

RELATÓRIO FINAL

**AValiação da Genotoxicidade da Fosfoetanolamina Sintética (USP – São Carlos): Teste de Micronúcleos em Medula Óssea de Camundongos**

Estudo nº: 021-MIC-005-16

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

Esplanada dos Ministérios, Bloco E

Brasília, DF

## SUMÁRIO

IDENTIFICAÇÃO .....	4
DECLARAÇÃO DE GARANTIA DA QUALIDADE .....	5
RESUMO.....	6
Datas.....	7
1. OBJETIVO DO ESTUDO .....	7
2. PESSOAL ENVOLVIDO E SUAS ATRIBUIÇÕES .....	7
3. SUBSTÂNCIA TESTE, SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA, VEÍCULO, REAGENTES E SOLVENTES .....	7
3.1. Caracterização da Substância Teste .....	7
3.2. Caracterização da Substância de Referência (Controles positivos).....	8
3.3. Caracterização do Veículo.....	8
3.4. Caracterização de Reagentes e Solventes utilizados no estudo.....	8
3.5. Preparo das Substâncias Teste, da Substância de Referência e do Veículo.....	9
3.6. Doses e vias de administração da Substância Teste e Substância de Referência .....	9
3.7. Justificativa para a seleção das concentrações da Substância Teste e Substância de Referência .....	10
4. SISTEMA TESTE .....	10
4.1. Justificativa para a seleção do Sistema Teste.....	10
4.2. Comitê de ética.....	10
4.3. Alojamento dos Animais.....	11
4.3.1. Biotério de Criação .....	11
4.3.2. Biotério de Manutenção .....	11
4.4. Identificação dos Animais .....	11
5. Robustez, Rastreabilidade e Reprodutibilidade .....	11
6. PROCEDIMENTOS DO ESTUDO .....	12
6.1. Desenho experimental.....	12
6.1.1. Teste Preliminar (seleção de doses da Substância Teste (Fosfoetanolamina Sintética – USP, São Carlos) .....	12
6.1.2. Teste Definitivo.....	13
6.2. Preparação das amostras de medula óssea.....	14

6.2.1. Análises das lâminas.....	14
6.3 Grupos experimentais.....	14
6.3.1. Teste preliminar.....	14
6.3.2. Teste definitivo .....	15
6.4. Eutanásia.....	15
5.5. Análise estatística .....	15
7. RESULTADOS.....	16
8. CONCLUSÃO DO ESTUDO.....	17
9. REGISTRO DE DADOS BRUTOS .....	18
10. ARQUIVAMENTO .....	18
11. REFERÊNCIAS.....	18
DECLARAÇÃO DO DIRETOR DE ESTUDO .....	19
DECLARAÇÃO DO GERENTE DA INSTALAÇÃO TESTE, DIRETOR DE ESTUDO SUBSTITUTO E DIRETOR-PRESIDENTE .....	20

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

## IDENTIFICAÇÃO

Título do Estudo AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE DA FOSFOETANOLAMINA SINTÉTICA (USP – São Carlos): TESTE DE MICRONÚCLEOS EM MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS

Número do Estudo 021-MIC-005-16

Patrocinador **Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação - MCTI**  
Telefone: +55 (61) 2033-7500  
Esplanada dos Ministérios, Bloco E  
Brasília – DF  
CEP 70067-900

Instalação de Teste **Centro de Inovação e Ensaios Pré-Clinicos**  
Av. Luiz Boiteux Piazza, 1302  
Florianópolis – SC  
Brasil  
CEP 88056-000

Diretor Presidente **Dr. João Batista Calixto**  
Telefone: 48 32612856  
E-mail: joao.calixto@cienp.org.br  
Centro de Inovação e Ensaios Pré-Clinicos  
Av. Luiz Boiteux Piazza, 1302  
Florianópolis – SC  
Brasil  
CEP 88056-000

Gerente da Instalação de Teste **Dr. Jarbas Mota Siqueira Junior**  
Telefone: 48 32612856  
E-mail: jarbas.siqueira@cienp.org.br  
Centro de Inovação e Ensaios Pré-Clinicos  
Av. Luiz Boiteux Piazza, 1302  
Florianópolis – SC  
Brasil  
CEP 88056-000

Diretora de Estudo **Dra. Cristina Setim Freitas**  
Telefone: 48 32612856  
E-mail: cristina.setim@cienp.org.br  
Centro de Inovação e Ensaios Pré-Clinicos  
Av. Luiz Boiteux Piazza, 1302  
Florianópolis – SC - Brasil  
CEP 88056-000

Diretora de Estudo Substituto **Dra. Raquel Cristina Schwanke**  
Telefone: 48 32612856  
E-mail: raquel.schwanke@cienp.org.br  
Centro de Inovação e Ensaios Pré-Clinicos  
Av. Luiz Boiteux Piazza, 1302  
Florianópolis – SC - Brasil  
CEP 88056-000

Unidade da Garantia da Qualidade **Franciele Avila Silveira**  
Telefone: 48 32612856  
E-mail: franciele.silveira@cienp.org.br

## DECLARAÇÃO DE GARANTIA DA QUALIDADE

Declaro que o Relatório Final foi revisado e reflete os Dados Brutos.

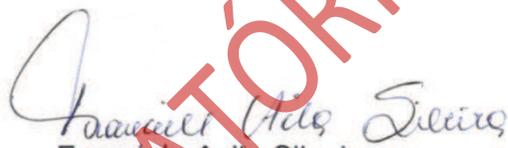
Declaro que foram realizadas auditorias, conforme descrito abaixo, não sendo observadas não conformidades que pudessem afetar a qualidade dos resultados.

Itens Auditados	Data da Auditoria	Data de relato ao DE*	Data de relato ao GIT#
Plano de Estudo	12/01/16	12/01/16	12/01/16
Dados Brutos	08 e 11/04/16	08 e 11/04/16	08 e 11/04/16
Relatório Final	11/04/16	11/04/16	11/04/16

\*DE: Diretor de Estudo; #GIT: Gerente da Instalação de Teste

Auditoria de estudo nº 021-MIC-005-16

Florianópolis, 11 de ABRIL de 2016.



Franciele Avila Silveira

Coordenadora da Unidade de Garantia da Qualidade

## RESUMO

Os testes de genotoxicidade foram desenvolvidos para detectar substâncias que possam induzir danos ao material genético, que conseqüentemente podem levar a carcinogênese e/ou mutagênese. O teste de micronúcleos detecta alterações genéticas decorrentes de lesões cromossômicas e/ou danos no aparelho mitótico. A formação de micronúcleos, é um indicativo de perdas de irreversíveis ao DNA e, dessa forma, a sua frequência pode ser usada como um índice de mutagenicidade. Já se sabe que há uma correlação positiva entre o aumento da frequência de micronúcleos e o aparecimento de tumores em roedores e humanos.

O teste de micronúcleos em medula óssea de camundongos foi realizado de acordo com os procedimentos descritos no plano de estudo 021-MIC-005-16 e seguiu rigorosamente as recomendações do guia 471 da OECD – *Guideline for Testing of Chemicals. Method 474 “Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test”* (Adopted: 26<sup>st</sup> September 2014).

O estudo foi considerado válido, pois os seguintes critérios experimentais foram atendidos:

- ✓ Aumento da frequência de células com micronúcleos (MN) no grupo controle positivo (Substância de Referência);
- ✓ Diferença significativa entre os grupos controle negativo (veículo) e controle positivo (Substância de Referência):  $p < 0.05$ ;
- ✓ O CIEnP está gerando o banco de dados históricos para o teste de micronúcleos *in vivo*.

No teste preliminar, não foram observados sinais clínicos compatíveis com toxicidade, em nenhuma das doses de Fosfoetanolamina Sintética (USP, São Carlos) testadas (8, 50, 320 e 2.000 mg/kg). Dessa forma, a dose limite da Substância Teste (2.000 mg/kg) foi utilizada no teste definitivo. No teste definitivo, a dose de 2.000 mg/kg de Fosfoetanolamina Sintética (USP, São Carlos) administrada pela via oral, não reduziu a proporção de eritrócitos imaturos e eritrócitos maduros (EPC/ENC), quando comparada com o controle negativo (água), indicando a ausência de ação tóxica em relação as células da medula óssea. Além disso, o tratamento com a Fosfoetanolamina Sintética (USP, São Carlos) não alterou a frequência de EPCs (eritrócitos imaturos) micronucleados, também quando comparado ao grupo controle negativo, mostrando que a Substância Teste não promove lesões cromossômicas. Conclui-se que nas condições avaliadas e nas doses testadas, a Fosfoetanolamina Sintética (USP, São Carlos) não promoveu aumento na frequência de micronúcleos nas células da medula óssea de camundongos.

## Datas

Data do início do estudo: 12/01/2016

Data do início do ensaio: 19/01/2016

Data do término do ensaio: 09/03/2016

Data do término do estudo: 11/04/2016

## 1. OBJETIVO DO ESTUDO

Avaliar possíveis danos citogenéticos, induzidos pela Substância Teste, a Fosfoetanolamina Sintética (USP – São Carlos), em cromossomos ou no aparelho mitótico de eritroblastos, através da análise de eritrócitos da medula óssea de camundongos.

## 2. PESSOAL ENVOLVIDO E SUAS ATRIBUIÇÕES

Cristina Setim Freitas, PhD	Diretora de Estudo
Daniela Ferraz Pereira Leite, PhD	Coordenadora de PDI
Simone Köbe, PhD	Apoio Técnico
Fernanda da Cruz, MsC	Apoio Técnico

## 3. SUBSTÂNCIA TESTE, SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA, VEÍCULO, REAGENTES E SOLVENTES

### 3.1. Caracterização da Substância Teste

Nome	: Fosfoetanolamina Sintética (USP – São Carlos)
Nome químico (IUPAC)	: Não se aplica
Número do CAS	: Não se aplica
Lote	: Não informado
Data de fabricação	: Não informado
Data de validade	: Não informado
Pureza/ Composição	: * <sup>1</sup> Fosfoetanolamina - 32,2 %; Fosfatos inorgânicos - 34,9%; Monoetanolamina protonada - 18,2 %; Pirofosfatos Inorgânicos – 3,6 %, Fosfobisetanolamina – 3,9 %; Água – 7,2%. * <sup>2</sup> Fosfoetanolamina - 16,9 %; Sal (de Ca <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> ou Mg <sup>2+</sup> ) de

Fosfoetanolamina - 45,6 %; Monoetanolamina - 37,5 %.

Fabricante : Instituto de Química de São Carlos - USP  
Aspectos físicos : Cristal branco  
Identificação CIEnP : 021.2

\*<sup>1</sup> Composição na íntegra do composto “Fosfoetanolamina-USP” em percentagem de massa - Dados fornecidos pela Unicamp.

\*<sup>2</sup> Composição da fração solúvel do composto “Fosfoetanolamina-USP” em percentagem de massa - Dados fornecidos pela USP.

### 3.2. Caracterização da Substância de Referência (Controles positivos)

Nome : Genuxal® (ciclofosfamida monoidratada)  
Nome químico (IUPAC) : (RS)-N,N-bis(2-cloroetil)-1,3,2-oxazafosfinan-2-amina 2-óxido  
Número do CAS : 6055-19-2  
Lote : 3D697J  
Data de validade : 31/04/2016  
Pureza : Não se aplica  
Fabricante : Baxter  
Aspectos físicos : Cristal

### 3.3. Caracterização do Veículo

Nome : Água deionizada  
Lote : Não se aplica  
Data de validade : Não se aplica  
Pureza : Não se aplica  
Fabricante : Não se aplica

### 3.4. Caracterização de Reagentes e Solventes utilizados no estudo

Nome: Fosfato de Sódio monobásico  
Lote: 12674  
Data de Validade: 31/03/2017  
Fabricante: Lafan

Nome: Fosfato de Sódio dibásico

Lote: DSBC6310V

Data de Validade: 09/09/2016

Fabricante: Vetec

Nome: Giemsa Stain

Lote: MKBJ4642V

Data de Validade: 23/05/2017

Fabricante: Sigma-Aldrich

Nome: Glicerol

Lote: SHBC7796V

Data de Validade: 01/04/2017

Fabricante: Sigma-Aldrich

Nome: Metanol (álcool metílico)

Lote: 185337

Data de Validade: 17/12/2017

Fabricante: Synth

### **3.5. Preparo das Substâncias Teste, da Substância de Referência e do Veículo.**

A Substância Teste (Fosfoetanolamina Sintética – USP, São Carlos) foi pesada e solubilizada em água deionizada com auxílio de um dispersor Polytron® (PT 1200E). A Substância de Referência foi solubilizada com água deionizada, na concentração de 2,5 mg/mL. Ambas as substâncias foram preparadas, imediatamente antes da administração.

### **3.6. Doses e vias de administração da Substância Teste e Substância de Referência.**

As doses da Substância Teste (Fosfoetanolamina Sintética – USP, São Carlos) utilizadas no teste preliminar foram: 8, 50, 320 e 2.000 mg/Kg (Mackay e Elliott, 1992). O teste principal foi realizado com a dose de 2.000 mg/Kg. A dose da Substância de Referência foi de 25 mg/kg, administrada por via intraperitoneal (Nazam et al., 2013; Recio et al., 2010).

### **3.7. Justificativa para a seleção das concentrações da Substância Teste e Substância de Referência.**

As doses da Substância Teste (Fosfoetanolamina Sintética – USP, São Carlos) foram determinadas através de um teste preliminar, com número reduzido de animais. O teste preliminar foi realizado com 4 grupos de dois animais (machos) cada, que foram tratados, pela via oral, com as doses sublinhadas e em negrito da seguinte sequência (base log): 5 8 12,5 20 32 50 80 125 200 320 500 800 1250 2.000 mg/kg (Mackay e Elliott, 1992). A partir desse teste preliminar foi realizado o teste principal com a maior dose tolerada, ou seja, 2.000 mg/Kg. A dose da Substância de Referência foi selecionada através de dados da literatura (Nazam et al., 2013; Recio et al., 2010).

## **4. SISTEMA TESTE**

Foram utilizados camundongos machos e fêmeas da espécie *Mus musculus* e linhagem “Swiss-webster”, entre 6 a 10 semanas, saudáveis, provenientes do Biotério de Criação do CIEnP. Estes animais, cujas matrizes foram adquiridas da empresa Charles River (USA), são mantidos sob condições SPF “specific pathogen free”. A variação de peso dos animais não excedeu  $\pm 20\%$  do peso médio de cada sexo.

### **4.1. Justificativa para a seleção do Sistema Teste**

Camundongos são espécies geralmente recomendadas para a realização do teste de micronúcleos, quando a medula óssea é utilizada. Camundongos apresentam sensibilidade adequada para detectar agentes que causam danos cromossômicos estruturais e numéricos (OECD 474, 2014).

### **4.2. Comitê de ética**

Os procedimentos experimentais seguiram as recomendações dos Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O protocolo utilizado neste estudo foi revisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Utilização Animal (CEUA) do CIEnP, sob o número 210/00 (Determinação de Micronúcleos). Os protocolos aprovados são mantidos em arquivos no CIEnP.

### **4.3. Alojamento dos Animais.**

Todas as gaiolas contêm forração tipo maravalha (ASPEN – Lignocel®), material para nidificação (madeira Aspen) e um pequeno bloco de madeira Aspen como enriquecimento ambiental. A maravalha utilizada para a cama foi previamente autoclavada e renovada periodicamente para manter o ambiente seco e limpo. A temperatura das salas foi ajustada para  $21 \pm 2$  °C com faixa de umidade de 45 - 70%. Os animais foram mantidos em ciclo claro/escuro de 12h, sendo que o início do ciclo claro começou às 6:30 da manhã. Por todo o período do estudo, os animais receberam água e ração *ad libitum*, sendo a ração da marca Nuvital CR1® (Quimtia, Colombo, Paraná, Brasil) autoclavada, e a água, filtrada, clorada e embalada na máquina *Hydropac* (Lab Products, Belcamp, Maryland, EUA). O CIEnP realiza mensalmente a avaliação de potabilidade da água fornecida aos animais.

#### **4.3.1. Biotério de Criação**

Os animais foram acondicionados no biotério do CIEnP em caixas conectadas em racks microisoladoras fabricadas pela empresa Lab Products, medindo (LxCxA): 31x16x14 cm, com até 5 animais por gaiola.

#### **4.3.2. Biotério de Manutenção**

Os animais utilizados neste estudo foram acondicionados no Biotério de Manutenção de roedores do CIEnP em gaiolas conectadas a racks microisoladoras da empresa ALESCO, medindo (LxCxA): 42,2x23x17 cm, e foram aclimatados por um período de no mínimo, 5 dias (5 animais por gaiola).

### **4.4. Identificação dos Animais**

Cada gaiola foi identificada com uma etiqueta padrão, contendo o nome do Diretor de Estudo, número do estudo, animal, linhagem, sexo, grupo experimental e data de início e término do estudo. Durante os experimentos, cada animal foi identificado com uma marcação na cauda, de acordo com o POP E.10/versão atual – Identificação de Animais para Estudos.

### **4.5. Robustez, Rastreabilidade e Reprodutibilidade**

Com o intuito de eliminar possíveis desvios que possam interferir na confiabilidade, rastreabilidade e na reprodutibilidade dos resultados do projeto, foram empregados os critérios propostos pelo guia OECD 474 “*Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test*” (2014).

Para isso, os seguintes procedimentos foram aplicados, desde o planejamento experimental à realização dos experimentos:

- 1) O número de animais em cada grupo experimental foi o mínimo recomendado pelo guia;
- 2) Os animais foram distribuídos aleatoriamente (randomicamente) nos diferentes grupos experimentais, utilizando critérios previamente estabelecidos pelo CIEnP (POP E.04/versão atual);
- 3) Nenhum dado foi excluído ou incluído nos resultados para efeito de cálculo das médias e análise estatística;
- 4) Todos os dados brutos de cada análise estão apresentados neste Relatório Final.

## 5. PROCEDIMENTOS DO ESTUDO

### 5.1. Desenho experimental

O teste de genotoxicidade foi realizado em conformidade com o guia 474 da OECD - *Guideline for The Testing of Chemicals. Method 474 "Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test" (Adopted: 26st September 2014)*. O ensaio iniciou com um teste preliminar, com o objetivo de determinar a dose máxima tolerada (DMT). Durante os testes preliminar e definitivo, os animais foram pesados diariamente, de acordo com o POP-E.01/versão atual.

#### 5.1.1. Teste Preliminar (seleção de doses da Substância Teste (Fosfoetanolamina Sintética – USP, São Carlos)

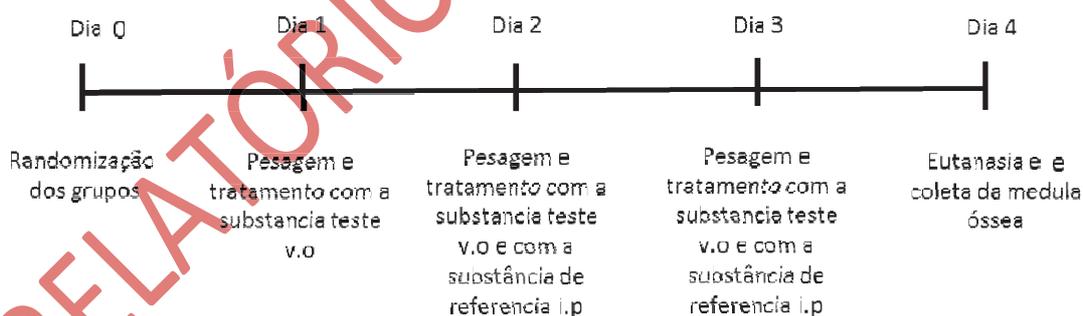
Como comentado anteriormente, o objetivo do teste preliminar foi identificar a DMT da Substância Teste (Fosfoetanolamina Sintética – USP, São Carlos). DMT é a dose mais alta que pode ser administrada, sem induzir mortalidade, morbidade, toxicidade excessiva (com base na presença de sinais clínicos como diarreia, diminuição do apetite e da ingestão de água, perda de peso), ou depressão da medula óssea.

O teste preliminar iniciou com quatro grupos de dois animais (machos), que foram tratados com as doses de 8, 50, 320 e 2.000 mg/kg de Fosfoetanolamina Sintética – USP, São Carlos. Cada grupo experimental (grupo 1: dose de 8 mg/kg; grupo 2: dose de 50 mg/kg; grupo 3: dose de 320 mg/kg e grupo 4: dose de 2.000 mg/kg) recebeu, em paralelo, uma dose durante três dias consecutivos, até a letalidade ou severa toxicidade (sinais clínicos conforme a Planilha PL-110/versão atual). Como não foi identificada letalidade com nenhuma das 4 doses de Fosfoetanolamina Sintética (USP - São Carlos) administradas, não

houve a necessidade de realizar tratamentos com doses intermediárias. Para confirmar que a maior dose que não promoveu efeitos tóxicos em machos é a mesma para as fêmeas, um grupo de três fêmeas foi tratado com a dose máxima estabelecida para machos (2.000 mg/kg). Os animais, machos e fêmeas, foram observados quanto aos sinais clínicos de toxicidade sistêmica (conforme a Planilha PL-110/versão atual). Como nenhum efeito tóxico foi observado na avaliação preliminar, a dose limite de Substância Teste, 2.000 mg/kg, foi utilizada no teste definitivo.

### 5.1.2. Teste Definitivo

Os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos distintos, contendo 10 animais por grupo (5 machos e 5 fêmeas). Um grupo foi tratado com a Substância Teste (2000 mg/kg, v.o.), outro grupo foi tratado com o veículo (controle negativo: água deionizada, 0,1 mL/10 g, v.o.) e o último grupo foi tratado com a Substância de Referência (controle positivo: ciclofosfamida 25 mg/kg, i.p.). Os animais receberam a Substância Teste (Fosfoetanolamina Sintética – USP, São Carlos) pela via oral durante três dias consecutivos, com intervalos de 24 horas entre os tratamentos. O grupo de animais que recebeu a Substância de Referência pela via intraperitoneal (controle positivo) foi tratado por apenas dois dias. Após 18 - 24 horas do último tratamento, os animais foram eutanasiados para coleta das medulas ósseas. O desenho experimental do teste definitivo está esquematizado na figura 1 abaixo.



**Figura 1:** Desenho experimental do teste definitivo de micronúcleos em medula óssea de camundongos.

## 5.2. Preparação das amostras de medula óssea

Os animais foram eutanasiados conforme POP-E.11/versão atual. Os dois fêmures foram retirados e lavados com solução de cloreto de sódio a 0,9%. A seguir, foram retiradas as duas extremidades (epífises) para expor o canal da medula. A medula óssea de cada fêmur foi extraída com auxílio de uma agulha acoplada a uma seringa de 1 mL, previamente preenchida com soro fetal bovino (aproximadamente 50 µL), assim cada animal gera duas lâminas, uma de cada medula. A agulha foi introduzida no canal e a medula foi empurrada diretamente sobre uma lâmina de vidro. A medula óssea foi homogeneizada e um fino esfregaço foi obtido com a ajuda de outra lâmina. Após 24 horas o material foi fixado com metanol absoluto por dez minutos e as células foram coradas com uma solução de Giemsa em tampão fosfato pH 5,8. Todas as lâminas foram codificadas antes da análise microscópica.

### 5.2.1. Análises das lâminas

As lâminas foram analisadas em microscópio óptico com objetiva de imersão (1.000 x) em diferentes campos. Primeiramente foi determinada a relação entre eritrócitos policromáticos (EPC: imaturos) e eritrócitos nomocromáticos (ENC: maduros) através da contagem de um total de 500 eritrócitos por lâmina (1.000 eritrócitos por animal). Para a identificação e quantificação dos micronúcleos, foram analisados 2.000 EPCs, por lâmina (totalizando 4.000 EPCs por animal). Os critérios para identificação dos micronúcleos foram o seu tamanho, a sua forma e a sua coloração. O micronúcleo deve ser arredondado ou oval, com contorno liso e definido, coloração azul escuro e deve ser 1/10 a 1/20 o tamanho do EPC.

## 5.3 Grupos experimentais

### 5.3.1. Teste preliminar

Grupos experimentais	Tratamento	Dose	Frequência de administração	Via e volume de administração
Controle Negativo (CN)	Água deionizada	N/A	1 vez ao dia/ 3 dias	v.o. (0,1 mL/10g)
Substância de Referência (Controle Positivo - CP)	Genuxal® (ciclofosfamida monoidratada)	25 mg/kg	1 vez ao dia/ 2 dias	i.p. (0,1 mL/10g)

<b>Substância Teste</b>	Fosfoetanolamina Sintética (USP –São Carlos)	8 mg/kg	1 vez ao dia/ 3 dias	v.o. (0,1 mL/10g)
<b>Substância Teste</b>	Fosfoetanolamina Sintética (USP –São Carlos)	50 mg/kg	1 vez ao dia/ 3 dias	v.o. (0,1 mL/10g)
<b>Substância Teste</b>	Fosfoetanolamina Sintética (USP –São Carlos)	320 mg/kg	1 vez ao dia/ 3 dias	v.o. (0,1 mL/10g)
<b>Substância Teste</b>	Fosfoetanolamina Sintética (USP –São Carlos)	2000 mg/kg	1 vez ao dia/ 3 dias	v.o. (0,1 mL/10g)

#### 5.3.2. Teste definitivo

<b>Grupos experimentais</b>	<b>Tratamento</b>	<b>Dose</b>	<b>Frequência de administração</b>	<b>Via e volume de administração</b>
<b>Controle Negativo (CN)</b>	Água deionizada	N/A	1 vez ao dia/ 3 dias	v.o. (0,1 mL/10g)
<b>Substância de Referência (Controle Positivo - CP)</b>	Genuxal® (ciclofosfamida monidratada)	25 mg/kg	1 vez ao dia/ 2 dias	i.p. (0,1 mL/10g)
<b>Substância Teste</b>	Fosfoetanolamina Sintética (USP –São Carlos)	2000 mg/kg	1 vez ao dia/ 3 dias	v.o. (0,1 mL/10g)

#### 5.4. Eutanásia

Antes da coleta das medulas ósseas, os animais foram eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub>, conforme POP-E.11/versão atual.

#### 5.5. Análise estatística

Os dados foram expressos como média ± desvio padrão da média. Para avaliação da diferença estatística entre os grupos experimentais foi utilizado o teste de “Kruskal-Wallis”. Os Valores de *p* menores que 0,05 foram considerados como indicativos de significância. O software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) foi utilizado para a realização das análises estatísticas.

Uma substância é considerada positiva quando apresentar aumento na frequência de células micronucleadas, aumento claro na frequência de células micronucleadas na dose mais alta e apresentar diferenças estatisticamente significativas na frequência de células micronucleadas entre os grupos teste e o grupo controle negativo (nível de significância de 5%). A Substância Teste é considerada negativa quando não existe aumento estatisticamente significativo na frequência de células micronucleadas entre os grupos teste e o grupo controle negativo, em qualquer tempo de amostragem.

## **6. RESULTADOS**

### **6.1. Teste preliminar**

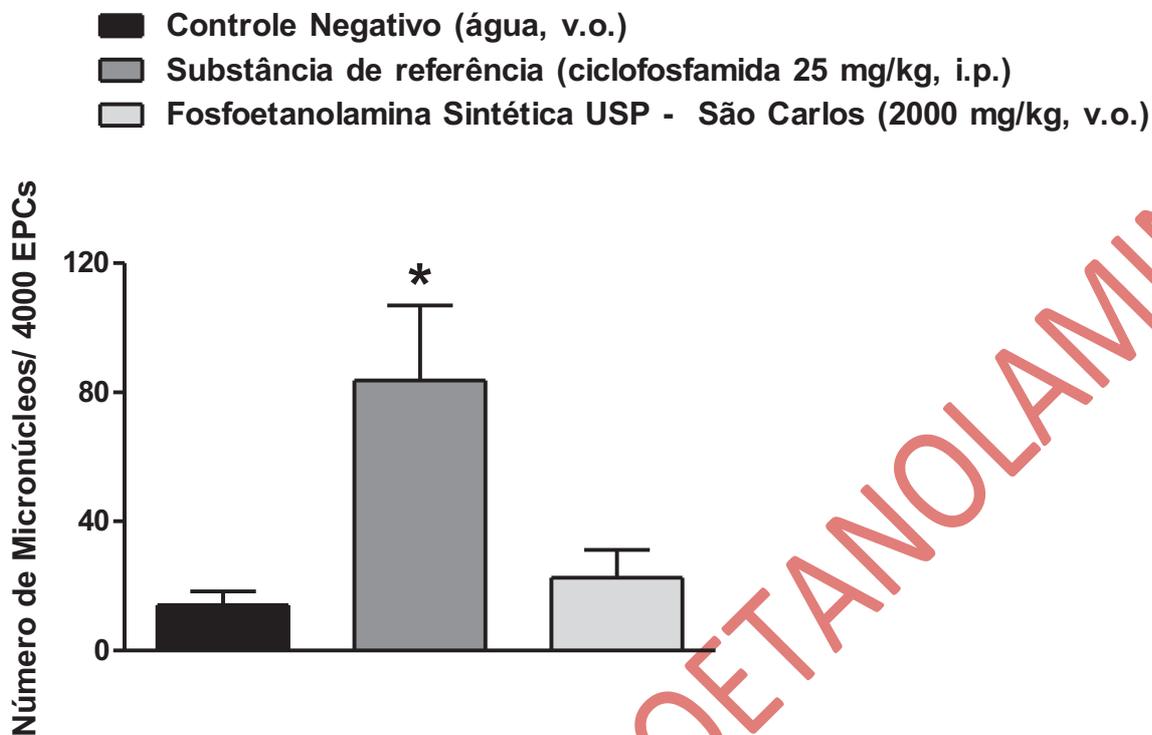
No teste preliminar, após o tratamento com a Substância Teste (Fosfoetanolamina Sintética – USP, São Carlos) durante 3 dias nas doses de 8, 50, 320 e 2.000 mg/kg, não foram observados sinais clínicos compatíveis com toxicidade. Dessa forma, a dose limite da Substância Teste (2000 mg/kg), foi utilizada no teste definitivo.

### **6.2. Teste definitivo**

No teste definitivo, a dose de 2000 mg/kg da Fosfoetanolamina Sintética – USP, São Carlos, administrada pela via oral, durante três dias consecutivos, não aumentou a frequência de micronúcleos em eritrócitos imaturos (EPCs), quando comparado ao grupo controle negativo (água), mostrando que a Substância Teste não promove lesões cromossômicas (Figura 2).

A proporção de EPC/ENC, não foi alterada com o tratamento realizado com a Substância Teste Fosfoetanolamina Sintética – USP, São Carlos, em comparação ao grupo controle negativo (água). A redução de EPCs em relação ao número de ENCs reflete toxicidade e depressão das células da medula óssea. Dessa forma, esses dados indicam a ausência de ação tóxica em relação às células da medula óssea.

A ciclofosfamida, Substância de Referência utilizada como controle positivo no teste, aumentou a frequência de micronúcleos em EPCs, em comparação ao grupo controle negativo (água), após tratamento durante 2 dias, com a dose de 25 mg/kg, via intraperitoneal (Figura 2).



**Figura 2:** Efeito da Substância Teste Fosfoetanolamina Sintética (USP – São Carlos), sobre a frequência de micronúcleos em eritrócitos imaturos (EPCs) da medula óssea de camundongos. Camundongos Swiss machos e fêmeas foram tratados com o veículo (controle negativo, água, 0,1 mL/10g, v.o.), com a Substância Teste (fosfoetanolamina, USP, São Carlos, 2000 mg/kg, v.o.) ou com a Substância de Referência (controle positivo), ciclofosfamida (25 mg/kg, i.p.), após 3 dias de tratamento com o veículo e Substância Teste e 2 dias de tratamento com a Substância de Referência, os animais foram eutanasiados e as medulas ósseas foram coletadas para a análise da frequência de micronúcleos e da proporção entre eritrócitos imaturos e maduras (EPC/ENC). Cada coluna representa a média  $\pm$  desvio padrão da média (n=10). A diferença com o grupo controle negativo (água) é indicado por \* $p < 0.05$  (teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn para comparações múltiplas).

## 7. CONCLUSÃO DO ESTUDO

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que o tratamento realizado com a Substância Teste Fosfoetanolamina Sintética (USP – São Carlos), não apresentou efeitos citotóxicos e genotóxicos em eritrócitos da medula óssea de camundongos, nas condições experimentais e doses utilizadas neste estudo.

## 8. REGISTRO DE DADOS BRUTOS

Todos os dados brutos e observações relacionadas ao estudo foram registrados em formulário adequado onde ficarão arquivados por 5 anos.

## 9. ARQUIVAMENTO

Uma cópia original do Plano de Estudo, Dados Brutos e Relatório Final foram arquivados no CIEnP, onde serão mantidos por 5 anos. A Substância Teste foi armazenada, em local apropriado no CIEnP e será mantida até a expiração de sua validade.

## 10. REFERÊNCIAS

Guia Brasileiro de Boas Práticas em Eutanásia em Animais - Conceitos e Procedimentos Recomendados. Conselho Federal de medicina Veterinária (CFMV), Brasília, 2013.

Mackay JM, Elliott BM. Dose-ranging and dose-setting for in vivo genetic toxicology studies. Mutation Res. 271: 97 – 99, 1992.

Nazam N, Lone MI, Shaikh S, Ahmad W. Assessment of genotoxic potential of the insecticide Dichlorvos using cytogenetic assay. Interdiscip Toxicol. 6 (2): 77 – 82, 2013.

OECD - Guideline for The Testing of Chemicals. Method 474 “Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test” (Adopted: 26st September 2014).

Recio L, Hobbs C, Caspary W, Witt KL. Dose-response assessment of four genotoxic chemicals in a combined mouse and rat micronucleus and comet assay. J Toxicol Sci. 35 (2): 149 – 162, 2010.

## DECLARAÇÃO DO DIRETOR DE ESTUDO

Eu, abaixo assinado, declaro que este estudo foi realizado sob a minha supervisão, conforme os procedimentos nele descritos. Os resultados apresentados referem-se às Substâncias Teste e de Referência utilizadas. As doses/concentrações utilizadas no presente estudo foram definidas pelo patrocinador.

*Cristina Freitas*

Dr<sup>a</sup>. Cristina Setim Freitas  
Diretora do Estudo

*11/04/2016*

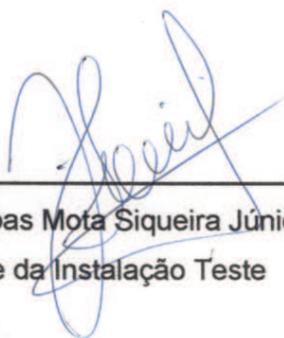
Data

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

**DECLARAÇÃO DO GERENTE DA INSTALAÇÃO TESTE, DIRETOR DE ESTUDO  
SUBSTITUTO E DIRETOR-PRESIDENTE**

Nós, abaixo assinados, declaramos que este estudo representa o registro preciso e verdadeiro dos resultados obtidos.

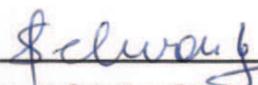
Este documento não deve ser reproduzido parcialmente.



Dr. Jarbas Mota Siqueira Júnior  
Gerente da Instalação Teste

11/04/2016

Data



Dra. Raquel Cristina Schwanke  
Diretor de Estudo Substituto

11/04/16

Data



Dr. João Batista Calixto  
Diretor-Presidente do CIEnP

11/04/16

Data