



**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
MESTRADO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E SAÚDE**

**CLÁUDIA RACHID COSTA**

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANGIOGÊNICA/ANTIANGIOGÊNICA,  
MUTAGÊNICA/ANTIMUTAGÊNICA DA FOSFOETANOLAMINA**

**GOIÂNIA – GO**

**2018**



MESTRADO EM CIÊNCIAS  
AMBIENTAIS E SAÚDE

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS**  
**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**  
**MESTRADO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E SAÚDE**

**CLÁUDIA RACHID COSTA**

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANGIOGÊNICA/ANTIANGIOGÊNICA,  
MUTAGÊNICA/ANTIMUTAGÊNICA DA FOSFOETANOLAMINA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação *stricto sensu*, Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde, da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais e Saúde.

Orientador: Prof.º Dr.º Paulo Roberto de Melo Reis

**GOIÂNIA – GO**

**2018**

C837a Costa, Claudia Rachid  
Avaliação das atividades angiogênica/antiangiogênica,  
mutagênica/antimutagênica da fosfoetanolamina [manuscrito] /  
Cláudia Rachid Costa. -- 2018.  
49 f.: il.; 30 cm

Texto em português com resumo em inglês  
Dissertação (mestrado) - Pontifícia Universidade Católica de Goiás,  
Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Ambientais e  
Saúde, Goiânia, 2018

Inclui referências f.31-37

1.Mutagenicidade. 2.Cancer - Tratamento 3. I. Reis, Paulo  
Roberto de Melo. II.Pontifícia Universidade Católica de Goiás. III.  
Título.

CDU: 606:616-056.7:602.8:616-006.6(043)



DISSERTAÇÃO DO MESTRADO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E SAÚDE  
DEFENDIDA EM 05 DE MARÇO DE 2018 E CONSIDERADA  
APROVADA PELA BANCA EXAMINADORA:

1)

Prof. Dr. Paulo Roberto de Melo Reis / PUC Goiás (Presidente)

2)

Profa. Dra. Lee Chen Chen (UFG – Membro Externo)

3)

Prof. Dr. Nelson Jorge da Silva Jr. (PUC Goiás – Membro)

4)

Prof. Dr. Rogério José de Almeida (PUC Goiás – Suplente)

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família e aos meus avós. Ao meu esposo André Colussi, que nunca mediu esforços para realizar os meus sonhos, e concretizar os meus objetivos. As minhas filhas, Manuela, Marina e Maitê Rachid Colussi, que são o motivo que me fazem querer sempre buscar o melhor. Aos meus avós Salem Abdel Jaber Rachid e Marina Soares Araújo (*in memoriam*), que sempre foram meus exemplos de ser humano, sempre me mostraram que os estudos era o melhor caminho a se seguir.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que me deu forças para chegar até aqui.

Ao meu orientador e eterno professor Paulo Roberto de Melo Reis, que me apresentou à pesquisa lá na Iniciação Científica, e que sempre me ajudou e me orientou, neste trabalho, e na vida, pelo seu grande exemplo.

Ao meu esposo André, que sempre foi meu maior incentivador, sempre sonhou os meus sonhos; as minhas filhas Manuela, Marina e Maitê, que muitas vezes não me tiveram por perto.

À minha mãe Erlála Maria Rachid, que sempre foi meu braço direito, sempre me socorrendo em todos os momentos de dificuldade.

Às minhas tias, Nília, Fátima e Sálua, e a minha prima Nagi Hanna, que viveram intensamente este momento comigo, sempre preocupadas, me ajudando e apoiando para que nada saísse errado.

Às minhas amigas Maria Alice e Ana Paula, que apoiaram em todas as horas, e que tanto me ajudaram em todas as etapas deste trabalho.

À Faculdade Serra da Mesa – FASeM, pelo apoio financeiro, e por sempre me conceder a possibilidade de me ausentar nos momentos de estudo e realização dos experimentos.

À Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de Goiás pela concessão da bolsa de estudos.

A todos que colaboraram diretamente e indiretamente à minha formação, e a todos que colaboraram com a realização deste estudo.

*Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível,  
em breve estarás fazendo o impossível.”*

*São Francisco de Assis.*

## RESUMO

As neoplasias malignas são um problema de saúde pública mundial, sendo a maior causa de mortalidade prematura do planeta. No Brasil, em 2012, mais de 200 mil pessoas foram a óbito, e estima-se que num prazo de 20 anos, haverá aumento de cerca de 70% de novos casos. Por isso, desde muito tempo, as terapias alternativas constituem uma forma de promover o "milagre" para a cura do câncer. Contudo, o empirismo milagroso não tem base científica e nem documentação suficiente para comprovar a eficácia e qualidade destas substâncias utilizadas neste autotratamento. Assim sendo, a fosfoetanolamina, uma substância experimental causou uma grande repercussão internacional e expos o Brasil a uma situação embaraçosa. Uma lei governamental, impôs a utilização da fosfoetanolamina sintética para o tratamento do câncer, sem bases científicas para a confirmação dos efeitos e eficácia do tratamento anticâncer, por meio de estudos laboratoriais experimentais e ensaios clínicos. Assim o objetivo deste trabalho, foi avaliar as atividades angiogênica/antiangiogênica, mutagênica/antimutagênica desta substância. O teste de angiogênese foi realizado através do modelo experimental em membrana corioalantóide (MCA) de ovo de galinha. Enquanto os testes de mutagenicidade e antimutagenicidade, foram realizados pelo Teste de Micronúcleo em medula óssea de camundongo. Os resultados foram significativos em todos os testes realizados.

**Palavras-chave:** Angiogênese. Fosfoetanolamina sintética. Membrana Corioalantóide. Micronúcleo. Mutagenicidade

## ABSTRACT

The malignant neoplasms are a public health problem worldwide, being the biggest cause of premature mortality of the planet. In Brazil, in 2012, more than 200 thousand people died, and it is estimated that within 20 years, there will be an increase of approximately 70% of new cases. Therefore, since a long time, the alternative therapies constitute a way of promoting "miracle" for the cure of cancer. However, the miraculous empiricism has no scientific basis and not enough documentation to prove the efficacy and quality these substances used in this self-treatment. Thus, the fosfoetanolamina, an experimental substance caused a great international repercussion and expos Brazil to an embarrassing situation. A governmental law, imposed the use of synthetic fosfoetanolamina for cancer treatment, without scientific bases for the confirmation of the effects and efficacy of anticancer treatment, by means of experimental laboratory studies and clinical trials. Thus the objective of this work was to evaluate the angiogenic activity/Antiangiogenic, mutagênica/antimutagênica this substance. The test of angiogenesis was performed using an experimental model (MCA) corioalantóide membrane of chicken egg. While the tests for mutagenicity and antimutagenicity, were performed by a micronucleus test in mouse bone marrow. The results were significant in all tests performed.

**Keywords:** Angiogenesis. Fosfoetanolamina synthetic. Chorioallantoic Membrane. Micronucleus Test.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
CAM	Chorioallantoic Membrane
DNA	Deoxyribonucleic acid
DOXO	Doxorrubicina
EPC	Eritrócito policromático
ENC	Eritrócito normocromático
EPCMN	Eritrócitos Policromáticos Micronucleados
MCA	Membrana Corioalantóide
NaCl	Cloreto de Sódio
OMS	Organização Mundial da Saúde
VEGF	Fator de Crescimento do Endotélio Vascular
®	Marca Registrada

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Médias e desvios padrões obtidos na mensuração do comprimento, calibre, números de junções e complexos dos vasos sanguíneos.....21
- Tabela 2.** Frequência de EPCMN após 24 horas do tratamento com solução aquosa de Fosfoetanolamina em diferentes concentrações e controles para avaliação de mutagenicidade .....26
- Tabela 3.** Frequência de EPCMN após 24 horas de tratamento simultâneo de diferentes concentrações da Fosfoetanolamina com doxorubicina para avaliação de antimutagenicidade.....27

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fórmula estrutural plana da Fosfoetanolamina (AL-ASFOUR, 2008).....6
- Figura 2.** Vias de síntese dos principais fosfolipídeos e triacilglicerídeos em eucariotos (NELSON, DAVID L. COX, 2014).....7
- Figura 3.** Esquema do processo de vasculogênese e angiogênese (RISAU, 1997).10
- Figura 4.** Etapas do processo de angiogênese: 1. Por estímulo tumoral ou tecido lesionado, fatores angiogênicos são liberados. 2. Difundem-se por tecidos proximais, onde se ligam a receptores específicos. 3. As células endoteliais (CE) são ativadas. 4. Produção de enzimas que degradam a membrana basal de vasos sanguíneos preexistentes. 5. As CE se proliferam e iniciam a formação de brotos em direção ao tecido de estímulo; 6. Moléculas especializadas na adesão (integrinas) servem como gancho na migração dos brotamentos. 7. Enzimas adicionais (metaloproteinases da matriz) auxiliam na remodelação desses brotos. 8. Brotos se fecham para formação dos tubos. 9. Formação de loops dos vasos sanguíneos. 10. Vasos recém-formados são estabilizados por células musculares especializadas lisas, os pericitos, que fornecem suporte estrutural para o fluxo sanguíneos (GOMES, 2012). ..... 12
- Figura 5.** Gráfico Box Plot dos valores do comprimento, calibre, número de junções e número de complexos das MCAs obtidas após tratamento com a solução aquosa de fosfoetanolamina e controles. ....24
- Figura 6.** Imagens representativas da rede vascular formada na região Membrana corioalantóide (MCA) após tratamento com a solução aquosa de fosfoetanolamina. As imagens de MCA no software Angioquant. ....25

## SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT .....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	ix
LISTA DE TABELAS .....	x
LISTA DE FIGURAS .....	xi
1 INTRODUÇÃO .....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	4
2.1 O Câncer.....	4
2.2 Fosfoetanolamina.....	5
3 OBJETIVOS .....	15
3.1 Objetivo Geral .....	15
3.2 Objetivos específicos .....	15
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
4.1 Fosfoetanolamina.....	16
4.2 Teste da Angiogênese em membrana corioalantóide .....	16
4.2.1 Ovos embrionados de galinha .....	16
4.2.2 Substâncias utilizadas .....	16
4.2.3 Procedimento experimental .....	17
4.2.4 Análise estatística .....	17
4.3 Avaliação da atividade mutagênica/antimutagênica da fosfoetanolamina pelo Teste do Micronúcleo em medula óssea de camundongos .....	18
4.3.1 Substâncias utilizadas .....	18
4.3.2 Animais utilizados no experimento.....	18
4.3.3 Aprovação em Comitê de Ética .....	19
4.3.4 Procedimento Experimental.....	19
4.3.5 Análise citogenética .....	20
5 RESULTADOS .....	21
5.1 Avaliação da atividade angiogênica/antiangiogênica da fosfoetanolamina sintética em MCA .....	21
5.2 Avaliação da atividade mutagênica e antimutagênica da fosfoetanolamina sintética .....	25

