



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
NÚCLEO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE
MEDICAMENTOS - NPDM
LABORATÓRIO DE ONCOLOGIA EXPERIMENTAL



LAUDO TÉCNICO DO ESTUDO DA FOSFOETANOLAMINA SINTÉTICA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTITUMORAL DA FOSFOETANOLAMINA SINTÉTICA
NO MODELO EXPERIMENTAL DE MELANOMA MURINO (NPDM – UFC)**

Código do Estudo: LOE 04/16

Data: 04/08/2016

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

odorico@ufc.br

TÉCNICOS:

Andréa Felinto Moura MSc - andreafmoura@gmail.com

Francisco Stefânio Barreto MSc - franciscostefanio@hotmail.com

Wesley Lyeverton Correia Ribeiro, MSc - wesley.ribeiro@ufc.br

Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos

Rua Coronel Nunes de Melo, 1000

Rodolfo Teófilo

Fortaleza – Ceará – Brasil

CEP: 60.430-275

(85) 999893459 (85) 3366-8201

AUTENTICAÇÃO DO RELATÓRIO

Versão: 04/08/2016

Cópia N.º 01

Declaro que todos os dados contidos neste relatório são acurados, completos, verdadeiros e correspondem aos obtidos durante o estudo coordenado pelo Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará.

Prof. Manoel Odorico de Moraes Filho, MD, PhD

Diretor

Laboratório de Oncologia Experimental

Núcleo de Pesquisa e de Desenvolvimento de Medicamentos

Faculdade de Medicina - Universidade Federal do Ceará

CEP 60430-275 Fortaleza – Ceará

Fone: 85-3366-8201 / 999893459

E-mail: odorico@ufc.br



Data: 05/08/2016

SUMÁRIO

1	LISTA DE ABREVIATURAS	4
2	INTRODUÇÃO	5
3	OBJETIVO	5
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	6
4.1	Desenho experimental.....	6
4.2	Local de execução da pesquisa.....	7
4.3	Obtenção e preparo da Fosfoetanolamina Sintética (FS).....	7
4.4	Reagentes	8
4.5	Obtenção e manutenção dos animais.....	8
4.6	Procedimentos Éticos.....	9
4.7	Linhagem celular	9
4.8	Manutenção da Linhagem celular.....	9
4.9	Inoculação do melanoma murino B16F10.....	10
4.10	Procedimento experimental	10
4.11	Análise estatística	11
5	RESULTADOS	12
5.1	Evolução ponderal dos animais durante o estudo.....	12
5.2	Avaliação do volume tumoral	13
5.3	Avaliação do peso tumoral.....	13
5.4	Avaliação hematológica	15
5.5	Alterações macroscópicas dos órgãos	17
5.6	Avaliação do peso relativo dos órgãos	17
5.7	Arquivamento dos resultados.....	19
6	CONCLUSÃO.....	19
7	BIBLIOGRAFIA	20
8	ANEXOS	Erro! Indicador não definido.

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

1 LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CIEnP	Centro de Inovação e Ensaios Pré-clínicos
CONCEA	Conselho Nacional de Experimentação Animal - CONCEA
FS	Fosfoetanolamina Sintética
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
HGB	Hemoglobina
HCT	Hematócrito
LOE	Laboratório de Oncologia Experimental
MCHC	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
MCTIC	Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovação e Comunicações
NIH	National Institute of Health - USA
Nubex	Biotério do Núcleo de Biologia Experimental
NPDM	Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos
NRC	National Research Council - USA.
PBS	Phosphate Buffer Solution
PCT	Procalcitonina
PDWc	Índice de Anisocitose Plaquetária
PLT	Plaquetas
RBC	Contagem de glóbulos vermelhos
RDWc	Amplitude de distribuição eritrocitária
TGF- α	Fator de crescimento e transformação alfa
TGF- β	Fator de crescimento e transformação beta
IL	Interleucina
UFC	Universidade Federal do Ceará
UNIFOR	Universidade de Fortaleza
VCM	Volume Corpuscular Médio
VPM	Volume Plaquetário Médio

2 INTRODUÇÃO

Apesar dos relatos do potencial antitumoral da Fosfoetanolamina Sintética (FS), a mesma não cumpriu os requisitos em testes pré-clínicos e clínicos necessários para o desenvolvimento de novos fármacos exigidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Com o intuito de preencher essa lacuna diversos estudos estão sendo conduzidos em alguns centros de pesquisas no Brasil, a fim de esclarecer os reais efeitos dessa molécula no tratamento do câncer (<http://www.mcti.gov.br/relatorios-fosfoetanolamina>).

