

RELATÓRIO FINAL

**AValiação DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DA FOSFOETANOLAMINA SINTÉTICA
(USP – SÃO CARLOS) EM MODELO DE TUMOR XENOGRÁFICO DE MELANOMA
HUMANO EM CAMUNDONGOS**

Estudo nº: 021-TXS-003-16

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

Esplanada dos Ministérios, Bloco E

Brasília, DF



AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DA FOSFOETANOLAMINA SINTÉTICA (USP – SÃO CARLOS) EM MODELO DE TUMOR XENOGRÁFICO DE MELANOMA HUMANO EM CAMUNDONGOS

SUMÁRIO

IDENTIFICAÇÃO	4
DECLARAÇÃO DE GARANTIA DA QUALIDADE	5
RESUMO	6
Datas	7
1. OBJETIVOS DO ESTUDO	7
2. PESSOAL ENVOLVIDO	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	8
3.3 Caracterização do Veículo	8
3.4 Caracterização de Reagentes e Solventes utilizados no estudo	8
3.5 Preparação da Substância Teste, da Substância de Referência e do Veículo	9
3.6 Doses e vias de administração	10
3.7 Justificativa para a seleção das doses e vias de administração	10
4. SISTEMA TESTE	10
4.1 Justificativa para a seleção do Sistema Teste	11
4.2 Comitê de ética	11
4.3 Alojamento dos Animais	11
4.3.1 Biotério de Criação	11
4.3.2 Aclimação no Biotério de Manutenção	12
4.4 Identificação dos Animais	12
5. ROBUSTEZ, RASTREABILIDADE, CONFIABILIDADE E REPRODUTIBILIDADE DOS RESULTADOS	12
6. PROCEDIMENTOS DO ESTUDO	12
6.1 Desenho experimental	12
6.2 Metodologia	13
6.2.1 Indução do tumor xenográfico em camundongos nude	13
6.2.2 Tratamentos	13



AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DA FOSFOETANOLAMINA SINTÉTICA (USP – SÃO CARLOS) EM MODELO DE TUMOR XENOGRÁFICO DE MELANOMA HUMANO EM CAMUNDONGOS

6.2.3 Avaliação do volume tumoral	14
6.3 Grupos experimentais	14
6.4 Eutanásia	15
6.5 Análise estatística.....	15
7. RESULTADOS.....	15
7.1 Indução do tumor xenográfico subcutâneo	15
7.2 Randomização dos animais nos grupos experimentais	15
7.3 Efeito da Fosfoetanolamina Sintética (USP - São Carlos) sobre o crescimento tumoral e o peso corporal.....	16
7.4 Efeito da Fosfoetanolamina Sintética (USP-São Carlos) sobre o peso tumoral no 36º dia do estudo.....	19
7.5 Efeito dos tratamentos sobre a morbidade, mortalidade, ulcerações tumorais e presença de metástase	20
8. CONCLUSÃO DO ESTUDO	20
9. REGISTRO DE DADOS BRUTOS	20
10. ARQUIVAMENTO	20
11. REFERÊNCIAS	21
DECLARAÇÃO DO DIRETOR DE ESTUDO	23
DECLARAÇÃO DO GERENTE DA INSTALAÇÃO TESTE E DIRETOR DE ESTUDO SUBSTITUTO	24



AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DA FOSFOETANOLAMINA SINTÉTICA (USP – SÃO CARLOS) EM MODELO DE TUMOR XENOGRÁFICO DE MELANOMA HUMANO EM CAMUNDONGOS

IDENTIFICAÇÃO

Título do Estudo	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DA FOSFOETANOLAMINA SINTÉTICA (USP – SÃO CARLOS) EM MODELO DE TUMOR XENOGRÁFICO DE MELANOMA HUMANO EM CAMUNDONGOS
Número do Estudo	021-TXS-003-16
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
Diretor de Estudo	Dr. Rodrigo Marcon Telefone: 48 32612856 E-mail: rodrigo.marcon@cienp.org.br Centro de Inovação e Ensaios Pré-Clinicos Av. Luiz Boiteux Piazza, 1302 Florianópolis – SC - Brasil CEP 88056-000
Diretor de Estudo Substituto	Dr^a. 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
Unidade da Garantia da Qualidade	Franciele Avila Silveira Telefone: 48 32612856 E-mail: franciele.silveira@cienp.org.br



AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DA FOSFOETANOLAMINA SINTÉTICA (USP – SÃO CARLOS) EM MODELO DE TUMOR XENOGRÁFICO DE MELANOMA HUMANO EM CAMUNDONGOS

DECLARAÇÃO DE GARANTIA DA QUALIDADE

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

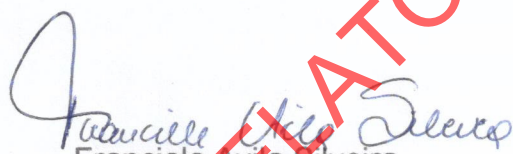
Declaro que foram realizadas auditorias, conforme descrito abaixo, não sendo observadas não conformidades que pudessem afetar a qualidade dos resultados.

Itens Auditados	Data da Auditoria	Data de relato ao DE*	Data de relato ao GIT#
Plano de Estudo	15/02/2016	15/02/2016	15/02/2016
Dados Brutos	24/05/2016	24/05/2016	24/05/2016
Relatório Final	25/05/2016	25/05/2016	25/05/2016

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

Auditoria de estudo nº 021-TXS-003-16

Florianópolis, 25 de Maio de 2016.


Franciele Avila Silveira

Coordenadora da Unidade de Garantia da Qualidade



AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DA FOSFOETANOLAMINA SINTÉTICA (USP – SÃO CARLOS) EM MODELO DE TUMOR XENOGRÁFICO DE MELANOMA HUMANO EM CAMUNDONGOS

RESUMO

O presente estudo teve por objetivo investigar a possível atividade antitumoral da Fosfoetanolamina Sintética (USP-São Carlos), administrada pela via oral em animais, através da utilização do modelo de tumor xenográfico subcutâneo de melanoma humano em camundongos *Nude atímico* (*NU(NCr)-Foxn1^{nu}*).

