

RELATÓRIO FINAL

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E ANTIPROLIFERATIVA DA
MISTURA DE FOSFOETANOLAMINA + MONOETANOLAMINA (100:70) EM
LINHAGEM DE CÉLULAS HUMANAS DE CARCINOMA DE PULMÃO**

Estudo nº: 024-VIP-006-17

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

Esplanada dos Ministérios, Bloco E

Brasília, DF

SUMÁRIO

IDENTIFICAÇÃO	4
1. DECLARAÇÃO DE GARANTIA DA QUALIDADE	5
2. RESUMO	6
3. DATAS	8
4. OBJETIVO DO ESTUDO	8
5. EQUIPE DE PROJETO.....	8
6. SUBSTÂNCIA TESTE, SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA, VEÍCULO, REAGENTES E SOLVENTES	8
6.1. Caracterização da Substância Teste	8
6.2. Caracterização da Substância de Referência	9
6.3. Caracterização do Veículo.....	9
6.4. Caracterização de Material e Reagentes.....	9
6.5. Preparo da Substância Teste, da Substância de Referência e do Veículo	11
6.6. Seleção das concentrações da Substância Teste e Substância de Referência	11
6.7. Justificativa para a seleção das concentrações	11
7. SISTEMA TESTE.....	12
7.1 Justificativa para a seleção do Sistema Teste	12
7.2 Obtenção do Sistema Teste	12
8. ROBUSTEZ, RASTREABILIDADE E REPRODUTIBILIDADE DOS RESULTADOS	12
9. PROCEDIMENTOS DO ESTUDO	13
9.1. Desenho experimental.....	13
9.1.1 Determinação do melhor tempo de incubação da Substância Teste	13
9.1.2 Avaliação da atividade citotóxica e antiproliferativa de diferentes concentrações da Substância Teste	13
9.2. Metodologia.....	14
9.2.1 Avaliação da atividade citotóxica utilizando o método do MTT	14
9.2.2 Avaliação da atividade citotóxica utilizando o método do Vermelho Neutro	14
9.2.3 Avaliação da atividade antiproliferativa utilizando o método da Sulforrodamina B.	14
9.3 Grupos experimentais	15
9.4 Análise estatística.....	15
10. RESULTADOS.....	16
10.1 Determinação do melhor tempo de incubação da Substância Teste.....	16
10.2 Avaliação da atividade citotóxica em diferentes concentrações da Substância Teste, do pH correspondente e a Substância de Referência em células de carcinoma de pulmão humano	16

AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E ANTIPROLIFERATIVA DA MISTURA DE FOSFOETANOLAMINA + MONOETANOLAMINA (100:70) EM LINHAGEM DE CÉLULAS HUMANAS DE CARCINOMA DE PULMÃO

10.3 Avaliação da atividade antiproliferativa da Substância Teste, pH correspondente e a Substância de Referência em células de carcinoma de pulmão humano	19
11. CONCLUSÃO DO ESTUDO	20
12. REGISTRO DE DADOS BRUTOS	21
13. ARQUIVAMENTO	21
14. REFERÊNCIAS	21
14.1 Internas	21
14.2 Normativas	21
14.3 Literatura	22
15. DECLARAÇÃO DO DIRETOR DE ESTUDO.....	23
16. DECLARAÇÃO DO GERENTE DA INSTALAÇÃO TESTE E DIRETOR PRESIDENTE.	24

IDENTIFICAÇÃO

Título do Estudo	AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E ANTIPROLIFERATIVA DA MISTURA DE FOSFOETANOLAMINA + MONOETANOLAMINA (100:70) EM LINHAGEM DE CÉLULAS HUMANAS DE CARCINOMA DE PULMÃO
Número do Estudo	024-VIP-006-17
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-Clínicos Telefone: 48 32612856 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-Clínicos
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-Clínicos
Diretor de Estudo	Dr. Rodrigo Marcon Telefone: 48 32612856 E-mail: rodrigo.marcon@cienp.org.br Centro de Inovação e Ensaios Pré-Clínicos
Diretor de Estudo Substituto	Dr. Allisson Freire Bento Telefone: 48 32612856 E-mail: allisson.bento@cienp.org.br Centro de Inovação e Ensaios Pré-Clínicos
Unidade da Garantia da Qualidade	Franciele Avila Silveira Telefone: 48 32612856 E-mail: franciele.silveira@cienp.org.br Centro de Inovação e Ensaios Pré-Clínicos

1. 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	15/02/2017	15/02/2017	15/02/2017
Dados Brutos	28 e 29/06/2017	29/06/2017	29/06/2017
Relatório Final	29/06/2017	29/06/2017	29/06/2017

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

Auditoria de estudo nº 024-VIP-006-17

Florianópolis, 29 de junho de 2017.



Franciele Avila Silveira

Coordenadora da Unidade de Garantia da Qualidade

2. RESUMO

O presente estudo avaliou as atividades citotóxica e antiproliferativa da Substância Teste Fosfoetanolamina + Monoetanolamina (100:70), sintetizada pelo Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), em linhagem de células humanas de carcinoma de pulmão. A avaliação da citotoxicidade da Substância Teste foi realizada em etapas: a primeira teve por objetivo determinar o melhor tempo de incubação (24, 48, 72 ou 96 horas) da mistura Fosfoetanolamina + Monoetanolamina (0,01 – 10 mg/mL), utilizando o ensaio de citotoxicidade por MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina). Após a escolha do melhor tempo de incubação, o objetivo foi avaliar as atividades citotóxica e antiproliferativa da mistura Fosfoetanolamina + Monoetanolamina (0,1 – 10 mg/mL), utilizando os ensaios de citotoxicidade por MTT e vermelho neutro e o ensaio de proliferação por sulforrodamina B. A interferência do pH sobre a atividade da Substância Teste também foi verificada; assim, o pH de cada concentração da mistura Fosfoetanolamina + Monoetanolamina foi mensurado, e soluções de meio de cultura tiveram o pH ajustado para corresponder a cada concentração da Substância Teste. Por fim, a Substância de Referência utilizada foi a cisplatina nas concentrações de 0,3 a 30 μ M. Os compostos foram incubados sobre as células por 72 horas, o qual foi o melhor tempo de incubação determinado pela etapa anterior.

A mistura Fosfoetanolamina + Monoetanolamina não apresentou atividade citotóxica e antiproliferativa até a concentração de 3 mg/mL. Todavia, a concentração de 10 mg/mL foi capaz de reduzir de forma significativa a viabilidade celular em $46,7 \pm 3,6$ % pelo ensaio de MTT, e a proliferação celular em $66,3 \pm 10,8$ %, na linhagem de carcinoma de pulmão. No entanto, foi observado que o pH correspondente à concentração de 10 mg/mL (6,35) interferiu na viabilidade e na proliferação das células. De fato, a incubação das células com meio de cultura com o pH ajustado para 6,35 por 72 horas resultou em redução na viabilidade em $15,3 \pm 5,1$ % pelo método de MTT e $28,7 \pm 17,3$ % pelo vermelho neutro. Além disso, o pH de 6,35 também foi capaz de reduzir a proliferação celular em $50,8 \pm 10,8$ %. A Cisplatina, utilizada como substância de Referência, reduziu a viabilidade das células de carcinoma de pulmão com uma CI_{50} de 6,9 (3,1 – 15,7) μ M, atingido uma citotoxicidade de $88,6 \pm 1,1$ % na maior concentração testada (30 μ M), quando avaliada pelo método do MTT e CI_{50} de 2,9 (2,1 – 4,1) μ M com citotoxicidade de $78,4 \pm 2,9$ % no vermelho neutro. Além disso, reduziu a proliferação das A mistura Fosfoetanolamina + Monoetanolamina (100:70), quando incubada na maior concentração testada (10 mg/mL), reduziu tanto a viabilidade como a proliferação de células de carcinoma de pulmão humano (A549) nos dois métodos utilizados.

AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E ANTIPROLIFERATIVA DA MISTURA DE FOSFOETANOLAMINA + MONOETANOLAMINA (100:70) EM LINHAGEM DE CÉLULAS HUMANAS DE CARCINOMA DE PULMÃO

A baixa atividade citotóxica da Substância Teste sobre as células de carcinoma de pulmão humano (A549), nos métodos utilizados, parece ser pelo menos em parte, relacionado ao a redução pH do meio de cultura, uma vez que o pH de 6,35, o qual corresponde à concentração de 10 mg/mL, apresentou resultados semelhantes sobre a citotoxicidade e a proliferação celular quando comparado à mistura da Fosfoetanolamina + Monoetanolamina (100:70). Estes resultados mostram que a adição da monoetanolamina a fosfoetanolamina não confere a mistura aumento na atividade citotóxica observada em estudo anterior (024-VIP-008-16).

3. DATAS

Data do início do estudo: 15/02/2017

Data de início do experimento 20/02/2017

Data de término do experimento: 29/03/2017

Data de término do estudo: 29/06/2017

4. OBJETIVO DO ESTUDO

Avaliar a citotoxicidade e antiproliferativa da Substância Teste (Fosfoetanolamina + Monoetanolamina – 100:70) na linhagem celular de carcinoma de pulmão, pelos métodos de MTT, vermelho neutro e Sulforrodamina B.

5. EQUIPE DE PROJETO

Rodrigo Marcon, PhD	Diretor de Estudo
Daniela Ferraz Pereira Leite, PhD	Coordenadora de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação
Camila Guimarães Moreira, PhD	Bolsista
Evelyn Cristina da Silva Santos, PhD	Bolsista
Gabriela Segat, MsC	Bolsista

6. SUBSTÂNCIA TESTE, SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA, VEÍCULO, REAGENTES E SOLVENTES

6.1. Caracterização da Substância Teste

Nome	: Fosfoetanolamina + Monoetanolamina (100:70)
Nome químico (IUPAC)	: Não se aplica
Número do CAS	: Não se aplica
Lote	: MAD1338
Data de fabricação	: Não informado
Data de validade	: Não informado
Pureza/ Composição	: Não informado
Aspectos físicos	: Amarelo viscoso
Fabricante	: Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
Identificação CIEnP	: 024.6

* *Dados fornecidos pelo patrocinador*

AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E ANTIPROLIFERATIVA DA MISTURA DE FOSFOETANOLAMINA + MONOETANOLAMINA (100:70) EM LINHAGEM DE CÉLULAS HUMANAS DE CARCINOMA DE PULMÃO

6.2. Caracterização da Substância de Referência

Nome : Cisplatina
Nome químico (IUPAC) : cis- Diamnineplatinum(ii) dichloride
Número do CAS : 15663-27-1
Lote : *LRAA 5492
Data de validade : *31/12/2019
Pureza : *99,5 %
Fabricante : Sigma-Aldrich
Aspectos físicos : Pó amarelo

**Dados fornecidos pelo fabricante*

6.3. Caracterização do Veículo

Nome : Kaighn's Modification of Ham's F-12 Medium (F12-K)
Lote : 63820758
Data de validade : 03/2017
Fabricante : ATCC

6.4. Caracterização de Material e Reagentes

Nome : Ácido acético glacial
Lote : DCBC6885V
Data de validade : 10/2020
Fabricante : Vetec

Nome : Antibiótico-antimicótico
Lote : 105M4823V
Data de validade : 11/2017
Fabricante : Sigma-Aldrich

Nome : Ácido tricloroacético
Lote : 190899
Data de validade : 27/07/2018
Fabricante : Synth

Nome : Cloreto de cálcio
Lote : 26407
Data de validade : 03/2019
Fabricante : Lafan Química

Nome : Dimetilsulfóxido
Lote : 188387
Data de validade : 15/04/2018
Fabricante : Synth

AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E ANTIPROLIFERATIVA DA MISTURA DE FOSFOETANOLAMINA + MONOETANOLAMINA (100:70) EM LINHAGEM DE CÉLULAS HUMANAS DE CARCINOMA DE PULMÃO

Nome : Etanol
Lote : 195407
Data de validade : 28/01/2019
Fabricante : Synth

Nome : Formaldeído
Lote : 81045
Data de validade : 04/2020
Fabricante : Dinamica

Nome : MTT
Lote : MKBT7789V
Data de validade : 03/2020
Fabricante : Sigma-Aldrich

Nome : Soro Fetal Bovino
Lote : SPBB 1028
Data de validade : 30/08/2017
Fabricante : Sigma-Aldrich

Nome : Sulforrodamina B
Lote : MKBQ 1665V
Data de validade : 27/05/2020
Fabricante : Sigma-Aldrich

Nome : Tampão Fosfato de Sódio (PBS)
Lote : 40114018
Data de validade : 04/03/2019
Fabricante : Laborclin

Nome : Tripsina/EDTA
Lote : SLBP3635V
Data de validade : 08/03/2017
Fabricante : Sigma-Aldrich

Nome : Trizma Base
Lote : SLBH3501
Data de validade : 30/08/2019
Fabricante : Sigma-Aldrich

Nome : Vermelho neutro
Lote : MKBP6756V

AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E ANTIPROLIFERATIVA DA MISTURA DE FOSFOETANOLAMINA + MONOETANOLAMINA (100:70) EM LINHAGEM DE CÉLULAS HUMANAS DE CARCINOMA DE PULMÃO

Data de validade : 06/11/2019
Fabricante : Sigma-Aldrich

Nome : Metanol
Lote : DCBB0805
Data de validade : 10/2020
Fabricante : Vetec

Nome : Azul de tripan
Lote : 1627965
Data de validade : Não informado
Fabricante : Life Technologies

6.5. Preparo da Substância Teste, da Substância de Referência e do Veículo

A manipulação da Substância Teste e Substância de Referência foi realizada em condições estéreis em fluxo laminar. Após, foi realizada a avaliação do pH de todas as concentrações da Substância Teste e, em seguida, alíquotas de meio de cultura tiveram o pH ajustado para corresponder aos apresentados pelas concentrações da Substância Teste.

A solubilização e/ou diluição das Substâncias Teste e de Referência foram realizadas em meio Kaighn's Modification of Ham's F-12 Medium (F12-K). As soluções das Substâncias Teste em todas as concentrações e dos respectivos pHs correspondentes foram filtradas em filtro de 0,22 µm, previamente à incubação sobre as células.

6.6. Seleção das concentrações da Substância Teste e Substância de Referência

No teste para determinar o melhor tempo de incubação da Substância Teste foram utilizadas as concentrações de 0,01 a 10 mg/mL. Nos ensaios para a avaliação da citotoxicidade e atividade antiproliferativa em células humanas de carcinoma de pulmão, as concentrações utilizadas da Substância Teste foram: 0,1; 0,3; 1, 3 e 10 mg/mL. A Cisplatina foi avaliada nas concentrações de 0,3; 1; 3; 10 e 30 µM. As soluções de meio de cultura com os pHs correspondentes às concentrações da mistura da Fosfoetanolamina + Monoetanolamina (100:70) foram: 7,65 para a concentração de 0,1 mg/mL, 7,59 para 0,3 mg/mL, 7,29 para 1 mg/mL, 6,92 para 3 mg/mL e 6,35 para a 10 mg/mL, por fim o pH do veículo foi de 7,68.

6.7. Justificativa para a seleção das concentrações

As concentrações da mistura da Fosfoetanolamina + Monoetanolamina (100:70) foram selecionadas pelo CIEnP para fins de comparação aos resultados prévios oriundos do estudo 024-VIP-008-16. As concentrações da Substância de Referência foram selecionadas

AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E ANTIPROLIFERATIVA DA MISTURA DE FOSFOETANOLAMINA + MONOETANOLAMINA (100:70) EM LINHAGEM DE CÉLULAS HUMANAS DE CARCINOMA DE PULMÃO

através de dados oriundos do estudo 024-VIP-008-16 e da literatura (Kelland e Abel, 1992; Kovács AF e Pandita *et al.*, 2014).

7. SISTEMA TESTE

Linhagem	: A549 (ATCC® CCL-185™)
Tipo celular	: Carcinoma de pulmão
Espécie de origem	: <i>Homo sapiens</i> , humano
Sexo	: Masculino
Idade	: 58 anos
Tecido de origem	: Pulmão
Morfologia	: Epitelial
Propriedades de crescimento em cultura	: Aderente
Lote	: 62783414
Fabricante	: ATCC

7.1 Justificativa para a seleção do Sistema Teste

As células da linhagem de carcinoma de pulmão (A549) foram selecionadas como sistema teste do presente estudo, pois é uma linhagem celular internacionalmente utilizada na triagem de potenciais fármacos antitumorais (Fountzilias *et al.*, 1986; Burger e Fiebig, 2004; Kumar *et al.*, 2014; Gopaul *et al.*, 2015). Além disso, a linhagem A549 também foi utilizada no estudo prévio 024-VIP-008-16 para a avaliação da atividade citotóxica da fosfoetanolamina, monoetanolamina e fosbisetanolamina.

7.2 Obtenção do Sistema Teste

As linhagens celulares de carcinoma de pulmão (A549) foram adquiridas da “American Type Culture Collection” (ATCC) e imediatamente alocadas em nitrogênio líquido, conforme o POP-E.35/versão atual. Para o uso no presente estudo, as células foram descongeladas e cultivadas de acordo com as especificações do fornecedor: ATCC *product sheet* da A549 (ATCC® CCL-185™). Em seguida, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços para a realização dos ensaios.

8. ROBUSTEZ, RASTREABILIDADE E REPRODUTIBILIDADE DOS RESULTADOS

Visando reduzir ao máximo possíveis desvios que possam interferir na confiabilidade, rastreabilidade e reprodutibilidade dos resultados do estudo, foram empregados os critérios propostos pelo guia de boas práticas em cultura celular (Coecke *et al.*, 2005). Para isso, os seguintes procedimentos foram rigorosamente aplicados desde o planejamento até a realização dos experimentos: 1) Nenhum dado foi excluído ou incluído nos resultados para efeito de cálculo das médias e análise estatística; 2) Todos os reagentes foram obtidos de

fornecedores credenciados pelo CIEnP e utilizados dentro do prazo de validade indicado pelo Fabricante; 3) Todos os experimentos foram realizados em triplicata; 4) A média das triplicatas de cada experimento foi considerada como $n = 1$ (número experimental = 1); 5) Exceto na avaliação do melhor tempo de incubação da Substância Teste, os experimentos foram conduzidos de forma conjunta com seus respectivos controles (Substâncias de Referência) para a validação do método.

9. PROCEDIMENTOS DO ESTUDO

9.1. Desenho experimental

9.1.1 Determinação do melhor tempo de incubação da Substância Teste

Para este ensaio, foram plaqueadas 7×10^3 células/poço de células de carcinoma de pulmão (A549), em placas de cultura de 96 poços, contendo de 100 a 200 μL de meio de cultura Kaighn's Modification of Ham's F-12 Medium suplementado com soro fetal bovino (10 %). Após 24 horas de incubação em estufa de CO_2 , à $37 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,1^\circ\text{C}$ e $5\% \pm 0,1 \%$ de CO_2 , o meio de cultura foi substituído por meio contendo a Substância Teste (0,01 - 10 mg/mL) ou Veículo (meio de cultura). Decorridas 24, 48, 72 ou 96 horas de incubação, a citotoxicidade foi avaliada pelo método do MTT, conforme descrito no item 9.2.1 (Avaliação da atividade citotóxica utilizando o método do MTT).

9.1.2 Avaliação da atividade citotóxica e antiproliferativa de diferentes concentrações da Substância Teste

Para este ensaio, foram plaqueadas 7×10^3 células/poço de células de carcinoma de pulmão (A549), em placas de cultura de 96 poços, contendo de 100 a 200 μL de meio de cultura. Após 24 horas de incubação em estufa de CO_2 , à $37 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,1^\circ\text{C}$ e $5\% \pm 0,1 \%$ de CO_2 , o meio de cultura foi substituído por meio contendo: Veículo (meio de cultura), Substância Teste (0,1 – 10 mg/mL), Substâncias de Referência Cisplatina (0,3 – 30 μM), ou meio de cultura com pH ajustado para 7,65 (corresponde à concentração de 0,1 mg/mL), 7,59 (corresponde à concentração de 0,3 mg/mL), 7,29 (corresponde à concentração de 1 mg/mL) 6,92 (corresponde à concentração de 3 mg/mL) e 6,35 (corresponde à concentração de 10 mg/mL) e 7,68 (corresponde ao veículo). Decorridas 72 horas de incubação, a viabilidade celular foi analisada pelos métodos de MTT e vermelho neutro e a atividade antiproliferativa foi avaliada pelo método de Sulforrodamina B, conforme descritos nos itens 9.2.1 (Avaliação da atividade citotóxica utilizando o método do MTT), 9.2.2 (Avaliação da atividade citotóxica utilizando o método do Vermelho neutro) e 9.2.3 (Avaliação da atividade antiproliferativa utilizando o método da Sulforrodamina B).

9.2. Metodologia

9.2.1 Avaliação da atividade citotóxica utilizando o método do MTT

O ensaio de viabilidade celular foi realizado através do teste colorimétrico de redução do MTT, no qual células viáveis reduzem o sal de MTT, formando um complexo, formazan, no interior de suas mitocôndrias, como descrito previamente por Mosmann, (1983). Para este ensaio, após os tratamentos, o meio de cultura foi trocado por meio contendo o MTT (0,5 mg/mL), e incubado por aproximadamente 4 horas à $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ em atmosfera umidificada, contendo $5\% \pm 0,1\%$ de CO_2 . Posteriormente, o meio foi novamente retirado e foram adicionados 100 μL de dimetilsulfóxido -DMSO- (100%). A absorbância foi mensurada em 570 nm, utilizando o equipamento SpectraMax i3x (Molecular Devices). Os resultados foram expressos em porcentagem de células viáveis em relação ao controle. Quando possível, foi calculada a CI_{50} (concentração capaz de reduzir 50% da viabilidade) e a porcentagem de inibição.

9.2.2 Avaliação da atividade citotóxica utilizando o método do Vermelho Neutro

A fim de avaliar a atividade citotóxica dos compostos por um mecanismo distinto do MTT, também foi utilizada a metodologia de incorporação do corante vermelho neutro por células viáveis, como descrito anteriormente por Borenfreund e Puerner (1985). Este método analisa a citotoxicidade celular através da capacidade endocítica da célula, a qual irá captar mais ou menos corante de acordo com a integridade da membrana plasmática. O composto endocitado fica armazenado no lisossomo e, através de uma solução de eluição, é possível realizar a leitura de absorbância das amostras. Para este ensaio, após os tratamentos, o meio de cultura foi substituído por meio contendo o corante vermelho neutro, em uma concentração de 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e incubado por 4 horas a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ em atmosfera umidificada, contendo $5\% \pm 0,1\%$ de CO_2 . Em seguida as células foram lavadas com uma solução contendo cloreto de cálcio (1 %) e formaldeído (0,5 %) em tampão fosfato de sódio (PBS), e logo em seguida, o corante foi solubilizado em 100 μL da solução de eluição, contendo ácido acético (1 %) e etanol (50 %) em PBS. A quantificação do vermelho neutro foi verificada através da absorbância em 540 nm, utilizando o equipamento SpectraMax i3x (Molecular Devices). Os resultados foram expressos em porcentagem de células viáveis. Quando possível foi calculada a CI_{50} (concentração capaz de reduzir 50% da viabilidade) e a porcentagem de inibição.

9.2.3 Avaliação da atividade antiproliferativa utilizando o método da Sulforrodamina B.

O método para a avaliação da atividade antiproliferativa dos compostos foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Vichai e Kirtikara (2006). Este método analisa a proliferação celular através da habilidade da sulforrodamina B de se ligar a componentes

AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E ANTIPROLIFERATIVA DA MISTURA DE FOSFOETANOLAMINA + MONOETANOLAMINA (100:70) EM LINHAGEM DE CÉLULAS HUMANAS DE CARCINOMA DE PULMÃO

proteicos das células fixadas pelo ácido tricloroacético. Para este ensaio, células sem tratamento foram fixadas, conforme descrito abaixo e mantidas à temperatura ambiente até o final do protocolo experimental (Tempo 0, T0). Em seguida, outras células receberam os tratamentos. Após 72 horas, o meio de cultura foi retirado e foram adicionados 100 µL de ácido tricloroacético 20% gelado em cada poço para fixação das células. Após uma hora de fixação a 4 °C, as placas foram lavadas e deixadas para secar. Posteriormente, 50 µL de sulforrodamina B (0,1 %) foram adicionados em cada poço por 30 minutos. Em seguida, as placas foram lavadas com ácido acético 1 % por quatro vezes. Por fim, 100 µL de Trizma base 10 mM foram adicionados para solubilização da sulforrodamina B e as absorvâncias do T0 e dos tempos de incubação de cada linhagem foram quantificadas em 540 nm através do equipamento SpectraMax i3x (Molecular Devices). Os resultados foram expressos como porcentagem de inibição da proliferação (crescimento celular). Quando possível, foi calculada a CI_{50} (concentração capaz de reduzir 50% da proliferação) e a porcentagem de inibição.

9.3 Grupos experimentais

Tabela 1. Representação dos grupos experimentais, tratamentos, periodicidade, concentração, sistema teste e número experimental				
Grupos experimentais	Veículo	Substância Teste	Substância de Referência	pH correspondente
Tratamentos	Meio de Cultura	Fosfoetanolamina + Monoetanolamina (100:70)	Cisplatina	Meio de cultura com pH ajustado
Periodicidade	72 horas	72 horas	72 horas	72 horas
Concentrações	-	0,1 – 10 mg/mL	0,3 – 30 µM	6,35 - 7,68
Sistema Teste	Carcinoma de pulmão	Carcinoma de pulmão	Carcinoma de pulmão	Carcinoma de pulmão
Número experimental	3 em triplicata	3 em triplicata	3 em triplicata	3 em triplicata

9.4 Análise estatística

Os dados foram expressos como Média ± Erro Padrão da Média (EPM). Para avaliar a diferença estatística entre os grupos foi realizada análise de variância (ANOVA) de uma via seguido pelo teste de Dunnett's. Os valores de p menores que 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados como indicativos de significância. Foi utilizado o software GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) para as análises estatísticas. Os valores das CI_{50} foram calculados através de regressão não linear (dose resposta – inibição).

10. RESULTADOS

10.1 Determinação do melhor tempo de incubação da Substância Teste

Visando determinar o melhor tempo de incubação da Substância Teste, foi realizado um ensaio exploratório, conforme descrito no item 9.1.1. Conforme observado na Tabela 2, a incubação da mistura Fosfoetanolamina + Monoetanolamina (100:70) por 24, 48, 72 e 96 horas sobre as células da linhagem de carcinoma de pulmão (A549), alterou a viabilidade celular em ao menos 20% na maior concentração testada em todos os tempos avaliados. Sendo assim, o critério de escolha do tempo de incubação foi baseado no estudo anterior 024-VIP-008-16, onde os compostos foram incubados por 72 horas sobre as células de carcinoma de pulmão (A549).

Tabela 2: Avaliação do melhor tempo de incubação da Substância Teste sobre a linhagem celular de carcinoma de pulmão humano através da viabilidade celular por MTT.

TRATAMENTO	CONCENTRAÇÃO	VIABILIDADE CELULAR (%)			
		24 h	48 h	72 h	96 h
Veículo	-	100	100	100	100
Fosfoetanolamina + Monoetanolamina (100:70)	0,01 (mg/mL)	105,3	118,8	103,3	90,0
	0,1 (mg/mL)	104,2	120,0	99,4	90,3
	1 (mg/mL)	95,2	120,0	91,2	89,7
	10 (mg/mL)	57,9	68,1	47,1	34,0

10.2 Avaliação da atividade citotóxica em diferentes concentrações da Substância Teste, do pH correspondente e a Substância de Referência em células de carcinoma de pulmão humano

A incubação da Fosfoetanolamina + Monoetanolamina (100:70) nos meios de culturas nas concentrações de 0,1 a 10 mg/mL reduziu a viabilidade das células de carcinoma de pulmão. A concentração de 10 mg/mL foi a única que apresentou atividade citotóxica sobre as células, com inibição de $46,7 \pm 3,6$ % quando avaliada pelo método de MTT (Figura 1A), e $19,8 \pm 4,1$ %, quando avaliado pelo método de vermelho neutro (Figura 1B), no período de 72 horas de incubação.

Os valores de pH das concentrações da mistura Fosfoetanolamina + Monoetanolamina foram: 7,65 para a concentração de 0,1 mg/mL, 7,59 para a concentração de 0,3 mg/mL, 7,29 para a concentração de 1 mg/mL, 6,92 para a concentração de 3 mg/mL, 6,35 para a concentração de 10 mg/mL e 7,68 para o grupo veículo. Conforme observado na figura 1C e 1D, a incubação nas células de carcinoma de pulmão por 72 horas

AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E ANTIPROLIFERATIVA DA MISTURA DE FOSFOETANOLAMINA + MONOETANOLAMINA (100:70) EM LINHAGEM DE CÉLULAS HUMANAS DE CARCINOMA DE PULMÃO

com o meio de cultura com o pH ajustado para 6,35 (o qual corresponde ao pH observado na concentração de 10 mg/mL da Substância Teste), resultou em redução significativa na viabilidade em $15,3 \pm 5,1$ %, pelo método de MTT (Figuras 1C) e $28,7 \pm 17,3$ % pelo vermelho neutro (Figuras 1D).

O medicamento antitumoral cisplatina (0,3 μ M -30 μ M), utilizado como Substância de Referência, reduziu a viabilidade das células de carcinoma de pulmão com uma CI_{50} de 6,9 (3,1 – 15,7) μ M, atingido uma citotoxicidade de $88,6 \pm 1,1$ % na maior concentração testada (30 μ M) (Figura 1E), quando avaliado pelo método do MTT. Resultados semelhantes foram encontrados com o método do vermelho neutro; CI_{50} de 2,9 (2,1 – 4,1) μ M e citotoxicidade de $78,4 \pm 2,9$ % na maior concentração testada (30 μ M) de (Figura 1F).

AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E ANTIPROLIFERATIVA DA MISTURA DE FOSFOETANOLAMINA + MONOETANOLAMINA (100:70) EM LINHAGEM DE CÉLULAS HUMANAS DE CARCINOMA DE PULMÃO

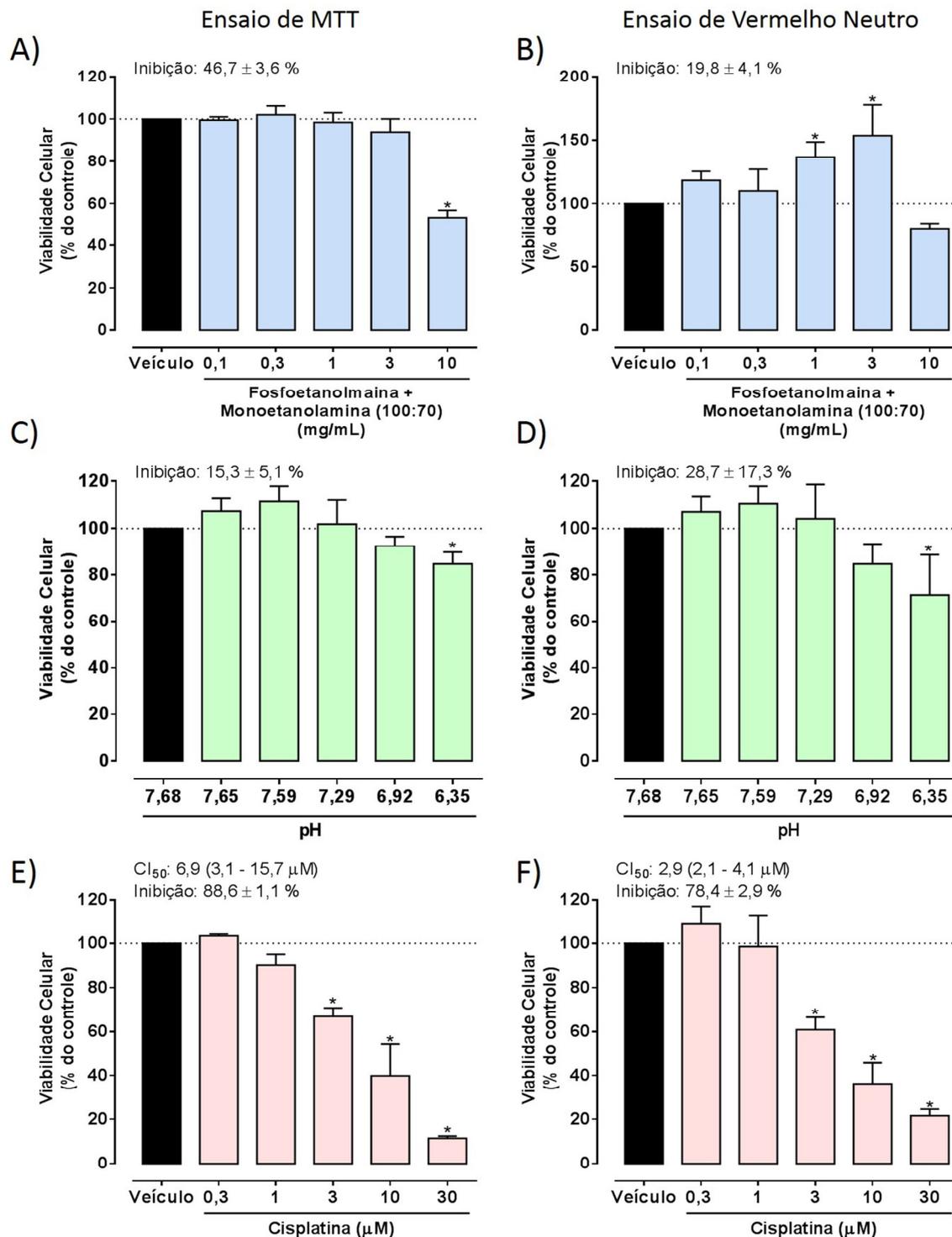


Figura 1. Avaliação da atividade citotóxica da Fosfoetanolamina + Monoetanolamina (100:70), do pH correspondente e da Cisplatina em células de carcinoma de pulmão humano. As células foram incubadas com Fosfoetanolamina + Monoetanolamina (0,1 a 10 mg/mL) (A, B), seus valores de pH correspondentes (7,68 a 6,35) (C e D) ou com a cisplatina (0,3 a 30 μM) por 72 horas. Após foi realizado o ensaio de **MTT** (A, C e E) ou **vermelho neutro** (B, D e F). As barras representam a média \pm erro padrão da média de 3 ensaios distintos. Para a análise estatísticas foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Dunnett's. Os valores de Cl_{50} foram calculados através de regressão não linear (dose resposta – inibição). A porcentagem de inibição foi calculada em relação ao grupo veículo.

10.3 Avaliação da atividade antiproliferativa da Substância Teste, pH correspondente e a Substância de Referência em células de carcinoma de pulmão humano

A Fosfoetanolamina + Monoetanolamina (100:70) foi testada nas concentrações de 0,1 a 10 mg/mL sobre as células de carcinoma de pulmão. Contudo, apenas a concentração de 10 mg/mL apresentou atividade antiproliferativa sobre as células, com inibição de $66,3 \pm 10,8$ % (Figuras 2A), no período de 72 horas de incubação.

O meio de cultura com os valores de pH ajustados para corresponder às concentrações da mistura da Fosfoetanolamina + Monoetanolamina resultou em redução da proliferação das células. Conforme observado na figura 2B, a incubação das células de carcinoma de pulmão por 72 horas com o meio de cultura com pH igual a 6,92 (o qual corresponde à concentração de 3 mg/mL) e o pH 6,38 (o qual corresponde à concentração de 10 mg/mL) resultou em inibição significativa da proliferação, apresentando $50,8 \pm 10,8$ % de redução da proliferação no pH de 6,35.

A Cisplatina, utilizada como substância de Referência reduziu a proliferação das células com valor de CI_{50} de 2,5 (1,8 – 3,6) μ M e inibição de 100 % (Figura 2C).

AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E ANTIPROLIFERATIVA DA MISTURA DE FOSFOETANOLAMINA + MONOETANOLAMINA (100:70) EM LINHAGEM DE CÉLULAS HUMANAS DE CARCINOMA DE PULMÃO

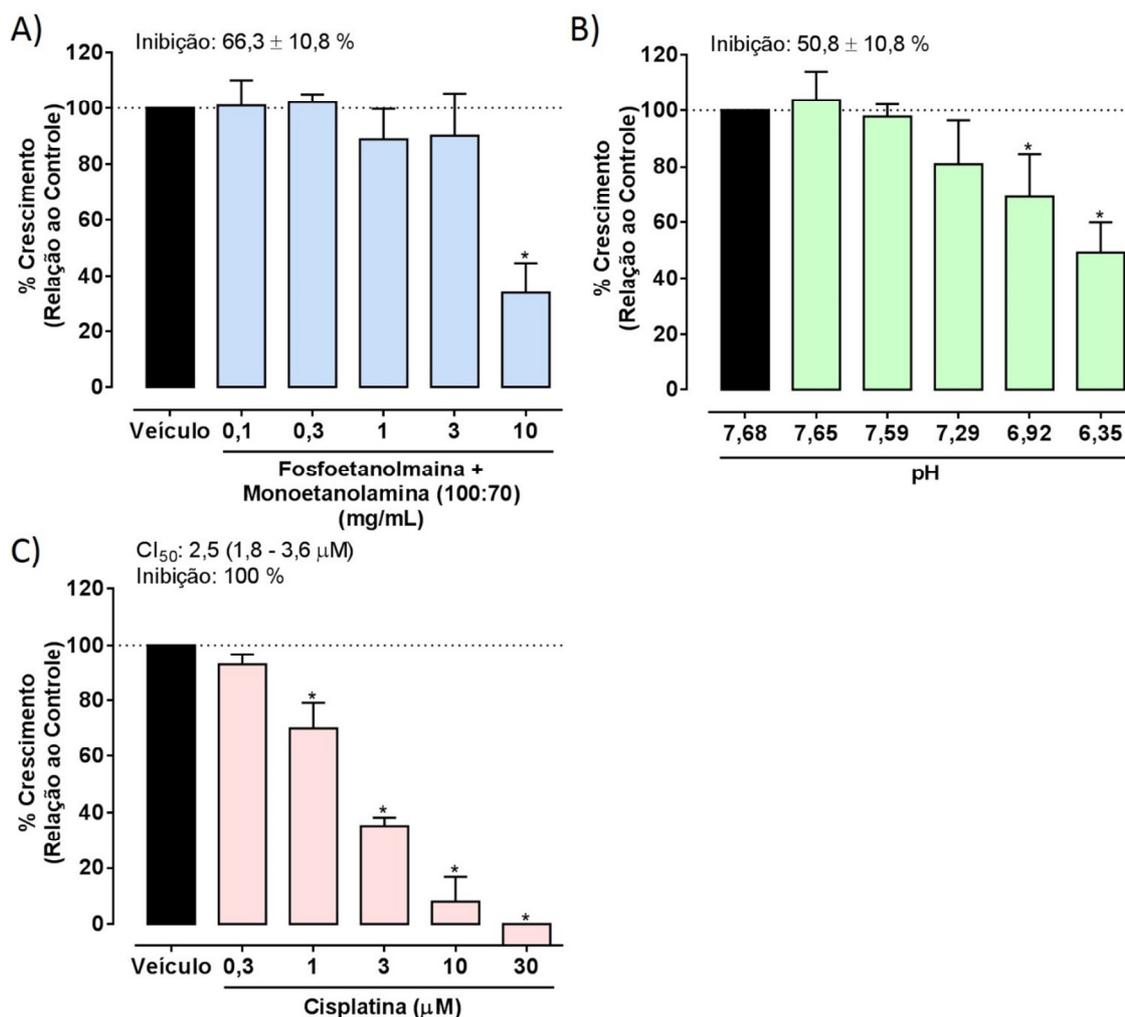


Figura 2. Avaliação da atividade antiproliferativa da Fosfoetanolamina + Monoetanolamina (100:70), do pH correspondente e da Cisplatina em células de carcinoma de pulmão humano. As células foram incubadas com Fosfoetanolamina + Monoetanolamina (0,1 a 10 mg/mL) (A), seus valores de pH correspondentes (7,68 a 6,35) (B) ou com a cisplatina (0,3 a 30 μ M) (C) por 72 horas. Após foi realizado o ensaio de proliferação celular através do método de **marcação proteica por Sulforrodamina B**. As barras representam a média \pm erro padrão da média de 3 ensaios distintos. Para as análises estatísticas foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Dunnett's. Os valores de CI_{50} foram calculados através de regressão não linear (dose resposta – inibição). A porcentagem de inibição foi calculada em relação ao grupo veículo.

