



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 SARCOMA 18

Código do Estudo: LOE 03/16

Data: 15/05/2016

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

odorico@ufc.br

TÉCNICOS:

Andréa Felinto Moura – andreafmoura@gmail.com

Francisco Stefânio Barreto – franciscostefanio@hotmail.com

Wesley Lyeverton Correia Ribeiro – 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

O câncer é considerado uma doença complexa de caráter genético e epigenético. É um conjunto de mais de 100 doenças que tem em comum o crescimento desordenado de células mutadas capaz de invadir tecidos e órgãos sadios. Em estimativa feita para o biênio 2016/2017, o INCA considera que o Brasil deverá registrar 596 mil novos casos de câncer, o que deixa claro a relevância na realização de pesquisas em busca do desenvolvimento de novos tratamentos para a doença. 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 novas drogas com potencial antitumoral (FERREIRA, ADEGA, CHAVES, 2013).

Com a utilização de tumores experimentais em ratos e camundongos, o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos, conseguiu, a partir da década de 1950, lançar fármacos antineoplásicos que são utilizados atualmente na clínica oncológica, como os agentes alquilantes, vincristina, vimblastina, taxol, cisplatina e carboplatina (TEICHER, 2011). Dentre os modelos animais utilizados em estudos de oncologia experimental, o Sarcoma 180 ou tumor de Crocker (Columbia University, Nova York) utilizado neste trabalho, é um modelo válido para predizer os efeitos antitumorais de moléculas em fase de testes pré-clínicos, como a Fosfoetanolamina Sintética (FS).

O sarcoma 180 foi primariamente um tumor murinho sólido, indiferenciado, que surgiu espontaneamente na região axilar, sendo a priori classificado como carcinoma mamário. Esse tumor passou por vários transplantes subcutâneos, assumindo a forma sarcomatosa, mantendo-se sem alterações desde então. É facilmente mantido em laboratório através de repicagens subcutâneas, intramusculares ou pela via intraperitoneal, com rápida proliferação nos animais inoculados (HAROLD et al., 1959; SCHABEL, 1977).

OBJETIVO

Geral:

Avaliação da Possível Atividade Anticâncer da Fosfoetanolamina Sintética (FS) no Sarcoma 180.

Específicos:

Avaliar os parâmetros bioquímicos e hematológicos dos animais estudados.

Fazer o estudo histopatológico dos principais órgãos dos animais estudados.

MATERIAIS E 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 1 g/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 camundongos (*Mus musculus*, linhagem Swiss) machos, fornecidos pelo Biotério do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos da UFC, com idade de 6 semanas, pesando em média 30 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 Sarcoma 180

O Sarcoma 180 é mantido na forma ascítica no Laboratório de Oncologia Experimental do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos da UFC, através de repicagens a cada 10 dias, com uma suspensão de 2×10^6 células.

Para o experimento com a FS, as células tumorais foram retiradas por aspiração da cavidade peritoneal do animal doador e, após determinação da viabilidade, diluídas em solução de Ringer lactato contendo 1% de Gentamicina para a concentração final de 4×10^6 células/mL. Posteriormente, 0,5 mL desta solução (2×10^6 células) foram inoculados por via subcutânea na região axilar dos camundongos.

Procedimento experimental

Após a inoculação os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos de 15 animais cada. Vinte e quatro horas após a inoculação das células tumorais, os animais foram tratados diariamente por via oral, com uma solução de Fosfoetanolamina Sintética na concentração de 1g/kg. A Ciclofosfamida foi utilizada como controle positivo, sendo administrada por via intraperitoneal na concentração de 25 mg/kg; o controle negativo recebeu por via oral 0,5 mL de soro fisiológico 0,9%. O tratamento foi realizado durante 10 dias consecutivos e as doses foram ajustadas diariamente de acordo com o peso dos animais, para um volume final de 0,5 mL.

A progressão do crescimento tumoral foi acompanhada por meio da mensuração do tamanho do tumor, utilizando paquímetro digital, a partir do sétimo dia do experimento, quando o tumor tornou-se mensurável em todos os animais dos grupos, até o décimo primeiro dia do experimento (dia da eutanásia). Para calcular o volume tumoral (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, os animais foram anestesiados com Cloridrato de Xilazina (10 mg/kg) e Cloridrato de Cetamina (90 mg/kg), e cerca de 1 mL de sangue foi coletado pela via retro-orbital para avaliação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos. Em seguida, os animais foram eutanasiados por overdose anestésica para avaliação macro e microscópica, e pesagem do tumor, fígado, baço, rins, estômago, pulmão, coração e cérebro.

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.

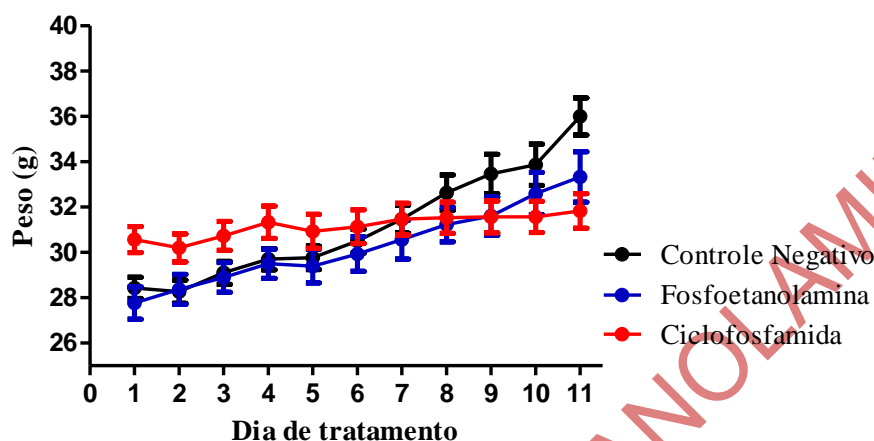
Análise Estatística

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 GraphPad Prism 5.0. Para todos os grupos considerou-se estatisticamente significativo quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

A **figura 1** mostra a evolução ponderal dos animais durante os dias de tratamento com a fosfoetanolamina, mostrando que houve ganho de massa corpórea juntamente com os animais do controle negativo. Na figura, nota-se ainda que os animais do grupo ciclofosfamida não apresentaram ganho real de peso, como nos demais grupos.

Figura 1. Curva de evolução ponderal de camundongos inoculados com tumor Sarcoma 180 durante o tratamento com a Fosfoetanolamina Sintética (FS) (1g/kg/dia) administrada por via oral durante 10 dias consecutivos. Ciclofosfamida (25 mg/kg/dia) foi utilizada como controle positivo e o veículo de diluição da FS, soro fisiológico 0,9%, foi utilizado como controle negativo.

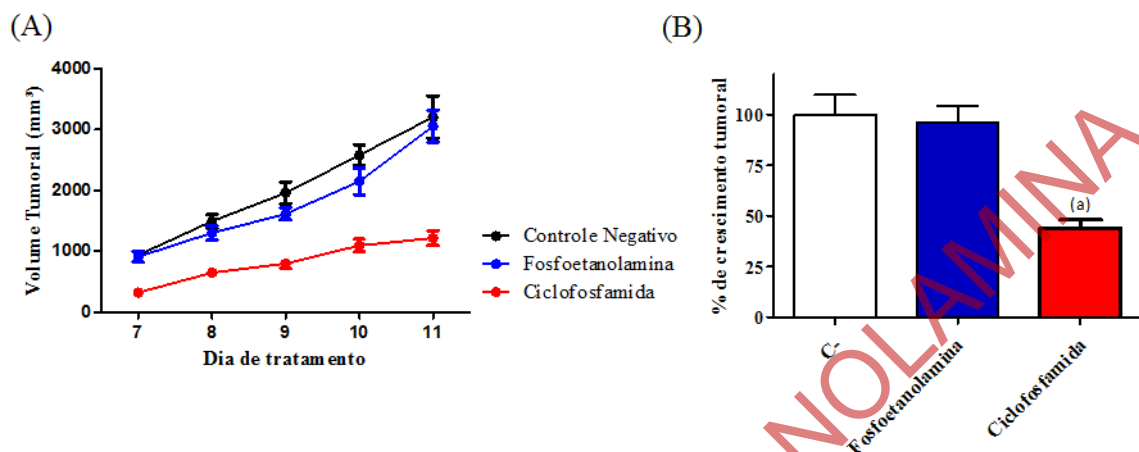


Os valores correspondem à média \pm erro padrão da média de 15 animais por grupo.

A partir do sétimo dia do experimento (quando os tumores apresentaram tamanho mensurável) até o décimo primeiro dia, foi realizada a medição do comprimento e da largura dos tumores utilizando paquímetro digital, para o acompanhamento da progressão do crescimento tumoral. A partir do cálculo do volume tumoral (mm^3) (STEEL, 1977), foi possível observar que a cinética de crescimento do tumor nos animais tratados com Fosfoetanolamina sintética foi semelhante ao controle negativo, enquanto que os animais tratados com Ciclofosfamida apresentaram inibição significativa do volume tumoral quando comparada ao controle negativo (**Figura 2A**).

Após a eutanásia e ressecção cirúrgica dos tumores, pode-se observar, com base na média do peso dos tumores, que não houve diferença estatística ($p < 0,0001$) entre os animais tratados com FS comparado com o controle negativo (**Figura 2B**).

Figura 2. Efeito da Fosfoetanolamina sintética (FS) (1g/kg/dia) administrada por via oral sobre o crescimento tumoral em camundongos transplantados com tumor Sarcoma 180. Ciclofosfamida (25 mg/kg) foi utilizada como controle positivo e o veículo de diluição da FS, soro fisiológico 0,9%, foi utilizado como controle negativo (C-). **(A)** Curva de evolução do volume tumoral (mm^3) mensurado por paquímetro digital a partir do sétimo dia do experimento até o dia da eutanásia; **(B)** Percentual de crescimento tumoral com base na média do peso dos tumores, após a eutanásia.



Os valores correspondem à média \pm erro padrão da média de 15 animais por grupo. (a) $p < 0,0001$ comparado com o controle negativo por ANOVA seguida pelo teste *post hoc* de Dunnett.

Na avaliação hematológica (**Tabela 1**), o grupo fosfoetanolamina apresentou uma ligeira diminuição no número de leucócitos e monócitos quando comparado com o grupo controle negativo. Não foi observada diferença estatística nos demais parâmetros avaliados nos animais tratados com FS. Além disso, a contagem de leucócitos, linfócitos, monócitos, granulócitos, glóbulos vermelhos, hemoglobina, hematócrito e plaquetas no grupo tratado com ciclofosfamida foi significativamente inferior ao controle negativo ($p < 0,0001$).

Tabela 1. Avaliação dos parâmetros hematológicos de camundongos transplantados com Sarcoma 180 após 10 dias de tratamento com FS (1g/kg). Ciclofosfamida (25mg/kg) foi utilizada como controle positivo e o veículo de diluição da FS, soro fisiológico 0,9%, foi utilizado como controle negativo.

Parâmetro (unidade)	Controle Negativo	Ciclofosfamida	Fosfoetanolamina
Leucócitos (10 ⁹ /L)	13,41 ± 0,80	4,18 ± 0,25 ^a	10,63 ± 0,58 ^d
Linfócitos (10 ⁹ /L)	5,14 ± 0,21	1,29 ± 0,13 ^a	5,15 ± 0,29
Monócitos (10 ⁹ /L)	0,80 ± 0,12	0,32 ± 0,04 ^b	0,51 ± 0,04 ^b
Granulócitos (10 ⁹ /L)	6,85 ± 0,71	2,28 ± 0,24 ^a	5,81 ± 0,40
RBC (10 ¹² /L)	8,69 ± 0,15	7,24 ± 0,28 ^a	8,63 ± 0,17
HGB (g/dL)	14,01 ± 0,21	11,19 ± 0,38 ^a	14,50 ± 0,29
HCT (%)	47,23 ± 1,11	40,07 ± 2,02 ^b	49,29 ± 1,52
VCM (fL)	54,67 ± 1,21	55,27 ± 1,15	56,20 ± 1,40
MCH (pg)	16,15 ± 0,21	15,88 ± 0,15	16,58 ± 0,18
MCHC (%)	29,68 ± 0,41	28,71 ± 0,51	29,57 ± 0,51
RDWc (%)	14,95 ± 0,14	14,45 ± 0,14 ^c	14,57 ± 0,07
PLT (10 ⁹ /l)	867,4 ± 18,04	1013 ± 64,33 ^c	861,3 ± 31,25
PCT (%)	0,49 ± 0,01	0,56 ± 0,03	0,48 ± 0,032
VPM (fL)	5,76 ± 0,05	5,84 ± 0,09	5,73 ± 0,07
PDWc (%)	30,34 ± 0,12	30,85 ± 0,31	30,48 ± 0,28

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 15 animais por grupo. (a) p<0,0001; (b) p<0,0004; (c) p<0,01; (d) p<0,009 comparado com o controle negativo por ANOVA seguida pelo teste *post hoc* de Dunnett.

Tabela 2. Avaliação dos parâmetros bioquímicos de camundongos transplantados com tumor Sarcoma 180 após 10 dias de tratamento com fosfoetanolamina (1 g/kg). Ciclofosfamida (25 mg/kg) foi utilizada como controle positivo e o veículo de diluição da FS, soro fisiológico 0,9%, foi utilizado como controle negativo.

Parâmetro (unidade)	Controle Negativo	Ciclofosfamida	Fosfoetanolamina
BD (mg/dl)	0,08 ± 0,005	0,11 ± 0,01	0,07 ± 0,01
BT (mg/dL)	0,16 ± 0,02	0,18 ± 0,02	0,10 ± 0,02
ALT ou TGO (U/L)	54,58 ± 2,60	37,73 ± 3,08 ^a	51,07 ± 2,85
AST ou TGP (U/L)	289,6 ± 14,80	275,5 ± 8,81	328,0 ± 13,29
Amilase (U/L)	487,1 ± 14,27	505,9 ± 10,50	486,4 ± 11,15
Creatinina (mg/dL)	0,43 ± 0,04	0,22 ± 0,01 ^a	0,22 ± 0,02 ^a
Ureia (mg/dL)	41,93 ± 2,07	39,07 ± 1,30	36,92 ± 1,46
Glicose (mg/dL)	146,2 ± 6,73	206,0 ± 9,01 ^b	164,7 ± 14,2

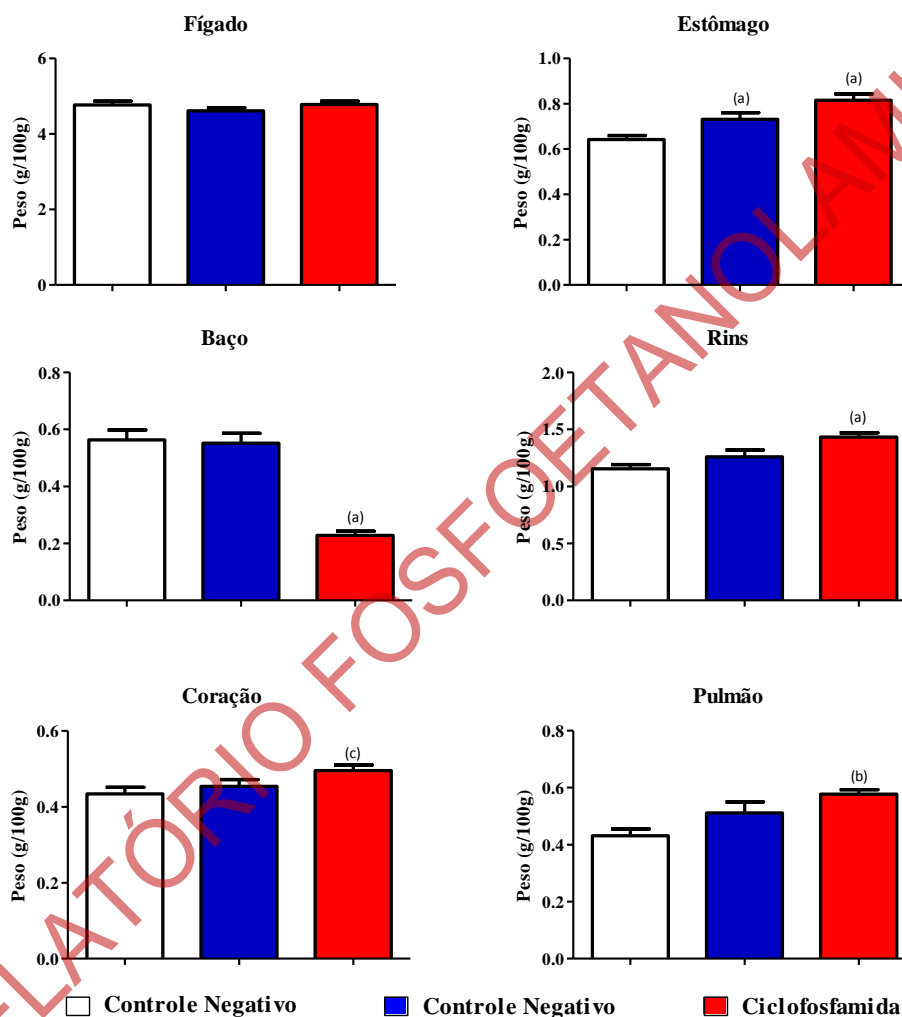
Bilirrubina Direta (BD); Bilirrubina Total (BT); alanina aminotransferase (ALT ou TGO), aspartato aminotransferase (AST ou TGP). Os valores correspondem à média ± erro padrão da média de pelo menos 10 animais por grupo. (a) $p < 0,0001$; (b) $p < 0,001$ comparado com o controle negativo por ANOVA seguida pelo teste *post hoc* de Dunnett.

Nos achados bioquímicos, a creatinina (função renal) e a aspartato aminotransferase - AST (função hepática) foram os parâmetros alterados nos animais tratados com a FS quando comparado com os animais do controle negativo. Nos animais que receberam ciclofosfamida, observou-se alteração na alanina aminotransferase (ALT), creatinina e glicose. A glicose de todos os grupos está aumentada para a espécie, de acordo com os parâmetros determinados por Branco e colaboradores (2011). Este achado pode ser devido a ação hiperglicêmica do anestésico Cloridrato de Cetamina utilizado na indução anestésica dos animais, conforme demonstrado por Brăslășu e colaboradores (2007).

Não foram encontrados achados macroscópicos relevantes nos órgãos estudados. A avaliação histopatológica (microscópica) está em curso e complementar os resultados apresentados na **Figura 3**. Todos os órgãos foram pesados, sendo possível observar que houve alterações no peso relativo úmido do estômago nos animais tratados com Fosfoetanolamina Sintética quando comparado com o controle negativo. A Ciclofosfamida reduziu de forma

significativa o peso relativo úmido do baço ($p < 0,0001$) e aumentou o peso relativo do estômago, rins, pulmão e coração (**Figura 3**).

Figura 3. Efeito da Fosfoetanolamina Sintética (FS) (1g/kg/dia) administrada por via oral sobre a massa dos órgãos dos camundongos (g/100g de massa corpórea) transplantados com tumor Sarcoma 180, após 10 dias de tratamento com fosfoetanolamina (1 g/kg). Ciclofosfamida (25 mg/kg) foi utilizada como controle positivo e o veículo de diluição da FS, soro fisiológico 0,9%, foi utilizado como controle negativo.



Os valores correspondem à média \pm erro padrão da média de 15 animais por grupo. (a) $p < 0,0001$; (b) $p < 0,002$; (c) $p < 0,04$, comparado com o controle negativo por ANOVA seguida pelo teste *post hoc* de Dunnett.

CONCLUSÃO

A partir do ensaio realizado para verificação da possível atividade inibidora do crescimento tumoral no Sarcoma 180, observou-se que a Fosfoetanolamina Sintética **não apresentou efeito inibidor** nos animais tratados com a dose de 1g/Kg de peso corporal por dia, durante 10 dias.

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

REFERÊNCIAS

BRANCO, A. C. S. C., et al. Parâmetros Bioquímicos e Hematológicos de Ratos Wistar e Camundongos Swiss do Biotério Professor Thomas George. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, vol. 15, Número 2, pág.: 209-214, 2011.

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

CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – CONCEA. **Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais em atividades de ensino ou de pesquisa científica – DBCA**. 50 p. Brasília, Distrito Federal, 2016. Disponível em: http://www.mct.gov.br/upd_blob/0238/238684.pdf. Acesso em: 01/03/2016.

DUNCAN, J. R., PRASSE, K. W. **Patologia clínica veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, Cap. 8: Aparelho digestivo, p. 108-114, 1982.

ELLISON, D. W., BEAL, M. F., MARTIN, J. B. Phosphoethanolamine and ethanolamine are decreased in Alzheimer's disease and Huntington's disease. **Brain Res**. 11; 417(2):389-92, 1987.

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.

HAROLD, et al. Transplantable and transmissible tumors of animals. **British Journal of Surgery**, v. 46, n. 200, p. 658-658, 1959.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Estimativas de câncer no Brasil**, 2016. Disponível: <http://www.inca.gov.br/wcm/dncc/2015/estimativa-2016.asp>. Acesso em 03/05/2016.

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

SCHABEL, F. Quantitative evaluation of anticancer agent activity in experimental animals. **Pharmacology & Therapeutics**, v.1, p. 411-435, 1977.

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

TEICHER, B. **Tumor models in cancer research**. Humana Press, 2011.