As células tumorais da linhagem de melanoma humano (A-375) foram implantadas no dorso dos animais e no décimo segundo dia após o implante das células, quando o tumor apresentou volume entre 50 mm³ a 200 mm³, os animais foram distribuídos de forma aleatória nos quatro grupos experimentais, a fim de que os grupos apresentassem uniformidade quanto ao volume tumoral. Em seguida iniciou-se o tratamento com o veículo (solução de cloreto de sódio 0,9%), com a Fosfoetanolamina Sintética (USP-São Carlos) nas doses de 200 mg/kg e 500 mg/kg, pela via oral ou com a Cisplatina 2 mg/kg, pela via intraperitoneal, utilizada como controle positivo. Os animais foram tratados uma vez ao dia, do dia entre o dia 12 até o dia 36 do estudo.

Os animais foram avaliados diariamente quanto a morbidade, mortalidade e a presença de ulcerações tumorais. O volume tumoral e o peso corporal dos animais foram analisados de três em três dias até o dia 36 do estudo. No final do estudo, foi avaliado a presença de metástases tumorais em diferentes órgãos. O tumor foi coletado, pesado e sua imagem registrada.

Os resultados descritos neste relatório demonstraram que a Fosfoetanolamina Sintética (USP-São Carlos), na dose de 500 mg/kg, mas não na dose de 200 mg/Kg, foi capaz de retardar o crescimento tumoral no modelo de tumor xenográfico de melanoma humano subcutâneo, com redução do volume tumoral final de 34% no 36º dia, quando comparado ao grupo veículo no mesmo período. O tratamento, no entanto, não causou alteração no peso corporal dos animais. O tratamento com a Cisplatina, um antitumoral utilizado na clínica, também foi capaz de retardar o crescimento tumoral, com redução do volume tumoral final de 68% no 36º dia, quando comparado ao grupo veículo no mesmo período, validando assim o modelo experimental utilizado. Não foram observadas metástases em nenhum dos grupos experimentais.



AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DA FOSFOETANOLAMINA SINTÉTICA (USP – SÃO CARLOS) EM MODELO DE TUMOR XENOGRÁFICO DE MELANOMA HUMANO EM CAMUNDONGOS

Datas

Data do início do estudo: 15/02/2016

Data do início do experimento: 23/02/2016

Data do término do experimento: 17/05/2016

Data do término do estudo: 25/05/2016

1. OBJETIVOS DO ESTUDO

1. Avaliar o efeito da Fosfoetanolamina Sintética (USP – São Carlos) administrada por via oral durante 24 dias sobre o peso corporal e a progressão tumoral de melanoma humano, utilizando o modelo de tumor xenográfico subcutâneo, em camundongos nude.
2. Avaliar o efeito da Fosfoetanolamina Sintética (USP – São Carlos) administrada por via oral durante 24 dias, sobre a morbididade, mortalidade e formação de úlceras tumorais, no modelo de tumor xenográfico subcutâneo, em camundongos nude.

2. PESSOAL ENVOLVIDO

Rodrigo Marcon, PhD	Diretor de Estudo
Daniela Ferraz Pereira Leite, PhD	Coordenadora de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação
Miliane de Jesus Oliveira	Apoio Técnico
Edir Rezende Junior	Apoio Técnico
Gabriela Segat	Apoio Técnico
Camila Guimarães Moreira, PhD	Apoio Técnico
Evelyn dos Santos, PhD	Apoio Técnico
Juliana Cavalli, PhD	Apoio Técnico
Ana Carolina Machado	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



AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DA FOSFOETANOLAMINA SINTÉTICA (USP – SÃO CARLOS) EM MODELO DE TUMOR XENOGRÁFICO DE MELANOMA HUMANO EM CAMUNDONGOS

Lote : Não informado
 Data de fabricação : Não informado
 Data de validade : Não informado
 Pureza/ Composição : ^{*1} Fosfoetanolamina - 32,2 %; Fosfatos inorgânicos - 34,9 %; Monoetanolamina protonada- 18,2 %; Pirofosfatos Inorgânicos – 3,6 %, Fosfobisetanolamina – 3,9 %; Água – 7,2%.
^{*2} Fosfoetanolamina - 16,9 %; Sal (de Ca²⁺, Zn²⁺ ou Mg²⁺) de Fosfoetanolamina - 45,6 %; Monoetanolamina - 37,5 %.
 Fabricante : Instituto Química de São Carlos - USP
 Aspectos físicos : Cristal branco
 Identificação CIEnP : 021.2

^{*1} Composição do composto “Fosfoetanolamina Sintética (USP – São Carlos)” na íntegra em percentagem de massa - Dados fornecidos pela Unicamp.

^{*2} Composição da fração solúvel do composto “Fosfoetanolamina Sintética (USP – São Carlos)” em percentagem de massa - Dados fornecidos pela USP.

3.2. 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 branco

3.3 Caracterização do Veículo

Nome : Solução de Cloreto de Sódio 0,9%
 Lote : 433275
 Data de validade : 02/2018
 Fabricante : Eurofarma

3.4 Caracterização de Reagentes e Solventes utilizados no estudo

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

Nome : Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)



AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DA FOSFOETANOLAMINA SINTÉTICA (USP – SÃO CARLOS) EM MODELO DE TUMOR XENOGRÁFICO DE MELANOMA HUMANO EM CAMUNDONGOS

Lote : 1676966
 Data de validade : 30/05/2016
 Fabricante : Gibco

Nome : Formol
 Lote : 184428
 Data de validade : 12/11/2016
 Fabricante : Synth

Nome : Tripsina
 Lote : SLBP3635V
 Data de validade : 31/03/2017
 Fabricante : Sigma

Nome : Isoflurano
 Lote : 007727
 Data de validade : 11/2017
 Fabricante : BioChimico

Nome : Linhagem celular A375 (ATCC® CRL-1619™)
 Doença : Melanoma maligno
 Espécie de origem : *Homo sapiens*, humano
 Sexo : Feminino
 Idade : 54 anos
 Tecido de origem : Pele
 Morfologia : Epitelial
 Propriedades de crescimento em cultura : Aderente
 Lote : 61573377
 Fabricante : ATCC

3.5 Preparação da Substância Teste, da Substância de Referência e do Veículo

A Fosfoetanolamina Sintética (USP-São Carlos) foi dissolvida em solução de cloreto de sódio 0,9% para a dose de 500 mg/kg (solução 50 mg/mL) e armazenada de 2 – 8 °C até o momento de sua utilização. A dose de 200 mg/kg (solução 20 mg/mL) foi preparada a partir da solução 50 mg/mL, utilizando o cloreto de sódio 0,9% como diluente (veículo). A Substância de Referência, Cisplatina, foi dissolvida em solução de cloreto de sódio 0,9% para a dose de 2 mg/kg (solução 0,2 mg/mL), conforme descrito anteriormente (Yang *et al.*, 2015).



AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DA FOSFOETANOLAMINA SINTÉTICA (USP – SÃO CARLOS) EM MODELO DE TUMOR XENOGRÁFICO DE MELANOMA HUMANO EM CAMUNDONGOS

3.6 Doses e vias de administração

Os animais receberam 200 mg/Kg ou 500 mg/Kg da Substância Teste, Fosfoetanolamina Sintética (USP-São Carlos) por via oral e 2 mg/Kg da Substância de Referência, Cisplatina, via intraperitoneal. As doses, vias de administração bem como o esquema terapêutico estão descritos no item 6.3 (Grupos Experimentais).

3.7 Justificativa para a seleção das doses e vias de administração

As doses da Fosfoetanolamina Sintética (USP-São Carlos) foram selecionadas pelo CIE nP através do cálculo de transposição de dose presente no guia do FDA (Food and Drug Administration) (*Guidance for Industry - FDA, 2005*). A transposição de dose foi calculada através da fórmula da dose equivalente para humanos (HED) = dose animal (mg/kg) x (peso animal em kg/peso humano em kg)^{0.33} presentes no guia (*Guidance for Industry - FDA, 2005*). Para fins de cálculo foi considerado peso animal (camundongo) médio de 30 g (0,03 kg) e o peso de um humano adulto de 60 kg. Sendo assim, a dose animal de 200 mg/kg da Fosfoetanolamina Sintética (USP-São Carlos) equivale, em humano a 16,2 mg/kg/dia, já a dose de 500 mg/kg em animal equivale a 40,5 mg/kg/dia em humanos. Para fins de conhecimento, cada cápsula de Fosfoetanolamina Sintética (USP - São Carlos) contém, em média 350 mg (0,35 g), sendo estas ingeridas pelo paciente 3 vezes ao dia, então, a dose ingerida ao dia por um paciente é de aproximadamente 1.050 mg, se dividido por 60 kg (peso médio de um humano adulto), equivale a 17,5 mg/kg/dia da Fosfoetanolamina Sintética (USP - São Carlos). A dose de Cisplatina foi selecionada de acordo com Yang e colaboradores (2015).

A via de administração selecionada para Fosfoetanolamina Sintética (USP-São Carlos) foi a via oral (v.o.), a mesma via utilizada para o veículo (solução de cloreto de sódio 0,9%), por ser a via de administração utilizada pelos pacientes. A Cisplatina não é efetiva por via oral, sendo utilizada na clínica pelas vias endovenosa, intra-arterial e intraperitoneal, assim, a via de administração escolhida neste projeto foi a via intraperitoneal (i.p).

4. SISTEMA TESTE

Foram utilizados camundongos machos e fêmeas da espécie *Mus musculus* e linhagem “Nude Atímico (*nu/nu NU(NCr)-Foxn1^{nu}*)”, saudáveis, provenientes do Biotério de



AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DA FOSFOETANOLAMINA SINTÉTICA (USP – SÃO CARLOS) EM MODELO DE TUMOR XENOGRÁFICO DE MELANOMA HUMANO EM CAMUNDONGOS

Criação do CIEnP, cujas matrizes foram adquiridas da empresa Charles River (USA), foram mantidos sob condições SPF “*Specific Pathogen Free*”.

4.1 Justificativa para a seleção do Sistema Teste

A espécie *Mus musculus* e linhagem “*Nude Atímico (nu/nu NU(NCr)-Foxn1^{nu})*” foi selecionada como sistema teste do presente estudo, pois é a espécie de roedores internacionalmente utilizada no desenvolvimento de potenciais fármacos antitumorais e também em estudos da biologia dos tumores, uma vez que tais animais são imunodeficientes, permitindo a inoculação de células tumorais humanas (Moro et al., 2012).

4.2 Comitê de ética

Os procedimentos experimentais seguiram as normas dos Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O protocolo utilizado neste estudo foi revisado, aprovado pelo Comitê de Ética em Utilização Animal (CEUA) do CIEnP, sob o número 239/00 e está arquivado no CIEnP.

4.3 Alojamento dos Animais

Todas as gaiolas continham forração tipo maravalha (ASPEN – Souralit®), material para nidificação, e pequenos blocos 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 ± 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. Os animais receberam água e ração *ad libitum* por todo o período do estudo, 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): 16x31x14 cm, com no máximo 5 animais por gaiola.



AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DA FOSFOETANOLAMINA SINTÉTICA (USP – SÃO CARLOS) EM MODELO DE TUMOR XENOGRÁFICO DE MELANOMA HUMANO EM CAMUNDONGOS

4.3.2 Aclimação no 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): 23X42,2x17 cm, com até 5 animais por gaiola e foram aclimatados por um período de, no mínimo, 2 dias

4.4 Identificação dos Animais

Cada gaiola foi identificada com uma etiqueta padrão e cada animal foi identificado individualmente através da marcação na cauda, conforme o POP-E.10/versão atual.

5. ROBUSTEZ, RASTREABILIDADE, CONFIABILIDADE E REPRODUTIBILIDADE DOS RESULTADOS

Com o intuito de eliminar possíveis desvios que possam interferir na confiabilidade, rastreabilidade e na reprodutibilidade dos resultados do estudo, foram empregados os critérios propostos pelo ARRIVE (do inglês, *Animal Research Reporting In Vivo Experiments*) (Kilkenny et al., 2010) e adotados pelos periódicos *British Journal of Pharmacology* (McGrath e Liley, 2015) e *Biochemical Pharmacology* (Mullane et al., 2015). Para isso, os seguintes procedimentos foram rigorosamente aplicados desde o planejamento experimental até a realização dos experimentos: 1) Nenhum dado foi excluído ou incluído nos resultados; 2) Os animais foram distribuídos aleatoriamente nos diferentes grupos experimentais; 3) Todos os reagentes foram obtidos de fornecedores credenciados pelo CIEnP e somente foram usados dentro do prazo de validade indicado pelo Fabricante; 4) Os experimentos foram realizados em duplicatas e 5) Os experimentos foram realizados de forma cega, ou seja, o experimentador que avaliou o tamanho tumoral não tinha conhecimento a respeito dos tratamentos dos animais.

6. PROCEDIMENTOS DO ESTUDO

6.1 Desenho experimental

O implante das células tumorais foi realizado em 83 animais, conforme descrito abaixo (item 6.2.1 - Indução do tumor xenográfico em camundongos nude). Após a inoculação das células tumorais (dia 0), os animais foram monitorados de 3 em 3 dias quanto a alteração de peso corporal e o crescimento do tumor até o final do estudo (36º dia).



AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DA FOSFOETANOLAMINA SINTÉTICA (USP – SÃO CARLOS) EM MODELO DE TUMOR XENOGRÁFICO DE MELANOMA HUMANO EM CAMUNDONGOS

No 12º dia após a inoculação das células tumorais de melanoma humano (A-375), os animais que apresentaram um volume tumoral entre 50 mm³ a 200 mm³ foram então separados aleatoriamente (randomizados) em quatro grupos experimentais (10 animais/grupo): Veículo (solução de Cloreto de Sódio 0,9%, v.o.), Fosfoetanolamina Sintética (USP – São Carlos, 200 mg/kg, v.o.), Fosfoetanolamina Sintética (USP – São Carlos, 500 mg/kg, v.o.) e Cisplatina (2 mg/kg, i.p.), de forma que a média do volume tumoral fosse semelhante em todos os grupos experimentais.

Os animais foram então tratados com o Veículo ou com a Fosfoetanolamina Sintética (USP – São Carlos, 200 ou 500 mg/kg, v.o.) uma vez ao dia, do 12º dia do estudo até o 36º dia (Final do Protocolo Experimental), enquanto que a Cisplatina (2 mg/kg, i.p.) foi administrada três vezes por semana, no 12º dia ao 21º dia do estudo e posteriormente uma vez por semana até o 36º dia (Final do Protocolo Experimental), conforme previamente descrito (Ahn *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2015), com algumas modificações.

Além da avaliação do crescimento tumoral e da alteração de peso corporal, os animais foram monitorados diariamente (12º ao 36º dia do estudo) quanto a morbidade, mortalidade e presença de úlceras no tumor. Ao final do protocolo (36º dia), foi realizado registro fotográfico de todos os animais do estudo, em seguida, o tumor foi removido, pesado e fotografado. Posteriormente, foi realizada a necropsia nos animais para verificar a presença de metástase nos seguintes órgãos: pulmão e fígado e em linfonodos adjacentes ao tumor.

6.2 Metodologia

6.2.1 Indução do tumor xenográfico em camundongos nude

A indução do tumor xenográfico subcutâneo foi realizado em camundongos *Nude* atímicos (*nu/nu NU(NCr)-Foxn1^{nu}*), como descrito anteriormente por Morton e Houghton, (2007). Uma solução de 0,1 mL contendo 2x10⁶ células da linhagem tumoral A-375 (Melanoma humano), provenientes da empresa ATCC e cultivadas no laboratório de Cultura Celular do CIEnP até sua utilização neste estudo, foi administrada pela via subcutânea (s.c.), no dorso dos animais previamente anestesiados com isoflurano 3-4%. O dia da administração das células nos animais foi considerado como dia “0” do estudo.

6.2.2 Tratamentos

No 12º dia após a administração das células tumorais, os animais que apresentaram tamanho tumoral entre 50 a 200 mm³ foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DA FOSFOETANOLAMINA SINTÉTICA (USP – SÃO CARLOS) EM MODELO DE TUMOR XENOGRÁFICO DE MELANOMA HUMANO EM CAMUNDONGOS

experimentais, conforme descrito no item 6.3 (Grupos Experimentais). Os animais que receberam o Veículo ou a Fosfoetanolamina Sintética (USP – São Carlos), foram tratados uma vez ao dia, do 12º dia do estudo até o 36º dia (Final do Protocolo Experimental). A Cisplatina (2 mg/kg, i.p.), um agente antitumoral reconhecidamente utilizado na clínica a mais de 30 anos, e comumente utilizado para o tratamento de melanoma maligno (Pectasides *et al.*, 1989; Daponte *et al.*, 2005), foi administrada três vezes por semana, no 12º dia ao 21º dia do estudo, posteriormente foi administrada uma vez por semana até o 36º dia. Imediatamente antes aos tratamentos, os animais foram levemente anestesiados com isoflurano 3-4%, para facilitar a manipulação dos animais.

6.2.3 Avaliação do volume tumoral

O volume tumoral foi quantificado baseando-se em duas dimensões, com auxílio de micrometro digital. O volume foi expresso em milímetros cúbicos (mm³), de acordo com a fórmula $V \text{ (volume)} = (\text{comprimento} \times \text{largura}^2)/2$ (Yang *et al.*, 2015). O comprimento foi considerado a maior distância entre dois pontos do tumor.

6.3 Grupos experimentais

Tabela 1. Representação dos grupos experimentais, tratamento, periodicidade, dose, via de administração, volume de administração e número de animais por grupo experimental.

Grupos experimentais	Controle Negativo	Substância Teste		Substância de Referência
Tratamento	Veículo	Fosfoetanolamina Sintética (USP-São Carlos)	Fosfoetanolamina Sintética (USP-São Carlos)	Cisplatina
Periodicidade	1 vez ao dia	1 vez ao dia	1 vez ao dia	3 vezes/semana (12º ao 21º dia do estudo) 1 vez/semana (21º ao 36º dia do estudo)
Dose	-	200 mg/kg	500 mg/kg	2 mg/kg
Via de Administração	Oral	Oral	Oral	Intraperitoneal
Volume de Administração	10 mL/kg	10 mL/kg	10 mL/kg	10 mL/kg
Animal por Grupo	10	10	10	10



AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DA FOSFOETANOLAMINA SINTÉTICA (USP – SÃO CARLOS) EM MODELO DE TUMOR XENOGRÁFICO DE MELANOMA HUMANO EM CAMUNDONGOS

6.4 Eutanásia

Ao final do protocolo citado acima, os animais foram eutanasiados através de deslocamento cervical após anestesia inalatória com isoflurano, conforme o POP E.11/versão atual e Guia Brasileiro de Boas Práticas em Eutanásia em Animais.

