

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UNB  
CAMPUS GAMA – FGA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

**BIOENGENHARIA TERAPÊUTICA: AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE DE LIPÍDIO SINTÉTICO EM CÉLULAS  
NEOPLÁSICAS**

**WELLINGTON RODRIGUES**

ORIENTADOR: Dra. JAQUELINE RODRIGUES DA SILVA



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UNB

FACULDADE UNB GAMA – FGA



**BIOENGENHARIA TERAPÊUTICA: AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE DE LIPÍDIO  
SINTÉTICO EM CÉLULAS NEOPLÁSICAS**

**WELLINGTON RODRIGUES**

ORIENTADOR: DRA. JAQUELINE RODRIGUES DA SILVA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM  
ENGENHARIA BIOMÉDICA

PUBLICAÇÃO: 131A/2020  
BRASÍLIA/DF, DEZEMBRO DE 2020

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UNB  
FACULDADE UNB GAMA - FGA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO

**BIOENGENHARIA TERAPÊUTICA: AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE DE LIPÍDIO  
SINTÉTICO EM CÉLULAS NEOPLÁSICAS**

WELLINGTON RODRIGUES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

APROVADA POR:



---

DRA. JAQUELINE RODRIGUES DA SILVA

(ORIENTADORA – UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA/INSTITUTO DE BIOLOGIA)



---

DRA. DANIELA MARA DE OLIVEIRA

(EXAMINADORA INTERNA – UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA/INSTITUTO DE BIOLOGIA)



---

DR. ADSON FERREIRA DA ROCHA

(EXAMINADOR INTERNO – UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA/FACULDADE DO GAMA)

**BRASÍLIA/DF, DEZEMBRO DE 2020**

## **FICHA CATALOGRÁFICA**

**RODRIGUES, WELLINGTON**

Bioengenharia Terapêutica: Avaliação de Citotoxicidade de Lipídio Sintético em Células Neoplásicas

[Distrito Federal], 2020.

User Field page\_minus\_preamble = 44p., 210 x 297 mm (FGA/UnB Gama, Mestrado em Engenharia Biomédica, 2020).

Dissertação de Mestrado em Engenharia Biomédica, Faculdade UnB Gama, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica.

1. Câncer

2. Lipídios análogos

3. Fosfolipídios

4. 2-aminoetanol-dihidrogenofosfato

I. FGA UnB

II. Título (série)

## **REFERÊNCIA**

Rodrigues, Wellington (2020). Bioengenharia Terapêutica: Avaliação de Citotoxicidade de Lipídio Sintético em Células Neoplásicas. Dissertação de mestrado em Engenharia Biomédica, Publicação 0131A/2020, Programa de Pós-Graduação, Faculdade UnB Gama, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 44p.

## **CESSÃO DE DIREITOS**

Autor: Rodrigues Wellington

Título: Bioengenharia Terapêutica: Avaliação de Citotoxicidade de Lipídio Sintético em Células Neoplásicas

Grau: Mestre

Ano: 2020

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta dissertação de mestrado e para emprestar ou vender essas cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva outros direitos de publicação e nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

---

[shipaniq@gmail.com](mailto:shipaniq@gmail.com)

Brasília, DF – Brasil

## RESUMO

O câncer é uma das principais causas de mortes em muitos países, apesar das diversas terapias existentes e aplicadas atualmente, nem todas apresentam os resultados desejados. A maioria dos tratamentos afetam tanto as células cancerígenas quanto as células normais, demonstrando a toxicidade desses agentes anticâncer; outro fator é a solubilidade da maioria das moléculas usadas como quimioterápicos e que são altamente hidrofóbicos, limitando assim a eficácia terapêutica, pelo tempo de meia-vida curta que apresentam.

A busca de novas terapias e moléculas que levem a um melhor prognóstico da doença, seja na cura ou na qualidade de vida dos pacientes é objetivo incessante dos médicos e cientistas da área. Tal empenho levou a evolução nas terapias farmacológicas que buscam uma ação mais específica do fármaco, como a melhora no reconhecimento de tumores e das células que os constituem, e uma penetração facilitada em células tumorais. É sabido que os lipídios bioativos apresentam alto potencial seletivo e de inibidores de metástases, podendo auxiliar como transportador e bio-sinalizador, facilitando a entrega do fármaco diretamente no tumor.

Alguns lipídios bioativos, assim como a molécula em estudo denominada como 2-aminoetanol-dihidrogenofosfato (PEA), são fosfolipídios sintéticos que apresentam características específicas, atuando na biomodulação das células como: controle proliferativo, funções das organelas, endocitose, autofagia, apoptose, envelhecimento e estresse oxidativo. Assim, este trabalho tem por finalidade avaliar a capacidade antineoplásica da PEA, que não têm como alvo o DNA, mas promovem alterações na membrana plasmática, induzindo a morte celular em células de adenocarcinoma da próstata DU-145, adenocarcinoma de mama humana MCF7 e MDA-MB-235, e Fibroblasto humano.

Avaliações físico-químicas e estruturais foram realizadas utilizando a condutometria e *in vitro* da molécula. Inicialmente os estudos de condutometria por meio de um titulante cem vezes mais concentrado, sendo um ácido forte HCL com pH semelhante ao do estômago, demonstraram dois pontos de inflexão sendo que, no primeiro ponto a molécula forma um dímero com a ligação do hidrogênio, e no segundo, ocorre uma protonação do íon de cloreto, com a molécula gerando uma diminuição da carga do eletrólito.

Nos estudos *in vitro*, a viabilidade celular foi determinada pelo teste colorimétrico de MTT, como um reflexo da função mitocondrial, após exposição a diferentes concentrações de PEA (0,02 a 500mM) por períodos de 24 e 48 horas.

As células de fibroblastos humano não foram afetadas pela incubação com a PEA nos períodos testados, apresentando apenas 10% de células mortas após 48 horas de exposição a concentração de 100 mM. Nas células de tumores mamários MCF7, a toxicidade foi concentração dependente, sendo

que as concentrações entre 30 e 40 mM promoveram a morte de cerca de 50% das células, independentemente do tempo de exposição. A linhagem de células MDA-MB-231, o tempo de exposição a molécula promoveu resultados diferentes em 24 horas o IC<sub>50</sub> foi com a concentração de 7,81 mM e em 48 horas 50 mM. O comportamento das células prostáticas em 24 horas de tratamento não apresentou toxicidade e em 48 horas de tratamento o IC<sub>50</sub> foi com a concentração de 80 mM.

**Palavras-chave:** Carcinogênese, Terapia, Fosfolipídios, Membrana Plasmática, Citotoxicidade, Viabilidade Celular, Câncer de Mama, Câncer de Próstata, Biotecnologia, Bioengenharia Terapêutica Eletroquímica, Condutometria, 2-aminoetanol-dihidrogenofosfato.

## ABSTRACT

Cancer is a leading cause of death in many countries, despite the various therapies that are currently in place and not all have the desired results. Most treatments affect both cancer cells and normal cells, demonstrating the toxicity of these anticancer agents; another factor is the solubility of most of the molecules used as chemotherapeutics and which are highly hydrophobic, thus limiting therapeutic efficacy, due to the short half-life they present.

The search for new therapies and molecules that lead to a better prognosis of the disease, whether in the cure or in the quality of life of patients, is an unceasing objective of doctors and scientists in the area. Such commitment led to the evolution in pharmacological therapies that seek a more specific action of the drug, such as the improvement in the recognition of tumors and the cells that constitute them, and an easier penetration in tumor cells. It is known that bioactive lipids have a high potential for selection and metastasis inhibitors, which can assist as a transporter and biosignalizer, facilitating the delivery of the drug directly to the tumor.

Some bioactive lipids, as well as the study molecule called 2-aminoethanol-dihydrogen phosphate (PEA), are synthetic phospholipids that have specific characteristics, acting on the biomodulation of cells such as: proliferative control, organelle functions, endocytosis, autophagy, apoptosis, aging and oxidative stress. Thus, this work aims to evaluate the antineoplastic capacity of PEA, which do not target DNA, but promote changes in the plasma membrane, inducing cell death in DU-145 prostate adenocarcinoma cells, MCF7 and MDA human breast adenocarcinoma -MB-235, and human fibroblast.

Physical-chemical and structural evaluations were performed using the conductometry and *in vitro* of the molecule. Initially conductivity studies using a titrant one hundred times more concentrated, being a strong HCL acid with a pH similar to that of the stomach, showed two points of inflection, and in the first point the molecule forms a dimer with hydrogen bonding, and in the second, protonation of the chloride ion occurs, with the molecule generating a decrease in the electrolyte charge.

In *in vitro* studies, cell viability was determined by the MTT colorimetric test, as a reflection of mitochondrial function, after exposure to different concentrations of PEA (0.02 to 500mM) for periods of 24 and 48 hours.

Human fibroblast cells were unaffected by incubation with PEA in the tested periods, showing only 10% of dead cells after 48 hours of exposure to 100 mM concentration. In MCF7 breast tumor cells, the toxicity was concentration dependent, with concentrations between 30 and 40 mM promoting the death of about 50% of the cells, regardless of the exposure time. The cell line MDA-

MB-231, the exposure time to the molecule promoted different results in 24 hours, the IC50 was with a concentration of 7.81 mM and in 48 hours 50 mM. The behavior of prostatic cells in 24 hours of treatment did not show toxicity and in 48 hours of treatment the IC50 was at a concentration of 80 mM.

**Keywords:** Carcinogenesis, Therapy, Phospholipids, Plasma Membrane, Cytotoxicity, Cell Viability, Breast Cancer, Prostate Cancer, Biotechnology, Electrochemical Therapeutic Bioengineering, Conductometry, 2-aminoethanol-dihydrogen phosphate.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço e dedico a Deus por me permitir vislumbrar a beleza de seus propósitos em minha vida. Pois já dizia Voltaire: A falsa ciência gera ateus; a verdadeira ciência faz os homens se curvarem diante da divindade.

Agradeço ao meu pai pelo amor incondicional. Sou eternamente grato. Dedico todo o meu amor e empenho neste trabalho ao meu pai, *in memoriam* Rubens Rodrigues, pois deitado em seu colo, prometi jamais desistir de entender o potencial da Phos.

À minha eterna amiga Natalanei Estevam, *in memoriam*. A sua serena voz que ecoa em meus princípios de dedicação terrena, que por aqui continuo fazendo minha humilde parte.

Ao meu segundo pai, amigo, irmão, professor de vida e de química, Dr. Otaviano Mendonça que por ele honro a genialidade da sua criação, que tanto nos fascina e nos une diante das conexões com cosmo, obrigado meu professor por permitir que Deus nos use de forma grandiosa e simples como nosso querido Chico.

À minha namorada Franciéle que na “caixinha da felicidade da UnB”, estava ela, que diuturnamente e incansavelmente, me acompanhou diante das alegrias e aflições, meu muito obrigado por tudo.

Ao professor Leandro Xavier, que me estimulou no início dessa jornada e vibrou com minha aprovação e a Denise Martins nossa secretária que sempre me acolheu com muito carinho e zelo.

Aos meus ex-professores doutores Welson Santos, Maria Clara da Silva e Juliano Bonfim Carregaro, dedico a vocês que me confiaram a carta de recomendação para a universidade, me orgulho de parte de mim ser vocês.

Agradeço a professora Suélia de Siqueira Rodrigues Fleury, que com amor, generosidade e timbre da compaixão sempre me motivou e me permitiu participar de tantos projetos lindos, onde o amor ao próximo era o que nos norteara.

Aos meus colegas, Breno, Ludmila, Mayla e Lorena, pelas inúmeras experiências sempre iluminadas, deixo o meu estamos juntos até depois do fim.

Agradeço muito o apoio e a paciência do Professor Adson Ferreira da Rocha e a sensibilidade em criar os grupos de experimentos eletrônicos entre alunos de humanas e de exatas, onde não posso esquecer a experiência de aprender com meu colega de turma Sr. Klaus, o quanto ele foi generoso em ensinar um curioso a criar um aparelho de eletrocardiograma, conhecê-lo juntamente com sua esposa me faz crer no amor e na amizade.

À professora Sônia Bão por me acolher no laboratório de Microscopia Eletrônica, que percebeu minha alegria em trabalhar sozinho em um domingo ouvindo e cantando Raul Seixas.

Agradeço imensamente à Bruna Guido e Ingrid Grazielle, anjos de luz que me ampararam, certamente o apoio de vocês foi primordial durante esta jornada, meu eterno agradecimento.

Meus colegas que me ajudou a engatinhar e a caminhar Diogo, Marcinha, Deyse, Babi, Gui, Karen, Eloísio, Matheus e a Nih que nos presenteou com uma anjinha cristal que nasceu em meio a ciência.

Agradeço o acolhimento da professora Daniela Mara de Oliveira, no laboratório de Genética e Morfologia, obrigada pelo apoio e ensinamentos partilhados. Aos meus colegas de trabalho professor Cesar, Monique, Lissete, Grazi e todos os demais que me receberam respeitosamente, me orgulho de fazer parte desse grupo.

Agradeço o professor Veterinário Rafael Rocha de Andrade da faculdade de saúde, por me ensinar com amor e dedicação como tratar nossos irmãos de aprimoramento, minimizando o impacto de dor e desconforto, pautado na bioética animal.

Agradeço o professor Natan Monsores da faculdade de saúde, pelo semestre cursado onde as aulas começavam as 13 horas sem hora para acabar, como foi bom celebrar a transcendência do que é estar na UnB, a cada aula percebia se nas feições a gratidão de cada um por ser seu aluno, talvez um dia eu e meus colegas de turma não saberemos os nomes de cada um, mas jamais esqueceremos de nossas feições que conviveram durante suas aulas.

Lucky o iluminado, meu filho, se eu pudesse prescreveria um filho de quatro patas para os mestrandos e doutorandos, eles são seres mágicos que nos entendem no olhar.

A Dona Sônia que me adotou como um filho, o meu muito obrigado por me ouvir nas horas de dificuldade e por me amar tanto. Gratidão eterna.

A minha irmã Carina Rodrigues e minhas sobrinhas Jú e Dindi, dedico todas as minhas conquistas a vocês. Amo muito vocês!

Meu eterno agradecimento a minha orientadora Jaqueline Rodrigues da Silva, por me amparar nas horas de desespero mental e por me nortear diante da execução do nosso trabalho, a Dona Maria sua mãe que me recebeu como se fosse da família, minha gratidão e respeito sempre irei recordar com carinho da nossa trajetória.

Agradeço à CAPES pela bolsa de auxílio financeiro e principalmente ao Ministério Público do Trabalho que financiou o meu projeto de pesquisa, permitindo o primeiro passo desse sonho.

Ao Programa de Pós Graduação em Engenharia Biomédica, agradeço e dedicarei toda a minha vida em honrar a nossa universidade, UnB sua Linda! Meu orgulho é você.

# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1	Contextualização do Problema .....	1
1.2	Justificativa .....	6
1.3	Objetivos.....	7
1.3.1	Objetivo Geral .....	7
1.3.2	Objetivos Específicos .....	7
<b>2</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....</b>	<b>8</b>
2.1	Câncer de Mama .....	8
2.2	Câncer de Próstata .....	9
2.3	Mecanismos de Ação dos Lipídios no Câncer .....	9
2.4	A Molécula de Estudo: 2-aminoetanol-dihidrogenofosfato.....	13
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>18</b>
3.1	Avaliação da Condutometria.....	18
3.1.1	Equipamentos.....	18
3.1.2	Reagentes, Soluções, Amostra e Quantificação.....	18
3.1.3	Teste de Condutometria.....	19
3.2	Ensaio <i>in vitro</i> .....	19
3.2.1	Equipamentos .....	19
3.2.2	Reagentes e Soluções Utilizadas .....	19
3.2.3	Molécula Teste.....	20
3.2.4	Linhagens Celulares.....	20
3.2.5	Cultura Celular.....	20
3.2.6	Citotoxicidade.....	21
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>22</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÕES .....</b>	<b>31</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>34</b>
<b>7</b>	<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>35</b>
	<b>LISTA DE REFERÊNCIAS.....</b>	<b>36</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Distribuição dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo, exceto pele não melanoma*. Em destaque estão os tipos de canceres que serão abordados nesse trabalho. .....	2
--	---

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Traços característicos de uma célula tumoral. A figura ilustra as características principais adquiridas pelas células tumorais (Adaptado de Hanahan & Weinberg, Cell, 2011.....3
- Figura 2.** Estrutura de um fosfolipídio de membrana. Fonte: Próprio autor (imagem criada no://biorender.com/) .....10
- Figura 3.** Primeiro cristal monoclinico de 2-aminoetanol-dihidrogenofosfato obtido por recristalização em água. Fonte: RIBEIRO FILHO, 1998.....13
- Figura 4.** Vias de síntese de fosfolipídios. Em destaque a Via Kennedy. Fonte: Adaptada do livro Princípios de bioquímica de Lenhing 6º, 2014, pág. 834.....14
- Figura 5.** Representação vista no software ORTEP com 50% de probabilidade para a forma zwitterion do 2-aminoetanol dihidrogenofosfato. Fonte: RIBEIRO FILHO, 1998.....15
- Figura 6.** Representação vista no software ORTEP do esquema de ligações de hidrogênio para o cristal de 2-aminoetanol dihidrogenofosfato. Fonte: RIBEIRO FILHO, 1998.....16
- Figura 7.** Fórmula estrutural do 2-aminoetanol dihidrogenofosfato.....16
- Figura 8.** Sistema utilizado na titulação condutométrica: a) agitador magnético; b) condutivímetro; c) célula de condutividade; d) bureta; e) béquer.....18
- Figura 9.** Titulação condutométrica de 2-aminoetanol-dihidrogeniofosfato  $10^{-4}$  mL. Foram efetuadas titulações condutométricas, variando as concentrações molares entre o titulado e o titulante até ser possível obter os pontos de infexões.....22
- Figura 10.** A reação apresenta o primeiro ponto de inflexão e formação do dímero catiônico.....23

<b>Figura 11.</b> A reação apresenta o segundo ponto de inflexão formando par iônico do íon do cloreto, com a PEA protonada com cátion.....	23
<b>Figura 12.</b> Citotoxicidade de diferentes concentrações da PEA em células de Fibroblasto humano, após 24 horas de incubação, pelo ensaio de MTT. Os dados são expressos como média e desvio padrão de 3 experimentos independentes, tendo com 100% de células viáveis as células expostas ao meio de cultivo suplementado .....	24
<b>Figura 13.</b> Citotoxicidade de diferentes concentrações da PEA (2) em células de Fibroblasto humano após 48 horas de incubação, pelo ensaio de MTT. Os dados são expressos como média e desvio padrão de 3 experimentos independentes, tendo com 100% de células viáveis as células expostas ao meio de cultivo suplementado.....	24
<b>Figura 14.</b> Citotoxicidade de diferentes concentrações da PEA (2) em células de MDA-MB-231 após 24 horas de incubação, pelo ensaio de MTT. Os dados são expressos como média e desvio padrão de 3 experimentos independentes, tendo com 100% de células viáveis as células expostas ao meio de cultivo suplementado.....	25
<b>Figura 15.</b> Citotoxicidade de diferentes concentrações da PEA (2) em células MDA-MB-231 após 48 horas de incubação, pelo ensaio de MTT. Os dados são expressos como média e desvio padrão de 3 experimentos independentes, tendo com 100% de células viáveis as células expostas ao meio de cultivo suplementado.....	26
<b>Figura 16.</b> Citotoxicidade de diferentes concentrações da PEA (2) em células MCF-7 após 48 horas de incubação, pelo ensaio de MTT. Os dados são expressos como média e desvio padrão de 3 experimentos independentes, tendo com 100% de células viáveis as células expostas ao meio de cultivo suplementado.....	26
<b>Figura 17.</b> Citotoxicidade de diferentes concentrações da PEA em células DU-145 após 24 horas de incubação, pelo ensaio de MTT. Os dados são expressos como média e desvio padrão de 3 experimentos independentes, tendo com 100% de células viáveis as células expostas ao meio de cultivo suplementado.....	27

<b>Figura 18.</b> Citotoxicidade de diferentes concentrações da PEA em células DU-145 após 48 horas de incubação, pelo ensaio de MTT. Os dados são expressos como média e desvio padrão de 3 experimentos independentes, tendo com 100% de células viáveis as células expostas ao meio de cultivo suplementado.....	28
<b>Figura 19.</b> Citotoxicidade de diferentes concentrações da PEA em células de Fibroblasto humano após 24 horas de incubação, pelo ensaio de MTT. Os dados são expressos como média e desvio padrão de 3 experimentos independentes, tendo com 100% de células viáveis as células expostas ao meio de cultivo suplementado.....	29
<b>Figura 20.</b> Citotoxicidade de diferentes concentrações da PEA em células de MDA-MB-231 após 24 horas de incubação, pelo ensaio de MTT. Os dados são expressos como média e desvio padrão de 3 experimentos independentes, tendo com 100% de células viáveis as células expostas ao meio de cultivo suplementado.....	29
<b>Figura 21.</b> Citotoxicidade de diferentes concentrações da PEA em células de MCF-7 após 24 horas de incubação pelo ensaio de MTT. Os dados são expressos como média e desvio padrão de 3 experimentos independentes, tendo com 100% de células viáveis as células expostas ao meio de cultivo suplementado.....	30

## LISTA DE NOMENCLATURAS E ABREVIações

<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ER</b>	Receptor de Estrogênio
<b>PR</b>	Receptor de Progesterona
<b>HER-2</b>	Receptor de fator de crescimento epidermal 2
<b>BRCA1</b>	Câncer de Mama 1
<b>BRCA2</b>	Câncer de Mama 2
<b>MYC</b>	Gene proto-oncogene
<b>TP53</b>	Proteína tumoral p53
<b>RB1</b>	Corepressor transcricional RB1
<b>PSA</b>	Antígeno Prostático Específico
<b>PAF</b>	Fator de Ativação de Plaquetas
<b>HL60</b>	Leucemia promiilocítica humana
<b>K562</b>	Leucemia mielóide crônica
<b>BG1</b>	Adenocarcinomas ovarianos
<b>BG3</b>	Adenocarcinomas ovarianos
<b>PEA</b>	Fosfoetanolamina
<b>Phos</b>	Fosfoetanolamina
<b>MEA</b>	Monoetanolamina
<b>PE</b>	Fosfatidiletanolamina
<b>PC</b>	Fosfatidilcolina
<b>MCF-7</b>	Adenocarcinoma, tecido glândula mamária, mama, derivado de sítio metastático: derrame pleural
<b>MCF-10A</b>	Linhagem não tumoral de célula epitelial mamária
<b>BCL-2</b>	Regulador de apoptose
<b>CO<sup>2</sup></b>	Gás carbônico
<b>DMEM</b>	Meio Eagle Modificado por Dulbecco
<b>PBS</b>	Tampão fosfato Salina
<b>MTT</b>	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il) 2,5-Difenil Brometo de Tetrazolium
<b>USP</b>	Universidade de São Paulo
<b>NIH/3T3</b>	Fibroblasto de tecido embrionário de camundongos <i>mus musculus</i>
<b>MDA-MB-231</b>	Adenocarcinoma, tecido glândula mamária, mama, derivado de sítio metastático: derrame pleural
<b>DU145</b>	Carcinoma humano, tecido de próstata; derivado de sítio metastático: cérebro
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>ATLs</b>	Lipídios antineoplásicos sintéticos
<b>APCLs</b>	Alquilfosfolipídios
<b>APCs</b>	Alquilfosfocolina
<b>IS</b>	Índice de seletividade
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentração Inibitória de 50%

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO DO PROBLEMA

O câncer é um termo genérico que engloba mais de cem tipos de doenças. Uma das suas características é a sua capacidade de provocar a rápida e desordenada proliferação de células alteradas geneticamente que pode afetar qualquer parte do corpo e se espalhar para outros órgãos. Esse processo é denominado metástase. Outros termos utilizados para o câncer são tumores malignos e neoplasias (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019; FEITELSON et al., 2015; FARES et al., 2020).

Atualmente, 7,6 milhões de pessoas no planeta morrem em decorrência da doença a cada ano (INCA, 2019), para o ano de 2030, segundo a organização mundial da saúde (OMS), a previsão é de 27 milhões de novos casos de câncer, 17 milhões de mortes pela doença e 75 milhões de pessoas vivendo com câncer (WHO, 2018). O câncer de pulmão lidera as listas globais de incidência e mortalidade, sendo seguido pelo de mama e colorretal, respectivamente (BRAY et al., 2018; WHO, 2018).

São estimados 625 mil novos casos no Brasil para cada ano do triênio 2020-2023 (450 mil, excluindo os casos de câncer de pele não melanoma). O câncer mais incidente será o de pele não melanoma (177 mil), seguido pelos cânceres de mama e próstata (66 mil cada), cólon e reto (41 mil), pulmão (30 mil) e estômago (21 mil), como pode ser observado na Tabela 1 (INCA, 2019).

Há diversos procedimentos e medicamentos disponíveis para o tratamento do câncer, que podem ser classificados como: cirúrgicos, radioterápicos e tratamentos sistêmicos com quimioterápicos, imunoterápicos, e terapias hormonal e/ou sítio ativo; e em alguns casos transplantes com células troncos ou medula óssea (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 19).

A falha do tratamento e a progressão do câncer está associado à heterogeneidade tumoral (PHI et al., 2018). No nível genômico as células que formam um tumor não possuem as mesmas características, fazendo com que as terapias não respondam de maneira homogênea, resultando assim em possível recorrência do tumor (YADAV; DESAI, 2019) levando a necessidade de interferências cirúrgicas ou radioterápicas. A quimioterapia tem capacidade para induzir a heterogeneidade tumoral derivada de células normais e cancerosas, resultando na diminuição dos efeitos terapêuticos da mesma (mecanismos farmacológicos), contribuindo de alguma

forma para a falha do tratamento e a progressão da doença (FOUAD; AANEI, 2017; PHI et al., 2018, HAMED et al., 2019). Limitando, assim, a eficiência dos quimio-agentes e a busca de novas moléculas e terapias (CHEN et al., 2017; SENTHEBANE et al., 2017).

**Tabela 1.** Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo, exceto pele não melanoma\* (INCA, 2019). Em destaque estão os tipos de cânceres que serão abordados nesse trabalho.

Localização Primária	Casos Novos	%			Localização Primária	Casos Novos	%
Próstata	65.840	29,2	Homens	Mulheres	Mama feminina	66.280	29,7
Cólon e Reto	20.520	9,1			Cólon e Reto	20.470	9,2
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.760	7,9			Colo do útero	16.590	7,4
Estômago	13.360	5,9			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.440	5,6
Cavidade Oral	11.180	5,0			Glândula Tireoide	11.950	5,4
Esôfago	8.690	3,9			Estômago	7.870	3,5
Bexiga	7.590	3,4			Ovário	6.650	3,0
Linfoma não-Hodgkin	6.580	2,9			Corpo do útero	6.540	2,9
Laringe	6.470	2,9			Linfoma não-Hodgkin	5.450	2,4
Leucemias	5.920	2,6			Sistema Nervoso central	5.230	2,3

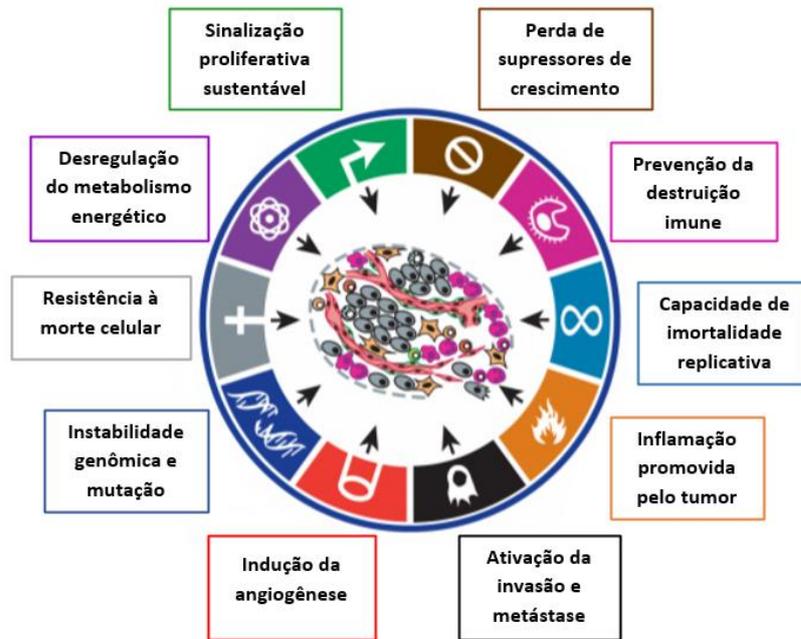
\* Números arredondados para múltiplos de 10

Fonte: Instituto Nacional do Câncer, 2019.

As células neoplásicas se diferenciam das células sadias por possuírem diferentes traços morfológicos e fenótipos, apresentando alterações de núcleo, mitocôndrias com baixa funcionalidade, modificações em seu citoesqueleto, alta produção de energia anaeróbica e diversas outras variações. Assim, a alta incidência de câncer, dependendo da longevidade celular, sugere a necessidade de múltiplas alterações genéticas para o processo de tumorigênese (CAMPISI, 2013; PHI et al., 2018; WHITE et al., 2014; FARES et al., 2020; INCA, 2019).

As características de instabilidade em células neoplásicas incluem a capacidade de manter a sinalização proliferativa, a inibição dos supressores de crescimento, e a resistência a morte celular adequando-se a imortalidade de se replicar através da indução da angiogênese (HANAHAN; WEINBERG., 2011; FARES et al., 2020; FOUAD; AANEI, 2017). Todos os tipos de cânceres adquirem características como: manutenção da sinalização proliferativa, perda dos supressores de crescimento, resistência à morte celular, imortalidade replicativa, indução da angiogênese e ativação da invasão e metástase ilustradas na Figura 1 durante o

processo de tumorigênese. Os mecanismos para adquirir as características do câncer variam entre os tipos e subtipos de câncer (HANAHAN; WEINBERG, 2011).



**Figura 1.** Traços característicos de uma célula tumoral. A figura ilustra as características principais adquiridas pelas células tumorais (Adaptado de Hanahan & Weinberg, Cell, 2011).

A etiologia das células neoplásicas está associada principalmente a fatores internos, como, por exemplo, a predisposição genética, e os externos, influenciado principalmente pelos hábitos alimentares e pelo estilo de vida que as pessoas seguem (TOMASSETTI; VOGELSTEIN, 2017b). O câncer surge em função do grau de exposição aos agentes causadores desta patologia, e a maioria dos casos de neoplasias malignas estão relacionadas a fatores externos, ou ambientais, sendo o uso de cigarro e a exposição solar os mais conhecidos e descritos. Porém, as modificações encontradas em células malignas, demonstram que o risco de surgimento de câncer em alguns tecidos é exponencialmente maior devido a sua especificidade e ao micro ambiente das mesmas, onde a homeostase do tecido é mantida pelas inúmeras divisões das chamadas “células auto renovadoras normais”. Os resultados destas alterações evidenciam que apenas um terço são de fatores ambientais ou genéticos, sendo o maior causador as mutações aleatórias oriundas das replicações do ácido desoxirribonucleico (DNA) (TOMASSETTINE; VOGELSTEIN, 2015a).

Várias vias de sinalização celular, como as relacionadas as irregularidades no reparo do DNA, ciclo celular, apoptose e equilíbrio redox, são afetadas simultaneamente pela progressão do tumor. As células tumorais durante a progressão do tumor se adaptam e adquirem

características e alterações comportamentais que impedem ou desregulam a ação de inibidores e promotores de crescimento, facilitando a formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese) e a perda dos mecanismos de controle da proliferação celular, como apoptose e senescência replicativa., (MARTIN, 2003; MARTIN; JIANG, 2009).

As atividades metabólicas são alteradas nas células cancerosas em relação às células normais e essas alterações suportam a aquisição e a manutenção de propriedades malignas.

O termo apoptose é usado para descrever a morte celular foi introduzido por Kerr e colegas em 1972; considerada sinônimo de morte celular programada e refere-se a um tipo de morte suicida, em que a célula diminui seu volume e conseqüentemente quebra seu DNA em diversos fragmentos (ALMEIDA et al., 2005).

Os tipos de morte celular podem ser classificados de acordo com a aparência morfológica, características bioquímicas, critérios funcionais ou aspectos imunológicos (GALVAN et al., 2016); as quais são: (i) apoptose, morte celular programada tipo I, (ii) autofagia, morte celular programada tipo II e (iii) necrose, morte sem características do tipo I e tipo II (KROEMER et al, 2009).

Ao projetar esquemas clínicos, a relação da ação do medicamento com o ciclo celular é de particular importância, porque esse conhecimento serve como base para o desenvolvimento de combinações e seqüências medicamentosas, às quais influenciam o uso de fármacos em combinação com radioterapia para que a morte celular seja a desejada (GALVAN et al., 2016).

A instabilidade genômica resulta em perda da manutenção do cromossomo e/ou reparo que pode ser aplicada nas terapias anticâncer, as quais exploram esses defeitos moleculares. As drogas e radiações ionizantes utilizada nas terapias anticâncer tradicionais danificam o DNA e a maquinaria que mantêm a integridade cromossômica; mantando preferencialmente certos tipos de células cancerosas mutantes que apresentam uma capacidade reduzida de sobreviver ao dano (ALMEIDA et al., 2005).

Com base na engenharia genética, têm surgido terapias modernas contra o câncer, incluindo o uso de pequenas moléculas e proteínas, com precisão dos alvos terapêuticos biológicos, tornando-se cada vez mais específicos e as terapias cada vez mais potentes. A biotecnologia e a bioengenharia promovem grandes avanços tecnológicos na área da saúde, proporcionando uma maior diversidade no diagnóstico e nos tratamentos, visando diagnósticos precoces e uma melhor ação dos fármacos e conseqüentemente a redução de efeitos adversos e uma maior eficácia de novos medicamentos, englobando diversas áreas do conhecimento no

desenvolvimento de uma série de técnicas e ferramentas que contribuem significativamente para a melhoria dos cuidados de saúde e da qualidade de vida (DAHLGREN et al., 2016; KARANDE, 2017; SARSAIYA; SHI; CHEN, 2019).

## 1.2 JUSTIFICATIVA

A busca de novas terapias para o tratamento do câncer vem se aprimorando ao longo dos últimos anos, levando ao desenvolvimento de moléculas e formas farmacêuticas direcionadas para alvos moleculares para tumores específicos, conhecida atualmente como onco-terapias. (SALAS-VEGA S, et al. 2016; KUNNUMAKKARA, AJAIKUMAR B et al. et al. 2019).

Seguindo a mesma busca, a molécula em estudo é um fosfolipídio sintético considerado um lipídio bioativo, que, de acordo com a sua atividade biológica, apresenta função de regulação metabólica celular, como controle proliferativo, das atividades das organelas; nos processos de endocitose, autofagia, apoptose, envelhecimento e estresse oxidativo (PATEL; WITT, 2017).

Dessa forma, este grupo de lipídios revela alto potencial seletivo e de inibição metastática, podendo auxiliar como transportador e facilitador de fármacos e/ou moléculas quimioterápicas para alvos celulares ou tumorais, atuando diretamente na absorção e distribuição dos fármacos intracelular e no organismo. As mudanças geradas nas membranas celulares, diante do equilíbrio lipídico celular, levarão a alterações no arranjo estrutural da membrana plasmática e a ativação do sistema imunológico (B e T). O que leva aos grupos de pesquisa iniciar os testes com novas moléculas e eficácia farmacológica em estudos *in vitro* com modelos celulares específicos e geneticamente bem caracterizados. Assim este trabalho tem por finalidade avaliar a capacidade de um lipídio antineoplásico sintético e seu potencial citotóxico para a sua aplicação como um onco-fármaco (VAN BLITTERSWIJK; VERHEIJ, 2013, MURRAY, M. et al, 2014).

## **1.1 OBJETIVOS**

### **1.1.1 Objetivo Geral**

Avaliar a capacidade citotóxica do cristal Fosfolipídico sintético 2-aminoetanol-dihidrogenofosfato) – PEA em cultura de células neoplásicas.

### **1.1.2 Objetivos Específicos**

- Analisar a condutividade elétrica dos cristais de PEA.
- Avaliar o equilíbrio químico dos cristais de PEA em meio de cultivo celular.
- Determinar a citotoxicidade do cristal de PEA em cultura de fibroblasto humano.
- Determinar a citotoxicidade do cristal de PEA em cultura de células de adenocarcinoma mamário humano tumorais MCF-7 e MDA-MB-231; carcinoma humano prostático DU-145.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama é a neoplasia maligna mais frequente em mulheres e é uma doença heterogênea em nível molecular, que se divide em subgrupos na base dos receptores da superfície celular, que são componentes dos fatores de crescimento epidérmico humano (HER-2) e incluem receptor de estrogênio (ER) e receptor de progesterona (PR). O tipo histológico mais comum para o câncer de mama feminina é o carcinoma de células epiteliais, que se divide em lesões *in situ* e invasoras. Os carcinomas mais frequentes são os ductais ou lobulares (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019; BRAY et al. 2018; FERLAY et al., 2018).

Segundo dados da Sociedade Brasileira de Mastologia, as mulheres têm cem vezes mais chances de desenvolver um câncer de mama do que os homens, esse risco aumenta após os 40 anos de idade e principalmente se houver casos de tumores mamários na família. Também se encontra como fator de risco as adolescentes que tiveram sua menarca antes dos 12 anos de idade e sua menopausa após os 50 anos, gestantes após 35 anos e fatores ambientais como hábitos não saudáveis, como ingestão de álcool, tabagismo, sedentarismo e obesidade (HADDAD, 2020; COSTA et al., 2020).

O tratamento efetivo do câncer de mama está associado ao momento do diagnóstico e seu grau de desenvolvimento tumoral, o estadiamento ou extensão da doença, define a progressão com base nas características do tumor primário (T), as características dos linfonodos das cadeias de drenagem linfática do órgão em que o tumor se localiza (N) e a presença ou ausência de metástase a distância (M). Esses parâmetros recebem graduações, geralmente de T0 a T4; N0 a N3; e de M0 a M1, objetivando o sucesso da terapia em estadiamento primário com a identificação do tumor na fase inicial (JIANG et al., 2015).

Outros fatores que contribuem para o aumento do risco de desenvolver este tipo de câncer, são fatores genéticos, como mutações dos genes BRCA1 (câncer de mama 1) e BRCA2 (câncer de mama 2) e fatores hereditários relacionados a presença de câncer de ovário na família (BRAY et al. 2018; FERLAY et al., 2018), além da menopausa tardia (alterações hormonais), obesidade, sedentarismo e exposições frequentes a radiações ionizantes (fatores ambientais e comportamentais) (BRAY et al. 2018).

Entretanto as diferentes anomalias nos genes (BRCA1, BRCA2, MYC, TP53, RB1, JUN e CDK2A), são responsáveis por proliferação celular e são detectados nos tumores

mamários, abrangendo-se a importância da rastreabilidade e diagnóstico precoce por meio de exames genéticos e moleculares (GALVAN et al., 2016; COSTA et al., 2020).

## **2.2 CÂNCER DE PRÓSTATA**

Um dos tumores mais frequente em homens no Brasil, é o câncer de próstata, ficando atrás apenas do câncer de pele não melanoma. Alguns tumores de próstata podem crescer rapidamente e se metastizar para órgãos e tecidos adjacentes, podendo levar a morte; é comum o crescimento lento, podendo demorar cerca de 15 anos para crescer 1 cm<sup>3</sup>. A estimativa de novos diagnósticos para o ano de 2020 é de 65.840 casos, em que estão incluídos os fatores de risco relativos à hereditariedade e os fatores ambientais que envolve hábitos não saudáveis (INCA, 2019, MORI et al., 2020).

O diagnóstico tardio do câncer de próstata se deve a diferentes fatores, como o local de desenvolvimento do tumor ser considerada uma região anatômica impossível de visualização, os tumores são identificados como na maioria dos diagnósticos de câncer apenas quando surgem os sintomas como, emagrecimento, onde o indivíduo perde peso mesmo se alimentando de forma adequada (GUNDEM et al., 2015).

O rastreamento do tumor de próstata é feito por meio do exame hematológico, quantificando uma enzima glicoproteica que tem características de marcadores tumorais conforme o Antígeno Prostático Específico (PSA), com níveis considerados normais até 4 acima disso pode ser uma anormalidade, tanto benigna quanto maligna (NYAME; GORE, 2020), sendo o exame definitivo para conclusão da anormalidade o estudo histopatológico (GLEASON, 1992).

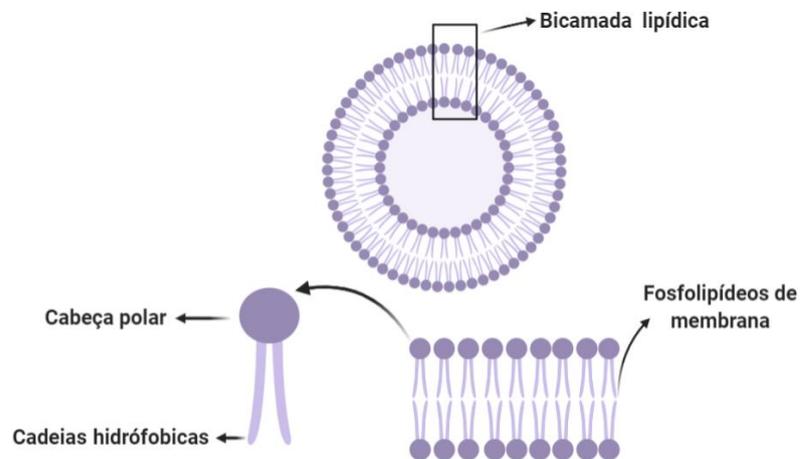
## **2.3 MECANISMOS DE AÇÃO DOS LIPÍDIOS NO CÂNCER**

Os lipídios são estruturas essenciais na formação da membrana, suas funções vão de estruturais a moléculas sinalizadoras e facilitadoras da passagem intra e inter celular, seja de nutrientes ou até mesmo de moléculas farmacológicas (VAN MEER; VOELKER; FEIGENSON, 2009).

As moléculas lipídicas são estruturalmente compostas, diante das suas inúmeras variabilidades por: (carbono, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio e fósforo), sendo os fosfolipídios dipolares formados em sua biossíntese por ácidos graxos, glicerol, ácido fosfórico e um

derivado nitrogenado. Suas estruturas são anfipáticas, sendo uma extremidade hidrofílica podendo ser ela formada por: (colina, serina, etanolamina, mais glicerol e o grupo fosfato, já na extremidade hidrofóbica está localizado a cadeia de ácidos graxos (FAHY et al, 2011).

O ambiente mais favorável para a cabeça hidrofílica é aquoso, enquanto a cauda hidrofóbica é mais estável em um ambiente lipídico; formando naturalmente bicamadas nas quais as cabeças hidrofílicas apontam para fora em direção ao ambiente aquoso e as caudas hidrofóbicas apontam para dentro uma em direção à outra (Figura 2) (WATSON, 2015).



**Figura 2.** Estrutura de um fosfolípido de membrana. Fonte: imagem criada no site: <https://biorender.com/>

Os lipídios sinalizadores são compostos por várias estruturas que facilitam as interações entre ligantes-receptores, e as vias de sinalização são ativadas pelas espécie lipídicas reativas que mediam a sinalização atraindo as proteínas e não sendo elas apenas um sub produto da peroxidação lipídica são também eletrólitos que formam canais covalentes e estáveis com resíduos nucleofílicos nas proteínas, agindo como uma chave redox que coordena o metabolismo celular e suas vias de sinalização (VOLKEL W, 2006).

Composta por receptores químicos de membrana específica a síntese lipídica é formada de forma desordenada tornando algumas organelas dependente do nível do transporte lipídico a depender do nível de colesterol (VAN MEER; VOELKER; FEIGENSON, 2009). O desordenamento químico e composicional de diferentes lipídios, confere uma alteração coletiva na membrana celular, como duas diversidades sendo ela atraindo lipídio-lipídio ou lipídio-proteína (HARAYAMA; RIEZMAN, 2018).

Os fosfolípidos são lipídios de membrana formados por duas cadeias de ácidos graxos ligadas ao glicerol e um ao grupo fosfato, sintetizados por organismos procarióticos e

eucarióticos desempenhando papel fundamental na compartimentalização da bioquímica da vida. A quantidade e a composição dos fosfolipídios são reguladas de forma a permitir que as membranas mantenham suas estruturas e funções, apesar de suas mudanças de desenvolvimento e ambientais. Fosfolipídios contendo glicerol são referidos como glicerofosfolipídios, encontrado na membrana celular é a fosfatidilcolina, que possui uma molécula de colina ligada ao grupo fosfato. A serina e a etanolamina formam lipídios chamados de fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina (BAKY et al, 2014; WATSON, 2015; CASARES; ESCRIBÁ; ROSSELLÓ, 2019).

Os fosfolipídios na membrana são envolvidos em diferentes células normais e células neoplásicas. Alguns fosfolipídios e determinados éster lipídeos, podem auxiliar na terapêutica contra a leucemia, tratando as células da medula óssea antes de transplantá-las; porém o seu mecanismo de citotoxicidade é ainda desconhecido (BERDEL; OKAMOTO, 1990).

Os ésteres de lipídios são importantes promissores agentes anticancerígenos e são os principais coadjuvantes da bicamada fosfolipídica, podendo ser utilizado para o encapsulamento de fármacos durante o seu transporte. A depender das estruturas moleculares presentes na membrana, as condições físicas podem ser desordenadas ou ordenadas por líquidos, a bicamada ordenada por líquidos na presença de um lipídio de cadeia curta é capaz de reduzir a barreira energética da membrana induzindo a formação de canais transitórias é também conhecido como balsas lipídicas (DEAN; LODHI, 2018; VAN HELL et al., 2013).

A fonte principal de lipídios é derivada da ingestão de alimentos para gerar energia, em níveis normais de lipídios o organismo tem as suas propriedades inatas de respiração celular e controle metabólico oxidativo, já em níveis anormais de lipídios estão relacionadas a alterações nas enzimas metabólicas e vias lipídicas que têm como consequências diversas doenças, incluindo distúrbios metabólicos e imunológicos podendo gerar câncer. A transformação e proliferação das células cancerosas demanda um alto consumo de energia e isso resulta em alterações no metabolismo lipídico. (BELORIBI-DJEFAFLIA; VASSEUR; GUILLAUMOND, 2016; LONG et al., 2018; MUNIR et al., 2019).

Como descrito acima, a principal barreira entre a célula e o meio em que essa se encontra, é a membrana plasmática, considerada uma barreira físico-química, formada por uma bicamada lipídica e com domínios enriquecidos por esfingolipídios e colesterol, lipídios esses de cadeia curta, ao quais são considerados facilitadores nas passagens de moléculas através da bicamada

pelo mecanismo de Flip-FLOP, tornando a biodisponibilidade intracelular dessas moléculas mais abundante (SIMONS; SAMPAIO, 2011; HATTORI et al, 2006).

Estudos realizados com a doxorrubicina, um antibiótico de anticracylina com atividade antineoplásica, aplicado em diferentes tipos de tumores líquidos ou sólidos, demonstram alguns efeitos colaterais em decorrência da sua alta solubilidade em meios aquosos; levando em alguns casos ineficiência durante o tratamento. Alterações na molécula da doxorrubicina e sua associação com fosfolipídio de cadeia curta, melhora a sua farmacocinética e aumenta a sua biodisponibilidade, permitindo que sua ação anti câncer seja mais efetiva. Como os resultados apresentados pelo uso da doxorrubicina lipossomal (Doxil®/Caelyx®), demonstrando uma melhor compatibilidade do fármaco com os fosfolipídios na membrana, favorecido pelos poros ricos em lipídios (*rafts*) e conseqüentemente um melhor direcionamento do fármaco, que supera a resistência e a ineficácia do tratamento (LUMMEL et al., 2010; VAN HELL et al., 2013).

Em outro estudo foi avaliado moléculas análogas a lipídios de ácido lipóico, com atuação na regulação do metabolismo celular, além de sua função como coenzima catalítica, atuando nos sensíveis processos regulatórios que constituem alvos terapêuticos para a ação de quimioterápicos pela interferência nos fluxos metabólicos das matrizes mitocondriais (BINGHAM; STUART; ZACHAR, 2014, TAN et al., 2017).

Um impedimento terapêutico por conta da resistência adquirida das células, foi comparado com a Cisplatina® e Clorambucil® uma molécula lipídica de éteres antitumorais glicosiladas demonstrou-se um potencial citotóxico em células de linhagens humanas de mama, próstata e pâncreas com maior efetividade ao se comparar com os quimioterápicos (OGUNSINA et al., 2020).

Os análogos de fosfolipídios bioativos levam a vários tipos de éter lipídicos com a função de fator de ativação de plaquetas (PAF) que facilitam a abordagem terapêutica no uso dos quimioterápicos clássicos, pela incorporação de análoga de lipídio. Testes com esses análogos em linhagens de células de leucemia humana HL60 e K562, e de adenocarcinomas ovarianos BG1 e BG3 mostraram um efeito aditivo, minimizando os efeitos adversos diante da redução dos níveis de plaquetas permitindo que sejam reduzidos os efeitos adversos do sistema hematológico (NOSEDA et al., 1987).

A maioria dos fármacos aplicados na terapêutica do câncer ligam-se a proteínas e regulam as suas atividades, porém alguns atuam através de uma nova abordagem chamada terapia

lipídica de membrana, que avalia a ligação em lipídios, modulando assim os componentes estruturais das membranas (MARTENS et al., 2018), induzindo uma modulação concomitante de localização e atividade da proteína da membrana; essa regulação pode induzir alterações na sinalização celular e na expressão gênica, que poderá ,assim, reverter o estado patológico (CASARES; ESCRIBÁ; ROSSELLÓ, 2019).

Estudos evidenciam que a terapia de lipídios tem potencial para o tratamento de patologias como câncer, doenças cardiovasculares, processos neurodegenerativos, obesidade, distúrbios metabólicos, processos inflamatórios e doenças infecciosas e autoimunes (CASARES; ESCRIBÁ; ROSSELLÓ, 2019; ESCRIBÁ et al., 2008; ZALBA; TEN HAGEN, 2017).

## 2.4 A MOLÉCULA DE ESTUDO: 2-AMINOETANOL-DIHIIDROGENOFOSFATO

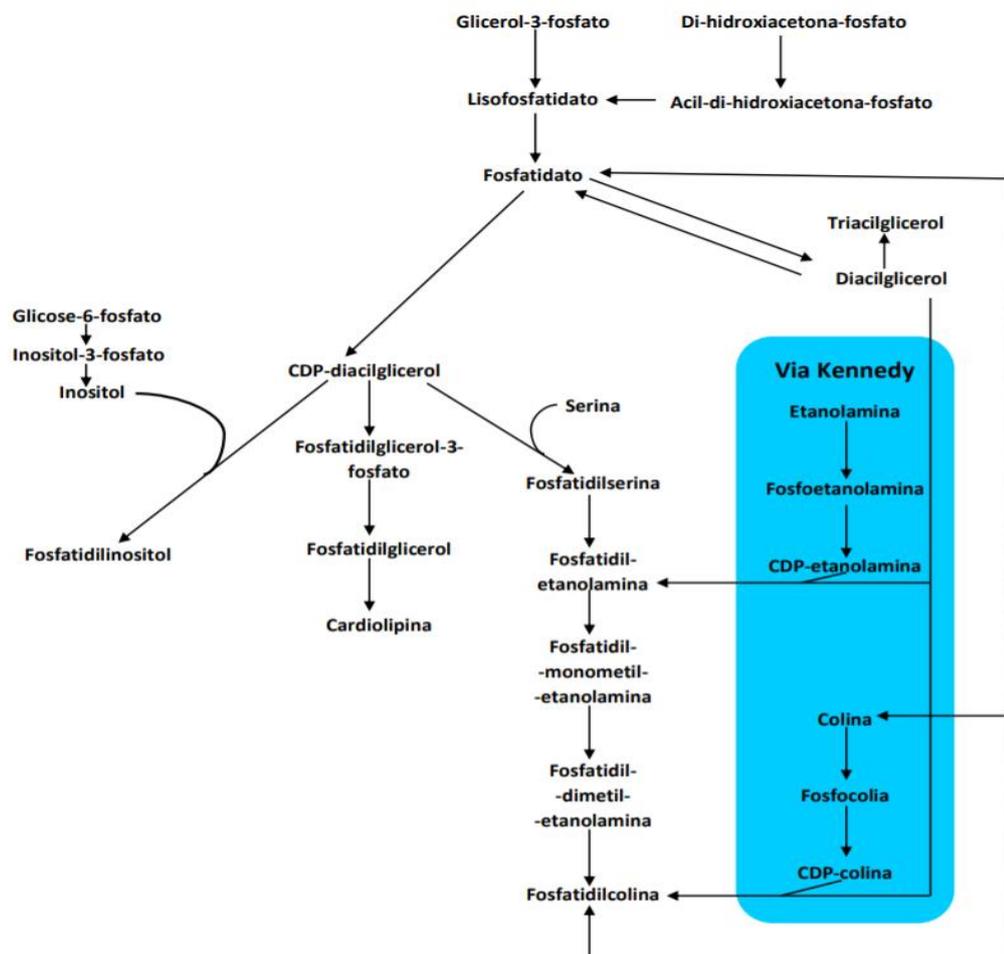
A molécula utilizada neste trabalho poderá ser encontrada na literatura com os seguintes nomes: 2-aminoetanol-dihidrogenofosfato, éster aminoetil fosfórico, ácido 2-aminoetanol-1-fosfórico, 2-aminoetil-fosfato, mono (2-amino) etil-fosfato, fosfoetanolamina, monoaminoetil-fosfato e fosfato de colamina (PubChem). Entretanto, o nome mais reconhecido é 2-aminoetanol-dihidrogeniofosfato (IUPAC) e o mais encontrado na literatura é a fosfoetanolamina com a abreviação de (PEA e Phos) (Figura 3) (RIBEIRO FILHO, 1998).



**Figura 3.** Primeiro cristal monoclinico de 2-aminoetanol-dihidrogenofosfato obtido por recristalização em água. Fonte: Fonte: RIBEIRO FILHO, 1998.

A referida molécula é precursora de síntese de fosfolipídios (HANAHAN et al.,1997) e na década de 90 foi alvo de estudos que visam a compreensão da evolução tumoral e desordens celulares no desenvolvimento neoplásico e doenças neurológicas (LIPPARD, BERG et al.,1994).

A PEA está presente na membrana plasmática e participa da síntese de fosfolipídio no retículo endoplasmático, atuando também em várias etapas do metabolismo celular, tais como o metabolismo mitocondrial, síntese de acetilcolina e síntese hormonal (LEHNINGER et al., 2000). A biossíntese da fosfatidiletanolamina e fosfatidilcolina ocorre pela fosforilação ativando o grupo polar, seguidos por uma condensação gerada pelo diacilglicerol. Em uma via de recuperação análoga chamada de via de Kennedy, durante a sua rota metabólica converte a etanolamina ingerida durante a dieta em fosfatidiletanolamina, na via de Kennedy o diacilglicerol condensa com serina formando fosfatidilserina ativado por etanolamina e colina (Figura 4) (CARMAN; HAN, 2011).

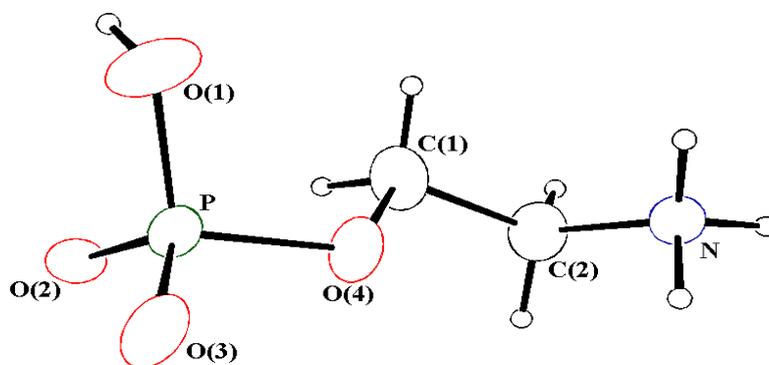


**Figura 4.** Vias de síntese de fosfolipídios. Em destaque a Via Kennedy. Fonte: Adaptada do livro Princípios de bioquímica de Lehninger 6º 2014, pág.; 834.

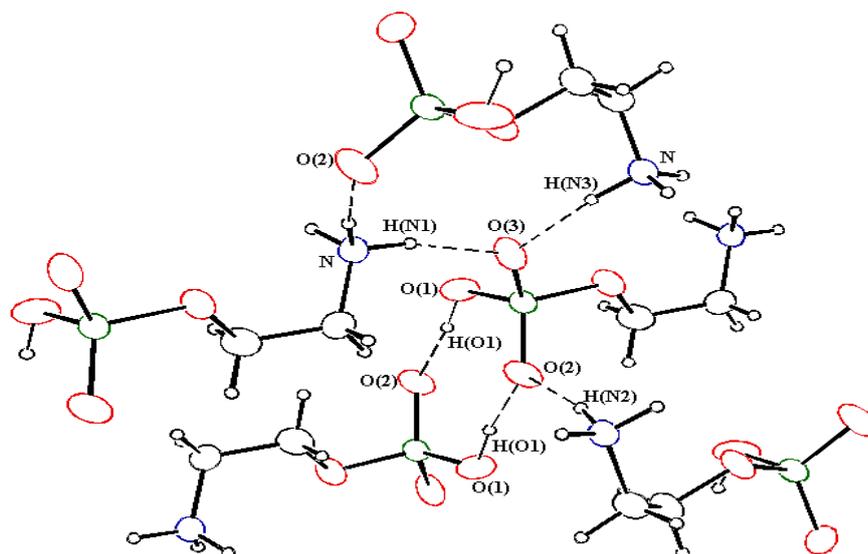
Foi comprovado que a Fosfoetanolamina e a Monoetanolamina (PEA e MEA) estão presentes em cérebro normal em grandes quantidades; as quais são as aminas precursoras da fosfatidiletanolamina (PE) e fosfatidilcolina (PC), considerados fosfolipídios estruturais e dois dos quatro que compõem a membrana celular (PERRY et al.,1971; CORAZZI et al.,1986; AL-

ASF0UR, 2008; CALZADA; ONGUKA; CLAYPOOL, 2016; VAZ et al., 2019). A PEA é o segundo fosfolípido mais abundante nas células, compreendendo 15–25% do total de fosfolípidos nas células de mamíferos. No entanto, a PEA não é simplesmente um constituinte passivo da membrana, mas está funcionalmente associado à biogênese e atividade das proteínas em seus sítios de ligação na membrana, fosforilação oxidativa com expressão de espécie reativa de oxigênio (ROS), autofagia, fusão de membranas, estabilidade mitocondrial (CALZADA; ONGUKA; CLAYPOOL, 2016, PATEL; WITT, 2017).

Ribeiro Filho, em seu estudo, realizou a cristalografia estrutural do cristal de fosfolípido obtido pelo método de difração de Raio X, (RIBEIRO FILHO, 1998). A Figura 5 e 6 apresenta uma estrutura em formato tridimensionais, e o seu envelopamento molecular é formado por um radical de fosfato, onde sua extremidade possui um grupamento amina que evidencia a possibilidade de 50 % da formação de dímeros, trímeros e tetrâmeros sendo ela um zwitterion. A molécula foi identificada e nomeada segundo regras da IUPAC, com o auxílio do programa CS ChemDraw Ultra (RIBEIRO FILHO, 1998; HELLER et al., 2015).

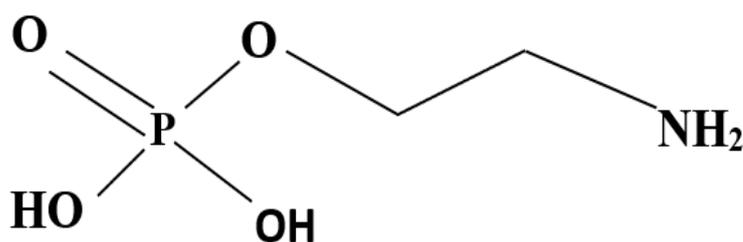


**Figura 5.** Representação vista no software ORTEP com 50% de probabilidade para a forma zwitterion do 2-aminoetanol dihidrogenofosfato. Fonte: RIBEIRO FILHO, 1998.



**Figura 6.** Representação vista no software ORTEP do esquema de ligações de hidrogênio para o cristal de 2-aminoetanol dihidrogenofosfato. Fonte: RIBEIRO FILHO, 1998.

A molécula PEA (Figura 7) é um lipídio semelhante os alquil-fosfolipídios que não apresentam alterações no DNA das células, mas atuam na membrana, interferindo no metabolismo lipídico e em suas vias de sinalização que podem gerar mudanças nos níveis de colesterol e alterações ultra estruturais com excessivas vesículas autofágicas (RÍOS-MARCO et al, 2017). Em estudos com células de leucemia a Phos promoveu a citotoxicidade pela indução da via apoptótica inibindo a progressão dos clones malignos CD34, CD117 e GR1 (FERREIRA et al, 2013a).



**Figura 7.** Fórmula Estrutural do 2-aminoetanol dihidrogenofosfato.

Estudo *in vivo*, com animais portadores do tumor de Ehrlich Ascites tratados com a Phos-s revelou a inibição da progressão tumoral com aumento da sobrevivência dos animais sem danos hepato-tóxico, pela ativação da caspase 3 e cascata apoptótica nas células tumorais (FERREIRA et al, 2012).

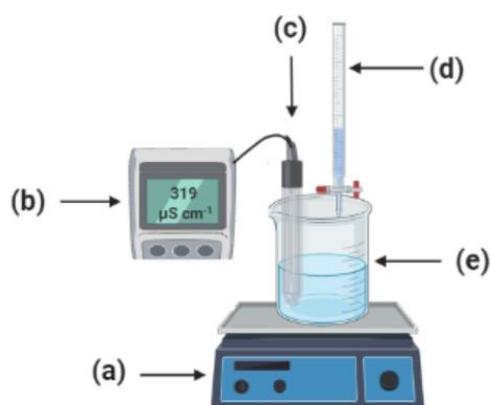
A atuação da Phos-s em células de câncer de mama das linhagens (MCF-7 e MCF-10), apresentou citotoxicidade nas duas linhagens, porém na linhagem MCF-10 as concentrações foram maiores, com destaque para o estudo onde a Phos-s inibiu a via do Bcl-2, induzindo a apoptose pela via mitocondrial e inibição da Ciclina D-1 com estimulação da P-53 (FERREIRA et al, 2013b).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 AVALIAÇÃO DA CONDUTOMETRIA

##### 3.1.1 EQUIPAMENTOS

Na avaliação da condutometria da PEA, utilizou-se o condutivímetro DM 31 (Digimed®) e uma célula de condutividade DMC-010M (Digimed®,  $K = 1,0 \text{ cm}^{-1}$ ) formada por dois discos de platina, a calibração do equipamento foi realizada com solução padrão de condutividade ( $1413 \mu\text{S cm}^{-1}$ ) antes das medidas. A Figura 8 ilustra o sistema utilizado na titulação condutométrica. Todas as medidas de massa foram realizadas em balança analítica Explorer (Ohaus®).



**Figura 8.** Sistema utilizado na titulação condutométrica: a) agitador magnético; b) condutivímetro; c) célula de condutividade; d) bureta; e) béquer

##### 3.1.2 REAGENTES, SOLUÇÕES, AMOSTRA E QUANTIFICAÇÃO

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico e as soluções foram preparadas em água deionizada. A solução estoque da PEA  $\approx 5,00 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  foi preparada dissolvendo-se a massa deste cristal em água deionizada e homogeneizada, sendo, em seguida, padronizada por titulação de precipitação com solução de HCl padronizada com a concentração de 0,01 mol/L.

### 3.1.3 TESTE DE CONDUTOMETRIA

Antes dos testes de condutometria, foi realizada a calibração da célula condutométrica. A bureta de 25,00 mL utilizada na titulação foi previamente calibrada empregando-se o método gravimétrico, que consiste na determinação do volume escoado.

Para a quantificação condutométrica da PEA, foram realizadas triplicatas de cada medida. Para isso diferentes alíquotas com volumes variando de 100 a 2000  $\mu\text{L}$  da solução estoque do 2-aminoetanol-dihidrogeniofosfato - PEA ( $5,00 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ ) foram transferidas para um béquer de 150 mL, em seguida, inserindo a célula condutométrica e titulou-se a solução padrão de HCl com a concentração 0,01 mol/L, com incrementos de 0,50 mL do titulante. Esse procedimento foi repetido para todas as amostras e os valores das condutâncias obtidos experimentalmente foram corrigidos em função do volume de titulante adicionado de acordo com a Equação (3.1).

$$L_{\text{cor}} = L_{\text{exp}} (V_i + V_a / V_i) \quad (3.1)$$

Onde:  $L_{\text{cor}}$  a condutância corrigida;  $L_{\text{exp}}$  condutância experimental;  $V_i$  volume inicial; e  $V_a$  volume adicionado.

Por meio do gráfico de condutância corrigida em função do volume de solução padrão de HCl, determinou-se que o volume do ponto final foi minimamente alterado por conta da maior concentração do ácido forte.

## 3.2 ENSAIOS IN VITRO

### 3.2.1 EQUIPAMENTOS

Os equipamentos utilizados foram estufa de  $\text{CO}_2$  (Thermo Scientific), fluxo unidirecional (VECO), microscópio invertido (Leica), capela química (Oxicamp) e espectrofotômetro SpectraMax M2 (Molecular Devices), centrífuga Mikro 220R (Hettich) e Citômetro BD FACSVerse<sup>TM</sup> (Universal Loader).

### 3.2.2 REAGENTES E SOLUÇÕES UTILIZADAS

Para os ensaios in vitro foram utilizados Meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM-Gibco®), Tripsina-EDTA (0,05%) (Gibco®), soro fetal bovino (Life Technologies<sup>TM</sup>),

Penicilina/Estreptomicina 100 µg/mL (Life Technologies™), Azul de tripan (Sigma-Aldrich®), Tampão fosfato-salino (PBS), solução de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il) 2,5-Difenil Brometo de Tetrazolium (MTT) em PBS (Life Technologies™) e Dimetilsulfóxido (DMSO) (J.T Baker®).

### **3.2.3 MOLÉCULA TESTE**

A molécula teste é um cristal monoclinico chamada de 2-aminoetanol-dihidrogenofosfato, sintetizada na Universidade de São Paulo (Usp-IQSC), cedida pelo Dr Otaviano Ribeiro Mendonça Filho, o fosfolipídio tem o peso molar de 141,063 g/mol de cor branca não amorfo e solúvel em água, identificado com número CAS 1071-23-4 e CID PubChem 1015.

### **3.2.4 LINHAGENS CELULARES**

As linhagens utilizadas no estudo foram células de fibroblastos humanos, MCF-7 (adenocarcinoma, tecido glândula mamária, derivado do sítio metastático: derrame pleural) MDA-MB-231 (adenocarcinoma, tecido glândula mamária, mama, derivado de sítio metastático: derrame pleural) e DU-145 (carcinoma humano, tecido de próstata; derivado de sítio metastático: cérebro). As Células adquiridas foram mantidas nos laboratórios de Nanobiotecnologia e Morfologia e Laboratório de Microscopia Eletrônica da Universidade de Brasília.

### **3.2.5 CULTURA CELULAR**

As células foram cultivadas e mantidas em meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina 100 µg/mL) em estufa umidificada a 37°C com 5% CO<sup>2</sup>. As passagens das células foram realizadas após atingirem 70% a 80% de confluência, assim foram retiradas das garrafas de cultura com auxílio da solução de tripsina e repassadas para uma nova garrafa.

### 3.2.6 CITOTOXICIDADE

A avaliação da citotoxicidade foi realizada pelo método de MTT, descrito por Mossman, 1983, utilizando uma solução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ila) 2,5-difenil tetrazólio em PBS na concentração de 5mg/mL (MOSSMAN, 1983).

A amostra do cristal foi pesada, dissolvida em tampão fosfato salino e diluída em meio de cultura suplementado quando aplicadas na cultura de células.

Para o plaqueamento, utilizaram-se placas de poliestireno com 96 poços (TPP, USA), as células foram retiradas da garrafa de cultura com auxílio da solução de tripsina, e a concentração celular foi determinada pela contagem das células em câmara de Neubauer, utilizando o método de exclusão com azul de tripan. A concentração celular de  $1 \times 10^4$  células/poço foi então aplicada para os ensaios de 24 horas e 48 horas sendo adicionados 100  $\mu$ l de suspensão celular em cada poço. Após esta etapa, as células foram mantidas por 24 horas em estufa úmida a 37 °C com 5% CO<sup>2</sup> para formação da monocamada de células.

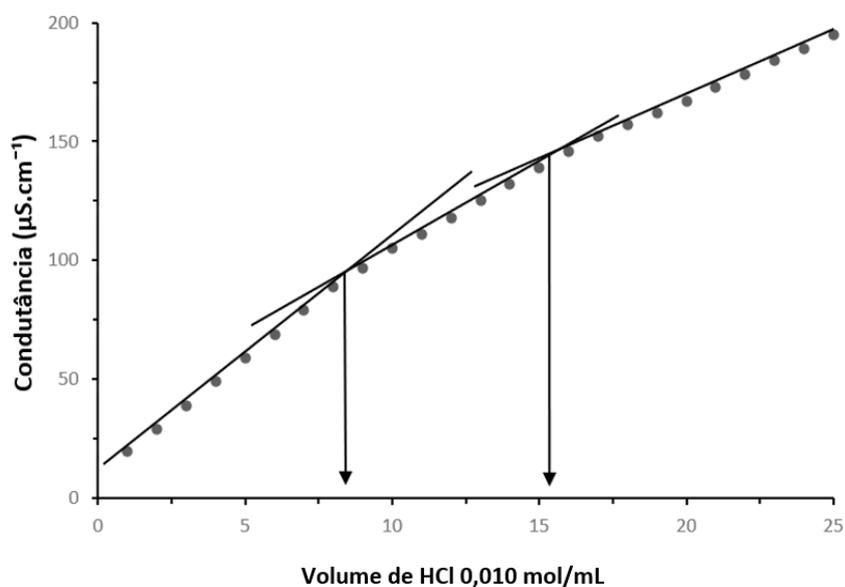
Após 24 horas do plaqueamento, o meio de cada poço foi descartado e adicionado a amostra de PEA em diferentes concentrações nos poços designados como tratados e apenas meio de cultura suplementado nos poços controles. As placas foram recolocadas na estufa de acordo com o tempo de incubação (24 horas e 48 horas). Após esse período, o meio de tratamento foi descartado e 150  $\mu$ l de solução de MTT em meio de cultura (10% de MTT em PBS a 5 mg/ml e 90% DMEM) foi adicionado em cada poço, mantendo a placa na estufa por duas horas para a absorção do MTT. Ao final do tempo de incubação, a solução de MTT foi descartada e adicionou-se 100  $\mu$ l de DMSO em cada poço e em seguida realizada a leitura da densidade óptica em espectrofotômetro, em um comprimento de onda de 595 nm.

A análise de cada concentração da amostra testada, foi realizada em triplicata e a porcentagem das células viáveis foi calculada utilizando as células que receberam apenas meio de cultivo (controle) como 100%. Na análise estatística, o cálculo dos valores do IC<sub>50</sub> (concentração da PEA que causa 50% de inibição da viabilidade celular) e a construção dos gráficos foi feita utilizando o Excel®.

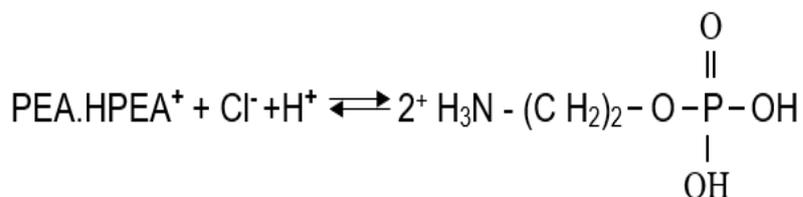
## 4 RESULTADOS

### 4.1 CONDUTOMETRIA

A condutometria (condutância ou condutividade) é uma medição físico-química que avalia a capacidade de uma solução de transportar uma corrente elétrica (LAVORANTE, MJ et al 2017). A Figura 9 apresenta a curva de titulação condutométrica obtida na padronização da solução estoque de 2-aminoetanol-dihidrogeniofosfato, utilizando-se como padrão primário o HCl cem vezes mais concentrado. Observa-se a existência de duas curvas com dois pontos de inflexão, no primeiro ponto é a onde ocorre a formação de um dímero da molécula gerando o PEA e o cátion ( $\text{PEA} + \text{HPEA}^+$ ) (Figura 10) e no segundo ponto de inflexão ocorre uma protonação com íon cloreto com a PEA, gerando uma diminuição da carga eletrolítica da molécula (Figura 11).



**Figura 9.** Titulação condutométrica de 2-aminoetanol-dihidrogeniofosfato  $10^{-4}$  mL (PEA), pela adição de solução de HCl 0,010M em água deionizada. Foram efetuadas titulações condutométricas, variando as concentrações molares entre o titulado (molécula de estudo) e o titulante até ser possível obter o ponto de inflexões. Foram realizados 3 ensaios independentes.



**Figura 10.** A reação apresenta o primeiro ponto de inflexão e formação do dímero catiônico.



**Figura 11.** A reação apresenta o segundo ponto de inflexão formando par iônico do íon do cloreto, com a PEA protonada com cátion.

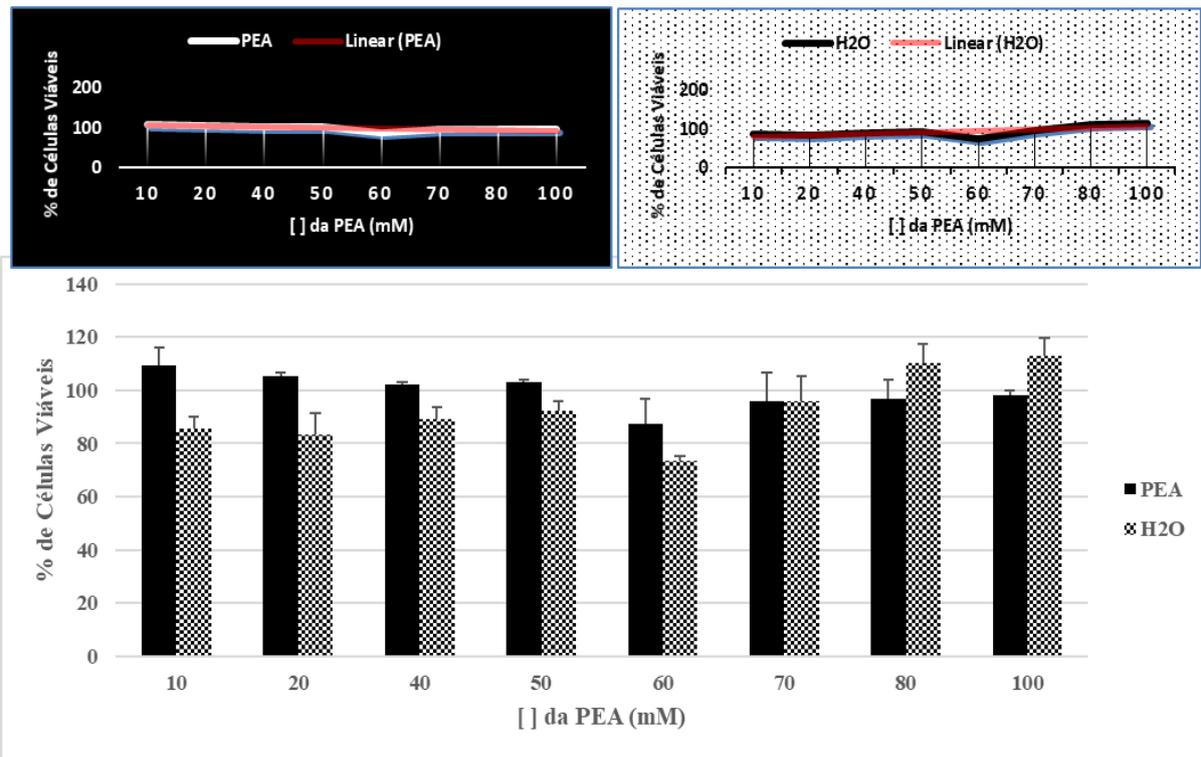
## 4.2 TESTES *IN VITRO*

A diluição da solução estoque de PEA em meio de cultura celular para preparação das soluções testes promoveu uma reação com o corante (vermelho fenol) que determina a estabilidade do meio quanto as variações de pH. Foi observado que apesar dessa mudança de cor o sistema permaneceu em equilíbrio químico, sem alteração do nível de tamponamento, sugerindo a acidificação do meio de nutrição. Esta hipótese foi descartada após a verificação do pH que mostrou a manutenção do pH da solução na faixa de 7,4.

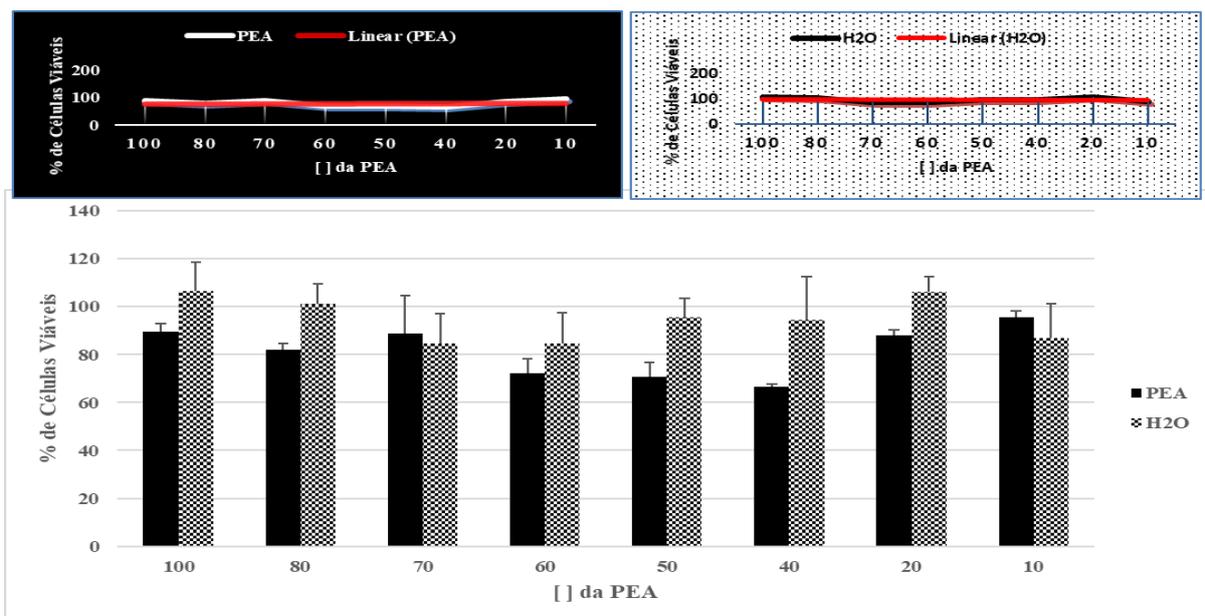
Com o objetivo de avaliarmos a capacidade do diluente da PEA influenciar na citotoxicidade da molécula em solução, ensaios utilizando a PEA dissolvida em água na concentração de 1 Mol L<sup>-1</sup> armazenada a 4 °C, posterior diluição em meio de cultivo suplementado com ajuste do pH no momento da adição as células.

Os resultados apresentados nas Figuras 12, 13, 14, 15, 16, 17 e 18, mostram a capacidade da PEA quando em água e armazenada a 4 °C de promover toxicidade nas diferentes linhagens de células utilizadas. Para tanto, as amostras cristal de PEA foi pesada para uma concentração de trabalho de 1M L<sup>-1</sup> para diluição em água (concentrações de 10 a 100 mM) e ajuste de pH no momento da aplicação na cultura celular para 7,4 com NaOH; como ocorreu diluição do meio de cultivo com o diluente da PEA (água) nas diferentes concentrações testadas, os volumes de água adicionado ao meio foram também avaliados. Assim, podemos observar que em cultura de fibroblastos humano a toxicidade tanto da PEA como do diluente foram

menores que 10%, quando incubados por 24h (Figura 12) e 30% após 48h (Figura 13) na concentração de 60 mM.

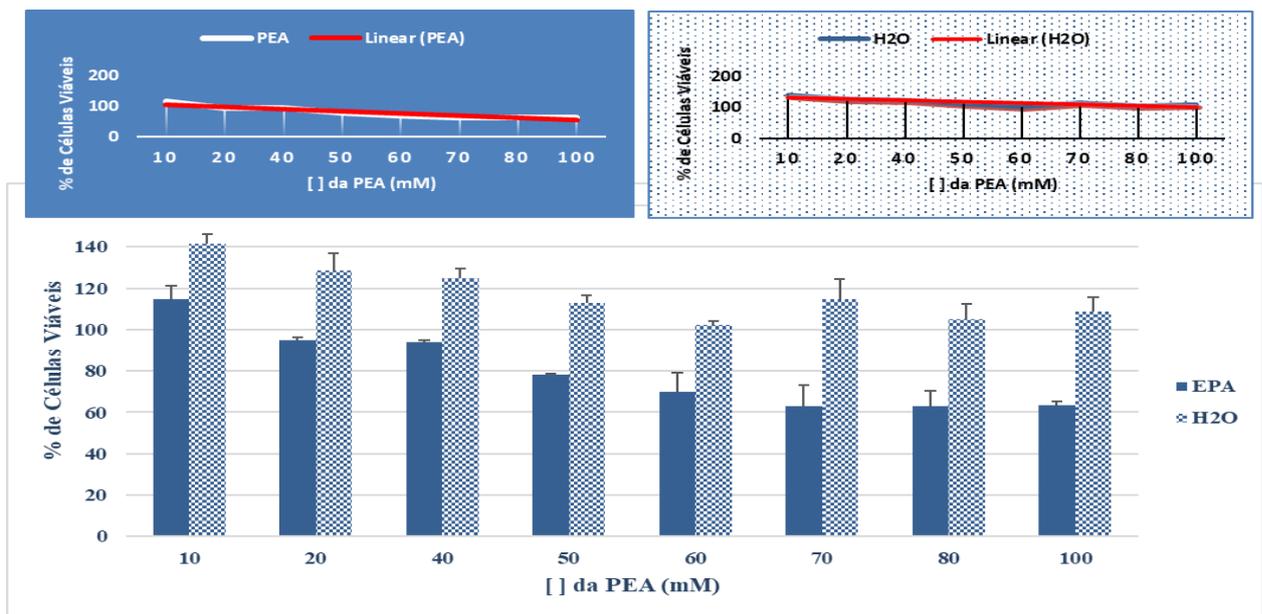


**Figura 12.** Citotoxicidade de diferentes concentrações da PEA em células de Fibroblasto humano, após 24 horas de incubação, pelo ensaio de MTT. Os dados são expressos como média e desvio padrão de 3 experimentos independentes, tendo com 100% de células viáveis as células expostas ao meio de cultivo suplementado.

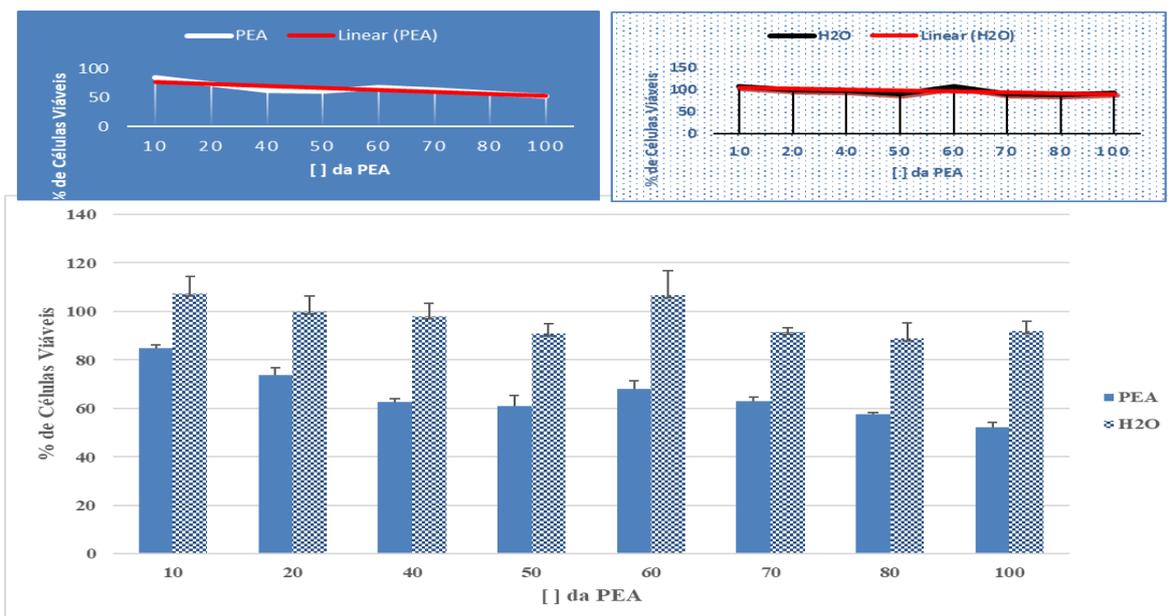


**Figura 13.** Citotoxicidade de diferentes concentrações da PEA (2) em células de Fibroblasto humano após 48 horas de incubação, pelo ensaio de MTT. Os dados são expressos como média e desvio padrão de 3 experimentos independentes, tendo com 100% de células viáveis as células expostas ao meio de cultivo suplementado.

Os resultados obtidos com a exposição da PEA em células tumorais de adenocarcinoma mamário demonstram que o diluente nas concentrações testadas não afeta a viabilidade celular, e em alguns ensaios ativam a proliferação das mesmas (Figuras 14, 15, 16, 17 e 18), apresentando uma viabilidade superior a 100%. Nas figuras 14 e 15, pode-se observar que o efeito citotóxico da PEA nas células MDA-MB-231 após 24 e 48 horas de incubação, respectivamente, com a toxicidade concentração dependente nos dois tempos, tendo um melhor perfil em 24 horas de incubação (Figura 14), com aproximadamente 50% de morte entre as concentrações de 80 a 100 mM.

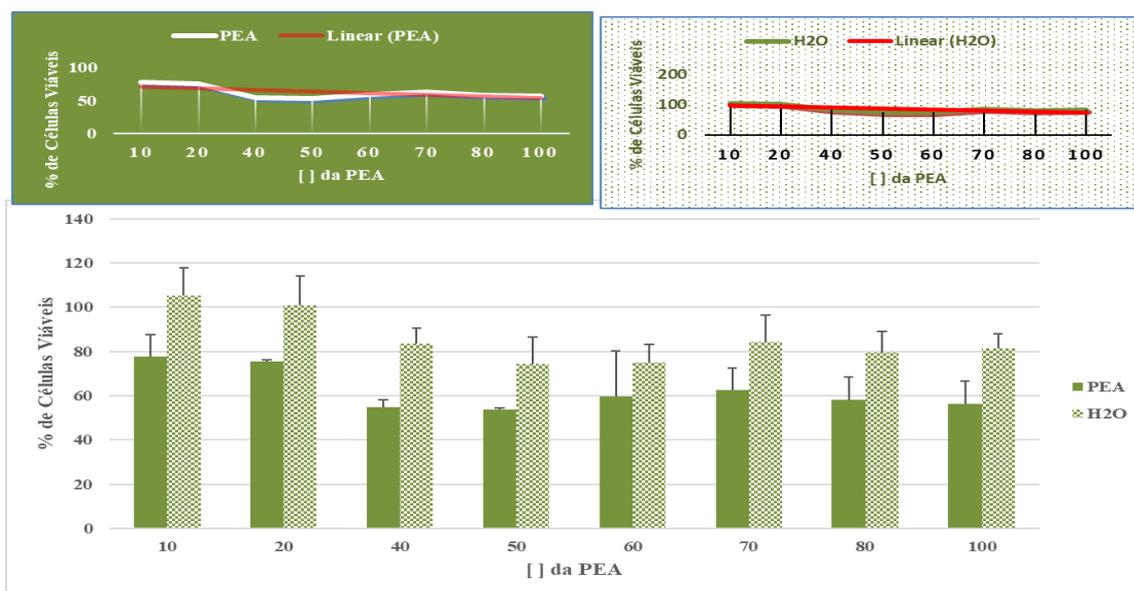


**Figura 14.** Citotoxicidade de diferentes concentrações da PEA (2) em células de MDA-MB-231 após 24 horas de incubação, pelo ensaio de MTT. Os dados são expressos como média e desvio padrão de 3 experimentos independentes, tendo com 100% de células viáveis as células expostas ao meio de cultivo suplementado.



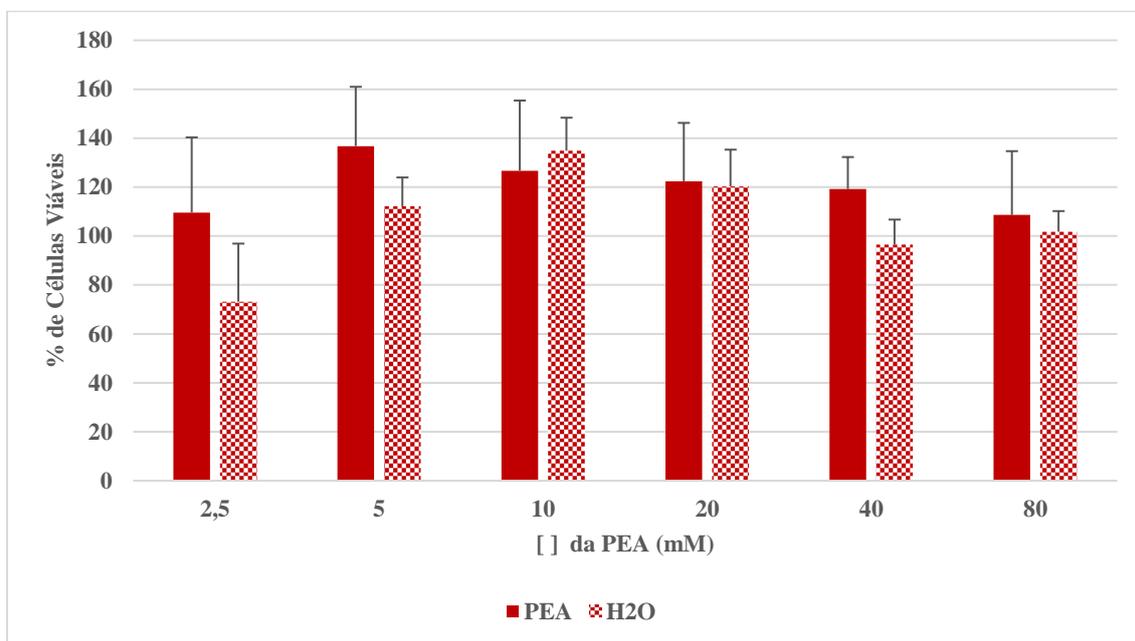
**Figura 15.** Citotoxicidade de diferentes concentrações da PEA (2) em células MDA-MB-231 após 48 horas de incubação, pelo ensaio de MTT. Os dados são expressos como média e desvio padrão de 3 experimentos independentes, tendo com 100% de células viáveis as células expostas ao meio de cultivo suplementado.

No gráfico da figura 15 observa-se que a PEA após 48 horas de incubação, promoveu uma toxicidade constante - média de 60% em concentrações superiores a 40mM. A mesma característica de platô também foi observada na incubação da PEA com cultura de células MCF-7 por 48h (Figura 16).

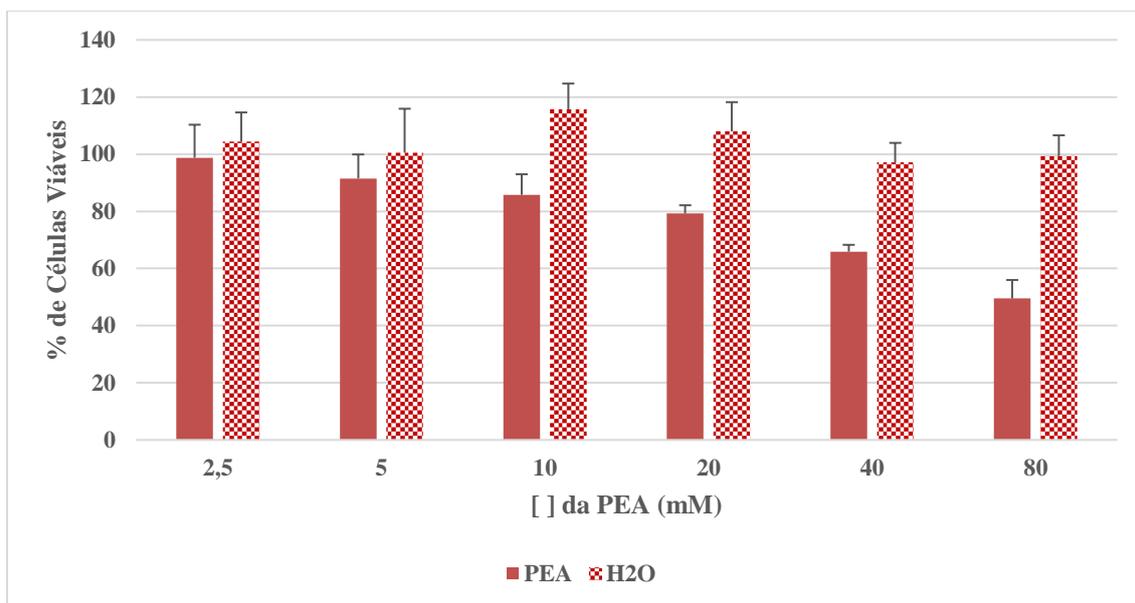


**Figura 16.** Citotoxicidade de diferentes concentrações da PEA (2) em células MCF-7 após 48 horas de incubação, pelo ensaio de MTT. Os dados são expressos como média e desvio padrão de 3 experimentos independentes, tendo com 100% de células viáveis as células expostas ao meio de cultivo suplementado.

Os resultados obtidos quando da exposição da PEA em células DU-145 por 24 horas (Figura 17) demonstram uma variabilidade na citotoxicidade, com inconstância na relação concentração da molécula e % de morte celular. Apesar dessa inconstância podemos observar no referido gráfico uma toxicidade nas concentrações de 2,5 a 80 mM. Em 48 horas de exposição (Figura 18), observa-se que a toxicidade apresentada foi dependente da concentração, sendo 80 mM a concentração com 50% de morte celular.



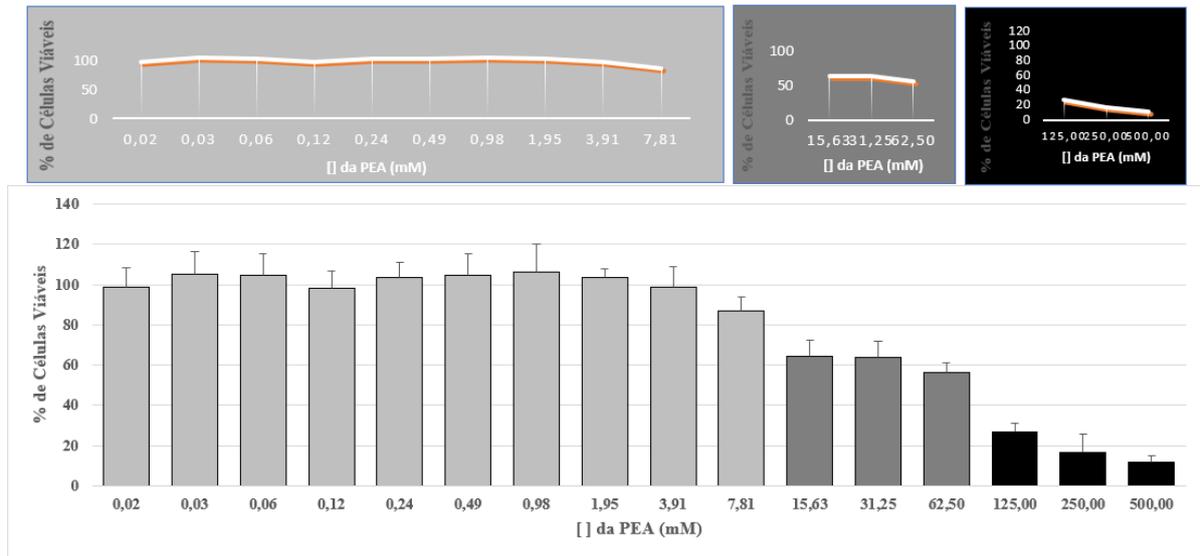
**Figura 17.** Citotoxicidade de diferentes concentrações da PEA em células DU-145 após 24 horas de incubação, pelo ensaio de MTT. Os dados são expressos como média e desvio padrão de 3 experimentos independentes, tendo com 100% de células viáveis as células expostas ao meio de cultivo suplementado.



**Figura 18.** Citotoxicidade de diferentes concentrações da PEA em células DU-145 após 48 horas de incubação, pelo ensaio de MTT. Os dados são expressos como média e desvio padrão de 3 experimentos independentes, tendo com 100% de células viáveis as células expostas ao meio de cultivo suplementado.

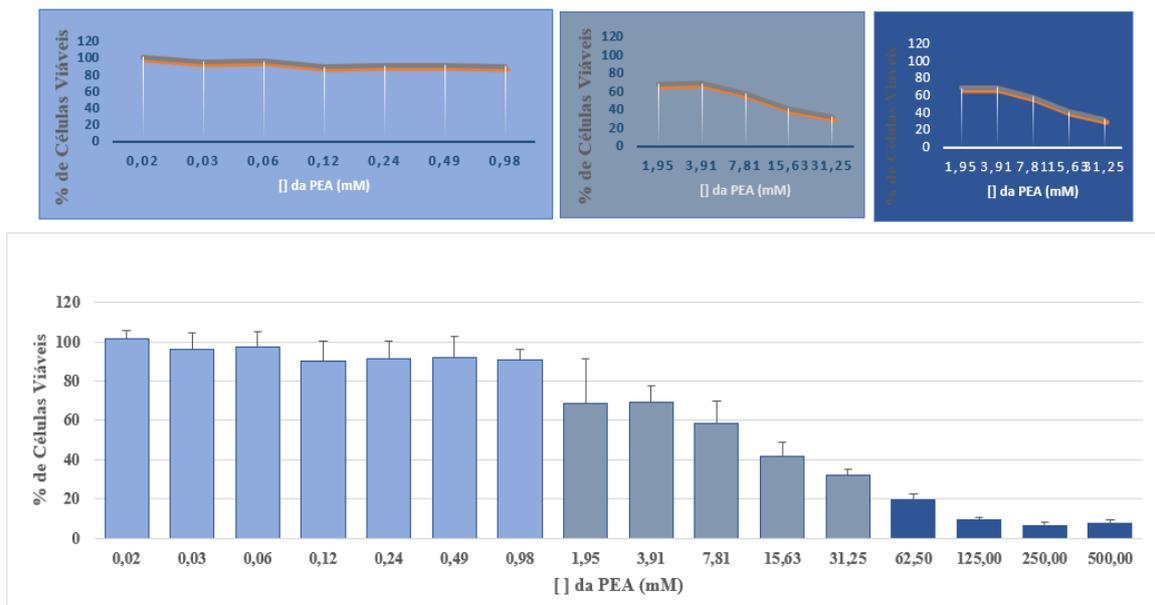
Entretanto, foi observado que ajuste do pH após a diluição com meio de cultura levou a utilização diferentes volumes da solução de NaOH para que a solução mantivesse o pH na região de equilíbrio químico, resultando um acréscimo de 10 % no volume final sugerindo uma influência na citotoxicidade observada. Novos testes foram realizados, utilizando uma solução de PEA em água, tamponada (pH=7,4) e congeladas a -20 °C em volumes de 2mL, quando da realização dos testes, uma alíquota foi descongelada e realizada as diluições com meio de cultura suplementado. Como a presença da água no meio de cultivo não promoveu a morte celular, quando das proporções testadas, tornando assim desnecessário novos experimentos com esse diluente.

O gráfico da figura 19, que mostra a ação da PEA em fibroblastos humanos, após 24 horas de exposição, observa-se que em concentrações inferiores a 7,81 mM, não ocorreu toxicidade. E, a partir da concentração de 15,63 mM, a citotoxicidade observada foi dependente da concentração da PEA aplicada apresentando aproximadamente 50% de viabilidade celular na concentração de 62,50 mM.



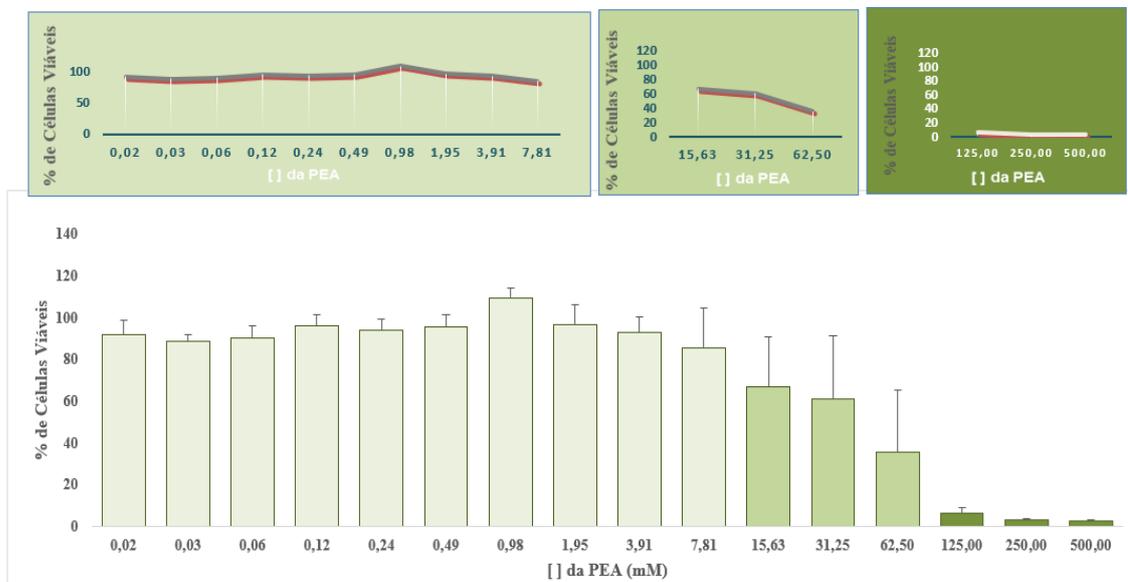
**Figura 19.** Citotoxicidade de diferentes concentrações da PEA em células de Fibroblasto humano após 24 horas de incubação, pelo ensaio de MTT. Os dados são expressos como média e desvio padrão de 3 experimentos independentes, tendo com 100% de células viáveis as células expostas ao meio de cultivo suplementado.

Na figura 20, observa-se o efeito da PEA em células MDA-MB-231 após 24 horas de incubação. A toxicidade ocorreu em concentrações superiores a 1,95 mM, com aproximadamente 50% de viabilidade celular na concentração de 7,81 mM.



**Figura 20.** Citotoxicidade de diferentes concentrações da PEA em células de MDA-MB-231 após 24 horas de incubação, pelo ensaio de MTT. Os dados são expressos como média e desvio padrão de 3 experimentos independentes, tendo com 100% de células viáveis as células expostas ao meio de cultivo suplementado.

Os testes com células MCF-7 (Figura 21) demonstraram uma toxicidade nas concentrações superiores a 15,63 mM após 24h de exposição, com a citotoxicidade dependente da concentração da molécula, e aproximadamente 50% de viabilidade celular na concentração de 31,25 mM.



**Figura 21.** Citotoxicidade de diferentes concentrações da PEA em células de MCF-7 após 24 horas de incubação pelo ensaio de MTT. Os dados são expressos como média e desvio padrão de 3 experimentos independentes, tendo com 100% de células viáveis as células expostas ao meio de cultivo suplementado.

## 5 DISCUSSÕES

A PEA é uma molécula dipolar, tendo ela características hidrofóbicas em sua extremidade onde se localiza o grupo fosfato e por essa particularidade lipofílica sua interação com a membrana e seu papel de sinalização (EMOTO et al, 1997), são características em estudos atuais que demonstram a sua interação permitindo a ligação de proteínas, peptídeos e moléculas farmacológicas com efetiva cascata de lise celular desencadeando a apoptose celular (HASIM et al, 2018).

A eletroquímica é um ramo da físico-química que estuda a relação entre os parâmetros elétricos e as alterações químicas identificáveis, sendo a eletricidade considerada o resultado de uma determinada alteração química, possuindo assim aplicabilidade interdisciplinar na química, biologia, física, eletrônica e outras áreas afins (BUTER et al., 2017; ZHU, X. & SHI, L. 2019).

A movimentação de íons (positivos e negativos) dentro de uma solução está relacionada com a condutância elétrica, como resultado de uma aplicação de um campo eletrostático, fornecendo assim informações sobre o conteúdo iônico total da solução aquosa. Alguns fatores como por exemplo, o número de íons presentes, das suas cargas e da mobilidade dos íons, pode alterar a condutância de uma solução iônica (LAVORANTE, MJ et al 2017).

Alguns exemplos do emprego de titulações condutométricas podem ser encontrados na literatura na como por exemplo na quantificação dos cloridratos de: fluoxetina, metformina, propranolol, tetraciclina e verapamil em formulações farmacêuticas, utilizando-se o nitrato de prata e ácido clorídrico como titulante (SARTORI; SUAREZ; FATIBELLO-FILHO, 2009 CAETANO et al 2011, GOIS, L. C. et al; 2019).

Neste contexto, a quantificação eletrolítica com ácido forte semelhante o cenário da metabolização da molécula do 2-aminoetanol-dihidrogeniofosfato (PEA) por via oral, avaliando os pontos de inflexão de tamponamento do equilíbrio químico da solução estoque (Figuras 9 a 11) indicando a formação de estruturas moleculares intermediária, semelhante ao descrito por RIBEIRO FILHO, 1998.

A síntese de novas moléculas é uma área crescente na química biológica, buscando a aplicação desses com uma reduzida toxicidade aos organismos e assim sua utilização nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética. A determinação da toxicidade é o primeiro

passo no processo de caracterização de uma nova molécula/substância para seu uso em sistemas vivos. Dessa maneira utilizando, linhagens celulares que caracterizam modelos de tecidos não tumorais (Fibroblastos) e tumorais (MDA-MB-231, MCF7 e DU145) pode-se avaliar a citotoxicidade da PEA.

A estrutura cristalina da molécula 2 aminoetanol - dihidrogenofosfato (PEA) facilita a sua solubilidade em meio aquoso. O que proporcionou a preparação de soluções utilizando água ultra pura e posteriores diluições em meio de cultivo celular para aplicação nos estudos *in vitro*. A concentração de 1 mol L<sup>-1</sup> foi a escolhida como solução estoque em água, mantida na geladeira (4 °C) sem ajuste do pH ou em alíquotas com volumes de 1 mL pH ajustado com NaOH para o valor de 7,4 e congeladas a -20 °C.

Os surgimentos dos lipídios antineoplásicos sintéticos (ATLs) se dividem em dois grupos distintos sendo eles os alquilfosfolipídios (APLs), o qual a PEA faz parte, onde a amina da etanolamina se agrega com um álcool graxo formando a fosfoetanolamina e o segundo grupo composto é o alquilfosfocolina (APCs). As duas moléculas são capazes de atuar no aparelho mitótico da célula sem alterar o seu DNA, interferindo no metabolismo lipídico e vias de sinalização como biomarcadores, efetivando as quimioterapias e radioterapias com melhor sensibilidade (KOSTADINOVA et al, 2015).

A estabilidade mitocondrial tem como fator principal a sua atividade inata de gerar energia durante a biossíntese celular, os lipídios mais abundantes encontrados na membrana mitocondrial são as fosfatidilserina e a PEA, isso em condições normais sendo intracelular e extracelular compondo a bicamada da membrana encontramos os esfingolipídios e as acetilcolinas. Entretanto esse papel inverte quando há uma desordem celular formado por neoplasias, pois a fosfatidilserina e a fosfoetanolamina rompem a membrana gerando uma assimetria lipídica e canais de passagens laterais alterando o domínio lipídico de vesículas autofágicas, executando o papel de biomarcadores sinalizando a alteração genética das células. Essa atuação pode também atrair células do sistema imune tais como as células (B e T), memória e sinalização (VAN MEER; VOELKER; FEIGENSON, 2009).

A PEA é encontrada predominantemente no folheto interno da célula voltado para o citoplasma e na composição mitocondrial, além das características de formação das estruturas das membranas, ela participa de diversos processos fisiopatológicos primordiais na biossíntese metabólica e energética das células (CALZADA et al, 2016).

Moléculas como duramicina e a cinamicina, se ligam com alto poder de afinidade com a PE, em uma proporção de 1:1 por uma dissociação de nanomolar, as duas moléculas são lantibióticos com efeitos não apenas bactericidas, mas também apoptóticos (ZHAO, 2011).

Os fatores de resistências às terapias existentes contra os tipos de câncer de mama atuais, levou a indústria farmacêutica, utilizar a lipídios sintéticos glicosilados de forma que melhorasse a farmacodinâmica e o aumento da concentração da biodisponibilidade dos quimioterápicos Cisplatina® e Clorambucil®, que além da eficiência melhorada pelo transporte e biodisponibilidade em seu sítio de ação, observou-se a redução dos efeitos citotóxicos em células normais, permitindo um melhor prognóstico diante da minimização dos efeitos deletérios desse quimioterápicos (OGUNSINA et al., 2020).

A molécula da PEA e suas modificações administradas diretamente em cultura de células pode promover a morte celular, como demonstrado nos resultados obtidos neste trabalho quando aplicados em cultura de células MCF-7, MDA-MB-231 e DU-145, com redução da viabilidade celular em concentrações de 20 mM, corroborando os ensaios realizados por FERREIRA et al 2012a , 2013b que relacionaram a toxicidade da moléculas ao aumento da taxa apoptótica induzido pela via da caspase-3 (FERREIRA et al 2012a, 2013b). Em estudo com tumores de próstata in vivo, a biodisponibilidade da PEA foi efetiva e sem interação medicamentosa sendo ela uma molécula precursora de novos fármacos antineoplásicos, nos padrões aprovados pela agência reguladora de alimentos e drogas americana (FDA) (SAXENA et al, 2017).

## 6 CONCLUSÃO

Nos estudos de condutividade elétrica observou que o fosfolípido tem em suas características a capacidade de formar dímeros durante a titulação de retorno, no primeiro ponto de inflexão a formação do dímero catiônico e no segundo ponto de inflexão a ionização com o íon cloreto.

A molécula (PEA) apresentou a integridade do envelopamento sintético molecular em meio ao pH saturado e caótico, com as semelhanças do suco gástrico sem sofrer hidrólise, com as características de formação de dímeros, trímeros e tetrâmeros.

As células de fibroblastos humano não foram afetadas pela incubação com a PEA nos períodos testados, apresentando apenas 10% de células mortas após 48 horas de exposição a concentração de 100 mM. Nas células de tumores mamários MCF7, a toxicidade foi concentração dependente, sendo que as concentrações entre 30 e 40 mM promoveram a morte de cerca de 50% das células, independentemente do tempo de exposição. A linhagem de células MDA-MB-231, o tempo de exposição a molécula promoveu resultados diferentes em 24 horas o  $IC_{50}$  foi com a concentração de 7,81 mM em 24 horas e em 48 horas 50 mM. O comportamento das células prostáticas em 24 horas de tratamento não apresentou toxicidade e em 48 horas de tratamento o  $IC_{50}$  foi com a concentração de 80 mM.

## 7 PERSPECTIVAS

- Ensaio *in vitro* e *in vivo* da PEA agregada a moléculas quimioterápicas.
- Estudos *in vitro* da PEA comparada com quimioterápico.
- Estudo de toxicidade da PEA em fase líquida e fluorescente em via endovenosa *in vivo*, possivelmente DL<sub>30</sub> ou DL<sub>50</sub> em camundongos.
- Estudos de biodisponibilidade e biodistribuição da PEA fase líquida fluorescente, com exames tomográficos *in vivo*.
- Formulação de lipossomas com a PEA sendo o fosfolípido precursor e agregação de moléculas análogas ao lipossoma constituído.

## LISTA DE REFERÊNCIAS

AL-ASFOUR, SANDRA VASCONCELLOS. Estudo de equilíbrios químicos com 2-aminoetanol-dihidrogenofosfato para fins biológicos. 2008. Tese (Doutorado em Química Analítica) - **Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos**, 2008.

ALMEIDA, V. L. et al. Cancer and cell cycle-specific and cell cycle nonspecific anticancer DNA-interactive agents: an introduction. **Química Nova**, v. 28, n. 1678–7064, p. 118–129, 2005.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer facts & figures 2019. Atlanta: **American Cancer Society**, 2019.

BAKY, H. H. A. EL et al. Phospholipids of some marine microalgae: Identification, antiviral, anticancer and antimicrobial bioactivities. **Der Pharma Chemica**, v. 6, n. 6, p. 9–18, 2014.

BELORIBI-DJEFAFLIA, S.; VASSEUR, S.; GUILLAUMOND, F. Lipid metabolic reprogramming in cancer cells. **Oncogenesis**, v. 5, n. 1, p. e189, 2016.

BERDEL, W. E.; OKAMOTO, S. Ether Lipids in Cancer Chemotherapy. **Keio Journal of Medicine**, v. 39, n. 2, p. 75–78, 1989.

BINGHAM, P. M.; STUART, S. D.; ZACHAR, Z. Lipoic acid and lipoic acid analogs in cancer metabolism and chemotherapy. **Expert Review of Clinical Pharmacology**, v. 7, n. 1751–2433, p. 837–846, 2014.

BUTER L., FRENSEMEIER, L. M., VOGEL, M., & KARST, U. Dual reductive/oxidative electrochemistry/liquid chromatography/mass spectrometry: Towards peptide and protein modification, separation and identification. **Journal of Chromatography A**, 1479, 153–160, 2017.

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, Hoboken, v. 68, n. 6, p. 394-424, Nov. 2018.

CAETANO, F. R. et al. A Fast and Simple Conductometric Method for Verapamil Hydrochloride Determination in Pharmaceutical Formulations. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 7, n. 4, p. 275–279, 2011.

CALZADA, E.; ONGUKA, O.; CLAYPOOL, S. M. Phosphatidylethanolamine Metabolism in Health and Disease. **International Review of Cell and Molecular Biology**, v. 321, p. 29–88, 2016.

CAMPISI, J. Aging, cellular senescence, and cancer. **Annual Review of Physiology**, v. 75, p. 685–705, 2013.

CARMAN, G. M.; HAN, G.-S. Regulation of Phospholipid Synthesis in the Yeast. **Annual Review of Biochemistry**, v. 7, p. 859–883, 2013.

CASARES, D.; ESCRIBÁ, P. V.; ROSSELLÓ, C. A. Membrane lipid composition: Effect on membrane and organelle structure, function and compartmentalization and therapeutic avenues. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 9, 2019.

CASTILLO CABALLERO, A. Calibration and Conformity in the Conductivity Channels of Pharmaceutical Waters Systems: A review. **Global Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 1, 2018.

CORAZZI, L. et al. Ethanolamine Base-Exchange Reaction in Rat Brain Microsomal Subfractions. **Journal of Neurochemistry**, v. 46, n. 1, p. 202–207, 1986.

COSTA, E. S. V. et al. Prevalence and clinical implications of the TP53 p.R337H mutation in Brazilian breast cancer patients: a systematic literature review. **Mastology**, v. 30, n. e20190013 1, p. 1–8, 2020.

CHEN, D. et al. Targeting BMI1+ Cancer Stem Cells Overcomes Chemoresistance and Inhibits Metastases in Squamous Cell Carcinoma. **Cell Stem Cell**, v. 20, n. 5, p. 621- 634.e6, 2017.

DAHLGREN, D. et al. Regional intestinal permeability of three model drugs in human. **Molecular Pharmaceutics**, v. 13, n. 9, p. 3013–3021, 2016.

DEAN, J. M.; LODHI, I. J. Structural and functional roles of ether lipids. **Protein and Cell**, v. 9, n. 2, p. 196–206, 2018.

DUNN, G. P. et al. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. **Nature Immunology**, v. 3, p. 991–998, 2002.

EMOTO, K. et al. Exposure of phosphatidylethanolamine on the surface of apoptotic cells. **Experimental Cell Research**, v. 232, n. 2, p. 430–434, 1997.

ESCRIBÁ, P. V. et al. Membranes: A meeting point for lipids, proteins and therapies: Translational Medicine. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 12, n. 3, p. 829–875, 2008.

FAHY, E. et al. Lipid classification, structures and tools☆. **Biochim Biophys Acta**, v. 11, n. 1811, p. 637–647, 2011.

FARES, J. et al. Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 5, n. 28, p. 1–17, 2020.

FEITELSON, M. A. et al. Sustained proliferation in cancer: Mechanisms and novel therapeutic targets. **Seminars in Cancer Biology**, v. 35, p. S25–S54, 2015.

FERLAY, J. et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. **International Journal of Cancer**, v. 144, n. 8, p. 1941–1953, 2019.

FERREIRA, A. K. et al. Synthetic phosphoethanolamine has in vitro and in vivo anti-leukemia effects. **British Journal of Cancer**, v. 109, n. 11, p. 2819–2828, 2013a.

FERREIRA, A. K. et al. Synthetic phosphoethanolamine induces cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells through the mitochondrial pathway. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 67, n. 6, p. 481–487, 2013b.

FERREIRA, A. K. et al. Anticancer effects of synthetic phosphoethanolamine on Ehrlich ascites tumor: An experimental study. **Anticancer Research**, v. 32, n. 1, p. 95–104, 2012.

FOUAD, Y. A.; AANEI, C. Revisiting the hallmarks of cancer. **American Journal of Cancer Research (AJCR)**, v. 7, n. 5, p. 1016–1036, 2017.

GOIS LC, BORBA WG, SILVA JG. Determinação Condutométrica de Cloridratos em Comprimidos como Proposta de Atividade Experimental. **Rev. Virtual Quim**, 2019.

GUNDEM, G. et al. The evolutionary history of lethal metastatic prostate cancer. **Nature**, v. 520, n. 7547, p. 353–357, 2015.

GLEASON, D. F. Histologic grading of prostate cancer: A perspective. **Human Pathology**, v. 23, n. 3, p. 273–279, 1992.

HADDAD, C. F. Hereditary breast cancer : review and current approach. **Mastology**, v. 30, n. 2594–5394, p. 1–11, 2020.

HAMED, A. R. et al. Targeting multidrug resistance in cancer by natural chemosensitizers. **Bulletin of the National Research Centre**, v. 43, n. 1, 2019.

HANAHAH, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HARAYAMA, T.; RIEZMAN, H. Understanding the diversity of membrane lipid composition. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 19, n. 5, p. 281–296, 2018.

HASIM, S. et al. Elucidating Duramycin’s bacterial selectivity and mode of action on the bacterial cell envelope. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. FEB, p. 1–10, 2018.

HATTORI, C. et al. BACE1 Interacts With Lipid Raft Proteins Chinatsu. **Journal of Neuroscience Research**, v. 84, p. 912–917, 2006.

HELL, A. J. VAN et al. Defined lipid analogues induce transient channels to facilitate drug-membrane traversal and circumvent cancer therapy resistance. **Scientific Reports**, v. 3, n. 1949, p. 1–8, 2013.

HELLER, S. R. et al. InChI, the IUPAC International Chemical Identifier. , v. 7, n. 1, p. 1–34, 2015.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA a SILVA. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil. **Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva**. Rio de Janeiro: INCA, 2019. 120

JIANG, W. G. et al. Tissue invasion and metastasis: Molecular, biological and clinical perspectives. **Seminars in Cancer Biology**, v. 35, p. S244–S275, 2015.

JIMÉNEZ-LÁPEZ, J. M. et al. Alterations in the homeostasis of phospholipids and cholesterol by antitumor alkylphospholipids. **Lipids in Health and Disease**, v. 9, p. 1–10, 2010.

KARANDE, P. Introduction to special issue: Bioengineered Therapeutics. The Next Generation of Drug Development. **Bioengineering & Translational Medicine**, v. 2, n. 1, p. 4–5, 2017.

KOSTADINOVA, A. et al. Antitumor Lipids - Structure, Functions, and Medical Applications. **Advances in Protein Chemistry and Structural Biology**, v. 101, p. 27–66, 2015.

KUNNUMAKKARA, AJAIKUMAR B et al. “Cancer drug development: The missing links.” **Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)** vol. 244, 8, 663-689, 2019.

KROEMER, G et al. “Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009.” **Cell death and differentiation** vol. 16,1 (2009): 3-11.

LABI, V.; ERLACHER, M. How cell death shapes cancer. **Cell Death and Disease**, v. 6, n. 3, p. 1–11, 2015.

LAVORANTE, M.J., FRANCO, J.I. Conductometric titration as a technique to determine variation in conductivity in perfluorosulfonic acid materials for fuel cells and electrolyzers. **Int J Energy Environ Eng** 8, 123–134 (2017).

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M.M. Lehninger principles of biochemistry. 3rd. ed. **New York Publishers**, 2000. 1152p.

LIPPARD, S. J.; BERG, J. M. Principles of bioinorganic chemistry. Mill Valley, CA: **University Science Books**, 1994

LONG, J. et al. Lipid metabolism and carcinogenesis, cancer development. **American journal of cancer research**, v. 8, n. 5, p. 778–791, 2018.

LUMMEL, M. et al. Enriching lipid nanovesicles with short-chain glucosylceramide improves doxorubicin delivery and efficacy in solid tumors. **The FASEB Journal**, v. 25, n. 1, p. 280–289, 2011.

MARTENS, C. et al. Direct protein-lipid interactions shape the conformational landscape of secondary transporters. **Nature Communications**, v. 9, n. 4151, 2018.

- MARTIN, G. S. Cell signaling and cancer. **Cancer Cell**, v. 4, n. 3, p. 167–174, 2003.
- MARTIN, T. A.; JIANG, W. G. Loss of tight junction barrier function and its role in cancer metastasis. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1788, n. 4, p. 872–891, 2009.
- MORI, R. R. et al. Prostate cancer screening among elderly men in Brazil: Should we diagnose or not? **International Braz J Urol**, v. 46, n. 1, p. 34–41, 2020.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.
- MUNIR, R. et al. Lipid metabolism in cancer cells under metabolic stress. **British Journal of Cancer**, v. 120, n. 12, p. 1090–1098, 2019.
- MURRAY, M. et al. Lipoid analogues as potential drugs for the regulation of mitochondrial cell death. *British Journal of Pharmacology*, v. 171, n. 8, p. 2051-2066, 2014.
- NATIONAL CANCER INSTITUTE (NCI). Division of Cancer Treatment and Diagnosis. **National Cancer Institute**.
- NYAME, Y. A.; GORE, J. L. What Goes Up Must Come Down: Identifying Truth from Global Prostate Cancer Epidemiology. **European Urology**, v. 77, n. 1, p. 53–54, 2020.
- NOSEDA, A. et al. Neoplastic cell inhibition with new ether lipid analogs. **Lipids**, v. 22, n. 11, p. 878–883, 1987.
- OGUNSINA, M. et al. Syntheses of L-rhamnose-linked amino glycerolipids and their cytotoxic activities against human cancer cells. **Molecules**, v. 25, n. 3, 2020.
- PATEL, D.; WITT, S. N. Ethanolamine and Phosphatidylethanolamine: Partners in Health and Disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, n. 4829180, p. 18, 2017.
- PERRY, T. L. et al. Regional Distribution of Amino Acids in Human Brain Obtained At Autopsy. **Journal of Neurochemistry**, v. 18, n. 3, p. 513–519, 1971.
- PHI, L. T. H. et al. Cancer stem cells (CSCs) in drug resistance and their therapeutic implications in cancer treatment. **Stem Cells International**, v. 2018, 2018.

RIBEIRO FILHO, O. M. Síntese, caracterização, estudos do equilíbrio e agregação do 2-aminoetal dihidrogenosfato. 117f. Tese (Doutorado) **Instituto de química de são paulo, Universidade de São Carlos**, São Paulo, 1999.

RÍOS-MARCO, P. et al. Alkylphospholipids: An update on molecular mechanisms and clinical relevance. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1859, n. 9, p. 1657–1667, 2017.

SALA-VEGA S, ILIOPOULOS O, MOSSIALOS E. Assessment of overall survival, quality of life, and safety benefits associated with new cancer medicines. **JAMA Oncol**; 3:382–90, 2017.

SARSAIYA, S.; SHI, J.; CHEN, J. Bioengineering tools for the production of pharmaceuticals: current perspective and future outlook. **Bioengineered**, v. 10, n. 1, p. 469–492, 2019.

SARTORI, E. R.; SUAREZ, W. T.; FATIBELLO-FILHO, O. Conductometric determination of metformin hydrochloride in pharmaceutical formulations using silver nitrate as titrant. **Quimica Nova**, v. 32, n. 7, p. 1947–1950, 2009.

SAXENA, R. et al. Preclinical Development of a Nontoxic Oral Formulation of Monoethanolamine, a Lipid Precursor, for Prostate Cancer Treatment. **Clinical Cancer Research : an Official Journal of the American Association for Cancer**, v. 23, n. 14, p. 3781–3793, 2018.

SENTHEBANE, D. A. et al. The role of tumor microenvironment in chemoresistance: To survive, keep your enemies closer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 7, 2017.

SILWANA, B. et al. A brief review on recent developments of electrochemical sensors in environmental application for PGMs. **Journal of Environmental Science and Health - Part A**, v. 51, n. 14, p. 1233–1247, 2016.

SIMONS, K.; SAMPAIO, J. L. Membrane Organization and Lipid Rafts. **Cold Spring Harb Perspect Biol.**, v. 3, n. 10, p. a004697, 2011.

SO, J. Y. et al. Induction of DNMT3B by PGE2 and IL6 at Distant Metastatic Sites Promotes Epigenetic Modification and Breast Cancer Colonization. **Cancer research**, v. 80, n. 12, p. 2612–2627, 2020.

- SOCIETY, A. C. Cancer facts & figures. **American Cancer Society**, v. 8, n. 3, p. 1–76, 2019.
- SWANN, J. B.; SMYTH, M. J. Review series Immune surveillance of tumors. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 5, p. 1137–1146, 2007.
- TAN, L. T. H. et al. Targeting membrane lipid a potential cancer cure? **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, n. 12, p. 1–6, 2017.
- TOMASSETTI, C.; VOGELSTEIN, B. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions. **HHS Public Access**, v. 176, n. 1, p. 78–81, 2015a.
- TOMASSETTI, C.; VOGELSTEIN, B. Stem cell divisions, somatic mutations, cancer etiology, and cancer prevention. *Science*. 2017;355(6331):1330-1334.
- VAN BLITTERSWIJK, W. J.; VERHEIJ, M. Anticancer mechanisms and clinical application of alkylphospholipids. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1831, n. 3, p. 663–674, 2013.
- VAN MEER, G.; VOELKER, D. R.; FEIGENSON, G. W. Membrane lipids: where they are. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 101, n. 1, p. 1–4, 2009.
- VAZ, F. M. et al. Mutations in PCYT2 disrupt etherlipid biosynthesis and cause a complex hereditary spastic paraplegia. **Brain**, v. 142, n. 11, p. 3382–3397, 2019.
- Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. Natural innate and adaptive immunity to cancer. **Annu Rev Immunol**. 29:235-271, 2011.
- VOLKEL W, SICILIA T, PAHLER A, et al. Increased brain levels of 4-hydroxy-2-nonenal glutathione conjugates in severe Alzheimer's disease. **Neurochem Int**. 2006;48(8):679-686.
- WATSON, H. Biological membranes. Essays in **Biochemistry**, v. 59, p. 43–70, 2015.
- WHITE, M. C. et al. Age and cancer risk: A potentially modifiable relationship. **American Journal of Preventive Medicine**, v. 46, p. S7–S15, 2014.
- WHO. Latest global cancer data: Cancer burden rises to 18.1 million new cases and 9.6 million cancer deaths in 2018. **World Health Organization**; 2018.

YADAV, A. K.; DESAI, N. S. Cancer Stem Cells: Acquisition, Characteristics, Therapeutic Implications, Targeting Strategies and Future Prospects. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 15, n. 3, p. 331–355, 2019.

ZALBA, S.; TEN HAGEN, T. L. M. Cell membrane modulation as adjuvant in cancer therapy. **Cancer Treatment Reviews**, v. 52, p. 48–57, 2017.

ZHAO M. Lantibiotics as probes for phosphatidylethanolamine. **Amino Acids**. 2011 Nov;41(5):1071-9.