

SARAH FERNANDES TEIXEIRA

Validação da enzima CTP:fosfoetanolamina-citidilil-transferase e do transporte de etanolamina como novos alvos para o desenvolvimento racional de novos fármacos para o tratamento do carcinoma de pulmão de células não pequenas

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de Concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Emer Suavinho Ferro

Co-orientador: Dr. Adilson Kleber Ferreira

Versão Corrigida.

São Paulo

2020

RESUMO

TEIXEIRA, S. F. **Validação da enzima CTP:fosfoetanolamina-citidilil-transferase e do transporte de etanolamina como novos alvos para o desenvolvimento racional de novos fármacos para o tratamento do carcinoma de pulmão de células não pequenas.** 2020. 102 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

A pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos cresce há décadas, contudo, a chegada de novos fármacos na terapêutica sofre pelos entraves da validação de alvos. Neste contexto, muitas doenças graves permanecem sem cura, dentre elas, o carcinoma de pulmão (CP). O CP é o câncer de maior morbidade e mortalidade em todo o mundo, sendo cerca de oitenta por cento dos casos diagnosticados como carcinoma de pulmão de células não pequenas (CPCNP). O nosso grupo trabalha no desenvolvimento racional de novos fármacos capazes de interferir na produção de fosfatidiletanolamina (PE) como uma estratégia inovadora para o tratamento de CPCNP. Este enfoque é devido ao aumento deste fosfolípido nos CPCNP e a relação deste com a progressão tumoral. Há duas formas de reduzir a produção de PE: 1) reduzir a atividade da enzima CTP:fosfoetanolamina-citidilil-transferase (Pcyt2), responsável pela etapa limitante da sua principal via de produção e 2) reduzir o aporte celular de etanolamina, substrato inicial de todas as rotas de produção de PE. Dessa forma, este trabalho avaliou *in vitro* e *in vivo* a importância da atividade da enzima Pcyt2 e do transporte de etanolamina em modelos de CPCNP. O efeito da inibição da Pcyt2 foi avaliado frente ao inibidor, meclizina, e utilizando células A549 e LL2/LC1 com deleção do gene PCYT2 (KO) e selvagens (WT). A inibição do transporte de etanolamina foi avaliada utilizando o inibidor DL-1-amino-2-propanol. A inibição concomitante da Pcyt2 e do transporte de etanolamina reduziu a viabilidade das células A549 por mecanismos independentes de apoptose. O mecanismo de ação da meclizina se mostrou associado aos danos mitocondriais. As células, A549 KO apresentaram diminuída proliferação celular, possivelmente associada a redução da proteína Rb fosforilada, resultante da ação da p21 e da p53 fosforiladas. A PE e o transporte de etanolamina se mostraram essenciais para a proliferação celular, pois apenas em cultura de células A549 selvagens expressando Pcyt2 a suplementação de etanolamina ou de soro foi capaz de aumentar a taxa proliferativa. As células LL2/LC1 KO demandam mais tempo para a formação de tumores em camundongos, corroborando a importância da Pcyt2 para o desenvolvimento tumoral. Em conjunto, estes dados mostram o potencial da enzima Pcyt2 e do transporte de etanolamina como alvos de agentes citostáticos para a terapêutica de CPCNP.

Palavras-chave: Carcinoma de pulmão de células não pequenas. Fosfatidiletanolamina. CTP:fosfoetanolamina-citidilil-transferase (Pcyt2). Transporte de etanolamina.

ABSTRACT

TEIXEIRA, S. F. **Validation of CTP:phosphoethanolamine cytidyltransferase enzyme and ethanolamine transport as new targets for the rational development of new drugs in Non-Small Cell Lung Cancer treatment.** 2020. 102 p. Thesis (Pharmacology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

The research and development of new drugs has grown for decades, however, the arrival of new drugs in therapy suffers from the barriers of target validation. In this context, therapeutics for critical diseases remain unresolved, including for lung carcinoma (LC). LC is the cancer with the highest morbidity and mortality worldwide, with around eighty percent of cases diagnosed as non-small cell lung cancer (NSCLC). Our group works on the development of new drugs capable of interfering in the production of phosphatidylethanolamine (PE) as an innovative strategy for the treatment of NSCLC. This focus is due to the increase of this phospholipid in NSCLC and its relationship with tumor progression. There are two ways to reduce the production of PE: 1) reduce the activity of the rate-limiting CTP enzyme: phosphoethanolamine-cytidyl transferase (Pcyt2), and 2) reduce the cellular supply of ethanolamine, which is the substrate of all PE production routes. Thus, this work evaluated *in vitro* and *in vivo* importance of Pcyt2 enzyme activity and ethanolamine transport, in NSCLC models. The effect of Pcyt2 inhibition was evaluated both against the meclizine inhibitor and using A549 and LL2/LC1 cells with the deletion of the PCYT2 (KO) gene. Inhibition of ethanolamine transport was assessed using the DL-1-amino-2-propanol inhibitor. Concomitant inhibition of Pcyt2 and ethanolamine transport reduced the viability of A549 cells, by mechanism independent of apoptosis. The meclizine mechanism of action was suggested to be associated with mitochondrial damage. A549 KO cells show decreased cell proliferation, possibly associated with a reduction in phosphorylated Rb protein, resulting from the action of phosphorylated p21 and p53. The transport of PE and ethanolamine were shown to be essential for cell proliferation, only in culture of wild-type A549 cells expressing Pcyt2. LL2/LC1 KO cells demanded longer time for the formation of tumors in mice, corroborating the importance of Pcyt2 for tumor development. Taken together, these data suggested the potential of the Pcyt2 enzyme and ethanolamine transport as targets for cytostatic agents in the treatment of NSCLC.

Keywords: Non-small cell lung cancer (NSCLC). Phosphatidylethanolamine. CTP:phosphoethanolamine cytidyltransferase (Pcyt2). Ethanolamine transport.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Planejamento racional de fármacos

O uso de substâncias no intuito de alterar as funções biológicas é antigo e o desenvolvimento de fármacos está intimamente relacionado aos avanços da humanidade (KOEHN; CARTER, 2005). A pesquisa e o desenvolvimento de novos fármacos são importantes linhas de pesquisa com grande impacto financeiro e social para a população mundial (CLEARY et al., 2018; DE RYCKER et al., 2018; MOHRS; GREIG, 2017).

Neste cenário, o planejamento racional de fármacos destaca-se pelo apelo de que alvos bem delineados, garantindo eficácia e redução dos efeitos adversos (DE RYCKER et al., 2018; TEIXEIRA et al., 2018). Nestes modelos os alvos são identificados e validados através da manipulação genética e/ou farmacológica do alvo em questão, a fim de avaliar a relevância deste para o modelo e, por conseguinte, prever uma resposta terapêutica (DE RYCKER et al., 2018; KAELIN et al., 2017). Assim, estes modelos são desenvolvidos por grupos multidisciplinares e exigem a identificação prévia de um alvo, preferencialmente alterado apenas no contexto da doença, o que torna um pouco mais complexa essa estratégia (GIBBS, 2000; SAWYERS, 2004). Em contrapartida, estes modelos contam com abordagens computacionais capazes de otimizar o processo de triagem de fármacos, quando comparado à busca através de quimiotecas. Dentre estas abordagens estão: a análise de *docking*; a avaliação da taxa de ligação com o alvo (afinidade/especificidade); o balanço entre hidrofobicidade/lipofobicidade; a relação quantitativa de estrutura-atividade e outros (OVERINGTON; AL-LAZIKANI; HOPKINS, 2006).

Entretanto, a chegada de novos fármacos na terapêutica é desproporcional aos crescentes investimentos em inovação na área. Dentre os motivos para este *plateau* na chegada de novos fármacos no mercado está a validação superficial dos alvos e a falta de translação dos dados pré-clínicos para a prática clínica (CLEARY et al., 2018; DE RYCKER et al., 2018; KAELIN et al., 2017; MOHRS; GREIG, 2017). Dado esses entraves na chegada de novos fármacos no mercado e a fim de melhorar o cenário da terapêutica atual, ganharam destaque também novas estratégias com fármacos já aprovados, tais

quais, as novas combinações, com sorafenibe e oxaliplatina por exemplo (TEIXEIRA et al., 2014; TEIXEIRA et al., 2016), ou até o reposicionamento terapêutico de fármacos, como a metformina (TEIXEIRA et al., 2013). Cumpre salientar que estratégias como estas também podem representar reduções dos gastos públicos com medicamentos (BERTOLINI; SUKHATME; BOUCHE, 2015) e dos investimentos em pesquisa e desenvolvimento de fármacos (MAXMEN, 2016).

Contudo, apesar de todos estes esforços, muitas doenças permanecem sem cura e representam um problema de saúde pública, dentre estas, o câncer destaca-se mundialmente por sua morbidade e mortalidade (BRAY et al., 2018). O câncer é uma designação para um conjunto de doenças marcadas por células modificadas (com alterações em seu metabolismo, sua sobrevivência e sua capacidade de evadir o sistema imune), permitindo seu crescimento desordenado e a invasão de tecidos e órgãos (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Desta forma, cada tipo de câncer apresenta particularidades biológicas que determinam sua melhor opção terapêutica e a negligência destas é um dos motivos para as estatísticas mundiais de mortalidade. Dentre os cânceres, o câncer de pulmão (CP) é a principal causa de morte por câncer no mundo e no Brasil (ARAUJO et al., 2018; BOLOKER; WANG; ZHANG, 2018; GBD 2017, 2018; INCA, 2014). Ademais, este câncer é o mais incidente no mundo (BRAY et al., 2018) e o segundo frequente no Brasil (ARAUJO et al., 2018; INCA, 2017).

1.2 O câncer de pulmão

O CP é o conjunto de doenças neoplásicas cujo o sítio primário é o pulmão, entretanto, a fim de facilitar seus guias de tratamento a Organização Mundial de Saúde classifica o CP em grupos baseados no tipo celular e nas alterações genéticas da célula tumoral inicial (ETTINGER et al., 2018; SCAGLIOTTI et al., 2011). Usualmente há uma primeira divisão em dois grandes grupos: o carcinoma de pulmão de pequenas células e o carcinoma de pulmão de células não pequenas (CPCNP) (DAVIDSON; GAZDAR; CLARKE, 2013; TRAVIS, BRAMBILLA; RIELY, 2013).

O carcinoma de pulmão de células pequenas representa cerca de 14% dos casos de câncer pulmão e caracteriza-se por sua agressividade (BOLOKER; WANG; ZHANG, 2018; DAVIDSON; GAZDAR; CLARKE, 2013; WAQAR; MORGENSZTERN, 2017). Estes tumores são tipicamente de porções medianas dos brônquios e expressam marcadores neuroendócrinos (por exemplo: o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, a molécula de adesão celular neuronal 1 e a proteína *achaete-scute complex homolog-like 1*) (MEUWISSEN et al., 2003; WISTUBA et al., 2001). Preconiza-se o tratamento dos pacientes com este diagnóstico através de quimio e/ou radioterapia independente do seu estágio, dado a alta taxa de metástase associada a esta doença (WAQAR; MORGENSZTERN, 2017).

Já o CPCNP, representa cerca de 84% dos diagnósticos de CP e é um grupo heterogêneo que engloba diferentes tipos histológicos, tais como: o carcinoma de células epidermóides, os adenocarcinomas, o carcinoma de células grandes e outros tipos mais raros (ETTINGER et al., 2018; TRAVIS et al., 2011). Quanto à origem de cada subtipo, os carcinomas de células epidermóides e os adenocarcinomas apresentam origem bem distinta, já a origem do carcinoma de células grandes ainda não é bem estabelecida. Os adenocarcinomas apresentam características broncoalveolares e alveolares (co-expressão do antígeno 10 de células Clara e da proteína C surfactante de células alveolares do tipo 2), assim, a hipótese é de que estes tumores derivam de células da junção broncoalveolar com o oncogene K-RAS ativado denominadas células-tronco broncoalveolares (KIM et al., 2005; JACKSON et al., 2001). Ao passo que os carcinomas de células epidermóides são de origem traqueal, iniciando-se por células basais mutadas com fenótipo positivo para as queratinas 5 e 14 e para o fator de transcrição p63 (BORTHWICK et al., 2001). Vale ressaltar ainda que os casos de adenocarcinoma são mais frequentes entre os CPCNP e apresentam incidência crescente, enquanto o carcinoma de células epidermóides tem sua incidência em declínio junto a redução da taxa de fumantes (ALBERG; BROCK; SAMET, 2005; CHANG et al., 2009; CHARLOUX et al., 1997; JANSSEN-HEIJNEN; COEBERGH, 2001; TSUKAZAN et al., 2017).

Apesar do fumo ser responsável por cerca de 90% de todos os casos de CP e do abandono deste hábito aumentar a sobrevivência de pacientes já

diagnosticados, vale destacar que o CP em pacientes sem histórico de fumo é a principal causa de morte por câncer (BOLOKER; WANG; ZHANG, 2018; CATALDO et al., 2010; PASIC et al., 2004; HO et al., 2017). Nestes casos, a causa é atribuída a outros fatores que estão intimamente relacionados ao aumento do risco de desenvolvimento desta neoplasia, tais quais: as dietas de baixo consumo de frutas e verduras; a poluição atmosférica; a doença pulmonar obstrutiva crônica; os fatores genéticos e a exposição ocupacional aos metais, aos pesticidas e às radiações (BOFFETTA, 2006; BOING; ROSSI, 2007; SAITO et al., 2017). Os casos de CP não associados ao fumo ocorrem principalmente em mulheres e são, com maior frequência, adenocarcinomas (SAITO et al., 2017; SAMET et al., 2009; YANO et al., 2011).

No que tange as linhas de tratamento para os CPCNP, em estágios iniciais, todos os subtipos são tratados com cirurgia podendo associar-se aos protocolos de rádio- e/ou quimioterapia. Ao passo que a doença metastática, conforme o fluxograma da Figura 1, apresenta como primeira linha a imunoterapia utilizando o pembrolizumab, um anticorpo monoclonal anti-proteína 1 de morte celular programada (PD-1) para tumores com alta expressão de ligante da proteína 1 de morte celular programada (PDL-1) ou as “terapias-alvo” para os receptores de tirosina quinase do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), a quinase do linfoma anaplásico (ALK) e o proto-oncogene ROS1 (ROS1), caso os tumores sejam positivos para alterações nessas proteínas (GARON et al., 2015; HANNA et al., 2017; PLANCHARD et al., 2019; VOKES et al., 2018). A mutação mais comum é em EGFR, principalmente entre asiáticos, o que permite utilizar como a terapia de primeira linha com os inibidores de tirosina quinase anti-EGFR, tais quais erlotinib, gefitinib ou afatinib (SEQUIST et al., 2008). Por outro lado, pacientes com a fusão de ALK e a mutação em ROS1 são tratados com crizotinib, outro inibidor de tirosina quinase (SGAMBATO et al., 2018).

Os pacientes que apresentarem progressão da doença após a imunoterapia e/ou a terapia com inibidores de tirosina quinase seguirão seu tratamento na mesma conduta terapêutica dos pacientes que não apresentam estes fenótipos. Ou seja, os protocolos de rádio- e/ou quimioterapia clássica de *doublet* de platina (associação de cisplatina ou carboplatina com pemetrexede

ou bevacizumab ou paclitaxel ou gemcitabina ou docetaxel ou vinorelbina) por 4 a 6 ciclos são a escolha clínica mais adequada. Em caso de resistência aos *doublet* de platina, o tratamento é feito pelo uso de docetaxel em monoterapia ou associado a outros fármacos como o ramucirumab. Contudo, o tratamento dos tumores epidermóides não devem seguir protocolos contendo pemetrexede, ramucirumab e bevacizumab devido ao risco de hemorragia graves nestes casos (ETTINGER et al., 2018; HANNA et al., 2017; PLANCHARD et al., 2019; THOMAS et al., 2015; VANSTEENKISTE et al., 2013).

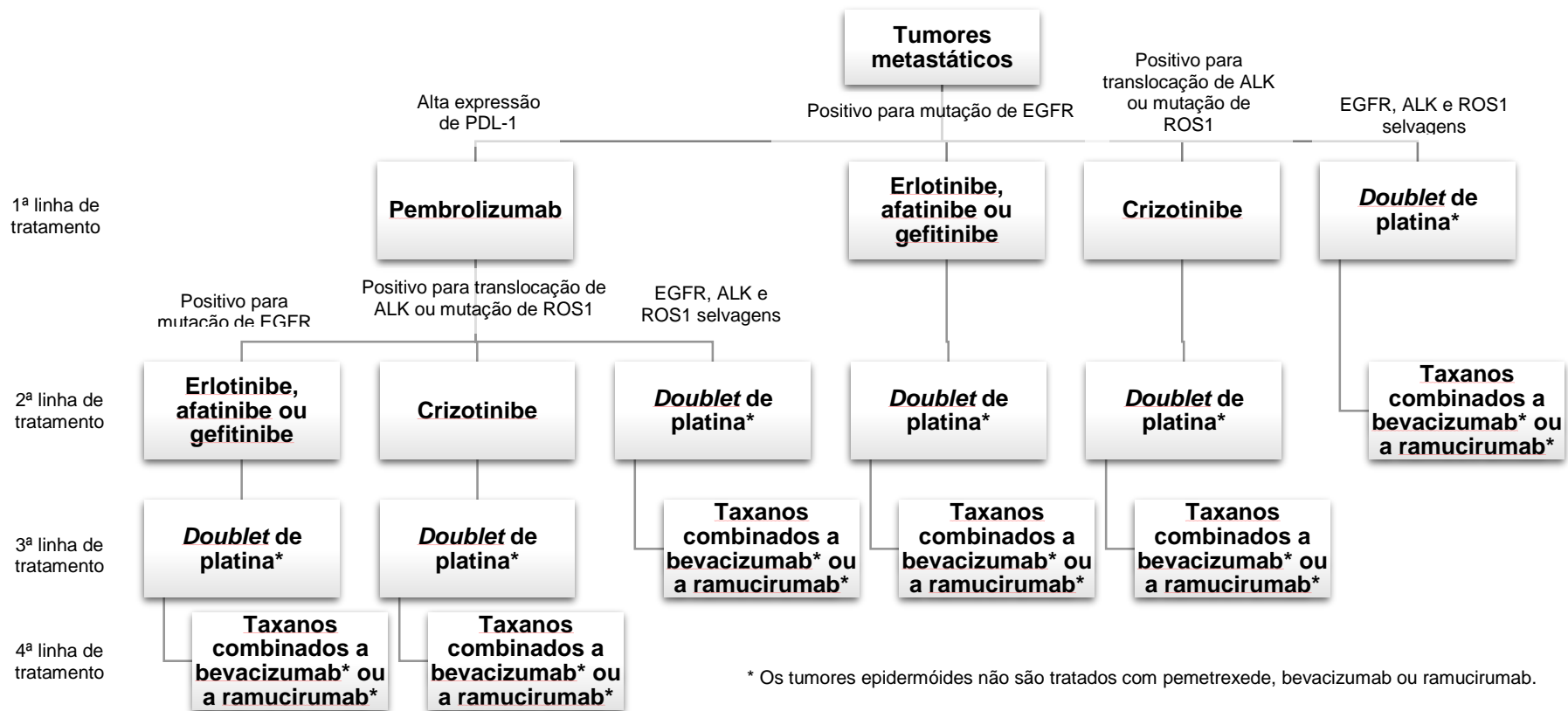


Figura 1 – Fluxograma de tratamento de CPCNP metastático inoperáveis segundo os guias práticos da *European Society for Medical Oncology (ESMO)* e da *American Society of Clinical Oncology (ASCO)*. A primeira linha de tratamento para CPCNP nos estádios avançados é a imunoterapia com pembrolizumab para tumores com alta expressão de PDL-1. Os tumores resistentes a este tratamento ou com baixa expressão de PDL-1 são prioritariamente tratados com os inibidores de tirosina quinase, caso sejam positivos para mutações no EGFR ou no ROS1 ou translocação de ALK. Em contrapartida os tumores sem essas alterações ou resistentes às linhas de tratamento anteriores são tratados com o *doublet de platina, ou seja, a combinação de cisplatina ou carboplatina com pemetrexede, bevacizumab, paclitaxel, gemcitabina, vinorelbina ou docetaxel. Vale frisar que os tumores epidermóides não podem ser tratados com pemetrexede, bevacizumab ou ramucirumab. Em todos os casos a segunda linha terapêutica usa docetaxel em monoterapia ou combinado com ramucirumab.**

Embora a cirurgia nos estágios iniciais possa ser curativa, 70% dos casos de CPCNP são diagnosticados já em estádios avançados e, por conseguinte, são inoperáveis (ARAUJO et al. 2018; BOLOKER; WANG; ZHANG, 2018; VANSTEENKISTE et al., 2013). Este diagnóstico tardio deve-se, em parte, aos sintomas genéricos da doença e que aparecem tardiamente, tais quais tosse persistente, dor e perda de peso (WOOD et al., 2018). No intuito de alterar este cenário, o *National Lung Cancer Screening Trial* realizou triagens anuais em pacientes de alto risco (fumantes e ex-fumantes com idade entre 55 e 80 anos com histórico de fumo de 30 maços cigarros ou mais por ano), no entanto, dado ao seu custo, o estresse o qual o paciente é submetido e a detecção frequente de nódulos benignos, estas triagens preventivas estão ainda sendo avaliadas (NLSTRT et al., 2011; WOOD et al., 2018). No Brasil, estas triagens ainda não são prática clínica devido a seus custos, falta de profissionais preparados e aos altos índices de doenças granulomatosas na população (DE SÁ et al., 2016).

Desta forma, apesar da redução das taxas de morte e de novos casos de CP relacionadas ao tabaco devido às extensivas políticas públicas de saúde no Brasil e no mundo (LEVY; DE ALMEIDA; SZKLO, 2012), as tentativas de diagnóstico precoce e todos os avanços terapêuticos das últimas décadas (DENG; NAKAMURA, 2017; GOTWALS et al., 2017; KUMAR et al., 2017; ROY; TRINCHIERI, 2017), o prognóstico dos pacientes com o CP permanece ruim (BOLOKER; WANG; ZHANG, 2018; SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2018). Neste contexto, o CP e, principalmente o adenocarcinoma de pulmão, são desafios à saúde pública nacional e mundial, sendo, pois, necessária a busca por estratégias inovadoras para transformar este cenário.

1.3A importância da fosfadiletanolamina no contexto tumoral

Ao buscar por novos alvos terapêuticos, inicialmente é necessário compreender que os fármacos clássicos utilizados no tratamento do câncer têm como alvos a replicação do DNA e a divisão celular, porém, alvos relacionados aos fosfolípidos vêm ganhando destaque no desenvolvimento de novos antineoplásicos (IORIO et al., 2010; KECKESOVA et al., 2017; MARINO et al., 2015; VALENZUELA-OSES et al., 2017; WEICHERT et al., 2014). Este interesse advém das funções celulares e da presença de alterações relacionadas aos

fosfolipídios no contexto tumoral (IGAL, 2010; MENENDEZ; LUPU, 2007; RYSMAN et al., 2010; SCOTT et al., 2010; SWINNEN et al., 2003). Os fosfolipídios, além de serem os principais componentes das membranas plasmáticas (ROTHMAN; LENARD, 1977), também estão relacionados aos processos de crescimento, proliferação, diferenciação, sobrevivência, apoptose, inflamação e motilidade (HUANG; FRETER, 2015; VANCE; TASSEVA, 2013). Juntos, todos esses processos celulares, apresentam-se alterados e são de extrema importância na iniciação e no desenvolvimento tumoral. Desta forma, as vias de produção de fosfolipídios estão aumentadas nas células tumorais e tornam-se possíveis alvos em potencial para o desenvolvimento de novas terapias antitumorais (HANAHAN; WEINBERG, 2011; IGAL, 2010; MENENDEZ; LUPU, 2007).

Dentre os mais abundantes fosfolipídios das membranas celulares temos a fosfatidiletanolamina (PE), que desempenha importantes papéis em processos fisiológicos, tanto diretamente quanto através de seus metabólitos biologicamente ativos, tais como, ácidos graxos livres e diacilglicerol, ambos importantes segundos mensageiros intracelulares (VANCE, 2008). Diversas das atividades exercidas pela PE estão intimamente relacionadas aos mecanismos de desenvolvimento tumoral como a citocinese (EMOTO et al., 1996), a apoptose (EMOTO et al., 1997) e a autofagia (LAMB, YOSHIMORI, TOOZE, 2013; ROCKENFELLER et al., 2015).

As perturbações na produção de PE geram alterações nas sinalizações celulares devido à função de chaperona deste fosfolipídio que faz pontes de hidrogênio com uma ampla variedade de aminoácidos (MILEYKOVSKAYA; DOWHAN, 2005; SIGNORELL et al., 2009). Além de suas características anfipáticas e de sua forma cônica (QUINN, 2010) que, juntas, permitem a topologia adequada dos domínios de membrana. Ao considerar os papéis da PE na morte celular, esta forma os intermediários nos processos de fusão e fissão de membrana, como as proteínas mitofusina 1 e mitofusina 2, diretamente associadas a proliferação e sobrevivência das células tumorais pelo constante recrutamento da PE (REHMAN et al., 2012). Em relação à maquinaria mitocondrial, a PE é crucial na biogênese das proteínas da membrana externa mitocondrial TOM e a SAM, além de manter a sintonia entre as proteínas da

membrana externa mitocondrial relacionadas à apoptose, como BAD, BAX e BID (LI et al., 2015). Ademais, a PE está intimamente relacionada a formação do sulco de clivagem, assegurando uma citocinese adequada pela sua redistribuição para o folheto externo da membrana (EMOTO et al., 1996), propiciando uma curvatura de membrana adequada, auxiliando o estrangulando o citoplasma pela contração dos filamentos proteicos de actina e miosina (EMOTO et al., 2000). Neste contexto, estudos com o produto natural ofiobolina A mostraram o potencial antineoplásico da redução da funcionalidade da PE em células tumorais pela ligação covalente da ofiobolina a este fosfolípido, formando poros na membrana celular (CHIDLEY et al., 2016).

Tecidos tumorais de amostras de pacientes com CPCNP, quando comparado ao tecido de uma região pulmonar não afetada, apresentam alterações proeminentes no perfil de fosfolípidios, em especial um aumento da PE (MARIEN et al., 2015). Portanto, há um interessante potencial terapêutico relacionado à intervenção no metabolismo dos fosfolípidios e, em especial, a PE, principalmente em modelo de CPCNP.

1.4 Biossíntese da fosfatidiletanolamina

Em células eucarióticas, quantitativamente, a principal via de produção de PE é a via de Kennedy (Figura 2), em que a PE é sintetizada a partir da fosforilação da etanolamina pela etanolamina-quinase, seguida da conversão da fosfoetanolamina em PE pela ação da CTP:fosfoetanolamina-citidilil-transferase (Pcyt2) (GIBELLINI; SMITH, 2010; PAVLOVIC; BAKOVIC, 2013). Apesar da via de Kennedy ser a principal rota de produção da PE, esta também é sintetizada a partir da via de descarboxilação da fosfatidilserina nas mitocôndrias através da ação da enzima fosfatidilserina descarboxilase (VANCE, 2008). Esta última via de produção de PE é importante principalmente na geração de PE com ácidos graxos polinsaturados que serão preferencialmente mantidos na mitocôndria. No entanto, esta via pode compensar os casos onde ocorre a redução de produção de PE pela via de Kennedy (BLEIJERVELD et al., 2007).

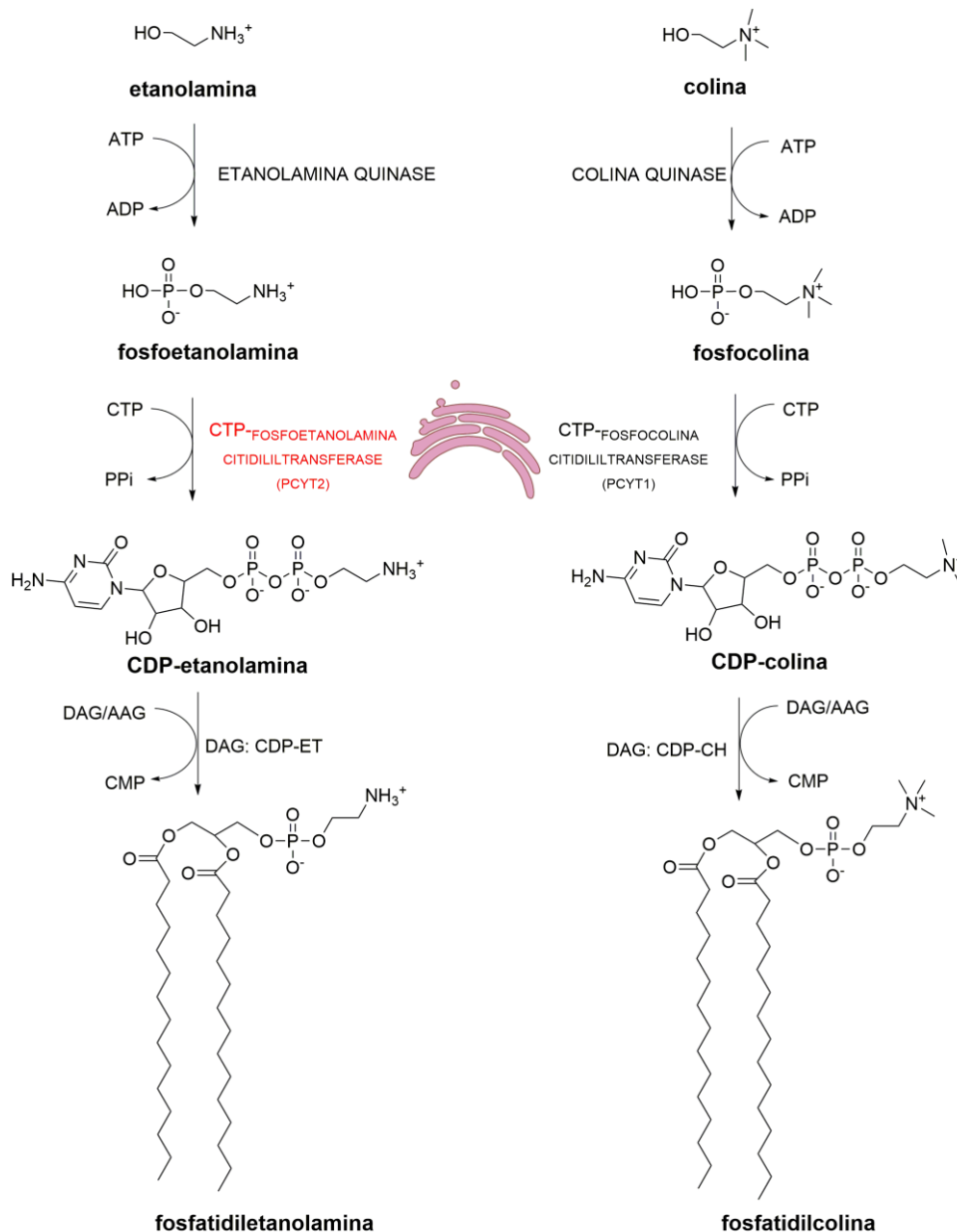


Figura 2 – A via de Kennedy: as reações da principal via de biossíntese dos dois fosfolipídios de membrana mais abundantes. A via de Kennedy apresenta duas rotas distintas para a produção de, respectivamente, PE e a fosfatidilcolina. As duas rotas são bem similares e apresentam enzimas análogas, responsáveis pela conversão dos precursores, etanolamina e a colina, em seus respectivos fosfolipídios. A via de Kennedy é iniciada pela ação de uma amino-álcool-fosfotransferase que fosforila a etanolamina ou a colina, resultando na produção da fosfoetanolamina e fosfocolina, respectivamente. A reação subsequente entre a citidina 5' trifosfato (CTP) e os produtos fosforilados é mediada pelas enzimas Pcyt2 e CTP:fosfocolina-citidilil-transferase, resultando na produção de CDP-etanolamina ou CDP-colina e pirofosfato. A última etapa da reação é pela CDP etanolamina: 1,2-diacilglicerol etanolamina fosfotransferase ou CDP colina: 1,2-diacilglicerol colina fosfotransferase, que acopla o produto da reação anterior ao diacilglicerol formado como produto final a PE ou a fosfatidilcolina, respectivamente. Neste contexto, essas enzimas surgem como possíveis alvos terapêuticos para reduzir a excessiva reciclagem de membrana das células tumorais, em especial, enzima da etapa limitante da reação, presente no retículo endoplasmático, Pcyt2 (destacada em vermelho).

Neste contexto, a Pcyt2 surge como um alvo terapêutico potencial, pois compõe a etapa limitante da principal via de produção do segundo fosfolípido de membrana mais abundante (SUNDLER; AKESSON, 1975), encontra-se frequentemente superexpressa em diversos tumores malignos, incluindo o CP (PAVLOVIC; BAKOVIC, 2013). Ademais, a inibição do transporte de etanolamina também apresenta um grande potencial para o desenvolvimento de novos fármacos antitumorais, dado que sua inibição levaria à redução da produção da PE, pela redução do substrato inicial, a etanolamina, que é adquirida exclusivamente através da dieta ou da troca de bases com a serina na via de decarboxilação da fosfatidilserina (BREMER et al., 1960). Desde a década de 80, o transporte desta amina de carga positiva em pH fisiológico já é estudado, sendo realizado de forma dependente ou não de sódio, como no caso da borda em escova da placenta, em que o transporte ocorre por meio de vesículas (GRASSL, 2011; YOREK et al., 1985; ZELINSKI; CHOY, 1982). Portanto, a inibição do transporte de etanolamina culmina na redução de produção de PE pela redução de disponibilidade do substrato inicial, a etanolamina (YOREK et al., 1985).

Ambas as estratégias, a inibição da enzima Pcyt2 e a inibição do transporte de etanolamina, levam a redução da produção de PE, que culmina na parada da divisão celular, desestruturação dos *lipid rafts*, alteração da produção de segundos mensageiros e apoptose (EMOTO; UMEDA, 2000; SIGNORELL et al., 2009; VANCE, 2008; ZHU; BAKOVIC, 2012). A inibição da Pcyt2 leva ao acúmulo de seu substrato, a fosfoetanolamina, que, quando em excesso, leva à inibição da respiração celular mitocondrial (FERREIRA et al., 2012^a; FERREIRA et al., 2012^b; FERREIRA et al., 2013; GOHIL et al., 2013; MAMBELLI et al., 2018). No entanto, há poucos relatos do papel da enzima Pcyt2 nos processos de iniciação e desenvolvimento tumoral, sendo frequentemente relacionada aos processos oxidativos, isquemia, esteatose hepática, resistência à insulina, hipertrigliceridemia e como uma estratégia neuroprotetora (SINGH et al., 2012; BASU et al., 2015).

Ademais, há poucos relatos na literatura de uso de inibidores da Pcyt2, como a meclizina (Figura 3A) (GOHIL et al., 2013), ou inibidores do transporte de etanolamina, como o DL-1-amino-2-propanol (Figura 3B) (RIFKIN;

STROBOS; FAIRLAMB, 1995), para fins antitumorais e, nenhum destes com avaliação em modelo *in vivo* ou em CP. Além do uso clássico da meclizina para combater náuseas e vertigem, este fármaco já foi estudado com citoprotetor em casos de isquemia cardíaca, cerebral e renal (GOHIL et al., 2010; KISHI et al., 2015; ZHUO, GORGUN, ENGLANDER, 2016), na doença de Huntington (GOHIL et al., 2011) e na doença de Parkinson (HONG, CHAU, SCHAPIRA, 2016).

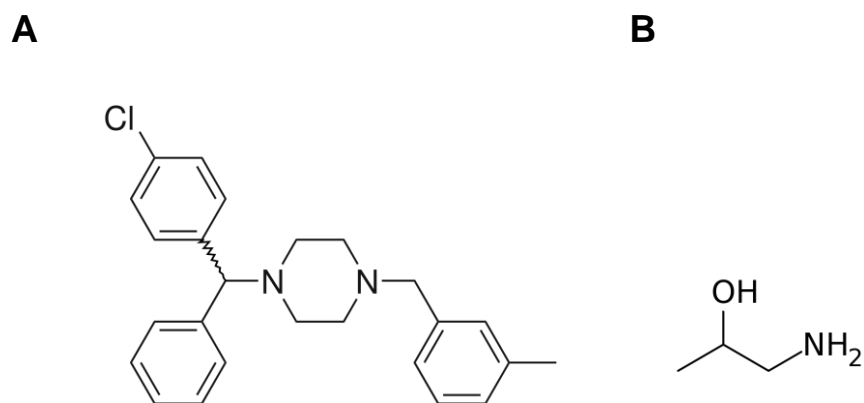


Figura 3 – Estrutura molecular da meclizina e do DL-1-amino-2-propanol. (A) A meclizina foi o primeiro inibidor da enzima Pcyt2 descrito na literatura. (B) O DL-1-amino-2-propanol é um composto muito semelhante estruturalmente à etanolamina e por isso é utilizado como inibidor competitivo do transporte de etanolamina.

1.5 Estudos prévios de um potencial inibidor da enzima Pcyt2

Estudos prévios realizados pelo nosso grupo já demonstraram o potencial da Pcyt2 no CP como alvo terapêutico para o tratamento do CP através do uso de um inibidor da enzima Pcyt2, denominado CHY-1 (dados não publicados). O CHY-1 foi o composto mais promissor selecionado de um conjunto de mais de oitenta derivados de éter fosfolípides que foram estudados através de métodos de modelagem molecular e da aplicação de ferramentas quimiométricas incluindo a análise hierárquica de *cluster* e a análise de componentes principais (HCA/PCA). Tais análises identificaram padrões de similaridade capazes de selecionar CHY-1 como um inibidor da enzima Pcyt2.

Em seguida, o CHY-1 apresentou efeitos citotóxicos preferenciais para células tumorais, em cultura bi e tridimensional, de células de CPCNP. A concentração citotóxica máxima utilizada de CHY-1 em células de CPCNP não reduziu a viabilidade de células de linhagem de fibroblasto humano de pulmão. Esses dados sugeriram a seletividade citotóxica de CHY-1 para células tumorais.

Ademais, CHY-1 também apresentou efeito antiproliferativo nas células de CPCNP, inibindo a formação de colônias por parada na transição das células da fase G1 para a S do ciclo celular, por mecanismos que envolvem a redução do complexo ciclina-A/Cdk2 e a expressão da proteína Cdk1 (dados não publicados). Dentre os mecanismos relacionados à toxicidade de CHY-1 estão também alterações derivadas do estresse do retículo endoplasmático devido a redução da produção de PE, tais como: o acúmulo de proteínas desdobradas ou deformadas, a inibição da síntese de proteínas anti-apoptóticas e o bloqueio da autofagia (dados não publicados). Ainda, o CHY-1 levou à desestruturação mitocondrial e ao aumento da expressão de calpaína 1. Além dos efeitos tóxicos diretos de CHY-1, este composto levou ao aumento da externalização de calreticulina e a liberação de HMGB1 nas células tumorais, sinais estes relacionados à indução de morte imunogênica, um interessante efeito que pode levar a uma resposta sinérgica do sistema imune contra o tumor.

No entanto, ao avaliar a inibição da atividade catalítica da Pcyt2 utilizando o isótopo radioativo [¹⁴C] fosfoetanolamina, o CHY-1 reduziu a produção de PE não apenas pela inibição de forma não competitiva, mas também inibindo o transporte de etanolamina. Este último efeito, potencializa o efeito inibitório de CHY-1 sobre a produção de PE em CPCNP. Contudo, esse segundo efeito inespecífico de CHY-1 dificultou a compreensão precisa dos seus alvos e de seu mecanismo de ação terapêutico. Além da dificuldade de determinar o seu mecanismo de ação, CHY-1 também apresenta uma rota de síntese complexa, que inviabilizou a continuação de seus testes. Portanto, o nosso grupo iniciou testes com seu intermediário, denominado SF2.

Desta forma, este trabalho avaliou o potencial terapêutico isolado dos alvos Pcyt2 e transporte celular de etanolamina em modelos de CPCNP, pois, a partir da análise isolada de cada um desses alvos podemos avaliar melhor os efeitos dos inibidores desenvolvidos pelo grupo (CHY-1 e SF2) e outros potenciais inibidores destes alvos em modelo de CPCNP.

2 CONCLUSÕES

Em resumo, podemos afirmar que:

- A inibição farmacológica da enzima Pcyt2 e do transporte de etanolamina reduziu a viabilidade celular das células A549, LL2/LC1 e MRC5;
- As células de fibroblasto MRC5 foram menos sensíveis a inibição da enzima Pcyt2 e do transporte de etanolamina do que as células tumorais A549 e LL2/LC1;
- As células A549 e LL2/LC1 KO para a enzima Pcyt2 apresentaram redução de sua proliferação devido a parada em G0/G1 induzida por redução da proteína Rb fosforilada, através da ação da p21 e da p53 fosforilada;
- As células A549 e LL2/LC1 aumentaram sua taxa de proliferação quando cultivadas em meio suplementado com etanolamina;
- A inibição da enzima Pcyt2 nas células LL2/LC1 induziu danos mitocondriais não associados a indução de apoptose;
- As células LL2/LC1 KO são menos tumorigênicas do que as células WT;

Portanto, podemos concluir que a inibição da Pcyt2 e o transporte de etanolamina nas células de CPCNP A549 e LL2/LC1 apresenta efeitos citostáticos mais proeminentes do que os citotóxicos. Desta forma, estes alvos devem ser melhor estudados quanto aos seus efeitos citostáticos ou em combinação com agentes citotóxicos.

REFERÊNCIAS*

- ALBERG, A.J.; BROCK, M.V.; SAMET, J.M. Epidemiology of lung cancer: looking to the future. **J Clin Oncol.**, v. 23, n. 14, p. 3175-3185, 2005.
- ALUIGI, M.; FOGLI, M.; CURTI, A.; ISIDORI, A. et al. Nucleofection is an efficient nonviral transfection technique for human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Stem Cells.**, v. 24, n. 2, p. 454-461, 2006.
- ARAÚJO, L.H.; BALDOTTO, C.; CASTRO, G. JR.; KATZ, A. et al. Lung cancer in Brazil. **J Bras Pneumol.**, v. 44, n.1, p. 55-64, 2018.
- BASU, P.; ALIBHAI, F.J.; TSIMAKOURIDZE, E.V.; SINGH, R.K. et al. Male-Specific Cardiac Dysfunction in CTP:Phosphoethanolamine Cytidylyltransferase (Pcyt2)-Deficient Mice. **Mol Cell Biol.**, v. 35, n. 15, p. 2641-2657, 2015.
- BERTOLINI, F., SUKHATME, V.P.; BOUCHE, G. Drug repurposing in oncology-patient and health systems opportunities. **Nat. Rev. Clin. Oncol.**, v. 12, p. 732-742, 2015.
- BERTRAM, J.S.; JANIK, P. Establishment of a cloned line of Lewis lung carcinoma cells adapted to cell culture. **Cancer Lett.**, v. 11, n. 1, p. 63-73, 1980.
- BLEIJERVELD, O.B.; BROUWERS, J.F.; VAANDRAGER, A.B.; HELMS, J.B. et al. The CDP-ethanolamine pathway and phosphatidylserine decarboxylation generate different phosphatidylethanolamine molecular species. **J Biol Chem.**, v. 282, n. 39, p. 28362-28372, 2007.
- BOFFETTA, P. Human cancer from environmental pollutants: the epidemiological evidence. **Mutat Res.**, v. 608, n. 2, p. 157-162, 2006.
- BOING, A.F.; ROSSI, T.F. Temporal trend in and spatial distribution of lung cancer mortality in Brazil between 1979 and 2004: magnitude, regional patterns, and gender-related differences. **J Bras Pneumol.**, v. 33, n. 5, p. 544-551, 2007.
- BORTHWICK, D.W.; SHAHBAZIAN, M.; KRANTZ, Q.T.; DORIN, J.R.; et al. Evidence for stem-cell niches in the tracheal epithelium. **Am J Respir Cell Mol Biol.**, v. 24, n. 6, p. 662-670, 2001.
- BRAY, F.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; SIEGEL, R.L. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA Cancer J Clin.**, v. 68, n. 6, p. 394-424, 2018.
- BREMER, J.; FIGARD, P.H.; GREENBERG, D.M. The biosynthesis of choline and its relation to phospholipid metabolism. **Biochim Biophys Acta.**, v. 43, p. 477-488, 1960.
- BOLOKER, G.; WANG, C.; ZHANG, J. Updated statistics of lung and bronchus cancer in United States (2018). **J Thorac Dis.**, v. 10, n. 3, p. 1158-1161, 2018.
- CATALDO, J.K.; DUBEY, S.; PROCHASKA, J.J. Smoking cessation: an integral part of lung cancer treatment. **Oncology**, v. 78, n. 5-6, p. 289-301, 2010.

CHANG, J.W.; ASAMURA, H.; KAWACHI, R.; WATANABE, S. Gender difference in survival of resected non-small cell lung cancer: histology-related phenomenon? **J Thorac Cardiovasc Surg.**, v. 137, n. 4, p. 807-812, 2009.

CHARLOUX, A.; QUOIX, E.; WOLKOVE, N.; SMALL, D. et al. The increasing incidence of lung adenocarcinoma: reality or artefact? A review of the epidemiology of lung adenocarcinoma. **Int J Epidemiol.**, v. 26, n. 1, p. 14-23, 1997.

CHICAYBAM, L.; BARCELOS, C.; PEIXOTO, B.; CARNEIRO, M. et al. An Efficient Electroporation Protocol for the Genetic Modification of Mammalian Cells. **Front Bioeng Biotechnol.**, v. 4, n. 99, 2017.

CHIDLEY, C.; TRAUGER, S.A.; BIRSOY, K.; O'SHEA, E.K. The anticancer natural product ophiobolin A induces cytotoxicity by covalent modification of phosphatidylethanolamine. **Elife.**, v. 5, p. pii: e14601, 2016.

CLEARY, E.G.; BEIERLEIN, J.M.; KHANUJA, N.S.; MCNAMEE, L.M. et al. Contribution of NIH funding to new drug approvals 2010-2016. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 115, n. 10, p. 2329-2334, 2018.

COHEN, B.; DEJONG, J.M. Meclizine and placebo in treating vertigo of vestibular origin. Relative efficacy in a double-blind study. **Arch Neurol.**, v. 27, n. 2, p. 129-135, 1972.

DASARI, S.; TCHOUNWOU, P.B. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. **Eur J Pharmacol.**, v. 740, p. 364-78, 2014.

