolução CNS nº 466 de 2012, faz-se necessário apresentar ao CEP/INTO, através da Plataforma Brasil, a cada 06 (seis) meses o relatório de acompanhamento de sua pesquisa. Além disso, após a conclusão da pesquisa, deverá ser submetido na Plataforma Brasil, através da Notificação, o Relatório Final e a pesquisa concluída para apreciação do CEP/INTO.

Informamos que qualquer alteração realizada no protocolo de pesquisa aprovado deverá ser submetida à apreciação do CEP/INTO através do envio de uma emenda utilizando a Plataforma Brasil.

Endereço: Avenida Brasil, nº 500	CEP: 20.940-070
Bairro: São Cristóvão	
UF: RJ	Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2134-5000	Fax: (21)2134-5228
	E-mail: cep.into@into.saude.gov.br



INSTITUTO NACIONAL DE
TRAUMATOLOGIA E
ORTOPEDIA JAMIL HADDAD -
INTO



Continuação do Parecer: 3.735.922

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_792241 E1.pdf	19/11/2019 17:34:12		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	19/11/2019 17:32:28	Maria Eugênia Leite Duarte	Aceito
Outros	respostascep.docx	19/11/2019 17:32:04	Maria Eugênia Leite Duarte	Aceito
Outros	ementa.docx	18/10/2019 11:35:20	Maria Eugênia Leite Duarte	Aceito
Folha de Rosto	folha de rosto.pdf	11/02/2015 01:14:37		Aceito
Outros	CV Maria Eugenia Leite Duarte.pdf	28/01/2015 13:01:16		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto final.pdf	28/01/2015 12:59:49		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIO DE JANEIRO, 29 de Novembro de 2019

Assinado por:
Eduardo Branco de Sousa
(Coordenador(a))

Endereço: Avenida Brasil, nº 500

Bairro: São Cristóvão

CEP: 20.940-070

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)2134-5000

Fax: (21)2134-5228

E-mail: cep.int@into.saude.gov.br

INSTITUTO NACIONAL DE
TRANSFORMAÇÃO E CULTURA

(De acordo com as normas da Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 441 de 12/5/2011 e nº 466 de 12/12/2012)

Quais são os objetivos dessa pesquisa?

O benefício relacionado com a sua participação é a contribuição no desenvolvimento de metodologias para a produção de células-tronco mesenquimais humanas cultivadas em laboratório em condições de segurança e qualidade compatíveis com futuro uso clínico.

Além dos descartes ósseos gerados na cirurgia de artroplastia do quadril, precisaremos de algumas informações pessoais como a sua data de nascimento, endereço, telefone e algumas informações sobre doenças que você ou seus familiares tenham ou tiveram no passado. Estas informações serão sigilosas e em nenhum momento sua identidade será revelada. Você tem o direito de não responder às perguntas caso não se sinta à vontade para responder, por qualquer razão, sem necessidade de se justificar.

58



MINISTÉRIO DA SAÚDE
SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE
INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA JAMIL HADDAD

Esclarecimentos e desistências

Sempre que achar necessário, para esclarecimento de qualquer dúvida, você poderá contatar a Dra. Maria Eugênia Duarte (fone: 21 2134 5498) ou Dra. Rafaela Sartore (fone: 21 2134 5499).

Em caso de dúvida ou preocupação quanto aos seus direitos como participante do projeto, você poderá entrar em contato direto com o Comitê de Ética em Pesquisa local, por meio do telefone 21 2134 5454, endereço eletrônico cep.into@into.saude.gov.br ou no endereço Avenida Brasil, 500, 9º andar, COENP - Cep: 20940-070 - Rio de Janeiro - RJ.

Termo de Assinaturas

Somente assine este documento, se consentir integralmente com os termos deste. Por favor, rubrique cada uma das folhas deste documento.

Declaro estar ciente das informações recebidas e prestadas, tendo lido (ou o documento foi lido para mim), compreendido e assinalado as opções que correspondem à minha vontade. Recebi neste ato uma das duas vias deste documento, datada e assinada por mim e pelo responsável do projeto. A outra via permanecerá arquivada na Divisão de Pesquisa do INTO.

Rio de Janeiro, 28 de Jan de 2016

[Assinatura manuscrita do voluntário]

Assinatura do voluntário

[Assinatura manuscrita do pesquisador responsável]

Pesquisador responsável