6 DISCUSSÃO .....	28
6.1 Avaliação da atividade angiogênica/antiangiogênica .....	28
6.2 Avaliação da atividade mutagênica e antimutagênica .....	29
7 CONCLUSÃO.....	30
8 REFERÊNCIAS.....	31

## 1 INTRODUÇÃO

As neoplasias malignas são um problema de saúde pública mundial, sendo a maior causa de mortalidade prematura do planeta. No Brasil, em 2012, mais de 200 mil pessoas foram a óbito, e estima-se que num prazo de 20 anos, haverá aumento de cerca de 70% de casos novos (OLIVEIRA; SILVEIRA, 2016). Para o indivíduo acometido por este infortúnio, conforme preceito constitucional, na Lei 12.732/12, o Sistema Único de Saúde (SUS) oferece atendimento e tratamento para a maioria dos casos. Entretanto, devido à complexidade da doença, os protocolos de tratamentos medicamentosos podem não ter a resposta esperada e desejada (RÊGO et al., 2017)

Assim, as terapias alternativas constituem numa forma de promover o "milagre" para a cura do câncer. Contudo, o empirismo milagroso não tem base científica e nem documentação suficiente para comprovar a eficácia e qualidade do tratamento. Atualmente, o arsenal medicamentoso utilizado em oncologia clínica vem a partir da demonstração do efeito obtidos nas pesquisas clínicas. Portanto, o uso de protocolos de tratamentos não comprovados cientificamente, é uma característica contemporânea em oncologia. Entretanto, estudos demonstram que a maioria dos pacientes usou algum tipo de terapia alternativa. Essa prática é ariscada, pois pode interferir e dificultar os efeitos comprovados de uma substância usada no tratamento anticâncer (PONDÉ; DE AZAMBUJA; ADES, 2016).

De fato, MELO-REIS et al. (2010) demonstraram, que algumas substâncias de conhecimento popular, realmente possuem algum tipo de atividade terapêutica. Em seu experimento detectou-se, que o látex da espécie vegetal *Synadenium umbellatum* atenuava a ação da mitomicina C, um quimioterápico de efeito consagrado na prática oncológica.

Assim sendo, a fosfoetanolamina, uma substância ainda em fase experimental, causou uma grande repercussão internacional e expos o Brasil a uma situação embaraçosa e os pacientes a danos desconhecidos. Por uma lei governamental, a fosfoetanolamina foi imposta para o tratamento do câncer, sem bases científicas para a confirmação dos efeitos e eficácia do tratamento anticâncer, por meio de estudos laboratoriais experimentais e ensaios clínicos (OLIVEIRA; SILVEIRA, 2016; PONDÉ; DE AZAMBUJA; ADES, 2016).

A fosfoetanolamina sintética (*synthetic phosphoethanolamine-Pho-s*), conhecida popularmente como “pílula do câncer”, este composto vem sendo utilizado de forma indiscriminadas por populares, com a promessa de tratamento e cura das neoplasias malignas no Brasil, sem as devidas e necessárias confirmações de seus efeitos terapêuticos. A premissa sugerida é que a Pho-s promoveria a apoptose das células causadora do tumor maligno, interferindo diretamente no crescimento e no desenvolvimento da neoplasia. A fosfoetanolamina é um precursor da biossíntese de fosfolípidos da membrana celular, importante para impedir o desenvolvimento do tumor. Uma característica importante é que esta classe não tem como alvo o ácido desoxirribonucleico (DNA) (FERREIRA et al., 2012a).

Os grandes avanços ocorridos na área da biologia molecular têm possibilitado uma melhor compreensão dos mecanismos de carcinogênese. Dentre estes, destaca-se a angiogênese como o processo através do qual as células tumorais estimulam a formação dos novos vasos sanguíneos necessários para o fornecimento dos nutrientes essenciais para seu crescimento acelerado (PINHO, 2005).

Angiogênese é a formação de novos vasos sanguíneos por um processo de germinação de brotos endoteliais a partir de vasos capilares preexistentes (HANAHAN; FOLKMAN, 1996; RISAU, 1995). A angiogênese está presente em vários processos fisiológicos como a menstruação, cicatrização de feridas, no coração e outros. Está presente também nos processos patológicos como artropatias crônicas, inflamação crônica, psoríase, retinopatia diabética, degeneração macular, angiofibroma, hemangioma, glaucoma vascular, crescimento tumoral, disseminação metastática e desenvolvimento de placa de ateroma (SAFATLE et al., 2002; VILE, 1995).

A angiogênese tem seus mecanismos controlados por fatores ativadores (angiogênicos) e inibidores (antiangiogênicos), que se desenvolve quando acontece algum estímulo que induz a alguma mudança das células endoteliais de um estado de quiescência, para um estado de replicação e migração, formando capilares (MARAGOUDAKIS, 1998; SAFATLE et al., 2002). Os fatores angiogênicos atuam seletivamente alterando as características das células estruturais do endotélio vascular, entretanto não são afetadas as funções de outros tipos de células (DEVITA VT, LAWRENCE TS, 2011; DONATO, 2003; MELO-REIS et al., 2010)As substâncias

antimutagênicas podem ser classificadas ou divididas em desmutagênicos, substâncias com papel de proteção ao inativar as substâncias mutagênicas antes de atuarem sobre o DNA e as substâncias bio-antimutagênicas com capacidade de inibir a mutação por interferirem sobre os processos metabólicos de reparação inerentes a célula (KADA; MORITA; INOUE, 1978).

O objetivo do presente estudo, foi avaliar as atividades angiogênica/antiangiogênica, mutagênica/antimutagênica da fosfoetanolamina sintética

Para avaliação da atividade angiogênica/antiangiogênica, utilizou-se o modelo experimental, o teste em membrana corioalantóide (MCA) de ovo embrionado de galinha. Enquanto, para os testes de mutagenicidade e antimutagenicidade, foi utilizado de Teste de Micronúcleo em medula óssea de camundongos. Os resultados foram significativos em todos os testes realizados.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 O Câncer

A Organização Mundial de Saúde (OMS), estima que 8,8 milhões de pessoas por ano morrem de câncer, a cada seis mortes no mundo, uma tem o câncer como responsável. Em 2030, 21 milhões de pessoas desenvolverão câncer, do mesmo que, atualmente 14 milhões de pessoas desenvolvem por ano esta doença, ou seja, em 2030 serão quase o dobro de pessoas doentes, assim demonstrando, o quanto é inquestionável, o grande problema de saúde pública que o câncer se tornou (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2017)

Apesar de ser conhecida como o flagelo da modernidade, relatos sobre o câncer são antigos, a 3.000 a.C., indianos, persas e egípcios já falavam sobre a malignidade de tumores. No entanto, somente no século IV a.C. na escola grega hipocrática as características destes tumores foram melhor definidas. O câncer foi definido pelos hipocráticos, como um desequilíbrio no organismo, desencadeado pelos fluidos ali compostos, relatavam que eram tumores duros, que apesar de serem retirados, reapareciam, ou se espalhavam por distintas partes do corpo. Esta percepção foi mantida pela medicina ocidental até o século do XVII, principalmente após a descoberta do sistema linfático no século XV, reforçando a ideia de desequilíbrio de fluidos. O câncer só passou a ser notado como uma doença que se iniciava a caráter local a partir do século XVIII, assim passou-se a perceber a necessidade de se desenvolver técnicas, como anatomia patológica, e maiores estudos sobre as células (TEIXEIRA; FONSECA, 2007).

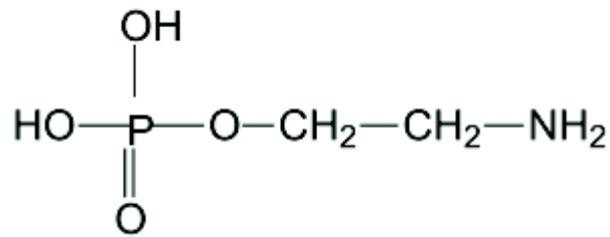
Atualmente, câncer é a denominação dada a um grupo de doenças malignas, que tem como característica principal o crescimento celular desordenado, no qual órgãos e tecidos são tomados por células que se proliferam de maneira rápida, agressiva e incontrollável, desencadeando o aparecimento de tumores malignos. O tipo de câncer é definido de acordo com o tipo de célula que está em divisão e hiperproliferação desordenada, em um foco local, ou podendo se disseminar para outros locais do corpo, mecanismo conhecido por metástase (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER - INCA, 2017).

O câncer é desencadeado por mutações, que podem ter como causas, agentes genéticos e ambientais, ou até mesmo, por substâncias tóxicas produzidas pelas próprias células, como os radicais livres. Estas mutações podem ser herdadas por células filhas, através de genes tumorais, denominados oncogenes, genes responsáveis pela transformação de células normais em células malignas, causando uma desorganização hiperproliferativa, desencadeada por defeitos no mecanismo que regulam a proliferação celular, estas células passam a ter alta capacidade de proliferação e invasão de órgãos e tecidos, adquirindo vantagens metabólicas e capacidades biológicas diferentes em relação as células normais (BELIZÁRIO, 2002). Propõe-se que estas células sofrem importantes alterações em sua fisiologia, dentre elas, 6 alterações são fundamentais para que ocorra o desenvolvimento tumoral, são elas: autossuficiência em sua sinalização de crescimento, insensibilidade aos sinais inibitórios de crescimento, evasão da morte celular programada (apoptose), potencial de replicação ilimitado, angiogênese, invasão e metástase (HANAHAN; WEINBERG, 2000).

## 2.2 Fosfoetanolamina

A Fosfoetanolamina (FOS) foi descrita pela primeira vez na literatura em 1936 como éster fosfórico amino-etílico, isolada na sua forma orgânica de tumores malignos de bovinos, e simultaneamente foi produzida sua forma sintética para comparação e confirmação da substância encontrada nos tumores (OUTHOUSE, 1936).

É um fosfomonoéster (figura 1), também conhecida como 2-amino-dihidrogenofosfato, fosforiletanolamina, éster aminoetil fosfórico, ácido 2-aminoetanol-1-fosfórico, 2-aminoetil-fosfato, 2-aminoetanol-fosfato, mono (2 amino) etil-fosfato, monoaminoetil-fosfato e fosfato de colamina. Possui características de substâncias anfóteras, pois apresenta um grupo amino e um grupo fosfato, ou seja, comporta-se tanto como ácido, ou como base, recebendo ou doando prótons dependendo da substância reagente. É composta por átomos de hidrogênio ionizáveis, ésteres que em presença de uma solução aquosa, atuam em forma de ânions, e amina que atua como *zwitterion*, ou seja, um íon dipolar (AL-ASFOUR, 2008).