No estudo inicial realizado *in vitro*, a FS não apresentou efeito antiproliferativo diante das linhagens de células tumorais e não tumorais testadas. Dando seguimento, foram realizados testes em dois modelos de tumores experimentais, utilizando o carcinossarcoma 256 de Walker (MORAES et al., 2016a) em ratos da linhagem Wistar e o Sarcoma 180 (MORAES et al., 2016b) em camundongos da linhagem Swiss. Nesses modelos, a FS não apresentou efeito antitumoral.

O melanoma é um dos tumores mais agressivos, devido ao seu elevado potencial metastático e a sua baixa resposta a terapia (SILVA et al., 2013), entretanto, esse tipo de tumor é capaz de ativar a resposta imune do hospedeiro e ativar a produção de fatores de crescimento e imunorregulatórios, como o fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fatores de crescimento e transformação alfa e beta (TGF- α e TGF- β), interleucinas IL-8 e IL-10 (HUSSEIN, 2005; BELARDELLI, FERRANTINI, 2002). Nesse sentido, o melanoma murino B16F10 tem sido usado extensivamente como um modelo animal de tumor imunogênico para estudo da imunoterapia em tumores experimentais (BAIRD et al., 2013).

3 OBJETIVO

O presente estudo teve como objetivo investigar o potencial antitumoral da Fosfoetanolamina Sintética (FS), administrada por via oral, em camundongos C57BL/6 inoculados com melanoma B16F10.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Desenho experimental

A **Figura 1** apresenta o desenho experimental onde estão descritas, resumidamente, todas as etapas deste trabalho.

Os animais foram aclimatados por sete dias antes do início do experimento. Em seguida, foi realizada a inoculação de células B16F10 por injeção subcutânea na região axilar esquerda dos animais. Após a inoculação os animais foram distribuídos aleatoriamente em cinco grupos de 10 animais:

Controle negativo (salina 0,9%);

FS 200 mg/kg;

FS 500 mg/kg;

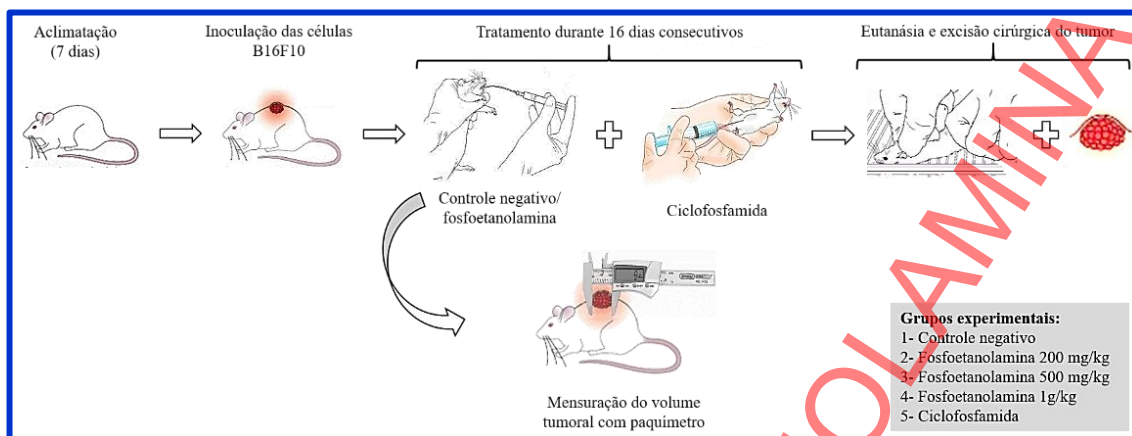
FS 1000 mg/kg; e

Controle positivo (Ciclofosfamida 25 mg/kg)

Após a inoculação das células foi realizado o tratamento dos animais durante 16 dias consecutivos, sendo que para controle negativo e para os grupos da FS foi utilizada a via oral, por gavagem, e o controle positivo foi administrado por via intraperitoneal.

Os tumores foram mensurados por meio de um paquímetro digital, previamente aferido e certificado. Após os 16 dias de tratamento, os animais foram anestesiados e em seguida, realizados a excisão cirúrgica do tumor.

Figura 1. Desenho experimental



Nota: A inoculação das células tumorais ocorreu na região axilar dos camundongos C57BL/6, a imagem usada aqui serve apenas para fins de compreensão. Crédito das imagens: www.clodosome.com/animal-injection; www.brl.uic.edu/node/37; www.medicinanet.com.br/m.

4.2 Local de execução da pesquisa

O estudo foi realizado no Laboratório de Oncologia Experimental (LOE) do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da Universidade Federal do Ceará – UFC.

4.3 Obtenção e preparo da Fosfoetanolamina Sintética (FS)

A FS foi fornecida pelo Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovação e Comunicações (MCTIC), sendo identificada como uma mistura de compostos: Fosfoetanolamina, Sal (de Ca^{2+}) de Fosfoetanolamina, Monoetanolamina e Fosfato de Cálcio.

Para verificação do potencial antitumoral *in vivo*, a FS foi pesada e diluída em soro fisiológico 0,9% (Fresenius Kabi Brasil Ltda.) para atingir as doses de 1000, 500 e 200 mg/kg do camundongo. Em seguida, a suspensão de FS foi submetida a um sonicador de ponta (Qsonica Sonicators) por cinco minutos,

sendo realizado a cada minuto em modo pulsado, com a amostra em gelo, seguindo as recomendações do Centro de Inovação e Ensaios Pré-clínicos - CIEnP.

O procedimento foi realizado diariamente e as doses foram ajustadas de acordo com a média do peso dos animais. As doses utilizadas no experimento foram determinadas de acordo com os estudos de toxicologia pré-clínica realizados pelo Centro de Inovação e Ensaios Pré-clínicos - CIEnP e que foram publicados em relatório executivo enviado ao MCTIC.

4.4 Reagentes

Todos os reagentes utilizados durante a realização do experimento para avaliar o potencial antitumoral da FS no Laboratório de Oncologia Experimental estavam dentro do prazo de validade estabelecido pelos fabricantes.

4.5 Obtenção e manutenção dos animais

Os animais foram adquiridos do Biotério do Núcleo de Biologia Experimental (Nubex) da Universidade de Fortaleza – UNIFOR. Foram utilizados 50 camundongos (*Mus musculus*, linhagem C57BL/6) machos, com idade de 4-5 semanas, pesando aproximadamente 25 g.

Os animais foram acondicionados em gaiolas de polisulfona medindo 44x31x21 cm, com tampas contendo filtros microisoladores, comedouro e encaixe para bebedouro e mantidas em racks com sistema de exaustão individualizado. A troca das gaiolas foi realizada duas vezes por semana em estação de troca/cabine de biossegurança.

Durante todo o experimento, os animais permaneceram em uma sala do biotério experimental do NPDM com condições controladas de temperatura ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), ar filtrado, com fotoperíodo de 12 horas de claro/escuro e umidade relativa de 60%, onde tiveram acesso à água potável filtrada e ração comercial em pellets

(Nuvilab®) *ad libitum*. Os animais foram mantidos em cama com maravalha irradiada, sendo aclimatados por sete dias antes do início do experimento. Todos os critérios de alimentação e ambiência atenderam às recomendações do *National Research Council (NRC)* e do *National Institute of Health (NIH)- USA*.

4.6 Procedimentos Éticos

A manutenção e manipulação dos animais durante a execução do projeto, eutanásia e descarte das carcaças foram realizadas em consonância com as resoluções do Conselho Nacional de Experimentação Animal - CONCEA (CONCEA, 2016). Os procedimentos adotados no uso de animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA da Universidade Federal do Ceará, com protocolo número: 36/16 e supervisionados por um profissional médico veterinário.

4.7 Linhagem celular

A linhagem tumoral utilizada para a avaliação da atividade antitumoral da Fosfoetanolamina Sintética foi a B16F10, obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro - BCRJ. A B16F10 é uma linhagem tumoral obtida de um melanoma espontâneo de camundongos isogênicos da linhagem C57BL/6.

4.8 Manutenção da Linhagem celular

O manuseio da linhagem ocorreu em ambiente estéril de uma 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). O cultivo celular foi realizado 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), suplementado com 10% de soro fetal bovino – SBF (Gibco) e 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco). A repicagem 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.

4.9 Inoculação do melanoma murino B16F10

Após o processo de obtenção da suspensão celular descrito no item anterior, as células foram centrifugadas durante 5 minutos a 1000 rpm. O *pellet* resultante foi ressuspendido em solução balanceada de Hank's com pH ajustado para 7,2. Após a contagem e determinação da viabilidade celular, dilui-se a suspensão para a concentração de 10^6 células/mL e inoculou-se 0,2 mL dessa suspensão por via subcutânea na região axilar de camundongos C57BL/6.