6.5 Análise estatística

Os dados foram expressos como Média $\pm$ Erro Padrão da Média (EPM). Para avaliar a diferença estatística entre os grupos no decorrer do tempo foi realizada análise de variância (ANOVA) de duas vias seguido pelo teste de Bonferroni. Para a avaliação da diferença estatística entre dois grupos foi utilizado o teste-t de student. Os valores de p menores que 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados como indicativos de significância. Foi utilizado o software GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) para realizar as análises estatísticas.

7. RESULTADOS

7.1 Indução do tumor xenográfico subcutâneo

A administração de 0,1 mL de solução contendo células de melanoma humano A-375 (2×10^6 células), levou a um crescimento tumoral no dorso dos animais no decorrer do tempo. No 12º dia do estudo (primeiro dia de tratamento), o valor médio do volume tumoral dos 40 animais utilizados no estudo foi de $110,2 \pm 4,0 \text{ mm}^3$ (média $\pm$ erro padrão da média).

7.2 Randomização dos animais nos grupos experimentais

Os 40 animais que apresentaram volume tumoral dentro da faixa preconizada para ser utilizado no estudo foram distribuídos aleatoriamente nos quatro grupos experimentais, de forma que a média do volume tumoral fosse semelhante em todos os grupos experimentais utilizados. O grupo que foi tratado com o Veículo apresentou no 12º dia do estudo (primeiro dia de tratamento), volume tumoral de $109,6 \pm 7,4 \text{ mm}^3$. Os grupos tratados com a Fosfoetanolamina Sintética (USP – São Carlos) nas doses de 200 mg/kg e 500 mg/kg apresentaram no 12º dia do estudo (primeiro dia de tratamento), volume tumoral médio de $112,3 \pm 10,2 \text{ mm}^3$ e $111,1 \pm 7,4 \text{ mm}^3$, respectivamente. O grupo que foi tratado com a Cisplatina na dose de 2 mg/kg, apresentou no 12º dia do estudo (primeiro dia de tratamento), um volume tumoral de $107,8 \pm 8,4 \text{ mm}^3$ (média $\pm$ erro padrão da média).



AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DA FOSFOETANOLAMINA SINTÉTICA (USP – SÃO CARLOS) EM MODELO DE TUMOR XENOGRÁFICO DE MELANOMA HUMANO EM CAMUNDONGOS

7.3 Efeito da Fosfoetanolamina Sintética (USP - São Carlos) sobre o crescimento tumoral e o peso corporal

Conforme observado na figura 1 (A e B), o grupo tratado diariamente com o veículo apresentou crescimento tumoral progressivo até o 36º dia do estudo. Assim, como descrito anteriormente, no 12º dia do estudo (primeiro dia de tratamento), o grupo que recebeu apenas o veículo apresentou um volume tumoral de $109,6 \pm 7,4 \text{ mm}^3$ (média $\pm$ erro padrão da média). A partir do 21º até o 36º dia o volume tumoral variou de $355,0 \pm 60,1 \text{ mm}^3$ para $1429 \pm 281,9 \text{ mm}^3$ (média $\pm$ erro padrão da média), respectivamente. Foi observado aumento no tamanho do tumor de aproximadamente 13 vezes, quando comparado o 36º dia (último dia de tratamento) ao 12º dia do estudo (primeiro dia de tratamento). A administração diária do veículo por via oral, não levou a alteração de peso corporal dos animais ao longo dos 24 dias de tratamento (Figura 1 C e D).

Assim como observado com os animais do grupo veículo, o tratamento dos animais com a Fosfoetanolamina Sintética (USP – São Carlos) na dose de 200 mg/kg pela via oral, não foi capaz de prevenir o crescimento tumoral ao longo dos 24 dias de tratamento (12º ao 36º do estudo, figura 1 A e B). O grupo experimental tratado com a Fosfoetanolamina Sintética (USP – São Carlos) na dose de 200 mg/kg apresentou no 12º dia do estudo (primeiro dia de tratamento), um volume tumoral de $112,3 \pm 10,2 \text{ mm}^3$ (média $\pm$ erro padrão da média), já no 36º dia do estudo (último dia de tratamento), este mesmo grupo apresentou um volume tumoral de $1640 \pm 295,5 \text{ mm}^3$ (média $\pm$ erro padrão da média), indicando um aumento de aproximadamente 14 vezes no volume do tumor em relação ao primeiro dia de tratamento. A administração diária de Fosfoetanolamina Sintética (USP – São Carlos) na dose de 200 mg/kg, não levou a alteração de peso corporal dos animais ao longo dos 24 dias de tratamento (Figura 1 C e D).

Conforme apresentado na figura 1 (A e B), o tratamento com a Fosfoetanolamina Sintética (USP – São Carlos) na dose de 500 mg/kg pela via oral, foi capaz de retardar o crescimento, apresentando diferença significativa no volume tumoral em relação ao grupo tratado com veículo nos dias 30, 33 e 36 do estudo. O grupo experimental tratado com a Fosfoetanolamina Sintética (USP – São Carlos) na dose de 500 mg/kg apresentou no 12º dia do estudo (primeiro dia de tratamento) um volume tumoral de $111,1 \pm 7,4 \text{ mm}^3$ (média $\pm$ erro padrão da média), já no 30º, 33º e 36º dia do estudo este mesmo grupo apresentou volume tumoral de $492,5 \pm 59,6 \text{ mm}^3$; $597,7 \pm 68,2 \text{ mm}^3$; $938,3 \pm 149,8 \text{ mm}^3$ (média $\pm$ erro padrão da média), respectivamente. O tratamento com a Fosfoetanolamina Sintética (USP –



AValiação DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DA FOSFOETANOLAMINA SINTÉTICA (USP – SÃO CARLOS) EM MODELO DE TUMOR XENOGRÁFICO DE MELANOMA HUMANO EM CAMUNDONGOS

São Carlos) na dose de 500 mg/kg causou redução no volume tumoral em 34% no 36º dia do estudo (último dia de tratamento), quando comparado ao grupo tratado com o veículo, também no 36º dia do estudo (último dia de tratamento). A administração diária de Fosfoetanolamina Sintética (USP – São Carlos) na dose de 500 mg/kg, não causou alteração de peso corporal dos animais ao longo dos 24 dias de tratamento (Figura 1 C e D).