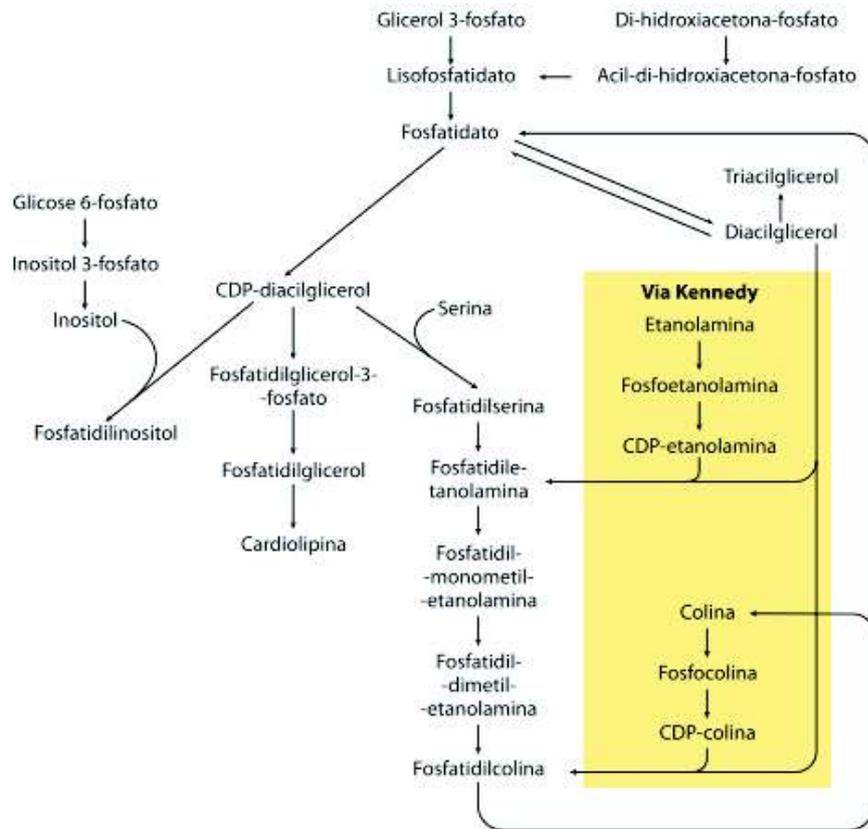


**Figura 1.** Fórmula estrutural plana da Fosfoetanolamina (AL-ASFOUR, 2008).

Suas moléculas estão presentes na membrana plasmática da célula animal, podendo ser encontrada em todos tecidos e órgãos; atua na síntese de dois, dos quatro fosfolipídeos que compõem a membrana celular, mais precisamente como precursor central na biossíntese da fosfatidilcolina (PC), sintetizada na membrana mitocondrial, e da fosfatidiletanolamina (PE), sintetizada no retículo endoplasmático, principais responsáveis pela manutenção do potencial transmembrana (ALMEIDA, 2007). São aminofosfolipídeos abundantes em membranas de células eucariotas, distribuídos assimetricamente entre a camada interna e externa da bicamada lipídica, responsáveis por algumas funções durante o metabolismo celular, como na participação da sinalização de vias lipídicas, pela estimulação direta de receptores de membrana ou pela geração de segundos mensageiros. Evidências demonstraram que PE tem influência no processo de citocinese, atuando como um regulador do movimento dinâmico das proteínas do citoesqueleto e desempenhando um papel fundamental na mediação durante a fusão da membrana e na desmontagem do anel contrátil, concedendo uma divisão celular bem sucedida (EMOTO et al., 1996).

A Fosfatidiletanolamina (PE) compreende aproximadamente 25% dos fosfolipídeos totais, é encontrada em maior quantidade no cérebro, compondo aproximadamente 45% do total de fosfolipídeos. Em mamíferos a Fosfatidiletanolamina (PE), atua como principal regulador na homeostase do colesterol, é responsável por regular a função e morfologia mitocondrial, e desempenha um importante papel no processo de autofagia. Sabe-se que em células de mamíferos, PE pode ser sintetizada por quatro vias diferentes (figura 2), sendo a mais importante, a via de CDP-etanolamina (via Kennedy), onde sua síntese acontece no retículo endoplasmático, a via de descarboxilação da Fosfatidilserina (OS), também é de grande importância, e sua síntese acontece no interior da membrana mitocondrial. O mecanismo de escolha da via para produção destes fosfolipídeos

ainda não é claro, pois em estudo realizado em camundongos, observou-se PE de diferentes vias, em diferentes células. (VANCE; TASSEVA, 2013).



**Figura 2.** Vias de síntese dos principais fosfolípidos e triacilglicerídeos em eucariotos (NELSON, DAVID L. COX, 2014).

Despertou-se grande interesse científico, em desenvolver estudos que elucidassem o comportamento bioquímico destes compostos fosforilados, por serem substâncias presentes em tecidos orgânicos, tornou-se o foco de várias pesquisas desde então (FOLSCH; OSTERBERG, 1959)

Evidências demonstram que a organização de diferentes fosfolípidos na bicamada da membrana celular não é ao acaso, podendo ser um fator importante na sinalização e na estrutura celular. Sabendo disso, na década de 60, pesquisadores passaram a ir em busca de novas moléculas imunomoduladoras derivadas de fosfolípidos, identificando a Lisofosfatidilcolina (LisoFC), como o primeiro análogo metabolicamente estável, entretanto, devido à instabilidade metabólica e rápida metabolização dos fosfolípidos, surgiu-se a necessidade de modificações estruturais

na LisoFC, para que se obtivesse estruturas análogas metabolicamente resistentes às enzimas responsáveis pelo metabolismo destes fosfolídeos, assim aumentando a sua capacidade imunomoduladora. A partir daí, os éteres provenientes da LisoFC, passaram a fazer parte de uma próspera classe de drogas consideradas citostáticas, surgindo então os análogos dos alquilfosfolídeos antitumorais (AFTs) (FERREIRA, 2013).

A progressão tumoral desencadeia muitas mudanças metabólicas para que possa acontecer o desenvolvimento do câncer. Foram encontrados em tumores de mama, níveis bastante aumentados em comparação ao tecido normal, dois derivados de alquilfosfolídeos, a fosfatidilcolina (PC) e a fosfatidiletanolamina (PE), demonstrando que estes níveis aumentam de acordo com a progressão do câncer (MORSE et al., 2011). Ainda não se sabe o mecanismo pelo qual as células tumorais conseguem modificar o metabolismo lipídico, porém o metabolismo destas células neoplásicas tem sido alvo de incansáveis estudos, para que haja desenvolvimento de novas drogas que as combatam, sem que haja danos as células saudáveis do organismo (VAN DER LUIT et al., 2007).

Pesquisas para o desenvolvimento de terapias anticâncer vem sendo realizadas desde a década de 40, porém, nos dias de hoje, a grande dificuldade na terapêutica de alguns tipos de câncer, ainda é um grande obstáculo, a necessidade de novas drogas mais eficientes e menos dispendiosas vem surgindo diante desta dificuldade. Os fosfolídeos antineoplásicos (APs), que fazem parte do grupo dos alquilisofosfolídeos sintéticos (ALPs), atualmente são o foco de estudo para a formulação de novos fármacos com promissora atividade anticancerígena. Estas drogas não possuem o DNA como o alvo de seu mecanismo de ação, e sim, a bicamada lipídica da membrana celular, devido a sua alta afinidade por ela, interferem no metabolismo de lipídios, alterando a transdução da sinalização celular, assim induzindo a apoptose, sem destruição das células normais (MENEGUELO, 2007).

Recentes estudos demonstraram que a fosfoetanolamina sintética pode exercer alguns efeitos anticâncer em distintas linhagens de células tumorais sólidas, destacou-se, que em células de melanoma a FOS apresentou atividade antiproliferativa e pró-apoptótica, e em modelos *in vivo* de carcinoma de ascite de Ehrlich, e também em melanoma, apresentou atividade antitumoral, inibindo o crescimento tumoral, e aumentando o tempo de vida dos animais, sem causar

toxicidade hepática e/ou hematológica (FERREIRA et al., 2013). Porém estes mecanismos antitumorais ainda são desconhecidos, mas não deixam de trazer grandes esperanças para o tratamento de neoplasias malignas que já se tornaram resistentes a tratamentos convencionais, principalmente por apresentarem alta atividade citotóxica a diferentes tumores (FERREIRA et al., 2012b).

Foi observado camundongos com tumores de melanoma, tratados com Fosfoetanolamina sintética, a redução significativa de metástases internas e neoangiogênese. A partir de então, despertou-se a necessidade de se investigar efeitos antitumorais desta, que é a precursora central na biossíntese destes fosfolipídeos, a Fosfoetanolamina (FOS ou PEA, derivada do inglês, Phosphoethanolamine), que exerce variadas funções no metabolismo celular; lipídio que participa na transferência de fosfoproteínas, atua como substrato para fosfolipídeos de membranas celulares, e tem apresentando intensa atividade citotóxica em uma grande variedade de células tumorais (FERREIRA et al., 2012a).

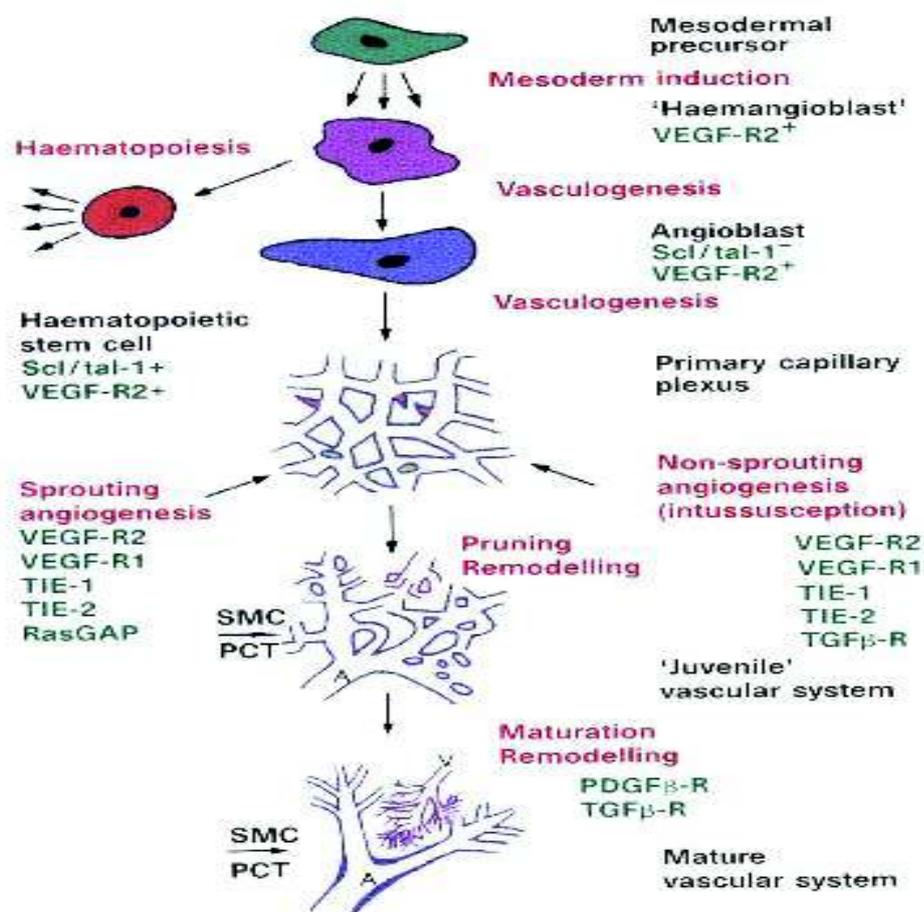
As terapias alternativas constituem uma forma de promover o "milagre" para a cura do câncer. Contudo, o empirismo milagroso não tem base científica e nem documentação suficiente para comprovar a eficácia do tratamento. O uso de tratamentos não comprovados cientificamente, não é uma característica contemporânea em oncologia. Estudos demonstram que a maioria dos pacientes usou algum tipo de terapia alternativa e sem sucesso. Essa prática é ariscada, pois pode interferir e dificultar os efeitos de uma substância usada no tratamento anticâncer (PONDÉ; DE AZAMBUJA; ADES, 2016).

Surgiu então, necessidade de se estudar esta substância que ficou conhecida popularmente como a "pílula do câncer", composto este, que vem sendo utilizada no Brasil para o tratamento de neoplasias malignas, sem as devidas e necessárias comprovações científicas de sua real atividade terapêutica (FERREIRA et al., 2012b).

### **2.3 Angiogênese**

Os vasos sanguíneos são estruturas provenientes de células endoteliais, que se comunicam formando conexões responsáveis por manter a direção do fluxo

sanguíneo, nutrindo tecidos e órgãos. Existem dois processos pelo qual acontece a formação de novos vasos sanguíneos. Um deles, é a angiogênese, que a partir da vasculatura pré-existente, se obtém a formação de novas redes de vasos sanguíneos, podendo acontecer de duas maneiras, através de brotamento de novos vasos, ou por não brotamento, por invaginação do vaso (*intussusception*), assim como demonstrado abaixo (figura 3) (GEHLING et al., 2000; HANAHAN; FOLKMAN, 1996; RISAU, 1995, 1997). Os mecanismos da angiogênese são regulados através de citocinas produzidas por diferentes tipos celulares, dentre elas, células tumorais, células estromais e células inflamatórias (LUDOVINI et al., 2003). São de fatores de crescimento, ou seja, fatores estimuladores ou inibidores, sendo estes, os fatores angiogênicos (fatores positivos), e fatores anti-angiogênicos (fatores negativos) (PEPPER, 1997).



**Figura 3.** Esquema do processo de vasculogênese e angiogênese (RISAU, 1997).

Em adultos o processo de formação de novos vasos acontece apenas através da angiogênese, logo, está envolvida em vários mecanismos fisiológicos no organismo, atua durante a menstruação, ovulação, nidadação, implantação e gestação. Exceto durante o ciclo reprodutivo feminino, a angiogênese é fundamentalmente mediada por fatores patológicos, como na cicatrização de feridas, e durante o crescimento tumoral. Em processos normais, em resposta a estímulos específicos, mediados por integrinas, mais especificamente a integrina  $\alpha\beta_3$ , são glicoproteínas responsáveis pela adesão celular, regulação da angiogênese e da homeostasia vascular, ativam a vasculatura em repouso, desencadeando o desenvolvimento de novos vasos, processo este, inexoravelmente regulado e restrito às células afetadas, por tempo determinado, limitado ao tempo de reparação (HANAHAN; FOLKMAN, 1996; HORTA et al., 2007).

A angiogênese é um dos mecanismos indispensáveis para o crescimento tumoral. Estudos demonstraram que a ativação da angiogênese acontece durante estágios pré-neoplásicos iniciais, ocorrendo antes do aparecimento do tumor (HANAHAN; FOLKMAN, 1996). A angiogênese possui relação direta no processo de desenvolvimento, invasão e metástase de um câncer, nutrindo e fornecendo condições favoráveis para a disseminação de células neoplásicas. Ao contrário do mecanismo fisiológico na formação de novos vasos, a angiogênese tumoral perde a capacidade de regulação e autolimitação, ocorrendo uma multiplicação vascular descontrolada e contínua. As células neoplásicas adquirem a capacidade de induzir a angiogênese, a partir da expressão local de fatores pró-angiogênicos. Dentre estes, o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) exerce um papel fundamental na ativação da atividade angiogênica, sendo responsável por estimular o início deste processo. A superexpressão de VEGF tem sido observada em muitos tipos de câncer, sendo associado a progressão e proliferação de vários tumores malignos. (CAPP et al., 2009; JIN et al., 2005).

Como já mencionado, o processo de angiogênese acontece devido a interação de vários mecanismos, envolvendo células, fatores solúveis e componentes da matriz extracelular (figura 4) (LIEKENS; CLERCQ; NEYTS, 2001). Existem centenas de fatores responsáveis pela indução da angiogênese, dentre eles, um grupo de moléculas que desempenham importantes funções neste processo (GOMES, 2012).



**Figura 4.** Etapas do processo de angiogênese: 1. Por estímulo tumoral ou tecido lesionado, fatores angiogênicos são liberados. 2. Difundem-se por tecidos proximais, onde se ligam a receptores específicos. 3. As células endoteliais (CE) são ativadas. 4. Produção de enzimas que degradam a membrana basal de vasos sanguíneos preexistentes. 5. As CE se proliferam e iniciam a formação de brotos em direção ao tecido de estímulo; 6. Moléculas especializadas na adesão (integrinas) servem como gancho na migração dos brotamentos. 7. Enzimas adicionais (metaloproteinases da matriz) auxiliam na remodelação desses brotos. 8. Brotos se fecham para formação dos tubos. 9. Formação de loops dos vasos sanguíneos. 10. Vasos recém-formados são estabilizados por células musculares especializadas lisas, os pericitos, que fornecem suporte estrutural para o fluxo sanguíneos (GOMES, 2012).

As integrinas, em específico, a integrina  $\alpha_v\beta_3$  exerce um importante papel na angiogênese, ela faz parte da família das integrinas  $\beta_3$ , proveniente de receptores  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (CD41/CD61), encontrado em plaquetas e megacariócitos, mais grandemente distribuído, o  $\alpha_v\beta_3$  (CD51/CD61). Pode ser encontrada na maioria das células originadas do mesênquima, demonstra grande afinidade por diferentes proteínas adesivas, dentre elas, a vitronectina, fibronectina, fibrinogênio, laminina, colágeno e fator de von Willebrand, colágeno tipo I e osteopondina, sendo responsáveis pela ligação das proteínas da matriz extracelular. A expressão da integrina  $\alpha_v\beta_3$  tem sido observada com frequência em diferentes células tumorais. Com propósito de utilizar as integrinas como alvo terapêutico, evidências tem demonstrado que a inibição da

integrina  $\alpha\beta_3$ , anula com eficácia a angiogênese impedindo o desenvolvimento tumoral, constatando que antagonistas de integrinas inibem a angiogênese desencadeada por fatores de crescimento e tumores (ELICEIRI; CHERESH, 2001).

Sabe-se então que a angiogênese é um processo fundamental na formação de tumores malignos, e que substâncias provenientes de células tumorais são responsáveis por estimular seu desencadeamento (NORRBY, 2006). Deste modo, percebeu-se que a angiogênese é um importante ponto na terapia antitumoral, estimulando pesquisas no desenvolvimento de elementos anti-angiogênicos, fatores inibidores da angiogênese (PAPETTI et al., 2002).

## **2.4 Mutagenicidade e Antimutagenicidade**

O ser humano está em constante exposição a agentes potencialmente mutagênicos, substâncias que podem ser responsáveis por induzir alterações celulares, causando danos ao metabolismo celular (FAGUNDES, 2013).

Mutações são alterações sofridas pelas células, como consequência, a transformação de seu material genético (DNA), causada pela frequente exposição a agentes ambientais (físicos, químicos ou biológicos). Estas alterações podem ser nocivas à células, uma vez que, podem causar danos a processos vitais no metabolismo celular, tais como a duplicação do DNA e a transcrição gênica, e até mesmo aberrações cromossômicas, fenômenos estes, que podem desencadear processos cancerosos e morte celular (COSTA; MENK, 2003). Tais alterações podem ocorrer de forma espontânea, em consequência de processos normais das células, ou podem ocorrer pela indução de fatores físicos, químicos, biológicos, ou pelo estresse oxidativo (OLINSKI et al., 2002).

Pode ser caracterizada como mutação, uma alteração estável ou herdada na sequência de nucleotídeos no material genético de uma célula, causando mudanças cromossômicas ou gênicas. Assim um composto é considerado mutagênico, quando exerce a capacidade de aumentar a taxa de mutação, além da julgada como mutação espontânea de um organismo (SILVA, 2014).

Antimutagenicidade é um mecanismo normal entre seres vivos, que tem como função, a capacidade de manutenção da transmissão de informações genéticas. Este evento se manifesta na diminuição da repetição de injúrias genéticas, produzido por um sistema eficiente de substâncias endógenas antimutagênicas, ativadas a níveis celulares e moleculares (GONCHAROVA, 1993).

São descritos como antimutagênicos, agentes que possuem a capacidade de reduzir a frequência de mutações, sejam elas, espontâneas ou induzidas. As substâncias antimutagênicas podem ser classificadas ou divididas em desmutagênicos, substâncias com papel de proteção ao inativar as substâncias mutagênicas antes de atuarem sobre o DNA e as substâncias bio-antimutagênicas com capacidade de inibir a mutação por interferirem sobre os processos metabólicos de reparação inerentes a célula (KADA; MORITA; INOUE, 1978).

O início e progressão do câncer, frequentemente tem como uma das principais causas frequentes, as mutações, devidos a danos causados ao DNA por agentes mutagênicos (AJITH; SOJA, 2006). Logo, o estudo de substâncias com propriedades terapêuticas, que apresentam em suas propriedades, possíveis atividades antimutagênicas, é de suma importância, uma vez que, nos dias de hoje um dos principais fatores que contribuem para a longevidade, é prevenir e controlar o aparecimento de tumores (RHEE; PARK, 2001)

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar a fosfoetanolamina sintética em relação as suas possíveis atividades angiogênica/antiangiogênica, mutagênica/antimutagênica, genotóxica/ antigenotóxica e citotóxica.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Avaliar a possível atividade angiogênica/antiangiogênica da fosfoetanolamina mediante realização de testes laboratoriais “in vivo”, utilizando como modelo experimental a membrana corioalantóide (CAM) de ovo embrionado de galinha.
- Avaliar a possível presença da atividade mutagênica da fosfoetanolamina sintética mediante a realização de experimentos “in vivo”, utilizando como modelo experimental o teste de micronúcleo em medula óssea hematopoiética de camundongos.
- Avaliar a possível presença da atividade antimutagênica da fosfoetanolamina mediante realização de experimentos “in vivo”, pelo tratamento simultâneo com um composto sabidamente mutagênico, a doxorribucina, utilizando-se o teste de micronúcleo em medula óssea hematopoiética de camundongos.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Fosfoetanolamina

A fosfoetanolamina utilizada, foi comercializada pela Sigma-Aldrich, a O-Phosphorylethanolamine P0503. Fórmula linear  $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OPO}_3\text{H}_2$ , peso molecular 141,06. Lote: BCBR7538V. Validade: 28/02/2019.

### 4.2 Teste da Angiogênese em membrana corioalantóide

#### 4.2.1 Ovos embrionados de galinha

Foram analisadas 50 membranas corioalantóide do ovo embrionado de galinha (*Gallus domesticus*). Os ovos foram obtidos da granja São Domingos, Setor Vale das Pombas da cidade de Aparecida de Goiânia – Goiás.

#### 4.2.2 Substâncias utilizadas

**a) Controle inibidor:** Solução de Dexametasona injetável, na concentração de 4mg/mL - Aché Laboratórios Farmacêuticos, Lote nº: 1608468, data de fabricação de julho de 2016, data de validade em julho de 2018.

**b) Controle negativo:** Água para Injeção, Samtec Biotecnologia Ltda, Lote: OUW, validade em outubro de 2017.

**c) Controle positivo:** Regederm® - Pele Nova Biotecnologia, Lote nº: 00134061, validade em fevereiro de 2018.

d) Cloreto de Sódio 0,9%, Samtec Biotecnologia Ltda, Lote: CDI, validade: dezembro de 2017.

e) A fosfoetanolamina Sigma-Aldrich para o teste, foi diluída em água destilada nas concentrações de 1000 mg/mL e 500 mg/mL.

### 4.2.3 Procedimento experimental

Inicialmente foi realizado a assepsia e antissepsia dos ovos embrionados de galinha, logo em seguida foram incubados em estufa automática a temperatura de 37°C e com umidade entre 60 e 70%, permanecendo durante dezesseis dias em incubação.

Ao quinto dia de incubação, os ovos foram retirados da estufa para a realização de uma abertura circular na casca dos mesmos, com auxílio de uma Micro Retífica Dremel®. Após abertura da casca dos ovos, foi colocado uma gota de cloreto de sódio a 0,9% (NaCl 0,9% p/v), para a facilitação da retirada da membrana interna do ovo, assim expondo a Membrana Corioalantóide (MCA) já vascularizada. A abertura foi vedada com fita adesiva e o ovo foi novamente incubado a 37° C. Todo este procedimento foi realizado dentro de uma câmara de fluxo laminar, em ambiente previamente esterilizado com luz ultravioleta

Ao décimo terceiro dia de incubação, os ovos foram retirados novamente da estufa para a colocação dos discos de papel filtro banhados com 5 µL com a substância teste (Fosfoetanolamina), e com os controles (negativo, indutor e inibidor), para a inoculação da solução Fosfoetanolamina no grupo teste, e, juntamente com os grupos controles (negativo, indutor e inibidor), os discos de papel filtro foram colocados diretamente sobre a membrana corioalantóide (MCA). Em seguida todos os ovos foram vedados novamente e recolocados para a incubação até o 16° dia.

Ao final do décimo sexto dia (último dia de incubação), os ovos foram retirados da estufa, para remoção das membranas. Todas as MCAs foram fixadas em solução de formol (3,7 % v/v) por 5 minutos. Após isso, foram cortadas detalhadamente e retiradas, sendo mantidas em placa de Petri com solução de formol a 10%. Em seguida, foram fotografadas com equipamento digital, em tamanho 640 x 480 pixels e formato de RGB 24 bits, padronizados com objetivo de analisar e quantificar a rede vascular (VAN DER LUIT et al., 2007; WILTING; CHRIST; WEICH, 1992).

### 4.2.4 Análise estatística

Para a análise estatística dos dados foi utilizado o software BioEstat versão 5.3. Foram analisadas 50 membranas, sendo 10 membranas por grupo. A diferença entre os controles e as diferentes concentrações pela análise de variância ANOVA – teste de *Tukey*. As diferenças entre os grupos (controles e teste) foram considerados significativos os valores de  $p < 0,05$ .

### **4.3 Avaliação da atividade mutagênica/antimutagênica da fosfoetanolamina pelo Teste do Micronúcleo em medula óssea de camundongos**

#### **4.3.1 Substâncias utilizadas**

- **Solubilização das células:**
  - Soro fetal bovino da Laborclin Produtos para Laboratórios.
- **Coloração das lâminas:**
  - Corante para células hematológicas PANÓTICO.
- **Controle positivo:**
  - Fauldoxo® (Cloridrato de doxorubicina) 10 mg, solução injetável – Libbs. Lote: 17<sup>o</sup>0663. Fabricação: 01/2017. Validade: 01/19.
- **Controle negativo:**
  - Água destilada estéril.
- **Teste de Mutagenicidade:**
  - Fosfoetanolamina dose 1000 mg/kg.
  - Fosfoetanolamina dose 500 mg/kg.
  - Fosfoetanolamina dose 250 mg/kg.
- **Teste de Antimutagenicidade:**
  - Fosfoetanolamina dose 1000 mg/kg.
  - Fosfoetanolamina dose 500 mg/kg.
  - Fosfoetanolamina dose 250 mg/kg.
  - Doxorubicina 2 mg/Kg.

#### **4.3.2 Animais utilizados no experimento**

Para realização do teste de micronúcleo foram utilizados 48 camundongos heterogênicos, linhagem *Mus musculus*, saudáveis, de origem do Biotério Central da Pontifícia Universidade Católica de Goiás. Machos e fêmeas, apresentavam peso corpóreo entre 30 a 40 g, e idade entre 90 a 95 dias. Os animais foram alojados em gaiolas individuais de polipropileno, com piso sólido, forradas com maravalha esterilizada, conforme padrões internacionais, estavam acomodados em ambiente com temperatura média de  $24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e umidade relativa de  $55\% \pm 5\%$ ; com ciclo de claro - escuro de 12 horas e tiveram água e alimentação *ad libitum*.

#### **4.3.3 Aprovação em Comitê de Ética**

O presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, protocolo nº 4665190417.

#### **4.3.4 Procedimento Experimental**

Os camundongos foram divididos em 8 grupos, cada grupo foi composto por 6 animais. Para avaliação da mutagenicidade, o grupo teste, os animais foram tratados via intraperitoneal (i.p.) com a solução aquosa de Fosfoetanolamina em doses de 1000, 500 e 250 mg/Kg durante 24 horas. Para avaliação da antimutagenicidade, as mesmas doses do grupo teste com solução aquosa de Fosfoetanolamina, foram administradas juntamente com uma dose única de 2 mg/Kg de Cloridrato de doxorubicina i.p. também durante um período de 24 horas. O grupo controle negativo, foi tratado com água destilada estéril (1 mL/100 g), enquanto o controle positivo foi tratado com 2mg/Kg de Cloridrato de doxorubicina. Após 24 horas de tratamento, os animais foram eutanasiados através de deslocamento cervical. Logo após, tiveram seus fêmures retirados. As epífises dos fêmures foram cortadas e a medula óssea foi lavada com 1 mL de soro fetal bovino. Em sequência, após homogeneização da medula no soro, esta foi centrifugada a 1000 x rpm durante 5 minutos. Descartou-se parcialmente o sobrenadante, e o precipitado de células foi homogeneizado. Uma gota da suspensão foi transferida para lâminas de vidro para confecção de esfregaço celular. Após secagem das lâminas, estas foram fixadas em metanol absoluto durante

5 minutos e coradas em solução corante PANÓTICO. Após este período, as lâminas foram lavadas em água corrente e deixadas secar em temperatura ambiente (HEDDLE et al., 1983, 1991).

#### **4.3.5 Análise citogenética**

A análise das lâminas foi realizada em microscópio de luz comum Nikon biocular, com a finalidade de se detectar possíveis alterações e/ou perdas cromossômicas (micronúcleos) nos eritrócitos policromáticos (EPC) da medula óssea dos animais submetidos a diferentes tratamentos. As células foram visualizadas em objetiva de imersão (100x) e ocular (10x), usando duas lâminas para cada animal, foram contados 4000 EPC por camundongo. (OECD, 2014).

#### **4.3.6 Análise estatística**

A frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN) em 4.000 EPC por camundongo dos grupos teste, foram comparadas em relação ao grupo controle negativo ou positivo pela análise de variância de ANOVA – teste *Tukey* (MELO-REIS et al., 2011) Foram considerados significativos valores de  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Avaliação da atividade angiogênica/antiangiogênica da fosfoetanolamina sintética em MCA

Foram testadas 10 MCAs por grupo, foi utilizado como controle negativo água destilada, controle positivo Regederm® – Pele Nova Biotecnologia, controle inibidor, utilizou-se dexametasona injetável, e para o teste, a solução aquosa de Fosfoetanolamina nas concentrações de 500 mg/mL e 1000 mg/mL. As redes vasculares das membranas foram analisadas após 72 horas de tratamento dos controles e teste (CHAVES et al., 2016; MELO-REIS et al., 2010). As médias e os desvios padrões estão apresentados na tabela 1 e figuras 5 e 6.

**Tabela 1.** Médias e desvios padrões obtidos na mensuração do comprimento, calibre, números de junções e complexos dos vasos sanguíneos.

Grupos	Comprimento (Pixel)	Calibre (Pixel)	Número de junções	Número de Complexos
Controle Positivo (Regederm®) <sup>a</sup>	9864,4 ± 3758,6	54046,9 ± 23123,2	256,0 ± 130,5	56,8 ± 22,1
Controle Inibidor (Dexametasona) <sup>b</sup>	2170,2 ± 1575,2	14226,4 ± 14010,7	30,0 ± 35,1	22,3 ± 12,7
Controle Negativo (H <sub>2</sub> O) <sup>c</sup>	3232,9 ± 1490,3	21122,9 ± 8508,6	66,0 ± 43,5	23,5 ± 16,7
Fosfo 500 mg/mL	6926,7 ± 2642,9 <sup>a,b,c</sup>	16196,3 ± 13970,3 <sup>a, b</sup>	106,5 ± 75,1 <sup>a, b,c</sup>	47 ± 25,6 <sup>b,c</sup>
Fosfo 1000 mg/mL	8849,2 ± 4458,4 <sup>b,c</sup>	33072,6 ± 15755,9 <sup>b,c</sup>	173,9 ± 98,3 <sup>b, c</sup>	60,9 ± 43,2 <sup>b,c</sup>

ANOVA, Tukey

a p<0,05 quando comparado com controle positivo;

b p<0,05 quando comparado ao inibidor;

c p<0,05 quando comparado ao controle negativo

Os resultados demonstraram um aumento significativo em relação ao comprimento dos vasos, na concentração de 500 mg/mL de fosfoetanolamina, quando comparada aos controles, negativo e inibidor ( $p < 0,05$ ), não apresentando diferença significativa quando comparada ao controle positivo, demonstrando atividade angiogênica, porém, não tão elevada, como o controle positivo. Enquanto na concentração de 1000 mg/mL, houve diferença significativa quando comparada aos controles negativo e inibidor ( $p < 0,05$ ), não havendo diferença significativa, quando comparada ao controle positivo, demonstrando importante atividade angiogênica.

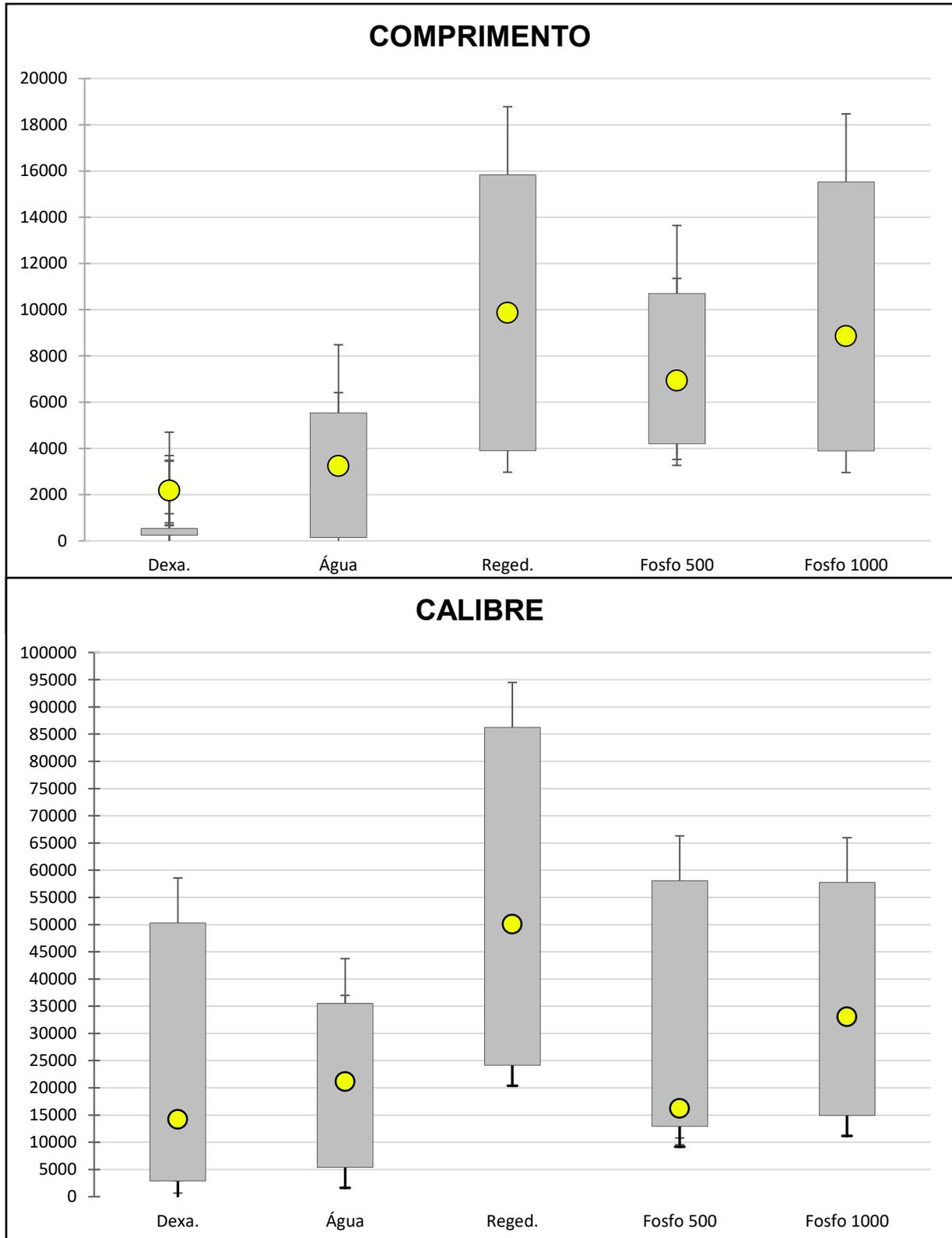
A variável calibre, a solução aquosa de fosfoetanolamina na concentração de 500 mg/mL, apresentou significativa diferença quando comparada ao controle positivo, não apresentando o aumento no calibre dos vasos ( $p < 0,05$ ), porém apresentou diferença significativa, observando aumento no calibre destes vasos quando comparada ao controle inibidor ( $p < 0,05$ ), entretanto, quando comparada ao controle negativo, não se obteve diferença significativa, apresentando-se estatisticamente igual. Enquanto, a solução de fosfoetanolamina na concentração de 1000 mg/mL, apresentou diferença significativa quando comparada aos controles negativo e inibidor ( $p < 0,05$ ), apresentando aumento considerável no calibre dos vasos, quando comparada ao controle positivo, não apresenta diferença significativa ( $p > 0,05$ ), demonstrando ser angiogênica.

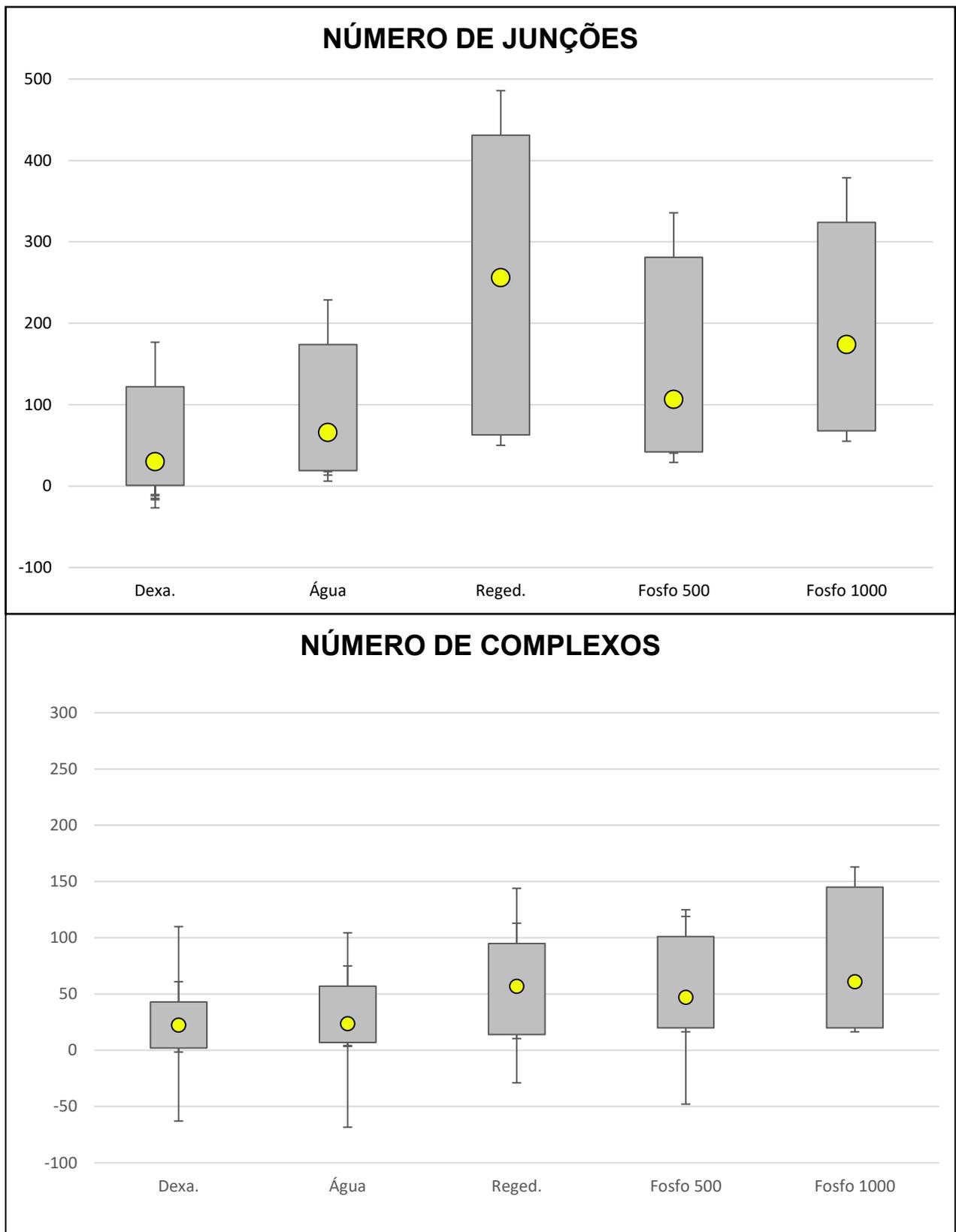
As membranas tratadas com a solução aquosa de fosfoetanolamina na concentração de 500 mg/mL, apresentaram diferença significativa quando comparadas ao controle positivo ( $p < 0,05$ ), não havendo aumento no número de junções, porém, quando comparadas ao controle inibidor e negativo, apresentaram significativa diferença ( $p < 0,05$ ), observando aumento no número destas junções. Já, na concentração de 1000 mg/mL de solução aquosa de fosfoetanolamina, os resultados demonstraram significativa diferença quando comparadas aos controles inibidor e negativo ( $p < 0,05$ ), apresentando um importante aumento no número de junções, e não apresentando diferença significativa ao controle positivo ( $p > 0,05$ ).

O número de complexos observados na concentração de 500 mg/mL de fosfoetanolamina, apresentou diferença significativa quando comparado aos controles inibidor e negativo ( $p < 0,05$ ). Do mesmo modo, na concentração de 1000 mg/mL, o número de complexos observado também foi maior quando comparado aos controles inibidor e negativo ( $p < 0,05$ ), observando um importante aumento no número destes

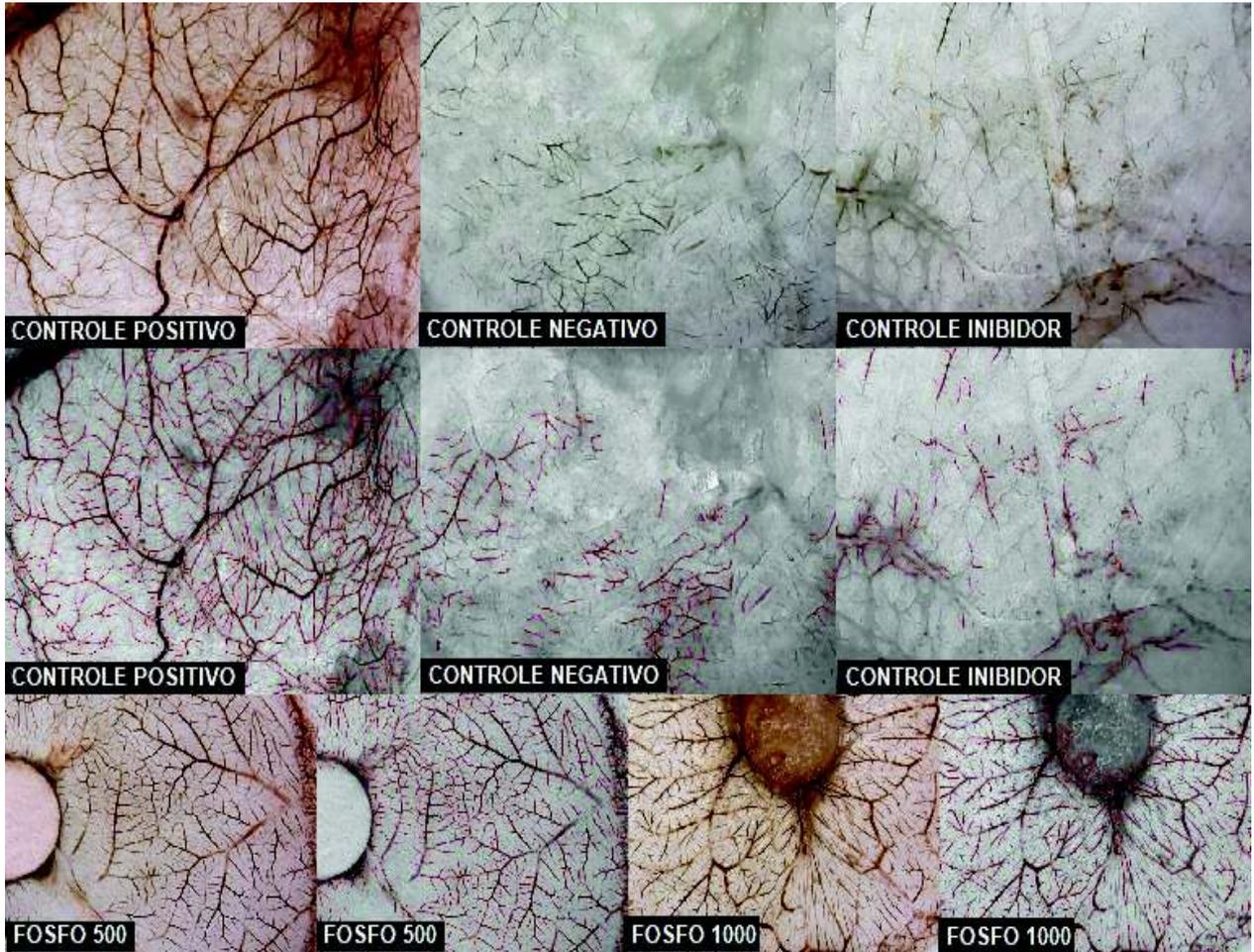
complexos. Contudo ambas concentrações não apresentaram diferença significativa em relação ao controle positivo ( $p>0,05$ ). Logo, demonstrando atividade angiogênica.

Os resultados da quantificação foram ilustrados nos gráficos da figura 5 e na figura 6.





**Figura 5.** Gráfico Box Plot dos valores do comprimento, calibre, número de junções e número de complexos das MCAs obtidas após tratamento com a solução aquosa de fosfoetanolamina e controles.



**Figura 6.** Imagens representativas da rede vascular formada na região Membrana corioalantóide (MCA) após tratamento com a solução aquosa de fosfoetanolamina. As imagens de MCA no software Angioquant.

## 5.2 Avaliação da atividade mutagênica e antimutagênica da fosfoetanolamina sintética

A avaliação de mutagenicidade e antimutagenicidade, foi realizada pelo teste de Micronúcleo em medula óssea de camundongos, através da contagem da frequência de EPCMN em 4.000 EPC por camundongo.

Os resultados da frequência de EPCMN avaliados em 4.000 EPC, média e desvio padrão, estão apresentados na tabela 2.

**Tabela 2.** Frequência de EPCMN após 24 horas do tratamento com solução aquosa de Fosfoetanolamina em diferentes concentrações e controles para avaliação de mutagenicidade

Doses (mg/kg)	Número de animais	Eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN)	
		Dados Individuais MN/4000 EPC	MN/4000 EPC Média ± DP
Fosfoetanolamina 250 mg/Kg	6	5-8-6-13-6-7	8 ± 2,9 <sup>a</sup>
Fosfoetanolamina 500 mg/Kg	6	9-13-16-16-12-9	13 ± 3,1 <sup>a, b</sup>
Fosfoetanolamina 1000 mg/Kg	6	9-13-13-12-17-10	12 ± 2,8 <sup>a, b</sup>
Controle Positivo (Doxorrubicina) <sup>a</sup>	6	59-54-47-50-53-43	51 ± 5,6
Controle Negativo (Água destilada) <sup>b</sup>	6	8-8-13-6-9-9	9 ± 2,3

ANOVA, Tukey

a p<0,05 quando comparado ao controle positivo;

b p<0,05 quando comparado ao controle negativo.

Os resultados do Teste de Micronúcleo para avaliação de mutagenicidade, demonstrou que a solução aquosa de fosfoetanolamina na concentração de 250 mg/mL, apresentou diferença significativa quando comparada aos controles positivo (p<0,05), e quando comparada ao controle negativo, não apresentou diferença significativa, ou seja, não verificando atividade mutagênica a substância em teste.

A solução aquosa de fosfoetanolamina na concentração de 500 mg/mL também apresentou diferença significativa em relação aos controles positivo e negativo (p<0,05), também não apresentando mutagenicidade.

E por fim, na concentração de 1000 mg/Kg de fosfoetanolamina observou-se significativa diferença entre os controles positivo e negativo (p<0,05), não conferindo atividade mutagênica considerável à substância.

Para avaliação de antimutagenicidade, os animais foram tratados com a solução aquosa de fosfoetanolamina nas concentrações de 250, 500 e 1000 mg/Kg, simultaneamente com a doxorrubicina. Os resultados estão expressos na tabela 3.

**Tabela 3.** Frequência de EPCMN após 24 horas de tratamento simultâneo de diferentes concentrações da Fosfoetanolamina com doxorubicina para avaliação de antimutagenicidade

Doses (mg/kg)	Número de animais	Eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN)	
		Dados Individuais MN/4000 EPC	MN/4000 EPC Média ± DP
Fosfoetanolamina 250 mg/Kg + doxorubicina	6	39-26-27-37-35-30	32 ± 5,4 <sup>a,b</sup>
Fosfoetanolamina 500 mg/Kg + doxorubicina	6	34-32-40-33-20-32	32 ± 6,5 <sup>a,b</sup>
Fosfoetanolamina 1000 mg/Kg + doxorubicina	6	39-35-19-23-24-23	27 ± 7,9 <sup>a,b</sup>
Controle Positivo (Doxorubicina) <sup>a</sup>	6	59-54-47-50-53-43	51 ± 5,6
Controle Negativo (Água destilada) <sup>b</sup>	6	8-8-13-6-9-9	9 ± 2,3

ANOVA, Tukey

a p<0,05 quando comparado ao controle positivo;

b p<0,05 quando comparado ao controle negativo.

De acordo com o demonstrado nos resultados, na concentração de 250 mg/mL da solução aquosa de fosfoetanolamina, observou-se uma diferença significativa, em relação aos controles positivo e negativo (p<0,05), constatando atividade antimutagênica.

Do mesmo modo, a fosfoetanolamina na concentração de 500 mg/mL, apresentou significativa diferença em relação aos controles positivo e negativo (p<0,05), também apresentando atividade antimutagênica.

Avaliação para antimutagenicidade demonstrou que a fosfoetanolamina na concentração de 1000 mg/mL apresentou significativa diferença quando comparada aos controles positivo e negativo (p<0,05).

A substância teste, em suas diferentes concentrações apresentou significativa diferença em relação aos grupos controle, assim sendo considerada uma substância antimutagênica.

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 Avaliação da atividade angiogênica/antiangiogênica

A fosfoetanolamina, uma substância sintética que ficou conhecida popularmente, como a “pílula do câncer”. A equipe coordenada pelo químico, Gilberto Orivaldo Chierice, estuda esta substância que promete ser a cura do câncer, a mais de 20 anos. Segundo Chierice, a fosfoetanolamina simula uma substância orgânica, responsável por sinalizar células neoplásicas, ativando a sua remoção pelo sistema imunológico. Porém a fosfoetanolamina se encontra em fase de teste pré-clínicos, ainda sem aprovação de uso pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) (MEDEIROS MOTA; CRISTINA DE SOUSA, 2017).

A análise dos resultados deste estudo, demonstrou, que a fosfoetanolamina sintética nas concentração de 500 mg/mL, apresentou demonstrou ser angiogênica, apenas em 2 parâmetros testado, apresentando aumento significativo apenas no número de junções e número de complexo, enquanto na concentração de 1000 mg/mL, apresentou significativo aumento nos quatro parâmetros testados (comprimento, calibre, número de junções e número de complexos), quando comparado aos grupos controle, demonstrando ser uma substância ativadora da angiogênese.

O levantamento bibliográfico realizado em plataformas de trabalhos de científicos, não constatou estudos relacionados a atividade angiogênica e antiangiogênica da fosfoetanolamina sintética.

Alguns dos estudos existentes realizados com a fosfoetanolamina, foi a avaliação da possível atividade anticâncer em sarcoma 18, não apresentando efeito inibidor nos animais tratados com a dose de 1 g/Kg durante 10 dias (FILHO, 2016). O estudo realizado com a fosfo em células de melanoma murino, apresentou resultados significativos, evidências demonstraram que a fosfoetanolamina possui atividade inibitória em relação a proliferação e crescimento de células tumorais tanto *in vitro*, quanto *in vivo* (VERONEZ, 2012).

Inicialmente, o intuito deste estudo, era encontrar uma sustância provavelmente antiangiogênica, já que em pesquisas realizadas com a fosfoetanolamina, a substância demonstrou possuir efeitos antiproliferativos (VERONEZ, 2012). Assim,

podendo ser uma substância em potencial para o tratamento anticâncer. No entanto, a fosfoetanolamina demonstrou ser angiogênica, ou seja, é capaz de ativar o crescimento de novos vasos a partir de vasos pré-existentes. Logo, se desperta sua importância para o tratamento de patologias que necessitem deste mecanismo, aplicando-a no desenvolvimento de novos medicamentos, nesta vertente. As doenças desencadeadas pelo diabetes, teria grande aplicabilidade no tratamento, pois são alterações que causam importantes danos a vascularização, a retinopatia diabética, o pé diabético, por exemplo, podendo até reduzir o número de amputações, com a reversão desta alteração.

Portanto, diante deste contexto, os resultados desta pesquisa são relevantes, pois demonstram que a Fosfoetanolamina sintética possui atividade angiogênica, sendo um importante passo para o avanço de novas pesquisas, e o desenvolvimento e aplicação de novas terapias para diversas patologias.

## **6.2 Avaliação da atividade mutagênica e antimutagênica**

A partir do teste de micronúcleo realizado com a solução aquosa de fosfoetanolamina, pode-se observar que a substância não apresentou atividade mutagênica em nenhuma de suas concentrações testadas (250, 500 e 1000 mg/Kg).

Um relatório desenvolvido por um grupo de pesquisa da Fosfoetanolamina sintética da USP de São Carlos, no Centro de Inovação e Ensaio Pré-Clínicos, em parceria com o Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações, único estudo de mutagenicidade feito com a fosfoetanolamina até então, realizou testes de micronúcleo em medula óssea de camundongos na dose oral de 2000 mg/Kg, também demonstrou que a fosfoetanolamina sintética, não apresentou efeitos mutagênicos (CALIXTO et al., 2016)

A avaliação da atividade antimutagênica demonstrou que a fosfoetanolamina possuem efeitos antimutagênicos em todas as concentrações testadas (250, 500, 1000 mg/Kg).

De acordo com levantamento bibliográfico realizado, a avaliação de antimutagenicidade da fosfoetanolamina sintética, feito pelo teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos, é inédito na literatura, sendo realizado até então, apenas neste estudo.

## 7 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos neste estudo, concluiu-se que a solução aquosa da Fosfoetanolamina sintética apresentou atividade angiogênica em todas as concentrações testadas.

A solução aquosa da Fosfoetanolamina sintética não apresentou ação mutagênica em nenhuma das concentrações, testadas pelo Teste de Micronúcleo em medula óssea de camundongos.

Na avaliação de antimutagenicidade, a solução aquosa da Fosfoetanolamina sintética apresentou ação antimutagênica significativa, quando comparada aos grupos controle.

## 8 REFERÊNCIAS

AJITH, T. A.; SOJA, M. A comparative study on the antimutagenicity of atorvastatin and lovastatin against directly acting mutagens. **Cell Biology and Toxicology**, v. 22, n. 4, p. 269–274, 2006.

AL-ASFOUR, S. V. Estudo de equilíbrios químicos com 2-aminoetanoldihidrogenofosfato para fins biológicos. **Tese de Doutorado em Química Analítica**. Universidade de São Paulo, 2008.

ALMEIDA, M. V. DE. Aplicação Pré-Clínica Da Fosfoetanolamina Sintética Sobre Modelos Experimentais De Epilepsias. **Biblioteca Digital de Teses e Dissertações**. Universidade de São Paulo, 2007.

BELIZÁRIO, J. E. O Próximo Desafio: Reverter o Câncer. **Ciência hoje**, v. 31, n. 184, p. 51–57, 2002.

CALIXTO, J. B. et al. Avaliação da Genotoxicidade da Fosfoetanolamina Sintética (USP – São Carlos): Teste de Mutação Reversa em *Salmonella typhimurium*. **Relatório Final**. Centro de Inovação e Ensaios Pré-Clínicos - CIEnP. Florianópolis-Sc, 2016.

CAPP, C. et al. Papel do Fator de Crescimento Endotelial Vascular nos Carcinomas de Tireóide. **Revista HCPA**, v. 29, n. 1, p. 51–59, 2009.

CHAVES, D. A. et al. Avaliação da atividade angiogênica da solução aquosa do barbatimão (*stryphnodendron adstringens*). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 2, p. 524–530, 2016.

COSTA, R. M. A.; MENK, C. F. MA. Biomonitoramento de Mutagênese Ambiental. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, p. 1–356, 2003.

DEVITA VT, LAWRENCE TS, R. S. **Cancer: Principles and Practice of Oncology Review**. 2nd ed. Based on: DeVita, Hellman, and Rosenberg's cancer. 2011.

DONATO, M. Angiogénesis y arteriogénesis : terapias del tercer milenio. **Revista Argentina de Cardiología**, v. 71, n. 1, p. 4–5, 2003.

ELICEIRI, B. P.; CHERESH, D. A. Adhesion events in angiogenesis. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 13, n. 5, p. 563–568, 2001.

EMOTO, K. et al. Redistribution of phosphatidylethanolamine at the cleavage furrow of dividing cells during cytokinesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 23, p. 12867–12872, 1996.

FAGUNDES, G. E. Influência de sucos de hortaliças fonte de luteína e beta-caroteno sobre a genotoxicidade induzida por agentes alquilantes em camundongos. **Dissertação de Mestrado em Ciências da Saúde**. Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, 2012.

FERREIRA, A. K. et al. Synthetic phosphoethanolamine a precursor of membrane phospholipids reduce tumor growth in mice bearing melanoma B16-F10 and in vitro induce apoptosis and arrest in G2/M phase. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 66, n. 7, p. 541–548, 2012a.

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, 2012b.

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, 2013.

FERREIRA, A. K. Alquil fosfatado sintético precursor dos fosfolipídios de membrana celular com potencial efeito antitumoral e apoptótico em modelos de tumores experimentais. **Biblioteca Digital de Teses e Dissertações**. Universidade de São Paulo, 2013.

FILHO, M. O. DE M. AVALIAÇÃO DA POSSÍVEL ATIVIDADE ANTICÂNCER DA FOSFOETANOLAMINA SINTÉTICA (FS) NO SARCOMA 18. **Laudo Técnico do**



**Pharmaceutical Sciences**, v. 43, n. 1, p. 1–17, 2007.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER - INCA. **O que é o câncer? - INCA**. Disponível em: <[http://www1.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=322](http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322)>. Acesso em: 3 dez. 2017.

JIN, Q. et al. Vascular Endothelial Growth Factor Polymorphisms in Relation to Breast Cancer Development and Prognosis. **Clinical Cancer Research**, v. 11, n. 10, p. 3647–3654, 2005.

KADA, T.; MORITA, K.; INOUE, T. Anti-mutagenic action of vegetable factor(s) on the mutagenic principle of tryptophan pyrolysate. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, v. 53, n. 3, p. 351–353, 1 jun. 1978.

LIEKENS, S.; CLERCQ, E. DE; NEYTS, J. Angiogenesis : regulators and clinical applications. **Biochemical Pharmacology**, v. 61, n. 3, p. 253–270, 2001.

LUDOVINI, V. et al. Evaluation of the prognostic role of vascular endothelial growth factor and microvessel density in stages I and II breast cancer patients. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 81, n. 2, p. 159–168, 2003.

MARAGOUDAKIS, M. E. Angiogenesis : models, modulators, and clinical applications. **Life Sciences**. New York, 1998.

MEDEIROS MOTA, A.; CRISTINA DE SOUSA, C. Fosfoetanolamina: Um Embate Entre o Direito à Vida e à Segurança. **RJLB**, v. 3, n. 2, p. 1–35, 2017.

MELO-REIS, P. et al. Assessment of the mutagenic and antimutagenic activity of *Synadenium umbellatum* Pax latex by micronucleus test in mice. **Brazilian Journal of Biology**, v. 71, n. 1, p. 169–174, fev. 2011.

MELO-REIS, P. R. et al. Angiogenic activity of *Synadenium umbellatum* Pax latex. **Brazilian journal of biology. Revista brasleira de biologia**, v. 70, n. 1, p. 189–94, 2010.

MENEGUELO, R. Efeitos antiproliferativos e apoptóticos da fosfoetanolamina sintética no melanoma B16F10. **Dissertação de Mestrado em Bioengenharia**. Universidade de São Paulo como, 2007.

MORSE, D. L. et al. Transcriptomic and Metabolomic Differentiation of Breast Cancers: Progression and Therapy Response via Magnetic Resonance Spectroscopy and Quantitative Expression Profiling in the Choline pathway. **NMR Biomed**, v. 31, n. 2, p. 510–514, 2011.

NELSON, DAVID L. COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6ª ed. New York: W.H.Freeman and Company, 2014.

NORRBY, K. In vivo models of angiogenesis. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 10, n. 3, p. 588–612, 2006.

OECD. Test No. 489: In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. **OECD Publishing**. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, 2014.

OLINSKI, R. et al. Oxidative DNA damage: assessment of the role in carcinogenesis, atherosclerosis, and acquired immunodeficiency syndrome. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 33, n. 2, p. 192–200, 2002.

OLIVEIRA, A. G. DE; SILVEIRA, D. Expectativa e Realidade em Torno do Efeito Anticâncer da Fosfoetanolamina (Conclusão). **Infarma - Ciências Farmacêuticas**, v. 28, n. 2, p. 57, 2016.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **OMS: câncer mata 8,8 milhões de pessoas anualmente no mundo**. Disponível em: <<https://nacoesunidas.org/oms-cancer-mata-88-milhoes-de-pessoas-anualmente-no-mundo/>>. Acesso em: 4 dez. 2017.

OUTHOUSE, E. L. Amino-ethyl phosphoric ester from tumours. **Biochem J**, v. 30, n. 2, p. 197–201, 1936.

PAPETTI, M. et al. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 282, n. 5, p. 947–970, 2002.

PEPPER, M. S. Transforming Growth Factor-beta : Vasculogenesis , Angiogenesis , and Vessel Wall Integrity. **Science Direct**, v. 8, n. 1, p. 21–43, 1997.

PINHO, M. S. L. Angiogênese: O gatilho proliferativo. **Rev Bras Coloproct**, v. 25, n. 4, p. 396–402, 2005.

PONDÉ, N.; DE AZAMBUJA, E.; ADES, F. Phosphoethanolamine and the danger of unproven drugs. **Ecancermedicalsecience**, v. 10, p. 1–6, 2016.

RÊGO, J. F. M. et al. A “miracle” cancer drug in the era of social media: A survey of Brazilian oncologists’ opinions and experience with phosphoethanolamine. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 63, n. 1, p. 70–77, 2017.

RHEE, C. H.; PARK, H. D. Three Glycoproteins with Antimutagenic Activity Identified in *Lactobacillus plantarum* KLAB21. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 8, p. 3445–3449, 1 ago. 2001.

RISAU, W. Differentiation of endothelium. **The FASEB Journal**, v. 9, n. 10, p. 926–933, 1995.

RISAU, W. Mechanisms of angiogenesis. **Nature**, v. 386, p. 671, 17 abr. 1997.

SAFATLE, A. DE M. V. et al. Implante de duas membranas biológicas em microbolsa corneana como modelo experimental de angiogênese. **Braz. J. vet. Res. anim. Sci.**, v. 39, n. 4, p. 189–195, 2002.

SILVA, C. A. DA. Avaliação da atividade genotóxica e antigenotóxica do elagitanino oenoteína B isolado de *Eugenia uniflora* L. **Dissertação de Mestrados em Biodiversidade Vegetal**. Universidade Federal de Goiás, 2014.

TEIXEIRA, L. A.; FONSECA, C. O. De doença desconhecida a problema de saúde

pública: **o INCA e o controle do câncer no Brasil**. Rio de Janeiro : Ministério da Saúde, 2007.

VAN DER LUIT, A. H. et al. A new class of anticancer alkylphospholipids uses lipid rafts as membrane gateways to induce apoptosis in lymphoma cells. **Molecular cancer therapeutics**, v. 6, n. 8, p. 2337–2345, 2007.

VANCE, J. E.; TASSEVA, G. Formation and function of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1831, n. 3, p. 543–554, 2013.

VERONEZ, L. C. Atividade Da Fosfoetanolamina Sintética Em Melanoma Murino Experimental. **Dissertação de Mestrado em Ciências**. Universidade de São Paulo, 2012.

VILE, R. G. **Cancer metastasis : from mechanisms to therapies**. Edition by Richard G. Vile J. Wiley, 1995.

WILTING, J.; CHRIST, B.; WEICH, H. A. The effects of growth factors on the day 13 chorioallantoic membrane (CAM): a study of VEGF 165 and PDGF-BB. **Anatomy and Embryolog**, v. 186, p. 251–257, 1992.