



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE MEDICINA  
NUCLEO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE  
MEDICAMENTOS - NPDM  
LABORATÓRIO DE ONCOLOGIA EXPERIMENTAL



## LAUDO TÉCNICO DO ESTUDO DA FOSFOETANOLAMINA SINTÉTICA

AVALIAÇÃO DA POSSÍVEL ATIVIDADE ANTICÂNCER DA  
FOSFOETANOLAMINA SINTÉTICA (FS) NO CARCINOSSARCOMA 256 DE  
WALKER

Código do Estudo: LOE 02/16

Data: 15/05/2016

PESQUISADOR: Prof. Manoel Odorico de Moraes Filho, MD, PhD

[odorico@ufc.br](mailto:odorico@ufc.br)

### TÉCNICOS:

Andréa Felinto Moura - [andreafmoura@gmail.com](mailto:andreafmoura@gmail.com)

Francisco Stefânio Barreto - [franciscostefanio@hotmail.com](mailto:franciscostefanio@hotmail.com)

Wesley Lyevertton Correia Ribeiro - [wesleylyeverton@yahoo.com.br](mailto:wesleylyeverton@yahoo.com.br)

Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos

Rua Coronel Nunes de Melo, 1000

Rodolfo Teófilo

Fortaleza – Ceará – Brasil

C EP: 60.430-275

(85) 999893459 (85) 3366-8201

## AUTENTICAÇÃO DO RELATÓRIO

Versão: 15/05/2016

Cópia N.º 01

*Declaro que todos os dados contidos neste relatório são acurados, completos, verdadeiros e correspondem aos obtidos durante o estudo coordenado pelo Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará.*

**Prof. Manoel Odorico de Moraes Filho, MD, PhD**

**Diretor**

***Laboratório de Oncologia Experimental***

**Núcleo de Pesquisa e de Desenvolvimento de Medicamentos**

**Faculdade de Medicina - Universidade Federal do Ceará**

**CEP 60430-275 Fortaleza – Ceará**

**Fone: 85-3366-8201 / 999893459**

**E-mail: odorico@ufc.br**

**Data:** \_\_\_\_\_

## INTRODUÇÃO

A existência de vários tipos de tumores com diferentes variações histopatológicas, genéticas e epigenéticas, e suas consequências clínicas, dificultam o entendimento desta doença, do mecanismo de ação dos quimioterápicos e a criação de novas terapias. Com isso, diferentes modelos experimentais têm sido desenvolvidos, a fim de contribuir para o avanço no estudo da fisiopatologia do câncer e na descoberta de novos fármacos com potencial antitumoral (FERREIRA, ADEGA, CHAVES, 2013).

A utilização de ratos e camundongos convencionais ou geneticamente modificados como instrumentos de estudos biológicos ocorre de modo intenso na oncologia experimental para a compreensão do câncer humano. As linhagens desses animais são padronizadas, dotadas de características conhecidas, e apresentam similaridades genéticas e fisiológicas com os seres humanos, o que torna possível fazer inferências a respeito da fisiopatologia do câncer e, assim, lançar novas abordagens terapêuticas (HANN & BALMAIN, 2001; PANTALEAO & LUCHS, 2010).

O carcinossarcoma 256 de Walker, modelo tumoral utilizado no presente estudo, foi descoberto por George Walker em 1928, a partir de um adenocarcinoma de mama em rata. Este tumor é frequentemente utilizado em estudos de oncologia experimental por se tratar de uma neoplasia bem caracterizada e por possuir rápida proliferação celular. Além disso, o carcinossarcoma de Walker é facilmente mantido em laboratório por meio de inoculações em ratos da linhagem Wistar, sendo, portanto, eficaz na descoberta de novas drogas anticancerígenas (EARLE, 1935; MORAES et al., 2000).

## **OBJETIVOS**

### **Geral:**

Avaliar a possível atividade anticâncer da Fosfoetanolamina Sintética no Carcinossarcoma 256 de Walker.

### **Específicos:**

Avaliar os parâmetros bioquímicos e hematológicos dos animais estudados.

Realizar o estudo histopatológico dos principais órgãos dos animais estudados.

## **MÉTODOS**

### **Local da Pesquisa**

O trabalho foi realizado no Laboratório de Oncologia Experimental do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da Universidade Federal do Ceará.

### **Obtenção e preparo da Fosfoetanolamina Sintética**

A Fosfoetanolamina Sintética utilizada no experimento foi fornecida pelo Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI).

Para verificação de um possível efeito antitumoral *in vivo*, a Fosfoetanolamina Sintética foi pesada, diluída em soro fisiológico 0,9% para uma concentração de 1g/kg de animal e, em seguida, sonicada por 5 minutos. O procedimento foi realizado diariamente e a dose foi ajustada de acordo com a média do peso diário dos animais. A dose utilizada para o estudo foi determinada nos estudos de toxicologia pré-clínica realizados pelo Centro de Inovação e Ensaios Pré-clínicos (CIEnP).

## **Obtenção e Manutenção dos Animais**

Foram utilizados 45 animais (*Rattus norvegicus*, linhagem Wistar) machos, fornecidos pelo Biotério do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos da UFC, com idade de 6 semanas, pesando em média 100 g, sendo distribuídos aleatoriamente em três grupos de 15 animais cada (tratamento, controle positivo e controle negativo).

Cada subgrupo de 5 animais foi acondicionado em gaiolas de polisulfona medindo 44x31x21 cm, com tampas contendo filtros microisoladores, comedouro e encaixe para bebedouro e mantidas em racks com sistema de exaustão individualizado. A troca das gaiolas foi realizada duas vezes por semana em estação de troca/cabine de biossegurança.

Durante todo o experimento, os animais permaneceram em uma sala experimental com condições controladas de temperatura ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ), ar filtrado, com fotoperíodo de 12 horas de claro/escuro e umidade relativa de 60%, onde tiveram acesso à água potável filtrada e ração comercial em pellets (Nuvilab®) *ad libitum*. Os animais foram mantidos em cama com maravalha irradiada, sendo aclimatados 72 horas antes do início do experimento.

Todos os critérios de alimentação e ambiência atenderam às recomendações do *National Research Council* e do *National Institute of Health - USA*. A manutenção e manipulação dos animais durante a execução do projeto, os procedimentos anestésicos, eutanásias e descarte das carcaças foram realizados em consonância com as resoluções do Conselho Nacional de Experimentação Animal – CONCEA (Número de Protocolo Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA: 36/16) e supervisionados por um profissional médico veterinário.

## **Inoculação do Carcinossarcoma 256 de Walker**

O tumor de Walker vem sendo mantido no Laboratório de Oncologia Experimental onde é repicado semanalmente, através de inoculações contendo  $10^6$  células viáveis/ml, com um índice de pega de 100%. Para o experimento com

a FS, 1 mL da suspensão de células tumorais retiradas do animal doador contendo  $10^6$  células viáveis por mL, foi inoculadas por via subcutânea na região axilar de cada animal dos 3 grupos experimentais.

### **Procedimento Experimental**

Após a inoculação os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos de 15 animais cada. Vinte e quatro horas após a inoculação, iniciou-se o tratamento com 1 mL de FS (1 g/kg de animal) por via oral. A Ciclofosfamida (25 mg/kg) foi utilizada como controle positivo por via intraperitoneal, e o controle negativo recebeu 1 mL de soro fisiológico 0,9% também por via oral. O tratamento foi realizado durante 10 dias consecutivos e as doses foram ajustadas diariamente de acordo com os pesos dos animais.