DAVIDSON, M.R.; GAZDAR, A.F.; CLARKE, B.E. The pivotal role of pathology in the management of lung cancer. **J Thorac Dis.**, v. Suppl 5, p. S463-S478, 2013.

DENG, X.; NAKAMURA, Y. Cancer Precision Medicine: From Cancer Screening to Drug Selection and Personalized Immunotherapy. **Trends Pharmacol Sci.**, v. 38, n. 1, p. 15-24, 2017.

DE RYCKER, M.; BARAGAÑA, B.; DUCE, S.L.; GILBERT, I.H. Challenges and recent progress in drug discovery for tropical diseases. **Nature**, v. 559, n. 7715, p. 498-506, 2018.

DE SÁ, V.K.; COELHO, J.C.; CAPELOZZI, V.L.; DE AZEVEDO, S.J. Lung cancer in Brazil: epidemiology and treatment challenges. **Lung Cancer (Auckl).**, v. 14, n. 7, p. 141-148, 2016.

DOBDELSTEIN, M.; MOLL, U. Targeting tumour-supportive cellular machineries in anticancer drug development. **Nat Rev Drug Discov.**, v. 13, n. 3, p. 179-196, 2014.

EKIM, B.; MAGNUSON, B.; ACOSTA-JAQUEZ, H.A.; KELLER, J.A. et al. mTOR kinase domain phosphorylation promotes mTORC1 signaling, cell growth, and cell cycle progression. **Mol Cell Biol.**, v. 31, n. 14, p. 2787-2801, 2011.

EMOTO, K.; KOBAYASHI, T.; YAMAJI, A.; AIZAWA, H. et al. Redistribution of phosphatidylethanolamine at the cleavage furrow of dividing cells during cytokinesis. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 93, n. 23, p. 12867-1272, 1996.

EMOTO, K.; TOYAMA-SORIMACHI, N.; KARASUYAMA, H.; INOUE, K. et al. Exposure of phosphatidylethanolamine on the surface of apoptotic cells. **Exp Cell Res.**, v. 232, p. 430-434, 1997.

EMOTO, K.; UMEDA, M. An essential role for a membrane lipid in cytokinesis. Regulation of contractile ring disassembly by redistribution of phosphatidylethanolamine. **J Cell Biol.**, v. 149, p. 1215-1224, 2000.

ETTINGER, D.S.; AISNER, D.L.; WOOD, D.E.; AKERLEY, W. et al. NCCN Guidelines Insights: Non-Small Cell Lung Cancer, Version 5.2018. **J Natl Compr Canc Netw.**, v. 16, n. 7, p. 807-821, 2018.

^a FERREIRA, A.K.; MENEGUELO, R.; MARQUES, F.L.; RADIN, A. 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. **Biomed Pharmacother.**, v. 66, n. 7, p. 541-548, 2012.

^b FERREIRA, A.K.; MENEGUELO, R.; PEREIRA, A.; MENDONÇA FILHO, O. et al. Anticancer effects of synthetic phosphoethanolamine on Ehrlich ascites tumor: an experimental study. **Anticancer Res.**, v. 32, n. 1, p. 95-104, 2012.

FERREIRA, A.K.; MENEGUELO, R.; PEREIRA, A.; FILHO, O.M. et al. Synthetic phosphoethanolamine induces cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells through the mitochondrial pathway. **Biomed Pharmacother.**, v. 67, n. 6, p. 481-487, 2013.

GARON, E.B.; RIZVI, N.A.; HUI, R.; LEIGHL, N. et al. Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. **N Engl J Med.**, v. 372, n. 21, p. 2018-20, 2015.

GIBELLINI, F.; SMITH, T.K. The Kennedy pathway--De novo synthesis of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine. **IUBMB Life**, v. 62, n. 6, p. 414-428, 2010.

GIBBS, J.B. Mechanism-based target identification and drug discovery in cancer research. **Science**, v. 287, n. 5460, p. 1969-1973, 2000.

GLOBAL BURDEN OF DISEASE 2017 CAUSES OF DEATH COLLABORATORS (GBD 2017). Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. **Lancet**, v. 392, n. 10159, p. 1736-1788, 2018.

GOHIL, V. M.; OFFNER, N.; WALKER, J.A.; SHETH, S.A.; FOSSALE, E.; GUSELLA, J.F.; MACDONALD, M.E.; NERI, C.; MOOTHA, V. K. Meclozine is neuroprotective in models of Huntington's disease. **Hum. Mol. Genet.**, v. 20, n. 2, p. 294-300, 2011.

GOHIL, V.M.; SHETH, S.A.; NILSSON, R.; WOJTOVICH, A.P.; LEE J. H., PEROCCHI F., CHEN W., CLISH C. B., AYATA C., BROOKES P. S., MOOTHA V. K. (2010) Nutrient-sensitized screening for drugs that shift energy metabolism from mitochondrial respiration to glycolysis. **Nat. Biotechnol.**, v. 28, n. 3, p. 249-255, 2010.

GOHIL, V.M.; ZHU, L.; BAKER, C.D.; CRACAN, V. et al. Meclizine inhibits mitochondrial respiration through direct targeting of cytosolic phosphoethanolamine metabolism. **J Biol Chem.**, v. 288, n. 49, p. 35387-35395, 2013.

GOTWALS, P.; CAMERON, S.; CIPOLLETTA, D.; CREMASCO, V. et al. Prospects for combining targeted and conventional cancer therapy with immunotherapy. **Nat Rev Cancer**, v. 17, n. 5, p. 286-301, 2017.

GRASSL, S.M. Ethanolamine transport in human placental brush-border membrane vesicles. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 298, n. 2, p. 695-702, 2001.

HAN, N.R.; LEE, H.; BAEK, S.; YUN, J.I. et al. Delivery of episomal vectors into primary cells by means of commercial transfection reagents. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 461, n. 2, p. 348-353, 2015.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HANNA, N.; JOHNSON, D.; TEMIN, S.; MASTERS, G. Systemic Therapy for Stage IV Non-Small-Cell Lung Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update Summary. **J Oncol Pract.**, v. 13, n. 12, p. 832-837, 2017.

HAUTEFORT, I.; PROENÇA, M.J.; HINTON, J.C.D. Single-Copy Green Fluorescent Protein Gene Fusions Allow Accurate Measurement of Salmonella Gene Expression In Vitro and during Infection of Mammalian Cells. **Appl Environ Microbiol.**, v. 69, n. 12, p. 7480-7491, 2003.

HEIM, R.; PRASHER, D.C.; TSIEN, R.Y. Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 91, n. 26, p. 12501-12504, 1994.

HO, J.; MCWILLIAMS, A.; EMERY, J.; SAUNDERS, C. et al. Integrated care for resected early stage lung cancer: innovations and exploring patient needs. **BMJ Open Respir Res.**, v. 4, n. 1, p. e000175, 2017.

HONG, C.T.; CHAU, K.Y.; SCHAPIRA, A.H. Meclizine-induced enhanced glycolysis is neuroprotective in Parkinson disease cell models. **Sci Rep.**, v. 6, p. 25344, 2016.

HUANG, C.; FRETER, C. Lipid metabolism, apoptosis and cancer therapy. **Int J Mol Sci.**, v. 16, n. 1, p. 924-949, 2015.

IGAL, R.A. Stearoyl-CoA desaturase-1: a novel key player in the mechanisms of cell proliferation, programmed cell death and transformation to cancer. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 9, p. 1509-1515., 2010.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA), 2017. **Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2017. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/estimativa-2018.pdf>. Acesso em: 07, ago, 2018.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA), 2014. **Atlas On-line de Mortalidade**. Disponível em: <https://mortalidade.inca.gov.br/MortalidadeWeb/>. Acesso em: 07, ago, 2018.

IORIO, E.; RICCI, A.; BAGNOLI, M.; PISANU, M.E. et al. Activation of phosphatidylcholine cycle enzymes in human epithelial ovarian cancer cells. **Cancer Res.** v.70, n. 5, p. 2126-2135, 2010.

JACKSON, E.L.; WILLIS, N.; MERCER, K.; BRONSON, R.T. et al. Analysis of lung tumor initiation and progression using conditional expression of oncogenic K-ras. **Genes Dev.**, v. 15, n. 24, p. 3243-3248, 2001.

JANSEN, R.; EMBDEN, J.D.; GAASTRA, W.; SCHOULS, L.M. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. **Mol Microbiol.**, v. 43, n. 6, p. 1565-1575, 2002.

JANSSEN-HEIJNEN, M.L.; COEBERGH, J.W. Trends in incidence and prognosis of the histological subtypes of lung cancer in North America, Australia, New Zealand and Europe. **Lung Cancer**, v. 31, n. 2-3, p. 123-137, 2001.

KAELIN, W.G. JR. Common pitfalls in preclinical cancer target validation. **Nat Rev Cancer**, v. 17, n. 7, p.425-440, 2017.

KANO-SUEOKA, T.; KING, D.M. Phosphatidylethanolamine biosynthesis in rat mammary carcinoma cells that require and do not require ethanolamine for proliferation. **J Biol Chem.**, v. 262, n. 13, p. 6074-6081, 1987.

KECKESOVA, Z.; DONAHER, J.L.; DE COCK, J.; FREINKMAN, E. et al. LACTB is a tumour suppressor that modulates lipid metabolism and cell state. **Nature**, v. 543, n. 7647, p. 681-686, 2017.

KIM, C.F.; JACKSON, E.L.; WOOLFENDEN, A.E.; LAWRENCE, S. et al. Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. **Cell**, v. 121, n. 6, p.823-835, 2005.

KIM, T.K.; EBERWINE, J.H. Mammalian cell transfection: the present and the future. **Anal Bioanal Chem.**, v. 397, n. 8, p. 3173–3178, 2010.

KISHI, S.; CAMPANHOLLE, G; GOHIL, V.M.; PEROCCHI, F.; BROOKS, C.R.; MORIZANE, R.; SABBISSETTI, V.; ICHIMURA, T.; MOOTHA, V.K.; BONVENTRE, J.V. Meclizine Preconditioning Protects the Kidney Against Ischemia-Reperfusion Injury. **EBioMedicine**, v. 2, n. 9, p. 1090-1101, 2015.

KOEHN, F.E.; CARTER, G.T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nat Rev Drug Discov.**, v. 4, n.3, p. 206-220, 2005.

KUMAR, B.; SINGH, S.; SKVORTSOVA, I.I.; KUMAR, V. Promising Targets in Anti-cancer Drug Development: Recent Updates. **Curr Med Chem.**, v. 24, n. 42, 4729-4752, 2017.

LAMB, C.A.; YOSHIMORI, T.; TOOZE, S.A. The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, v. 14, n. 12, p. 759-774, 2013.

LEVY, D.; DE ALMEIDA, L.M.; SZKLO, A. The Brazil SimSmoke policy simulation model: the effect of strong tobacco control policies on smoking prevalence and smoking-attributable deaths in a middle income nation. **PLoS Med.**, v. 9, n. 11, p. e1001336, 2012.

LI, J.; QI, W.; CHEN, G.; FENG, D. et al. Mitochondrial outer-membrane E3 ligase MUL1 ubiquitinates ULK1 and regulates selenite-induced mitophagy. **Autophagy.**, v. 11, n. 8, p. 1216-1229, 2015.

MAMBELLI, L.I.; TEIXEIRA, S.F.; JORGE, S.D.; KAWAMURA, B. et al. Phosphoethanolamine induces caspase-independent cell death by reducing the expression of C-RAF and inhibits tumor growth in human melanoma model. **Biomed Pharmacother.**, v. 103, p. 18-28, 2018.

MARIEN, E.; MEISTER, M.; MULEY, T.; FIEUWS, S. et al. Non-small cell lung cancer is characterized by dramatic changes in phospholipid profiles. **Int J Cancer**, v. 137, n. 7, p. 1539-1548, 2015.

MARINO, R.; BAIU, D.C.; BHATTACHARYA, S.; TITZ, B. et al. Tumor-selective anti-cancer effects of the synthetic alkyl phosphocholine analog CLR1404 in neuroblastoma. **Am J Cancer Res.**, v. 5, n. 11, p. 3422-3435, 2015.

MAXMEN, A. Busting the billion-dollar myth: how to slash the cost of drug development. **Nature**, v. 536, p. 388-390, 2016.

MENENDEZ, J.A.; LUPU, R. Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. **Nat Rev Cancer**, v. 7, n. 10, p. 763-777, 2007.

MEUWISSEN, R.; LINN, S.C.; LINNOILA, R.I.; ZEVENHOVEN, J., et al. Induction of small cell lung cancer by somatic inactivation of both Trp53 and Rb1 in a conditional mouse model. **Cancer Cell**, v. 4, n. 3, p. 181-189, 2013.

MILEYKOVSKAYA, E.; DOWHAN, W. Role of membrane lipids in bacterial division-site selection. **Curr Opin Microbiol.**, v. 8, n. 2, p. 135-142, 2005.

MILLER, A.D. The problem with cationic liposome/micelle-based non-viral vector systems for gene therapy. **Curr Med Chem.**, v. 10, n. 14, p. 1195-1211, 2003.

MOHS, R.C.; GREIG, N.H. Drug discovery and development: Role of basic biological research. **Alzheimers Dement.**, v. 3, n. 4, p. 651-657, 2017.

NATIONAL LUNG SCREENING TRIAL RESEARCH TEAM (NLSTRT), ABERLE, D.R.; ADAMS, A.M.; BERG, C.D. et al. Reduced lung-cancer mortality with low-

dose computed tomographic screening. **N Engl J Med.**, v. 365, n. 5, p. 395-409, 2011.

OVERINGTON, J.P.; AL-LAZIKANI, B.; HOPKINS, A.L. How many drug targets are there? **Nat Rev Drug Discov.**, v. 5, n. 12, p. 993-996, 2006.

PAPAGEORGIU, A.; STRAVORAVDI, P.; SAHPAZIDOU, D.; NATSIS, K. et al. Effect of navelbine on inhibition of tumor growth, cellular differentiation and estrogen receptor status on Lewis lung carcinoma. **Chemotherapy**, v. 46, n. 3, p. 188-194, 2000.

PASIC, A.; POSTMUS, P.E.; SUTEDJA, T.G. What is early lung cancer? A review of the literature. **Lung Cancer**, v. 45, n. 3, p. 267-277, 2004.

PAVLOVIC, Z.; BAKOVIC, M. Regulation of Phosphatidylethanolamine Homeostasis - The Critical Role of CTP:Phosphoethanolamine Cytidylyltransferase (Pcyt2). **Int J Mol Sci.**, v. 14, n. 2, p. 2529-2550, 2013.

PENG, R.; LIN, G.; LI, J. Potential pitfalls of CRISPR/Cas9-mediated genome editing. **FEBS J.**, v. 283, n. 7, p. 1218-1231, 2016.

PETIT, C.S.; ROCZNIAK-FERGUSON, A.; FERGUSON, S.M. Recruitment of folliculin to lysosomes supports the amino acid-dependent activation of Rag GTPases. **J Cell Biol.**, v. 202, n. 7, p. 1107-1122, 2013.

PLANCHARD, D.; POPAT, S.; KERR, K.; NOVELLO, S. et al. Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Ann Oncol.**, v. 30, n. 5, p. 863-870, 2019.

QUINN, P.J. A lipid matrix model of membrane raft structure. **Prog Lipid Res.**, v. 49, n. 4, p. 390-406, 2010.

RAN, F.A.; HSU, P.D.; LIN, C.Y.; GOOTENBERG, J.S. et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. **Cell**, v. 154, n. 6, p. 1380-1389, 2013.

REHMAN, J.; ZHANG, H.J.; TOTH, P.T.; ZHANG, Y. et al. Inhibition of mitochondrial fission prevents cell cycle progression in lung cancer. **FASEB J.**, v. 26, n. 5, p. 2175-2186, 2012.

RIFKIN, M.R.; STROBOS, C.A.; FAIRLAMB, A.H. Specificity of ethanolamine transport and its further metabolism in *Trypanosoma brucei*. **J Biol Chem.**, v. 270, n. 27, p. 16160-16166, 1995.

ROCKENFELLER, P.; KOSKA, M.; PIETROCOLA, F.; MINOIS, N. et al. Phosphatidylethanolamine positively regulates autophagy and longevity. **Cell Death Differ.**, v. 22, n. 3, p. 499-508, 2015.

RONINSON, I.B. Oncogenic functions of tumour suppressor p21(Waf1/Cip1/Sdi1): association with cell senescence and tumour-promoting activities of stromal fibroblasts. **Cancer Lett.**, v. 179, n. 1, p. 1-14, 2002.

ROTHMAN, J.E.; LENARD, J. Membrane asymmetry. **Science**, v. 195, n. 4280, p. 743-53, 1977.

ROY, S.; TRINCHIERI, G. Microbiota: a key orchestrator of cancer therapy. **Nat Rev Cancer**, v. 17, n. 5, p. 271-285, 2017.

RYSMAN, E.; BRUSSELMANS, K.; SCHEYS, K.; TIMMERMANS, L. et al. De novo lipogenesis protects cancer cells from free radicals and chemotherapeutics by promoting membrane lipid saturation. **Cancer Res.**, v. 70, n. 20, p. 8117-8126, 2010.

SAITO, S.; ESPINOZA-MERCADO, F.; LIU, H.; SATA, N. et al. Current status of research and treatment for non-small cell lung cancer in never-smoking females. **Cancer Biol Ther.**, v. 18, n. 6, p. 359-368, 2017.

SAMET, J.M.; AVILA-TANG, E.; BOFFETTA, P.; HANNAN, L.M. et al. Lung cancer in never smokers: clinical epidemiology and environmental risk factors. **Clin Cancer Res.**, v. 15, n. 18, p. 5626-5645, 2009.

SAWYERS, C. Targeted cancer therapy. **Nature**, v. 432, n. 7015, p. 294-297, 2004.

SENGUPTA, S.; PETERSON, T.R.; SABATINI, D.M. Regulation of the mTOR complex 1 pathway by nutrients, growth factors, and stress. **Mol Cell.**, v. 40, n. 2, p. 310-322, 2010.

SCAGLIOTTI, G.; BRODOWICZ, T.; SHEPHERD, F.A.; ZIELINSKI, C. et al. Treatment-by-histology interaction analyses in three phase III trials show superiority of pemetrexed in nonsquamous non-small cell lung cancer. **J Thorac Oncol.**, v. 6, n. 1, p. 64-70, 2011.

SCOTT, K.F.; SAJINOVIC, M.; HEIN, J.; NIXDORF, S. et al. Emerging roles for phospholipase A2 enzymes in cancer. **Biochimie**, v. 92, n. 6, p. 601-610, 2010.

SEQUIST, L.V.; MARTINS, R.G.; SPIGEL, D.; GRUNBERG, S.M. et al. First-line gefitinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer harboring somatic EGFR mutations. **J Clin Oncol.**, v. 26, n. 15, p. 2442-2449, 2008.

