



Ângela Mesquita Laranjeiro

## Potencial efeito antitumoral da Fosfoetanolamina Sintética em modelos de tumores experimentais

Monografia realizada no âmbito da unidade de Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientado pelo Professor Doutor Ricardo António Esteves de Castro e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Ângela Mesquita Laranjeiro

# Potencial efeito antitumoral da Fosfoetanolamina Sintética em modelos de tumores experimentais

Monografia realizada no âmbito da unidade de Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas,  
orientado pelo Professor Doutor Ricardo António Esteves de Castro e apresentada à Faculdade de  
Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

**O Tutor,**

---

Professor Doutor Ricardo António Esteves de Castro

**A Aluna,**

---

Ângela Mesquita Laranjeiro

Eu, Ângela Mesquita Laranjeiro, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2011144662, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 12 de julho de 2016

---

Ângela Mesquita Laranjeiro

## AGRADECIMENTOS

Na conclusão da última etapa do meu percurso académico, não posso deixar de agradecer a todos os que me acompanharam e que contribuíram para que cumprisse os meus objetivos.

Um sincero agradecimento ao meu tutor, Professor Ricardo Castro, pela orientação durante a realização desta monografia e por todos os conselhos e palavras de incentivo.

Às melhores amigas que Coimbra me deu, Patrícia, Rita, Inês, Sónia, Mafalda e Ana Lúcia, agradeço a amizade, as palavras de ânimo e todos os momentos partilhados durante este percurso que fizemos juntas.

Um agradecimento especial à Inês Jorge, pela partilha de experiências e pelo apoio fundamental durante esta etapa.

Ao meu namorado, um obrigado nunca será suficiente para agradecer pela paciência e por todo o apoio, carinho e motivação demonstrados durante todo o meu percurso, mas, principalmente, nesta fase final.

Aos meus pais, aos meus irmãos e aos meus avós, o meu mais sincero e profundo agradecimento pelo amor, pelo apoio, pela paciência e pelo carinho, de sempre.

## RESUMO

O cancro constitui uma das principais causas de morte em todo o mundo e apesar da enorme variabilidade que o caracteriza, evidências científicas demonstram que a resistência à apoptose, decorrente de defeitos na sinalização da morte celular, é uma das suas características mais marcantes.

A existência de mecanismos de resistência aos processos de regulação da apoptose e do ciclo celular traduz-se numa busca incessante da investigação científica por novos compostos capazes de atuar a esse nível.

A descoberta da especificidade da acumulação da fosfoetanolamina nas células tumorais e antes da indução da apoptose sugerem que esta substância possa exercer um papel indutor da morte celular, possuindo, assim, propriedades antitumorais.

### **Palavras-chave:**

Fosfoetanolamina, cancro, apoptose, mitocôndria, fosfolípidos.

## ABSTRACT

*Cancer is a worldwide leading cause of death, and despite the huge variability that characterizes it, scientific evidence shows that resistance to apoptosis due to defects in cell death signaling, is one of its most remarkable features.*

*The existence of resistance mechanisms of apoptosis and cell cycle regulation processes is reflected in a constant search of scientific research for new compounds capable of acting at this level.*

*The discovery of the specificity of phosphoethanolamine accumulation in tumor cells and before the induction of apoptosis suggests that this substance may have a role in inducing cell death, thus having antitumor properties.*

**Keywords:**

*Phosphoethanolamine, cancer, apoptosis, mitochondria, phospholipids.*

# ÍNDICE

<b>Resumo</b> .....	v
<b>Abstract</b> .....	vi
<b>1. Introdução</b> .....	1
<b>2. Fosfolípidos antineoplásicos</b> .....	2
2.1. Características gerais .....	2
2.2. Mecanismo de ação.....	3
2.3. Fosfoetanolamina.....	4
<b>3. Aspetos gerais do cancro</b> .....	5
<b>4. Apoptose – morte celular programada</b> .....	6
4.1. Vias apoptóticas.....	7
4.1.1. <i>Via extrínseca</i> .....	7
4.1.2. <i>Via intrínseca ou mitocondrial</i> .....	7
<b>5. Evidências experimentais da atividade da fosfoetanolamina sintética</b> .....	9
5.1. Efeito antitumoral em células de melanoma murino.....	9
5.2. Efeito antitumoral em células de tumor ascítico de Ehrlich .....	10
5.3. Efeito antitumoral em modelos celulares humanos de cancro da mama .....	11
5.4. Efeito antitumoral no carcinoma de células renais murino .....	12
5.5. Efeito antitumoral em modelos de leucemia humana .....	12
<b>6. Controvérsia</b> .....	13
<b>7. Perspetivas futuras</b> .....	14
<b>8. Conclusão</b> .....	16
<b>9. Bibliografia</b> .....	17



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representação da assimetria das membranas biológicas. ....	2
<b>Figura 2.</b> Estrutura química da fosfoetanolamina .....	4
<b>Figura 3.</b> Via apoptótica intrínseca ou mitocondrial .....	8
<b>Figura 4.</b> Mecanismo hipotético da indução da apoptose pela fosfoetanolamina sintética....	11

## ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>Apaf-1</b>	<i>Apoptotic Protease Activating Factor 1</i>
<b>Bak</b>	<i>Bcl-2 homologous antagonist killer</i>
<b>Bax</b>	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
<b>Bcl-2</b>	<i>B-cell lymphoma 2</i>
<b>Bid</b>	<i>BH3 interacting-domain death agonist</i>
<b>HUVEC</b>	<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>
<b>IQSC</b>	Instituto de Química de São Carlos
<b>IRPTC</b>	<i>Immortalized Rat Proximal Tubule Cells</i>
<b>PTP</b>	Poros de Transição de Permeabilidade
<b>TNF</b>	<i>Tumor Necrosis Factor (Fator de Necrose Tumoral)</i>

## I. Introdução

O cancro constitui uma das principais causas de morte em todo o mundo. Milhões de pessoas vivem com o diagnóstico e estima-se que nas próximas décadas o número de novos casos tenda a aumentar, o que torna a luta contra o cancro um trabalho diário e permanente, que requer um esforço de pesquisa e reinvenção constantes na busca por novos tratamentos.

Existem três abordagens terapêuticas principais no tratamento do cancro: radioterapia, quimioterapia e cirurgia. A quimioterapia baseia-se, essencialmente, na exploração das diferenças entre as células cancerígenas e as células saudáveis. No entanto, o elevado grau de semelhança entre elas torna a identificação de diferenças exploráveis um desafio e, apesar de serem cada vez mais seletivos, os fármacos utilizados acabam por afetar todas as células, incluindo as saudáveis. Da mesma forma, a radioterapia, que tem por objetivo matar as células cancerígenas e impedir o crescimento do tumor, acaba por também ser nociva para as células saudáveis.

Assim, a tendência atual é a procura de fármacos cada vez mais seletivos e com um menor número, ou até mesmo isentos, de efeitos adversos que possam comprometer as células saudáveis.

No geral, a área da oncologia tem sido um campo de intensa investigação científica e uma das áreas que tem conseguido obter mais resultados, sendo privilegiada a pesquisa e o desenvolvimento de fármacos que atuem tanto na regulação do crescimento tumoral, como no metabolismo das células cancerígenas, principalmente ao nível dos mecanismos de controlo do ciclo celular e apoptose, que se encontram defetivos nas células cancerígenas.

Recentemente, as mitocôndrias das células cancerígenas têm surgido como o «calcanhar de Aquiles» da destruição do tumor. Agentes antitumorais visando especificamente as mitocôndrias de células tumorais, atuam por desestabilização desses organelos, desencadeando o seu potencial apoptogénico e resultando na morte eficiente das células malignas (Mollinedo *et al.*, 2011).

Integrando esse fluxo de inovação, surgiram os fosfolípidos antineoplásicos, uma promissora classe terapêutica de agentes antineoplásicos que apresenta um mecanismo de ação inovador, atuando com grande seletividade ao nível das membranas celulares das células tumorais, induzindo a apoptose.

Com o recente advento dos fosfolípidos antineoplásicos no tratamento do cancro, torna-se, agora, interessante investigar e determinar se o precursor central da biossíntese dos fosfolípidos, a fosfoetanolamina, pode igualmente apresentar efeitos antitumorais.

## 2. Fosfolípidos antineoplásicos

### 2.1. Características gerais

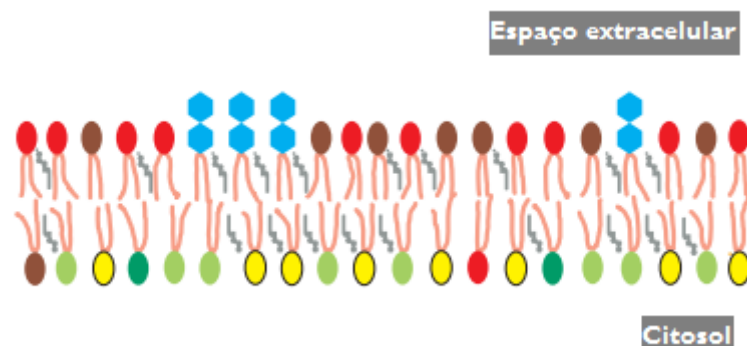
Todas as células são delimitadas por uma membrana, designada membrana plasmática ou celular, que separa o conteúdo celular do meio envolvente. As células eucarióticas, além de membrana plasmática, apresentam ainda uma grande variedade de membranas internas que envolvem e definem os compartimentos intracelulares, denominados organelos, tais como as mitocôndrias e o retículo endoplasmático (Rang e Dale, 2012).

Diferenças subtis entre as várias membranas biológicas atribuem a cada organelo a sua característica distintiva, no entanto, independentemente da sua localização, todas as membranas biológicas apresentam uma estrutura geral que lhes é comum, sendo compostas essencialmente por lípidos e proteínas.

Os lípidos mais abundantes nas membranas celulares são os fosfolípidos, que constituem a bicamada lipídica, elemento fundamental da estrutura das membranas. Da composição fosfolipídica da membrana destacam-se, em termos quantitativos, a fosfatidilcolina, a fosfatidilserina e a fosfatidiletanolamina (Alberts *et al.*, 2010; Azevedo, 2005).

De uma maneira geral, os fosfolípidos de membrana encontram-se envolvidos na transdução do sinal celular, principalmente nos sinais de morte celular, quer pela estimulação dos recetores ao nível da membrana, quer pela geração de segundos mensageiros (Ferreira, Adilson K *et al.*, 2011).

As membranas biológicas são geralmente assimétricas na sua estrutura (Figura 1), sendo essa assimetria expressa pela diferente composição molecular observada nas duas monocamadas da membrana, já que os lípidos e as proteínas não se encontram distribuídos de forma equivalente nas duas camadas (Azevedo, 2005).



**Figura 1.** Representação da assimetria das membranas biológicas. Adaptado (Alberts *et al.*, 2010).

Nas células eucarióticas, os novos fosfolípidos são sintetizados por enzimas associadas à face externa da membrana do retículo endoplasmático, que utilizam ácidos gordos livres como substratos, sendo depois depositados na monocamada interna da membrana plasmática.

Para permitir que a membrana cresça uniformemente como um todo, metade das novas moléculas de fosfolípidos recém-sintetizados é transferida para a monocamada oposta, processo catalisado por enzimas designadas flipases. Na membrana plasmática, as flipases transferem os fosfolípidos seletivamente, de modo a que diferentes tipos fiquem concentrados em cada monocamada.

Geralmente, a fosfatidilcolina localiza-se na monocamada externa e a fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina encontram-se na monocamada interna das membranas celulares (Alberts *et al.*, 2010).

A assimetria dos lípidos é estabelecida e mantida durante o crescimento da membrana, graças à troca extremamente lenta dos fosfolípidos entre as duas camadas. A existência e manutenção da assimetria química e estrutural entre as monocamadas das membranas é essencial para a realização das funções celulares (Alberts *et al.*, 2010).

Existem evidências de que nos estádios precoces da apoptose, a assimetria dos lípidos é perturbada, existindo translocação da fosfatidilserina da monocamada interna para a externa da membrana, o que parece constituir o mecanismo fundamental através da qual as células apoptóticas são reconhecidas e eliminadas pelos macrófagos (Quinn e Kagan, 2004).

Os fosfolípidos antineoplásicos constituindo uma classe terapêutica com um mecanismo de ação inovador, interferindo em eventos reguladores celulares defetivos nas células tumorais, têm adquirido grande importância como compostos modelo para o desenvolvimento de novos fármacos mais seletivos para a terapêutica antitumoral (Brachwitz e Vollgraf, 1995).

## **2.2. Mecanismo de ação**

O mecanismo de ação dos fosfolípidos antineoplásicos permanece ainda pouco claro, no entanto, existem evidências substanciais de que estes agentes antitumorais, ao contrário dos fármacos antineoplásicos convencionais, não têm como alvo o material genético das células e a reparação da maquinaria de replicação celular, mas sim a membrana plasmática, especialmente a das células tumorais, atuando ao nível da modulação da biossíntese dos lípidos de membrana e indução da apoptose (Ferreira, Meneguelo, Pereira, *et al.*, 2012).

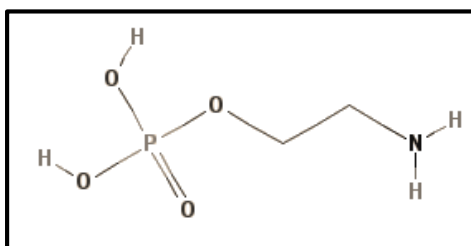
Efetivamente, foi demonstrado que os seus efeitos estão dependentes da sua incorporação na membrana plasmática (Ferreira, Meneguelo, Marques, *et al.*, 2012).

Uma vez inseridos na membrana, os fosfolípidos antineoplásicos interferem no metabolismo e *turnover* dos fosfolípidos, levando a uma acumulação dos mesmos na membrana plasmática com alteração das propriedades físicas da mesma, intervindo na transdução de sinais, especialmente na inibição da transdução do sinal mitogénico, culminando na indução da morte celular por apoptose (Ferreira, Meneguelo, Pereira, et al., 2012).

A maioria dos efeitos exercidos por estes agentes estão associados à inibição da biossíntese de fosfatidilcolina, fosfolípido essencial na proliferação celular, que se encontra aumentada nas células cancerígenas, interferindo assim no *turnover* dos fosfolípidos na membrana celular, induzindo apoptose (Ferreira, Adilson K et al., 2011).

### 2.3. Fosfoetanolamina

A fosfoetanolamina (Figura 2) é uma amina primária, sintetizada no retículo endoplasmático, que atua como precursora central na biossíntese de fosfolípidos, tais como a fosfatidiletanolamina e a fosfatidilcolina, constituintes maioritários das membranas biológicas envolvidos no *turnover* das membranas e nas vias de sinalização lipídica (Dhakshinamoorthy et al., 2015; Ferreira, A K et al., 2013).



**Figura 2.** Estrutura química da fosfoetanolamina (Pubchem, 2016).

Adicionalmente, participa em várias etapas de regulação no metabolismo celular, particularmente no metabolismo mitocondrial, através da regulação do potencial de membrana mitocondrial e indução da apoptose (Dhakshinamoorthy et al., 2015).

A fosfoetanolamina foi isolada e identificada pela primeira vez em 1936, por Edgar Lawrence Outhouse, do Instituto Banting da Universidade de Toronto, Canadá, a partir de tumores malignos bovinos (Outhouse, 1936).

No início dos anos 90, passou a ser estudada pelo químico Gilberto Chierice, do Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, Brasil, que colocou a hipótese de se tratar de uma substância integrante dos mecanismos de defesa do organismo contra as células tumorais (MCTI, 2015).

Apesar de a fosfoetanolamina ser produzida em escala industrial pelo laboratório Santa Cruz Biotechnology dos EUA (Texas) e comercializada pela Sigma-Aldrich há décadas e de

existir como suplemento alimentar nos EUA há mais de 50 anos, Gilberto Chierice iniciou os seus estudos para encontrar uma nova via de síntese, alegando que as existentes seriam de baixo rendimento. Alguns meses depois, conseguiu sintetizar em laboratório a «fosfoetanolamina sintética», uma molécula fosforilada artificialmente, produto da combinação de duas substâncias, a monoamina e o ácido fosfórico, através de uma nova via de síntese que gera um composto de alta pureza, de baixo custo e com um alto rendimento (cerca de 95 %) (MCTI, 2015).

O interesse na elucidação das propriedades antitumorais da fosfoetanolamina decorre do papel dos fosfolípidos, particularmente da fosfatidilcolina e da fosfatidilserina, na indução da apoptose.

A utilização de metabolitos como agentes terapêuticos é particularmente interessante na medida em que estes possuem papéis importantes nos processos celulares, para além de que, sendo moléculas produzidas endogenamente pelas células, podem ser menos propensos a ter efeitos tóxicos fora do seu alvo terapêutico, em relação aos compostos sintéticos. Como tal, há um interesse significativo na identificação e caracterização de metabolitos com potencial antitumoral específico que pode levar ao desenvolvimento de novos agentes quimioterapêuticos (Dhakshinamoorthy *et al.*, 2015).

Os metabolitos envolvidos nas vias de sinalização lipídica, tais como a fosfoetanolamina, têm sido estudados como candidatos terapêuticos focados no metabolismo do cancro. A especificidade da acumulação da fosfoetanolamina nas células tumorais e o facto de essa acumulação ocorrer antes da indução da apoptose, sugerem que a fosfoetanolamina possa exercer um papel indutor da apoptose, possuindo assim propriedades antitumorais (Dhakshinamoorthy *et al.*, 2015).

### **3. Aspetos gerais do cancro**

Os processos de multiplicação e divisão celulares, bem como o crescimento dos tecidos, são processos altamente regulados no sentido de manter as populações celulares dentro de limites fisiológicos. Alterações nesse sistema regulador resultam em distúrbios celulares, sendo uma das consequências as neoplasias.

Uma neoplasia é uma lesão com origem na proliferação descontrolada das células, que leva a uma acumulação progressiva de células alteradas, conduzindo à formação de uma massa tumoral.

As neoplasias são classificadas de acordo com o seu comportamento, localização anatómica e morfologia, em benignas ou malignas, sendo o termo cancro utilizado como sinónimo de neoplasia maligna.

No sentido de identificar os alvos e os obstáculos terapêuticos existentes, é importante considerar e compreender a fisiopatologia da doença.

O processo de desenvolvimento do cancro é complexo e envolve muitas etapas, que resultam de alterações genéticas (mutações no ADN, alterações da integridade cromossômica) e epigenéticas (ação hormonal, efeitos de promotores tumorais, entre outras) que conferem vantagens na sobrevivência e crescimento às células, conduzindo à multiplicação e proliferação descontroladas de células anormais (Alberts *et al.*, 2010).

As células cancerígenas manifestam, essencialmente, quatro características que as distinguem das células normais: proliferação descontrolada, desdiferenciação e perda de função, poder de invasão e capacidade de metástase (Rang e Dale, 2012).

Apesar da enorme variabilidade que caracteriza o cancro, evidências científicas demonstram que a resistência à apoptose, decorrente de defeitos na sinalização da morte celular, é uma das características mais marcantes da maioria das neoplasias malignas.

Em contraste com as células normais, que obtêm a energia necessária para os processos celulares a partir da fosforilação oxidativa mitocondrial, a maioria das células cancerígenas apresentam um metabolismo dependente da glicólise aeróbia, que lhes proporciona um fornecimento constante e contínuo de metabolitos, permitindo uma proliferação mais rápida (Dhakshinamoorthy *et al.*, 2015; Heiden, Vander, Cantley e Thompson, 2009).

Esta alteração do metabolismo foi, recentemente, reconhecida como uma das marcas principais do cancro e como resultado, está a tornar-se um alvo promissor para o desenvolvimento de novos fármacos antineoplásicos (Dhakshinamoorthy *et al.*, 2015).

Uma vez que os níveis de fosfoetanolamina aumentam ligeiramente, mas de forma consistente em todas as perturbações metabólicas, a reação parece ser uma resposta generalizada ao stresse metabólico e que pode ser indicativa de um aumento do *turnover* fosfolipídico na membrana plasmática ou de uma resposta apoptótica ao aumento do nível de stresse celular (Vermeersch *et al.*, 2014).

#### **4. Apoptose – morte celular programada**

A apoptose, também denominada morte celular programada, constitui um mecanismo fisiológico de morte celular, segundo o qual ocorrem uma série de alterações morfológicas e bioquímicas na célula que conduzem à sua morte. É um processo suscetível de regulação, assumindo uma importância fundamental na homeostasia da generalidade dos tecidos, bem como, quando inapropriadamente regulado, na fisiopatologia da maior parte das doenças, incluindo o cancro (Degterev, Boyce e Yuan, 2003).

Com efeito, em conjunto com os processos de divisão e proliferação celulares, a apoptose é responsável por controlar a quantidade e os tipos de células que são produzidas, removendo as que são desnecessárias ou perigosas para o organismo (Hengartner, 2000).

O processo de apoptose é mediado por uma família de proteases, designadas caspases, que são sintetizadas na célula sob a forma zimogénios inativos (pro-caspases), necessitando de ser ativadas para exercerem a sua ação (Alberts *et al.*, 2010; Degterev *et al.*, 2003).

As caspases são responsáveis pelas alterações morfológicas e degradativas que ocorrem na célula durante o processo apoptótico, que incluem a perda da integridade da membrana mitocondrial, a condensação da cromatina e fragmentação do ADN, a destruição do citoesqueleto e alterações na membrana plasmática, que culminam na fragmentação da célula em corpos apoptóticos, ulteriormente fagocitados (Azevedo, 2005; Hengartner, 2000).

As modificações da membrana plasmática decorrentes da apoptose incluem, essencialmente, a exteriorização de fosfatidilserina, que normalmente reside na monocamada citoplasmática da membrana (Azevedo, 2005).

#### **4.1. Vias apoptóticas**

O reconhecimento e a propagação dos sinais apoptóticos podem ocorrer por duas vias apoptóticas principais: a via extrínseca, que envolve a estimulação de recetores de morte por interação com ligandos externos, e a via intrínseca ou mitocondrial, ativada por fatores internos, como danos no material genético ou stresse celular (Azevedo, 2005; Rang e Dale, 2012). Em ambas as vias, há ativação de caspases iniciadoras que dão início a uma cascata de eventos, que envolvem a clivagem de proteínas essenciais à sobrevivência da célula, culminando na morte celular (Azevedo, 2005).

##### **4.1.1. Via extrínseca**

A via apoptótica extrínseca é desencadeada pela ligação dos recetores de morte celular aos seus ligandos. Os recetores de morte localizam-se na membrana plasmática e fazem parte da superfamília de recetores do Fator de Necrose Tumoral (TNF).

A estimulação dos recetores pelos seus ligando externos, conduz ao recrutamento de proteínas adaptadoras, que traduzem o sinal de ativação da caspase-8, uma caspase iniciadora, que por sua vez inicia a cascata de ativação de caspases efetoras que culmina com a morte celular (Rang e Dale, 2012).

##### **4.1.2. Via intrínseca ou mitocondrial**

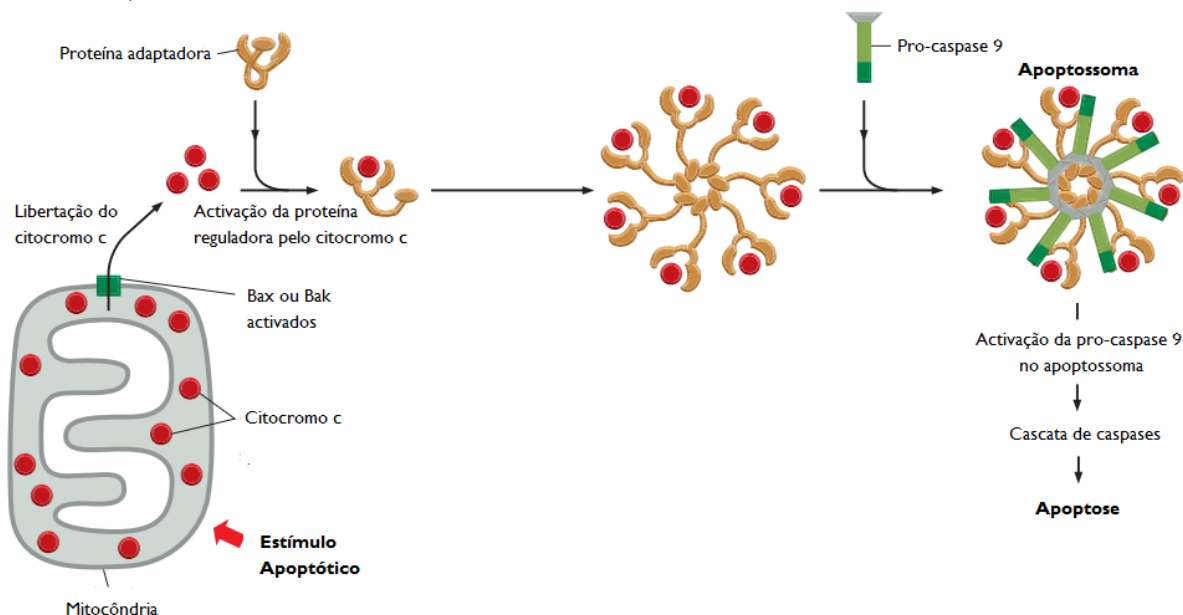
Na via apoptótica intrínseca ou mitocondrial, as células são induzidas a sofrer apoptose pelo stresse e dano celular.



A mitocôndria integra os estímulos de morte celular, observando-se uma perda do potencial de membrana mitocondrial que está associada à formação de poros de transição de permeabilidade (PTP), que modificam a sua permeabilidade seletiva (Mollinedo *et al.*, 2011).

Como representado na figura 3, na presença desses estímulos apoptóticos, a alteração de permeabilidade da membrana mitocondrial permite a liberação de membros pró-apoptóticos da família de proteínas Bcl-2, as proteínas Bid, Bax e Bak e à consequente liberação do citocromo c, um componente essencial na via intrínseca da apoptose (Dunkle e He, 2011).

O citocromo c libertado liga-se, então, a uma proteína adaptadora, denominada Apaf-1 (*Apoptotic protease activating factor 1*), ativando-a, e o complexo assim formado associa-se à caspase iniciadora, a pro-caspase 9, formando o apoptossoma. No interior do apoptossoma, a pro-caspase 9 é ativada e dá início à cascata de caspases efetoras, incluindo a caspase-3, que culmina na morte da célula (Ferreira, Adilson Kleber, Meneguelo, Pereira, *et al.*, 2012; Rang e Dale, 2012).



**Figura 3.** Via apoptótica intrínseca ou mitocondrial. Adaptado (Alberts *et al.*, 2010).

Em adição aos componentes pró-apoptóticos, a família Bcl-2 possui membros anti-apoptóticos (por exemplo, a própria Bcl-2) que, contrariamente aos membros pró-apoptóticos, inibem a liberação do citocromo c das mitocôndrias.

Em células normais, os fatores de sobrevivência ativam continuamente os mecanismos anti-apoptóticos, e a retirada desses fatores de sobrevivência pode causar a morte celular de várias maneiras diferentes dependendo do tipo de célula. No entanto, um mecanismo comum é uma inversão do equilíbrio entre os membros da família Bcl-2 que conduz à perda da estimulação da ação antiapoptótica das proteínas, com resultante ação sem oposição das proteínas pró-apoptóticas (Rang e Dale, 2012).

## **5. Evidências experimentais da atividade da fosfoetanolamina sintética**

A fosfoetanolamina sintética nunca foi formalmente testada e estudada em seres humanos, existindo apenas evidências da sua atividade em modelos de tumores experimentais.

Desde o ano 2000, vários estudos experimentais *in vitro* (modelos celulares) e *in vivo* (modelos animais) têm sido realizados no sentido de testar o potencial antineoplásico da fosfoetanolamina sintética.

### **5.1. Efeito antitumoral em células de melanoma murino**

O estudo inicial, (Ferreira, Adilson K *et al.*, 2011), pretendeu demonstrar os efeitos antitumorais *in vitro* e *in vivo* da fosfoetanolamina sintética em linhas celulares de melanoma murino e de fibroblastos humanos normais. Os ensaios realizados incluíram a avaliação da citotoxicidade e do efeito antitumoral da fosfoetanolamina e a determinação da atividade apoptótica.

A fosfoetanolamina demonstrou efeito citotóxico *in vitro* sobre as células tumorais de melanoma, nas concentrações de 1,5 a 6 mg/ml e não exerceu efeito sobre as linhas celulares de fibroblastos humanos.

O ensaio *in vivo* foi realizado em ratos inoculados com células de melanoma murino, aleatoriamente divididos em quatro grupos: dois grupos experimentais, tratados com fosfoetanolamina nas concentrações de 7 e 14 mg/kg, um grupo comparador que recebeu tratamento com Paclitaxel (Taxol<sup>®</sup>), agente citotóxico utilizado no tratamento do melanoma, e um grupo controlo, não tratado. O tamanho do tumor foi medido três vezes por semana, durante 40 dias de tratamento. Observou-se uma redução de 86 % no tamanho do tumor nos grupos tratados com fosfoetanolamina, quando comparado com o grupo comparador tratado com Taxol<sup>®</sup>, que apresentou uma redução de apenas 60 % do tamanho do tumor. As taxas de sobrevivência foram significativamente maiores nos grupos tratados com fosfoetanolamina e Taxol<sup>®</sup> e não foi observada perda de peso significativa nos animais.

O tratamento com a fosfoetanolamina nas concentrações de 7 e 14 mg/kg resultou ainda numa inibição das metástases na ordem dos 5,4 % e dos 13 %, respetivamente, demonstrando uma maior eficácia na redução das metástases comparativamente ao Taxol<sup>®</sup>.

Após remoção asséptica das massas tumorais dos dois grupos tratados com fosfoetanolamina e do grupo controlo, foi determinada a apoptose nas células tumorais por análise da expressão dos membros pró e anti-apoptóticos da família Bcl-2. Verificou-se que a fosfoetanolamina induz a via apoptótica mitocondrial pelo aumento da atividade da caspase-3.

Adicionalmente, num estudo efetuado, mais tarde, em modelos celulares de melanoma murino, (Ferreira, Adilson Kleber, Meneguelo, Marques, *et al.*, 2012), foi demonstrado o efeito antiproliferativo *in vitro* da fosfoetanolamina sintética, dependente da concentração usada. Foi também demonstrado que a fosfoetanolamina induz disfunções na mitocôndria, levando à despolarização da membrana e redução do potencial de membrana, induzindo a atividade da caspase-3 e conseqüentemente a morte celular.

Os resultados foram consistentes em ambos os estudos, demonstrando que a fosfoetanolamina possui efeitos antitumorais em modelos experimentais de melanoma.

## **5.2. Efeito antitumoral em células de tumor ascítico de Ehrlich**

O tumor ascítico de Ehrlich constitui um modelo de tumor experimental pouco diferenciado e transplantável, que se assemelha aos tumores humanos mais sensíveis à quimioterapia (Ozaslan *et al.*, 2011).

Neste estudo, (Ferreira, Adilson Kleber, Meneguelo, Pereira, *et al.*, 2012), foram realizados ensaios *in vivo* em ratos inoculados com células de tumor ascítico de Ehrlich, e ensaios *in vitro* para avaliação da citotoxicidade da fosfoetanolamina em linhas celulares humanas de adenocarcinoma da mama, melanoma maligno e carcinoma mucoepidermóide pulmonar em comparação com fibroblastos e células endoteliais do cordão umbilical humanos e linfócitos murinos normais.

Nos ensaios *in vitro*, verificou-se que a fosfoetanolamina sintética numa concentração de 2.30 mg/ml induziu citotoxicidade em todas as linhas de células tumorais estudadas sem afetar a viabilidade das células normais.

No ensaio *in vivo*, os ratos foram aleatorizados em três grupos: dois grupos experimentais tratados com fosfoetanolamina, nas doses de 5 e 70 mg/kg/dia, e um grupo controlo, não tratado. Foi avaliado o crescimento do tumor e a taxa de sobrevivência, tendo-se verificado nos grupos experimentais uma inibição do crescimento do tumor e uma maior taxa de sobrevivência, sem hepatotoxicidade associada, em comparação com o grupo controlo.

Posteriormente, após extração asséptica dos tumores foram realizados ensaios *in vitro* nas células tumorais obtidas para avaliação do efeito apoptótico da fosfoetanolamina nas alterações morfológicas das células.

Foi demonstrado que a fosfoetanolamina induz a via apoptótica intrínseca ou mitocondrial, através da redução do potencial de membrana mitocondrial, que aumenta a permeabilidade da membrana externa e conseqüentemente a atividade da caspase-3, resultando em alterações morfológicas celulares associadas à morte celular, tais como condensação da cromatina e retração celular.

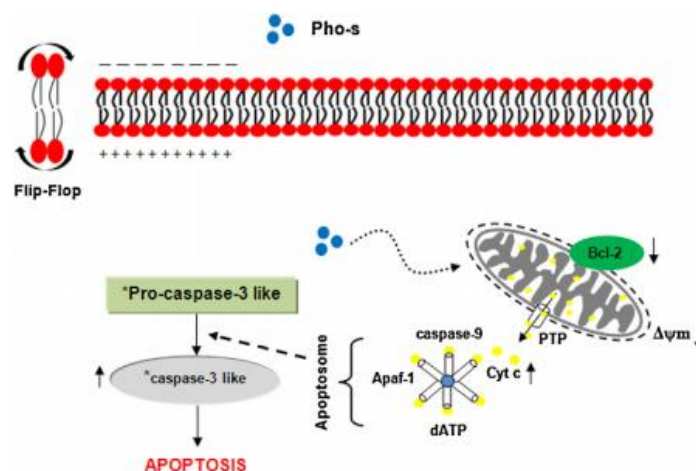
### 5.3. Efeito antitumoral em modelos celulares humanos de cancro da mama

Neste estudo, (Ferreira, Adilson Kleber, Meneguelo, *et al.*, 2013), foi investigado o efeito antitumoral *in vitro* da fosfoetanolamina sintética no cancro da mama, que constitui a segunda causa de morte nas mulheres. Para tal, foram utilizados modelos celulares humanos de cancro da mama e células epiteliais da mama normais.

Em primeiro lugar, avaliou-se a atividade citotóxica da fosfoetanolamina nos dois modelos celulares, tendo-se verificado citotoxicidade em ambos. No entanto, foi possível observar que apenas concentrações elevadas da fosfoetanolamina resultaram em efeitos citotóxicos nas células normais.

Posteriormente, foram realizados testes com o objetivo de medir o potencial de membrana mitocondrial, a expressão de membros pró e anti-apoptóticos e a atividade das caspases.

À semelhança do que tinha sido observado nos estudos realizados anteriormente, a fosfoetanolamina demonstrou efeito apoptótico por redução do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ), que resulta na formação de poros de transição de permeabilidade (PTP) e na libertação dos membros pro-apoptóticos da família Bcl-2, iniciando a cascata de eventos que culminam na apoptose, incluindo a externalização da carga negativa da membrana plasmática associada à presença da fosfatidilserina, conforme representado na figura 4.



**Figura 4.** Mecanismo hipotético da indução da apoptose pela fosfoetanolamina sintética. (Ferreira, Adilson Kleber, Meneguelo, *et al.*, 2013)

Adicionalmente, foi demonstrado neste estudo que a fosfoetanolamina atua também por inibição da proteína antiapoptótica Bcl-2, o que está fortemente relacionado com a libertação das proteínas apoptóticas da mitocôndria para o citosol.

#### **5.4. Efeito antitumoral no carcinoma de células renais murino**

O carcinoma das células renais constitui o tipo mais comum de cancro renal, representando cerca de 85 % do número total de casos existentes.

No sentido de avaliar a atividade anti-angiogénica da fosfoetanolamina neste tipo de cancro, foram realizados ensaios *in vitro* em modelos celulares de carcinoma renal murino em comparação com células murinas imortalizadas dos túbulos proximais dos rins (IRPTC, *immortalized rat proximal tubule cells*) e células humanas do endotélio do cordão umbilical (HUVEC, *human umbilical vein endothelial cells*) normais (Ferreira, Adilson Kleber, Freitas, *et al.*, 2013).

Adicionalmente, foram realizados ensaios *in vivo* em ratos inoculados com células de carcinoma renal murino com o objetivo de avaliar a atividade anti-metastática da fosfoetanolamina.

Os ratos foram aleatoriamente divididos em três grupos, dois grupos experimentais, sujeito ao tratamento com fosfoetanolamina nas concentrações de 50 e 100 mg/Kg/dia, e um grupo comparador, tratado com sunitib, fármaco utilizado no tratamento do carcinoma das células renais. De seguida, observou-se o desenvolvimento de tumores nos pulmões.

Nos ensaios *in vitro* foi avaliada a citotoxicidade da fosfoetanolamina nos vários modelos celulares, em comparação com o sunitib, sendo que ambos demonstraram efeitos citotóxicos sobre todos os modelos celulares, incluindo as células normais. No entanto, as células de carcinoma murino mostraram-se as mais sensíveis ao tratamento com a fosfoetanolamina, enquanto o sunitib foi mais citotóxico para as células endoteliais. Estas observações suportam a teoria de que a fosfoetanolamina é mais seletiva para as células tumorais.

Na avaliação das propriedades anti-angiogénicas da fosfoetanolamina, investigou-se se a fosfoetanolamina é capaz de regular os dois eventos chave da angiogénese: a proliferação e a migração das células endoteliais, em comparação com outros inibidores da angiogénese.

O ensaio foi realizado no modelo celular HUVEC e os resultados demonstraram que, em concentrações subtóxicas, a fosfoetanolamina inibiu o crescimento das células, exibindo, assim, atividade antiproliferativa.

O potencial terapêutico da fosfoetanolamina foi validado no modelo *in vivo* de carcinoma renal onde se demonstrou que a fosfoetanolamina inibe a formação de metástases pulmonares, com uma eficácia superior ao sunitib.

#### **5.5. Efeito antitumoral em modelos de leucemia humana**

O estudo mais recente, (Ferreira, A K *et al.*, 2013), pretendeu demonstrar os efeitos antitumorais *in vitro* e *in vivo* da fosfoetanolamina sintética na leucemia, utilizando como modelo

linhas celulares humanas de leucemia eritromieloblástica e de leucemia das células-T e células mieloides humanas normais.

Nos ensaios *in vitro*, realizados sobre as linhas celulares humanas de leucemia, foi avaliada a citotoxicidade da fosfoetanolamina sintética, bem como os mecanismos subjacentes. A fosfoetanolamina demonstrou um potente efeito citotóxico dose-dependente sobre os modelos celulares de leucemia, verificando-se que as células de leucemia eritromieloblástica foram as mais sensíveis à fosfoetanolamina.

Na avaliação do mecanismo subjacente à citotoxicidade induzida pela fosfoetanolamina foi mais uma vez demonstrado que a fosfoetanolamina induz a apoptose através da via mitocondrial. Os resultados mostraram que o tratamento com fosfoetanolamina induz a despolarização mitocondrial levando à diminuição do potencial de membrana combinada com um aumento da transição de potencial mitocondrial e a libertação de agentes pró-apoptóticos da mitocôndria, causando, por conseguinte, um aumento significativo na ativação da caspase-3, que leva à exteriorização da fosfatidilserina.

No ensaio *in vivo*, conduzido em modelos animais transgênicos portadores de leucemia promielocítica aguda, foram explorados os efeitos antitumorais da fosfoetanolamina, tendo sido demonstrado que ela induz uma diminuição dos blastos e dos leucócitos no sangue periférico, o que sugere que a fosfoetanolamina exerce efeitos antiproliferativos na leucemia promielocítica aguda, por bloqueio da disseminação de clones malignos.

Em suma, neste estudo verificou-se que a fosfoetanolamina sintética possui atividade antitumoral contra as células leucémicas, ficando, assim, demonstrado que não exerce apenas efeito sobre tumores sólidos mas também contra tumores hematológicos.

## **6. Controvérsia**

A fosfoetanolamina sintética tem sido alvo de grande controvérsia, ganhando grande destaque na imprensa brasileira e internacional, bem como nas principais publicações científicas a nível mundial (Escobar, 2016a, 2016b; Ledford, 2015).

Durante mais de 20 anos, as cápsulas de fosfoetanolamina sintética, produzidas por Chierice no Instituto de Química de São Carlos (IQSC) da Universidade de São Paulo, foram distribuídas informalmente a doentes oncológicos, sem terem sido realizados os ensaios de segurança e eficácia necessários e sem existir autorização de comercialização concedida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), autoridade reguladora de todos os produtos e serviços sujeitos a vigilância sanitária no Brasil, incluindo os medicamentos. Alguns dos doentes que receberam e iniciaram o tratamento com as cápsulas distribuídas,

demonstraram algumas melhorias, perpetuando a crença de que a fosfoetanolamina sintética seria uma cura milagrosa para o cancro.

Receoso com a distribuição não oficial da substância, o Conselho Administrativo da Universidade de São Paulo proibiu o IQSC de continuar a produzir e distribuir ilegalmente a fosfoetanolamina sintética, decisão que gerou uma onda de indignação entre os doentes. Como resultado, durante o ano de 2015 multiplicaram-se as ações judiciais no sentido de obter, por meio dos tribunais, o acesso às cápsulas de fosfoetanolamina.

Apesar da oposição da ANVISA e de sociedades científicas brasileiras, tais como a Associação Médica Brasileira, a Academia Brasileira de Ciências, a Sociedade Brasileira de Farmacêuticos Hospitalares e a Sociedade Brasileira de Farmacêuticos de Oficina, no dia 14 de abril de 2016 foi publicada no Diário Oficial da União, o equivalente no Brasil ao Diário da República português, a Lei número 13.269, sancionada pela, então, presidente do Brasil, Dilma Rousseff, que autoriza a produção e a utilização da fosfoetanolamina sintética em doentes com cancro, mesmo que não haja registo da substância na ANVISA (Presidência da República, 2016).

A promulgação da lei acendeu ainda mais a discussão sobre a fosfoetanolamina e principalmente sobre a necessidade da realização de mais estudos sobre a eficácia e segurança da substância. Diante da repercussão do tema, o Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação do Brasil, comprometeu-se a investir até 10 milhões de reais (aproximadamente, 2,5 milhões de euros) para financiar as pesquisas.

## **7. Perspetivas futuras**

Para ser aprovada a sua comercialização, qualquer substância com potencial terapêutico deve passar por diversas fases que fazem parte do processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos: a fase pré-clínica, em que a substância é testada em laboratório e em animais no sentido de verificar a sua atividade biológica e segurança para que possa seguir para a próxima fase, a fase clínica, que compreende ensaios clínicos realizados em seres humanos para avaliação da sua eficácia e segurança.

O IQSC em articulação com o Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação e o Ministério da Saúde, estão a promover a realização de estudos para verificar a segurança e eficácia da fosfoetanolamina em laboratórios credenciados e com reconhecida experiência na pesquisa e desenvolvimento de fármacos, em cinco estados brasileiros.

Até ao momento, foram já realizados quatro testes de segurança, que incluíram a avaliação do potencial citotóxico e antiproliferativo da fosfoetanolamina, avaliação da dose máxima

tolerada e seleção de doses, bem como a avaliação da sua genotoxicidade, em modelos experimentais.

Os resultados obtidos, publicados em março de 2016, demonstraram que a fosfoetanolamina não apresenta atividade mutagénica nem sinais de toxicidade, no entanto e ao contrário do que se esperava, também demonstraram pouca eficácia da fosfoetanolamina no combate ao cancro. Apesar dos resultados insatisfatórios, o ministério anunciou a continuação dos estudos.

Assim, a previsão é que continuem a ser realizados os testes pré-clínicos e que, caso a fosfoetanolamina sintética demonstre potencial terapêutico e segurança, sejam iniciados, a seu tempo, os ensaios em seres humanos para que a fosfoetanolamina possa vir a ser autorizada como medicamento. O processo de descoberta e desenvolvimento de um novo fármaco, até que seja aprovado como medicamento, é um processo longo e dispendioso, pelo que ainda vai levar algum tempo até que eventualmente a fosfoetanolamina sintética seja aprovada para comercialização.

Outra das hipóteses que se coloca, sendo inclusivamente recomendada pelo ministro da tecnologia, ciência e inovação, é a aprovação da fosfoetanolamina sintética como suplemento alimentar, que pode conduzir a uma aprovação mais célere da substância e dessa forma impedir que muitos doentes tentem obtê-la por meios ilegais e sem qualquer tipo de controlo (MCTI, 2016).



## 8. Conclusão

O conhecimento detalhado dos mecanismos moleculares de regulação da vida e morte celulares é indiscutivelmente importante enquanto instrumento potencial de desenvolvimento de estratégias de atuação em diversas situações patológicas, principalmente no cancro.

Os efeitos farmacológicos dos fosfolípidos antineoplásicos e os efeitos experimentalmente demonstrados pela fosfoetanolamina podem ser considerados promissores para o tratamento de vários tipos de cancro, devido ao seu potencial citotóxico contra uma grande variedade de células cancerígenas.

Não obstante a importância dos estudos apresentados, para um melhor conhecimento da fosfoetanolamina sintética e do seu comportamento, o processo de descoberta e desenvolvimento de um medicamento de uso humano, requer a condução de ensaios adicionais que até ao momento não foram realizados.

Assim, perante a diversidade que caracteriza o cancro, sendo pouco provável a existência de uma substância que consiga atuar e tratar eficazmente todas as variantes, não existem estudos científicos rigorosos que permitam comprovar os benefícios, compreender os riscos e garantir a segurança e a eficácia da fosfoetanolamina sintética para que seja utilizada como agente farmacológico no tratamento do cancro.

## 9. Bibliografia

ALBERTS, B. *et al.* - Essential Cell Biology. Garland Science, 2010. (3. ed.) ISBN 9780815341291,9780815341307.

AZEVEDO, C. - Biologia Celular e Molecular. Lidel, 2005. (4. ed.) ISBN 9727573541.

BRACHWITZ, H.; VOLLGRAF, C. - Analogs of alkyllysophospholipids: Chemistry, effects on the molecular level and their consequences for normal and malignant cells. **Pharmacology and Therapeutics**. ISSN 01637258 , 66:1(1995), 39–82. doi: 10.1016/0163-7258(95)00001-W.

DEGTEREV, A.; BOYCE, M.; YUAN, J. - A decade of caspases. **Oncogene**. ISSN 0950-9232 , 22:53 (2003), 8543–8567. doi: 10.1038/sj.onc.1207107.

DHAKSHINAMOORTHY, S. *et al.* - Metabolomics identifies the intersection of phosphoethanolamine with menaquinone- triggered apoptosis in an in vitro model of leukemia. **Molecular BioSystems**. ISSN 1742-206X. (2015) doi: 10.1039/C5MB00237K.

DUNKLE, A.; HE, Y.-W. - Apoptosis and Autophagy in the Regulation of T Lymphocyte Function. **Immunology Research**. ISSN 15378276 , 4:164 (2011), 70–86. doi: 10.1126/scisignal.2001449.Engineering.

ESCOBAR, H. - Brazil bill would legalize renegade cancer pill. **Science**. [Em linha] , 352:6281 (2016), 18. doi: 10.1126/science.352.6281.18. [Consult. 16 abr. 2016]. Disponível em <http://science.sciencemag.org/content/352/6281/18>

ESCOBAR, H. - Brazil president signs law legalizing renegade cancer pill. **Science**. [Em linha] (2016) ISSN 0036-8075 doi: 10.1126/science.aaf9915. [Consult. 16 abr. 2016]. Disponível em <http://www.sciencemag.org/news/2016/04/brazil-president-signs-law-legalizing-renegade-cancer-pill>

FERREIRA, A. K. *et al.* - Synthetic phosphoethanolamine induces apoptosis through caspase-3 pathway by decreasing expression of Bax/Bad protein and changes cell cycle in melanoma. **Journal of Cancer Science and Therapy**. ISSN 19485956 , 3:3(2011), 53–59. doi: 10.4172/1948-5956.1000058.

FERREIRA, A. K.; MENEGUELO, R.; PEREIRA, A.; *et al.* - Anticancer effects of synthetic phosphoethanolamine on Ehrlich ascites tumor: an experimental study. **Anticancer research**. ISSN 1791-7530 , 32:1 (2012), 95–104.

FERREIRA, A. K.; MENEGUELO, R.; MARQUES, F. L. N.; *et al.* - Synthetic phosphoethanolamine a precursor of membrane phospholipids reduce tumor growth in mice bearing melanoma B16-F10 and in vitro induce apoptosis and arrest in G2/M phase. **Biomedicine and Pharmacotherapy**. ISSN 07533322 , 66:7(2012), 541–548. doi: 10.1016/j.biopha.2012.04.008.

FERREIRA, A. K. *et al.* - Synthetic phosphoethanolamine has in vitro and in vivo anti-leukemia effects. **British journal of cancer**. ISSN 1532-1827 , 109:11 (2013), 2819–28. doi: 10.1038/bjc.2013.510.

FERREIRA, A. K.; MENEGUELO, R.; *et al.* - Synthetic phosphoethanolamine induces cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells through the mitochondrial pathway. **Biomedicine & pharmacotherapy = Biomédecine & pharmacothérapie**. ISSN 1950-6007 , 67:6(2013), 481–7. doi: 10.1016/j.biopha.2013.01.012.

FERREIRA, A. K.; FREITAS, V. M.; *et al.* - Anti-Angiogenic and Anti-Metastatic Activity of

Synthetic Phosphoethanolamine. **PLoS ONE**. ISSN 19326203 , 8:3 (2013). doi: 10.1371/journal.pone.0057937.

HEIDEN, M. VANDER; CANTLEY, L.; THOMPSON, C. - Understanding the Warburg effect: The metabolic Requirements of cell proliferation. **Science**. 324:5930 (2009), 1029–1033. doi: 10.1126/science.1160809.Understanding.

HENGARTNER, M. O. - The biochemistry of apoptosis. **Nature**. 407 (2000), 770–776.

LEDFORD, H. - Brazilian courts tussle over unproven cancer treatment. **Nature**. [Em linha] ISSN 1476-4687 , 527:7579 (2015), 420–421. doi: 10.1038/527420a. [Consult. 6 fev. 2016]. Disponível em <http://www.nature.com/news/brazilian-courts-tussle-over-unproven-cancer-treatment-1.18864>

MCTI - **Relatório de atividades do grupo de trabalho sobre a fosfoetanolamina**. Brasília : [s.n.] (2015)

MCTI - **Ministro sugere legalizar fosfoetanolamina como suplemento alimentar** [Em linha] [Consult. 16 abr. 2016]. Disponível em [http://www.mcti.gov.br/fosfoetanolamina-noticias/-/asset\\_publisher/QZohZ4pzYw5E/content/ministro-sugere-legalizar-fosfoetanolamina-como-suplemento-alimentar;jsessionid=55CFCECE4D0C020CF8D66D8BB24AA2BA](http://www.mcti.gov.br/fosfoetanolamina-noticias/-/asset_publisher/QZohZ4pzYw5E/content/ministro-sugere-legalizar-fosfoetanolamina-como-suplemento-alimentar;jsessionid=55CFCECE4D0C020CF8D66D8BB24AA2BA).

MOLLINEDO, F. *et al.* - Involvement of lipid rafts in the localization and dysfunction effect of the antitumor ether phospholipid edelfosine in mitochondria. **Cell death & disease**. ISSN 2041-4889 , 2 (2011), e158. doi: 10.1038/cddis.2011.41.

OUTHOUSE, E. L. - Amino-ethyl phosphoric ester from tumours. **Biochem J.** , 30:2 (1936), 197–201.

OZASLAN, M. *et al.* - Ehrlich ascites carcinoma. **African Journal of Biotechnology**. 10:13 (2011), 2375–2378.

PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA - Lei número 13269. **Diário Oficial da União de 13-04-2016** [Em linha]. Brasil : [s.n.]. (2016) Disponível em [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_Ato2015-2018/2016/Lei/L13269.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2015-2018/2016/Lei/L13269.htm)

PUBCHEM - **PubChem Compound Database; CID=1015** [Em linha] [Consult. 6 fev. 2016]. Disponível em <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1015>

QUINN, P.; KAGAN, V. - Phospholipid Metabolism in Apoptosis. . [S.l.] : KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, 2004. ISBN 0-306-47931-1,0-306-46782-8.

RANG, H.; DALE, M. - Rang and Dale's Pharmacology. (7. ed.) ISBN 9780702034718.

VERMEERSCH, K. A *et al.* - Distinct metabolic responses of an ovarian cancer stem cell line. **BMC Systems Biology**. ISSN 1752-0509 , 8:1 (2014), 134. doi: 10.1186/s12918-014-0134-y.

**Créditos da imagem de capa:** *Detalhe de cápsulas de fosfoetanolamina em recipiente no Instituto de Química de São Carlos (IQSC).* Cecília Bastos/USP Imagens. Disponível em <http://www.imagens.usp.br/>