11. CONCLUSÃO DO ESTUDO

Os resultados descritos neste relatório demonstram que:

A mistura Fosfoetanolamina + Monoetanolamina (100:70), quando incubada na maior concentração testada (10 mg/mL), reduziu parcialmente tanto a viabilidade como a proliferação de células de carcinoma de pulmão humano (A549) nos dois métodos utilizados. Esse efeito da Substância Teste sobre as células de carcinoma de pulmão humano (A549) parece ser, pelo menos em parte, relacionado ao pH do meio de cultura,

AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E ANTIPROLIFERATIVA DA MISTURA DE FOSFOETANOLAMINA + MONOETANOLAMINA (100:70) EM LINHAGEM DE CÉLULAS HUMANAS DE CARCINOMA DE PULMÃO

uma vez que o pH de 6,35, o qual corresponde à concentração de 10 mg/mL, apresentou resultados semelhantes sobre a citotoxicidade e proliferação quando comparado à mistura da Fosfoetanolamina + Monoetanolamina (100:70). Estes resultados mostram que a adição da monoetanolamina a fosfoetanolamina não confere a mistura aumento na atividade citotóxica observada em estudo anterior (024-VIP-008-16).

12. REGISTRO DE DADOS BRUTOS

Todos os dados gerados durante a condução do estudo foram registrados diretamente, prontamente, exatamente e de maneira legível, pela pessoa que gerou os dados (NIT-DICLA-035). Todos os dados brutos foram registrados em planilhas e/ou formulários adequados, assinados e datados.

13. 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.

14. REFERÊNCIAS

14.1 Internas

POP-D.18/versão atual – Método colorimétrico do MTT
POP-D.21/versão atual – Contagem de células através do CountessTM
POP-D.23/versão atual – Ensaio de proliferação celular
POP-D.27/versão atual – Método colorimétrico do Vermelho Neutro
POP-D.37/versão atual – Ensaio de citotoxicidade (viabilidade celular)
POP-E.17/versão atual – Subcultivo de células aderidas ou em suspensão
POP-E.39/versão atual – Controle de esterilidade de reagentes e Substâncias
POP-F.13/versão atual – Descarte de materiais contaminantes (Resíduos)

14.2 Normativas

Coecke S, Balls M, Bowe G, Davis J, Gstraunthaler G, Hartung T, Hay R, Merten OW, Price A, Schechtman L, Stacey G, Stokes W; Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice. Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice. *Altern Lab Anim.* 2005 Jun;33(3):261-87.

INMETRO – NIT – DICLA – 035 a 041 (versões atuais) “Boas Práticas de Laboratório – BPL”.

14.3 Literatura

Borenfreund E; Puerner JA. Toxicity determined in vitro morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol Lett.* 1985, 24(2-3): 119-24.

Burger A, Fiebig H. Preclinical Screening for New Anticancer Agents. Figg W e McLeod L. *Handbook of Anticancer Pharmacokinetics and Pharmacodynamics.* Springer, New York, 2004.

Coecke S; Balls M; Bowe G; Davis J; Gstraunthaler G, Hartung T, Hay R, Merten OW, Price A, Schechtman L, Stacey G, Stokes W. Guidance on good cell culture practice: a report of the second ECVAM task force on good cell culture practice. *Altern Lab Anim.* 2005, 33(3):261-87.

Fountzilias G, Gratzner H, Lim LO, Yunis AA. Comparative effects of selected drug combinations on the growth of a human pancreatic carcinoma cell line (MIA PaCa-2). *J. Natl. Cancer Inst.* 76: 37-43, 1986.

Gopaul K, Shintre SA, Koobanally NA. A Review on the Synthesis and Anti-cancer Activity of 2-substituted Quinolines. *Anticancer Agents Med Chem*;15(5):631-46, 2015.

Kelland LR; Abel G. Comparative in vitro cytotoxicity of taxol e taxotere against cisplatin-sensitive and –resistant human ovarian carcinoma cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1992, 30 (6): 444-50.

Kovács AF; Cinatl J. In vitro cytotoxic dose-relation of cisplatin and sodium thiosulphate in human tongue and oesophageal squamous carcinoma cell lines. *J. Craniomaxillofac Surg.* 2002, 30 (1):54-8.

Kumar R, Chaudhary K, Singla D, Gautam A, Raghava G. Designing of promiscuous inhibitors against pancreatic cancer cell lines. *Sci. Rep.* 4, 4668, 2014.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983 Dec 16;65(1-2):55-63.

Pandita A; Kumar B; Manvati S; Vaishnavi S; Singh SK; Bamezai RN. Synergic combination of gemcitabine and dietary molecules induces apoptosis in pancreatic cancer cells and down regulates PKM2 expression. *PLoS One*, 2014, 8:9(9).

Vichai V; Kirtikara K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat protoc.* 2006, 1(3):1112-6.



AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E ANTIPROLIFERATIVA DA MISTURA DE FOSFOETANOLAMINA + MONOETANOLAMINA (100:70) EM LINHAGEM DE CÉLULAS HUMANAS DE CARCINOMA DE PULMÃO

15. 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 a Substância Teste utilizada.

Dr. Rodrigo Marcon

Diretor do Estudo

Data

16. DECLARAÇÃO DO GERENTE DA INSTALAÇÃO TESTE E DIRETOR PRESIDENTE

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

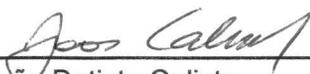
Este documento não deve ser reproduzido parcialmente.



Dr. Jarbas Mota Siqueira Junior
Gerente da Instalação Teste

29/06/2017

Data



Dr. João Batista Calixto
Diretor-Presidente do CIEnP

29/06/17

Data