A progressão do crescimento tumoral foi acompanhada por meio da mensuração do tamanho do tumor, utilizando paquímetro digital, a partir sétimo dia do experimento, quando o tumor já era mensurável em todos os animais dos grupos, até o décimo primeiro dia (último dia de tratamento). Para calcular o volume tumoral ( $\text{mm}^3$ ) foi utilizada a seguinte fórmula (STEEL, 1977):

$$\text{Volume do tumor (mm}^3\text{)} = (D \times d^2)/2$$

Onde:

D = medida do diâmetro maior (mm).

d = medida do diâmetro menor (mm).

Dez dias após o início do tratamento, no décimo primeiro dia do experimento, os animais foram anestesiados com Xilazina (10 mg/kg) e Ketamina (90 mg/kg) e cerca de 3 mL de sangue foram coletados da artéria abdominal para avaliação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos. Em seguida, os animais foram eutanasiados por overdose anestésica para a retirada e pesagem do tumor, fígado, baço, rins, estômago, pulmão e coração.

O percentual de crescimento tumoral (IT) foi calculado pela fórmula:

$$IT (\%) = \{[(A-B)/A] \times 100\} - 100$$

Onde:

A = média do peso dos tumores do grupo controle.

B = média do peso dos tumores nos animais tratados.

### **Análise Estatística**

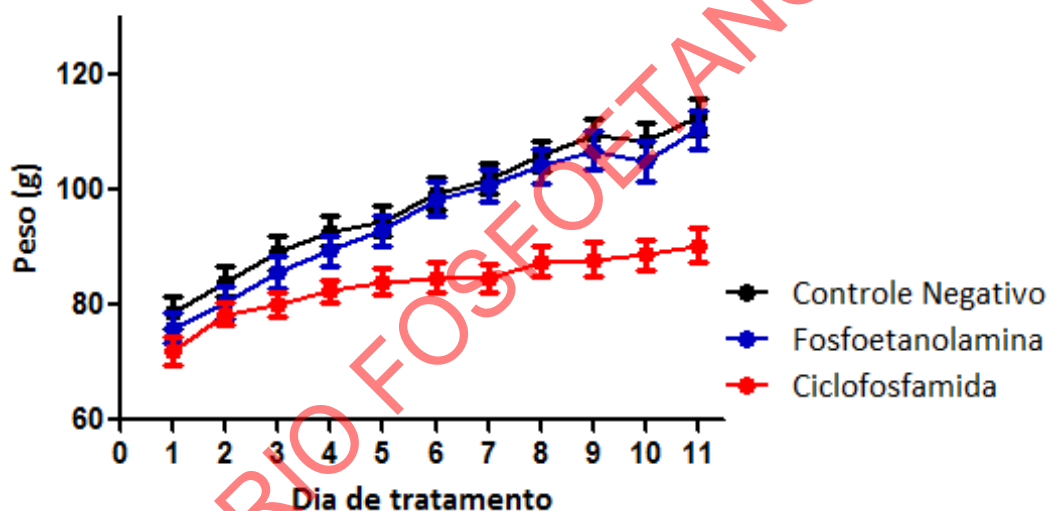
Os dados foram analisados a partir da média e do erro padrão da média dos experimentos. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida de teste de Dunnett, com auxílio do programa Graph Pad Prism 5.0. Para todos os grupos considerou-se estatisticamente significativo quando  $p < 0,05$ .

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

## RESULTADOS

A evolução ponderal dos animais foi avaliada diariamente. De acordo com a **Figura 1**, foi observado que durante o tratamento com a FS (1 g/kg) os animais tiveram ganho ponderal semelhante aos animais do controle negativo, ganho este não observado nos animais tratados com Ciclofosfamida (25 mg/kg).

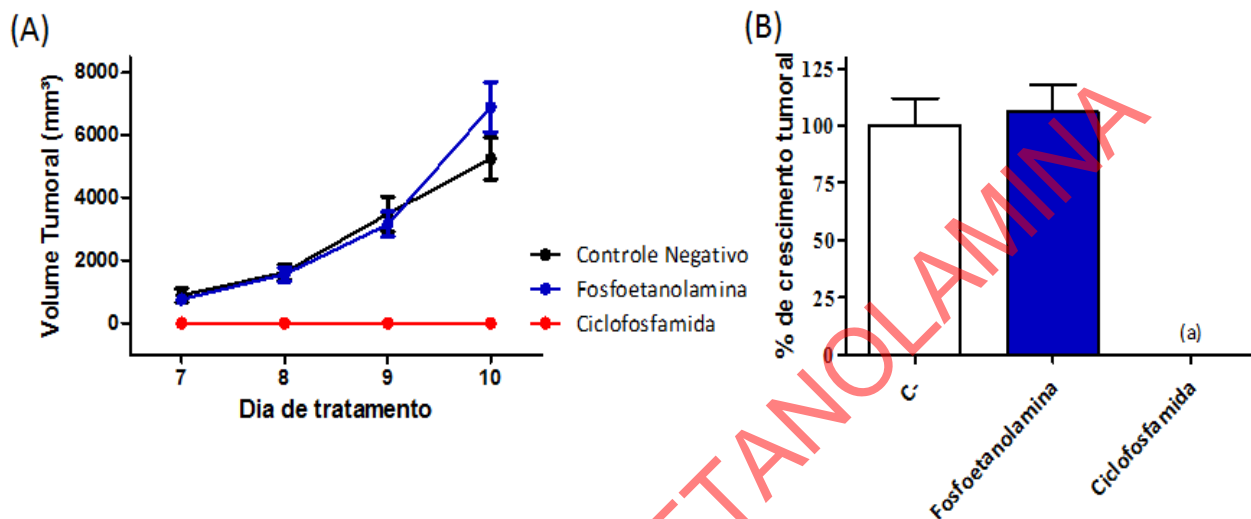
**Figura 1.** Curva de evolução ponderal durante o tratamento com a Fosfoetanolamina sintética (FS) (1g/kg/dia) administrada por via oral. Ciclofosfamida (25 mg/kg/dia) foi utilizada como controle positivo, e o soro fisiológico 0,9% foi utilizado como controle negativo.



A partir do cálculo do volume ( $\text{mm}^3$ ), foi possível observar que a cinética de crescimento do tumor nos animais tratados com FS foi semelhante ao controle negativo, enquanto que os animais tratados com Ciclofosfamida não apresentaram ganho de volume tumoral (**Figura 2A**). Após a eutanásia, pôde-se perceber, com base no peso dos tumores, que não houve diferença estatística significativa ( $p < 0,0001$ ) entre os animais tratados com FS quando comparado com o controle negativo (**Figura 2B**).



**Figura 2.** Efeito da Fosfoetanolamina Sintética (FS) na dose de 1g/kg/dia, administrada por via oral sobre o crescimento tumoral em ratos Wistar inoculados com o Carcinossarcoma 256 de Walker. Ciclofosfamida na dose de 25 mg/kg administrada por via intraperitoneal foi utilizada como controle positivo, e soro fisiológico 0,9% na dose de 1 mL por via oral foi utilizado como controle negativo (C-). 'A' representa a curva de evolução do volume tumoral ( $\text{mm}^3$ ) mensurado por paquímetro digital a partir do sétimo dia de tratamento até o décimo dia de tratamento; 'B' representa o percentual de crescimento tumoral após a eutanásia.



Os valores correspondem à média  $\pm$  erro padrão da média. (a)  $p < 0,0001$  comparado com o controle negativo por ANOVA seguida pelo teste *post hoc* de Dunnett.

Na avaliação hematológica, o grupo Fosfoetanolamina Sintética apresentou aumento significativo apenas na contagem de linfócitos em relação ao controle negativo ( $p < 0,05$ ). Ademais, a contagem de leucócitos, linfócitos e granulócitos no grupo tratado com Ciclofosfamida foi significativamente inferior ao controle negativo ( $p < 0,05$ ), estando esses valores inferiores aos padrões estabelecidos para a espécie (MITRUKA & RAWNSLEY, 1977; MELO et al. 2012).

**Tabela 1.** Avaliação dos parâmetros hematológicos de ratos Wistar transplantados com tumor de Walker 256 após 10 dias de tratamento com fosfoetanolamina (1 g/kg). Ciclofosfamida (25 mg/kg) foi utilizada como controle positivo e o soro fisiológico 0,9%, foi utilizado como controle negativo.

Parâmetro (unidade)	Controle Negativo	Ciclofosfamida	Fosfoetanolamina
Leucócitos (10 <sup>9</sup> /L)	16,63 ± 4,45	0,64 ± 0,1 <sup>a</sup>	18,88 ± 2,33
Linfócitos (10 <sup>9</sup> /L)	4,73 ± 0,55	0,36 ± 0,04 <sup>a</sup>	7,01 ± 0,34 <sup>a</sup>
Monócitos (10 <sup>9</sup> /L)	1,38 ± 0,24	0,03 ± 0,00	1,8 ± 0,66
Granulócitos (10 <sup>9</sup> /L)	9,82 ± 3,41	0,42 ± 0,04 <sup>a</sup>	11,34 ± 1,4
RBC (10 <sup>12</sup> /L)	6,12 ± 0,64	6,2 ± 0,11	5,57 ± 0,12
HGB (g/dL)	9,57 ± 1,11	12,15 ± 0,3 <sup>a</sup>	11,02 ± 0,26
HCT (%)	39,28 ± 1,84	42,05 ± 0,76	37,7 ± 0,85
VCM (fL)	67,44 ± 0,47	67,83 ± 0,38	67,64 ± 0,38
MCH (pg)	18,84 ± 0,56	20,08 ± 0,15 <sup>a</sup>	19,52 ± 0,13
MCHC (%)	27,97 ± 0,86	29,59 ± 0,25 <sup>a</sup>	28,95 ± 0,20
RDWc (%)	14,95 ± 0,25	14,67 ± 0,16	15,54 ± 0,18
PLT (10 <sup>9</sup> /L)	835,6 ± 47,69	501,8 ± 16,57 <sup>a</sup>	938,4 ± 35,28
PCT (%)	0,58 ± 0,03	0,26 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,61 ± 0,03
VPM (fL)	6,6 ± 0,1	6,33 ± 0,08	6,83 ± 0,23
PDWc (%)	33,78 ± 0,3	32,75 ± 0,4	34,35 ± 0,56

Contagem de glóbulos vermelhos (RBC); Hemoglobina (HGB); Hematócrito (HCT); Volume Corpuscular Médio (VCM); Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (MCHC); Amplitude de distribuição eritrocitária (RDWc); Plaquetas (PLT); Procalcitonina (PCT); Volume Plaquetário Médio (VPM); Índice de Anisocitose Plaquetária (PDWc).

Os valores correspondem à média ± erro padrão da média de pelo menos 10 animais por grupo. (a)  $p < 0,05$  comparado com o controle negativo por ANOVA seguida pelo teste *post hoc* de Dunnett.

Não foi verificada qualquer alteração significativa dos parâmetros bioquímicos dos animais tratados com fosfoetanolamina sintética quando comparados com o controle negativo. À exceção dos parâmetros de proteína total, ácido úrico, ureia e glicose dos animais tratados com Ciclofosfamida, todos os demais foram significativamente diferentes em relação ao controle negativo

( $p < 0,05$ ). Os valores para glicose em todos os grupos foram superiores aos valores de referência estabelecidos por Lima e colaboradores (2014). Este achado pode ser explicado devido a ação hiperglicêmica do anestésico Ketamina utilizado na indução anestésica dos animais, conforme demonstrado por Brăslășu e colaboradores (2007).

**Tabela 2.** Avaliação dos parâmetros bioquímicos de ratos Wistar transplantados com tumor de Walker 256 após 10 dias de tratamento com fosfoetanolamina (1 g/kg). Ciclofosfamida (25 mg/kg) foi utilizada como controle positivo e o soro fisiológico 0,9%, foi utilizado como controle negativo.

Parâmetro (unidade)	Controle Negativo	Ciclofosfamida	Fosfoetanolamina
Albumina	2,67 ± 0,12	4,20 ± 0,14 <sup>a</sup>	2,43 ± 0,12
Proteína Total	6,86 ± 0,19	6,75 ± 0,23	6,61 ± 0,29
BD (mg/dl)	0,07 ± 0,005	0,05 ± 0,002 <sup>a</sup>	0,07 ± 0,005
BT (mg/dL)	0,04 ± 0,01	0,27 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,12 ± 0,07
Triglicérides (mg/dL)	145,9 ± 14,91	57,69 ± 6,77 <sup>a</sup>	114,3 ± 3,21
Colesterol (mg/dL)	51,45 ± 1,79	73 ± 3,82 <sup>a</sup>	52,33 ± 3,19
Ácido úrico	1,77 ± 0,14	2,39 ± 0,41	2,04 ± 0,20
ALT (U/L)	35 ± 2,26	27 ± 1,08 <sup>a</sup>	37,25 ± 2,68
AST (U/L)	207,7 ± 6,7	80 ± 7,1 <sup>a</sup>	191,6 ± 10,46
Amilase (U/L)	249 ± 8,1	311,8 ± 10,93 <sup>a</sup>	237,1 ± 9,71
Fosfatase	373,8 ± 17,82	164,5 ± 10,35 <sup>a</sup>	407,3 ± 16,6
Gama GT	3,81 ± 0,48	1,58 ± 0,28 <sup>a</sup>	3,58 ± 0,52
Creatinina (mg/dL)	0,31 ± 0,02	0,24 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,33 ± 0,016
Ureia (mg/dL)	45,18 ± 2,59	53,80 ± 3,66	51,25 ± 3,56
Glicose (mg/dL)	280,9 ± 19,62	305,4 ± 9,93	273,3 ± 17,92

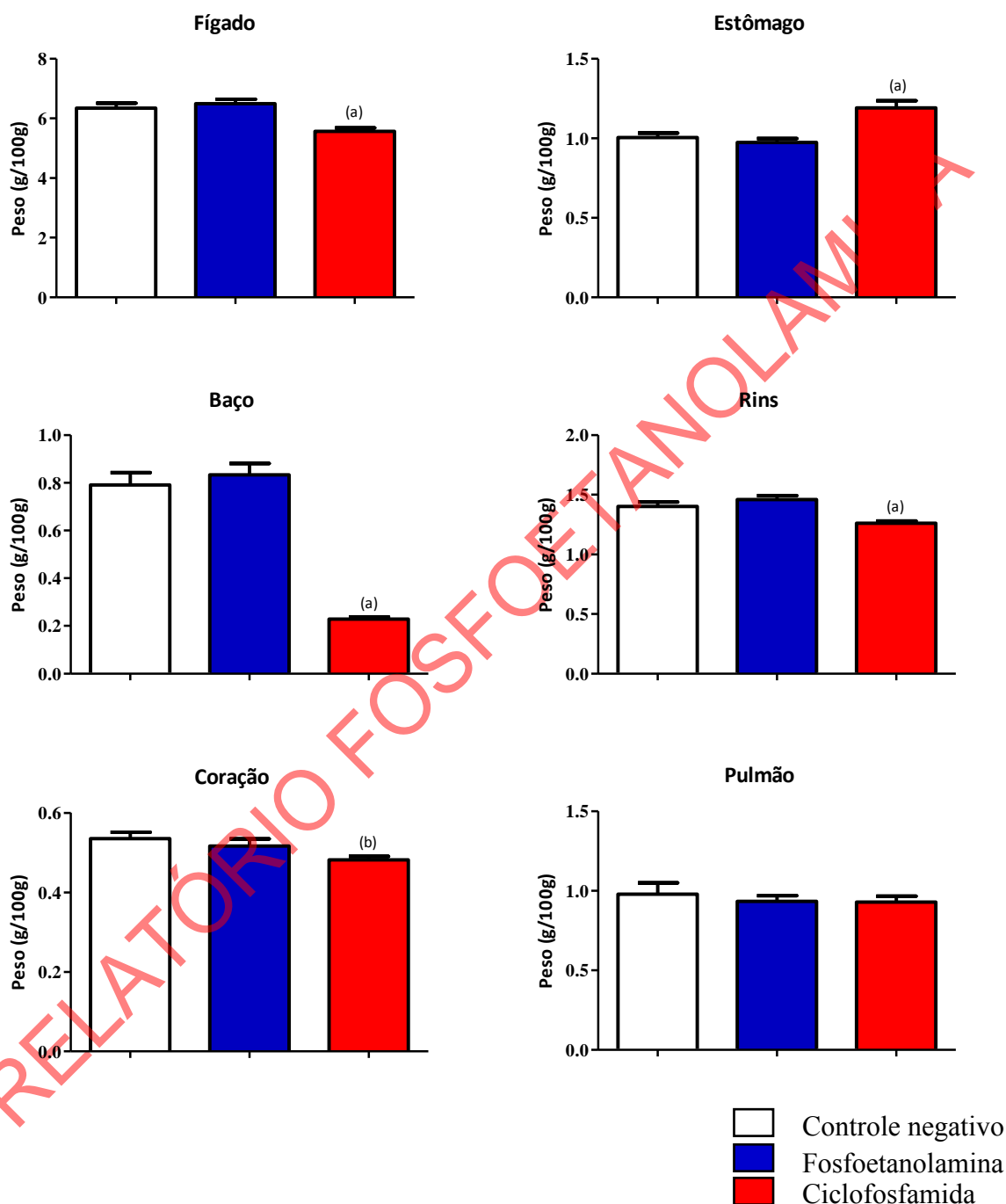
Bilirrubina Total (BT); Bilirrubina Direta (BD); alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST).

Os valores correspondem à média ± erro padrão da média de pelo menos 10 animais por grupo. (a)  $p < 0,05$  comparado com o controle negativo por ANOVA seguida pelo teste *post hoc* de Dunnett.

Alterações macroscópicas e microscópicas em órgãos de interesse (fígado, estômago, baço, rins, pulmão e coração) foram avaliadas após a eutanásia dos animais e retirada dos órgãos. Não foram encontrados achados macroscópicos relevantes. A avaliação histopatológica (microscópica) está em curso e complementará os resultados apresentados na **Figura 3**. Todos os órgãos foram pesados, sendo possível observar que não houve alterações no peso relativo úmido dos órgãos nos animais tratados com Fosfoetanolamina sintética quando comparado com o controle negativo. A Ciclofosfamida reduziu de forma significativa o peso relativo úmido do fígado, baço, rins ( $p < 0,0001$ ) e coração ( $p < 0,05$ ); e aumentou o peso relativo do estômago ( $p < 0,0001$ ) (**Figura 3**).

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

**Figura 3.** Efeito da Fosfoetanolamina Sintética (FS) (1g/kg/dia) administrada por via oral sobre a massa dos órgãos dos ratos Wistar (g/100g de massa corpórea) transplantados com tumor de Walker 256, após 10 dias de tratamento consecutivo com fosfoetanolamina sintética (1 g/kg). Ciclofosfamida (25 mg/kg) foi utilizada como controle positivo, e o soro fisiológico 0,9%, foi utilizado como controle negativo.



Os valores correspondem à média  $\pm$  desvio padrão da média de pelo menos 14 animais por grupo. (a)  $p < 0,0001$ ; (b)  $p < 0,05$ , comparado com o controle negativo por ANOVA seguida pelo teste *post hoc* de Dunnett.

O estudo histopatológico dos órgãos evidenciou metástases pulmonares nos animais do grupo controle negativo (3/15) e no grupo tratado com a FS (7/15) como mostrado na tabela 3.

Tabela3: Avaliação histopatológica da presença de metástase pulmonar do tumor de Walker após 10 dias de tratamento com Fosfoetanolamina Sintética (1g/Kg), Soro Fisiológico (0,5mL) e Ciclofosfamida (25mg/Kg).

Grupos experimentais	Metástase pulmonar	
	Sim	Não
(n=15)/grupo		
Controle negativo (Soro Fisiológico)	3	12
Controle positivo (Ciclofosfamida 25mg/Kg)	0	15
Fosfoetanolamina Sintética (1g/Kg)	7	8

## CONCLUSÃO

A partir do estudo realizado para verificação da possível atividade inibidora do crescimento tumoral no Carcinossarcoma 256 de Walker, observou-se que a Fosfoetanolamina Sintética **não apresentou efeito inibidor** nos animais tratados com a dose de 1g/Kg de peso corporal por dia, administrada durante 10 dias consecutivos.

## REFERÊNCIAS

AMERICAN CANCER SOCIETY. **What is cancer?** Disponível em: <<http://www.cancer.org/cancer/cancerbasics/what-is-cancer>>. Acesso em: 28 out. 2014.

BRĂSLAȘU, T.E.D., BRĂDĂIAN, C., CORNILĂ, M. SĂVULESCU, I., COJMĂLEAȚĂ, R., BRĂSLAȘU, M.C. Normal blood glucose in white wistar rat and its changes following anesthesia. **Lucrări științifice Medicină Veterinară** VOL. XL, 2007.

EARLE, W.R. A study of the Walker rat mammary Carcinoma 256, in vivo and in vitro. **Am J Cancer** 1935; vol. 24; p. 566-612.

FERREIRA, D.; ADEGA, F.; CHAVES, R. The importance of cancer cell lines as in vitro models in cancer methylome analysis and anticancer drugs testing. **Oncogenomics and Cancer Proteomics - Novel Approaches in Biomarkers Discovery and Therapeutic Targets in Cancer**, Dr. Cesar Lopez (Ed.), ISBN: 978-953-51-1041-5, InTech.

HANN B, BALMAIN A. Building validated mouse models of human cancer. **Curr Opin Biol**, 13(6):778-84, 2001.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; ASTER, J.C. **Robbins e Contran. Patologia: bases patológicas da doença**. 8 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

LIMA, C.M. A., LIMA, K., MELO, M.G.D., DÓRIA, G.A.A., LEITE, B.L.S., SERAFINI, M.R.; ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R.L.C., ARAÚJO, A.A.S. **Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (Rattus norvegicus linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes**. **Scientia Plena**. v. 10, n. 03 , 2014

MELO, M.G.D.; G. A. A. Dória; Serafini, M.R.; Araújo, A. A. S. **Valores de referência Hematológicos e Bioquímicos de Ratos (Rattus norvegicus linhagem Wistar) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Sergipe**. **Scientia Plena** 8, 049903 (2012).

MITRUKA, B.M.; RAWNSLEY, H.M. **Clinical Biochemical and Hematological Reference Values in Normal Experimental Animals**. New York, Masson Publishing, 272, 1977.

MORAES, Sandra Pedroso de et al. Modelo experimental de tumor de Walker. **Acta Cir. Bras.** vol.15, n.4, 2000.

PANTALEÃO, C.; LUCHS, A. Câncer e modelos experimentais de tumores murinos. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, [S.l.], v. 69, n. 4, p. 439-445, 2010.

PINHO, M. **Biologia Molecular do Câncer: fundamentos para a prática médica**. 1. ed. Revinter Ltda. 2005.

STEEL, G.G. Growth kinetics of tumours. **Clarendon Press**, Oxford, 1977.