4.10 Procedimento experimental

Após a inoculação das células os animais foram divididos aleatoriamente em cinco grupos de 10 animais, sendo identificados e armazenados em microisoladores. Vinte e quatro horas após a inoculação das células, os animais foram tratados com 0,5 mL de Fosfoetanolamina Sintética (200, 500 e 1000 mg/kg de animal) por via oral, uma vez por dia. A Ciclofosfamida (25 mg/kg de animal) foi utilizada como controle positivo, sendo administrada por via intraperitoneal (0,3 mL), e o controle negativo recebeu 0,5 mL de veículo usado para a diluição da Fosfoetanolamina (soro fisiológico 0,9%) por via oral. O tratamento foi realizado durante 16 dias consecutivos. Os animais foram pesados a cada três dias para se obter dados sobre a evolução ponderal e para ajustar as doses da Fosfoetanolamina.

A progressão do crescimento tumoral foi acompanhada por meio da mensuração do tamanho do tumor, utilizando paquímetro digital (Vonder), a partir do décimo terceiro dia de tratamento, quando o tumor tornou-se mensurável em todos os animais dos grupos, até o décimo sétimo dia (dia da eutanásia).

Para calcular o volume tumoral (mm^3) foi utilizada a seguinte fórmula (STEEL, 1977):

$$\text{Volume do tumor (mm}^3\text{)} = (D \times d^2)/2$$

Onde:

D = medida do diâmetro maior (mm).

d = medida do diâmetro menor (mm).

Dezessete dias após o início do tratamento, os animais foram anestesiados e sangrados através plexo retro orbital para avaliação de parâmetros hematológicos. Em seguida, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical para a retirada, pesagem e fotografia do tumor, além da retirada e pesagem do fígado, baço, rins, estômago, pulmão, coração e cérebro. O percentual de crescimento tumoral (IT) foi calculado pela fórmula:

$$\text{IT (\%)} = \{[(A-B)/A] \times 100\} - 100$$

Onde:

A = média do peso dos tumores do grupo controle.

B = média do peso dos tumores nos animais tratados.

Após a pesagem, o tumor e os órgãos foram fixados em solução de formol a 10% tamponado com pH ajustado para 7,2 e, em seguida, corados com hematoxilina-eosina para posterior estudo histopatológico.

4.11 Análise estatística

Os dados foram analisados a partir da média e do erro padrão da média dos experimentos. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diversos grupos, utilizou-se a análise de variância (ANOVA)

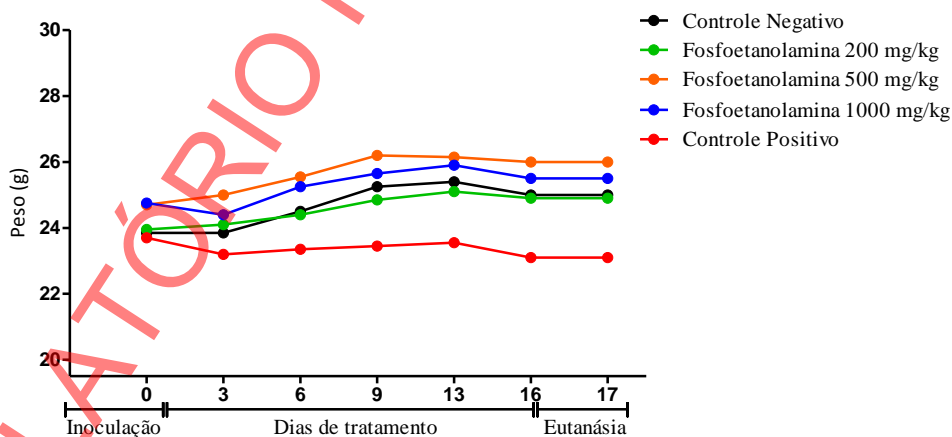
seguida de teste de Dunnett, com auxílio do programa Graph Pad Prism 5.0. Para todos os grupos considerou-se estatisticamente significativo quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Evolução ponderal dos animais durante o estudo

O ganho de peso dos animais foi avaliado a cada três dias e a média do peso do grupo foi usada para o cálculo da dose. A **Figura 2** mostra a evolução ponderal dos animais desde a inoculação do tumor até o dia da eutanásia, evidenciando discreto ganho de massa corpórea dos animais tratados com a Fosfoetanolamina juntamente com os animais do controle negativo. Na **Figura 2**, podemos notar ainda que os animais do grupo Ciclofosfamida não apresentaram ganho real de peso.

Figura 2. Curva de evolução ponderal dos animais C57BL/6 transplantados com tumor B16F10 durante o tratamento com a Fosfoetanolamina sintética (FS) (200, 500 e 1000 mg/kg/dia) administrada por via oral uma vez por dia. Ciclofosfamida (25 mg/kg/dia) foi utilizada como controle positivo e o veículo de diluição da FS, soro fisiológico 0,9%, foi utilizado como controle negativo.



Os valores correspondem à média de 10 animais por grupo.

5.2 Avaliação do volume tumoral

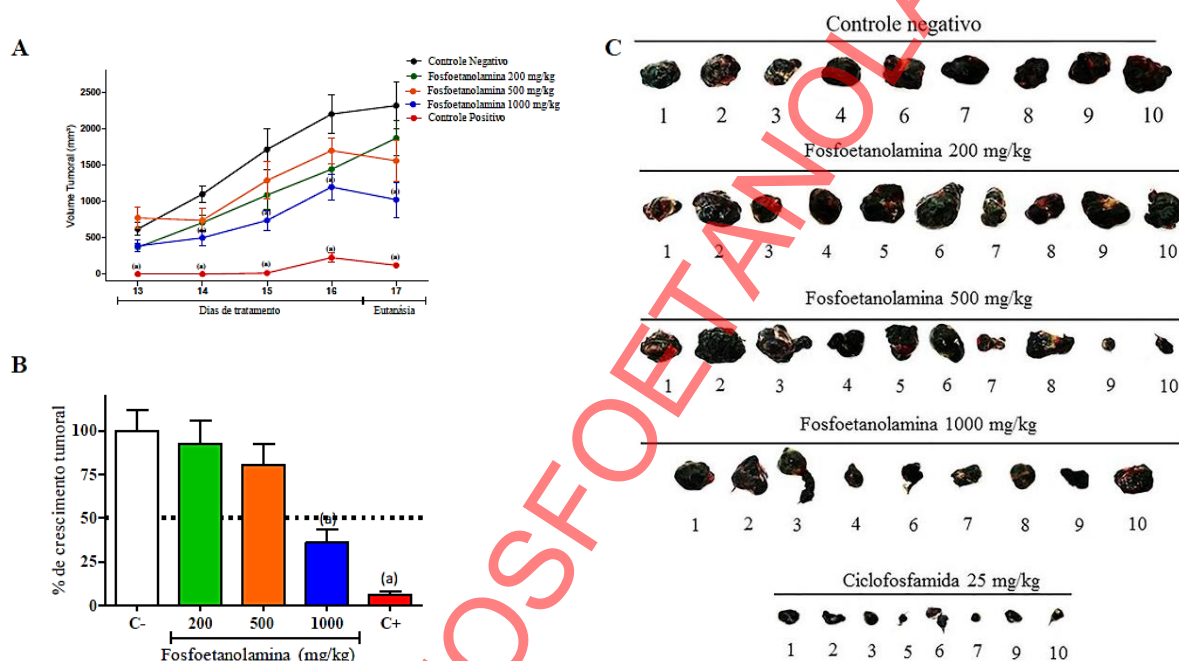
A partir do décimo terceiro dia de tratamento, quando os tumores apresentaram tamanho mensurável, até o décimo sétimo dia (eutanásia), foi realizada a medição do comprimento e da largura do tumor utilizando paquímetro digital, para o acompanhamento do crescimento tumoral. A partir do cálculo do volume tumoral (mm^3) (STEEL, 1977), foi possível observar que a cinética de crescimento do tumor nos animais tratados com Fosfoetanolamina sintética nas doses de 200 e 500 mg/kg foi semelhante ao controle negativo, enquanto que os animais tratados com a dose 1000 mg/kg e com a ciclofosfamida apresentaram redução de massa tumoral estatisticamente relevante quando comparado com os tumores do controle negativo (**Figura 3A**).

5.3 Avaliação do peso tumoral

Após a eutanásia e ressecção cirúrgica dos tumores, pôde-se observar homogeneidade na massa tumoral entre os grupos. Com base na média do peso dos tumores, notou-se também que não houve diferença estatística ($p < 0,0001$) entre os animais tratados com FS nas doses de 200 e 500 mg/kg quando comparado com o controle negativo, porém, houve diferença estatística nos animais tratados com a dose de 1000 mg/kg, apresentando redução de massa tumoral de 64%, o que pode ser observado no gráfico dos percentuais de crescimento do tumoral (**Figura 3B**) e pela fotografia dos tumores (**Figura 3C**). A Ciclofosfamida inibiu o crescimento tumoral em 93%.

Não foram observadas metástases macroscópicas em nenhum dos 50 animais utilizados no presente estudo. Os exames histopatológicos que estão em curso confirmarão a ausência ou não de metástases e complementarão os resultados apresentados neste relatório.

Figura 3. Efeito da Fosfoetanolamina Sintética (FS) (200, 500 e 1000 mg/kg/dia) administrada por via oral uma vez por dia sobre o crescimento tumoral em camundongos C57BL/6 inoculados com tumor B16F10. Ciclofosfamida (25 mg/kg) foi utilizada como controle positivo e o veículo de diluição da FS, soro fisiológico 0,9%, foi utilizado como controle negativo (C-). **(A)** Curva de evolução do volume tumoral (mm^3) mensurado por paquímetro digital a partir do décimo terceiro dia de tratamento até o décimo sétimo dia (eutanásia); **(B)** Percentual de crescimento tumoral com base na média do peso dos tumores, após a eutanásia; **(C)** Fotografia dos tumores após a excisão cirúrgica.



Os valores correspondem à média \pm erro padrão da média de 10 animais por grupo. (a) $p < 0,0001$ comparado com o controle negativo por ANOVA seguida pelo teste *post hoc* de Dunnett.

Como se observa na figura 3 houve crescimento tumoral uniforme em todos os animais do controle negativo e redução significativa de massa tumoral nos animais tratados com a Ciclofosfamida, o que valida o estudo.

5.4 Avaliação hematológica

Na avaliação hematológica (**Tabela 1**), os animais tratados com FS na dose de 1000 mg/kg apresentaram uma diminuição no número de leucócitos ($p < 0,02$) e de plaquetas ($p < 0,01$) quando comparado com o grupo controle negativo. Não foi observado diferença estatística nos demais parâmetros avaliados nos animais tratados com FS, com exceção da procalcitonina, que se mostrou reduzida nas doses de 200 e 500 mg/kg. Ademais, a contagem de leucócitos ($p < 0,001$), linfócitos ($p < 0,001$), monócitos ($p < 0,05$) foi significativamente inferior ao controle negativo. Plaquetas e procalcitonina foram parâmetros que apresentaram elevação no grupo tratado com ciclofosfamida ($p < 0,001$).

RELATÓRIO FOSFOETANOGRAMA

Tabela 1. Avaliação dos parâmetros hematológicos de camundongos C57BL/6 transplantados com B16F10 após 16 dias de tratamento com Fosfoetanolamina Sintética (FS) (200, 500 e 1000 mg/kg/dia). Ciclofosfamida (25 mg/kg) foi utilizada como controle positivo e o veículo de diluição da FS, soro fisiológico 0,9%, foi utilizado como controle negativo.

Parâmetro (unidade)	Controle Negativo	FS 200 mg/kg	FS 500 mg/kg	FS 1000 mg/kg	Controle Positivo
Leucócitos ($10^9/L$)	10,21 ± 0,93	8,28 ± 0,99	7,50 ± 1,21	6,43 ± 0,64 ^c	2,57 ± 0,33 ^b
Linfócitos ($10^9/L$)	7,23 ± 1,20	4,58 ± 0,76	5,29 ± 0,84	4,78 ± 0,78	1,29 ± 0,29 ^b
Monócitos ($10^9/L$)	0,58 ± 0,09	0,53 ± 0,06	0,35 ± 0,06	0,32 ± 0,07	0,22 ± 0,04 ^a
Granulócitos ($10^9/L$)	2,40 ± 0,34	3,64 ± 0,47	2,42 ± 0,47	1,36 ± 0,29	1,43 ± 0,22
RBC ($10^{12}/L$)	7,68 ± 0,38	7,81 ± 0,58	6,84 ± 0,64	8,70 ± 0,49	8,21 ± 0,12
HGB (g/dL)	11,32 ± 0,56	11,47 ± 0,86	9,93 ± 0,94	12,60 ± 0,72	12,55 ± 0,12
HCT (%)	37,41 ± 1,70	36,93 ± 2,62	32,88 ± 2,83	41,35 ± 2,23	39,58 ± 0,40
VCM (fl)	49,00 ± 0,55	47,29 ± 0,86	48,56 ± 0,78	47,57 ± 0,43	48,20 ± 0,41
MCH (pg)	14,80 ± 0,14	14,73 ± 0,25	14,53 ± 0,33	14,49 ± 0,19	15,28 ± 0,12
MCHC (%)	30,30 ± 0,12	31,04 ± 0,19	29,98 ± 0,46	30,50 ± 0,52	31,68 ± 0,16 _b
RDWc (%)	15,84 ± 0,27	14,99 ± 0,19	15,48 ± 0,29	15,84 ± 0,29	17,08 ± 0,33 _b
PLT ($10^9/L$)	1109 ± 27,87	684,7 ± 83,66 ^b	589,4 ± 60,92 ^b	734,6 ± 81,08 ^b	1575 ± 64,91 _b
PCT (%)	0,59 ± 0,04	0,40 ± 0,05 ^b	0,33 ± 0,03 ^b	0,42 ± 0,05	0,92 ± 0,04 ^b
VPM (fl)	5,80 ± 0,10	5,87 ± 0,18	5,88 ± 0,05	5,70 ± 0,03	5,87 ± 0,07
PDWc (%)	30,98 ± 0,48	31,39 ± 0,40	31,13 ± 0,24	30,71 ± 0,47	31,13 ± 0,28

Contagem de glóbulos vermelhos (RBC); Hemoglobina (HGB); Hematócrito (HCT); Volume Corpuscular Médio (VCM); Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (MCHC); Amplitude de distribuição eritrocitária (RDWc); Plaquetas (PLT); Procalcitonina (PCT); Volume Plaquetário Médio (VPM); Índice de Anisocitose Plaquetária (PDWc).

Os valores correspondem à média ± erro padrão da média de 15 animais por grupo. (a) $p < 0,05$; (b) $p < 0,001$; (c) $p < 0,02$ comparado com o controle negativo por ANOVA seguida pelo teste *post hoc* de Dunnett.

5.5 Alterações macroscópicas dos órgãos

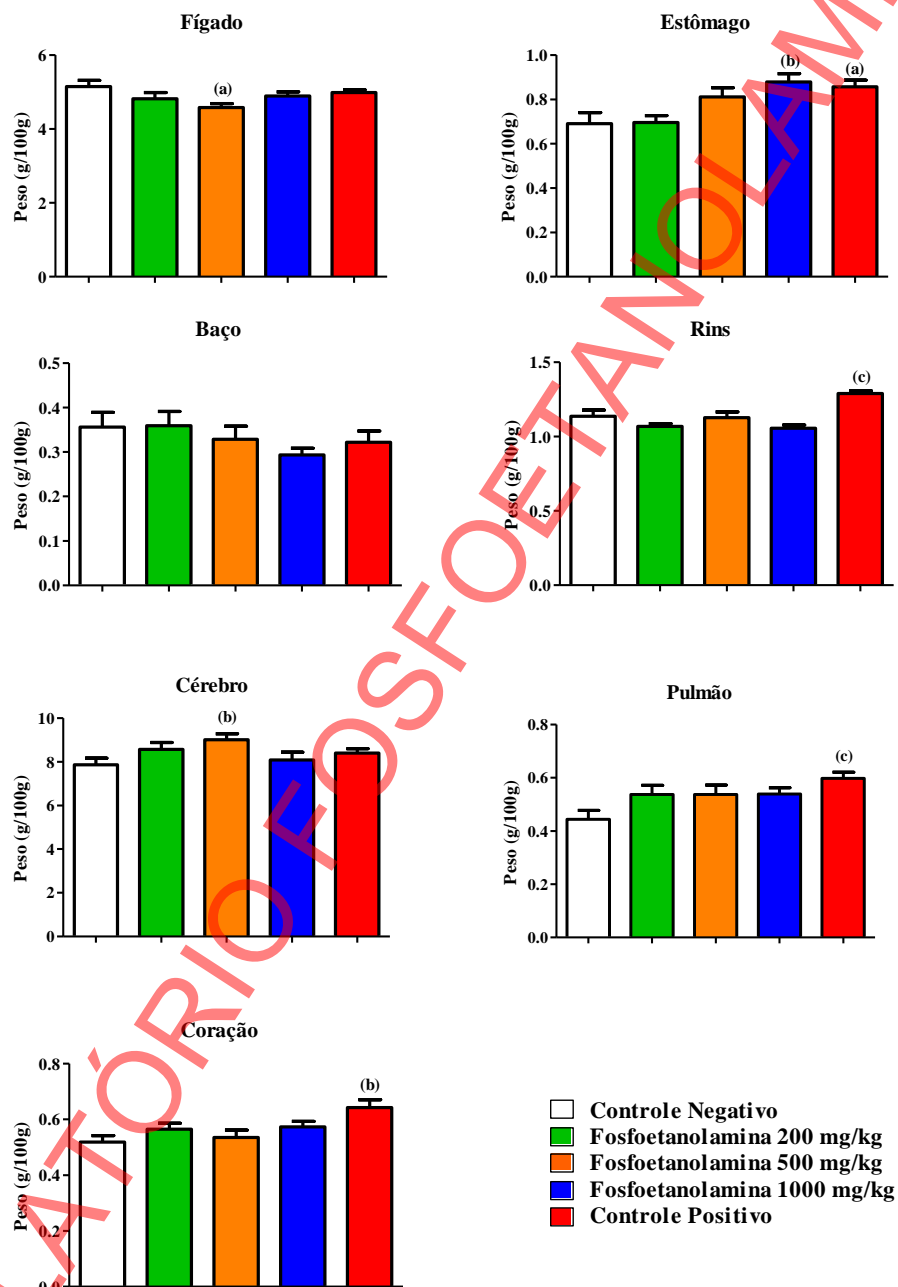
Não foram encontradas alterações macroscópicas dignas de nota nos órgãos estudados (fígado, estômago, baço, rins, pulmão, coração e cérebro).

5.6 Avaliação do peso relativo dos órgãos

Todos os órgãos foram pesados, sendo possível observar que houve alterações no peso relativo úmido do fígado, cérebro e estômago nos animais tratados com FS (500 e 1000 mg/kg) quando comparado com o controle negativo. A Ciclofosfamida aumentou de forma significativa o peso relativo úmido do estômago, rins, pulmão e coração. Não houve diferença no peso relativo do baço (Figura 4).

RELATÓRIO FOSFOETILANOLAMINA

Figura 4. Efeito da Fosfoetanolamina Sintética (FS) (200, 500 e 1000 mg/kg/dia) administrada por via oral sobre a massa dos órgãos dos camundongos C57BL/6 (g/100g de massa corpórea) transplantados com B16F10, após 16 dias de tratamento com FS. Ciclofosfamida (25 mg/kg) foi utilizada como controle positivo e o veículo de diluição da FS, soro fisiológico 0,9%, foi utilizado como controle negativo.



Os valores correspondem à média \pm erro padrão da média de 10 animais por grupo. (a) $p < 0,05$; (b) $p < 0,001$; (c) $p < 0,02$, comparado com o controle negativo por ANOVA seguida pelo teste *post hoc* de Dunnett.

5.7 Arquivamento dos resultados

Todos os resultados brutos obtidos no presente estudo estão registrados em formulários adequados e serão arquivados para possíveis averiguações por 5 anos.

6 CONCLUSÃO

A partir do ensaio antitumoral *in vivo* realizado neste trabalho, observou-se que a Fosfoetanolamina Sintética não apresentou efeito antitumoral nas doses de 200 e 500 mg/kg nos animais inoculados com tumor sólido do tipo melanoma. No entanto, a dose de 1000 mg/kg, administrada uma vez ao dia, durante 16 dias consecutivos, foi eficaz em reduzir significativamente (64%) o crescimento do melanoma B16F10.

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

7 BIBLIOGRAFIA

Baird JR, Byrne KT, Lizotte PH, Toraya-Brown S, Scarlett UK, Alexander MP, Sheen MR, Fox BA, Bzik DJ, Bosenberg M, Mullins DW, Turk MJ, Fiering S. Immune-mediated regression of established B16F10 melanoma by intratumoral injection of attenuated *Toxoplasma gondii* protects against rechallenge. **J. Immunol.** 190(1):469-78, 2013.

Belardelli F, Ferrantini M. Cytokines as a link between innate and adaptive antitumor immunity. **Trends Immunol.** 23: 201-208, 2002.

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

Hussein MR. Tumour-infiltrating lymphocytes and melanoma tumorigenesis: an insight. **British J. Dermatol.** 153: 18-21, 2005.

Ministério da Ciência, tecnologia, Inovações e Comunicações. Pesquisa em Fosfoetanolamina. <http://www.mcti.gov.br/relatorios-fosfoetanolamina>. Acesso em: 04/08/2016.

Moraes Filho, M. O.; Moura, A. F.; Barreto, F. S.; Ribeiro, W. L. C. Avaliação da Atividade Anticâncer da Fosfoetanolamina Sintética (FS) no Sarcoma 180. 2016. (Relatório de pesquisa).

Moraes Filho, M. O.; Moura, A. F.; Barreto, F. S.; Ribeiro, W. L. C. Avaliação da Atividade Anticâncer da Fosfoetanolamina Sintética no Carcinossarcoma 256 de Walker. 2016. (Relatório de pesquisa).

Silva CFN, Melo GP, Bernardes SS, Cecchini AA. Modelos experimentais de melanoma murino *in vivo*. **Biosaúde.** 15(2): 73-80, 2013.

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