SGAMBATO, A.; CASALUCE, F.; MAIONE, P.; GRIDELLI, C. Targeted therapies in non-small cell lung cancer: a focus on ALK/ROS1 tyrosine kinase inhibitors. **Expert Rev Anticancer Ther.**, v. 18, n. 1, p. 71-80, 2018.

SIGNORELL, A.; GLUENZ, E.; RETTIG, J.; SCHNEIDER, A. et al. Perturbation of phosphatidylethanolamine synthesis affects mitochondrial morphology and cell-cycle progression in procyclic-form *Trypanosoma brucei*. **Mol Microbiol.**, v. 72, n. 4, p. 1068-1079, 2009.

SIEGEL, R.L.; MILLER, K.D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2018. **CA Cancer J Clin.**, v. 68, n. 1, p. 7-30, 2018.

SINGH, R.K.; FULLERTON, M.D.; VINE, D.; BAKOVIC, M. Mechanism of hypertriglyceridemia in CTP:phosphoethanolamine cytidyltransferase-deficient mice. **J Lipid Res.**, v. 53, n. 9, p. 1811-1822, 2012.

SOBOLEWSKA, A.; GAJEWSKA, M.; ZARZYŃSKA, J.; GAJKOWSKA, B. et al. IGF-I, EGF, and sex steroids regulate autophagy in bovine mammary epithelial cells via the mTOR pathway. **Eur J Cell Biol.**, v. 88, n. 2, p. 117-130, 2009.

STERNBERG, S.H.; REDDING, S.; JINEK, M.; GREENE, E.C. et al. DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. **Nature**, v. 507, n. 7490, 62-67, 2014.

SUNDLER, R.; AKESSON, B. Regulation of phospholipid biosynthesis in isolated rat hepatocytes—effect of different substrates. **J Biol Chem.**, v. 250, p. 3359-3367, 1975.

SWINNEN, J.V.; VAN VELDHoven, P.P.; TIMMERMANS, L.; DE SCHRIJVER, E. et al. Fatty acid synthase drives the synthesis of phospholipids partitioning into detergent-resistant membrane microdomains. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 302, n. 4, p. 898-903, 2003.

TEIXEIRA, S. F.; GUIMARÃES, I. S. ; MADEIRA, K.P. ; DALTOÉ, R.D. et al. Metformin synergistically enhances antiproliferative effects of cisplatin and etoposide in NCI-H460 human lung cancer cells. **J Bras Pneumol.**, v. 39, n. 6, p. 644-649, 2013.

TEIXEIRA, S.F.; DE AZEVEDO, R.A.; SALOMON, M.A.; JORGE, S.D. et al. Synergistic anti-tumor effects of the combination of a benzofuroxan derivate and sorafenib on NCI-H460 human large cell lung carcinoma cells. **Biomed Pharmacother.**, v. 68, n. 8, p. 1015-1022, 2014.

TEIXEIRA, S. F.; DE AZEVEDO, R.A.; SILVA, A.C.; BRAGA, R.C. et al. Evaluation of cytotoxic effect of the combination of a pyridinyl carboxamide derivative and oxaliplatin on NCI-H1299 human non-small cell lung carcinoma cells. **Biomed Pharmacother.**, v. 84, p. 1019-1028, 2016.

TEIXEIRA, S.F.; RODRIGUES, C.P.; COSTA, C.J.S.; PETTINATI, T.N. et al. Edelfosine: an antitumor drug prototype. **Anticancer Agents Med Chem.**, 2018. [*Epub ahead of print*]

THOMAS, A.; LIU, S.V.; SUBRAMANIAM, D.S.; GIACCONE, G. Refining the treatment of NSCLC according to histological and molecular subtypes. **Nat Rev Clin Oncol.**, v. 12, n. 9, p. 511-526, 2015.

TRAVIS, W.D.; BRAMBILLA, E.; RIELY, G.J. New pathologic classification of lung cancer: relevance for clinical practice and clinical trials. **J Clin Oncol.**, n. 31, v. 8, p. 992-1001, 2013.

TRAVIS, W.D. Pathology of lung cancer. **Clin Chest Med.**, v. 32, n. 4, p. 669-692, 2011.

TSUKAZAN, M.T.R.; VIGO, Á.; SILVA, V.D.D.; BARRIOS, C.H. et al. Lung cancer: changes in histology, gender, and age over the last 30 years in Brazil. **J Bras Pneumol.**, v. 43, n. 5, p. 363-367, 2017.

VALENZUELA-OSES, J.K.; GARCÍA, M.C.; FEITOSA, V.A.; PACHIONI-VASCONCELOS, J.A. et al. Development and characterization of miltefosine-

loaded polymeric micelles for cancer treatment. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.**, v. 81, p. 327-333, 2017.

VANCE, J.E. Phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells: two metabolically related aminophospholipids. **J Lipid Res.**, v. 49, n. 7, p. 1377-1387, 2008.

VANCE, J.E.; TASSEVA, G. Formation and function of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1831, n. 3, p. 543-554, 2013.

VAN MOORSEL, C.J.; PINEDO, H.M.; VEERMAN, G.; VERMORKEN, J.B. et al. Scheduling of gemcitabine and cisplatin in Lewis lung tumour bearing mice. **Eur J Cancer.**, v. 35, n. 5, p. 808-814, 1999.

VANSTEENKISTE, J.; DE RUYSSCHER, D.; EBERHARDT, W.E.; LIM, E.; SENAN, S. et al. Early and locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Ann Oncol.**, v. 24, n. Suppl 6, p. vi89-vi98, 2013.

VOKES, E.E.; READY, N.; FELIP, E.; HORN, L. et al. Nivolumab versus docetaxel in previously treated advanced non-small-cell lung cancer (CheckMate 017 and CheckMate 057): 3-year update and outcomes in patients with liver metastases. **Ann Oncol.** v. 29, n. 4, p. 959-965, 2018.

WANG, T.; WARREN, S.T.; JIN, P. Toward pluripotency by reprogramming: mechanisms and application. **Protein Cell.**, v. 4, n. 11, pp. 820-832, 2013.

WANG, Y.; PRIVES, C. Increased and altered DNA binding of human p53 by S and G2/M but not G1 cyclin-dependent kinases. **Nature**, v. 376, n. 6535, p. 88-91, 1995.

WAQAR, S.N.; MORGENZTERN, D. Treatment advances in small cell lung cancer (SCLC). **Pharmacol Ther.**, v. 180, p. 16-23, 2017.

WEERTS, A.P.; PATTYN, N.; VAN DE HEYNING, P.H.; WUYTS, F.L. Evaluation of the effects of anti-motion sickness drugs on subjective sleepiness and cognitive performance of healthy males. **J Psychopharmacol.**, v. 28, n. 7, p. 655-664, 2014.

WEICHERT, J.P.; CLARK, P.A.; KANDELA, I.K.; VACCARO, A.M. et al. Alkylphosphocholine analogs for broad-spectrum cancer imaging and therapy. **Sci Transl Med.**, v. 6, n. 240, p. 240ra75, 2014.

WEISS, R.H. p21Waf1/Cip1 as a therapeutic target in breast and other cancers. **Cancer Cell**, v. 4, n. 6, p. 425-429, 2003.

WISTUBA, I.I.; GAZDAR, A.F.; MINNA, J.D. Molecular genetics of small cell lung carcinoma. **Semin Oncol.**, v. 28, n. 2, suppl 4, p. 3-13, 2001.

WOOD, D.E.; KAZEROONI, E.A.; BAUM, S.L.; EAPEN, G.A. et al. Lung Cancer Screening, Version 3.2018, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. **J Natl Compr Canc Netw.** v. 16, n. 4, p. 412-441, 2018.

XIANG, X.; ZHAO, J.; XU, G.; LI, Y. et al. mTOR and the differentiation of mesenchymal stem cells. **Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).**, v. 43, n. 7, p. 501-510, 2011.

YANG, H.; XIONG, X.; LI, T.; YIN, Y. Ethanolamine enhances the proliferation of intestinal epithelial cells via the mTOR signaling pathway and mitochondrial function. **In Vitro Cell Dev Biol Anim.**, v. 52, n. 5, p. 562-567, 2016.

YANO, T.; HARO, A.; SHIKADA, Y.; MARUYAMA, R. et al. Non-small cell lung cancer in never smokers as a representative 'non-smoking-associated lung cancer': epidemiology and clinical features. **Int J Clin Oncol.**, v. 16, n. 4, p. 287-293, 2011.

YOREK, M.A.; ROSARIO, R.T.; DUDLEY, D.T.; SPECTOR, A.A. The utilization of ethanolamine and serine for ethanolamine phosphoglyceride synthesis by human Y79 retinoblastoma cells. **J Biol Chem.**, v. 260, n. 5, p. 2930-2936, 1985.

ZELINSKI, T.A.; CHOY, P.C. Phosphatidylethanolamine biosynthesis in isolated hamster heart. **Can J Biochem.**, v. 60, n. 8, p. 817-823, 1982.

ZHU, L.; BAKOVIC, M. Breast cancer cells adapt to metabolic stress by increasing ethanolamine phospholipid synthesis and CTP:ethanolaminephosphate cytidyltransferase-Pcyt2 activity. **Biochem Cell Biol.**, v. 90, n. 2, p. 188-199, 2012.

ZHUO, M.; GORGUN, M.F.; ENGLANDER, E.W. Augmentation of glycolytic metabolism by meclizine is indispensable for protection of dorsal root ganglion neurons from hypoxia-induced mitochondrial compromise. **Free Radic Biol Med.**, v. 99, p. 20-31, 2016.