

Resumo Executivo

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA E ANTIPROLIFERATIVA DA FOSFOETANOLAMINA, MONOETANOLAMINA E FOSFOBISETANOLAMINA EM CÉLULAS HUMANAS DE CARCINOMA DE PÂNCREAS E MELANOMA.

Patrocinador: **Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação - MCTI**

Esplanada dos Ministérios, Bloco E
Brasília, DF

1. INTRODUÇÃO

A fosfoetanolamina é um derivado da etanolamina (amina e álcool primário) sintetizada pela primeira vez em 1936 por Outhouse E.L. (1936). Mesmo não sendo registrada na ANVISA para uso humano, por falta de estudos científicos não clínicos e clínicos que comprovem sua segurança e eficácia, a fosfoetanolamina sintética vem sendo utilizada no Brasil para o tratamento de vários tipos de câncer. Essa substância, a qual está sendo utilizada por pacientes, começou a ser produzida e distribuída pelo químico Gilberto Orivaldo Chierice, então professor do Instituto de Química da USP - São Carlos (IQSC) no final da década de 1980. O embasamento que levou a crença sobre a atividade antitumoral da fosfoetanolamina partiu dos estudos de eficácia não clínica (*in vitro* e *in vivo*) publicados pelo grupo do professor Gilberto Orivaldo Chierice e colaboradores, onde foi demonstrado que a fosfoetanolamina, em altas concentrações, apresentou redução na viabilidade celular (morte celular) para diferentes células tumorais humanas, incluindo: células de leucemia linfóide (IC₅₀, 6 - 12 mM), células de leucemia mieloide (IC₅₀, 9 mM) (Ferreira *et al.*, 2013), células de câncer de mama (IC₅₀, 1,82 mg/mL), células de carcinoma de pulmão (IC₅₀, 1,32 mg/mL), células de melanoma humano (IC₅₀, 1,20 mg/mL). Ferreira *et al.*, (2012), demonstraram atividade antiproliferativa para a fosfoetanolamina em células de melanoma de roedores (B16F10). Estudos conduzidos *in vivo* demonstraram que a fosfoetanolamina administrada pela **via intraperitoneal** apresentou atividade antitumoral sobre a leucemia em camundongos (Ferreira *et al.*, 2013) e sobre o tumor ascítico de Ehrlich (Ferreira *et al.*, 2012). Análise química realizada pelo Instituto de Química de São Carlos (USP) com amostra de fosfoetanolamina produzido pelo Sr. Salvador Claro Neto e enviado ao Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI) em 2015, demonstrou que a fosfoetanolamina, considerada como sendo de alto grau de pureza, não apresenta apenas um composto puro (fosfoetanolamina), mas sim uma mistura de compostos presentes em diferentes concentrações. Neste dossiê foi demonstrado que, a “fosfoetanolamina sintética” produzida pelo Sr. Salvador Claro Neto possui 16,9 % fosfoetanolamina, 37,5% de monoetanolamina e 45,6 % do sal de fosfoetanolamina. Mais recentemente, os professores Dr. Luiz Carlos Dias da Unicamp e Dr. Eliezer Barreiro da UFRJ, demonstraram que nas mesmas amostras de “fosfoetanolamina” produzida pelo Sr. Salvador Claro Neto, há proporções diferentes dos compostos mencionados acima sendo 32,2 % de fosfoetanolamina, 18,2% monoetanolamina, 3,9 % Fosfobisetanolamina, 38,5% de fosfatos e 7,2% de água.

2. OBJETIVOS

O presente estudo avaliou a atividade citotóxica e antiproliferativa dos principais compostos presentes nas análises químicas da amostra fosfoetanolamina produzida pelo Sr. Salvador Claro Neto (Fosfoetanolamina, Monoetanolamina e Fosfobisetanolamina), sobre células humanas de carcinoma de Pâncreas e Melanoma *in vitro*. Visando fornecer maior robustez aos resultados gerados, foram empregadas três diferentes metodologias para avaliar a possível ação antitumoral com cada uma das substâncias mencionadas acima.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Avaliação da citotoxicidade dos compostos através do ensaio de MTT e Vermelho Neutro e da atividade antiproliferativa através do ensaio de Sulforrodamina B

O ensaio de viabilidade celular (citotoxicidade) foi realizado através do teste colorimétrico de redução do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio), como descrito previamente por Mosmann, (1983) e através da incorporação do corante vermelho neutro por células viáveis, como descrito anteriormente por Borenfreund e Puerner (1985). Para a avaliação da proliferação celular foi utilizado o método descrito por (Vichai e Kitikara, 2006). Inicialmente foi avaliado o melhor tempo de incubação da Fosfoetanolamina, Monoetanolamina e Fosfobisetanolamina, solubilizados e meio de cultura nas concentrações de 1.000 e 10.000 µM e das substâncias controle positivo, Cisplatina e Gencitabina nas concentrações de 1 µM e 10 µM, sobre a citotoxicidade, nos tempos de incubação de 24, 48, 72 e 96 horas, utilizando o ensaio de MTT. Com base nesses resultados foram selecionados os melhores tempo de incubação dos compostos Fosfoetanolamina, Monoetanolamina e Fosfobisetanolamina. Essas substâncias foram solubilizados nas concentrações de 100 µM, 300 µM, 1.000 µM, 3.000 µM e 10.000 µM e incubadas sobre as células de carcinoma de

Pâncreas (ATCC/Lote 61181029) e Melanoma humano (ATCC/Lote 61573377). Concentrações maiores não puderam ser testadas devido a alteração do pH do meio de cultura. Para efeito de comparação, foram utilizados quimioterápicos comercializados e utilizados para o tratamento clínico dos tumores avaliados (carcinoma de Pâncreas e Melanoma). A droga controle positivo utilizado para o carcinoma de Pâncreas foi a Gencitabina (European Pharmacopoeia), um análogo de nucleosídeo, e para o Melanoma foi utilizado a Cisplatina (Sigma-Aldrich), um inibidor da síntese de DNA, ambos nas concentrações de 0,1 μM , 0,3 μM , 1 μM , 3 μM e 10 μM . Os resultados foram expressos em porcentagem de células viáveis em relação ao controle, e foi calculada a concentração que causou a morte em 50% das células, ou seja, a Cl_{50} e a maior inibição observada nas concentrações utilizadas.

4. RESULTADOS

4.1 Escolha do melhor tempo de incubação dos compostos através do ensaio de citotoxicidade por MTT

A incubação das células de Melanoma com a Substância **Teste Monoetanolamina** nas concentrações de 1.000 e 10.000 μM ou com a **Substância de Referência Cisplatina** nas concentrações de 1 e 10 μM , foi capaz de reduzir a viabilidade celular após 24 e 48 horas de incubação. Através desta análise, foi utilizado o período de incubação de 48 horas para as avaliações posteriores das diferentes concentrações das Fosfoetanolamina, Monoetanolamina, Fosfobisetanolamina e da Cisplatina nas células de Melanoma humano. A alteração na viabilidade celular das células de carcinoma de Pâncreas somente ocorreu pela incubação com a Substância **Teste Monoetanolamina** por um período de 48 horas e somente na maior concentração (10.000 μM). Após 72 horas de incubação tanto a Monoetanolamina (1.000 e 10.000 μM), quanto a Substância de Referência Gencitabina (1 e 10 μM), apresentaram atividade citotóxica sobre as células de carcinoma de Pâncreas. Sendo assim, para as avaliações posteriores das diferentes concentrações das Fosfoetanolamina, Monoetanolamina, Fosfobisetanolamina e da Gencitabina nas células de Carcinoma de Pâncreas humano, foi utilizado o período de 72 horas de incubação dos compostos.

4.2 Avaliação da citotoxicidade dos compostos através do ensaio de MTT

Os tratamentos com veículo (meio de cultura) ou com as Substâncias Teste Fosfoetanolamina e Fosfobisetanolamina nas concentrações de 100 μM , 300 μM , 1.000 μM , 3.000 μM e 10.000 μM não resultaram em nenhuma alteração sobre a viabilidade celular (citotoxicidade), tanto nas células de Melanoma, quanto nas de carcinoma de Pâncreas. No entanto, a incubação de Monoetanolamina nos meios de culturas nas concentrações de 100 μM , 300 μM , 1.000 μM , 3.000 μM e 10.000 μM causou redução proporcional a concentração empregada da viabilidade das células (citotoxicidade) de Melanoma, com IC_{50} aproximada de 7.774 μM e inibição de 62,3%, bem como nas células de carcinoma de Pâncreas, com IC_{50} aproximada de 5.525 μM e inibição de 75,3 %. O medicamento antitumoral Cisplatina, utilizado como controle positivo sobre as células tumorais de Melanoma, apresentou IC_{50} aproximada de 2,96 μM e inibição de 86,8%, já a Gencitabina, um antitumoral utilizado para o carcinoma de Pâncreas apresentou $\text{IC}_{50} < 0,1 \mu\text{M}$. Assim, a Monoetanolamina foi aproximadamente 2.600 vezes menos potente que a Cisplatina em relação a citotoxicidade de células de Melanoma. As Cl_{50} s também estão descritas no anexo I deste relatório.

4.3 Avaliação da citotoxicidade dos compostos através do ensaio de Vermelho Neutro

A incubação das células com o veículo (meio de cultura) ou com as Substâncias Teste Fosfoetanolamina e Fosfobisetanolamina nas concentrações de 100 μM , 300 μM , 1.000 μM , 3.000 μM e 10.000 μM não resultou em nenhuma alteração na viabilidade celular (citotoxicidade) tanto nas células de Melanoma, quanto nas de carcinoma de Pâncreas, no ensaio de Vermelho Neutro. Já a Monoetanolamina utilizada nas concentrações de 100 μM , 300 μM , 1.000 μM , 3.000 μM ou 10.000 μM resultou em redução da viabilidade das células (citotoxicidade), de forma proporcional a concentração usada, sobre as células de Melanoma, com IC_{50} superior a 10.000 μM (inibição de 45,0%), bem como nas células de carcinoma de Pâncreas, com IC_{50} aproximada de 6.861 μM e inibição de 64,2%. O antitumoral Cisplatina, utilizado como controle positivo sobre as células tumorais de Melanoma apresentou IC_{50} de 3,4 μM e inibição de 75,6%. A Gencitabina, um antitumoral utilizado para o carcinoma de Pâncreas apresentou $\text{IC}_{50} < 0,1 \mu\text{M}$. As Cl_{50} s estão descritas na tabela 1 deste resumo.

4.4 Avaliação da proliferação celular dos compostos através do ensaio de incorporação pela Sulforrodamina B

A incubação das células com o veículo (meio de cultura) ou com as Substâncias Teste Fosfoetanolamina e Fosfobisetanolamina nas concentrações de 100 μM , 300 μM , 1.000 μM , 3.000 μM e 10.000 μM não resultou em nenhuma alteração significativa sobre a proliferação celular, tanto nas células de Melanoma, quanto nas de carcinoma de Pâncreas. A Monoetanolamina utilizada nas concentrações de 100 μM , 300 μM , 1.000 μM , 3.000 μM e 10.000 μM resultou em redução proporcional a concentração empregada sobre a proliferação de células de Melanoma, com IC_{50} aproximada de 7.413 μM e inibição de 63,4 %, e nas células de carcinoma de Pâncreas, com IC_{50} aproximada de 3.347 μM e inibição de 64,2 %. O antitumoral Cisplatina, utilizado como controle sobre as células tumorais de Melanoma

apresentou uma IC₅₀ aproximada de 1,13 µM e inibição de 100 %. A Gencitabina, um antitumoral utilizado para o carcinoma de Pâncreas apresentou uma IC₅₀ < 0,1 µM. Assim a Monoetanolamina foi aproximadamente 6.500 vezes menos potente que a Cisplatina em relação a proliferação de células de Melanoma. As IC₅₀s estão descritas na tabela 1 deste resumo.

5. CONCLUSÃO DO ESTUDO

Os resultados descritos neste relatório parcial demonstram que somente a **Monoetanolamina** apresentou atividade citotóxica e antiproliferativa, sendo contudo, várias ordens de magnitude menos potente que os antitumorais Cisplatina e Gencitabina, utilizados como controle positivo. Já a **Fosfoetanolamina** e a **Fosfobisetanolamina** não apresentaram nenhuma atividade citotóxica nem antiproliferativa em nenhuma das 3 metodologias utilizadas.

6. PRÓXIMAS ETAPAS

- 1) Serão realizados ensaios para avaliar a atividade citotóxica e antiproliferativa dos três compostos (Fosfoetanolamina, Monoetanolamina e Fosfobisetanolamina), utilizando as metodologias de MTT, Vermelho Neutro e Sulforrodamina B em células de carcinoma de Pulmão (ATCC).
- 2) Serão realizados ensaios para avaliação da atividade citotóxica e antiproliferativa para a Monoetanolamina utilizando as metodologias de MTT, Vermelho Neutro e Sulforrodamina B em células humanas sem câncer (fibroblasto).
- 3) Serão realizados ensaios *in vitro* para avaliar possíveis mecanismos responsáveis pelas atividades antiproliferativas da monoetanolamina.
- 4) Será avaliada possível atividade anticâncer *in vivo* da Monoetanolamina e da Fosfoetanolamina (USP) no modelo de tumor xenográfico de melanoma em camundongos nude (animal atímico transplantado com células de tumor humano).

7. REFERÊNCIAS

- Albanesi, C. Keratinocytes in allergic skin diseases. *Current Opinion in Allergy and Immunology* (2010), 10:452–456.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. (1983) 16;65 (1-2):55-63.
- Borenfreund E, Puerner JA. A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90). *Journal of tissue culture methods*. (1985) 9: 7-9.
- Outhouse EL. Amino-ethyl phosphoric ester from tumours. *Biochem J*. (1936) 30:197–201.
- Ferreira AK, et al. Anticancer effects of synthetic phosphoethanolamine on Ehrlich ascites tumor: an experimental study. *Anticancer Res*. (2012) 32(1):95-104.
- Ferreira AK, et al. Synthetic phosphoethanolamine has *in vitro* and *in vivo* anti-leukemia effects. *British Journal of Cancer* (2013) 109, 2819–2828.
- Ferreira AK, et al. Synthetic phosphoethanolamine a precursor of membrane phospholipids reduce tumor growth in mice bearing melanoma B16-F10 and *in vitro* induce apoptosis and arrest in G2/M phase. *Biomedicine & Pharmacotherapy* (2012) 541–548.
- Ferreira AK, et al. Anticancer Effects of Synthetic Phosphoethanolamine on Ehrlich Ascites Tumor: An Experimental Study. *Anticancer Research* (2012) 32: 95-104.
- Ferreira AK, et al. Anti-Angiogenic and Anti-Metastatic Activity of Synthetic Phosphoethanolamine. *Plos One* (2013) 8:3.

TABELA 1		CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA 50% (IC ₅₀) APROXIMADA		
LINHAGEM	ENSAIO	MONOETANOLAMINA	CISPLATINA	GENCITABINA
Melanoma	Citotoxicidade (MTT)	7.774 µM	2,9 µM	----
	Citotoxicidade (Vermelho N)	Maior que 10.000 µM	3,4 µM	----
	Proliferação	7.413 µM	1,1 µM	----
Carcinoma de Pâncreas	Citotoxicidade (MTT)	5.525 µM	----	Menor que 0,1 µM
	Citotoxicidade (Vermelho N)	6.861 µM	----	Menor que 0,1 µM
	Proliferação	3347 µM	----	Menor que 0,1 µM