



Universidade Federal do Ceará
Laboratório de Oncologia Experimental
Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos

LAUDO TÉCNICO DO ESTUDO DE AMOSTRAS
LABORATÓRIO DE ONCOLOGIA EXPERIMENTAL
NÚCLEO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

Avaliação do Potencial Citotóxico *in vitro* da Fosfoetanolamina Sintética (FS) e da Fosfoetanolamina Sintética Nanoencapsulada (FSNE)

Nº. de Páginas: 8

Pesquisador (a) responsável pelas amostras:
Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho
odorico@ufc.br

Técnicos Responsáveis (LOE):

Andréa Felinto Moura

andreafmoura@gmail.com

Francisco Stefânio Barreto

franciscostefanio@hotmail.com

Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos

Rua Coronel Nunes de Melo, 1000

Rodolfo Teófilo

Fortaleza – Ceará – Brasil

C EP: 60.430-270

(85) 999893459 (85) 3366-8201

CITOTOXICIDADE *IN VITRO*

OBJETIVOS

Verificar o potencial antiproliferativo *in vitro* da Fosfoetanolamina Sintética (FS) e da Fosfoetanolamina Sintética Nanoencapsulada (FSNE) frente a três linhagens de células tumorais e duas linhagens de células não tumorais, além de verificar o potencial hemolítico destes compostos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras

As amostras foram diluídas em água miliQ estéril, nas concentrações de 1M e 2M para a FS e FSNE, respectivamente. O veículo foi utilizado no controle negativo e a Doxorubicina, um fármaco amplamente utilizado na quimioterapia do câncer (TACAR et al., 2013), foi utilizada como controle positivo.

Linhagens celulares

As linhagens tumorais utilizadas para a avaliação da atividade antiproliferativa foram obtidas através de doação do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (US-NCI, *United States – National Cancer Institute*). As células mononucleadas de sangue periférico (CMSP) foram obtidas de voluntários saudáveis, sendo utilizadas como modelo para a avaliação da citotoxicidade sobre células não tumorais (Tabela 1).

Tabela 1. Linhagens celulares testadas durante o estudo.

Linhagem Celular	Tipo histológico	Origem	Concentração de plaqueamento (cél/mL)
HCT-116	Carcinoma Colorretal	Humana	7×10^4
PC-3	Adenocarcinoma de Próstata	Humana	1×10^5
SF-295	Glioblastoma	Humana	1×10^5
L-929	Fibroblasto	Murino	1×10^5
CMSP	Células mononucleadas de Sangue Periférico	Humana	1×10^6

Manutenção das linhagens celulares

As linhagens celulares foram manuseadas em ambiente estéril de câmara de fluxo laminar vertical (VECO, modelo Biosafe 12, classe II) e mantidas em incubadora de CO₂ a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ (NUAIRE, modelo TS Autoflow).

As linhagens tumorais foram cultivadas em frascos de cultura de células de 25 cm² com volume de 50 mL ou de 75 cm² com volume de 250 mL em meio RPMI 1640 (Gibco), e as células 3T3-L1 foram cultivadas em DMEM (Gibco), ambos suplementados com 10% de soro bovino fetal (SBF) e 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina). A manutenção foi realizada antes que as células atingissem a confluência. O crescimento das linhagens foi acompanhado diariamente por microscópio de inversão (ZEISS, modelo Axiovert 40C).

Para a manutenção das células aderidas, o meio foi retirado e o frasco lavado 2x com PBS estéril, em seguida, adicionou-se tripsina-EDTA 0,5% (Gibco) diluída 10x em solução tampão (PBS, *Phosphate Buffer Solution*). Posteriormente, o meio de cultura suplementado com SBF foi adicionado às células em suspensão para inibição da tripsina. Parte das células foi removida da garrafa e o volume preenchido com meio suplementado. Para manutenção de células em suspensão, fez-se apenas a substituição do meio de cultura.

Obtenção das células mononucleadas do sangue periférico (CMSP)

As células mononucleadas foram obtidas do sangue periférico de voluntários sadios coletado em tubos tipo *Vacutainer* contendo solução de EDTA K₂ (BD Vacutainer®). Após a coleta, 5 mL de sangue total foram diluídos em PBS (1:1) e vagarosamente depositados sobre 2 mL de Ficoll®-Hypaque (Sigma). Posteriormente foi realizada a centrifugação por 30 minutos a 1500 rpm para separação das fases da solução. As células mononucleadas concentram-se na camada localizada na interface entre o plasma (fase clara) e os eritrócitos (fase escura). As CMSP foram transferidas para outro tubo onde foi acrescentado PBS até atingir um volume final de 11 mL, sendo então centrifugado por 20 minutos a 1000 rpm. Esse procedimento foi repetido e o pellet de CMSP foi ressuspensionado em meio RPMI 1640 suplementado com 20% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (para uma concentração final de 100 U/mL penicilina, 100 µg/mL estreptomicina). Para estimular a proliferação dos linfócitos, foi adicionado ao

meio 2% do agente mitogênico fito-hemaglutinina (Sigma). As células foram contadas e diluídas para uma concentração final de 1×10^6 células /mL e a citotoxicidade do composto foi testada utilizando o método do MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenilbrometo de tetrazólio).

Avaliação da atividade antiproliferativa *in vitro* - método do MTT

O ensaio do MTT é um método colorimétrico que tem como objetivo quantificar a atividade mitocondrial por meio da redução do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenilbrometo de tetrazólio (MTT), de cor amarela, resultando na formação de cristais de formazan, de cor púrpura, em células metabolicamente ativas. Os metabólitos primários envolvidos do ciclo de Krebs, NADH₂, NADPH e Succinato são os principais envolvidos nesta reação, em que a atividade metabólica da célula é dependente do número de células e está diretamente relacionada com a quantidade de MTT metabolizada, sendo a quantificação realizada por absorbância em espectrofotômetro (MOSMANN, 1983).

As células em suspensão ou monocamadas foram plaqueadas em multiplacas de 96 cavidades, sendo a concentração de plaqueamento determinada de acordo com as linhagens a serem testadas descritas na Tabela 1. Após 24 horas de incubação em estufa a 37°C a 5% CO₂, 100 µL de amostra teste diluídas em meio completo foram adicionadas e as placas foram novamente incubadas por 72 horas. As placas foram centrifugadas a 1500 rpm por 5 min e, em seguida, o sobrenadante foi retirado. Foi adicionado em cada poço 150 µL de solução de MTT (0,5 mg/mL), diluído em meio RPMI 1640, e as placas foram reincubadas por 3 horas. Após o período de incubação, essas placas foram novamente centrifugadas a 3000 rpm por 10 min e o sobrenadante retirado. Para realização da leitura em espectrofotômetro de placa (Beckman Coulter Inc., modelo DTX-880) com absorbância de 595 nm, o formazan foi novamente suspenso em 150 µL de Dimetilsulfóxido (DMSO) adicionado em cada poço. Para leitura foi utilizado o programa *Multimode Detection Software* (Beckman Coulter Inc.).

Determinação do potencial hemolítico

Este ensaio permite avaliar o potencial da substância teste em causar danos na membrana celular, seja pela formação de poros ou pela ruptura total através da quantificação espectrofotométrica da hemoglobina liberada em solução salina (JIMENEZ et al., 2004).

O sangue coletado de indivíduos saudáveis foi diluído em 150 mL de solução salina (NaCl 0,85% + CaCl₂ 10 mM). Os eritrócitos foram lavados 3 vezes em solução salina contendo cloreto de cálcio e centrifugados a 1500 rpm por 5 minutos para redução da contaminação plasmática. Após a terceira centrifugação, os eritrócitos foram ressuspensos em solução salina para obtenção de uma solução de eritrócitos a 2%. Os ensaios foram realizados em placas de microdiluição contendo 96 poços. Cada poço da primeira coluna recebeu 100 µL de solução salina. Os poços da segunda fileira receberam 80 µL de solução salina e 20 µL do veículo de diluição das amostras teste (DMSO 50%). Os poços da 12^a coluna receberam 80 µL de solução salina e 20 µL de Triton X-100 a 1% (controle positivo). Os poços da 11^a coluna receberam 190 µL de solução salina e 10 µL de Fs e FSNE na concentração final de 300 mM.

A placa foi incubada sob agitação constante a temperatura ambiente (25 °C ± 2 °C), por 1 h. Após a incubação, a placa foi centrifugada a 2000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante transferido para outra placa para realização da leitura da absorbância em espectrofotômetro de placa a 450 nm. A atividade hemolítica foi determinada de maneira relativa ao valor dos controles positivo e negativo.

Análise estatística

Para a análise dos dados, foi utilizado o programa GraphPad Prism versão 5.0. Os valores das absorbâncias, resultantes dos testes das frações em concentração única, foram transformados em porcentagem de inibição, sendo comparado ao controle negativo. Estes dados foram analisados com base na média ± desvio padrão da média da triplicata de no mínimo três experimentos. Quando testadas em diluição seriada, foi feita a determinação da concentração inibitória média (CI₅₀) com os respectivos intervalos de confiança (IC 95%), obtidos por regressão não linear.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos dados observados na Tabela 2, tanto a FS quanto FSNE, somente apresentaram atividade citotóxica em concentrações elevadas, com valores de CI_{50} que variaram de 8,6 a 43,4 mM para FS e de 18,1 a 75,9 mM para FSNE em linhagens de célula tumorais e não tumorais. Além disso, é possível verificar que a FS exerce efeito antiproliferativo na linhagem de fibroblastos murinos (L-929) em uma concentração menor do que em células tumorais, enquanto que, com a substância nanoencapsulada o efeito antiproliferativo é reduzido tanto em células L-929, como em CMSP, sendo sua atividade em células tumorais mantida com CI_{50} semelhante à FS.

Tabela 2 – Potencial antiproliferativo da fosfoetanolamina sintética (FS) e da fosfoetanolamina sintética nanoencapsulada (FSNE) em linhagens tumorais e não tumorais avaliado pelo ensaio do MTT, após 72 h de tratamento.

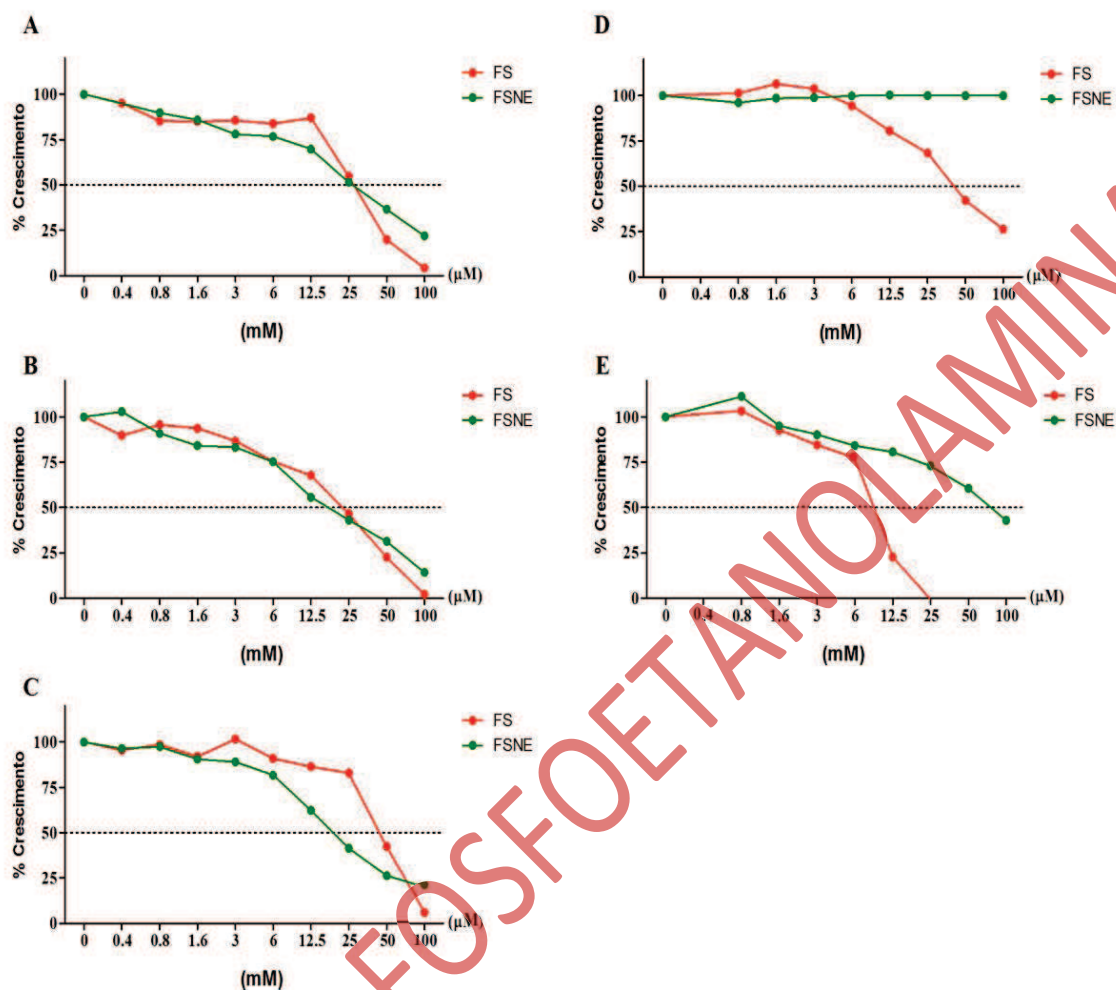
AMOSTRAS	CI_{50} (mM) Intervalo de confiança de 95%				
	HCT-116	SF-295	PC-3	L-929	CMSP
FS	25,9 (22,2-30,2)	43,4 (39,6-47,5)	19,7 (17,1-22,7)	8,6 (8,0-9,3)	42,4 (37,4-48,1)
FSNE	25,1 (19,8-31,7)	20,2 (18,3-22,4)	18,1 (15,3-21,5)	75,9 (59,6-96,9)	>100
Doxorrubicina	0,00015 (0,00013-0,00017)	0,00038 (0,00031-0,00047)	0,0016 (0,0014-0,0018)	0,0016 (0,0015-0,0018)	0,0018 (0,0014-0,0022)

Valores de CI_{50} com um intervalo de confiança de 95% obtido por regressão não-linear a partir apenas um experimento realizado em duplicata.

O Gráfico 1 mostra a curva dose-resposta dos compostos testados frente a linhagens de células tumorais e não tumorais. Visto que a doxorrubicina foi testada em uma menor concentração para determinação da CI_{50} , não foi possível colocar os dados no Gráfico 1.

Conforme observado nos trabalhos publicados com a fosfoetanolamina sintética sua concentração inibitória média frente às diferentes linhagens tumorais testadas foram da ordem de mM, e mesmo a concentração sendo elevada, os autores a consideraram como um composto citotóxico (FERREIRA et al., 2012; FERREIRA et al., 2013). No entanto, de acordo com o programa de triagem de moléculas com potencial atividade anticâncer do NCI, um composto puro é considerado citotóxico se o valor de sua CI_{50} for igual ou menor que 4 $\mu\text{g/mL}$ após o tempo de incubação de 72h (GERAN, et al., 1972).

Gráfico 1 – Curvas dose-resposta da fosfoetanolamina sintética (FS) e da fosfoetanolamina sintética nanoencapsulada (FSNE) frente a linhagens tumorais e não tumorais avaliado pelo ensaio do MTT, após 72 h de tratamento. (A) HCT-116; (B) PC-3; (C) SF-295; (D) CMSP; (E) L-929.



CONCLUSÃO

Com base no protocolo do NCI, os compostos FS e FSNE não são considerados citotóxicos, visto que apresentam valores de CI_{50} que variaram de 8,6 a 75,9 mM. No entanto, foi possível observar, a partir dos dados obtidos, que a fosfoetanolamina sintética quando encapsulada apresentou seletividade para células tumorais.

É importante ressaltar que os estudos *in vitro* são utilizados para triagem inicial de moléculas promissoras. No entanto, uma molécula não citotóxica ou citotóxica em altas concentrações pode apresentar, conforme evidenciam os trabalhos publicados com a fosfoetanolamina, potencial antitumoral *in vivo*, possivelmente por depender de rotas metabólicas para desencadear sua ação. Com isso, sugerimos que testes adicionais *in vivo* sejam realizados para verificação da atividade antineoplásica da fosfoetanolamina.

REFERÊNCIAS

FERREIRA, A.K.; MENEGUELO, R.; MARQUES, F.; RADIN, A.; FILHO, O.M.; NETO, S.C.; CHIERICE, G.O.; MARIA, D.A. 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. **Biomed Pharmacother.** v.66, n.7, p. 541-8, 2012.

FERREIRA, A.K.; SANTANA-LEMONS, B.A.; REGO, E.M.; FILHO, O.M.; CHIERICE, G.O.; MARIA, D.A. Synthetic phosphoethanolamine has in vitro and in vivo anti-leukemia effects. **Br J Cancer.** v. 109; n.11; p. 2819-28, 2013.

GERAN, R.I.; GREENBERG, N.H.; MACDOLNARD, M.M.; SCHUMACHER, A.M.; ABBOTT, B.J. Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systems. **Cancer Chemother Rep.** v. 3; 1-103; 1972.

JIMENEZ, P. C. **Bioprospecção de substâncias com potencial antitumoral em acídias do litoral cearense: Estudos com *Eudistoma vannamei* Millar, 1977 (Urochordata, Ascidiaceae).** 2004. 111 p. Dissertação - Universidade Federal do Ceará, 2004.

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

TACAR, O.; SRIAMORNSAK, P.; DASS, C.R. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. **J Pharm Pharmacol.** v.65; n.2; p. 157-70, 2013.