O medicamento antitumoral Cisplatina, utilizado neste estudo como Substância de Referência, na dose de 2 mg/kg (i.p), foi capaz de retardar o crescimento tumoral, de forma significativamente, a partir do dia 27 do estudo (Figura 1 A e B). O tratamento com a Cisplatina preveniu a progressão tumoral de maneira mais proeminente que os outros tratamentos, uma vez que houve diferença significativa entre o grupo tratado com a Cisplatina em relação ao que recebeu o veículo, a partir do dia 27 do estudo (Figura 1A). O grupo experimental tratado com a Cisplatina na dose de 2 mg/kg apresentou no 12º dia do estudo (primeiro dia de tratamento) volume tumoral de $107,8 \pm 8,4 \text{ mm}^3$ (média $\pm$ erro padrão da média), já no 27º, 30º, 33º e 36º dias do estudo este mesmo grupo apresentou volume tumoral de $252,9 \pm 54,3 \text{ mm}^3$; $289,9 \pm 60,5 \text{ mm}^3$; $331,4 \pm 69,4 \text{ mm}^3$; $452,8 \pm 89,8 \text{ mm}^3$ (média $\pm$ erro padrão da média), respectivamente. No 36º dia do estudo (último dia de tratamento) foi observada redução de 68 % no volume tumoral do grupo tratado com a Cisplatina, quando comparado ao grupo que recebeu o veículo no mesmo período. A administração da Cisplatina na dose de 2 mg/kg, 3 vezes por semana, do dia 12 ao dia 21 do estudo, levou a redução no peso corporal dos animais, e dessa forma, a frequência de administração da Cisplatina foi alterada para uma vez por semana, a partir do 21º até o final do estudo (36º dia), sendo observado posteriormente recuperação no peso corporal dos animais, sem comprometer a atividade antitumoral da Cisplatina (Figura 1 C e D). Cabe ressaltar que os resultados observados no grupo que recebeu a Cisplatina, um antitumoral utilizado na clínica, validam o modelo experimental utilizado para verificar a atividade da Fosfoetanolamina Sintética (USP – São Carlos).

AValiação da Atividade Antitumoral da Fosfoetanolamina Sintética (USP – São Carlos) em Modelo de Tumor Xenográfico de Melanoma Humano em Camundongos

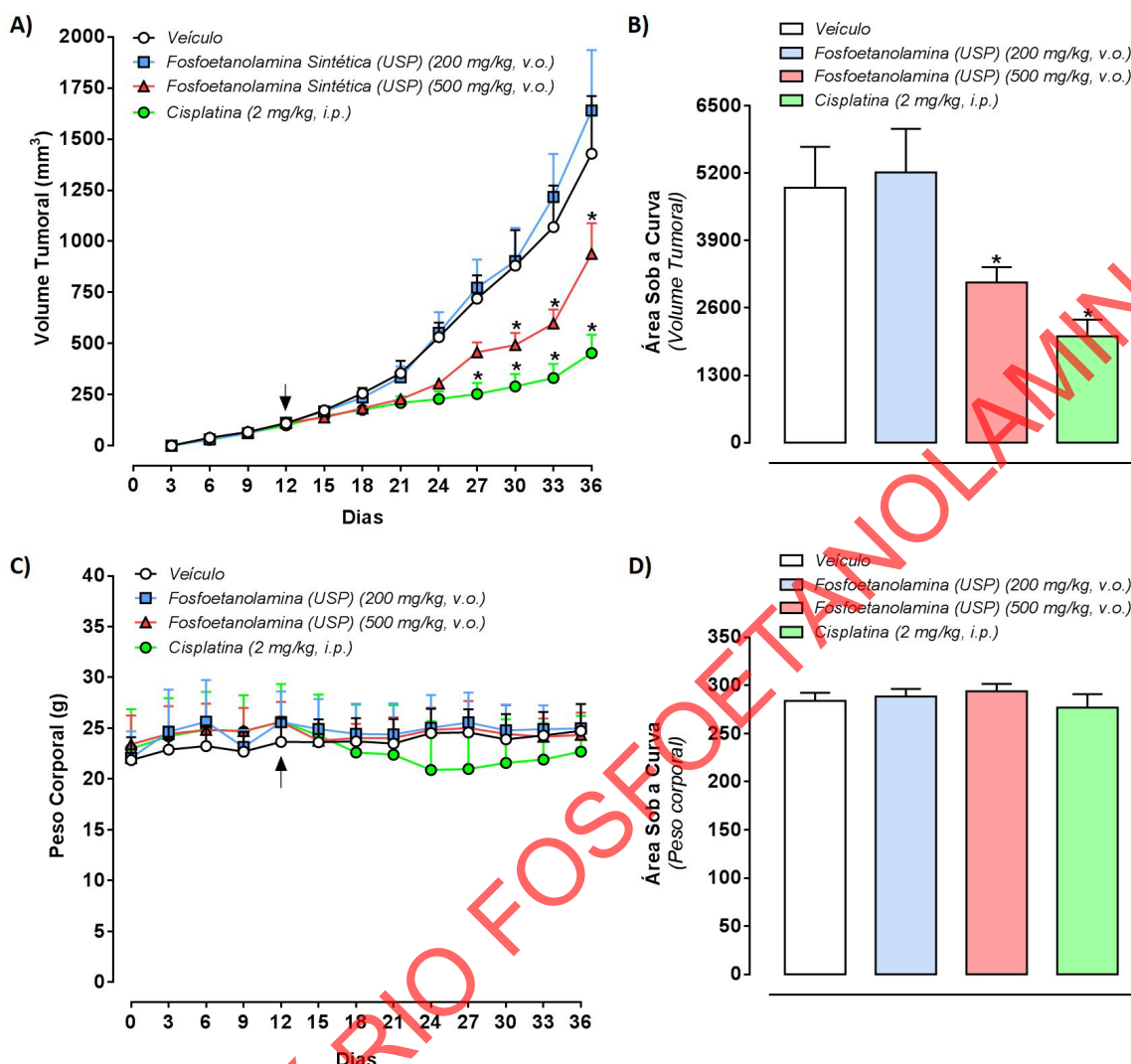


Figura 1: Avaliação da atividade da Fosfoetanolamina Sintética (USP - São Carlos) sobre o crescimento tumoral (A) e o peso corporal (C) de animais com tumor xenográfico de células melanoma humano administradas por via subcutânea em camundongos nude. As células foram administradas no dia 0 do estudo, no dia 12 os animais foram separados em 4 grupos baseado no volume tumoral e depois aleatoriamente nomeados nos seguintes grupos experimentais: veículo (10 mL/kg, v.o.), Fosfoetanolamina Sintética (USP- São Carlos, 200 mg/kg, v.o.), Fosfoetanolamina Sintética (USP- São Carlos, 500 mg/kg, v.o.) e Cisplatina (2 mg/kg, i.p.). Os tratamentos iniciaram no 12º dia do estudo (seta preta). As avaliações de volume tumoral (A) e peso corporal (C) foram realizadas de 3 em 3 dias, do dia 0 ao dia 36 do estudo. Os gráficos B e D representam a área sob a curva dos gráficos A e C, respectivamente. Cada coluna ou ponto representa a média $\pm$ erro padrão da média de 10 animais. A diferença estatística entre os grupos experimentais dos gráficos A e C foi avaliada através da análise de variância (ANOVA de duas vias) seguida pelo Teste de Bonferroni (* $p < 0,05$ em comparação ao grupo veículo). A diferença estatística entre o grupo tratado com o veículo em comparação ao grupo tratado com a Cisplatina ou Fosfoetanolamina Sintética (500 mg/kg, v.o.), no gráfico B, foi avaliada através do teste-t de Student (* $p < 0,05$ em comparação ao grupo veículo).

7.4 Efeito da Fosfoetanolamina Sintética (USP-São Carlos) sobre o peso tumoral no 36º dia do estudo

No 36º dia do estudo os animais foram eutanasiados, o tumor foi coletado, dissecado e pesado (Figura 2A), e sua imagem registrada (Figura 2B). Os tumores dos animais tratados com o veículo apresentaram um peso médio de $0,97 \pm 0,16$ g (média $\pm$ erro padrão da média). Os tumores dos grupos tratados com a Fosfoetanolamina Sintética (USP - São Carlos), nas doses de 200 e 500 mg/kg, apresentaram um peso médio de $1,019 \pm 0,16$ g e $0,63 \pm 0,08$ g (média $\pm$ erro padrão da média), respectivamente. Embora, o peso médio do tumor do grupo tratado com a Fosfoetanolamina Sintética (USP-São Carlos) na dose de 500 mg/kg tenha sido 35 % menor que o peso tumoral do grupo o veículo, tal redução não teve relevância estatística. O grupo que recebeu tratamento com a Cisplatina (2 mg/kg) apresentou peso tumoral de $0,32 \pm 0,05$ g, ou seja, 67,1 % menor que o peso tumoral do grupo tratado com o veículo (Figura 2A).

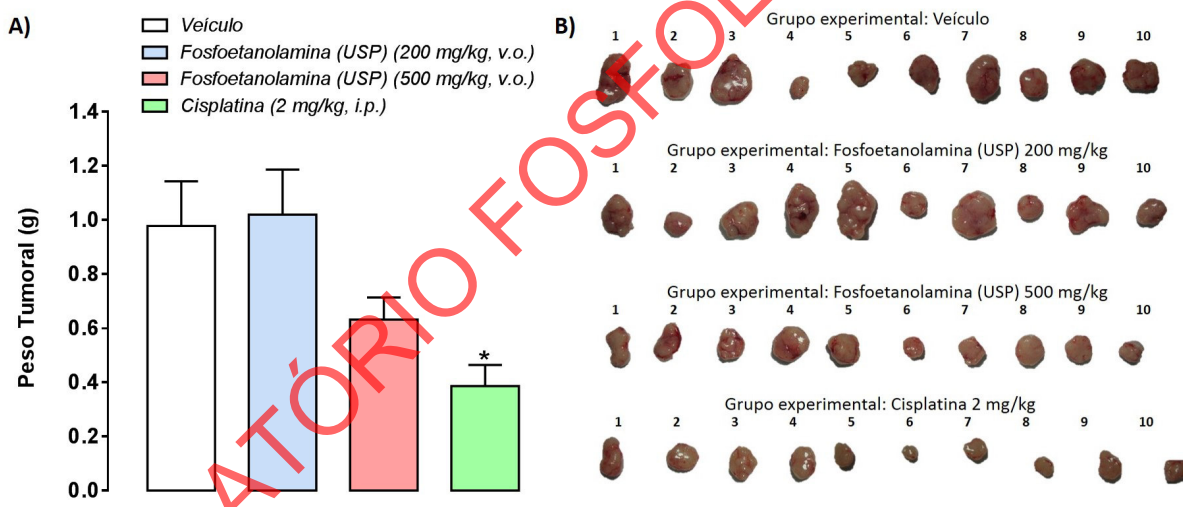


Figura 2: Avaliação da atividade da Fosfoetanolamina Sintética (USP-São Carlos) sobre o peso tumoral no modelo experimental de tumor xenográfico de melanoma humano subcutâneo em camundongos. As células foram administradas no dia 0 do estudo, no dia 12 os animais foram separados em 4 grupos baseado no volume tumoral e depois aleatoriamente nomeados nos seguintes grupos experimentais: Veículo (10 mL/kg, v.o.), Fosfoetanolamina Sintética (USP- São Carlos, 200 mg/kg, v.o.), Fosfoetanolamina Sintética (USP- São Carlos, 500 mg/kg, v.o.) e Cisplatina (2 mg/kg, i.p.). Os tratamentos iniciaram no 12º dia do estudo. Os tumores foram coletados no 36º dia do estudo, dissecados e pesados (A), e a imagem foi registrada (B). Cada coluna representa a média $\pm$ erro padrão da média de 10 animais. A diferença estatística entre o grupo tratado com o Veículo com o grupo tratado com a Cisplatina ou Fosfoetanolamina Sintética (500 mg/kg, v.o.), foi avaliada através do teste-t de student (* $p < 0,05$ em comparação ao grupo veículo).



AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DA FOSFOETANOLAMINA SINTÉTICA (USP – SÃO CARLOS) EM MODELO DE TUMOR XENOGRÁFICO DE MELANOMA HUMANO EM CAMUNDONGOS

7.5 Efeito dos tratamentos sobre a morbidade, mortalidade, ulcerações tumorais e presença de metástase

Os tratamentos com o veículo, Fosfoetanolamina Sintética (USP-São Carlos) nas doses de 200 e 500 mg/kg e da Cisplatina (2 mg/kg), não levaram a morbidade e, tampouco, a mortalidade dos animais utilizados no estudo. Dos dez animais presentes em cada grupo experimental, 5 animais do grupo veículo apresentaram ulcerações tumorais no 36º dia do estudo, no grupo que foi tratado com a Fosfoetanolamina Sintética (USP-São Carlos) na dose de 200 mg/kg foi observado ulcerações tumorais em 7 animais, porém, os animais que receberam a Fosfoetanolamina Sintética (USP-São Carlos) na dose de 500 mg/kg foi observado ulceração tumoral em apenas 1 animal e, por fim, os tratados com a Cisplatina não apresentaram ulcerações tumorais. Não foi observada a presença de metástase em nenhum dos 40 animais utilizados no estudo.

8. CONCLUSÃO DO ESTUDO

Os resultados descritos neste relatório demonstraram que a Fosfoetanolamina Sintética (USP-São Carlos), na dose de 500 mg/kg, mas não na dose de 200 mg/Kg, foi capaz de retardar de forma significativa, o crescimento tumoral no modelo de tumor xenográfico de melanoma humano subcutâneo em camundongos nude. O tratamento, no entanto, não causou alteração no peso corporal dos animais. O tratamento com a Cisplatina, um antitumoral utilizado na clínica, também retardou, de forma significativa, o crescimento tumoral, quando comparado ao grupo veículo no mesmo período, validando assim o modelo experimental utilizado.

9. REGISTRO DE DADOS BRUTOS

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

10. ARQUIVAMENTO

Uma cópia original do Plano de Estudo, Dados Brutos e Relatório Final foram arquivados no CIE nP, onde serão mantidos por 5 anos. A Substância Teste,



AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DA FOSFOETANOLAMINA SINTÉTICA (USP – SÃO CARLOS) EM MODELO DE TUMOR XENOGRÁFICO DE MELANOMA HUMANO EM CAMUNDONGOS

Fosfoetanolamina Sintética (USP-São Carlos) foi armazenada em local apropriado no CIEnP e será mantida até a expiração de sua validade.

11. REFERÊNCIAS

Guidance for Industry. FDA - Food and Drug Administration. -Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers. U.S. Department of Health and Human Services. Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Pharmacology and Toxicology, 2005.

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

Ahn J, Lee H, Seo K, Kang S, Ra J, Youn H. Anti-Tumor Effect of Adipose Tissue Derived-Mesenchymal Stem Cells Expressing Interferon- β and Treatment with Cisplatin in a Xenograft Mouse Model for Canine Melanoma. PLoS ONE 8(9): e74897, 2013.

Daponte A, Ascierto P, Gravina A, Melucci M, Scala S, Ottaiano A, Simeone E, Palmieris G, Comella G. Temozolomide and cisplatin in advanced malignant melanoma. Anticancer Res. 25(2B):1441-7, 2005.

Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Animal research: reporting in vivo experiments: The ARRIVE guidelines. PLoS Biol. 8 (6): e1000412, 2010.

McGrath JC, Lilley E. Implementing guidelines on reporting research-using animals (ARRIVE etc.): new requirements for publication in BJP. Br J Pharmacol. 172 (13): 3189 – 3193, 2015.

Moro, M.; Bertolini, G.; Tortoreto, M.; Pastorino, U.; Sozzi, G.; Roz, L. Patient-derived xenografts of non-small cell lung cancer: resurgence of an old model for investigation of modern concepts of tailored therapy and cancer stem cells. J. Biomed. Biotech. 2012.

Morton C, Houghton P. Establishment of human tumor xenografts in immunodeficient mice. Nature Protocols | Vol.2 No.2 2007.



AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DA FOSFOETANOLAMINA SINTÉTICA (USP – SÃO CARLOS) EM MODELO DE TUMOR XENOGRÁFICO DE MELANOMA HUMANO EM CAMUNDONGOS

Mullane K, Enna SJ, Piette J, Williams M. Guidelines for manuscript submission in the peer-reviewed pharmacological literature. *Biochemical Pharmacology*, 97: 225 - 235, 2015.

Pectasides D, Yianniotis H, Alevizakos N, Bafaloukos D, Barbounis V, Varthalitis J, Dimitriadis M, Athanassiou A. Treatment of metastatic malignant melanoma with dacarbazine, vindesine and cisplatin. *Br J Cancer*. 60(4): 627–629, 1989.

Yang X, Yang Y, Tang S, Tang H, Yang G, Xu Q, Wu J. EphB4 inhibitor overcome the acquired resistance to cisplatin in melanomas xenograft model. *Journal of Pharmacological Sciences* 129, 2015.

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA



AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DA FOSFOETANOLAMINA SINTÉTICA (USP – SÃO CARLOS) EM MODELO DE TUMOR XENOGRÁFICO DE MELANOMA HUMANO EM CAMUNDONGOS

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

25/05/16

Data

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA



AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DA FOSFOETANOLAMINA SINTÉTICA (USP – SÃO CARLOS) EM MODELO DE TUMOR XENOGRÁFICO DE MELANOMA HUMANO EM CAMUNDONGOS

DECLARAÇÃO DO GERENTE DA INSTALAÇÃO TESTE E DIRETOR DE ESTUDO
SUBSTITUTO

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

Este documento não deve ser reproduzido parcialmente.

Dra. Cristina Setim Freitas
Diretor de Estudo Substituto

25/05/16

Data

Dr. Jarbas Mota Siqueira Junior
Gerente da Instalação Teste

25/05/16

Data

Dr. João Batista Calixto
Diretor-Presidente do CIE nP

25/05/16

Data

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA