

RELATÓRIO FINAL

AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E ANTIPROLIFERATIVA DA FOSFOETANOLAMINA (UNICAMP), MONOETANOLAMINA (UNICAMP) E FOSFOBISSETANOLAMINA (UNICAMP) EM LINHAGENS DE CÉLULAS HUMANAS DE CARCINOMA DE PULMÃO, CARCINOMA DE PÂNCREAS E MELANOMA.

Estudo nº: 024-VIP-008-16

Patrocinador: Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação - MCTI

Esplanada dos Ministérios, Bloco E

Brasília, DF



AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E ANTIPROLIFERATIVA DA FOSFOETANOLAMINA (UNICAMP), MONOETANOLAMINA (UNICAMP) E FOSFOBISSETANOLAMINA (UNICAMP) EM LINHAGENS DE CÉLULAS HUMANAS DE CARCINOMA DE PULMÃO, CARCINOMA DE PÂNCREAS E MELANOMA.

SUMÁRIO

IDENTIFICAÇÃO	4
DECLARAÇÃO DE GARANTIA DA QUALIDADE	5
RESUMO	6
Datas	8
1. OBJETIVOS DO ESTUDO	8
2. PESSOAL ENVOLVIDO	9
3. SUBSTÂNCIA TESTE, SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA, VEÍCULO, REAGENTES E SOLVENTES	9
3.1 Caracterização das Substâncias Teste	9
3.2 Caracterização das Substâncias de Referência	10
3.3 Caracterização do Veículo	10
3.4 Caracterização de Material e Reagentes	11
3.5 Preparo da Substância Teste, das Substâncias de Referência e do Veículo	13
3.6 Concentrações	13
3.7 Justificativa para a seleção das concentrações	13
4. SISTEMA TESTE	14
4.1 Justificativa para a seleção do Sistema Teste	14
4.2 Obtenção do Sistema Teste	15
4.3 Manutenção do Sistema teste	15
5. ROBUSTEZ, RASTREABILIDADE E REPRODUTIBILIDADE DOS RESULTADOS	15
6. PROCEDIMENTOS DO ESTUDO	16
6.1 Delineamento experimental	16
6.1.1 Determinação do melhor tempo de incubação das Substâncias Teste	16
6.1.2 Avaliação da atividade citotóxica e antiproliferativa de diferentes concentrações das Substâncias Teste	17
6.1.3 Determinação do pH do meio contendo as concentrações de 10.000, 30.000 e 100.000 µM da Fosfoetanolamina (Unicamp).	18
6.1.4 Avaliação do efeito citotóxico e antiproliferativo nas concentrações de 10.000, 30.000 e 100.000 µM da Fosfoetanolamina (Unicamp) e do pH equivalente.	19
6.2 Metodologia	20
6.2.1 Avaliação da atividade citotóxica utilizando o método do MTT	20
6.2.2 Avaliação da atividade citotóxica utilizando o método do Vermelho neutro	20
6.2.3 Avaliação da atividade antiproliferativa utilizando o método da Sulforrodamina B.	21
6.2 Grupos experimentais	21



AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E ANTIPROLIFERATIVA DA FOSFOETANOLAMINA (UNICAMP), MONOETANOLAMINA (UNICAMP) E FOSFOBISSETANOLAMINA (UNICAMP) EM LINHAGENS DE CÉLULAS HUMANAS DE CARCINOMA DE PULMÃO, CARCINOMA DE PÂNCREAS E MELANOMA.

6.3 Análise Estatística	22
7. RESULTADOS.....	23
7.1 Determinação do melhor tempo de incubação das substâncias Teste.....	23
7.2 Avaliação da atividade citotóxica em diferentes concentrações das Substâncias Teste e de Referência em células de melanoma humano	25
7.3 Avaliação da atividade citotóxica em diferentes concentrações das Substâncias Teste e de Referência em células de carcinoma de Pâncreas	28
7.4 Avaliação da atividade citotóxica das Substâncias Teste e de Referência em células de carcinoma de Pulmão.....	31
7.5 Avaliação da atividade antiproliferativa das Substâncias Teste e de Referência em células de melanoma humano.....	34
7.6 Avaliação da atividade antiproliferativa das Substâncias Teste e de Referência em células de carcinoma de Pâncreas humano	35
7.7 Avaliação da atividade antiproliferativa das Substâncias Teste e de Referência em células de carcinoma de Pulmão humano	37
7.8 Determinação do pH da Fosfoetanolamina (Unicamp) diluído em meio de cultura da linhagem de carcinoma de Pulmão.....	38
7.9 Avaliação da atividade citotóxica a antiproliferativa da Fosfoetanolamina (Unicamp) nas concentrações de 10.000 µM, 30.000 µM e 100.000 µM e do pH equivalente, em linhagem de carcinoma de Pulmão utilizando os ensaios de MTT, Vermelho Neutro e Sulforrodamina B.....	39
8. CONCLUSÃO DO ESTUDO	41
9. REGISTRO DE DADOS BRUTOS.....	42
10. ARQUIVAMENTO.....	42
11. REFERÊNCIAS	42
12. DECLARAÇÃO DO DIRETOR DE ESTUDO.....	44
13. DECLARAÇÃO DO GERENTE DA INSTALAÇÃO TESTE E DIRETOR DE ESTUDO SUBSTITUTO.....	45



AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E ANTIPROLIFERATIVA DA FOSFOETANOLAMINA (UNICAMP), MONOETANOLAMINA (UNICAMP) E FOSFOBISSETANOLAMINA (UNICAMP) EM LINHAGENS DE CÉLULAS HUMANAS DE CARCINOMA DE PULMÃO, CARCINOMA DE PÂNCREAS E MELANOMA.

IDENTIFICAÇÃO

Título do Estudo	AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E ANTIPROLIFERATIVA DA FOSFOETANOLAMINA (UNICAMP), MONOETANOLAMINA (UNICAMP) E FOSFOBISSETANOLAMINA (UNICAMP) EM LINHAGENS DE CÉLULAS HUMANAS DE CARCINOMA DE PULMÃO, CARCINOMA DE PÂNCREAS E MELANOMA.
Número do Estudo	024-VIP-008-16
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-Clínicos 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 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-Clínicos 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-Clínicos Av. Luiz Boiteux Piazza, 1302 Florianópolis – SC - Brasil CEP 88056-000
Diretor de Estudo Substituto	Dra. Cristina Setim Freitas Telefone: 48 32612856 E-mail: cristina.setim@cienp.org.br Centro de Inovação e Ensaios Pré-Clínicos 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 DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E ANTIPROLIFERATIVA DA FOSFOETANOLAMINA (UNICAMP), - MONOETANOLAMINA (UNICAMP) E FOSFOBISSETANOLAMINA (UNICAMP) EM LINHAGENS DE CÉLULAS HUMANAS DE CARCINOMA DE PULMÃO, CARCINOMA DE PÂNCREAS E MELANOMA.

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	20/01/2016	20/01/2016	20/01/2016
Dados Brutos	01/06/2016 e 02/06/2016	01/06/2016 e 02/06/2016	01/06/2016 e 02/06/2016
Relatório Final	09/06/2016	09/06/2016	09/06/2016

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

Auditoria de estudo nº 024-VIP-008-16

Florianópolis, 09 de Junho de 2016.


Franciele Ávila Silveira

Coordenadora da Unidade de Garantia da Qualidade



AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E ANTIPROLIFERATIVA DA FOSFOETANOLAMINA (UNICAMP), MONOETANOLAMINA (UNICAMP) E FOSFOBISSETANOLAMINA (UNICAMP) EM LINHAGENS DE CÉLULAS HUMANAS DE CARCINOMA DE PULMÃO, CARCINOMA DE PÂNCREAS E MELANOMA.

RESUMO

O presente estudo avaliou a atividade citotóxica e antiproliferativa das Substâncias Teste: Fosfoetanolamina, Fosfobisetanolamina e Monoetanolamina, sintetizadas pelo Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), em linhagens de células humanas de carcinoma de pâncreas, carcinoma de pulmão e de melanoma. A avaliação da citotoxicidade das substâncias foi realizada em diferentes etapas: a primeira etapa teve por objetivo determinar o melhor tempo de incubação dos compostos (24, 48, 72 e 96 horas) sobre as três linhagens de células de câncer humano, utilizando o ensaio de citotoxicidade por MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina). As etapas subsequentes tiveram o objetivo de avaliar as atividades citotóxica e antiproliferativa das Substâncias Teste em uma faixa ampla de concentrações utilizando o melhor tempo de incubação estabelecido previamente. Além disso, foi verificada uma possível interferência do pH em altas concentrações da Fosfoetanolamina (Unicamp) sobre a citotoxicidade em células da linhagem de carcinoma de pulmão.

Para a avaliação da atividade citotóxica das três Substâncias Teste, realizada nas linhagens celulares mencionadas, foram utilizados os métodos de MTT e vermelho neutro, para a avaliação da atividade antiproliferativa foi utilizado o método da sulforrodamina B. Para todas as três metodologias, as Substâncias Testes foram avaliadas em uma faixa de concentração de 100 a 10.000 μM e as Substâncias de Referência - Cisplatina e Gencitabina – utilizadas nas faixas de 0,1 a 30 μM e 0,001 a 0,1 μM , respectivamente.

O presente estudo ainda avaliou, em células de carcinoma de pulmão, a possível atividade citotóxica e/ou antiproliferativa da Fosfoetanolamina (Unicamp) nas concentrações de 10.000, 30.000 e 100.000 μM , bem como, do pH resultante da dissolução dessa Substância Teste nas respectivas concentrações em meio de cultura.

A Fosfoetanolamina (Unicamp) não apresentou atividade citotóxica e antiproliferativa até a concentração de 10.000 μM (10 mM) nas linhagens de carcinoma de pâncreas e de melanoma humano. Todavia, esta concentração foi capaz de reduzir a viabilidade celular em 10,8 % e a proliferação em 36,1 % na linhagem de carcinoma de pulmão. Além disso, concentrações maiores da Fosfoetanolamina (Unicamp), como 30.000 μM (30 mM) e 100.000 μM (100 mM) também levaram a citotoxicidade e redução da proliferação celular em células de carcinoma de pulmão. No entanto, foi verificado que o pH do meio, resultante da dissolução de 30 mM (pH = 5,67) e 100 mM (pH = 4,95) dessa Substância Teste, *per se* também foi capaz de apresentar o mesmo efeito. O composto Monoetanolamina (Unicamp) apresentou atividade citotóxica em células humanas de melanoma, com redução de 17,6 %



AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E ANTIPROLIFERATIVA DA FOSFOETANOLAMINA (UNICAMP), MONOETANOLAMINA (UNICAMP) E FOSFOBISSETANOLAMINA (UNICAMP) EM LINHAGENS DE CÉLULAS HUMANAS DE CARCINOMA DE PULMÃO, CARCINOMA DE PÂNCREAS E MELANOMA.

na concentração de 3.000 μM (3 mM) e 48,6 % na concentração de 10.000 μM (10 mM) em células humanas de carcinoma de pâncreas na concentração de 10.000 μM (10 mM) em 75,3 %. No entanto, essa Substância Teste não apresentou atividade citotóxica na linhagem de carcinoma de pulmão. A Fosfobisetanolamina (Unicamp) não apresentou atividade citotóxica e antiproliferativa em nenhuma das linhagens celulares utilizadas neste projeto, independente do teste utilizado.

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA



AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E ANTIPROLIFERATIVA DA FOSFOETANOLAMINA (UNICAMP), MONOETANOLAMINA (UNICAMP) E FOSFOBISSETANOLAMINA (UNICAMP) EM LINHAGENS DE CÉLULAS HUMANAS DE CARCINOMA DE PULMÃO, CARCINOMA DE PÂNCREAS E MELANOMA.

Datas

Data do início do estudo: 20/01/2016

Data de início do ensaio: 20/01/2016

Data de término do ensaio: 03/05/2016

Data do término do estudo: 09/06/2016

1. OBJETIVOS DO ESTUDO

1. Determinar o melhor tempo de incubação das Substâncias Teste para a determinação da citotoxicidade nas linhagens de células humanas de carcinoma de Pâncreas, carcinoma de Pulmão e de Melanoma;
2. Avaliar a atividade citotóxica das Substâncias Teste em linhagens de células humanas de carcinoma de Pâncreas, carcinoma de Pulmão e de Melanoma, utilizando o método do MTT e do Vermelho Neutro;
3. Avaliar a atividade antiproliferativa das Substâncias Teste em linhagens de células humanas de carcinoma de Pâncreas, carcinoma de Pulmão e de Melanoma, utilizando o método de Sulforrodamina B;
4. Verificar o efeito do pH meio para dissolução da Fosfoetanolamina (Unicamp) nas concentrações de 10.000 μM (10 mM), 30.000 μM (30 mM) e 100.000 μM (100 mM) e do meio de cultura (F12-K) utilizado na linhagem de Carcinoma de Pulmão (na ausência da Substância Teste);
5. Comparar o efeito citotóxico e antiproliferativo da Fosfoetanolamina (Unicamp) nas concentrações de 10.000 μM , 30.000 μM e 100.000 μM com o efeito do pH equivalente dessas concentrações da Substância Teste em meio de cultura F12-K em linhagem de células humanas de carcinoma de Pulmão, utilizando os métodos de MTT e Vermelho neutro (citotoxicidade) e método da Sulforrodamina B (proliferação).



AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E ANTIPROLIFERATIVA DA FOSFOETANOLAMINA (UNICAMP), MONOETANOLAMINA (UNICAMP) E FOSFOBISSETANOLAMINA (UNICAMP) EM LINHAGENS DE CÉLULAS HUMANAS DE CARCINOMA DE PULMÃO, CARCINOMA DE PÂNCREAS E MELANOMA.

2. PESSOAL ENVOLVIDO

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

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

3.1 Caracterização das Substâncias Teste

Nome	: Fosfoetanolamina (Unicamp)
Nome químico (IUPAC)	: 2-Aminoetanol-O-fosfato
Número do CAS	: 1071-23-4
Lote	: Não informado
Data de fabricação	: 18/01/2016
Data de validade	: Não informado
Pureza/ Composição	: * > 98%
Fabricante	: Instituto de Química - Unicamp
Aspectos físicos	: Cristal branco
Identificação CIEEnP	: 024.1

* Dados fornecidos pela Unicamp

Nome	: Monoetanolamina (Unicamp)
Nome químico (IUPAC)	: 2-Aminoetanol
Número do CAS	: 141-43-5
Lote	: Não informado
Data de fabricação	: 01/12/2015
Data de validade	: Não informado
Pureza/ Composição	: * > 98%
Fabricante	: Instituto de Química - Unicamp
Aspectos físicos	: Líquido incolor
Identificação CIEEnP	: 024.3

* Dados fornecidos pela Unicamp

Nome	: Fosfobisetanolamina (Unicamp)
Nome químico (IUPAC)	: Cloridrato de bis (2-aminoetil) hidrogenofosfato
Número do CAS	: 3316-61-8
Lote	: Não informado



AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E ANTIPROLIFERATIVA DA FOSFOETANOLAMINA (UNICAMP), MONOETANOLAMINA (UNICAMP) E FOSFOBISSETANOLAMINA (UNICAMP) EM LINHAGENS DE CÉLULAS HUMANAS DE CARCINOMA DE PULMÃO, CARCINOMA DE PÂNCREAS E MELANOMA.

Data de fabricação : 18/01/2016
 Data de validade : Não informado
 Pureza/ Composição : * > 98%
 Fabricante : Instituto de Química - Unicamp
 Aspectos físicos : Cristal branco
 Identificação CIE nP : 024.2

* Dados fornecidos pela Unicamp

3.2 Caracterização das Substâncias 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.

Nome : Gencitabina
 Nome químico (IUPAC) : 4-amino-1-(2-deoxy-2,2-difluoro-β-D-erythro-pentofuranosyl)pyrimidin-2(1H)-on
 Número do CAS : 95058-81-4
 Lote : *0053W9
 Data de validade : *28/04/16
 Pureza : *99,9%
 Fabricante : Sigma-Aldrich
 Aspectos físicos : *Pó branco

*Dados fornecidos pelo fabricante.

3.3 Caracterização do Veículo

Nome : Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)
 Lote : 1676966
 Data de validade : 04/2016
 Pureza : Não se aplica
 Fabricante : Gibco

Nome : Kaighn's Modification of Ham's F-12 Medium (F12-K)
 Lote : 63433044
 Data de validade : 10/2016



AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E ANTIPROLIFERATIVA DA FOSFOETANOLAMINA (UNICAMP), MONOETANOLAMINA (UNICAMP) E FOSFOBISSETANOLAMINA (UNICAMP) EM LINHAGENS DE CÉLULAS HUMANAS DE CARCINOMA DE PULMÃO, CARCINOMA DE PÂNCREAS E MELANOMA.

Pureza : Não se aplica
Fabricante : ATCC

3.4 Caracterização de Material e Reagentes

Nome : Ácido acético glacial
Lote : 183216
Data de validade : 07/10/2017
Fabricante : Synth

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 : 184517
Data de validade : 14/11/2017
Fabricante : Synth

Nome : Etanol
Lote : 185728
Data de validade : 09/01/2018
Fabricante : Synth

Nome : Formaldeído
Lote : DCBC2332
Data de validade : 04/2016
Fabricante : Vetec

Nome : Horse serum



AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E ANTIPROLIFERATIVA DA FOSFOETANOLAMINA (UNICAMP), MONOETANOLAMINA (UNICAMP) E FOSFOBISSETANOLAMINA (UNICAMP) EM LINHAGENS DE CÉLULAS HUMANAS DE CARCINOMA DE PULMÃO, CARCINOMA DE PÂNCREAS E MELANOMA.

Lote : 12/013
Data de validade : 31/08/2016
Fabricante : Sigma-Aldrich

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 : 04/03/2018
Fabricante : Laborclin

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

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

Nome : Vermelho neutro
Lote : mkbp6756v
Data de validade : 06/11/2019
Fabricante : Sigma-Aldrich



AValiação DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E ANTIPROLIFERATIVA DA FOSFOETANOLAMINA (UNICAMP), MONOETANOLAMINA (UNICAMP) E FOSFOBISSETANOLAMINA (UNICAMP) EM LINHAGENS DE CÉLULAS HUMANAS DE CARCINOMA DE PULMÃO, CARCINOMA DE PÂNCREAS E MELANOMA.

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

A manipulação de todas as Substâncias Teste foi realizada em condições estéreis e em fluxo laminar. A solubilização e/ou diluição das Substâncias Teste foram realizadas em diferentes meios de cultura, de acordo com as linhagens celulares. Para detalhes dos meios de cultura ver item 4.3. As soluções das Substâncias Teste na concentração de 10.000 µM foram filtradas em filtro de 0,22 µm e utilizadas para a diluição das demais concentrações.

3.6 Concentrações

No teste para a determinação do melhor tempo de incubação as três Substâncias Teste foram utilizadas as concentrações de 1.000 e 10.000 µM e as Substâncias de Referência nas concentrações de 1 e 10 µM.

Nos ensaios para a avaliação da citotoxicidade e atividade antiproliferativa em células humanas de carcinoma de Pâncreas, carcinoma de Pulmão e de Melanoma, as três Substâncias Teste foram utilizadas nas seguintes concentrações: 100, 300, 1.000, 3.000 e 10.000 µM. A Cisplatina foi avaliada nas concentrações de 0,1; 0,3; 1; 3 e 10 µM em células de melanoma, nas concentrações de 0,3; 1; 3; 10 e 30 µM em células de carcinoma de Pulmão. A Gentamicina foi utilizada nas concentrações de 0,001; 0,003; 0,01; 0,03 e 0,1 µM em células de carcinoma de Pâncreas.

As concentrações utilizadas da Fosfoetanolamina (Unicamp) para a avaliação da interferência do pH na atividade citotóxica em células de carcinoma de Pulmão foram 10.000 µM, 30.000 µM e 100.000 µM.

3.7 Justificativa para a seleção das concentrações

As concentrações das Substâncias Teste Fosfoetanolamina (Unicamp), (100, 300, 1.000, 3.000 e 10.000 µM), foram selecionadas pelo CIE nP, de acordo com estudos prévios realizado com a Fosfoetanolamina *in vitro* (Ferreira *et al.*, 2013a; Ferreira *et al.*, 2013b; Ferreira *et al.*, 2013c). As concentrações das Substâncias Teste da Monoetanolamina (Unicamp) e da Fosfobisetanolamina (Unicamp) foram as mesmas da Fosfoetanolamina (Unicamp) para fins de comparação dos resultados. As concentrações das Substâncias de Referência foram selecionadas através de dados da literatura (Kelland e Abel, 1992; Kovács AF e Cinatl, 2002, Pandita *et al.*, 2014).



AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E ANTIPROLIFERATIVA DA FOSFOETANOLAMINA (UNICAMP), MONOETANOLAMINA (UNICAMP) E FOSFOBISSETANOLAMINA (UNICAMP) EM LINHAGENS DE CÉLULAS HUMANAS DE CARCINOMA DE PULMÃO, CARCINOMA DE PÂNCREAS E MELANOMA.

4. SISTEMA TESTE

Linhagem : A375 (ATCC® CRL-1619™)
 Tipo celular : 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

Linhagem : MIA PaCa-2 (ATCC® CRL-1420™)
 Tipo celular : Carcinoma de Pâncreas
 Espécie de origem : *Homo sapiens*, humano
 Sexo : Masculino
 Idade : 65 anos
 Tecido de origem : Pâncreas
 Morfologia : Epitelial
 Propriedades de crescimento em cultura : Aderente
 Lote : 61181029
 Fabricante : ATCC

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

4.1 Justificativa para a seleção do Sistema Teste

As células da linhagem de melanoma humano (A-375), carcinoma de Pâncreas (MIA PaCa-2) e carcinoma de Pulmão (A549) foram selecionadas como sistema teste do presente estudo, pois são linhagens de células internacionalmente utilizadas na triagem de potenciais fármacos antitumorais (Fountzilias et al., 1986; Burger e Fiebig, 2004; Kumar et al., 2014; Gopaul et al., 2015).



AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E ANTIPROLIFERATIVA DA FOSFOETANOLAMINA (UNICAMP), MONOETANOLAMINA (UNICAMP) E FOSFOBISSETANOLAMINA (UNICAMP) EM LINHAGENS DE CÉLULAS HUMANAS DE CARCINOMA DE PULMÃO, CARCINOMA DE PÂNCREAS E MELANOMA.

4.2 Obtenção do Sistema Teste

As linhagens celulares de carcinoma de Pâncreas (MIA PaCa-2), Melanoma (A-375) e 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. As células foram expandidas conforme POP-E.37/versão atual, para geração do estoque do Banco de Células do CIE nP e novamente congeladas conforme POP-E.19/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™), MIA PaCa-2 (ATCC® CRL-1420™) e A-375 [A375] (ATCC® CRL-1619™). Em seguida, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços para a realização dos ensaios, como descrito no item 6.2 (Metodologia).

4.3 Manutenção do Sistema teste

As células provenientes do estoque foram mantidas em incubadora de CO₂, a 37 °C e 5 % de CO₂ em garrafas contendo meio específico para cada linhagem celular. Para as células MIA PaCa-2 (Carcinoma de Pâncreas) foi utilizado o meio de cultura DMEM, suplementado com soro fetal bovino (10%), *horse serum* (2,5%) e solução de antibiótico-antimicótico (1%). Para as células A-375 (Melanoma) foi utilizado meio de cultura DMEM, suplementado com soro fetal bovino (10%) e solução de antibiótico-antimicótico (1%). Para as células A549 (Carcinoma de Pulmão) foi utilizado meio de cultura F12-K, suplementado com soro fetal bovino (10%) e solução de antibiótico-antimicótico (1%).

5. 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 CIE nP 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) Os



AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E ANTIPROLIFERATIVA DA FOSFOETANOLAMINA (UNICAMP), MONOETANOLAMINA (UNICAMP) E FOSFOBISSETANOLAMINA (UNICAMP) EM LINHAGENS DE CÉLULAS HUMANAS DE CARCINOMA DE PULMÃO, CARCINOMA DE PÂNCREAS E MELANOMA.

experimentos foram conduzidos de forma conjunta com seus respectivos controles (Substâncias de Referência) para a validação do método; 6) todos os dados brutos foram auditados pela garantia da qualidade do CIE nP e serão mantidos arquivados por 5 anos .

6. PROCEDIMENTOS DO ESTUDO

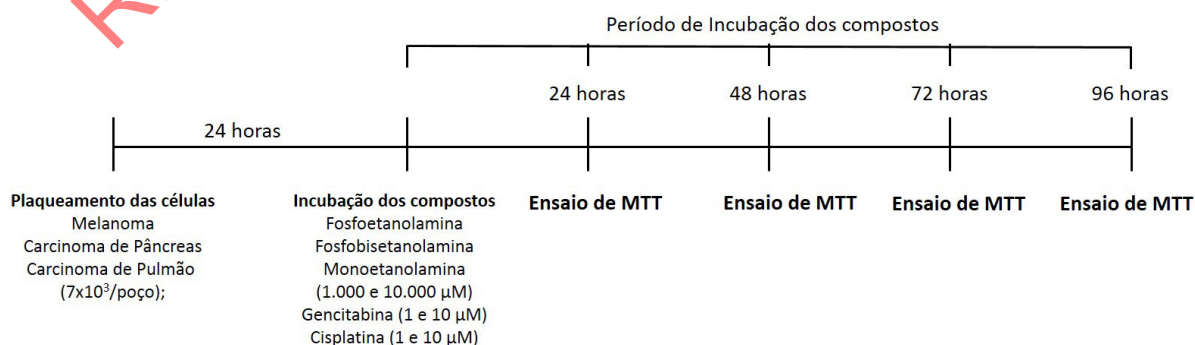
Para o ensaio de avaliação do melhor tempo de incubação das Substâncias Teste foi realizado um único experimento em triplicata. Para a avaliação do efeito do pH, foram realizadas duas repetições (número experimental = 2) em triplicata. Para o restante dos ensaios foram realizadas três repetições (número experimental = 3) em triplicata. Cada número experimental utilizou uma passagem, data distinta e/ou foi realizado por diferente experimentador distinto.

6.1 Delineamento experimental

6.1.1 Determinação do melhor tempo de incubação das Substâncias Teste

Para este ensaio, foram plaqueadas 7×10^3 células/poço de células de carcinoma de Pâncreas (MIA PaCa-2), Melanoma (A-375) e carcinoma de Pulmão (A549), em placas de cultura de 96 poços, contendo 200 μ L de meio de cultura suplementado (específico para cada linhagem, ver item 4.3). Após 24 horas de incubação em estufa de CO₂, à 37 °C e 5% de CO₂, o meio de cultura foi substituído por meio contendo as Substâncias Teste (1.000 ou 10.000 μ M), Substâncias de Referência 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 6.2.1 (Avaliação da atividade citotóxica utilizando o método do MTT). O desenho experimental do teste está esquematizado na figura 1.

Figura 1: Desenho experimental para a determinação do melhor tempo de incubação das Substâncias Teste.



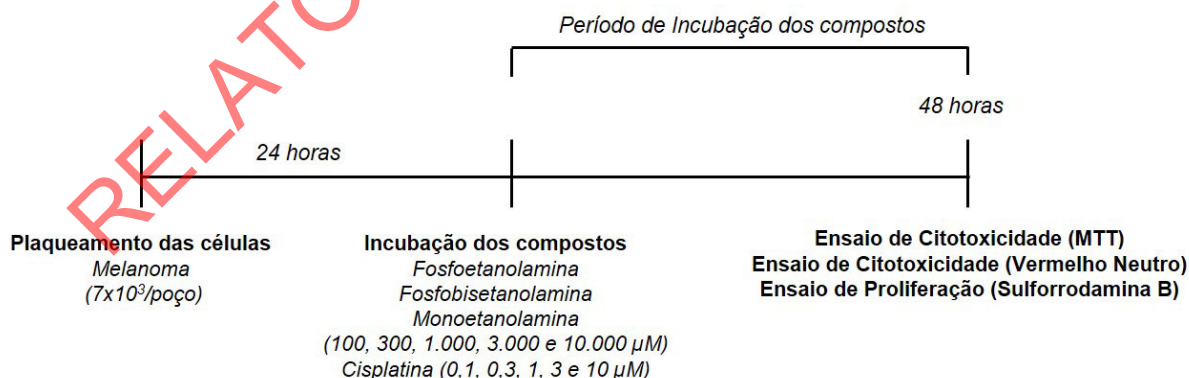


AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E ANTIPROLIFERATIVA DA FOSFOETANOLAMINA (UNICAMP), MONOETANOLAMINA (UNICAMP) E FOSFOBISETANOLAMINA (UNICAMP) EM LINHAGENS DE CÉLULAS HUMANAS DE CARCINOMA DE PULMÃO, CARCINOMA DE PÂNCREAS E MELANOMA.

6.1.2 Avaliação da atividade citotóxica e antiproliferativa de diferentes concentrações das Substâncias Teste

Para este ensaio, foram plaqueadas 7×10^3 células/poço de células de Carcinoma de Pâncreas (MIA PaCa-2), Melanoma (A-375) e Carcinoma de Pulmão (A549), em placas de cultura de 96 poços, contendo 200 μ L de meio de cultura. Após 24 horas de incubação em estufa de CO₂, à 37 °C e 5% de CO₂, o meio de cultura foi substituído por meio contendo: Veículo (meio de cultura), Substâncias Teste (100, 300, 1.000, 3.000 e 10.000 μ M), Substâncias de Referência – Cisplatina (0,1; 0,3; 1; 3 e 10 μ M em Melanoma ou 0,3; 1; 3; 10 e 30 μ M em Carcinoma de Pulmão) ou Gencitabina (0,001; 0,003; 0,01; 0,03 e 0,1 μ M em carcinoma de Pâncreas) e novamente incubadas. Decorridas 72 horas (para as linhagens de Carcinoma de Pâncreas e Carcinoma de Pulmão) ou 48 horas de incubação (para as células de Melanoma), a viabilidade celular foi analisada pelos métodos de MTT e do vermelho neutro e a atividade antiproliferativa foi avaliada pelo método da Sulforrodamina B, conforme descritos nos itens 6.2.1 (Avaliação da atividade citotóxica utilizando o método do MTT), 6.2.2 (Avaliação da atividade citotóxica utilizando o método do Vermelho neutro) e 6.2.3 (Avaliação da atividade antiproliferativa utilizando o método da Sulforrodamina B). O desenho experimental do teste está esquematizado na figura 2 (Ensaio sobre as células de melanoma humano), figura 3 (Ensaio sobre as células de carcinoma de pâncreas) e figura 4 (Ensaio sobre as células de carcinoma de pulmão).

Figura 2: Desenho experimental para a avaliação da atividade citotóxica e antiproliferativa das Substâncias Teste em células de Melanoma humano (A-375).



AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E ANTIPROLIFERATIVA DA FOSFOETANOLAMINA (UNICAMP), MONOETANOLAMINA (UNICAMP) E FOSFOBISETANOLAMINA (UNICAMP) EM LINHAGENS DE CÉLULAS HUMANAS DE CARCINOMA DE PULMÃO, CARCINOMA DE PÂNCREAS E MELANOMA.

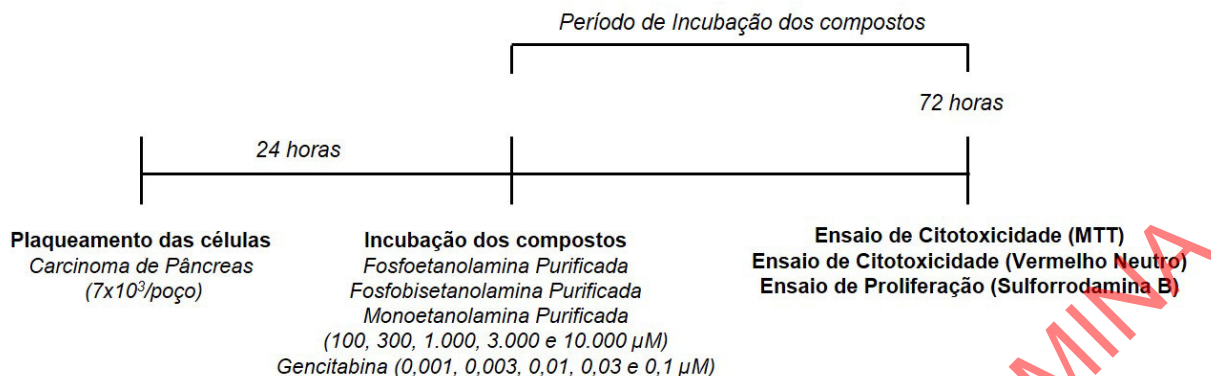


Figura 3: Desenho experimental para a avaliação da atividade citotóxica e antiproliferativa das Substâncias Teste em células de carcinoma de Pâncreas (MIA PaCa-2).

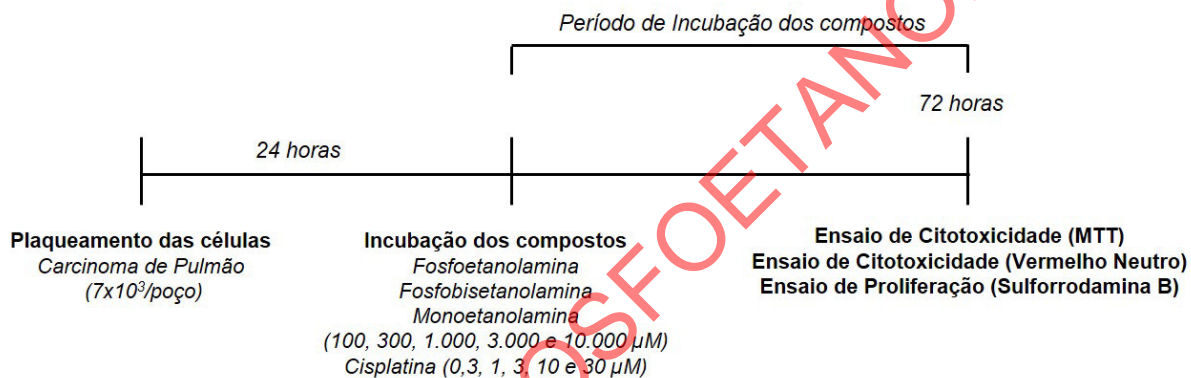


Figura 4: Desenho experimental para a avaliação da atividade citotóxica e antiproliferativa das Substâncias Teste em células de carcinoma de pulmão (A549).

6.1.3 Determinação do pH do meio contendo as concentrações de 10.000, 30.000 e 100.000 µM da Fosfoetanolamina (Unicamp).

A Fosfoetanolamina (Unicamp) foi preparada em meio de cultura F12-K, utilizado na manutenção das células humanas de carcinoma de Pulmão, conforme descrito no item 4.3, para atingir a concentração de 10.000 µM, 30.000 µM e 100.000 µM. Posteriormente, o pH dessas soluções resultantes foi mensurado com auxílio de um pHmetro digital Orion Star A211 (Thermo Scientific). O pH do veículo (meio de cultura F12-K), utilizado para o tratamento das células humanas de carcinoma de Pulmão, também foi mensurado. Em seguida, o pH do meio de cultura, sem a presença da Fosfoetanolamina (Unicamp), foi ajustado para equivaler ao pH observado nas concentrações de 10.000 µM, 30.000 µM ou 100.000 µM da Fosfoetanolamina (Unicamp).



AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E ANTIPROLIFERATIVA DA FOSFOETANOLAMINA (UNICAMP), MONOETANOLAMINA (UNICAMP) E FOSFOBISSETANOLAMINA (UNICAMP) EM LINHAGENS DE CÉLULAS HUMANAS DE CARCINOMA DE PULMÃO, CARCINOMA DE PÂNCREAS E MELANOMA.

6.1.4 Avaliação do efeito citotóxico e antiproliferativo nas concentrações de 10.000, 30.000 e 100.000 μM da Fosfoetanolamina (Unicamp) e do pH equivalente.

Para este ensaio, 7×10^3 células por poço da linhagem humana de carcinoma de Pulmão (A549) foram plaqueadas em placas de cultura de 96 poços e incubadas em estufa de CO_2 à 37 °C e 5% de CO_2 , contendo 200 μL de meio de cultura, por 24 horas.

No dia seguinte ao plaqueamento, a Fosfoetanolamina (Unicamp) foi preparada em meio de cultura utilizado para a manutenção das células humanas de carcinoma de pulmão (F12-K suplementado conforme descrito 4.3), para atingir as concentrações de 10.000 μM , 30.000 μM e 100.000 μM . Para a avaliação do efeito do pH sobre a viabilidade e proliferação celular, o meio de cultura F12-K teve seu pH ajustado para a obtenção de meios com pH 6,45; 5,67 e 4,98; equivalente aos valores do pH do meio contendo Fosfoetanolamina (Unicamp) nas concentrações de 10.000, 30.000 e 100.000 μM , respectivamente.

Assim, 24 horas após o plaqueamento, o meio de cultura foi substituído por meio contendo: Fosfoetanolamina (Unicamp) nas concentrações de 10.000, 30.000 e 100.000 μM e os meios de cultura com pH 7,7 (sem ajuste) e com os meios acidificados. Decorridas 72 horas de incubação, a viabilidade foi analisada pelos métodos de MTT e do vermelho neutro e a atividade antiproliferativa foi avaliada pelo método da Sulforrodamina B, conforme descritos nos itens 6.2.1 (Avaliação da atividade citotóxica utilizando o método do MTT), 6.2.2 (Avaliação da atividade citotóxica utilizando o método do Vermelho neutro) e 6.2.3 (Avaliação da atividade antiproliferativa utilizando o método da Sulforrodamina B). O desenho experimental do teste está esquematizado na figura 5.

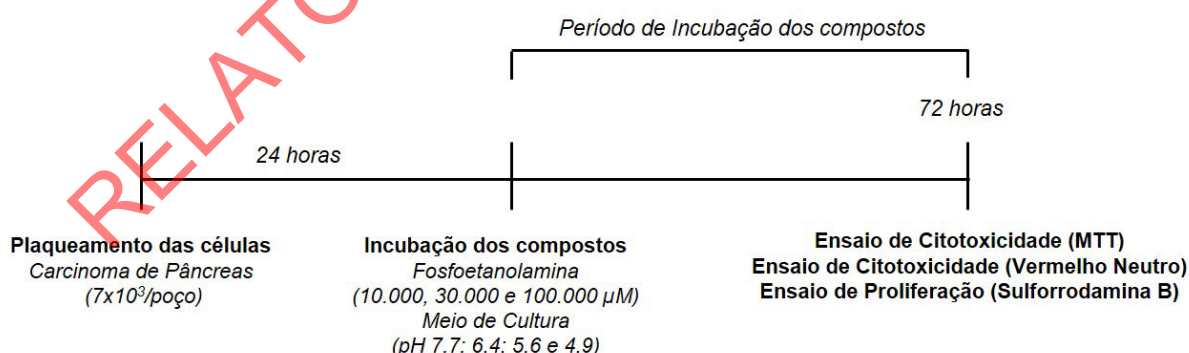


Figura 5: Desenho experimental para a avaliação da atividade citotóxica e antiproliferativa da Fosfoetanolamina (Unicamp) nas concentrações de 10.000, 30.000 e 100.000 μM e seus respectivos pHs em células de carcinoma de pulmão (A549).



AValiação DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E ANTIPROLIFERATIVA DA FOSFOETANOLAMINA (UNICAMP), MONOETANOLAMINA (UNICAMP) E FOSFOBISETANOLAMINA (UNICAMP) EM LINHAGENS DE CÉLULAS HUMANAS DE CARCINOMA DE PULMÃO, CARCINOMA DE PÂNCREAS E MELANOMA.

6.2 Metodologia

6.2.1 Avaliação da atividade citotóxica utilizando o método do MTT

O ensaio de viabilidade celular foi realizado através do teste colorimétrico de redução do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina), no qual as 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 4 horas à 37 °C em atmosfera umidificada, contendo 5 % CO₂. Posteriormente, o meio foi novamente retirado e adicionado 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. Em alguns casos foram calculadas a CI₅₀ (a concentração capaz de reduzir 50% da viabilidade), e a porcentagem de inibição.

6.2.2 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 µg/mL e incubado por 4 horas à 37 °C em atmosfera umidificada, contendo 5% CO₂. Em seguida as células foram lavadas com uma solução contendo cloreto de cálcio (1 %) e formaldeído (0,5 %) em 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 e foi calculada a concentração que causou a redução da viabilidade em 50% das células, ou seja, a CI₅₀ e a porcentagem de inibição.



AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E ANTIPROLIFERATIVA DA FOSFOETANOLAMINA (UNICAMP), MONOETANOLAMINA (UNICAMP) E FOSFOBISSETANOLAMINA (UNICAMP) EM LINHAGENS DE CÉLULAS HUMANAS DE CARCINOMA DE PULMÃO, CARCINOMA DE PÂNCREAS E MELANOMA.

6.2.3 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 proteicos das células fixadas pelo ácido tricloroacético. Para este ensaio, células sem tratamento foram fixadas, conforme descrito abaixo e mantidas a temperatura ambiente até o final do protocolo experimental (Tempo 0, T0). Em seguida, outras células receberam os tratamentos com as Substâncias Teste ou Substâncias de Referência, durante 48 horas (Melanoma – T48) ou 72 horas (carcinoma de Pâncreas ou Pulmão – T72), após 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 por alguns minutos. Posteriormente, 50 µL de Sulforrodamina B (0,1 %) foi adicionado 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 foi adicionado para solubilização da Sulforrodamina B, e as absorbâncias do T0 e dos tempos de 48 ou 72 horas (T48 ou T72) foram quantificadas em 540 nm através do equipamento SpectraMax i3x (Molecular Devices). Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição da proliferação (crescimento celular) e foi calculada a CI₅₀ e a porcentagem de inibição.

6.2 Grupos experimentais

Tabela 1. Representação dos grupos experimentais, tratamento, concentrações, sistema teste (Carcinoma de Pâncreas) e avaliações.

Grupos experimentais	Controle	Substância Teste			Substância de Referência
Tratamento	Veículo (Meio de Cultura)	Fosfoetanolamina (Unicamp)	Fosfobisetanolamina (Unicamp)	Monoetanolamina (Unicamp)	Gencitabina
Concentrações	-	100, 300, 1.000, 3.000 e 10.000 µM			0,001 a 0,1 µM
Tempo de Incubação	72 horas				
Sistema Teste	Carcinoma de Pâncreas (MIA PaCa-2)				
Ensaio de Citotoxicidade	MTT e Vermelho Neutro				
Ensaio de Proliferação	Sulforrodamina B				



AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E ANTIPROLIFERATIVA DA FOSFOETANOLAMINA (UNICAMP), MONOETANOLAMINA (UNICAMP) E FOSFOBISETANOLAMINA (UNICAMP) EM LINHAGENS DE CÉLULAS HUMANAS DE CARCINOMA DE PULMÃO, CARCINOMA DE PÂNCREAS E MELANOMA.

Tabela 2. Representação dos grupos experimentais, tratamento, concentrações, sistema teste (Melanoma) e avaliações.

Grupos experimentais	Controle	Substância Teste			Substância de Referência
Tratamento	Veículo (Meio de Cultura)	Fosfoetanolamina (Unicamp)	Fosfobisetanolamina (Unicamp)	Monoetanolamina (Unicamp)	Cisplatina
Concentrações	-	100, 300, 1.000, 3.000 e 10.000 µM			0,1 a 10 µM
Tempo de Incubação	48 horas				
Sistema Teste	Linhagem de Melanoma humano (A-375)				
Ensaio de Citotoxicidade	MTT e Vermelho Neutro				
Ensaio de Proliferação	Sulforrodamina B				

Tabela 3. Representação dos grupos experimentais, tratamento, concentrações, sistema teste (Carcinoma de Pulmão) e avaliações.

Grupos experimentais	Controle	Substância Teste			Substância de Referência
Tratamento	Veículo (Meio de Cultura)	Fosfoetanolamina (Unicamp)	Fosfobisetanolamina (Unicamp)	Monoetanolamina (Unicamp)	Cisplatina
Concentrações	-	100, 300, 1.000, 3.000 e 10.000 μ M			0,3 a 30 μ M
Tempo de Incubação	72 horas				
Sistema Teste	Carcinoma de Pulmão (A549)				
Ensaio de Citotoxicidade	MTT e Vermelho Neutro				
Ensaio de Proliferação	Sulforrodamina B				

6.3 Análise Estatística

Os dados foram expressos como Média $\pm$ Erro Padrão da Média (EPM). Para a avaliação da diferença estatística entre os grupos experimentais foi realizada análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Bonferroni. Os Valores de p menores que 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_{50s} foram calculados através de regressão não linear (dose resposta – inibição).



AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E ANTIPROLIFERATIVA DA FOSFOETANOLAMINA (UNICAMP), MONOETANOLAMINA (UNICAMP) E FOSFOBISETANOLAMINA (UNICAMP) EM LINHAGENS DE CÉLULAS HUMANAS DE CARCINOMA DE PULMÃO, CARCINOMA DE PÂNCREAS E MELANOMA.

7. RESULTADOS

7.1 Determinação do melhor tempo de incubação das substâncias Teste

Visando determinar o menor tempo de incubação das Substâncias Teste para a observação na redução da viabilidade celular em pelo menos 20%, foi realizado um ensaio exploratório, conforme descrito no item 6.1.1

Conforme observado na Tabela 4, a incubação das Substâncias Teste e a Substância de Referência Cisplatina, sobre as células da linhagem de Melanoma humano, a incubação por 48 horas é suficiente para observar alteração na viabilidade celular em ao menos 20%, com a Cisplatina e com a Monoetanolamina (Unicamp).

Tabela 4: Avaliação do melhor tempo de incubação Substâncias Teste e de Referência sobre a linhagem celular de Melanoma humano através da viabilidade celular por MTT.

MELANOMA (A-375)					
TRATAMENTO	CONCENTRAÇÃO	VIABILIDADE CELULAR (%)			
		24 h	48 h	72 h	96 h
Veículo	-	100	100	100	100
Cisplatina	1 µM	85,6	75,1	90,6	67,9
	10 µM	11,1	7,2	21,0	3,2
Fosfoetanolamina (Unicamp)	1.000 µM	99,1	93,5	100,2	100,2
	10.000 µM	108,2	115,1	101,3	100,7
Monoetanolamina (Unicamp)	1.000 µM	83,3	77,4	104,2	59,2
	10.000 µM	7,4	4,8	35,2	3,2
Fosfobisetanolamina (Unicamp)	1.000 µM	85,6	96,2	96,7	97,9
	10.000 µM	87,6	91,7	83,3	94,8

Conforme observado na tabela 5, em células da linhagem de carcinoma de Pâncreas, o menor período de incubação no qual se observa uma redução da viabilidade, (20% ou mais), induzida por um maior número de substâncias, foi de 72h, sendo então selecionado para as avaliações posteriores.



AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E ANTIPROLIFERATIVA DA FOSFOETANOLAMINA (UNICAMP), MONOETANOLAMINA (UNICAMP) E FOSFOBISETANOLAMINA (UNICAMP) EM LINHAGENS DE CÉLULAS HUMANAS DE CARCINOMA DE PULMÃO, CARCINOMA DE PÂNCREAS E MELANOMA.

Tabela 5: Avaliação do melhor tempo de incubação das Substâncias Teste e de Referência sobre a linhagem celular de Carcinoma de Pâncreas humano através da viabilidade celular por MTT.

CARCINOMA DE PÂNCREAS (MIA PaCa-2)					
TRATAMENTO	CONCENTRAÇÃO	VIABILIDADE CELULAR (%)			
		24 h	48 h	72 h	96 h
Veículo	-	100	100	100	100
Gencitabina	1 µM	159,3	93,5	54,3	16,7
	10 µM	103,1	95,5	52,1	16,8
Fosfoetanolamina (Unicamp)	1.000 µM	109,0	149,8	145,7	111,0
	1.0000 µM	112,6	128,5	186,5	116,6
Monoetanolamina (Unicamp)	1.000 µM	118,5	148,5	206,1	109,6
	10.000 µM	100,8	68,2	52,3	18,4
Fosfobisetanolamina (Unicamp)	1.000 µM	112,8	110,6	182,1	109,7
	10.000 µM	84,4	112,1	172,1	102,5

Conforme observado na tabela 6, em células da linhagem de carcinoma de Pulmão, o menor período de incubação no qual se observa uma redução da viabilidade, de 20% ou mais, de um maior número de substâncias foi o período de 24h, no entanto, como no período mais tardio esse dado não foi repetido, e como a citotoxicidade da Monoetanolamina na concentração de 10.000 µM, não foi confirmada em nenhum outro período, o tempo de 72h foi selecionado para as avaliações posteriores.



AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E ANTIPROLIFERATIVA DA FOSFOETANOLAMINA (UNICAMP), MONOETANOLAMINA (UNICAMP) E FOSFOBISETANOLAMINA (UNICAMP) EM LINHAGENS DE CÉLULAS HUMANAS DE CARCINOMA DE PULMÃO, CARCINOMA DE PÂNCREAS E MELANOMA.

Tabela 6: Avaliação do melhor tempo de incubação das Substâncias Teste e de Referência sobre a linhagem celular de Carcinoma de Pulmão humano através da viabilidade celular por MTT.

CARCINOMA DE PULMÃO (A549)					
TRATAMENTO	CONCENTRAÇÃO	VIABILIDADE CELULAR (%)			
		24 h	48 h	72 h	96 h
Veículo	-	100	100	100	100
Cisplatina	1 µM	91,3	95,8	88,1	85,3
	10 µM	75,0	86,0	65,0	55,0
Fosfoetanolamina (Unicamp)	1.000 µM	94,9	94,7	93,1	97,9
	10.000 µM	74,9	63,7	56,3	53,1
Monoetanolamina (Unicamp)	1.000 µM	79,4	98,1	100,1	102,5
	10.000 µM	69,0	92,6	50,0	31,7
Fosfobisetanolamina (Unicamp)	1.000 µM	92,2	93,7	93,7	99,8
	10.000 µM	89,5	87,8	95,2	96,4

7.2 Avaliação da atividade citotóxica em diferentes concentrações das Substâncias Teste e de Referência em células de melanoma humano

Os tratamentos com a Fosfoetanolamina (Figuras 6A e 7A) e Fosfobisetanolamina (Figuras 6B e 7B), provenientes da (Unicamp), testadas nas concentrações de 100 a 10.000 µM não resultaram em nenhuma alteração na viabilidade das células de Melanoma humano, avaliadas por diferentes metodologias (MTT- Figuras 6A e 6B - e Vermelho neutro – Figuras 7A e 7B), no período de 48h. O tratamento com a Substância Teste, Monoetanolamina (Unicamp), reduziu na viabilidade dessas células em $17,6 \pm 4,9$ % e $48,6 \pm 1,3$ % (Figura 6C), nas concentrações de 3.000 e 10.000 µM, respectivamente, quando avaliada pelo método do MTT. A concentração calculada capaz de reduzir a viabilidade em 50% das células (CI_{50}) foi de 10.225,0 (8.375,0 – 12.483,0) µM. Quando avaliada pelo método do vermelho neutro, a Monoetanolamina (Unicamp) reduziu na viabilidade dessas células em $45,0 \pm 7,8$ % na concentração de 10.000 µM (Figura 7C), de forma que sua (CI_{50}), não pôde ser avaliada por esse método, que se mostrou menos sensível. A Cisplatina (0,1 µM - 10 µM), utilizada como Substância de Referência reduziu a viabilidade das células de Melanoma humano com uma CI_{50} de 2,9 (2,3 – 3,8) µM atingido uma citotoxicidade de $86,8 \pm 8,9$ % na maior concentração testada (10 µM) (Figura 6D) pelo método do MTT. Resultados semelhantes foram encontrados com o método do vermelho neutro; CI_{50} de 2,9

(2,0 – 4,1) μM , citotoxicidade de $75,6 \pm 8,7$ % na maior concentração testada (10 μM) de (Figura 7D).

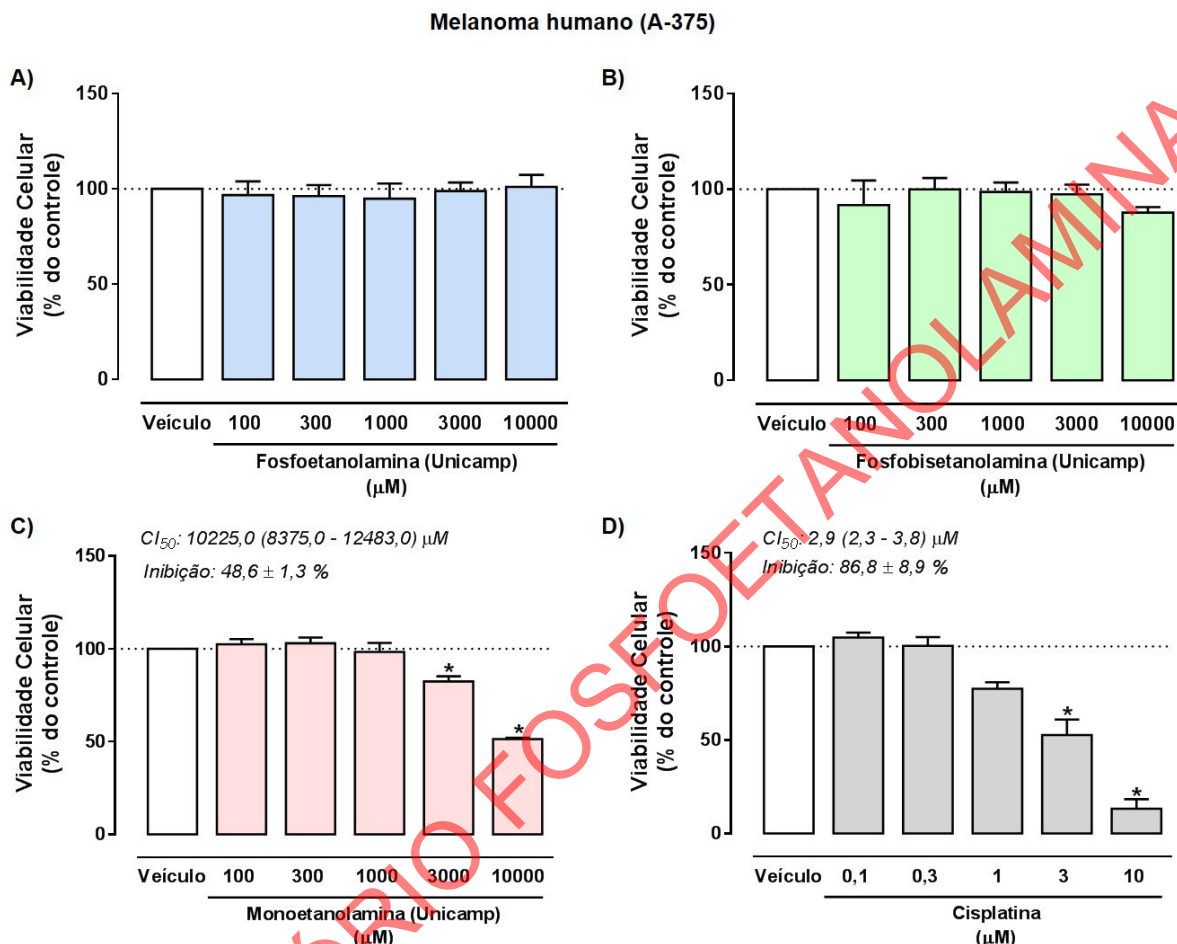


Figura 6. Avaliação da viabilidade celular da Fosfoetanolamina (Unicamp), Monoetanolamina (Unicamp), Fosfobisetanolamina (Unicamp) e Cisplatina nas células de Melanoma humano, através do ensaio de MTT. As células foram incubadas com (A) Fosfoetanolamina (Unicamp), (B) Fosfobisetanolamina (Unicamp), (C) Monoetanolamina (Unicamp) nas concentrações de 100, 300, 1.000, 3.000 ou 10.000 μM ou com o controle (D) Cisplatina 0,1; 0,3; 1; 3 ou 10 μM durante 48 horas e, em seguida, foi realizado o ensaio de viabilidade celular através do **método de MTT**. 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, seguido pelo teste de Bonferroni. 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.

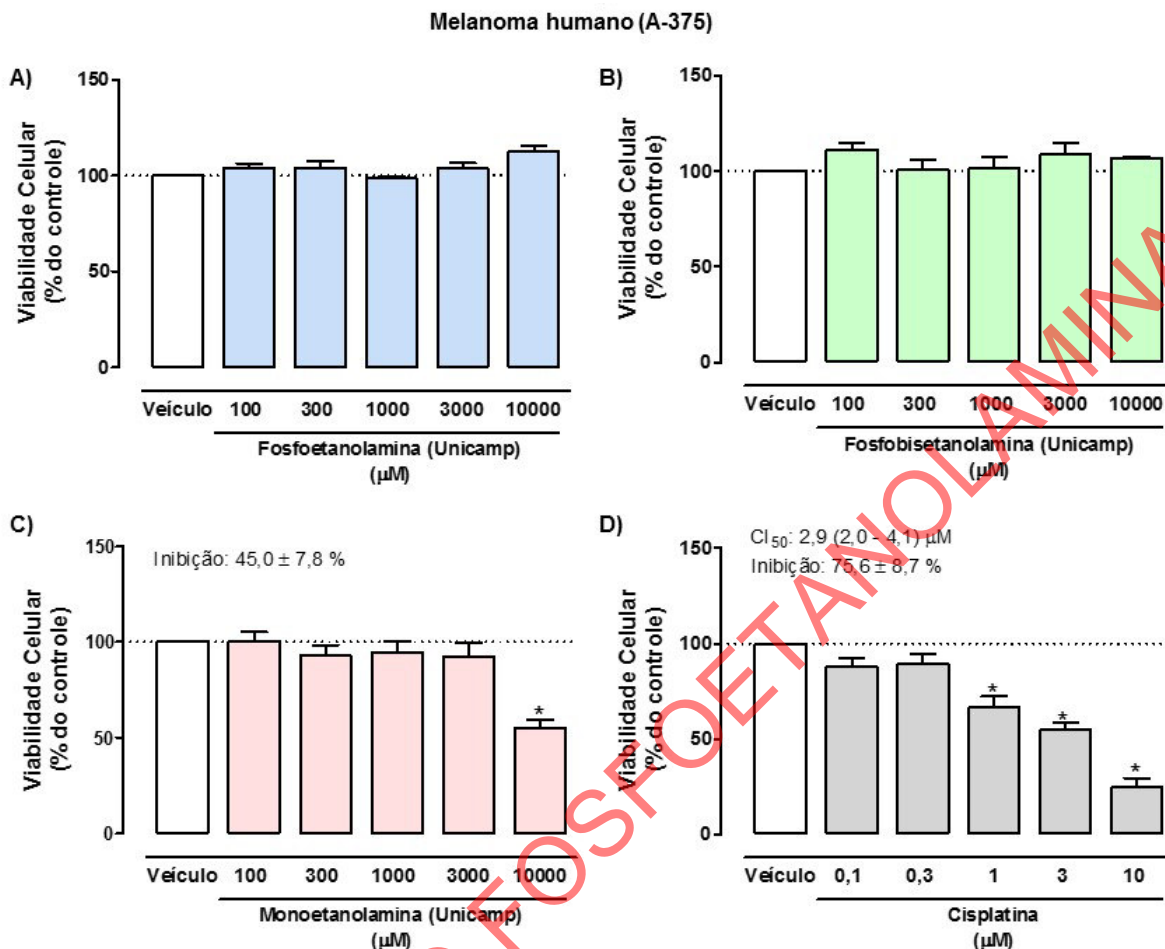


Figura 7. Avaliação da viabilidade celular da Fosfoetanolamina (Unicamp), Monoetanolamina (Unicamp), Fosfobisetanolamina (Unicamp) e Cisplatina nas células de Melanoma humano, através do ensaio de Vermelho Neutro. As células foram incubadas com (A) Fosfoetanolamina (Unicamp), (B) Fosfobisetanolamina (Unicamp), (C) Monoetanolamina (Unicamp) nas concentrações de 100, 300, 1.000, 3.000 ou 10.000 μM ou com o controle (D) Cisplatina 0,1; 0,3; 1; 3 ou 10 μM durante 48 horas e, em seguida, foi realizado o ensaio de viabilidade celular através do **método de Vermelho neutro**. As barras representam a média $\pm$ erro padrão da média de 3 ensaios distintos. Para a análise estatística foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido pelo teste de Bonferroni. 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.



AValiação DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E ANTIPROLIFERATIVA DA FOSFOETANOLAMINA (UNICAMP), MONOETANOLAMINA (UNICAMP) E FOSFOBISSETANOLAMINA (UNICAMP) EM LINHAGENS DE CÉLULAS HUMANAS DE CARCINOMA DE PULMÃO, CARCINOMA DE PÂNCREAS E MELANOMA.

7.3 Avaliação da atividade citotóxica em diferentes concentrações das Substâncias Teste e de Referência em células de carcinoma de Pâncreas

Assim como observado para as células de melanoma, a Fosfoetanolamina (Unicamp) e a Fosfobisetanolamina (Unicamp) testadas até a concentração de 10.000 μM não foram citotóxicas para as células de Carcinoma de Pâncreas quando avaliadas pelo método do MTT (Figuras 8A e B) ou pelo vermelho neutro (Figura 9A e B). O tratamento com a Substância Teste, Monoetanolamina (Unicamp), (100–10.000 μM) também resultou em redução na viabilidade das células de carcinoma de Pâncreas. A CI_{50} calculada utilizando o método do MTT foi de 5.525,0 (3.073,0 – 9.934,0) μM e de 8.210 (4.934 – 13.660) μM quando avaliado por vermelho neutro. A citotoxicidade atingida na máxima concentração utilizada (10.000 μM) foi de $75,3 \pm 11,3 \%$ pelo método do MTT (Figura 8C) e $64,2 \pm 1,9 \%$, pelo método do vermelho neutro (Figura 9C). A Gencitabina, utilizada como Substância de Referência nas concentrações de 0,001 - 0,1 μM , reduziu a viabilidade celular com uma CI_{50} de 0,045 (0,022 – 0,091) μM calculada pelo método do MTT e de 0,04 (0,02 – 0,09) μM pelo método do vermelho neutro. A citotoxicidade máxima observada para gencitabina nas células de carcinoma de Pâncreas foi de $64,3 \pm 3,8 \%$, (MTT, Figura 8D) e $64,5 \pm 17,7 \%$ (vermelho neutro, Figura 9D) na concentração de 0,1 μM de Gencitabina.

AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E ANTIPROLIFERATIVA DA FOSFOETANOLAMINA (UNICAMP), MONOETANOLAMINA (UNICAMP) E FOSFOBISETANOLAMINA (UNICAMP) EM LINHAGENS DE CÉLULAS HUMANAS DE CARCINOMA DE PULMÃO, CARCINOMA DE PÂNCREAS E MELANOMA.

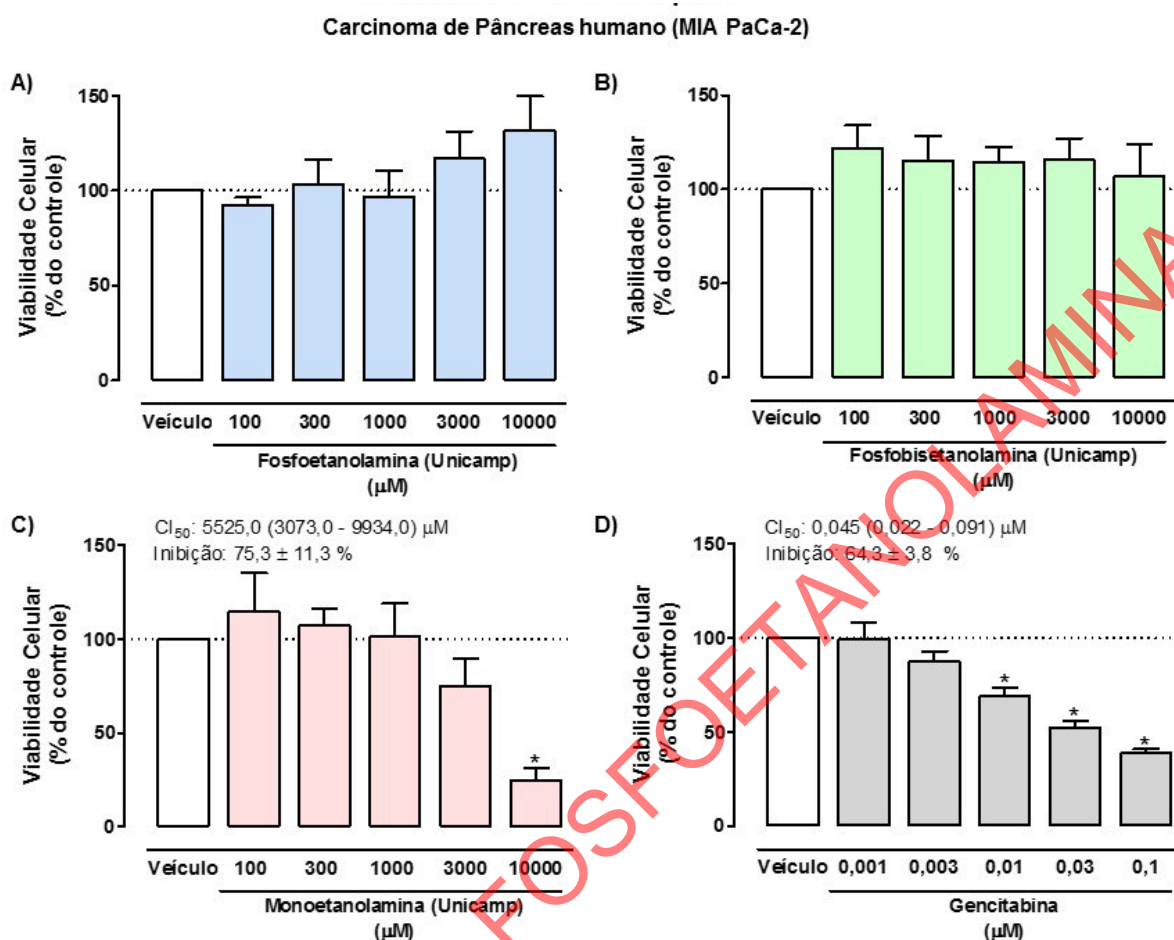


Figura 8. Avaliação da viabilidade celular da Fosfoetanolamina (Unicamp), Monoetanolamina (Unicamp), Fosfobisetanolamina (Unicamp) e Gencitabina nas células de Carcinoma de Pâncreas, através do ensaio de MTT. As células foram incubadas com (A) Fosfoetanolamina (Unicamp), (B) Fosfobisetanolamina (Unicamp), (C) Monoetanolamina (Unicamp) nas concentrações de 100, 300, 1.000, 3.000 ou 10.000 µM ou com o controle (D) Gencitabina 0,001; 0,003; 0,01; 0,03 ou 0,1 µM, durante 72 horas, e, em seguida, foi realizado o ensaio de viabilidade celular através do método de MTT. As barras representam a média ± erro padrão da média de 3 ensaios distintos. Para as análises estatísticas foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido pelo teste de Bonferroni. 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.

AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E ANTIPROLIFERATIVA DA FOSFOETANOLAMINA (UNICAMP), MONOETANOLAMINA (UNICAMP) E FOSFOBISETANOLAMINA (UNICAMP) EM LINHAGENS DE CÉLULAS HUMANAS DE CARCINOMA DE PULMÃO, CARCINOMA DE PÂNCREAS E MELANOMA.

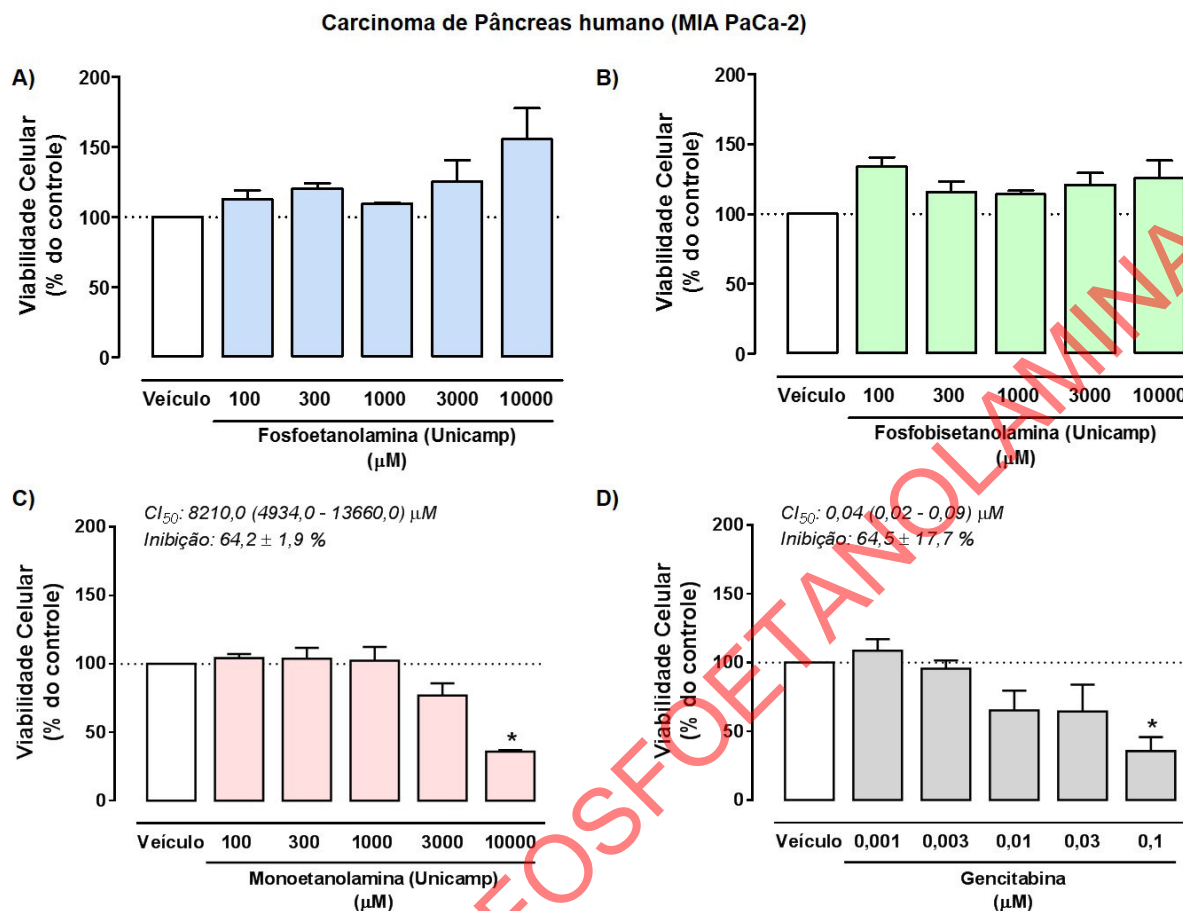


Figura 9. Avaliação da viabilidade celular da Fosfoetanolamina (Unicamp), Monoetanolamina (Unicamp), Fosfobisetanolamina (Unicamp) e Gencitabina nas células de Carcinoma de Pâncreas, através do ensaio de Vermelho Neutro. As células foram incubadas com (A) Fosfoetanolamina (Unicamp), (B) Fosfobisetanolamina (Unicamp), (C) Monoetanolamina (Unicamp) nas concentrações de 100, 300, 1.000, 3.000 ou 10.000 µM ou com o controle (D) Gencitabina 0,001; 0,003; 0,01; 0,03 ou 0,1 µM, durante 72 horas e, em seguida, foram realizados os ensaios de viabilidade celular através do **método de Vermelho Neutro**. 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, seguido pelo teste de Bonferroni. 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.



AValiação DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E ANTIPROLIFERATIVA DA FOSFOETANOLAMINA (UNICAMP), MONOETANOLAMINA (UNICAMP) E FOSFOBISETANOLAMINA (UNICAMP) EM LINHAGENS DE CÉLULAS HUMANAS DE CARCINOMA DE PULMÃO, CARCINOMA DE PÂNCREAS E MELANOMA.

7.4 Avaliação da atividade citotóxica das Substâncias Teste e de Referência em células de carcinoma de Pulmão

Diferentemente dos resultados encontrados nas demais linhagens celulares avaliadas, em carcinoma de Pulmão a Fosfoetanolamina (Unicamp) reduziu a viabilidade celular em $31,6 \pm 14,8$ % na maior concentração testada $10.000 \mu\text{M}$ (Figura 10A), quando avaliada pelo método mais sensível, o do MTT. Quando avaliada pelo método do vermelho neutro a citotoxicidade ($10,8 \pm 3,1$) % não foi significativa (Figura 11A). Assim como para as demais células, a Fosfobisetanolamina (Unicamp) testada até a concentração de $10.000 \mu\text{M}$ não foi citotóxica (Figuras 10B e 11B). Diferentemente dos dados obtidos com a Monoetanolamina (Unicamp) para as demais células, para a linhagem de Carcinoma de Pulmão, essa substância teste não foi citotóxica (Figuras 10C e 11C). A substância de Referência Cisplatina também foi usada na linhagem de carcinoma de pulmão, apresentando uma CI_{50} de $4,6 \mu\text{M}$ ($2,6 - 8,1$) quando avaliada pelo método do MTT e de $9,4$ ($6,2 - 14,1$) μM , quando avaliada pelo método do vermelho neutro (Figuras 10D e 11D). Na concentração máxima utilizada, $30 \mu\text{M}$, a citotoxicidade da Cisplatina observada foi de $79,2 \pm 5,6$ % pelo método do MTT (Figuras 10D) e de $66,8 \pm 10,2$ % pelo método do Vermelho neutro (Figura 11D).

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E ANTIPROLIFERATIVA DA FOSFOETANOLAMINA (UNICAMP), MONOETANOLAMINA (UNICAMP) E FOSFOBISETANOLAMINA (UNICAMP) EM LINHAGENS DE CÉLULAS HUMANAS DE CARCINOMA DE PULMÃO, CARCINOMA DE PÂNCREAS E MELANOMA.

Carcinoma de Pulmão humano (A549)

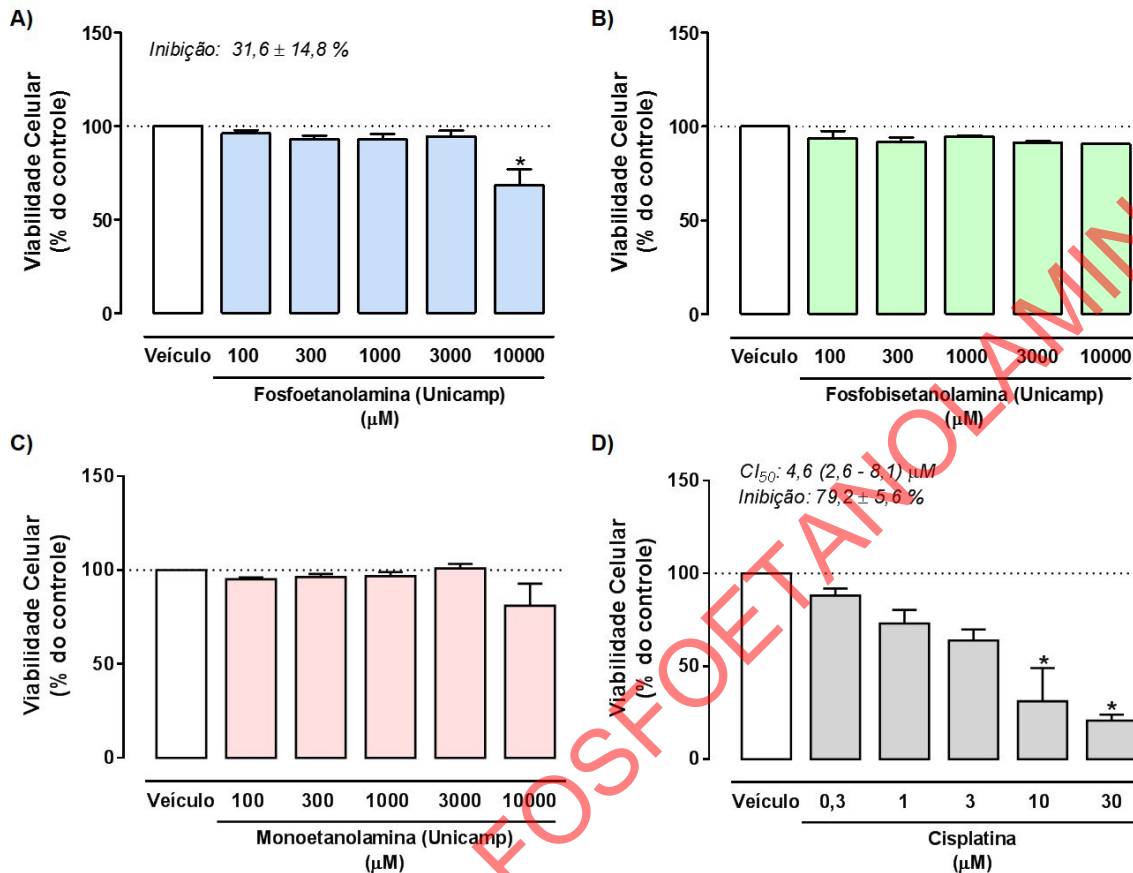


Figura 10. Avaliação da viabilidade celular da Fosfoetanolamina (Unicamp), Monoetanolamina (Unicamp), Fosfobisetanolamina (Unicamp) e Gencitabina nas células de Carcinoma de Pulmão, através do ensaio de MTT. As células foram incubadas com (A) Fosfoetanolamina (Unicamp), (B) Fosfobisetanolamina (Unicamp), (C) Monoetanolamina (Unicamp) nas concentrações de 100, 300, 1.000, 3.000 ou 10.000 µM ou com o controle (D) Cisplatina 0,3; 1; 3; 10 ou 30 µM, durante 72 horas e, em seguida, foi realizado o ensaio de viabilidade celular através do **método de MTT**. 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, seguido pelo teste de Bonferroni. 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.

AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E ANTIPROLIFERATIVA DA FOSFOETANOLAMINA (UNICAMP), MONOETANOLAMINA (UNICAMP) E FOSFOBISETANOLAMINA (UNICAMP) EM LINHAGENS DE CÉLULAS HUMANAS DE CARCINOMA DE PULMÃO, CARCINOMA DE PÂNCREAS E MELANOMA.

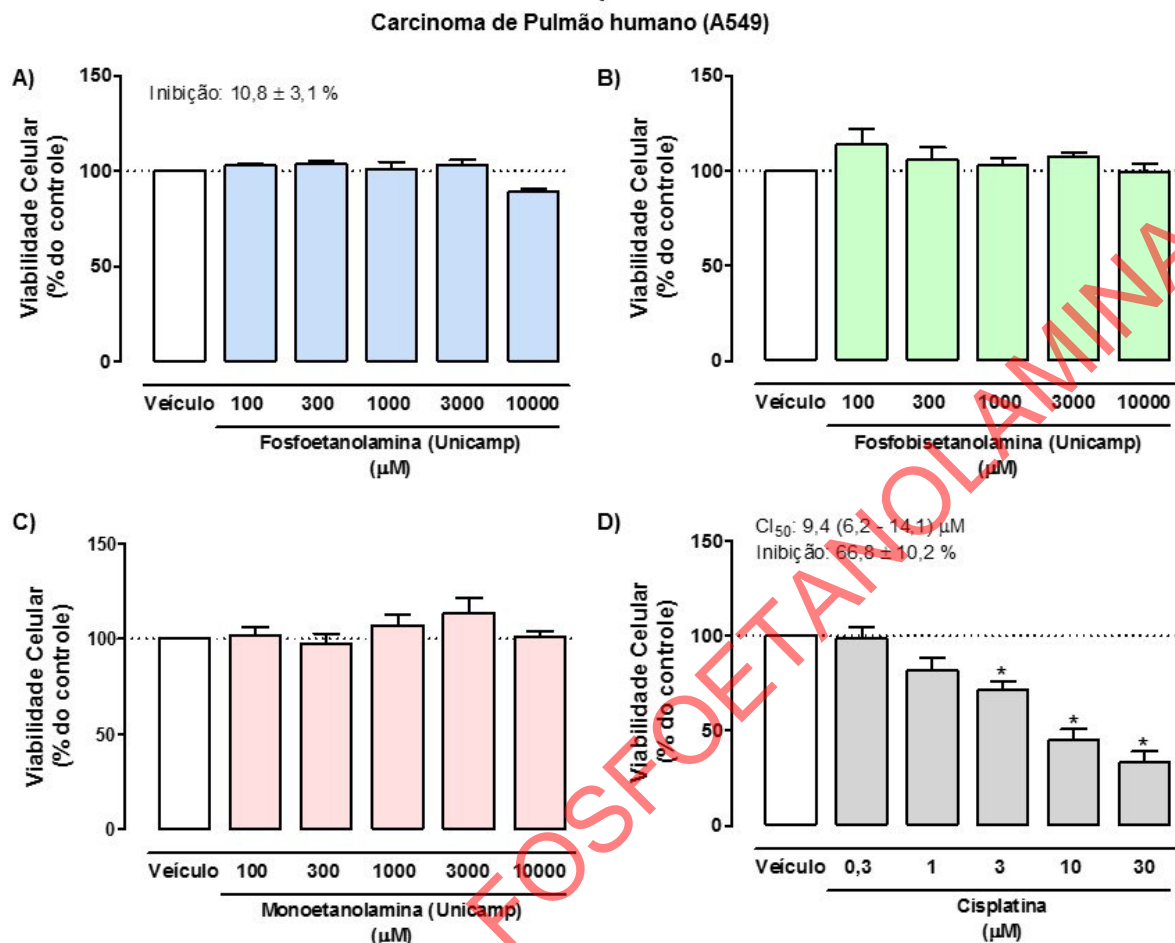


Figura 11. Avaliação da viabilidade celular da Fosfoetanolamina (Unicamp), Monoetanolamina (Unicamp), Fosfobisetanolamina (Unicamp) e Gencitabina nas células de Carcinoma de Pulmão, através do ensaio de Vermelho Neutro. As células foram incubadas com (A) Fosfoetanolamina (Unicamp), (B) Fosfobisetanolamina (Unicamp), (C) Monoetanolamina (Unicamp) nas concentrações de 100, 300, 1.000, 3.000 ou 10.000 µM ou com o controle (D) Cisplatina 0,3; 1; 3; 10 ou 30 µM, durante 72 horas e, em seguida, foi realizado o ensaio de viabilidade celular através do **método de Vermelho Neutro**. 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, seguido pelo teste de Bonferroni. 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.



AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E ANTIPROLIFERATIVA DA FOSFOETANOLAMINA (UNICAMP), MONOETANOLAMINA (UNICAMP) E FOSFOBISETANOLAMINA (UNICAMP) EM LINHAGENS DE CÉLULAS HUMANAS DE CARCINOMA DE PULMÃO, CARCINOMA DE PÂNCREAS E MELANOMA.

7.5 Avaliação da atividade antiproliferativa das Substâncias Teste e de Referência em células de melanoma humano

Os tratamentos com a Fosfoetanolamina (Figuras 12A) e Fosfobisetanolamina (Figuras 12B), provenientes da (Unicamp), testadas nas concentrações de 100 a 10.000 μM , por 48h, não resultaram na alteração na proliferação das células de Melanoma, avaliadas pelo método da Sulforrodamina B. Diferentemente, o tratamento com a substância teste Monoetanolamina (Unicamp), nas mesma condições, resultou em redução na proliferação das células de Melanoma humano, com CI_{50} de 7.413,0 (6.028,0 – 9.115,0) μM e porcentagem de inibição na concentração de 10.000 μM de $63,4 \pm 9,5 \%$ (Figura 7C), a Cisplatina, utilizada como Substância de Referência reduziu a proliferação celular com uma CI_{50} de 1,1 (0,6 – 1,8) μM e inibição de 100 % (Figura 12D).

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E ANTIPROLIFERATIVA DA FOSFOETANOLAMINA (UNICAMP), MONOETANOLAMINA (UNICAMP) E FOSFOBISETANOLAMINA (UNICAMP) EM LINHAGENS DE CÉLULAS HUMANAS DE CARCINOMA DE PULMÃO, CARCINOMA DE PÂNCREAS E MELANOMA.

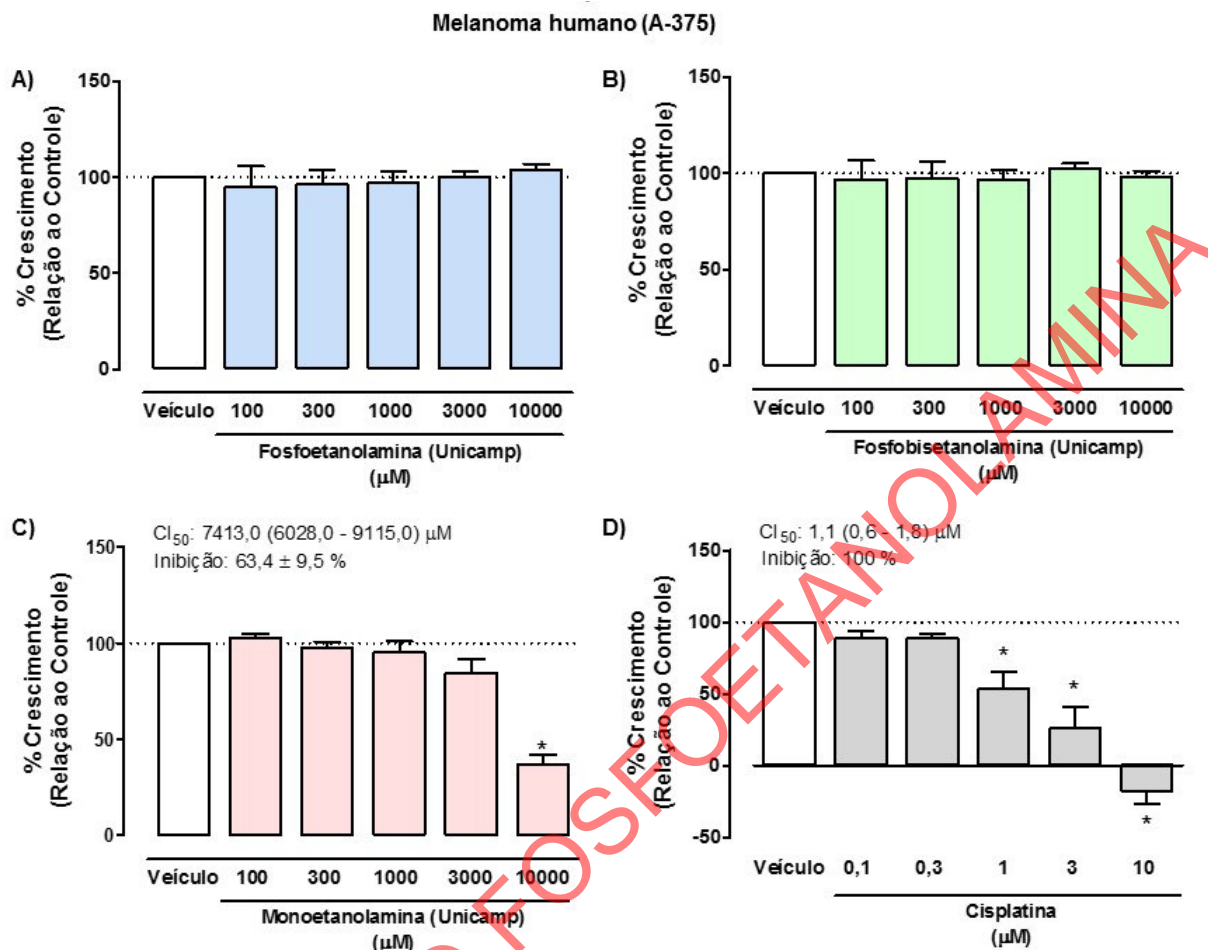


Figura 12. Avaliação da proliferação celular da Fosfoetanolamina (Unicamp), Monoetanolamina (Unicamp), Fosfobisetanolamina (Unicamp) e Cisplatina nas células de Melanoma humano, através do ensaio de marcação proteica com Sulforrodamina B. As células foram incubadas com (A) Fosfoetanolamina (Unicamp), (B) Fosfobisetanolamina (Unicamp), (C) Monoetanolamina (Unicamp) nas concentrações de 100, 300, 1.000, 3.000 ou 10.000 μM ou com o controle (D) Cisplatina 0,1; 0,3; 1; 3 ou 10 μM durante 48 horas e, em seguida, 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, seguido pelo teste de Bonferroni. 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.

7.6 Avaliação da atividade antiproliferativa das Substâncias Teste e de Referência em células de carcinoma de Pâncreas humano

Assim como observado para as células de melanoma, os tratamentos com a Fosfoetanolamina (Figuras 13A) e Fosfobisetanolamina (Figuras 13B), provenientes da (Unicamp), não resultaram na alteração na proliferação das células da linhagem humana de

carcinoma de Pâncreas. No entanto, a incubação com a Monoetanolamina (Unicamp), por 72h, resultou em redução na proliferação das células de Carcinoma de Pâncreas com CI_{50} de 3.486,0 (1.784,0 – 6.813,0) μM e porcentagem de inibição de 100 % na concentração de 10000 μM (Figura 13C). A substância de Referência, Gencitabina, reduziu a proliferação celular com uma CI_{50} de 0,011 (0,007 – 0,018) μM e inibição de $83,2 \pm 11,6$ % na concentração de 0,1 μM (Figura 13D).

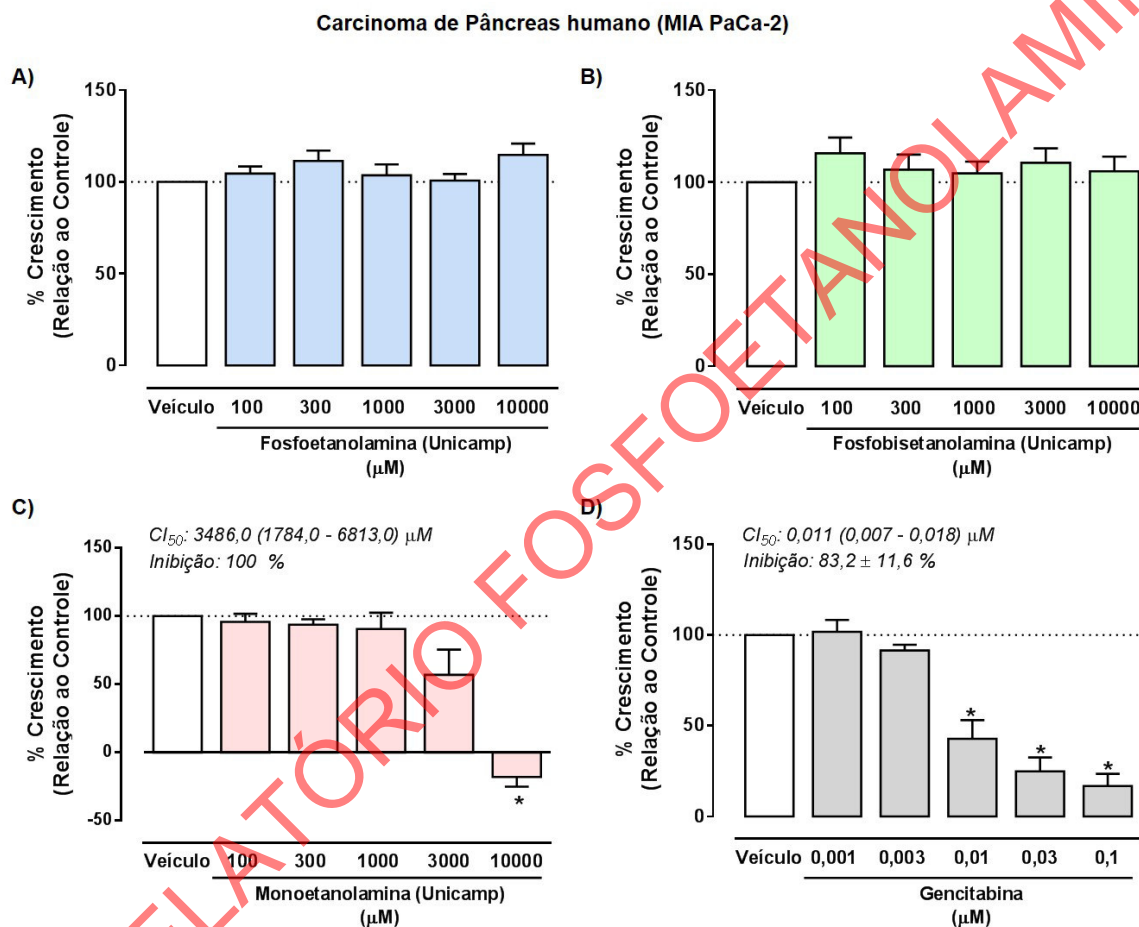


Figura 13. Avaliação da proliferação celular da Fosfoetanolamina (Unicamp), Monoetanolamina (Unicamp), Fosfobisetanolamina (Unicamp) e Cisplatin nas células de Carcinoma de Pâncreas, através do ensaio de marcação proteica com Sulforrodamina B. As células foram incubadas com (A) Fosfoetanolamina (Unicamp), (B) Fosfobisetanolamina (Unicamp), (C) Monoetanolamina (Unicamp) nas concentrações de 100, 300, 1.000, 3.000 ou 10.000 μM ou com o controle (D) Gencitabina 0,001; 0,003; 0,01; 0,03 ou 0,1 μM , durante 72 horas e, em seguida, 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, seguido pelo teste de Bonferroni. 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.



AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E ANTIPROLIFERATIVA DA FOSFOETANOLAMINA (UNICAMP), MONOETANOLAMINA (UNICAMP) E FOSFOBISETANOLAMINA (UNICAMP) EM LINHAGENS DE CÉLULAS HUMANAS DE CARCINOMA DE PULMÃO, CARCINOMA DE PÂNCREAS E MELANOMA.

7.7 Avaliação da atividade antiproliferativa das Substâncias Teste e de Referência em células de carcinoma de Pulmão humano

Diferentemente do observado para as células de melanoma e carcinoma de Pâncreas, a incubação com a Fosfoetanolamina (Unicamp) levou à inibição da proliferação celular de $36,1 \pm 24,5$ % na concentração de $10.000 \mu\text{M}$ (Figura 14A). No entanto, semelhantemente ao observado com as demais linhagens celulares, a Fosfobisetanolamina, proveniente da (Unicamp), não resultou na alteração na proliferação das células de carcinoma de Pâncreas (Figura 14B) e o tratamento com a Monoetanolamina (Unicamp), inibiu a proliferação em $31,8 \pm 7,7$ % (Figura 14C), na concentração de $1.000 \mu\text{M}$. A Cisplatina, utilizada como substância de Referência, quando testada na linhagem de Carcinoma de Pulmão, apresentou uma CI_{50} em $2,5$ ($1,5 - 4,1$) μM e inibição de 100 % (Figura 14D).

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E ANTIPROLIFERATIVA DA FOSFOETANOLAMINA (UNICAMP), MONOETANOLAMINA (UNICAMP) E FOSFOBISETANOLAMINA (UNICAMP) EM LINHAGENS DE CÉLULAS HUMANAS DE CARCINOMA DE PULMÃO, CARCINOMA DE PÂNCREAS E MELANOMA.

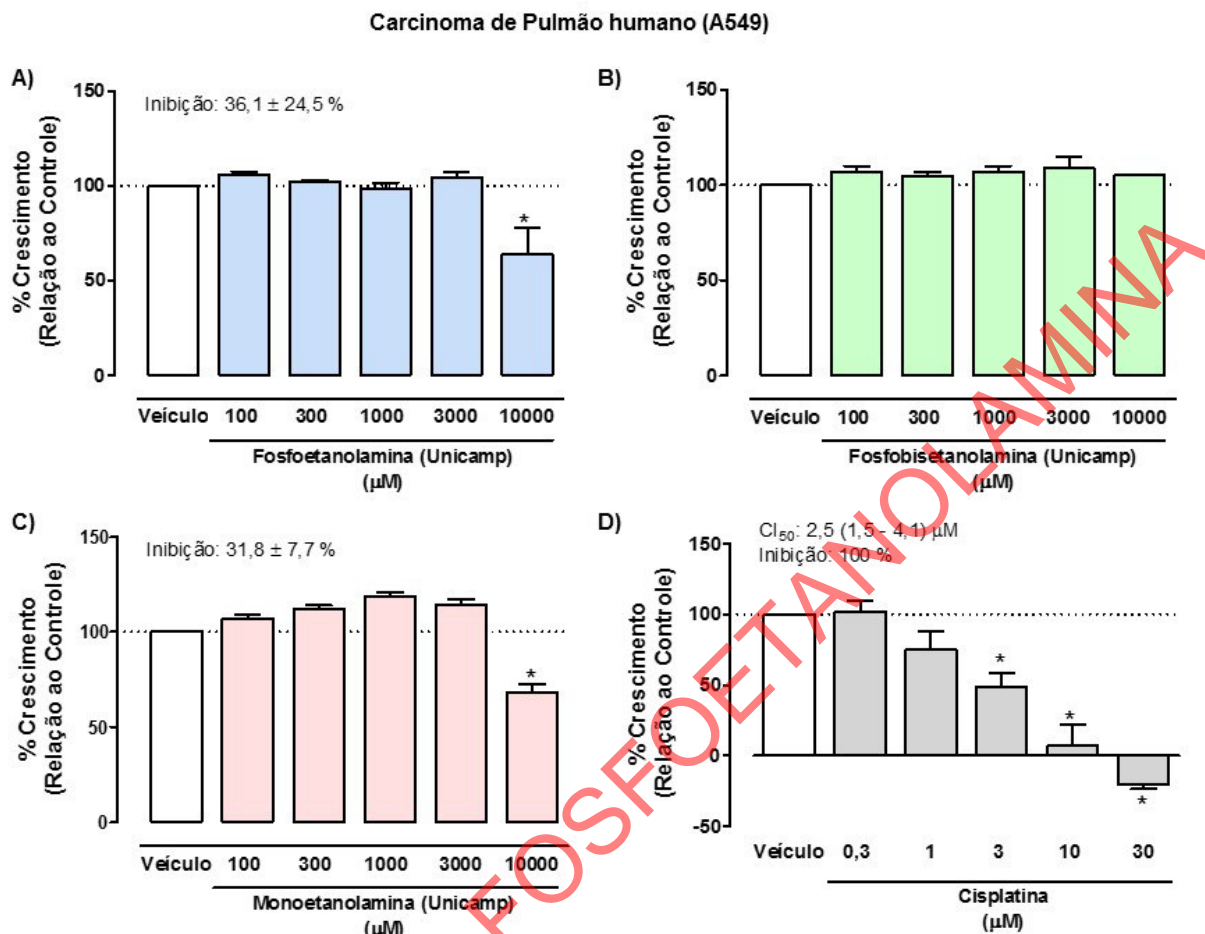


Figura 14. Avaliação da proliferação celular da Fosfoetanolamina (Unicamp), Monoetanolamina (Unicamp), Fosfobisetanolamina (Unicamp) e Cisplatina nas células de Carcinoma de Pulmão, através do ensaio de marcação proteica com Sulforrodamina B. As células foram incubadas com (A) Fosfoetanolamina (Unicamp), (B) Fosfobisetanolamina (Unicamp), (C) Monoetanolamina (Unicamp) nas concentrações de 100, 300, 1.000, 3.000 ou 10.000 µM ou com o controle (D) Cisplatina 0,3; 1; 3; 10 ou 30 µM, durante 72 horas e, em seguida, 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, seguido pelo teste de Bonferroni. 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.

7.8 Determinação do pH da Fosfoetanolamina (Unicamp) diluído em meio de cultura da linhagem de carcinoma de Pulmão

Considerando os dados da literatura que demonstraram que a incubação de células tumorais com a Fosfoetanolamina induziu redução na viabilidade celular quando empregada em altas concentrações (Ferreira *et al.*, 2013a; Ferreira *et al.*, 2013b; Ferreira *et al.*, 2013c),



AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E ANTIPROLIFERATIVA DA FOSFOETANOLAMINA (UNICAMP), MONOETANOLAMINA (UNICAMP) E FOSFOBISSETANOLAMINA (UNICAMP) EM LINHAGENS DE CÉLULAS HUMANAS DE CARCINOMA DE PULMÃO, CARCINOMA DE PÂNCREAS E MELANOMA.

e considerando as mudanças na coloração observado no meio de cultura, um indicativo de alteração do pH, observadas com a concentração de 10.000 µM da Fosfoetanolamina. (Unicamp), a única que apresentou atividade citotóxica em células de carcinoma de pulmão, foram realizadas quatro avaliações do pH em meio de cultura contendo, ou não, a Fosfoetanolamina (Unicamp) em 4 dias diferentes. O pH foi avaliado somente em meio de cultura F12-K, ou em meio de cultura F12-K contendo as concentrações da Fosfoetanolamina (Unicamp) nas concentrações finais de 10.000 µM, 30.000 µM ou 100.000 µM. Conforme mostrado na Tabela 7, a faixa de pH do meio de cultura F12-K ficou entre 7,4 – 8,2 (Média = $7,76 \pm 0,15$). A dissolução da Fosfoetanolamina (Unicamp), de forma a atingir as concentrações finais de 10.000 µM, 30.000 µM e 100.000 µM, causou redução dos valores de pH para $6,45 \pm 0,04$; $5,67 \pm 0,03$ e $4,98 \pm 0,02$, respectivamente.

Tabela 7: Avaliação dos valores de pH para cada concentração de Fosfoetanolamina (Unicamp) em meio de cultura utilizado para a linhagem de carcinoma de Pulmão (A549).

	Meio de Cultura (F12-k) Puro	Fosfoetanolamina (Unicamp) 10.000 µM	Fosfoetanolamina (Unicamp) 30.000 µM	Fosfoetanolamina (Unicamp) 100.000 µM
pH (Avaliação 1)	8,19	6,51	5,62	4,96
pH (Avaliação 2)	7,49	6,37	5,65	4,97
pH (Avaliação 3)	7,70	6,40	5,78	5,01
pH (Avaliação 4)	7,66	6,54	5,64	4,99
Média ± EPM	$7,76 \pm 0,15$	$6,45 \pm 0,04$	$5,67 \pm 0,03$	$4,98 \pm 0,02$

7.9 Avaliação da atividade citotóxica a antiproliferativa da Fosfoetanolamina (Unicamp) nas concentrações de 10.000 µM, 30.000 µM e 100.000 µM e do pH equivalente, em linhagem de carcinoma de Pulmão utilizando os ensaios de MTT, Vermelho Neutro e Sulforrodamina B

Como a Fosfoetanolamina (Unicamp) na concentração de 10.000 µM (10 mM) causou, em células de carcinoma de Pulmão, alterações tanto na viabilidade celular, quanto na proliferação celular, e considerando que nessa concentração o meio de cultura apresentou alteração de cor (indicando alteração no pH), um novo ensaio foi conduzido para verificar a influência do pH nos efeitos observados. Para isso, o meio de cultura F12-K foi



AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E ANTIPROLIFERATIVA DA FOSFOETANOLAMINA (UNICAMP), MONOETANOLAMINA (UNICAMP) E FOSFOBISSETANOLAMINA (UNICAMP) EM LINHAGENS DE CÉLULAS HUMANAS DE CARCINOMA DE PULMÃO, CARCINOMA DE PÂNCREAS E MELANOMA.

acidificado, de forma atingir o pH equivalente para cada concentração Fosfoetanolamina (Unicamp). Assim, tanto a Substância Teste nas concentrações de 10.000 μ M, 30.000 μ M e 100.000 μ M (10 – 100 mM), quanto os meios de cultura, na ausência da substância Teste, mas com o pH equivalente, foram incubados com as células de carcinoma de Pulmão por 72 horas. Conforme pode ser observado na Figura 15, no ensaio do MTT (Figura 15A), as três concentrações testadas e as três soluções com pHs equivalentes diminuíram a viabilidade celular, quando comparadas com o grupo veículo (pH 7,7). Na avaliação da viabilidade celular através do método do Vermelho Neutro (Figura 15B) e proliferação celular através da Sulforrodamina B (Figura 15C), somente as concentrações de 30.000 μ M e 100.000 μ M e o meio de cultura com o pH equivalente, reduziram significativamente os valores quando comparados com o grupo veículo (pH 7,76). Não houve diferença significativa entre o efeito da fosfoetanolamina e do meio com pH semelhante, em nenhuma condição testada.

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E ANTIPROLIFERATIVA DA FOSFOETANOLAMINA (UNICAMP), MONOETANOLAMINA (UNICAMP) E FOSFOBISETANOLAMINA (UNICAMP) EM LINHAGENS DE CÉLULAS HUMANAS DE CARCINOMA DE PULMÃO, CARCINOMA DE PÂNCREAS E MELANOMA.

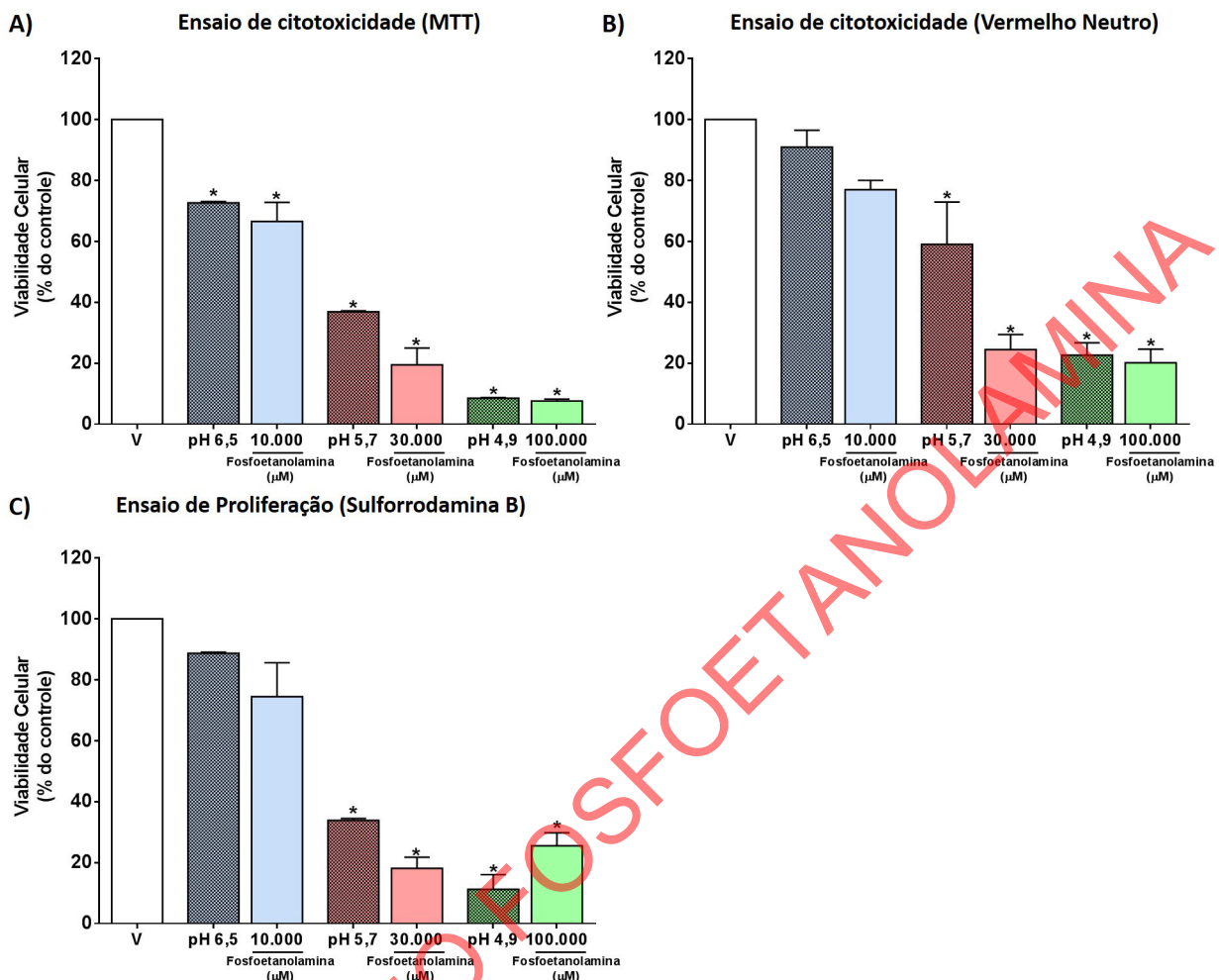


Figura 15. Avaliação dos efeitos da alteração do pH sobre a linhagem de carcinoma de Pulmão. As concentrações de Fosfoetanolamina a (Unicamp) de 10.000, 30.000 e 10.0000 μM e dos pHs equivalentes (7,7; 6,5; 5,7 e 4,9) do meio de cultura F12-K foram avaliadas nos ensaios de (A) MTT, (B) Vermelho Neutro ou (C) Sulforrodamina B, após 72 horas de incubação em células de carcinoma de pulmão. As barras representam a média $\pm$ erro padrão da média de 2 ensaios distintos em triplicata. Para as análises estatísticas foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido pelo teste de Bonferroni.

8. CONCLUSÃO DO ESTUDO

Os resultados descritos neste relatório demonstram que:

1. A Monoetanolamina (Unicamp), quando incubada em altas concentrações ($\geq 3.000 \mu\text{M}$) reduziu tanto a viabilidade com a proliferação de células de melanoma humano (A375) e em células de carcinoma de Pâncreas humano (MIA PaCa-2). No entanto, não apresentou o mesmo efeito sobre as células de carcinoma de Pulmão humano (A549).



AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E ANTIPROLIFERATIVA DA FOSFOETANOLAMINA (UNICAMP), MONOETANOLAMINA (UNICAMP) E FOSFOBISETANOLAMINA (UNICAMP) EM LINHAGENS DE CÉLULAS HUMANAS DE CARCINOMA DE PULMÃO, CARCINOMA DE PÂNCREAS E MELANOMA.

2. Nas condições aqui descritas, a Fosfoetanolamina (sintetizada pela Unicamp), casou inibição parcial sobre a viabilidade e a proliferação das células da linhagem celular de carcinoma de Pulmão humano (A549) (em concentrações $\geq 10.000 \mu\text{M}$), ainda assim, esse efeito parece estar relacionado com a redução do pH do meio de cultura causado pela mesma.
3. A Fosfobisetanolamina (Unicamp) testada até a concentração de $10.000 \mu\text{M}$ não apresentou atividade citotóxica e/ou antiproliferativa em nenhuma das linhagens de células tumorais avaliadas.
4. Os antitumorais Cisplatina e Gencitabina, utilizados neste estudo como Substâncias de Referência, apresentaram atividade citotóxica e antiproliferativa em baixas concentrações, validando assim o modelo experimental utilizado.

9. REGISTRO DE DADOS BRUTOS

Todos os dados brutos e observações relacionadas ao estudo foram registrados em formulário adequado onde ficarão arquivadas no CIEnP por 5 anos.

10. ARQUIVAMENTO

Uma cópia original do Plano de Estudo, Dados Brutos e Relatório Final foram arquivados no CIEnP, onde serão mantidos por 5 anos. As Substâncias Teste (Fosfoetanolamina, Monoetanolamina e Fosfobisetanolamina (sintetizadas pela UNICAMP)) foram armazenadas em local apropriado no CIEnP.

11. REFERÊNCIAS

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.



AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E ANTIPROLIFERATIVA DA FOSFOETANOLAMINA (UNICAMP), MONOETANOLAMINA (UNICAMP) E FOSFOBISSETANOLAMINA (UNICAMP) EM LINHAGENS DE CÉLULAS HUMANAS DE CARCINOMA DE PULMÃO, CARCINOMA DE PÂNCREAS E MELANOMA.

Ferreira AK; Freitas VM; Levy D; Ruiz JLM; Bydlowski SP; Rici REG; Filho OMR; Chierice GO; Maria DA. Anti-angiogenic and anti-metastatic activity of synthetic phosphoethanolamine. *PloS One*. 2013, 8(3) e57937 (b).

Ferreira AK; Meneguelo R; Pereira A; Filho OMR; Chierice GO; Maria DA. Synthetic phosphoethanolamine induces cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells through the mitochondrial pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2013, 67:481-487 (a).

Ferreira AK; Santana-Lemos BAA; Rego EM; Filho OMR; Chierice GO; Maria DA. Synthetic phosphoethanolamine has in vitro and in vivo anti-leukemia effects. *British Journal of Cancer*. 2013, 109:2819-2828 (c).

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, Koorbanally 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 FOSFOETANOLAMINA (UNICAMP), - MONOETANOLAMINA (UNICAMP) E FOSFOBISSETANOLAMINA (UNICAMP) EM LINHAGENS DE CÉLULAS HUMANAS DE CARCINOMA DE PULMÃO, CARCINOMA DE PÂNCREAS E MELANOMA.

12. 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

09/06/2016

Data

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA



AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E ANTIPROLIFERATIVA DA FOSFOETANOLAMINA (UNICAMP), MONOETANOLAMINA (UNICAMP) E FOSFOBISSETANOLAMINA (UNICAMP) EM LINHAGENS DE CÉLULAS HUMANAS DE CARCINOMA DE PULMÃO, CARCINOMA DE PÂNCREAS E MELANOMA.

13. 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.

Cristina Freitas

Dra. Cristina Setim Freitas
Diretor de Estudo Substituto

09/06/16

Data

Jarbas Mota Siqueira Junior

Dr. Jarbas Mota Siqueira Junior
Gerente da Instalação Teste

05/06/16

Data

João Batista Calixto

Dr. João Batista Calixto
Diretor-Presidente do CIEP

9/6/16

Data

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA