

## Resumo Executivo

### **AValiação DA GENOTOXICIDADE DA FOSFOETANOLAMINA (USP – São Carlos): TESTE DE MUTAÇÃO REVERSA EM *Salmonella typhimurium* (TESTE DE AMES – ENSAIO *Salmonella*/ MICROSSOMA)**

#### **Introdução**

A fosfoetanolamina foi isolada e purificada pela primeira vez, na Universidade de Toronto, pelo pesquisador Edgar Laurence Outhouse, em 1936. É um derivado da etanolamina (monoetanolamina) presente na membrana de células animais, que vem sendo pesquisada por vários grupos de pesquisa. Diversas propriedades terapêuticas vêm sendo atribuídas a fosfoetanolamina, incluindo um possível efeito antitumoral. No final da década de 80, o então professor do Instituto de Química da USP - São Carlos (IQSC), Gilberto Orivaldo Chierice, realizou a síntese da fosfoetanolamina. Motivado por resultados de estudos de eficácia não clínica (*in vitro* e *in vivo*), que demonstraram que a fosfoetanolamina, em altas concentrações, promovia redução na viabilidade celular de diferentes células tumorais, realizados e publicados pelo seu grupo de pesquisa e colaboradores, o professor Gilberto iniciou a distribuição da substância para pacientes com câncer, mesmo sem a realização dos estudos científicos de segurança e de eficácia indispensáveis para o registro de medicamentos para uso humano. No Dossiê enviado ao Ministério de Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI) em 2015, o IQSC (USP) descreve a análise química realizada com a fosfoetanolamina produzida pelo Sr. Salvador Claro Neto, onde se evidencia que as cápsulas distribuídas aos pacientes, não contém apenas fosfoetanolamina e sim uma mistura de compostos presentes em diferentes concentrações (16,9 % fosfoetanolamina, 37,5% de monoetanolamina e 45,6 % do sal de fosfoetanolamina). Recentemente, um novo estudo 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 possui composição distinta daquela 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).

A avaliação da segurança da fosfoetanolamina é de suma importância, já que a substância vem sendo utilizada por muitos pacientes para tratar vários tipos de câncer. Carcinogenicidade e mutagenicidade estão entre os efeitos toxicológicos que causam maior preocupação para a saúde humana. Testes de genotoxicidade foram desenvolvidos para detectar substâncias que possam induzir danos ao material genético e são recomendados pelas agências regulatórias em todo mundo, como parte da avaliação da segurança de produtos químicos e naturais. Estes testes permitem a identificação do risco em relação aos danos ao DNA. As substâncias que são positivas em testes que detectam tais tipos de alterações genéticas têm o potencial de serem cancerígenas e/ou mutagênicos para humanos. O teste de mutagenicidade em bactérias é amplamente utilizado e geralmente é aplicado como triagem inicial para avaliação da possível atividade genotóxica, em particular, para atividades indutoras de mutação de ponto. Assim, tem sido demonstrado que muitas substâncias químicas que apresentam resultados positivos no Teste de Ames, são carcinógenos para mamíferos.

#### **Objetivos**

Detectar mutações de ponto, induzidas pela substância teste (fosfoetanolamina – USP, São Carlos), através da avaliação da reversão de mutações em diferentes cepas de *Salmonella typhimurium*. As mutações de ponto envolvem substituição, adição ou deleção de um ou alguns pares de bases de DNA.

#### **Metodologia**

A substância teste foi pesada e irradiada por 30 minutos, com luz ultravioleta (UV, 245 nm, 15 watts) dentro de uma cabine de segurança biológica, para esterilização. A mesma foi solubilizada em água deionizada estéril com auxílio de um dispersor Polytron® e posteriormente diluída, sempre em cabine de segurança biológica. O teste de mutagenicidade foi realizado em conformidade com o guia

471 da OECD – Guideline for Testing of Chemicals. Method 471 “Bacterial Reverse Mutation Test” (Adopted: 21<sup>st</sup> July 1997). O Guia recomenda a utilização de, no mínimo, cinco linhagens (cepas) da bactéria *Salmonella typhimurium* (TA97a, TA98, TA100, TA102 e TA 1535). Inicialmente foi realizada análise preliminar, com a linhagem TA100, na ausência do sistema de ativação metabólica (S9), com o objetivo de selecionar as doses utilizadas no teste definitivo e excluir concentrações que apresentem citotoxicidade, que impossibilitaria a verificação da mutagenicidade, pois reduz o número de colônias devido a toxicidade que impede o crescimento das bactérias. As concentrações da substância teste utilizadas no teste preliminar foram de 5.000, 1.000, 200, 40 e 8 µg/placa. A citotoxicidade foi detectada através da redução no número de colônias revertentes e da ausência ou diminuição da camada de *background* nas placas tratadas com a substância teste.

O teste definitivo foi realizado com as cinco linhagens de *S. typhimurium*, através do método de incorporação em placa, na ausência e na presença do sistema de ativação metabólica (S9). Com base nos resultados obtidos no ensaio preliminar, foram selecionadas 7 concentrações da substância teste. A menor concentração que impediu o crescimento bacteriano foi de 8 µg/placa, dessa forma, foram selecionadas as seguintes concentrações: 8; 5; 3,2; 2; 1,25; 0,8 e 0,5 µg/placa. Cada teste foi realizado duas vezes.

➤ Procedimento do Ensaio **sem** a adição de ativador metabólico

As diferentes concentrações da substância teste ou controles (negativo e positivo) foram distribuídas em tubos de ensaio (em triplicata). Em seguida foram adicionados 100 µL de cada cultura bacteriana (cepas da *S. typhimurium*), 500 µL de tampão fosfato pH 7,4 e 2 mL de ágar de superfície suplementado com 0,5 mM de histidina e biotina. O conteúdo dos tubos foi homogeneizado e colocado sobre uma placa de Petri contendo meio mínimo (ME). As placas foram incubadas à 37 ± 1 °C, por 48 horas.

➤ Procedimento do ensaio **com** a adição de ativador metabólico

A adição de S9 ao teste tem o objetivo de simular a metabolização que a substância teste pode sofrer no fígado, quando administrada em mamíferos. As diferentes concentrações da substância teste ou controles (negativo e positivo) foram distribuídas em tubos de ensaio (em triplicata). Em seguida foram adicionados 100 µL de cada cultura bacteriana (cepas da *S. typhimurium*), 500 µL da mistura de ativação metabólica (S9 extraído do fígado de ratos, concentração final de 8%) e 2 mL de ágar de superfície suplementado com 0,5 mM de histidina e biotina. O conteúdo dos tubos foi homogeneizado e colocado sobre uma placa de petri contendo meio mínimo (ME). As placas foram incubadas à 37 ± 1 °C, por 48 horas.

O número de colônias revertentes, por placa, foi contado com o auxílio de um contador de colônias, após o período de incubação.

## Resultados

O ensaio preliminar com a linhagem TA 100 foi realizado com o objetivo de selecionar concentrações adequadas para a realização do teste definitivo. Todas as concentrações testadas (5.000, 1.000, 200, 40 e 8 µg/placa) reduziram a camada de *background* nas placas, caracterizando citotoxicidade em relação a esta linhagem, na ausência de ativação metabólica (S9). De acordo com os resultados do ensaio preliminar, a maior dose para o ensaio definitivo foi escolhida com base na citotoxicidade, de acordo com os critérios especificados nos guias internacionais. Dessa forma, as concentrações selecionadas foram 8; 5; 3,2; 2; 1,25; 0,8 e 0,5 µg/placa para todas as linhagens, na ausência ou presença de S9. Após incubação com a substância teste, na ausência de S9, ainda foi observada citotoxicidade, para todas as linhagens, com as concentrações de 8 e 5 µg/placa. No entanto, não foi observado aumento significativo no número de colônias revertentes, o que resultou em valores do índice de mutagenicidade (IM) entre 0,8 e 1,5. Na presença de ativação metabólica a citotoxicidade foi observada apenas pra a linhagem TA 100, na concentração de 5 µg/placa. Da mesma forma que foi observado no teste realizado sem ativação metabólica, o número de colônias revertentes não foi alterado, apresentando valores do IM entre 0,8 e 1,5. Substâncias com índices de mutagenicidade iguais ou maiores que 2 são consideradas mutagênicas. Desta forma, os resultados descritos acima preenchem os critérios para uma resposta negativa.

### Conclusão

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que, nas condições nas quais foram realizadas o teste e nas concentrações utilizadas, a substância teste **Fosfoetanolamina (USP – São Carlos)**, **não apresentou atividade mutagênica** quando avaliada no teste de mutação reversa em bactérias *Salmonella typhimurium*, na ausência ou na presença de ativação metabólica (S9).

Para complementar os dados sobre a genotoxicidade da fosfoetanolamina (USP – São Carlos), foi realizada a quantificação de micronúcleos em células da medula óssea de camundongos. A leitura das lâminas já foi realizada, no entanto, como todo o ensaio foi realizado de forma cega (as lâminas foram codificadas, para que o examinador não tivesse conhecimento dos tratamentos realizados), todos os dados brutos estão sendo decodificados e organizados para a realização da análise estatística e apresentação dos resultados.

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA