

Resumo Executivo

AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE DA FOSFOETANOLAMINA SINTÉTICA (produzida na USP- São Carlos): TESTE DE MICRONÚCLEOS EM MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS

Introdução

A fosfoetanolamina é um derivado da etanolamina (monoetanolamina) que foi isolada e purificada pela primeira vez, em 1936. Essa substância vem sendo pesquisada ao longo dos anos, pois muitas propriedades terapêuticas vêm sendo atribuídas a ela, incluindo uma possível atividade antitumoral. Devido a alguns resultados de eficácia não clínica, relacionados com a redução na viabilidade celular de diferentes tumores, obtidos por pesquisadores do grupo do então professor do Instituto de Química da USP - São Carlos (IQSC), Gilberto Orivaldo Chierice e colaboradores, a fosfoetanolamina começou a ser distribuída para pacientes com câncer, mesmo sem a realização dos estudos científicos para avaliar sua segurança e eficácia, necessários para o registro de medicamentos para uso humano nos órgãos regulatórios como a ANVISA. Em 2015, foi enviado ao Ministério de Ciência e Tecnologia MCTI, um dossiê onde o IQSC (USP) descreve a análise química realizada com a fosfoetanolamina produzida pelo Sr. Salvador Claro Neto, onde fica claro que as cápsulas distribuídas aos pacientes, não contém apenas fosfoetanolamina e sim uma mistura de compostos (16,9 % fosfoetanolamina, 37,5% de monoetanolamina e 45,6 % do sal de fosfoetanolamina). Uma nova análise realizada recentemente, por outro grupo de pesquisa, coordenado pelos professores Dr. Luiz Carlos Dias (Unicamp) e Dr. Eliezer Barreiro (UFRJ), demonstrou que as mesmas amostras de “fosfoetanolamina” produzidas pelo Sr. Salvador Claro Neto possuem composição distinta da que foi descrita no dossiê enviado ao MCTI (32,2 % de fosfoetanolamina, 18,2% monoetanolamina, 3,9 % fosfobisoetanolamina, 38,5% de fosfatos e 7,2% de água). Como a fosfoetanolamina vem sendo utilizada por muitos pacientes para tratamento do câncer, é de suma importância avaliar a sua segurança. Dentre os efeitos toxicológicos que causam maior preocupação para a saúde humana estão a carcinogenicidade e a mutagenicidade. Os testes de genotoxicidade foram propostos para detectar substâncias que possam induzir danos ao material genético, que consequentemente podem levar a dano cromossomal e/ou mutagênese. O teste de micronúcleos é capaz de detectar alterações genéticas decorrente de lesões cromossômicas e/ou danos no aparelho mitótico. A formação de micronúcleos é um indicativo de perdas irreversíveis do DNA. É reconhecido que há uma correlação positiva entre o aumento da frequência de micronúcleos e o aparecimento de tumores em roedores e seres humanos.

Objetivos

Avaliar se a fosfoetanolamina (sintetizada na USP- São Carlos) induz alterações cromossomais estruturais e/ou numéricas, em cromossomos ou no aparelho mitótico de eritroblastos, através da análise de eritrócitos da medula óssea de camundongos.

Metodologia

A substância teste (fosfoetanolamina, USP- São Carlos) foi pesada e solubilizada em água deionizada com auxílio de um dispersor Polytron®. O teste de genotoxicidade foi realizado em conformidade com o guia 474 da OECD - Guideline for The Testing of Chemicals(Method 474) “Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test” (Adopted: 26st September 2014). O ensaio iniciou com um teste preliminar, com o objetivo de determinar a dose máxima tolerada (MTD), que é a dose mais alta que pode ser administrada em camundongos, sem induzir mortalidade, morbidade, toxicidade excessiva (com base na presença de sinais clínicos como diarreia, diminuição do apetite e da ingestão de água, perda de peso). O teste preliminar iniciou com grupos de dois camundongos swiss machos, SPF criados no biotério do CIEnP, que foram tratados por via oral com as doses de 8, 50, 320 e 2.000 mg/kg. Cada grupo experimental recebeu uma dose durante três dias, até a letalidade ou severa toxicidade (sinais clínicos). Como nenhum efeito tóxico foi observado na avaliação preliminar, a dose limite de substância teste (2.000 mg/kg), foi utilizada no teste definitivo. No teste definitivo, os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos distintos contendo 10 animais cada (5 fêmeas e 5 machos). Um grupo foi tratado com a substância teste (2.000 mg/kg, v.o.), outro grupo foi tratado com o veículo (controle negativo: água deionizada, v.o.) e o terceiro grupo foi tratado com a substância de referência (controle

positivo: ciclofosfamida 25 mg/kg, i.p.). O tratamento foi realizado durante três dias consecutivos, com intervalos de 24 horas entre os tratamentos. O grupo de animais que recebeu a substância de referência foi tratado por apenas dois dias. Decorrido 24 horas do último tratamento, os animais foram eutanasiados para coleta das medulas ósseas, que foram retiradas dos dois fêmures de cada animal, com auxílio de uma agulha acoplada a uma seringa de 1 mL, previamente preenchida com soro fetal bovino (~50 µL). A medula óssea foi homogeneizada e um fino esfregaço foi obtido com a ajuda de duas lâminas. Após, o material foi fixado e corado com solução de Giemsa. As lâminas foram analisadas em microscópio óptico com objetiva de imersão (1.000 x). Primeiramente foi determinada a relação entre eritrócitos policromáticos (EPC: imaturos) e eritrócitos normocromáticos (ENC: maduros) através da contagem de um total de 500 eritrócitos por lâmina (1.000 eritrócitos por animal). A redução de EPCs em relação ao número de ENCs reflete toxicidade e depressão das células da medula óssea. A identificação e a quantificação dos micronúcleos foram realizadas em um total de 2.000 EPCs por lâmina (totalizando 4.000 EPCs por animal).

Resultados

No teste preliminar, não foram observados sinais clínicos compatíveis com toxicidade, em nenhuma das doses testadas (8, 50,320 e 2.000 mg/kg). Dessa forma, a dose limite da substância teste (2.000 mg/kg), foi utilizada no teste definitivo. No teste definitivo, a dose de 2.000 mg/kg da fosfoetanolamina administrada pela via oral, não reduziu a proporção de EPC/ENC, quando comparada com o controle negativo (água), indicando a ausência de ação tóxica em relação as células da medula óssea. Além disso, o tratamento não alterou a frequência de EPCs micronucleados, quando comparado ao grupo controle negativo, indicando que a substância teste não promoveu lesões cromossômicas.

Conclusão

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que o tratamento realizado com a substância teste **Fosfoetanolamina (USP – São Carlos)**, não apresentou efeitos citotóxicos ou genotóxicos nas condições experimentais utilizadas.

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA