

Guilherme Ayres Rossini

**Análise crítica dos efeitos biológicos da
fosfoetanolamina sintética no câncer**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo, para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia
Experimental

Orientador: Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria

**São Paulo
2023**

Guilherme Ayres Rossini

**Análise crítica dos efeitos biológicos da
fosfoetanolamina sintética no câncer**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo, para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia
Experimental

Orientador: Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria

**São Paulo
2023**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Rossini, Guilherme Ayres
Análise crítica dos efeitos biológicos da
fosfoetanolamina sintética no câncer / Guilherme
Ayres Rossini. -- São Paulo, 2023.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Fisiopatologia Experimental.
Orientador: Durvanei Augusto Maria.

Descritores: 1.Metabolismo 2.Neoplasias
3.Metabolômica 4.Posforilação oxidativa 5.Mitocôndrias
6.Succinato desidrogenase

USP/FM/DBD-197/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 8755

Agradecimentos

Agradeço, em primeiro lugar, ao meu orientador Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria pela oportunidade que meu deus deu de ser seu aluno e poder estudar a fosfoetanolamina.

Agradeço ao Instituto Butantan, à Universidade de São Paulo e, em especial, à Faculdade de Medicina e a todos os professores que compartilharam conhecimento comigo.

Agradeço ao Dr. Zyun Masuda, Prof. Dr. Bayardo Baptista Torres, Prof. Dr. Marcel Cerqueira Cesar Machado, Alan e todos os outros companheiros que dedicaram seu tempo para estudar bioquímica nas noites de domingo.

Agradeço ao Prof. Dr. Pablo González Blasco e todos os colegas da SOBRAMFA.

Agradeço à Dra. Regina Monteiro e todos os colegas do IPP.

Agradeço à minha mãe Gisele Maria Ayres, ao meu pai Dr. José Roberto Rossini Sobrinho, aos meus irmãos Dr. Daniel, futura Dra. Giovanna e Victória.

Agradeço aos meus avós maternos Dr. Reynaldo Russo Ayres e Maria José Soares Ayres e agradeço aos meus avós paternos Walter Wilson Rossini e Denise Eugenia Rossini. Aos meus tios, tias, primos, primas e todos os meus antepassados.

Agradeço à Dra. Marcella Jovelli pelo companheirismo.

Agradeço ao meu amigo Dr. Lorenzo Trevisani pela parceria durante todos os anos de faculdade, intercâmbio em Boston e troca de informações sobre essa complexa patologia que é o câncer. Também agradeço ao meu amigo Michael Gartrell.

Agradeço a todos os pacientes que passaram e passarão pela minha vida, pela confiança e pela oportunidade de cuidar e manifestar a Medicina na relação médico-paciente.

Por fim, agradeço ao Anjo da Sabedoria que sempre faz lembrar que: “Toda Sabedoria provém do Pai Celestial, e fica com ele para sempre”.

*“Os lábios da sabedoria estão fechados,
exceto aos ouvidos do entendimento.”*

Hermes Trismegisto

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas	
Lista de tabelas	
Lista de figuras	
Resumo	
Abstract	
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Mitocôndria no metabolismo tumoral.....	1
1.2 Fosforilação oxidativa e espécies reativas de oxigênio nos tumores...	3
1.3 O potencial de membrana e o pH em tumores.....	4
1.4 O gradiente de pH em tumores e o “efeito Warburg reverso”	6
1.5 Metabolismo da glicose e efeito Warburg.....	8
1.6 Metabolismo dos aminoácidos e unidades de monocarbono.....	9
1.7 Metabolismo dos lipídios, ácidos graxos e colesterol nos tumores.....	10
1.8 Metabolismo dos fosfolipídios.....	10
1.9 Metabolismo como alvo terapêutico.....	14
1.10 Fosfoetanolamina (pETN).....	16
1.11 Nova rota de síntese da fosfoetanolamina sintética.....	18
1.12 Segurança e toxicidade do sal de pETN.....	22
1.13 Formulação lipossomal nanoestruturada da pETN (2-AEH2F).....	26
2 OBJETIVOS.....	29
2.1 Objetivo geral.....	29
2.2 Objetivo específico.....	29
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
4 RESULTADOS.....	33
4.1 Plataforma <i>The Human Metabolome Database</i>	33
4.2 Plataforma <i>GDC Data Portal</i>	36
4.3 Plataforma <i>The Human Protein Atlas</i>	37
4.4 Plataforma <i>R2: Genomics and Visualization Platform</i>	40
5 DISCUSSÃO.....	45
6 CONCLUSÃO.....	54
7 REFERÊNCIAS.....	55

ABREVIATURAS

mtDNA:	DNA mitocondrial
DNA:	ácido desoxirribonucleico
CTE:	Cadeia transportadora de elétrons
ERO:	espécies reativas de oxigênio
OMA1:	metallopeptidase presente na membrana interna da mitocôndria
S-OPA:	isoforma da OPA1, proteína ancorada na membrana interna da mitocôndria
L-OPA:	isoforma da OPA1, proteína ancorada na membrana interna da mitocôndria
NAD ⁺ :	dinucleótido de nicotinamida e adenina
NADPH:	fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
FAD ⁺ :	dinucleótido de flavina e adenina
RNA:	ácido ribonucleico
ADP:	adenosina difosfato
pETN:	fosfoetanolamina
ETN:	etanolamina
CTP:	trifosfato de citosina
pH:	potencial de hidrogênio
pHi:	potencial de hidrogênio intracelular
pHe:	potencial de hidrogênio extracelular
CoQ10:	coenzima
SLC:	grupo de transportadores de soluto
BIC:	bicarbonato
AE2:	proteína de troca aniônica
CA:	anidrase carbônica
CAIX:	anidrase carbônica isoforma 9
CAXII:	anidrase carbônica isoforma 12
CAI:	anidrase carbônica isoforma 1
CAII:	anidrase carbônica isoforma 2
NHE1:	antiportador sódio hidrogênio
FATs:	fibroblastos associados ao tumor
MCT-4:	transportador de monocarboxilato 4
MCT-1:	transportador de monocarboxilato 1
GLUT:	transportador de glicose

SAM:	s-adenosilmetionina
SAH:	s-adenosilhomocisteína
AG:	ácidos graxos
PE:	fosfatidiletanolamine
PS:	fosfatidilserina
PC:	fosfatidilcolina
ETNK1:	etanolamino quinase-1
ETNK2:	etanolamino quinase-2
CDP-ETN:	difosfato de citidina etanolamina
EPT1:	etanolamina fosfoetanolamina transferase 1
DAG:	diacilglicerol
PCYT2:	fosfoetanolamina citidiltransferase-2
PCYT1:	fosfocolina citidiltransferase-1
PSD:	fosfatidilserina descarboxilase
CHO:	colina
pCHO:	fosfocolina
PEMT:	fosfatidiletanolamina N-metiltransferase
PSS1:	fosfatidilserina sintase 1
PSS2:	fosfatidilserina sintase 2
PEBP:	proteína ligadora de fosfatidiletanolamina
CB1:	receptor canabinoide tipo 1
CB2:	receptor canabinoide tipo 2
PI3K/AKT:	via de sinalização intracelular
CHKA:	colina quinase A
CHKB:	colina quinase B
GABA:	gama-aminobutirico
GABAB:	receptor B de gama-aminobutirico
3-AAP:	3-amino-acido-propil-fosfonico
2-AEH2F:	fosfoetanolamina lipossomal nanoestruturada

Lista de Tabelas

- Tabela 1:** Na tabela abaixo é possível observar os sinônimos descritos para fosfoetanolamina. As informações estão escritas exatamente como na plataforma com a intenção de preservar a informação e evitar “ruídos” de tradução..... 34
- Tabela 2:** Na coluna da esquerda, estão as propriedades ou grandezas representadas e, na coluna da direita, os valores..... 35
- Tabela 3:** Na coluna da esquerda, estão os genes e, na coluna da direita, as reações enzimáticas envolvidas de alguma maneira com a pETN..... 36
- Tabela 4:** Distribuição das diferentes regiões e tipos de tecidos diferenciados em relação ao nível de expressão proteica de PCYT2. Na coluna da esquerda (*High*), estão listados os tecidos que possuem alta expressão proteica; ao lado (*Medium*), tecidos com média expressão; em seguida (*Low*), com baixa expressão; e, na última coluna do lado direito (*Not detected*), tecidos que não foram detectadas a expressão da PCYT2..... 39
- Tabela 5:** As diferentes concentrações da expressão de RNA da PCYT2 de acordo com o tipo de tecido tumoral. Na coluna da esquerda, está listado o tipo de tumor e, na da direita, a análise quantitativa da expressão do RNA; FPKM = *Fragments per kilo based per million mapped reads*..... 40
- Tabela 6:** A coluna da esquerda representa o resultado de agrupamentos genéticos que estão correlacionados com a PCYT2 em amostra de organóide hepático normal. A coluna da direita mostra a significância estatística representada pelos valores de p..... 41
- Tabela 7:** A coluna da esquerda representa o resultado de agrupamentos genéticos que estão correlacionados com a PCYT2 em amostras de carcinoma hepatocelular. A coluna da direita mostra a significância estatística representada pelos valores de p..... 43

Lista de Figuras

- Figura 1:** Representação das características comuns ao câncer adaptadas do trabalho feito por Hannah e Weinberg, 2011..... 2
- Figura 2:** Representação dos diferentes estados metabólicos em uma célula tumoral, mantendo o mesmo gradiente de pH de acordo com a biodisponibilidade de nutrientes. **A:** $pH_i > pHe$ em condições repletas de nutrientes. A célula tumoral tende a manifestar padrão anabólico, sintetizando material genético e membrana celular; **B:** $pH_i > pHe$ em condições escassas de nutrientes. Células tumorais se manifestam em um padrão catabólico..... 7
- Figura 3:** Ao lado esquerdo da figura, é possível observar as etapas de síntese endógena de PC, ou braço PC da via Kennedy. No lado direito, é possível observar as etapas da síntese endógena de PE, ou braço PE da via Kennedy. Ao centro está representada a conversão de PE em PC por uma enzima que conecta a via Kennedy com o Metabolismo das Unidades de Monocarbono. A PC e a PE podem ser convertidas em PS, que, por sua vez, pode ser convertida novamente em PE na mitocôndria por uma reação de descarboxilação da PS..... 12
- Figura 4:** Representação das diferentes funções da PE. No canto superior esquerdo, está representada a reação de metilação da PE, catalizada pela PEMPT. No canto superior direito, está representado a consequência da função estrutural da PE, servindo como um dos fosfolipídios de membrana que compõem as membranas das organelas e da célula. As regiões com PE são os locais onde tende-se a ocorrer fissão e fusão das membranas. No canto inferior direito, está representado autofagia, em que a PE também atua. No canto inferior esquerdo, está representada a ligação da PE com a PEBP, uma proteína citoplasmática com inúmeras funções celulares, relacionada com o câncer. Na região central inferior, está a relação da PE com o sistema endocanabinóide. A PE atua como precursora de uma dos principais endocanabinóides, a anandamida que atua nos receptores CB1..... 14
- Figura 5:** É possível observar a ação inibitória do cloridrato de meclizina na mitocôndria de maneira indireta. Ao lado esquerdo da figura, é possível também possível ver a CTE sendo inibida pelas altas concentrações de pETN, que é resultado da inibição da PCYT2 pelo cloridrato de meclizina..... 15
- Figura 6:** A figura mostra alguns padrões semelhantes entre as estruturas das moléculas pETN, GABA e 3-AAP, sendo que as 3 moléculas possuem grupamento amina em uma de suas extremidades e duas delas (pETN e 3-AAP) possuem o grupamento fosfato na outra extremidade..... 17
- Figura 7:** **A:** fórmula química de pETN, quimicamente ativa; **B:** diferentes moléculas de fosfolipídios de membrana que contêm a pETN em sua “cabeça” polar. À esquerda, está a fosfatidiletanolamina, no meio, a liso-fosfatidiletanolamina e, à direita, a esfingomiéline..... 18
- Figura 8:** Fotografia do cristal de fosfoetanolamina sintetizado por Chierice..... 20
- Figura 9:** **A:** Representação ORTEP, a partir de estudos de difração de raio-x, do sal de pETN (Ribeiro Filho OM, Chierice GO, 1998); **B:** Representação ORTEP, a partir de estudos de difração de raio-x, do sal de pETN Sigma Aldrich® (Myller et al., 2013)..... 22

Figura 10: Resumo das etapas do estudo realizado no Instituto do Câncer do Estado de SP (ICESP). **1:** Pacientes foram alocados nas respectivas coortes de acordo com os critérios de inclusão e exclusão; **2:** Exame de tomografia computadorizada para avaliar tamanho do tumor antes de iniciar o tratamento; **3:** Tratamento com três comprimidos de 2-AEH2F uma vez ao dia por 3 semanas; **4:** Descalonamento da dose para dois comprimidos uma vez ao dia por mais 1 semana; **5:** Realização de novos exames de tomografia computadorizadas para avaliar o tamanho do tumor após 28 dias de tratamento; **6:** Avaliação da resposta terapêutica de acordo com o tamanho do tumor. As análises estatísticas se basearam na comparação entre os exames de imagem realizados antes e depois do tratamento. Caso tumor do paciente não apresentasse uma diminuição significativa do tamanho do tumor, o tratamento era suspenso..... 26

Figura 11: **A:** fotomicrografia eletrônica de célula melanoma (B16F10) com 2-AEH2F lipossomal aderido na membrana (seta preta) antes de serem internalizados; **B:** fotomicrografia confocal a laser com 2-AEH2F lipossomas marcados com Dil já internalizados para o citoplasma das células tumorais (setas azuis). O asterisco em amarelo mostra o núcleo da célula tumoral (hepatocarcinoma)..... 27

Figura 12: Imagem representando o funcionamento das plataformas computacionais de software. Na esquerda da figura é possível ver o que entra de informações provenientes de diferentes biobancos de análises. A imagem do computador no centro representa todo processamento dos dados, resultando em uma interface de fácil navegação da plataforma online, que facilita o pesquisador a explorar a grande quantidade de dados provenientes dos diferentes tipos de análises (ômicas)..... 30

Figura 13: Gráfico (Kaplan-Meier) representando a taxa de sobrevivência geral (eixo vertical) em relação ao tempo em anos (eixo horizontal) de 3476 casos com mutação somática de PCYT2. Cada degrau na curva Kaplan-Meier significa que um evento (morte) ocorreu com um paciente ou um grupo de pacientes. As pequenas marcas acima da curva significam um evento de perda do seguimento do paciente naquele momento, não necessariamente a morte..... 37

Figura 14: Sublocalização celular da PCYT2. Em verde, estão os locais em que foram detectados a presença da PCYT2; e, em cinza, estão os compartimentos em que não foram detectados a PCYT2..... 38

Figura 15: Ao lado esquerdo da figura é possível observar as etapas síntese endógena de PC, ou braço PC da via Kennedy. No lado direito é possível observar as etapas da síntese endógena de PE, ou braço PE da via Kennedy. A PC e a PE podem ser convertidas em PS, que por sua vez pode ser convertida novamente em PE na mitocôndria por uma reação de descarboxilação da PS. As enzimas em amarelo representam enzimas que estão diretamente relacionadas a reações que envolvem a fosfoetanolamina. Já as enzimas em azul representam reações que estão indiretamente relacionadas com a fosfoetanolamina..... 46

Figura 16: **A:** A figura mostra a relação da atividade do complexo II com a concentração de pETN, em que quanto maior a concentração de pETN menor a atividade mitocondrial de maneira estatisticamente significativa. **B:** A imagem mostra a relação da atividade do complexo II e a pETN e o succinato. É possível observar que a inibição do complexo II causado pela pEN pode ser revertida conforme aumenta a concentração do succinato..... 48

Figura 17: A figura mostra a cadeia transportadora de elétrons sendo afetada pelo aumento da concentração de pETN dentro da matriz mitocondrial representada pelas esferas azuis (1); parte do complexo II é a succinato desidrogenase, uma enzima que também está envolvida no ciclo de Krebs, com o aumento das concentrações de pETN a succinato desidrogenase é inibida representada pelo "X" acima das esferas azuis inibindo a enzima (2); uma das consequências da inibição é a diminuição da atividade mitocondrial (3); após a exposição, a célula pode se adaptar aos níveis elevados de pETN ou, dependendo da concentração, pode desencadear processo de morte celular programada (4)..... 50

Figura 18: Representação do mecanismo de entrada do 2-AEH2F lipossomal para dentro da célula e aumento da concentração da pETN intracelular. O ponto de interrogação no núcleo da célula tumoral representa a dúvida existente diante da falta de dados na literatura sobre o efeito biológico na expressão de PCYT2..... 52

RESUMO

Rossini GA. *Análise crítica dos efeitos biológicos da fosfoetanolamina sintética no câncer* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

Introdução: O câncer é uma das mais complexas doenças que o ser humano já se deparou, com potencial de se tornar a principal causa de morte até 2025. As alterações metabólicas presentes nos tumores estão relacionadas à sobrevivência tumoral. O metabolismo de fosfolipídios em tumores é uma das alterações que pode ser alvo terapêutico de inovações tecnológicas. A fosfoetanolamina é uma molécula endógena envolvida em processos metabólicos fisiológicos e patológicos. Nos tumores, sua via metabólica também está alterada e sua forma sintética pode causar um efeito biológico em tumores. Seu mecanismo de ação ainda não está totalmente compreendido e o presente trabalho visa ampliar o conhecimento no tema através de análises *in silico*.

Métodos: Análise *in silico* em plataformas computacionais de genômica, metabolômica, proteômica e transcriptômica. **Resultados e Discussão:** Biobancos de metabolômica apontam envolvimento da fosfoetanolamina nas reações de diferentes enzimas. As plataformas de genômica, proteômica e transcriptômica sugerem que a via na qual a fosfoetanolamina está envolvida é inespecífica ao tipo de tumor. Encontrou-se alterações de grupos de genes envolvidos na fosforilação oxidativa, tanto em hepatócitos diferenciados, quanto em hepatocarcinomas. Os dados da literatura confirmam que a fosfoetanolamina é capaz de inibir a fosforilação oxidativa, diminuindo a atividade mitocondrial através da inibição da succinato desidrogenase no complexo II da cadeia transportadora de elétrons. O efeito biológico da fosfoetanolamina está diretamente relacionado à concentração do composto ao qual as células tumorais estão expostas. A 2-AEH2F representa a formulação nanoestruturada da fosfoetanolamina e possui maior biodisponibilidade do que o sal de fosfoetanolamina sintética. **Conclusão:** A fosfoetanolamina é capaz de inibir a fosforilação oxidativa em mitocôndrias de células diferenciadas e tumorais. As mitocôndrias das células tumorais são mais vulneráveis aos níveis de fosfoetanolamina do que as mitocôndrias das células diferenciadas. A fosfoetanolamina atua nos tumores através da inibição da cadeia transportadora de elétrons, ligando-se ao mesmo sítio do succinato - na succinato desidrogenase no complexo II. A consequência da inibição irá depender da concentração de fosfoetanolamina e da capacidade de adaptação da célula tumoral.

Descritores: Metabolismo; Neoplasias; Metabolômica; Fosforilação Oxidativa; Mitocôndrias; Succinato desidrogenase.

ABSTRACT

Rossini GA. *A critical analysis of synthetic phosphoethanolamine's effect on cancer* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina: Universidade de São Paulo"; 2023.

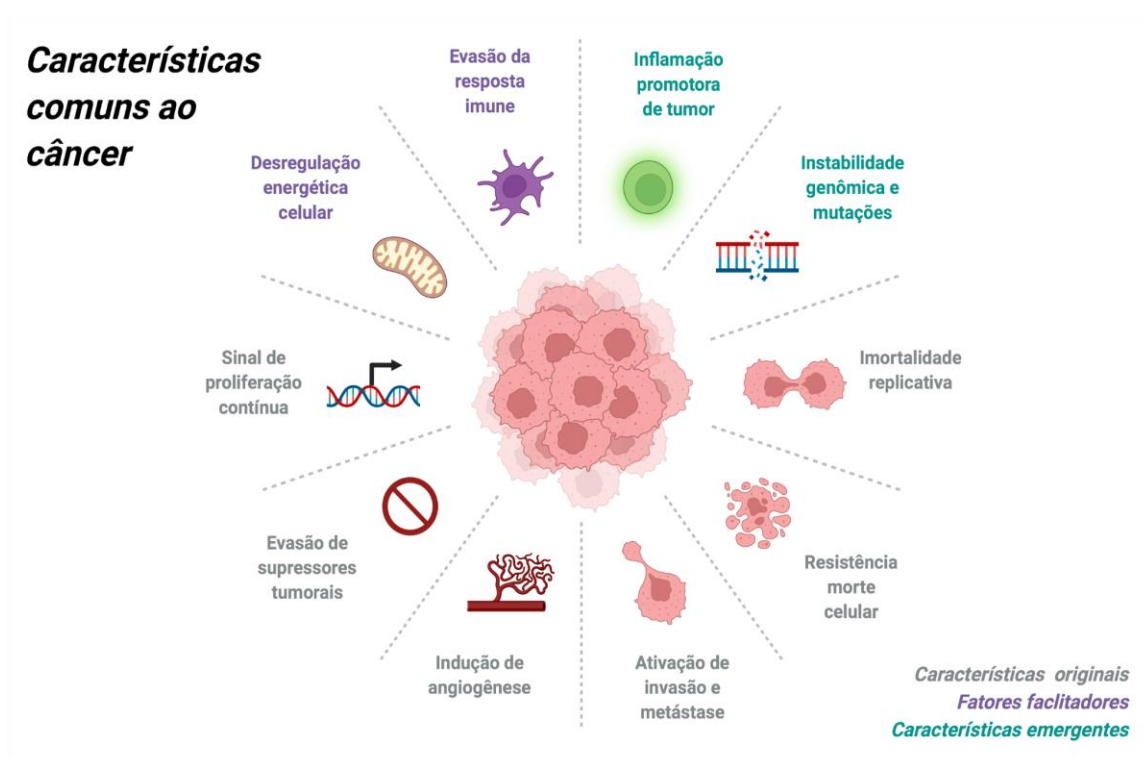
Introduction: Cancer is one of the most complex diseases that humans have encountered, with the potential to become the leading cause of death by 2025. The metabolic alterations in tumors are related to tumor survival. Phospholipid metabolism in tumors is one of the alterations which can be a therapeutic target for technological innovations. Phosphoethanolamine is an endogenous molecule involved in metabolic-physiological and pathological processes. In tumors, its metabolic pathway manifests irregularities and its synthetic form can cause biological effects on tumors. Its modus operandi has not been entirely understood and the present paper devotes itself to amplify our knowledge through *in silico* analyses. **Methods:** *In silico* analysis from biobanks and big data portals. **Results and Discussion:** Metabolomic biobanks indicate the involvement of phosphoethanolamine in different enzymatic reactions. The transcriptomic, genomic and proteomic platforms suggest that the pathway which phosphoethanolamine uses is tumorally nonspecific. Gene group alterations which were involved in oxidative phosphorylation were also found in hepatocytes and in hepatocellular carcinomas. Data from the literature confirm that phosphoethanolamine is capable of inhibiting oxidative phosphorylation, decreasing mitochondrial activity through the inhibition of succinate dehydrogenase in complex II of the electron transport chain. The biological effect of phosphoethanolamine is directly related to the concentration of the compound to which the tumor cells are exposed. The 2-AEH2F represents the nanostructured formulation of phosphoethanolamine and displays higher bioavailability levels than synthetic phosphoethanolamine salts. **Conclusion:** Phosphoethanolamine is capable of inhibiting oxidative phosphorylation in the mitochondria of differentiated and tumoral cells. The mitochondria of tumoral cells are more vulnerable to phosphoethanolamine than those of differentiated cells. Phosphoethanolamine acts on tumors by inhibiting the electron transport chain, binding itself to the same place that succinate does - to the succinate dehydrogenase on complex II. The consequences of inhibition will depend on the concentration of phosphoethanolamine and on the tumor cells capacity to adapt.

Descriptors: Metabolism; Neoplasm; Metabolomics; Oxidative Phosphorylation; Mitochondria; Succinate dehydrogenase.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Mitocôndria no metabolismo tumoral

Diferentemente da célula diferenciada, a célula tumoral está em constante divisão celular tendo suas necessidades energéticas adaptadas para a demanda. A desregulação do metabolismo celular emergiu como uma das características comuns ao câncer [Figura 1] (Hanahan; Weinberg, 2011). O metabolismo é composto por uma heterogênea e dinâmica rede de circuitos moleculares e partículas chamadas metabólitos que dão suporte para iniciação, promoção e progressão das neoplasias malignas (DeBerardinis; Chandel, 2016). A mitocôndria é a principal organela envolvida nesse processo (Tennant et al., 2009; Badrinath et al., 2018): uma organela extremamente dinâmica capacitada de remodelar sua forma e tamanho através de fissão e fusão da sua estrutura. O balanço entre fissão e fusão modula a forma e função, regulando inúmeros processos celulares de acordo com a necessidade metabólica da célula (Tilokani et al., 2018). Evidências por microscopia eletrônica de varredura mostram que ela pode adquirir um formato único, como se fosse uma “rede mitocondrial única e contínua” em algumas espécies (Naguro et al., 2012). Além disso, a mitocôndria possui um DNA próprio, o mtDNA, que pode ser utilizado, entre outras coisas, para a investigação da história evolutiva de espécies (Figuet et al., 2014).



Fonte: Guilherme Ayres Rossini através da plataforma biorender.com adaptado de Hannah e Weinberg, 2011

Figura 1: Representação das características comuns ao câncer adaptadas do trabalho feito por Hannah e Weinberg, 2011.

Estados patológicos, como o câncer, também estão associados a alterações na morfologia mitocondrial (Campello; Scorrano, 2010; Tilokani et al., 2018). A capacidade de mudança da morfologia mitocondrial está relacionada não apenas a fatores intrínsecos como também a de outras estruturas celulares como eixo-actina-retículo endoplasmático (Zhang et al., 2014; Tilokani et al., 2018). Além do metabolismo celular, uma outra importante função fisiológica e adaptativa da mitocôndria, que também está envolvida na carcinogênese, é a regulação de diversos tipos de morte celular programada, um processo fisiológico crucial nos organismos multicelulares (Ulivieri, 2010; Galluzzi et al., 2012). A perda da capacidade de disparar mecanismos de morte celular programada é uma das características comuns do câncer [Figura 1]. Um dos mecanismos de morte mais conhecidos é a apoptose, que pode ser classificada em extrínseca e intrínseca (Hanahan; Weinberg, 2011). Apesar da mitocôndria possuir essas qualidades, sua principal função é a realização da fosforilação oxidativa, um fenômeno biológico envolvido na produção de energia.

1.2 Fosforilação oxidativa e espécies reativas de oxigênio nos tumores

A fosforilação oxidativa também ocorre nas células cancerígenas, e é responsável por grande parte da produção de ATP através das cadeias transportadoras de elétrons (CTE). A CTE é composta por quatro complexos enzimáticos (alguns autores consideram a ATP-sintase o quinto complexo enzimático) que atravessam a membrana interna da mitocôndria. A disposição espacial dos complexos da CTE se dá predominantemente nas cristas da mitocôndria (Burke, 2017).

O complexo I (NADH-ubiquinona oxirredutase) catalisa a transferência de dois elétrons do NADH para a ubiquinona. Ao mesmo tempo, acontece a translocação de prótons através da membrana interna da mitocôndria para o espaço intermembrana. Estima-se que esse processo contribui em torno de 40% da força próton-motriz (Marzzoco et al., 2018). Já o complexo II (succinato desidrogenase - do ciclo de Krebs) catalisa a oxidação de succinato a fumarato, com redução de FAD a FADH₂. O complexo I e II se conecta ao complexo III (ubiquinona-citocromo c oxirredutase) através de uma enzima móvel chamada coenzima Q10. Nos processos envolvidos no complexo III, existe o acoplamento da translocação de prótons ao transporte de elétrons com a oxidação da coenzima Q10 e redução do citocromo C (Marzzoco et al., 2018). O citocromo c é uma proteína heme cuja uma das funções é a de transferir elétrons do complexo III para o complexo IV (Burke, 2017). De maneira simplificada, cada complexo é composto por diferentes subunidades proteicas e podem se alternar em sua forma reduzida ou oxidada conforme a passagem dos elétrons até reagir com oxigênio no final do complexo IV. Estima-se que este processo é responsável por 95% do consumo de oxigênio do organismo humano (Marzzoco et al., 2018). Uma das consequências de todo esse fenômeno é a mudança na magnitude do gradiente de prótons mitocondrial, como pode ser representado no potencial de membrana da célula e da mitocôndria (Chen, 1988). Ao mesmo tempo que existe a transferência de elétrons pelos complexos, também existe uma transferência de prótons da membrana interna (impermeável aos H⁺) para o espaço intermembrana, levando a uma concentração maior de prótons no espaço intermembrana do que na matriz mitocondrial que resulta em um

gradiente de prótons (assim como um gradiente elétrico, resultado da diferença da carga elétrica entre a face interna da membrana voltada para matriz [mais negativa] e a face voltada para o espaço intermembrana). Toda essa energia eletroquímica conservada é a força próton-motriz, que é utilizada para produzir ATP a partir do ADP pela ATP-sintase. Os níveis de ADP controlam a produção de ATP pela ATP-sintase, responsável pela produção da maior parte do ATP da célula. Simultaneamente, uma parte da força próton-motriz é dissipada em calor pelas proteínas desacopladoras (Marzzoco et al., 2018).

Todo esse processo de consumo de oxigênio e produção de ATP também resulta na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Seyfried et al., 2020). ERO são moléculas eletricamente instáveis que contêm oxigênio e facilmente reagem com outras biomoléculas na célula. Após reagirem, podem mudar a forma geométrica das estruturas levando à perda ou alteração da sua função. A produção de ERO desequilibrada está envolvida na fisiopatologia de inúmeras doenças e, no câncer, o estresse oxidativo e geração de ERO são alguns dos fenômenos metabólicos mais importantes na carcinogênese (Hayes et al., 2020).

As células possuem diversos sistemas de neutralização de ERO, como a síntese e homeostase de glutatona, o das tioredoxinas, entre outros. Esses sistemas possuem importantes papéis no câncer. O ERO, em determinadas quantidades, promove a divisão e crescimento do tumor; em outras quantidades, pode desencadear processos de morte celular programada das células cancerígenas (Purohit et al., 2019; Hayes et al., 2020). Grande parte do sistema de defesa antioxidante é baseado em NADPH e NAD⁺ para neutralizar as ERO. O NAD⁺ também participa da fosforilação oxidativa e pode regular a estabilidade genômica nas neoplasias (Xie et al., 2020).

1.3 O potencial de membrana e o pH em tumores

O potencial de membrana é o nome dado à diferença de carga do lado interno em relação ao externo de uma membrana biológica. Na mitocôndria, a redução do potencial de membrana é responsável pelo estímulo que ativa a proteína OMA1 que cliva L-OPA1 em S-OPA1 e aumenta a permeabilidade da

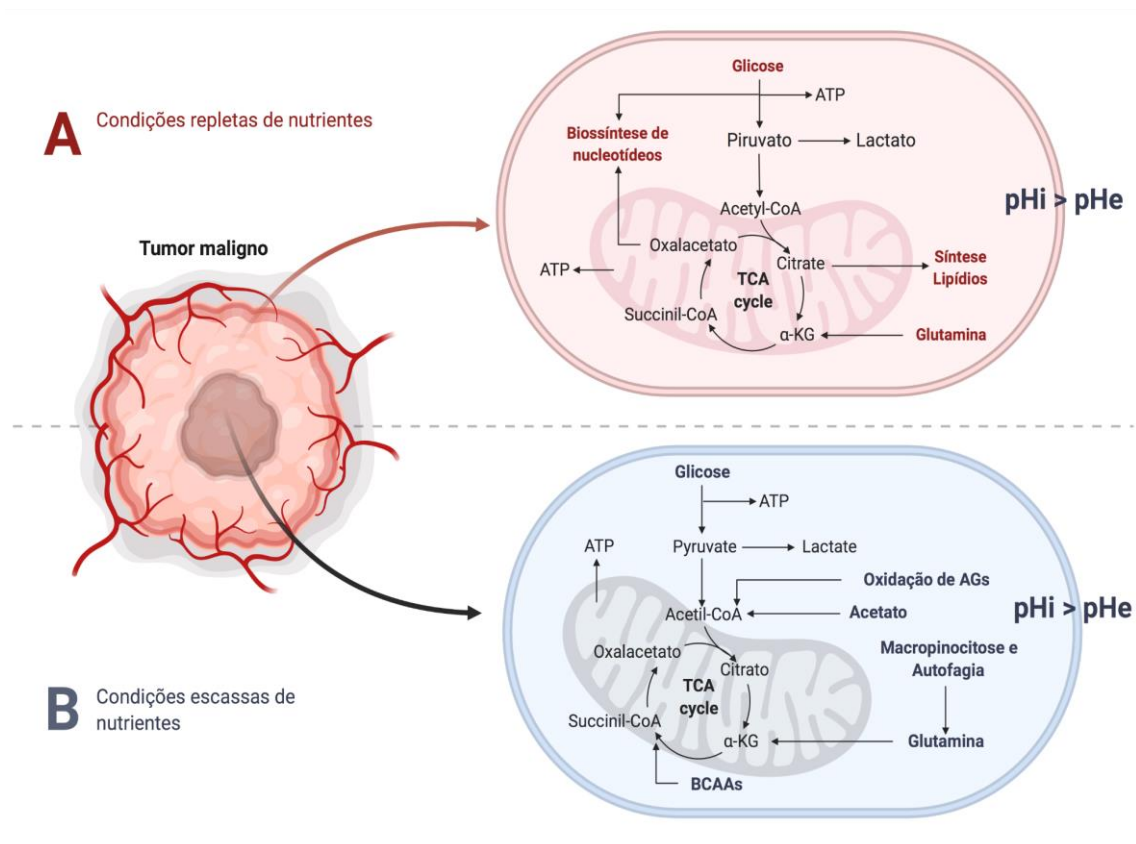
crista liberando maior quantidade de citocromo c no citosol (Burke, 2017). O citocromo c, além do seu papel na fosforilação oxidativa, é uma importante molécula mediadora da via intrínseca da apoptose (Ow et al., 2008). O principal mecanismo de disparo de apoptose intrínseca é a alteração do potencial da membrana mitocondrial (Galluzzi et al., 2012). Ademais, o potencial de membrana da mitocôndria está associado com a regulação de outras funções celulares como motilidade, diferenciação e crescimento (Chen, 1988). Estudos com rodamina sugerem que o potencial de membrana mitocondrial nas neoplasias pode variar de acordo com o tipo de tecido, grau de multiplicação, de crescimento, assim como grau de diferenciação. A baixa captação e retenção de rodamina significa baixo potencial de membrana, e alta captação e retenção da rodamina, alto potencial de membrana (Chen, 1988). No geral, as análises dos valores do potencial de membrana nas mitocôndrias das células tumorais não podem ser realizadas de maneira simples, uma vez que podem estar hiperpolarizadas em carcinomas diferenciados. Já em carcinomas pouco diferenciados tal hiperpolarização não ocorre (Chen, 1988). Da mesma forma, diferentes tipos de populações celulares do tumor também podem ter potencial de membrana mitocondrial diferentes, como nas células tronco tumorais e nas células não-tronco tumorais (Zhang et al., 2015).

Na membrana celular, existe uma associação do potencial de membrana da célula com o grau de atividade mitótica, sendo que o potencial de membrana é o principal controlador da atividade mitótica (Cone Jr, 1970). A partir desta perspectiva, é possível unificar todos os mecanismos de carcinogênese, em que os estímulos de natureza química, física e biológica resultam em alterações eletroquímicas representadas pelo potencial de membrana da célula tumoral (Cone Jr, 1971). Em neurônios maduros, a despolarização sustentada da membrana, mediada por diversos agentes que aumentam o sódio intracelular e diminuem o potássio extracelular, é capaz de induzir à síntese de DNA e RNA e ao processo de divisão celular. Durante o transporte de sódio, os prótons também são transportados alterando sua concentração e refletindo nos valores de pH (Cone Jr; Cone, 1976).

1.4 O gradiente de pH em tumores e o “efeito Warburg reverso”

Os valores de pH também afetam o potencial de membrana e estão relacionados com a complexa mudança e adaptação das vias metabólicas existentes, que, além de manter o equilíbrio das ERO, também dão suporte e sustentação para proliferação e sobrevivência das células tumorais. Essas mudanças não são estáticas e podem mudar de acordo com a região do tumor, biodisponibilidade de nutrientes e outras necessidades ao longo do tempo [Figura 2] (Asgharzadeh et al., 2017).

Um dos padrões existentes é a inversão do gradiente de pH em relação às células diferenciadas, constatando-se uma sutil acidificação do pH extracelular (pHe) e uma sutil alcalinização do pH intracelular (pHi) nos tumores [Figura 2] (Saito et al., 2016; Asgharzadeh et al., 2017). Esse padrão pode ser observado e confirmado por diferentes métodos de estudo ao longo dos anos (Zhang et al., 2010), sustentando-se através de diversos mecanismos biológicos envolvidos no equilíbrio do pH pela célula tumoral. Transportadores da família *Solute Carrier Family* (SLC) participam desse processo. O bicarbonato (BIC) pode entrar na célula via co-transportador Sódio/BIC (SLC4A4 e SLC4A7). Já os transportadores AE2 (SLC4A2) importam íons de cloro osmoticamente ativos em troca do BIC. Proteínas da família da anidrase carbônica (CA) auxiliam na regulação do pH através da catalisação reversível de hidratação do CO₂ em BIC e H⁺. As CAs podem estar localizadas em diferentes regiões do citoplasma ou membrana das células. Os tumores expressam as isoformas de membrana CAIX (CA9) e CAXII (CA12), assim como as isoformas citoplasmáticas CAI (CA1) e CAII (CA2) (Pedersen et al., 2017; Guan et al., 2018; Becker, 2020).



Fonte: Guilherme Ayres Rossini através da plataforma biorender.com

Legenda: ATP = adenosina trifosfato; TCA cycle - ciclo de Krebs; pHi = pH intracelular; pHe = pH extracelular; BCAAs = aminoácidos de cadeia ramificadas

Figura 2: Representação dos diferentes estados metabólicos em uma célula tumoral, mantendo o mesmo gradiente de pH de acordo com a biodisponibilidade de nutrientes. **A:** pHi > pHe em condições repletas de nutrientes. A célula tumoral tende a manifestar padrão anabólico, sintetizando material genético e membrana celular; **B:** pHi > pHe em condições escassas de nutrientes. Células tumorais se manifestam em um padrão catabólico.

O início da mitose é precedido pela leve alcalinização do citoplasma (Tannock, 1989). O transportador NHE1 (SLC9A1) é um transportador da família SLC, que faz a troca do sódio extracelular por próton (H⁺) intracelular. O NHE1 está presente na membrana das células e é extremamente sensível aos níveis de pHi (Cardone et al., 2005), aumentando sua atividade e gerando uma leve alcalinização do pHi e acidificação do pHe (Felippe Jr, 2019). Estudos sugerem que esse gradiente de pHe ácido e pHi alcalino na frente de migração é responsável pela promoção da migração das células tumorais e, até mesmo, pela metástase (Reshkin et al., 2000; Cardone et al., 2005; Harguindey et al., 2005; Martin et al., 2011; Stroka et al., 2014; Becker, 2020). Além do mais, células do microambiente tumoral como endotélio também têm NHE1 expressos em sua membrana (Pedersen et al., 2017).

Ao mesmo tempo, o pH ácido se relaciona diretamente na dinâmica do nicho ecológico do microambiente tumoral, influenciando na aquisição de nutrientes (Finicle et al., 2018), angiogênese (Palma et al., 2017), autofagia e imunossupressão (Corbet; Feron, 2017). Células imunológicas estão associadas ao tumor de maneira específica ao tecido; porém, alguns padrões podem ser observados, e.g. a polarização de macrófagos aumentando os do tipo M2, associados à imunossupressão local e progressão do tumor (Anderson; Simon, 2020). Concomitantemente, a inflamação crônica presente no microambiente tumoral participa de mais de uma etapa do processo de carcinogênese (Greten; Grivennikov, 2019). Fibroblastos associados ao tumor (FATs) também podem auxiliar os tumores, entre outras funções, no escape imunológico (De Jaeghere et al., 2019). Devido a maior quantidade de ERO e inflamação no microambiente (Greten; Grivennikov, 2019), os FATs podem realizar glicólise anaeróbica, aumentando a produção de lactato, que sai dos FATs para o microambiente tumoral através de transportadores MCT-4 (SLC16A3). O lactato pode ser aproveitado pelas células tumorais através dos transportadores MCT-1 (SLC16A1). Este fenômeno é conhecido como “Efeito Warburg Reverso” (Pavrides et al., 2009; Whitaker-Menezes et al., 2011; Benny et al., 2020) devido à sua semelhança com uma das primeiras alterações metabólicas descritas em tumores, o efeito Warburg.

1.5 Metabolismo da glicose e efeito Warburg

A alteração metabólica mais conhecida e caracterizada do câncer é do metabolismo da glicose (Moreno-Sánchez et al., 2007). Nos tumores existe um aumento da captação da glicose do extracelular por transportadores específicos conhecidos como GLUT (SLC2A1, SLC2A3 e outros). Após entrar na célula, a glicose é oxidada até piruvato na via glicolítica (Embden-Meyerhof), resultando na rápida produção de ATP e redução do NAD⁺ em NADH. O piruvato pode ser convertido em lactato e H⁺. Este fenômeno é conhecido como “Efeito Warburg” ou glicólise aeróbica, uma vez que um dos primeiros cientistas a identificá-lo, há quase um século atrás, foi o Prêmio Nobel em Fisiologia e Medicina: Otto Heinrich Warburg (Warburg et al., 1927; Warburg, 1931).

Ao mesmo tempo, o piruvato também pode ser convertido em acetil-CoA e entrar na mitocôndria (Moreno-Sánchez et al., 2009). Apesar do aumento do consumo de glicose pela célula tumoral, notado por Warburg, ter sido confirmado ao longo dos anos, a fosforilação oxidativa também ocorre e é fonte de ATP em diferentes tipos de tumores (Bui; Thompson, 2006; Ortega et al., 2009; Vander Heiden et al., 2009; DeBerardinis; Chandel, 2016). A glicólise aeróbica também fornece substratos metabólicos para a via das pentoses fosfatos. Essa via possui dois braços provenientes das primeiras etapas do metabolismo da glicose: um braço é considerado oxidativo e o outro, não-oxidativo. Ambos podem estar ativados no câncer, a depender da circunstância (Patra; Hay, 2014). O desvio das pentoses fosfato é um importante ramo da rede metabólica da glicose, em que o tumor utiliza pentose ribose-5-fosfato para produzir ácidos nucleicos (RNA e DNA), NADPH, FADH₂, Coenzima A, entre outros substratos metabólicos (Jiang et al., 2014; Patra; Hay, 2014).

1.6 Metabolismo dos aminoácidos e unidades de monocarbono

Além da glicose, o tumor também apresenta alterações no metabolismo de aminoácidos (Vettore et al., 2020). Como a glutamina que contribui para síntese de nucleotídeos, assim como pode ser metabolizada em glutamato que é convertido em alfa-cetoglutarato e pode entrar no ciclo de Krebs para produção de ATP, no processo conhecido como glutaminólise (Altman et al., 2016). A glutaminólise alimenta o ciclo de Krebs e a fosforilação oxidativa sendo considerada uma das principais fontes de ATP para as células tumorais (Seyfried et al., 2020). Ao mesmo tempo, existe uma compartimentalização da produção e da utilização de ATP. Nesse sentido, estudos sugerem que a glicólise aeróbica (Efeito Warburg) seja a fonte de ATP para o núcleo da célula em mitose (Gajewski et al., 2003). A serina e glicina participam do metabolismo do folato e unidades de monocarbono. O metabolismo das unidades de monocarbono (*one carbon metabolism*) é um integrador de estado nutricional em que fontes de nutrientes diversas como a serina, glicina, teonina, vitamina b12, colina, entre outros compostos alimentam duas engrenagens: o ciclo do folato e o ciclo da metionina (Locasale, 2013). A metionina é um aminoácido essencial na dieta

humana. A metionina é a principal doadora de S-adenosilmetionina (SAM) que é o doador universal de grupos metil para as reações epigenéticas tanto das histonas como das ilhas CpG no DNA (Sanderson et al., 2019). Reações epigenéticas podem influenciar na transcrição gênica. As reações de metilação, acetilação e fosforilação são reações metabólicas e epigenéticas melhores caracterizadas e todas são controladas pelo metabolismo celular (Kaelin; McKnight, 2013; Kinnaird et al., 2016).

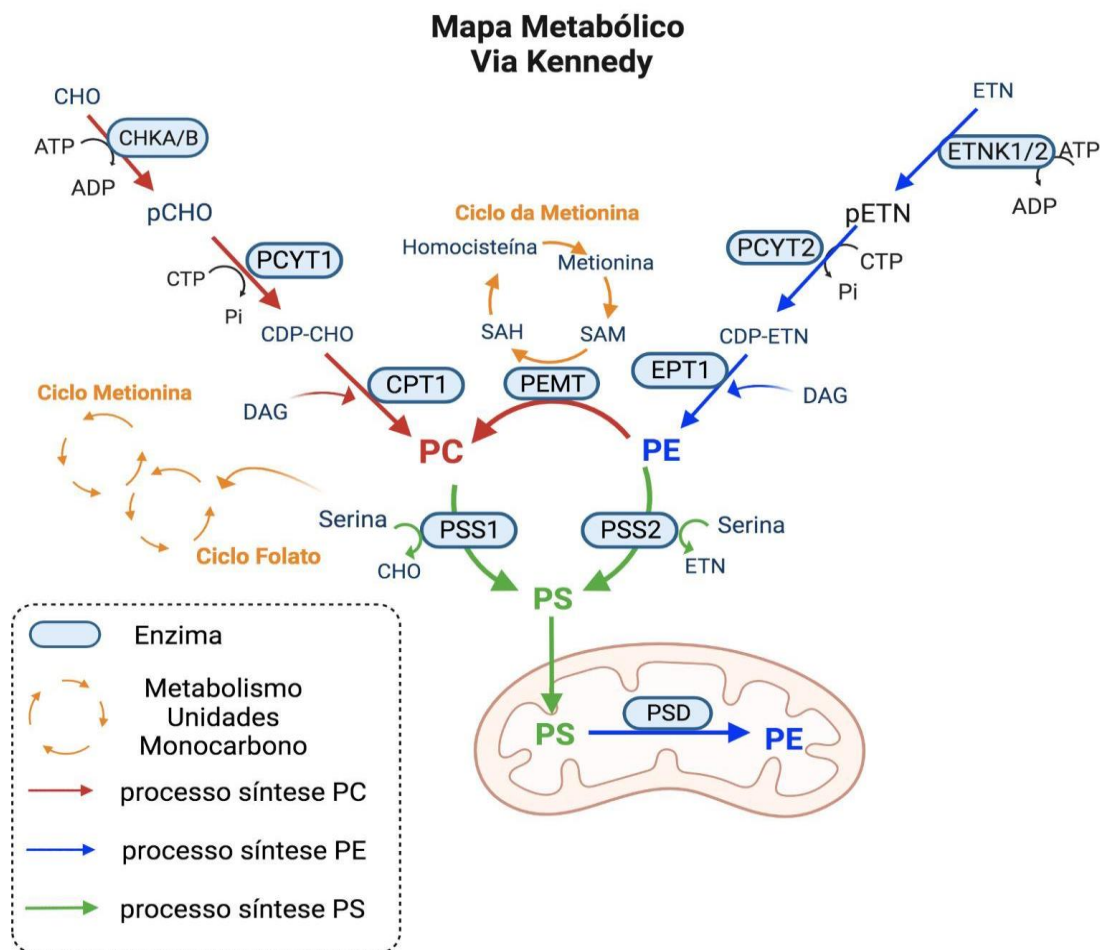
1.7 Metabolismo dos lipídios, ácidos graxos e colesterol nos tumores

O metabolismo dos lipídios também é dinâmico com uma adaptação metabólica e mudança de rotas diante da biodisponibilidade de nutrientes e oxigênio, entre outros estímulos estressantes (Munir et al., 2019). O colesterol modula vias de sinalização envolvidas na carcinogênese. Seu metabolismo começa com a Acetil-CoA e HMG-CoA na via do mevalonato até a formação do colesterol. Uma vez formado, ele pode participar da formação de ésteres de colesterol e oxisteróis. Os oxisteróis derivados das células tumorais podem realizar uma imunomodulação local no microambiente tumoral (Huang et al., 2020). O metabolismo de ácidos graxos (AGs) dá suporte para a carcinogênese e progressão do tumor através de diversos circuitos metabólicos. As células cancerígenas adquirem AGs do meio extracelular através de endocitose ou macropinocitose (Lin et al., 2020). Os AGs auxiliam tanto no processo de armazenamento, biosíntese de membrana e até sinalização intracelular (Nagarajan et al., 2021). Além disso, a reprogramação metabólica de AGs é um dos meios de resistência às terapias antitumorais (Hoy et al., 2021).

1.8 Metabolismo dos fosfolipídios

Eugene P. Kennedy, aluno de Albert Lehninger, na Universidade de Harvard, dedicou seus estudos aos fosfolipídios de membrana (Chang; Kennedy, 1967) em *Escherichia coli* (Miller; Kennedy, 1987). Seus estudos sobre o metabolismo de fosfolipídios em bactérias resultou no nome de batismo da via de síntese de fosfatidiletanolamina (PE) e fosfatidilcolina (PC): “*The Kennedy Pathway*” (Gibellini; Smith, 2010; Dowhan; Bogdanov, 2021). Algo que pode ser

considerado uma complexa via metabólica que, basicamente, possui dois diferentes braços: o braço da PC, com a colina em uma extremidade e a fosfatidilcolina na outra; e o braço da PE, com a etanolamina em uma extremidade e a fosfatidiletanolamina na outra (Pavlovic; Bakovic, 2013; Huang; Freter, 2015). A etanolaminoquinase-1 ou 2 (ETNK1/2) catalisa uma reação de fosforilação cujos reagentes são a etanolamina (ETN) e o ATP. Seus produtos são fosfoetanolamina (pETN) e o ADP. A ETNK1/2, são mais específicas para fosforilação da ETN, sendo responsáveis pela primeira etapa (Gibellini; Smith, 2010). A segunda etapa, é mediada pela enzima fosfoetanolamina citidiltransferase-2 (PCYT2) (Pavlovic; Bakovic, 2013). Esta catalisa a reação cujos reagentes são a pETN e CTP. Os produtos são a CDP-ETN e o pirofosfato. A PCYT2 é altamente específica para pETN, que está como reagente nessa última reação, ao mesmo tempo em que está como produto na primeira etapa catalisada pelas ETNK1/2. Por fim, na última etapa da síntese de fosfatidiletanolamina, a enzima 1,2-diacilglicerol etanolamina fosfotransferase (SELANOI ou EPT1) condensa a CDP-ETN junto com diacilglicerol (DAG) para formar fosfatidiletanolamina (PE) [Figura 3] (Patel; Witt, 2017). Ao mesmo tempo, na mitocôndria, a fosfatidiletanolamina (PE) pode ser sintetizada através da descarboxilação da fosfatidilserina (PS) pela enzima fosfatidilserina descarboxilase (PSD) [Figura 3] (Flis; Daum, 2013). As células podem transformar um fosfolípido em outro. Esses processos metabólicos estão interconectados a outras engrenagens metabólicas, como o metabolismo das unidades de monocarbono [Figura 3] (Ye et al., 2017).



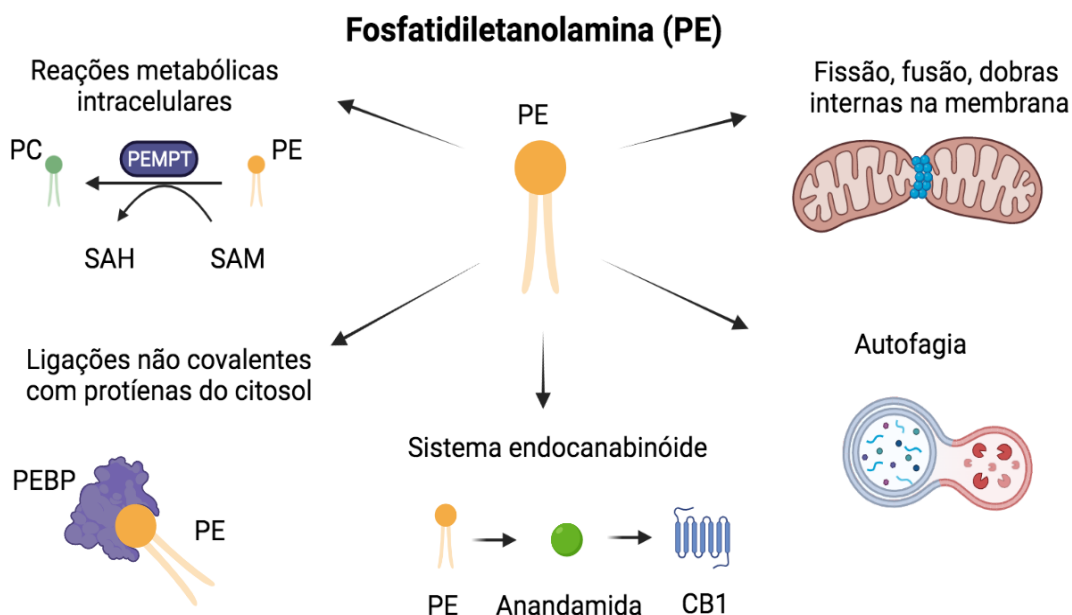
Fonte: Guilherme Ayres Rossini através da plataforma biorender.com

Legenda: PE = fosfatidiletanolamina; PS = fosfatidilserina; PC = fosfatidilcolina; PSD = fosfatidilserina descarboxilase-1; PSS1 = fosfatidilserina sintase-1; PSS2 = fosfatidilserina sintase-2; CHO = colina; pCHO = fosfocolina; CHKA/B = colino quinase A ou B; PCYT1 = fosfato citidiltransferase-1; CPT1 = colinafosfotransferase-1; ETN = etanolamina; ETNK1/2 = etanolamina quinase-1 ou 2; pETN = fosfoetanolamina; PCYT2 = fosfoetanolamina citidiltransferase-2; ATP = adenosina trifosfato; ADP = adenosina difosfato; CTP = citosina trifosfato; CDP = citosina difosfato; CDP-pETN = CDP-fosfoetanolamina; DAG = diacilglicerol; EPT1 = 1,2-diacilglicerol etanolamina fosfotransferase; SAM = S-adenosil metionina; SAH = S-adenosil homocisteína.

Figura 3: Ao lado esquerdo da figura, é possível observar as etapas de síntese endógena de PC, ou braço PC da via Kennedy. No lado direito, é possível observar as etapas da síntese endógena de PE, ou braço PE da via Kennedy. Ao centro está representada a conversão de PE em PC por uma enzima que conecta a via Kennedy com o Metabolismo das Unidades de Monocarbono. A PC e a PE podem ser convertidas em PS, que, por sua vez, pode ser convertida novamente em PE na mitocôndria por uma reação de descarboxilação da PS.

Os fosfolipídios são estruturas que compõem a membrana plasmática das células (Sezgin et al., 2017), formadas por uma parte (“pernas”) constituída de cadeias acila hidrofóbica/apolar e outra parte (“cabeça”) constituída por grupamentos fosfato hidrofílico/polar. A região hidrofílica pode ser classificada de acordo com sua forma e função: a PS e o fosfatidilinositol (PI) que se

comportam como ânion; e, a PE e a PC que se comportam como zwitterion (Holthuis; Menon, 2014). Um zwitterion é uma molécula com grupos funcionais com carga negativa e positiva (pode doar ou receber carga). A PC possui uma forma cilíndrica que se auto-organiza proporcionando uma estabilidade e fluidez para a membrana. Por outro lado, a PE possui, devido à sua cabeça polar relativamente pequena, um formato de cone facilitando áreas de “dobras” negativas na membrana. Essas regiões são os locais em que ocorrem fusões e fissões, assim como o ancoramento de proteínas (Holthuis; Menon, 2014). A PE é considerada o segundo fosfolípido mais abundante, ocupando predominantemente a face interna da membrana plasmática, possuindo importante papel na composição da membrana das mitocôndrias e retículos (Flis; Daum, 2013). No entanto, seu destino não é apenas fazer parte da estrutura da membrana: a PE também pode participar da autofagia (Rockenfeller et al., 2015) e de reações de metilação como a principal consumidora de SAM e grupos metil das células (Ye et al., 2017). Ao mesmo tempo, a PE pode se ligar de maneira não covalente com uma família de proteínas citoplasmáticas com múltiplas funções chamadas proteínas de ligação da fosfatidiletanolamina (do inglês: *phosphatidylethanolamine-binding proteins* [PEBP]). O aumento da expressão do gene PEBP4 está associada à progressão, invasão e metástase em diversos tipos de tumores devido à modulação da via PI3K/AKT (Luo et al., 2019). No sistema endocanabinóide, a PE sofre ação de N-acetiltransferases até ser transformada em N-aciletanolamina, precursor do endocanabinóide anandamida que atua em receptores CB1 e 2 [Figura 4] (Cristino et al., 2020).



Fonte: Guilherme Ayres Rossini através da plataforma biorender.com

Legenda: PE = fosfatidiletanolamina; PC = fosfatidilcolina; PEMPT = fosfatidiletanolamina n-metiltransferase; SAM = S-adenosilmetionina; SAH = S-adenosilhomocisteína; PEBP = proteína ligadora de fosfatidiletanolamina; CB1 = cannabinoide receptor 1

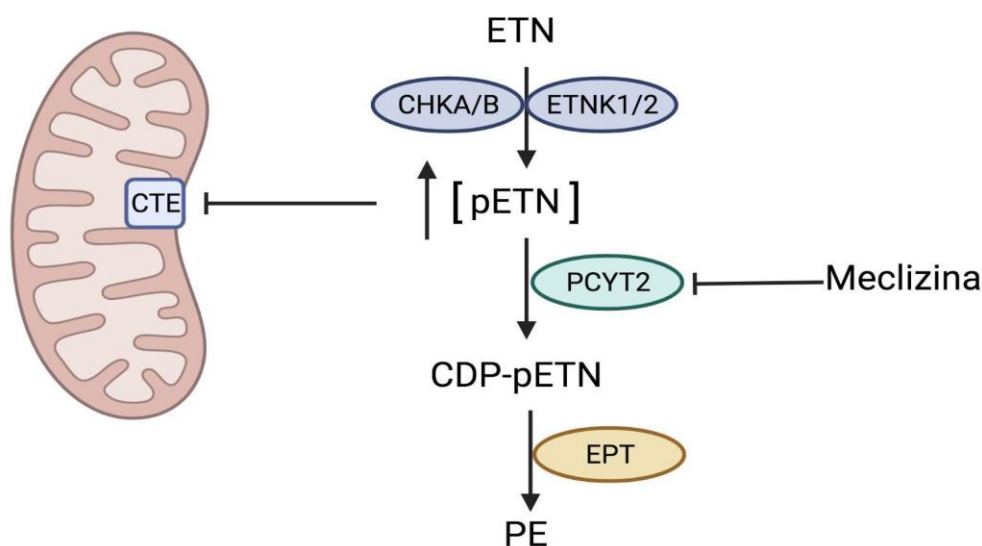
Figura 4: Representação das diferentes funções da PE. No canto superior esquerdo, está representada a reação de metilação da PE, catalizada pela PEMPT. No canto superior direito, está representado a consequência da função estrutural da PE, servindo como um dos fosfolípidios de membrana que compõem as membranas das organelas e da célula. As regiões com PE são os locais onde tende-se a ocorrer fissão e fusão das membranas. No canto inferior direito, está representado autofagia, em que a PE também atua. No canto inferior esquerdo, está representada a ligação da PE com a PEBP, uma proteína citoplasmática com inúmeras funções celulares, relacionada com o câncer. Na região central inferior, está a relação da PE com o sistema endocanabinóide. A PE atua como precursora de uma dos principais endocanabinóides, a anandamida que atua nos receptores CB1.

1.9 Metabolismo como alvo terapêutico

Da mesma maneira que existe uma heterogeneidade genética na mesma peça tumoral, existe uma heterogeneidade e plasticidade metabólica (Diaz-Ruiz et al., 2011; Gerlinger et al., 2012; Schito; Semenza, 2016). As estratégias antitumorais que possuem o metabolismo como alvo podem atuar por diferentes mecanismos de ação: inibir uma via que dá suporte ao crescimento tumoral; induzir distúrbios metabólicos ao diminuir ou aumentar a concentração de algum metabólito; e, interferir na homeostase de estresse oxidativo e funcionamento da fosforilação oxidativa mitocondrial (Martinez-Outschoorn et al., 2017). As combinações de drogas que atuam no metabolismo

dos tumores são imensas devido à grande quantidade de vias interligadas. As engrenagens metabólicas podem se relacionar por diversos mecanismos, como o uso do mesmo substrato de uma reação enzimática, as enzimas em si, cofatores de reações enzimáticas, etc. Estratégias que possuem o metabolismo como alvo terapêutico tendem a utilizar uma combinação de drogas devido à capacidade de reprogramação metabólica dos tumores (Altman et al., 2016; Martinez-Outschoorn et al., 2017). O metabolismo de fosfolipídios, em especial a via de síntese de PE também pode ser alvo terapêutico em tumores (Guan et al., 2020). Em um estudo de rastreamento de uma droga capaz de inibir a fosforilação oxidativa, o cloridrato de meclizina teve esse potencial, de maneira independente da via HIF1A (Gohil et al., 2010). Seu efeito na mitocôndria se dá de maneira indireta e não está relacionada ao conhecido efeito inibitório em receptores H1; mas, sim, a inibição não-competitiva da PCYT2 e o acúmulo do principal substrato direto: a fosfoetanolamina (pETN) que possui efeito biológico inibitório na fosforilação oxidativa na CTE [Figura 5] (Gohil et al., 2013).

Mecanismo de ação da meclizina na mitocôndria



Fonte: Guilherme Ayres Rossini através da plataforma biorender.com

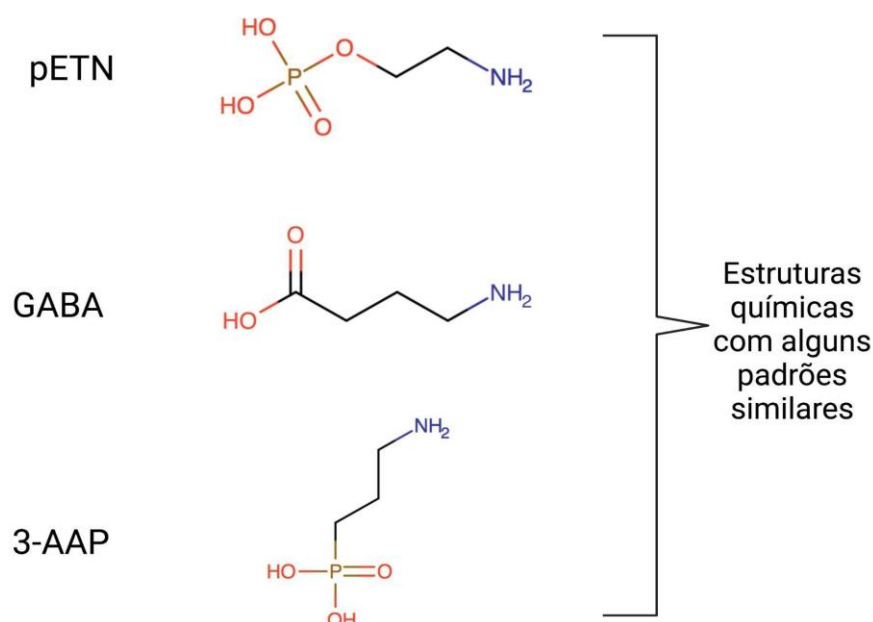
Legenda: PE = fosfatidiletanolamina; ETN = etanolamina; ETNK1/2 = etanolamina quinase-1 ou 2; pETN = fosfoetanolamina; PCYT2 = fosfoetanolamina citidiltransferase-2; CHKA/B = colina quinase-2 ou 2; CDP-pETN = citosina difosfato-fosfoetanolamina; CTE = Cadeia Transportadora de Eletrons.

Figura 5: É possível observar a ação inibitória do cloridrato de meclizina na mitocôndria de maneira indireta. Ao lado esquerdo da figura, é possível também possível ver a CTE sendo inibida pelas altas concentrações de pETN, que é resultado da inibição da PCYT2 pelo cloridrato de meclizina.

1.10 Fosfoetanolamina (pETN)

As primeiras publicações sobre a fosfoetanolamina datam da década de 1930, quando Edgard Laurence Outhouse descreveu a presença de fosfoetanolamina (“*Amino-ethyl phosphoric acid*” nas palavras de Outhouse) em mais de 20 tecidos normais assim como em tumores bovinos malignos e não-malignos (Outhouse, 1936, 1937). No entanto, existem registros que afirmam que o bioquímico Erwin Chargaff (na década de 1940) foi o primeiro cientista a identificar a molécula de pETN com nome de “*Colamine Phosphate*” que posteriormente também foi chamada de “*Membrane Integrity Factor*”, “*Vitamin M*” e “*calcium-EAP*” (Nieper, 1998).

Em Londres, pesquisadores constataram a presença de pETN na saliva e urina de pacientes (Rose; Kerr, 1958); e, na mesma cidade, Cusworth isolou e identificou fosfoetanolamina na urina de pacientes com hipofosfatase (Cusworth, 1958). Do outro lado do oceano Atlântico, nos Estados Unidos, Smith e Rossi mostraram que a pETN pode sofrer degradação enzimática pela fosfatase alcalina (Smith; Rossi, 1958). Posteriormente, pesquisadores alemães apontaram que o pH de 10 é o ideal para fosfatase alcalina realizar hidrólise da pETN, e em pH fisiológico a taxa máxima de hidrólise é em torno de 8% (Muller et al., 1989). Ainda na Alemanha, quantidades significativamente menores de pETN foram encontradas nos trombócitos de pacientes portadores de doença arterial crônica (Bruhn et al., 1977). No Japão, um grupo de pesquisadores apontou que a pETN pode agir no sistema renina-angiotensina, inibindo a taxa de formação da angiotensina devido a inibição não-competitiva da renina com efeitos hipotensores (Miyazaki et al., 1976). No sistema nervoso central, a pETN também tem características inibitórias uma vez que está envolvida com a potencialização da neurotransmissão inibitória (Klunk et al., 1995). Inicialmente, a hipótese era a possibilidade da pETN atuar diretamente nos mesmos receptores (GABAB) que outros neurotransmissores sabidamente inibem (e.g. gama-aminobutírico [GABA] e o análogo 3-amino-ácido-propil-fosfórico [3-AAP]) devido à sua semelhança estrutural [Figura 6]. Porém, ensaios experimentais sugerem que a pETN atue na neurotransmissão inibitória em um outro nível (Klunk et al., 1995).



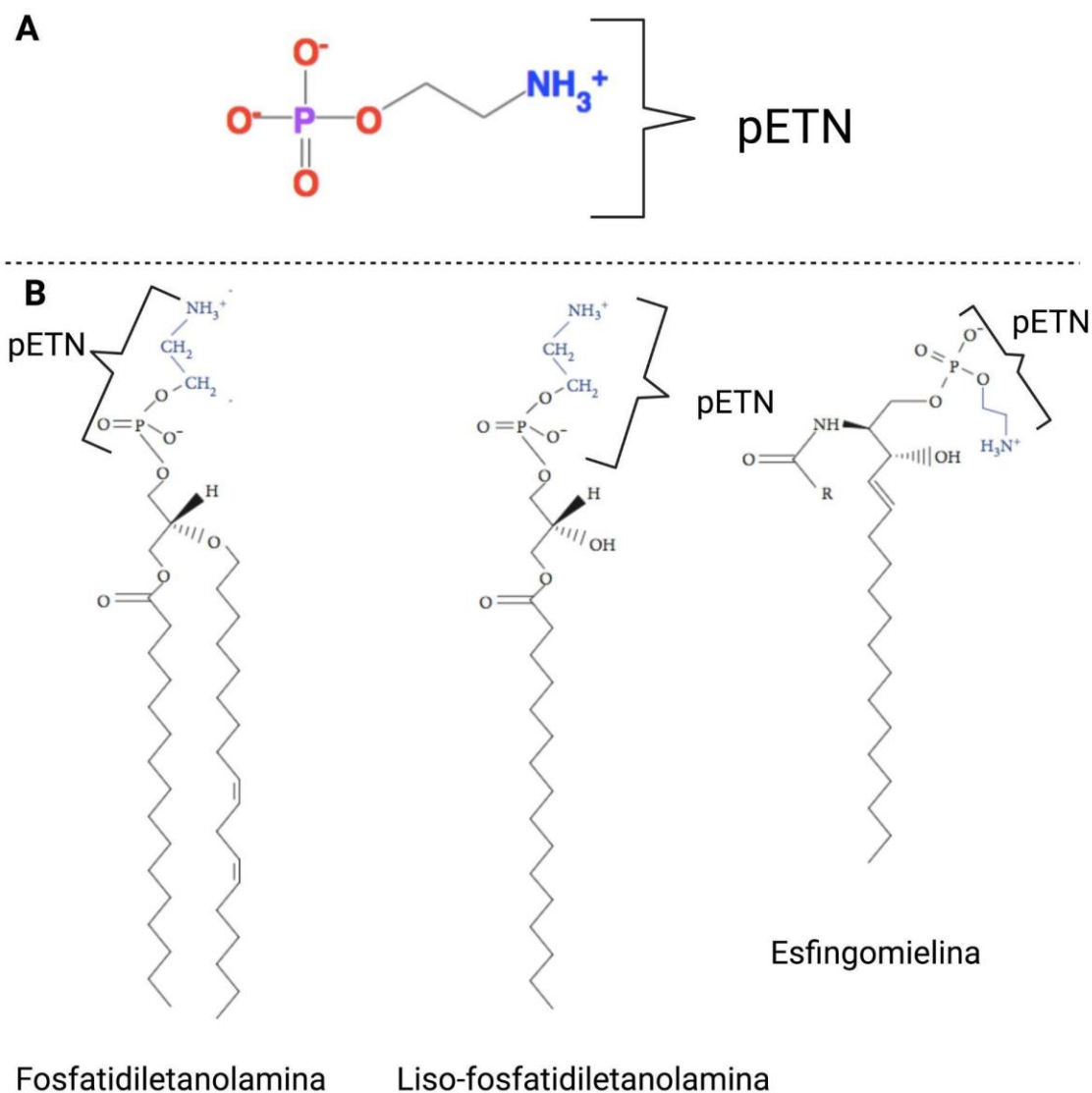
Fonte: Adaptado de pesquisas na Human Metabolome Database, adaptação elaborada por Guilherme Ayres Rossini através da plataforma biorender.com

Legenda: pETN = fosfoetanolamina; GABA = gamma-aminobutírico; 3-AAP = 3-amino ácido propil fosfórico

Figura 6: A figura mostra alguns padrões semelhantes entre as estruturas das moléculas pETN, GABA e 3-AAP, sendo que as 3 moléculas possuem grupamento amina em uma de suas extremidades e duas delas (pETN e 3-AAP) possuem o grupamento fosfato na outra.

Nos distúrbios de proliferação celular, Naish e Rylet constataram acúmulo de pETN no fígado de ratos injetados com hepatocarcinógenos (Naish; Rylett, 1960). Pesquisadores japoneses, associaram a pETN como possível fator de crescimento tumoral derivado da hipófise em um experimento com células de câncer de mama em ratos (Kano-Sueoka et al., 1979). Estudos com ressonância magnética e fósforo-31 sugerem alterações do metabolismo de fosfolípidios e da fosfoetanolamina nos tumores (Oberhaensli et al., 1986; Daly et al., 1987; Daly; Cohen, 1989; Cadoux-Hudson et al., 1989). Ao mesmo tempo, o metabolismo da pETN também pode estar alterado em estados fisiológicos de proliferação celular, como na produção do leite materno humano (Twelves et al., 1994). Atualmente, sabe-se que a pETN é uma pequena molécula orgânica zwitteriônica que possui tanto o grupamento fosfato quanto o grupamento amina em sua estrutura [Figura 7A]. A molécula de pETN compõe a parte polar da estrutura de alguns fosfolípidios de membrana das células como PE, liso-

fosfatidiletanolamina e esfingomiéline [Figura 7B] (Patel; Witt, 2017).



Fonte: Desenho elaborado por Guilherme Ayres Rossini através da plataforma biorender.com e adaptado de Patel D e Witt SN, 2017.

Legenda: PE = fosfatidiletanolamina; pETN = fosfoetanolamina

Figura 7: **A:** fórmula química de pETN, quimicamente ativa; **B:** diferentes moléculas de fosfolipídios de membrana que contêm a pETN em sua “cabeça” polar. À esquerda, está a fosfatidiletanolamina, no meio, a liso-fosfatidiletanolamina e, à direita, a esfingomiéline.

1.11 Nova rota de síntese da fosfoetanolamina sintética

Edgard Laurence Outhouse foi o primeiro a descrever uma metodologia de síntese da fosfoetanolamina sintética com rendimento de 80% (Outhouse, 1936; 1937). Em 1951, os cientistas italianos Giorgio Ferrari e Emiliano Ferrari

patentearam uma outra rota de síntese da pETN (Ferrari; Ferrari, 1951). Na mesma década, Cherbuliez et al. (1958) propuseram uma outra rota de síntese com base na de Outhouse. Na década seguinte, pesquisadores conseguiram separar a fosfoetanolamina da cilatina (Neuzil et al., 1969). O médico alemão Hans A. Nieper pediu ao químico Dr. Franz Kohler para sintetizar o sal de pETN. A síntese química de pETN feita por Franz Kohler continha cálcio e por isso ficou conhecida como *Calcium-EAP*. O Dr. Nieper, em 1964, iniciou estudos clínicos do *Calcium-EAP* em esclerose múltipla e em 1967 a legislação federal da Alemanha já permitia a administração de *Calcium-EAP* para esclerose múltipla como opção terapêutica (Nieper, 1989). Nieper (1995) também observou que, dos mais de 2800 pacientes sob tratamento de *Calcium-EAP* para esclerose múltipla, poucos, proporcionalmente, desenvolveram câncer.

No Brasil, o químico Gilberto Orivaldo Chierice (1944-2019) levantou uma hipótese para a relação da pETN com os tumores: diferentemente dos pesquisadores do Japão - que a identificaram como fator de crescimento tumoral -, para Chierice, a pETN era um composto antitumoral endógeno e o acúmulo em tecidos tumorais era reflexo de uma tentativa do corpo parar ou reverter aquele estado patológico. Nesse sentido, trabalhou para descrever uma nova rota de síntese da fosfoetanolamina sintética. Na rota de síntese de Chierice, utiliza-se monoetanolamina e ácido fosfórico em condições específicas para as reações químicas resultarem na formação do sal cristalizado da pETN [Figura 8] (Ribeiro Filho; Chierice, 1998; Al-Asfour, 2008). Chierice orientou alunos em programas de pós-graduação *stricto sensu* sobre a síntese, caracterização e efeito biológico da pETN (Ribeiro Filho; Chierice, 1998; Meneguelo, 2007; Almeida, 2007; Al-Asfour, 2008). Em 28 de fevereiro de 2008, em conjunto com seu companheiro de pesquisa Salvador Claro Neto, e outros pesquisadores, realizaram o depósito da patente de uma nova rota de síntese da pETN na forma sólida com cálcio, magnésio e zinco e na forma de solução com monoetanolamina, com baixo custo de produção (PI 0800460-9 A2). Chierice contava com o Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria, do Instituto Butantan, com quem mais publicou trabalhos sobre a pETN (Ferreira et al., 2011; 2012a; 2012b; 2013a; 2013b; 2013c; Luna et al., 2016; 2018a; 2018b). Durvanei constatou que o efeito biológico antitumoral da pETN é dependente da concentração (Ferreira

et al., 2012; 2012b; 2013a). Ele também observou que a concentração citotóxica para células tumorais não afeta as células normais (Ferreira et al., 2011).



Fonte: Adaptada do trabalho de Ferreira et al., 2011

Figura 8: Fotografia do cristal de fosfoetanolamina sintetizado por Chierice

Em 2015 o Ministério da Ciência e Tecnologia (MCTI) se comprometeu a investir 10 milhões de reais em estudos sobre a fosfoetanolamina (Brasil, 2015). Juntamente com o Ministério da Saúde, instituiu o Grupo de Trabalho por meio da portaria número 1.767 de 29/10/2015. Este grupo de trabalho realizou experimentos de maneira independente dos pesquisadores do Instituto Butantan. Alguns experimentos envolveram o sal sintetizado por Chierice em comparação com o sal vendido no mercado (Sigma Aldrich®). O grupo de trabalho foi composto por pesquisadores de Florianópolis, Campinas e Fortaleza. Em Fortaleza, na Universidade Federal do Ceará, as pesquisas foram lideradas pelo Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho que mostrou resultados pré-clínicos semelhantes ao do Prof. Dr. Durvanei, evidenciando que a pETN, em determinadas concentrações, é capaz de inviabilizar culturas de diferentes tipos celulares em ensaios *in vitro* (Moraes Filho et al., sd, a, b).

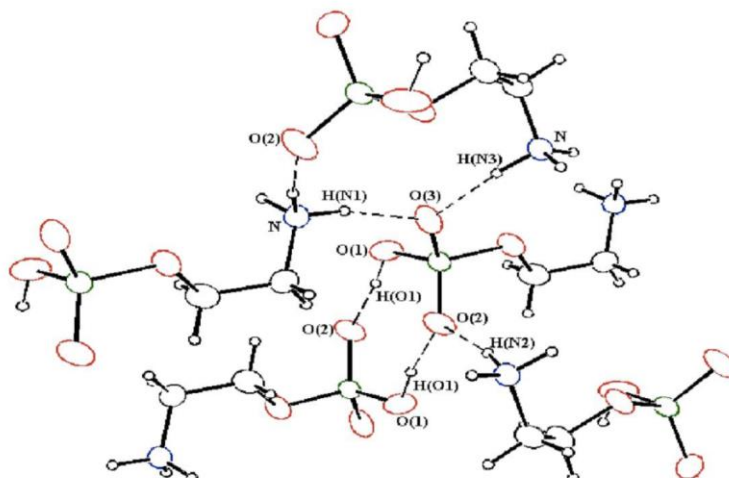
Nos estudos *in vivo*, os camundongos enxertados com melanoma apresentaram redução de 64% da massa tumoral nas doses 1000mg/kg por via oral (Moraes Filho et al., 2016b). Nos outros modelos avaliados, a administração de pETN por via oral não teve o mesmo efeito (Moraes Filho et al., 2016a; 2016c).

Na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), os estudos foram

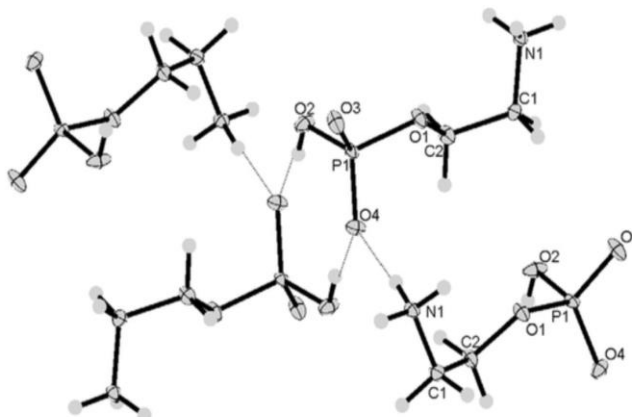
liderados pelos Profs. Drs. Eliezer J. Barreiro e Luiz Carlos Dias. Dezesesseis cápsulas com sal de pETN foram analisadas através de ressonância nuclear magnética de hidrogênio-1, carbono-13 e fósforo-31 que mostraram a presença da pETN, monoetanolamina protonada, fosfobisetanolamina, fosfato de cálcio, fosfato de magnésio, pirofosfato de cálcio e pirofosfato de magnésio em sua maioria e, em menor quantidade, dentro do limite seguro (provável contaminação), outros compostos como zinco, bário, alumínio, manganês e ferro (Brasil, 2016).

Em Florianópolis, estudos farmacocinéticos liderados pelo Prof. Dr. João Batista Calixto apontam que a pETN administrada por via oral é absorvida para corrente sanguínea, sendo que o tempo para atingir a concentração máxima variou de 5 a 360 minutos com meia vida de eliminação longa (24h). Quando comparados com a pETN da Sigma-Aldrich®, o tempo para atingir a concentração máxima variou de 5 a 120 minutos com tempo de meia vida de eliminação de 5h - uma diferença significativamente menor de padrões farmacológicos da pETN Sigma Aldrich® em relação a pETN de Chierice (Brasil, 2015a). Quando administrados por via endovenosa, o tempo de meia vida de eliminação foi substancialmente superior em relação ao oral. Segundo o relatório do grupo de trabalho, esse perfil farmacocinético é não usual do tipo “flip-flop”, em que a taxa de absorção é mais lenta que a de eliminação (Brasil, 2015a). Uma possível explicação para a diferença de padrões farmacológicos da pETN de Chierice em relação à pETN Sigma Aldrich® pode ser atribuída a algumas particularidades da estrutura tridimensional e à configuração geométrica entre as moléculas de pETN cristalizadas pela rota de síntese de Chierice [Figura 9A] e as pETN adquiridas da indústria Sigma-Aldrich® [Figura 9B] (Myller et al., 2013).

A



B



Fonte: Adaptação dos trabalhos de Ribeiro Filho; Chierice, 1998 e Myller et al., 2013; adaptação elaborada por Guilherme Ayres Rossini através da plataforma biorender.com

Figura 9: **A:** Representação ORTEP, a partir de estudos de difração de raio-x, do sal de pETN (Ribeiro Filho; Chierice, 1998); **B:** Representação ORTEP, a partir de estudos de difração de raio-x, do sal de pETN Sigma Aldrich® (Myller et al., 2013).

1.12 Segurança e toxicidade do sal de pETN

Testes de acordo com o guia 471 da OECD apontaram ausência de ação tóxica na medula (Freitas et al., 2016). Ensaio para detectar mutações de ponto foram realizados em diferentes cepas de *Salmonella typhimurium*, com o mínimo de cinco linhagens (TA97a, TA98, TA100, TA102 e TA1535). Os resultados apresentaram índice de mutagenicidade entre 0,8 e 1,5 (menor que 2), preenchendo critérios para uma resposta negativa, ou seja, o sal não apresentou atividade mutagênica (Brasil, 2016). Uma análise *in silico* mostrou baixa

probabilidade de neurotoxicidade para o sal de fosfoetanolamina e seus metabólitos (Lorenzo et al., 2016). Da mesma maneira, em ensaios controlados, a exposição pETN não alterou nenhum parâmetro neurológico pré-estabelecido pelos testes de segurança, mostrando segurança neurológica (De Andrade et al., 2016a). Em relação a segurança cardiovascular, a pETN não inibiu canal hERG de potássio (Moreira et al., 2019) e não alterou cronotropismo, inotropismo e lusitropismo cardíaco nem padrões hemodinâmicos, revelando segurança cardiovascular e hemodinâmica (De Andrade et al., 2016b). Quando administrada por via oral em ratos Wistar, Swiss e camundongos enxertados com tumores, nenhum dos modelos apresentou sinais de toxicidade como alteração de peso, alterações nos parâmetros bioquímicos e hematológicos (Moraes Filho et al., 2016a; 2016b; 2016c).

Os ensaios pré-clínicos de dose máxima tolerada e toxicidade oral do composto em ratos foram divididos em duas etapas: na etapa um, havia 5 grupos com 3 machos e 3 fêmeas que foram tratados com dose única de fosfoetanolamina sintética por via oral nas doses 175mg/kg, 550mg/kg, 1750mg/kg e 5000mg/kg, e o grupo controle com cloreto de sódio 0,9%. Os animais foram acompanhados durante 14 dias. Os resultados não mostraram nenhum sinal indicativo de toxicidade. Todos os animais sobreviveram durante todo período experimental, com parâmetros de peso corporal, consumo de ração e bioquímica, além de sinais clínicos, dentro da normalidade. Na avaliação hematológica, todos os parâmetros permaneceram inalterados, exceto a variação quantitativa de monócitos para machos e fêmeas, sendo considerados inconclusivos os dados devido ao pequeno número de amostras do grupo. Na segunda etapa, o tratamento foi repetido durante 7 dias nas doses de 1.000mg/kg. Novamente, os resultados não indicaram sinais de toxicidade. Todos os animais sobreviveram durante todo período de estudo sem alterações clínicas, do peso corporal, consumo de ração, peso e tamanho dos órgãos. Nas análises hematológicas, o número de leucócitos diminuiu em ratos machos tratados, assim como a glicose e triglicerídeos em ratos fêmeas nas análises bioquímicas. O grupo concluiu que o composto é seguro e que não foi possível mensurar a dose máxima tolerada devido ao fato da substância testada não ter apresentado toxicidade em nenhuma das doses testadas (Bento et al., 2016).

Ensaio com a administração de pETN por via endovenosa em camundongos também sugerem segurança do composto em determinadas doses. No geral, os animais mantiveram o consumo de ração normalmente; porém, os animais tratados apresentaram alteração (diminuição) significativa do peso durante o tratamento, retornando ao normal no vigésimo oitavo dia. No grupo de dose única, a grande maioria dos animais não apresentaram sinais de alterações clínicas detectáveis - apenas os subgrupos de doses 500mg/kg manifestaram (onde 33,3% dos animais, logo após a administração do composto, apresentaram alteração do estado de consciência, irresponsividade ao toque, entre outros sintomas que duram por volta de 3 minutos evoluindo para melhora dos mesmos). No grupo 1000mg/kg, 33,3% dos animais também apresentaram essas alterações clínicas; mas, os sintomas não reverteram e os animais morreram. O aumento de reticulócitos foi observado em ambos os grupos após o sétimo dia de aplicação, assim como outras alterações inespecíficas das células do sangue (Araujo, 2018).

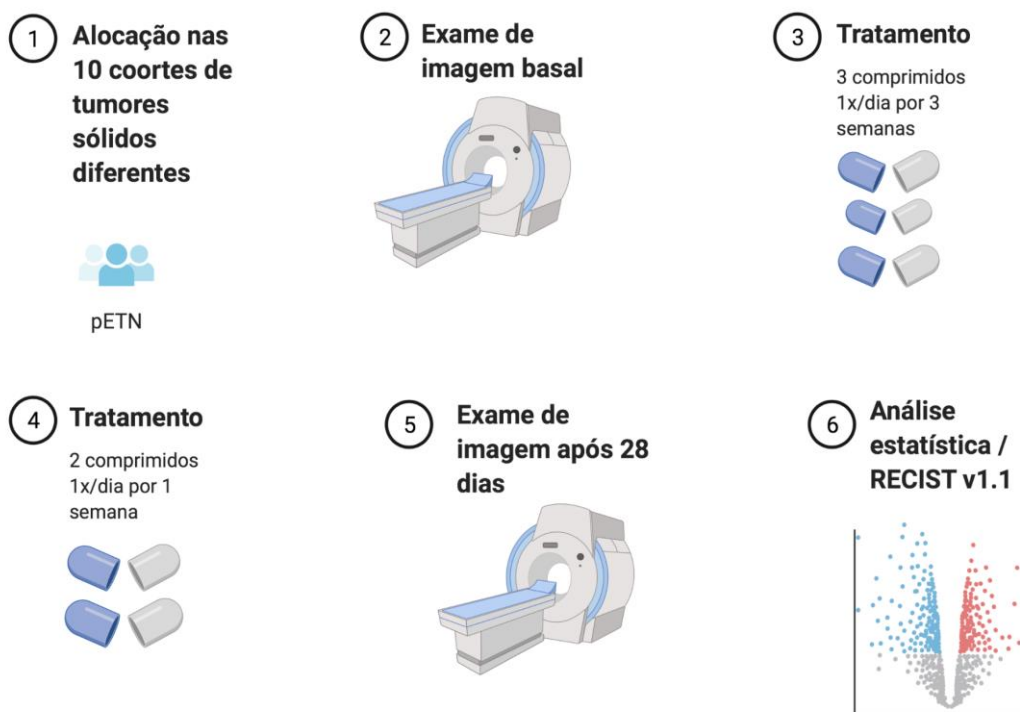
Em um estudo em cães domésticos fase 1, com administração por via endovenosa da pETN, um total de 12 animais foram divididos em 4 grupos com diferentes doses de 30mg/kg a 150mg/kg administradas por via endovenosa semanalmente por até 8 semanas. Os autores notaram uma mudança transitória da frequência respiratória no momento da infusão. O composto foi considerado seguro até na dose máxima testada (150mg/kg) 1x/semana por 8 semanas, assim como não influenciou parâmetros biliares ou induziu toxicidade hepática, nem alterou a função renal (uréia e creatinina). Os níveis de proteínas totais e glicêmicos não demonstraram diferença significativa e os níveis dos eletrólitos potássio, sódio e fósforo se mantiveram constantes, sendo que apenas o cálcio ionizado apresentou um aumento significativo nos níveis plasmáticos em relação ao grupo controle (Cunha, 2019). Em cães portadores de mastocitomas de alto grau, a administração de pETN nas doses de 70mg/kg por via endovenosa semanalmente mostrou-se segura e com boa tolerabilidade dos animais (Januario et al., 2022).

Em seres humanos, o Prof. Dr. Paulo Marcelo Gehm Hoff foi o líder dos primeiros estudos controlados do sal de pETN administrada por via oral. O Governo do Estado de São Paulo patrocinou o primeiro estudo controlado da

pETN no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP, s.d.) após polêmicas envolvendo judicialização da saúde (Ledford, 2015). Na primeira fase, que avalia segurança e toxicidade, o sal foi considerado seguro (ICESP; sd, b). Não foram avaliados parâmetros de farmacocinética e farmacodinâmica, dose terapêutica, efeito de primeira passagem. Na segunda fase, 210 pacientes (mas finalizada com 72 pacientes) foram divididos em 10 coortes diferentes compostas por doentes portadores de tumores sólidos metastáticos refratários a pelo menos uma terapêutica de primeira linha. Nesse estudo de eficácia fase 2, utilizou-se o RECIST v1.1 como critério de resposta terapêutica: um critério anatômico (tamanho do tumor) com base no exame de imagem de tomografia computadorizada (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02950103).

Após realizarem exames de sangue e de imagem (tomografia), os pacientes foram tratados com 1.500mg/dia (3 cápsulas tomadas juntas pela manhã) por 3 semanas durante o primeiro ciclo. Posteriormente, as doses eram reduzidas para 1.000mg/dia (2 cápsulas tomadas juntas pela manhã) por mais 1 semana. Após o intervalo total de 28 dias, eram realizados novamente os exames de sangue e imagem [Figura 10]. O impacto na qualidade de vida e sobrevida global do uso contínuo do composto não foi avaliado no estudo. No geral, pode-se concluir que a administração do sal via oral foi considerada segura em seres humanos e nenhum efeito adverso foi atribuído ao uso de pETN nas doses administradas. Já a resposta terapêutica, segundo critérios RECIST v1.1, foi observada apenas em um paciente da coorte de melanoma (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02950103). Em outro estudo, em cães portadores de sarcoma de partes moles, que também utilizou o critério RECIST, a administração endovenosa de pETN nas doses de 70mg/kg, uma vez por semana por 4 semanas, também falhou em mostrar efeito de citorredução tomográfica. No entanto, o mesmo estudo apontou alterações significativas na redução da temperatura do tumor constatadas através de câmeras de infravermelho (de Castro et al., 2022).

Etapas do estudo do ICESP



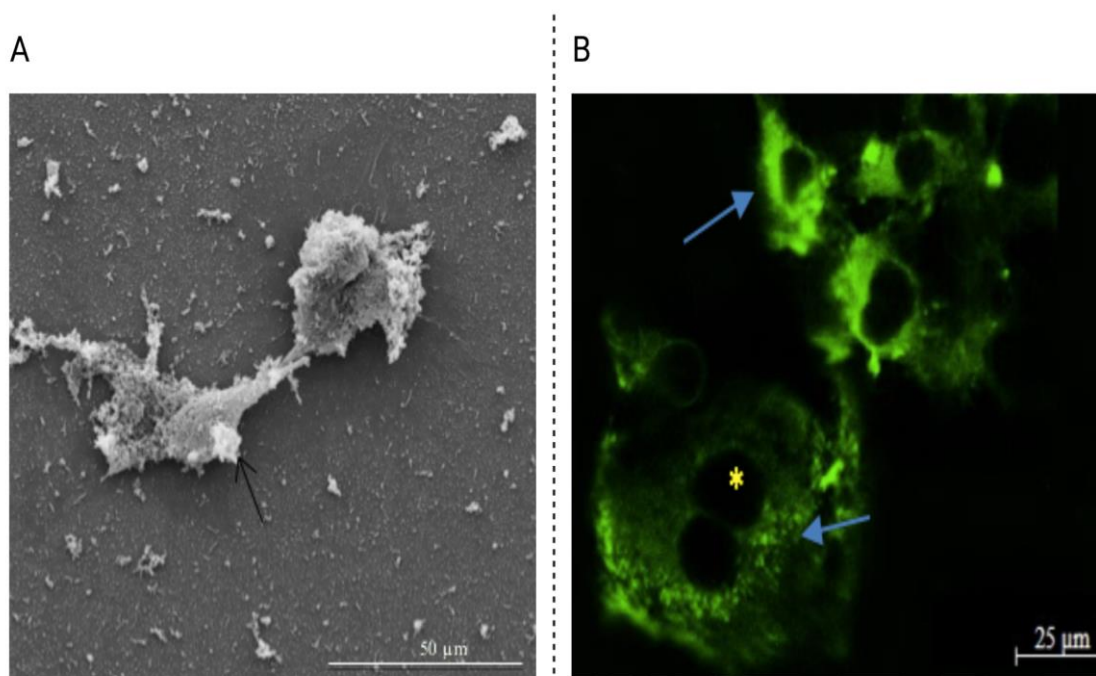
Fonte: Desenho elaborado por Guilherme Ayres Rossini através da plataforma biorender.com

Figura 10: Resumo das etapas do estudo realizado no Instituto do Câncer do Estado de SP (ICESP). **1:** Pacientes foram alocados nas respectivas coortes de acordo com os critérios de inclusão e exclusão; **2:** Exame de tomografia computadorizada para avaliar tamanho do tumor antes de iniciar o tratamento; **3:** Tratamento com três comprimidos de 2-AEH2F uma vez ao dia por 3 semanas; **4:** Descalonamento da dose para dois comprimidos uma vez ao dia por mais 1 semana; **5:** Realização de novos exames de tomografia computadorizadas para avaliar o tamanho do tumor após 28 dias de tratamento; **6:** Avaliação da resposta terapêutica de acordo com o tamanho do tumor. As análises estatísticas se basearam na comparação entre os exames de imagem realizados antes e depois do tratamento. Caso tumor do paciente não apresentasse uma diminuição significativa do tamanho do tumor, o tratamento era suspenso.

1.13 Formulação lipossomal nanoestruturada da pETN (2-AEH2F)

Com a ideia de aumentar a biodisponibilidade da pETN no microambiente tumoral, o grupo do Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria trabalhou para desenvolver uma formulação lipossomal nanoestruturada ou 2-AEH2F (Luna, 2017). Lipossoma é um composto formado a partir da interação de lipídios anfipáticos com água, caracterizado pela formação de duas monocamadas de lipídios com porções hidrofóbicas, que interagem entre si, e duas porções hidrofílicas que interagem com a água. A nova formulação se mostrou estável: o

tamanho da 2-AEH2F mais estável é de 59,61 nanômetros, com pouca modificação ao longo do tempo, apresentando taxa de encapsulação em torno de 50% e eletroafinidade por células tumorais (Luna et al., 2016; Luna, 2017). Em análises com microscopia eletrônica de varredura, foi possível observar os lipossomas aderidos às células cancerígenas (melanoma) antes de serem internalizados, sugerindo uma afinidade e atração eletromagnética [Figura 11a] (Luna et al., 2016; 2018a). O estudo de microscopia confocal a laser com o 2-AEH2F marcado com fluorescente Dil mostrou a internalização do composto para o interior das células de carcinomas hepatocelulares [Figura 11b] (Luna et al., 2018b). A 2-AEH2F também mostrou potencial antitumoral em linhagens celulares de adenocarcinoma de mama (Silva, 2016; Bonfim Neto, 2018), de carcinoma espinocelular de língua humana (de Carvalho, 2017) e de leucemia (Conceição, 2017).



Fonte: Desenho elaborado por Guilherme Ayres Rossini através da plataforma biorender.com e adaptado do trabalho de Luna et al., 2016 (Figura A) e Luna, 2017 (Figura A).

Figura 11: **A:** fotomicrografia eletrônica de célula melanoma (B16F10) com 2-AEH2F aderido na membrana (seta preta) antes de serem internalizados; **B:** fotomicrografia confocal a laser com 2-AEH2F lipossomas marcados com Dil já internalizados para o citoplasma das células tumorais (setas azuis). O asterisco em amarelo mostra o núcleo da célula tumoral (hepatocarcinoma).

Todas as vias moleculares envolvidas no mecanismo antitumoral da pETN ainda não foram totalmente descritas. Análise *in silico* dos possíveis efeitos biológicos do composto podem guiar futuros ensaios envolvendo o tema.

Elas auxiliam os pesquisadores tanto para testar hipóteses quanto para elaborarem hipóteses guiadas pela bioinformática. A bioinformática e biologia computacional são áreas do conhecimento científico interdisciplinar, que podem se desenvolver e aplicar métodos computacionais para analisar grande quantidade de dados. Esses, por sua vez, podem ser provenientes de sequenciamentos genéticos como na genômica, proteicos conforme a proteômica, metabólicos como na metabolômica, e de RNA como na transcriptômica, entre outros. Plataformas computacionais são plataformas de *software* integrado que possuem uma interface de fácil navegação para os cientistas que não possuem treinamentos ou familiaridade com a linguagem computacional de programação. Elas podem ser utilizadas para análises de dados, responder questões científicas e testar hipóteses. Grande parte das plataformas foram construídas a partir de consórcios científicos internacionais. Frequentemente, são de acesso gratuito para pesquisadores ao redor do mundo, que as utilizam para diversas finalidades como avaliar a presença de determinadas enzimas em diferentes tecidos, normais ou patológicos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

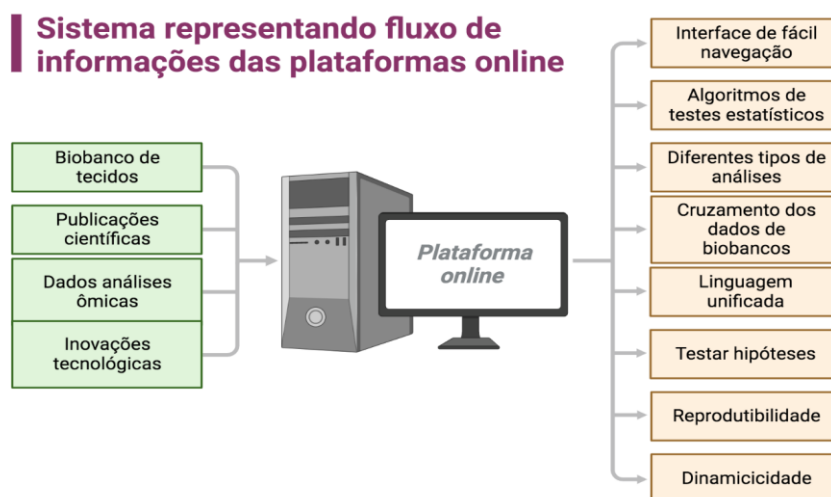
Busca e análises em plataformas computacionais por informações relacionadas ao metabolismo endógeno da molécula de fosfoetanolamina, para poder guiar futuros ensaios experimentais com administração exógena do composto.

2.2 Objetivo Específico

Encontrar possíveis vias envolvidas no mecanismo antitumoral do sal de pETN.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto foi desenvolvido a partir de análises *in silico* em plataformas computacionais [Figura 12]. Os dados foram organizados de acordo com sua plataforma computacional de origem. As informações incluídas foram guiadas respeitando os critérios de inclusões que podem variar de acordo com a plataforma. De maneira geral, incluiu-se dados que possibilitem a comparação da relação da fosfoetanolamina ou vias envolvidas com tecidos normais e tumorais. Nas plataformas que continham testes estatísticos do cruzamento de dados, apenas aqueles que tinham valor de p menor ou igual a 0.05 foram incluídos. Duas diferentes palavras-chaves foram utilizadas para busca, sendo que a palavra-chave “*phosphoethanolamine*” foi utilizada apenas na primeira plataforma: *The Human Metabolome Database*. Já nas demais plataformas, a “PCYT2” foi escolhida como palavra-chave para busca. Escolheu-se a PCYT2 como palavra-chave com base na especificidade da enzima pela molécula de pETN e por ela ser a principal reguladora da homeostase da via de síntese de PE (Pavlovic; Bakovic, 2013).



Fonte: Desenho feito por Guilherme Ayres Rossini através da plataforma biorender.com

Figura 12: Imagem representando o funcionamento das plataformas computacionais de software. Na esquerda da figura é possível ver o que entra de informações provenientes de diferentes biobancos de análises. A imagem do computador no centro representa todo processamento dos dados, resultando em uma interface de fácil navegação da plataforma online, que facilita o pesquisador a explorar a grande quantidade de dados provenientes dos diferentes tipos de análises (ômicas).

3.1 *The Human Metabolome Database* (<https://hmdb.ca>): plataforma de metabolômica lançada em 2007 (Wishart et al., 2007).

Palavra-chave: “*phosphoethanolamine*”

3.2 *National Cancer Institute GDC Data Portal* (<https://portal.gdc.cancer.gov/>): plataforma internacional de genômica humana da instituição governamental sobre câncer nos Estados Unidos (Grossman et al., 2016). Nela é possível explorar os dados por nomes de genes na sessão “*exploration*”.

Palavra-chave: “PCYT2”

3.3 *The Human Protein Atlas* (<https://www.proteinatlas.org/>): plataforma internacional interativa com informações proteômica e transcriptômica entre outras análises e interações. O biobanco possui amostras de tecidos humanos normais e patológicos, análises a níveis teciduais, celulares, subcelulares, entre outras (Uhlen et al., 2010; 2017; Karlsson et al., 2021).

Palavra-chave: PCYT2

3.4 *R2: Genomics Analysis and Visualization Platform* (<http://r2.amc.nl>): plataforma internacional interativa desenvolvida por Jan Koster do Departamento de Oncogenômica do centro médico acadêmico na Holanda. Nela é possível navegar por inúmeras funcionalidades, sendo que a primeira etapa da navegação é a escolha entre análise em um único ou múltiplos *datasets*: “*single dataset*” vs “*across datasets*”. A opção escolhida para o presente estudo foi “*single dataset*”.

Em seguida, na segunda etapa: “*Select a dataset for analysis*”, dois tipos de *datasets* foram escolhidos para comparação entre o tecido normal e o patológico. O primeiro foi de tecido hepático normal (*Normal Liver Organoid - McGilvray - 4059*) e o segundo de câncer hepático (*Tumor liver hepatocellular carcinoma - TCGA - 371*). Na terceira etapa: “*Select type of analysis*”, a opção “*KEEG PahwayFinder by Gene correlation*” foi utilizada para ambos os *datasets* escolhidos na segunda etapa.

O motivo da escolha do tecido hepático foi devido aos dados e evidências prévias da internalização da pETN lipossomal para o interior de

hepatocarcinomas produzidos em nosso laboratório (Luna et al., 2018b). O gene escolhido para a análise foi o PCYT2 como palavra-chave e critério de correlação entre os *pathways*. O conceito de *pathway* em biologia molecular envolve um conjunto de pequenas moléculas, genes, proteínas e outras estruturas celulares que interagem entre si e resultam em um fenótipo específico. Ao buscar correlação da PCYT2 com determinado grupo de genes, a plataforma busca informações que estão armazenadas em diferentes bases de dados.

Palavra-chave: PCYT2

4 RESULTADOS

4.1 Plataforma *The Human Metabolome Database*

Nesta plataforma é possível observar que existem diversos sinônimos para fosfoetanolamina: *(2-aminoethoxy) phosphonic acid* é o nome da IUPAC; outros estão listados na Tabela 1. Segundo a descrição da molécula na plataforma, ela faz parte do reino dos compostos orgânicos que contém um grupo fosfato ligado ao segundo carbono de uma etanolamina. É um composto encontrado tanto no reino animal quanto vegetal, fazendo parte de diversos processos celulares que ocorrem naturalmente em diferentes sistemas biológicos. Em um nível celular, ou em estruturas subcelulares, ela se encontra no retículo endoplasmático, na membrana celular e no citoplasma da célula. Pode ser detectada em diferentes fluidos biológicos como: sangue, saliva, liquor, urina e fezes. Ela também pode estar associada a algumas condições como: injúria traumática cerebral, doença de Crohn, retocolite ulcerativa, câncer colorretal e esofagite eosinofílica (sendo que nesta última condição a pETN pode ser considerada como um biomarcador da doença segundo a plataforma). Em um nível molecular, a plataforma mostrou que a pETN possui características biofísicas específicas listadas na Tabela 2. Da mesma maneira, está correlacionada com 10 diferentes enzimas listadas na Tabela 3, que podem representar diferentes caminhos a serem explorados e analisados por futuros pesquisadores.

Tabela 1: Na tabela abaixo é possível observar os sinônimos descritos para fosfoetanolamina. As informações estão escritas exatamente como na plataforma com a intenção de preservar a informação e evitar “ruídos” de tradução.

IUPAC: (2-aminoethoxy)phosphonic acid	
<i>2-Amino-ethanol dihydrogen phosphate</i>	<i>EAP</i>
<i>2-Amino-ethanol phosphate</i>	<i>OPA</i>
<i>Colamine phosphate</i>	<i>PE</i>
<i>Colamine phosphoric acid</i>	<i>PEA</i>
<i>Ethanolamine acid phosphate</i>	<i>PETN</i>
<i>Ethanolamine O-phosphate</i>	<i>Phosphoric acid 2-aminoethyl phenyl ester</i>
<i>Ethanolamine phosphate</i>	<i>Phosphoryl-ethanolamine</i>
<i>mono(2-Aminoethyl) phosphate</i>	<i>2-Amino-ethanol dihydrogen phosphoric acid</i>
<i>Monoaminoethyl phosphate</i>	<i>2-Amino-ethanol phosphoric acid</i>
<i>O-Phosphocolamine</i>	<i>Colaminphosphate</i>
<i>O-Phosphorylethanolamine</i>	<i>Ethanolamine acid phosphoric acid</i>
<i>Phosphoethanolamine</i>	<i>Ethanolamine O-phosphoric acid</i>
<i>mono(2-Aminoethyl) phosphoric acid</i>	<i>Ethanolamine phosphoric acid</i>
<i>Monoaminoethyl phosphoric acid</i>	<i>Phosphate 2-aminoethyl phenyl ester</i>
<i>Phosphonoethanolamine</i>	<i>2-Aminoethanol dihydrogen phosphate (ester)</i>
<i>2-Amino-ethanol O-phosphate</i>	<i>2-Aminoethyl dihydrogen phosphate</i>
<i>Colamine acid phosphat</i>	<i>2-Aminoethyl dihydrogen phosphate (acd/name 4.0)</i>
<i>Colaminephosphoric acid</i>	<i>2-Aminoethyl phosphate</i>
<i>Ethamp</i>	<i>O-Phosphonatoethanaminium</i>
<i>Phosphorylethanolamine</i>	<i>Phosphoryethanolamine</i>
<i>Phosphorylethanolamine magnesium (1:1) salt</i>	<i>Phosphorylethanolamine, 3H-labeled CPD</i>
<i>Phosphorylethanolamine zinc salt</i>	<i>Calcium 2-aminoethanol phosphate</i>
<i>Phosphorylethanolamine, cobalt (2+) (1:1) salt</i>	<i>Phosphorylethanolamine ca (1:1) salt</i>

Tabela 2: Na coluna da esquerda, estão as propriedades ou grandezas representadas e, na coluna da direita, os valores.

Property	Value
<i>Water solubility</i>	72mg/mL
<i>pKa (strongest acidic)</i>	1.54
<i>pKa (strongest basic)</i>	10.02
<i>Physiological Charge</i>	-1
<i>Hydrogen Acceptor Count</i>	4
<i>Hydrogen Donor Count</i>	3
<i>Polar Surface Area</i>	92.78 Å ²
<i>Rotable Bond Count</i>	3
<i>Refractivity</i>	27.08 m ³ ·mol ⁻¹
<i>Polarizability</i>	11.12 Å ³
<i>Number of Rings</i>	0
<i>Bioavailability</i>	Yes
<i>Rule of Five</i>	Yes
<i>Ghose Filter</i>	No
<i>Veber's Rule</i>	No
<i>MDDR-like Rule</i>	No
<i>Melting Point</i>	241 - 243 °C

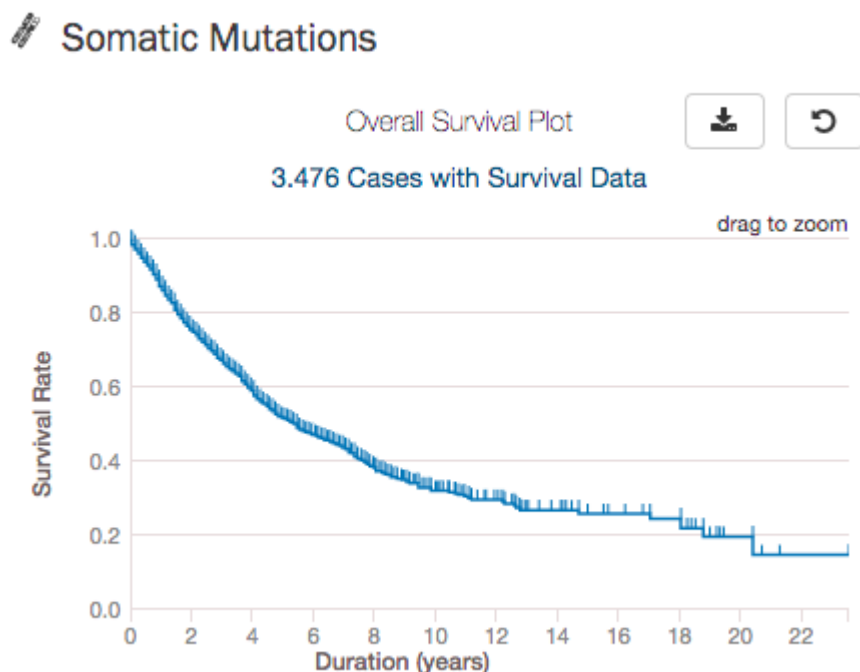
Tabela 3: Na coluna da esquerda, estão os genes e, na coluna da direita, as reações enzimáticas envolvidas de alguma maneira com a pETN.

Gene	Enzymatic reaction
PCYT2	$CTP + pETN = \text{Pyrophosphate} + \text{CMP-pETN}$
ETNK1	$ATP + ETN = pETN + ADP$
ETNK2	$ATP + ETN = pETN + ADP$
CHKA	$ATP + ETN = pETN + ADP$
CHKB	$ATP + ETN = pETN + ADP$
PHOSPHO1	$pETN + H_2O = ETN + \text{Phosphate}$
SGPL1	$\text{Sphinganine 1-phosphate} = pETN + \text{Palmitadehyde} / \text{Hexadecenal}$
AGXT2L1	$pETN + H_2O = \text{Acetaldehyde} + \text{Ammonia} + \text{Phosphate}$
ENNP6	$1-(1\text{-Alkenyl})\text{-sn-glycero-3-pETN} + H_2O = 1-(1\text{-Akenyl})\text{-sn-glycerol} + pETN$
HRASLS2	$\text{Phosphatidylcholine} + pETN = 1\text{-acylglycerophosphocholine} + \text{N-palmitoyl-pETN}$

4.2 Plataforma GDC Data Portal

Os dados de genômica da plataforma *GDC Data Portal* mostram a presença de mutações somáticas da PCYT2 de maneira inespecífica ao tipo do tumor. Na sessão “*exploration*” da plataforma, é possível observar que existem 3556 casos afetados por mutação somática da PCYT2: o sítio primário mais acometido é o da mama (520 casos); seguido por pulmão e brônquios (494 casos); e, em terceiro lugar, câncer de ovário (358 casos). No entanto, outros sítios primários também estão acometidos em números menores, sugerindo inespecificidade ao sítio primário. Da mesma maneira, é possível observar a presença da mutação nos tumores provenientes de diferentes tecidos germinativos (ectoderma, mesoderma e endoderma), sendo que os de origem endodérmica (adenocarcinomas, carcinomas ductais e espinocelulares) representam a maioria dos casos. Os dados da plataforma mostram a prevalência da mutação equilibrada entre homens (1901 casos) e mulheres (1624 casos), que são afetados por 74 mutações somáticas diferentes da PCYT2. Os dados de sobrevida geral apontam 50% de sobrevida em 5 anos e em torno de 30% em 10 anos dos pacientes que apresentam mutação da PCYT2

[Figura 13].

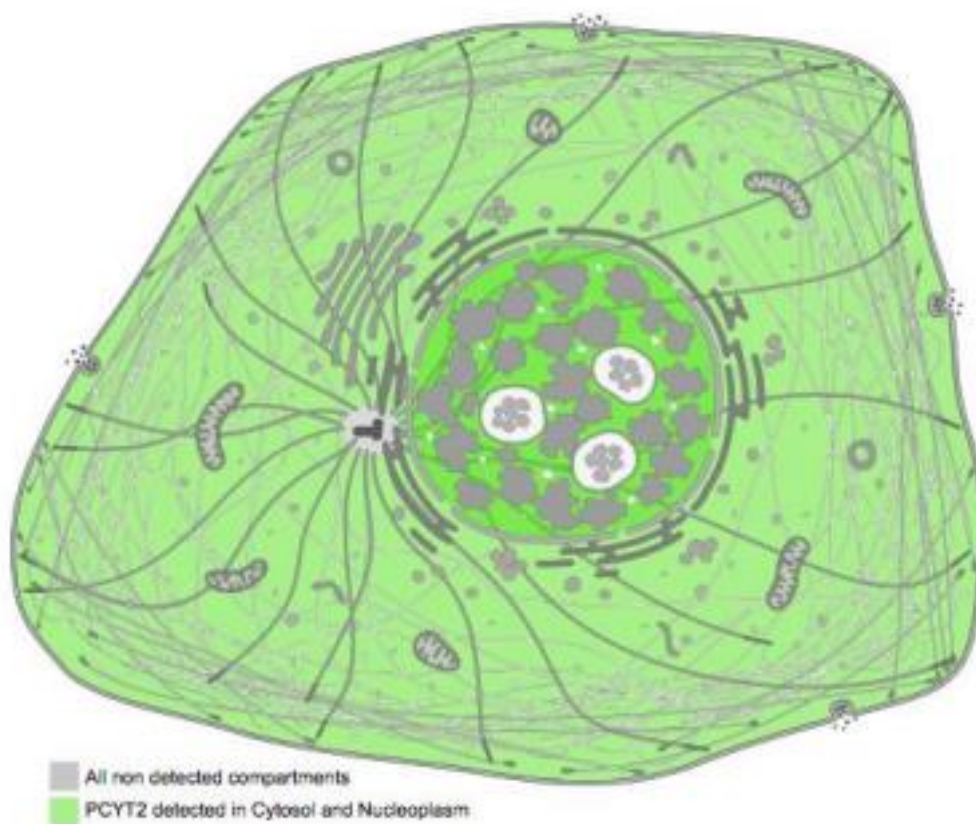


Fonte: <https://portal.gdc.cancer.gov/>

Figura 13: Gráfico (Kaplan-Meier) representando a taxa de sobrevida geral (eixo vertical) em relação ao tempo em anos (eixo horizontal) de 3476 casos com mutação somática de PCYT2. Cada degrau na curva Kaplan-Meier significa que um evento (morte) ocorreu com um paciente ou um grupo de pacientes. As pequenas marcas acima da curva significam um evento de perda do seguimento do paciente naquele momento, não necessariamente a morte.

4.3 Plataforma *The Human Protein Atlas*

Essa plataforma tem diversas interfaces e uma delas é um mapa da localização de determinada proteína em algum compartimento celular (Thul et al., 2017). No caso da PCYT2, os dados sugerem a localização subcelular no citoplasma e núcleo [Figura 14]. Além disso, os dados da proteômica de tecidos normais mostram a presença da PCYT2 em diferentes tipos de tecido. A PCYT2 não foi detectada apenas nos tecidos de músculo liso e esquelético. Os níveis de expressão são heterogêneos e não foi possível atribuir algum padrão específico conforme demonstrado na Tabela 4. As análises quantitativas da expressão do RNA da PCYT2 em diferentes tipos de tumores também sugerem uma inespecificidade ao tipo conforme a Tabela 5.



Fonte: <https://www.proteinatlas.org/>

Figura 14: Sublocalização celular da PCYT2. Em verde, estão os locais em que foram detectados a presença da PCYT2; e, em cinza, estão os compartimentos em que não foram detectados a PCYT2.

Tabela 4: Distribuição das diferentes regiões e tipos de tecidos diferenciados em relação ao nível de expressão proteica de PCYT2. Na coluna da esquerda (*High*), estão listados os tecidos que possuem alta expressão proteica; ao lado (*Medium*), tecidos com média expressão; em seguida (*Low*), com baixa expressão; e, na última coluna do lado direito (*Not detected*), tecidos que não foram detectadas a expressão da PCYT2.

Protein expression overview	High	Medium	Low	Not detected
	<i>Cerebral cortex</i>	<i>Hippocampus</i>	<i>Seminal vesicle</i>	<i>Smooth muscle</i>
	<i>Cerebellum</i>	<i>Caldate</i>	<i>Vagina</i>	<i>Skeletal muscle</i>
	<i>Bronchus</i>	<i>Thyroid gland</i>	<i>Cervix</i>	
	<i>Lung</i>	<i>Parathyroid gland</i>	<i>Heart muscle</i>	
	<i>Stomach</i>	<i>Adrenal gland</i>	<i>Adipose tissue</i>	
	<i>Duodenum</i>	<i>Nasopharynx</i>	<i>Spleen</i>	
	<i>Small intestine</i>	<i>Oral mucosa</i>	<i>Bone marrow</i>	
	<i>Kidney</i>	<i>Salivary gland</i>		
	<i>Testicle</i>	<i>Esophagus</i>		
	<i>Placenta</i>	<i>Colon</i>		
	<i>Skin</i>	<i>Rectum</i>		
		<i>Liver</i>		
		<i>Gallbladder</i>		
		<i>Pancreas</i>		
		<i>Urinary bladder</i>		
		<i>Epididymis</i>		
		<i>Prostate</i>		
		<i>Ovary</i>		
		<i>Fallopian tube</i>		
		<i>Endometrium</i>		
		<i>Breast</i>		
		<i>Soft tissue</i>		
		<i>Appendix</i>		
		<i>Lymph node</i>		
		<i>Tonsil</i>		

Tabela 5: As diferentes concentrações da expressão de RNA da PCYT2 de acordo com o tipo de tecido tumoral. Na coluna da esquerda, está listado o tipo de tumor e, na da direita, a análise quantitativa da expressão do RNA; FPKM = *Fragments per kilo based per million mapped reads*.

Tissue type TCGA dataset	RNA expression overview (median in FPKM)
<i>Liver cancer</i>	24.3
<i>Melanoma</i>	9
<i>Prostate cancer</i>	8.5
<i>Colorectal cancer</i>	8.5
<i>Urothelial cancer</i>	8.3
<i>Endometrial cancer</i>	7.8
<i>Stomach cancer</i>	6.9
<i>Ovarian cancer</i>	6.3
<i>Glioma</i>	6.2
<i>Lung cancer</i>	5.8
<i>Pancreatic cancer</i>	5.5
<i>Breast cancer</i>	4.8
<i>Thyroid cancer</i>	4.8
<i>Cervical cancer</i>	4.5
<i>Renal cancer</i>	4.4
<i>Head and neck cancer</i>	4.2
<i>Testis cancer</i>	4.0

4.4 Plataforma R2: Genomics and Visualization Platform

Os resultados provenientes dos cruzamentos de dados a partir do gene PCYT2 no *dataset: Normal Liver Organoid - McGilvray - 4059* apontaram que 1964 combinações preencheram os critérios da correlação com PCYT2 e 537 não preencheram. Os que possuíam valor de p maior ou igual a 0.05 estão na Tabela 6. Na busca em *datasets* de organóide hepático normal por um *pathway* que possa estar relacionado aos processos celulares da PCYT2, de maneira surpreendente, foram encontrados 41 diferentes *pathways* que estão

significativamente relacionados com a expressão da PCYT2. Entre eles alguns relacionados aos processos de digestão, metabolismo de nutrientes e esteatose hepática. Já os resultados provenientes dos cruzamentos de dados a partir do gene PCYT2 no *dataset: Tumor liver hepatocellular carcinoma - TCGA - 371* apontaram que 4612 combinações preencheram os critérios da correlação com PCYT2 e 2013 não preencheram. Os que possuíam valor de p maior ou igual a 0.05 estão na Tabela 7. Na tabela é possível observar que 45 diferentes *pathways* mostraram correlação significativa com a PCYT2. Interessantemente, 13 *pathways* estão presentes em ambos os *datasets* (hepatócitos e hepatocarcinoma). São eles: *Non alcoholic fatty liver disease; Oxidative phosphorylation; Huntington disease; Parkinson disease; Chemical carcinogenesis; Axon guidance; Thyroid cancer; Proteoglycans in cancer; MicroRNAs in cancer; Focal adhesion; Peroxisome; Drug metabolism cytochrome P450; Complement and coagulation cascades*. Um *pathway* que chamou a atenção é o da relação da PCYT2 com a fosforilação oxidativa em ambos os *datasets*.

Tabela 6: A coluna da esquerda representa o resultado de agrupamentos genéticos que estão correlacionados com a PCYT2 em amostra de organóide hepático normal. A coluna da direita mostra a significância estatística representada pelos valores de p.

Gene group	p value
<i>Protein digestion and absorption</i>	6.4e-10
<i>Alzheimer disease</i>	7.7e-06
<i>Non alcoholic fatty liver disease</i>	1.9e-05
<i>PPAR signaling pathway</i>	4.5e-05
<i>Oxidative phosphorylation</i>	7.2e-05
<i>Mineral absorption</i>	1.1e-04
<i>Huntington disease</i>	1.5e-04
<i>Parkinson disease</i>	1.5e-04
<i>Cardiac muscle contraction</i>	1.8e-03
<i>Chemical carcinogenesis</i>	2.3e-03
<i>ECM receptor interaction</i>	2.5e-03
<i>Steroid biosynthesis</i>	2.9e-03

continua

Tabela 6: A coluna da esquerda representa o resultado de agrupamentos genéticos que estão correlacionados com a PCYT2 em amostra de organóide hepático normal. A coluna da direita mostra a significância estatística representada pelos valores de p *continuação*

Gene group	p value
<i>Citrate cycle - TCA cyclo</i>	3.0e-3
<i>Tight junctions</i>	4.5e-03
<i>Axon guidance</i>	5.5e-03
<i>Thyroid cancer</i>	5.7e-03
<i>Glutathione metabolism</i>	5.9e-03
<i>Arginine and proline metabolism</i>	9.1e-03
<i>Fructose and mannose metabolism</i>	1.0e-2
<i>Biosynthesis of unsaturated fatty acids</i>	0.01
<i>Fatty acids degradation</i>	0.01
<i>Proteoglycans in cancer</i>	0.01
<i>MicroRNAs in cancer</i>	0.01
<i>Tryptophan metabolism</i>	0.01
<i>Fat digestion and absorption</i>	0.02
<i>p53 signaling pathway</i>	0.02
<i>Focal adhesion</i>	0.02
<i>Pathogenic Escherichia coli infection</i>	0.02
<i>Pentose and glucuronate interconversions</i>	0.02
<i>Peroxisome</i>	0.02
<i>Drug metabolism cytochrome P450</i>	0.02
<i>Complement and coagulation cascades</i>	0.02
<i>Arginine biosynthesis</i>	0.02
<i>Melanoma</i>	0.03
<i>PI3K-Akt signaling pathway</i>	0.03
<i>Central carbon metabolism in cancer</i>	0.04
<i>Bladder cancer</i>	0.04
<i>Terpenoid backbone biosynthesis</i>	0.04
<i>Ribosome</i>	0.04
<i>Ascorbate and aldarate metabolism</i>	0.05
<i>Galactose metabolism</i>	0.05

Tabela 7: A coluna da esquerda representa o resultado de agrupamentos genéticos que estão correlacionados com a PCYT2 em amostras de carcinoma hepatocelular. A coluna da direita mostra a significância estatística representada pelos valores de p.

Gene groups	p value
<i>Complement and coagulation cascades</i>	3.6e-05
<i>Drug metabolism cytochrome P450</i>	2.1e-04
<i>Axon guidance</i>	3.4e-04
<i>Focal adhesion</i>	3.5e-04
<i>Regulation of actin cytoskeleton</i>	7.1e-04
<i>Chemical carcinogenesis</i>	1.1e-03
<i>Staphylococcus aureus infection</i>	1.1e-03
<i>Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450</i>	1.2e-03
<i>MicroRNAs in cancer</i>	2.1e-03
<i>Peroxisome</i>	3.5e-03
<i>Fc gamma R mediated phagocytosis</i>	3.9e-03
<i>Rap1 signaling pathway</i>	4.2e-03
<i>Mucin type O Glycan biosynthesis</i>	4.7e-03
<i>Alanine aspartate and glutamate metabolism</i>	5.0e-03
<i>Fatty acid degradation</i>	6.1e-03
<i>Bile secretion</i>	6.4e-03
<i>Renal cell carcinoma</i>	7.1e-03
<i>Glyoxylate and dicarboxylate metabolism</i>	7.5e-03
<i>Valine leucine and isoleucine degradation</i>	8.6e-03
<i>Pathways in cancer</i>	9.9e-03
<i>Other types of O glycan biosynthesis</i>	0.01
<i>Platelet activation</i>	0.01
<i>Osteoclast differentiation</i>	0.01
<i>Oxidative phosphorylation</i>	0.02
<i>Pancreatic cancer</i>	0.02
<i>Non alcoholic fatty liver disease NAFLD</i>	0.02
<i>Phospholipase D signaling pathway</i>	0.02

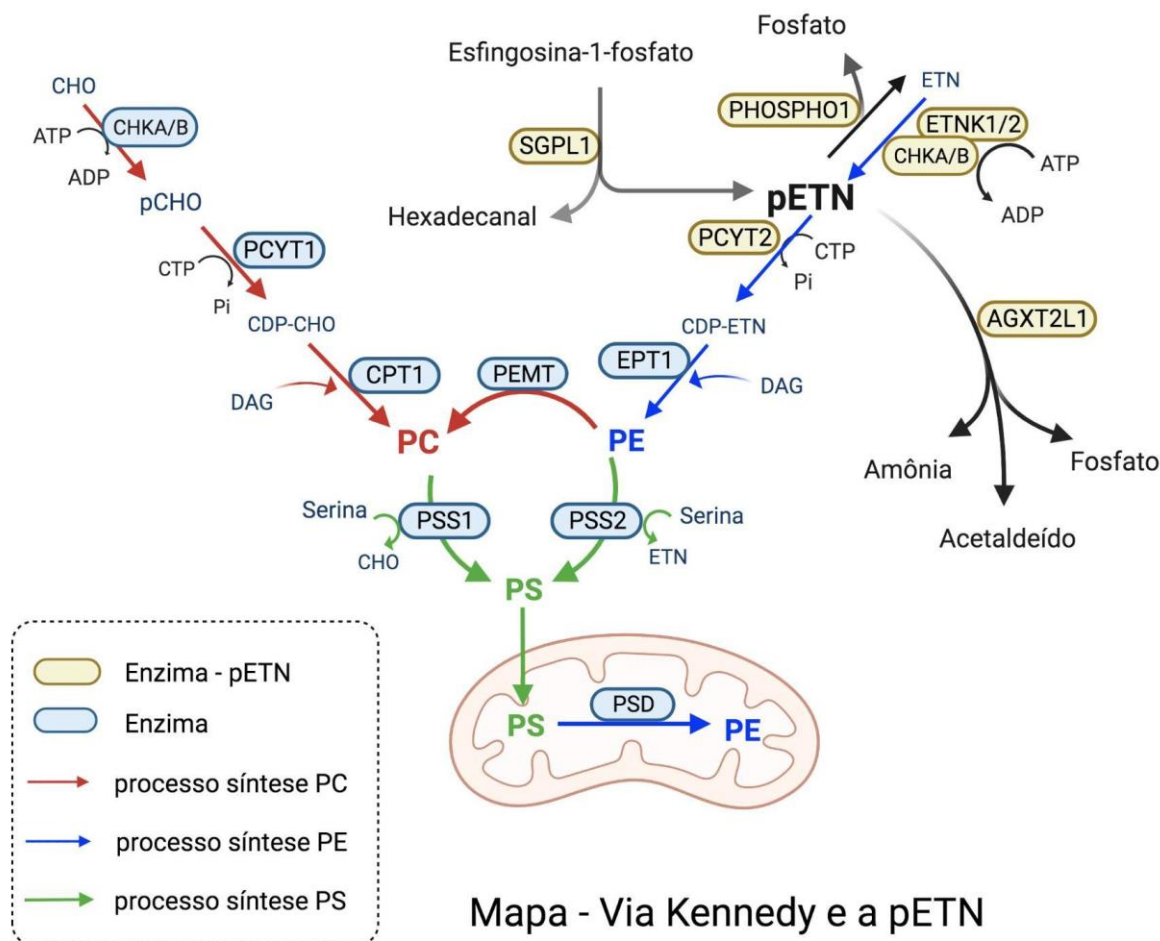
continua

Tabela 7: A coluna da esquerda representa o resultado de agrupamentos genéticos que estão correlacionados com a PCYT2 em amostras de carcinoma hepatocelular. A coluna da direita mostra a significância estatística representada pelos valores de p *continuação*

<i>Gene groups</i>	p value
<i>AGE RAGE signaling pathway in diabetic complications</i>	0.02
<i>T cell receptor signaling pathway</i>	0.02
<i>Propanoate metabolism</i>	0.03
<i>Butanoate metabolism</i>	0.03
<i>Huntington disease</i>	0.03
<i>Leishmaniasis</i>	0.03
<i>Phosphatidylinositol signaling system</i>	0.03
<i>Pertussis</i>	0.03
<i>cGMP PKG signaling pathway</i>	0.03
<i>Bacterial invasion of epithelial cells</i>	0.03
<i>Proteoglycans in cancer</i>	0.03
<i>Parkinson disease</i>	0.04
<i>Dilated cardiomyopathy</i>	0.04
<i>Ras signaling pathway</i>	0.04
<i>Hippo signaling pathway</i>	0.04
<i>Cytokine cytokine receptor interaction</i>	0.05
<i>Glycosaminoglycan biosynthesis chondroitin sulfate dermatan sulfate</i>	0.05

5 DISCUSSÃO

O número de sinônimos encontrados para “fosfoetanolamina” representa um desafio linguístico para os pesquisadores no tema. Ao mesmo tempo, as diferentes reações enzimáticas em que o composto está envolvido revela a complexidade científica. A esfingosina-fosfato liase-1 (SGPL1) é capaz de clivar a molécula lipídica bioativa esfingosina-1-fosfato em pETN, que pode ser direcionada para síntese de PE [Figura 15]. Estudos sugerem que a SGPL1 pode estar envolvida na patogênese de doenças neurodegenerativas devido ao seu envolvimento com a autofagia em neurônios (Mitroi et al., 2017). A PHOSPHO1 é uma fosfatase que degrada a pETN em ETN e fosfato inorgânico [Figura 15]. Ela está presente na membrana das células de diferentes tipos de tecidos e está envolvida, entre outras coisas, nos processos de mineralização óssea (Dillon et al., 2019; 2021). A AGXT2L1 é uma fosfoliase capaz de quebrar a pETN em fosfato inorgânico, amônia e acetaldeído (Veiga-da-Cunha et al., 2012). Essa enzima foi associada com alguns distúrbios psiquiátricos como bipolaridade e esquizofrenia (Veiga-da-Cunha et al., 2012). A ETNK1, 2, CHKA e B são quatro enzimas responsáveis pela conversão da ETN em pETN. Todas utilizam ATP para fosforilação do substrato ETN [Figura 15]. A enzima CHKA está envolvida na fisiopatologia de alguns distúrbios de neurodesenvolvimento, epilepsia severa e microcefalia (Klockner, 2022). Já a CHKB está envolvida na fisiopatologia de um distúrbio muscular específico, chamado distrofia muscular relacionada a CHKB, onde células com baixa atividade desta enzima possuem níveis menores de PC na membrana das mitocôndrias, tornando-as disfuncionais para beta oxidação (Chan; Nishino, 2023). A ETNK2 foi associada à trombose placentária em modelos de animais, possivelmente devido à relação entre PE e hemostasia via proteína C (Tian et al., 2006). Além da ETNK1 (Fontana et al., 2020), todas as quatro (ETNK1/2, CHKA/B) enzimas responsáveis pela fosforilação de ETN em pETN estão associadas com os tumores (Hu et al., 2016; Zhang et al., 2016; Huang et al., 2022; Chu et al., 2023).



Fonte: Guilherme Ayres Rossini através da plataforma biorender.com

Legenda: PE = fosfatidiletanolamina; PS = fosfatidilserina; PC = fosfatidilcolina; PSD = fosfatidilserina descarboxilase-1; PSS1 = fosfatidilserina sintase-1; PSS2 = fosfatidilserina sintase-2; CHO = colina; pCHO = fosfocolina; CHKA/B = colino quinase A ou B; PCYT1 = fosfato citidiltransferase-1; CPT1 = colinafosfotransferase-1; ETN = etanolamina; ETNK1/2 = etanolamina quinase-1 ou 2; pETN = fosfoetanolamina; PCYT2 = fosfoetanolamina citidiltransferase-2; ATP = adenosina trifosfato; ADP = adenosina difosfato; CTP = citosina trifosfato; CDP = citosina difosfato; CDP-pETN = CDP-fosfoetanolamina; DAG = diacilglicerol; EPT1 = 1,2-diacilglicerol etanolamina fosfotransferase; SGPL1 = esfingosina fosfato-liase-1; AGXT2L1 = etanolamina fosfato fosfo-liase; PHOSPHO1 = fosfoetanolamina/fosfocolina fosfatase 1

Figura 15: Ao lado esquerdo da figura é possível observar as etapas síntese endógena de PC, ou braço PC da via Kennedy. No lado direito é possível observar as etapas da síntese endógena de PE, ou braço PE da via Kennedy. A PC e a PE podem ser convertidas em PS, que por sua vez pode ser convertida novamente em PE na mitocôndria por uma reação de descarboxilação da PS. As enzimas em amarelo representam enzimas que estão diretamente relacionadas a reações que envolvem a fosfoetanolamina. Já as enzimas em azul representam reações que estão indiretamente relacionadas com a fosfoetanolamina.

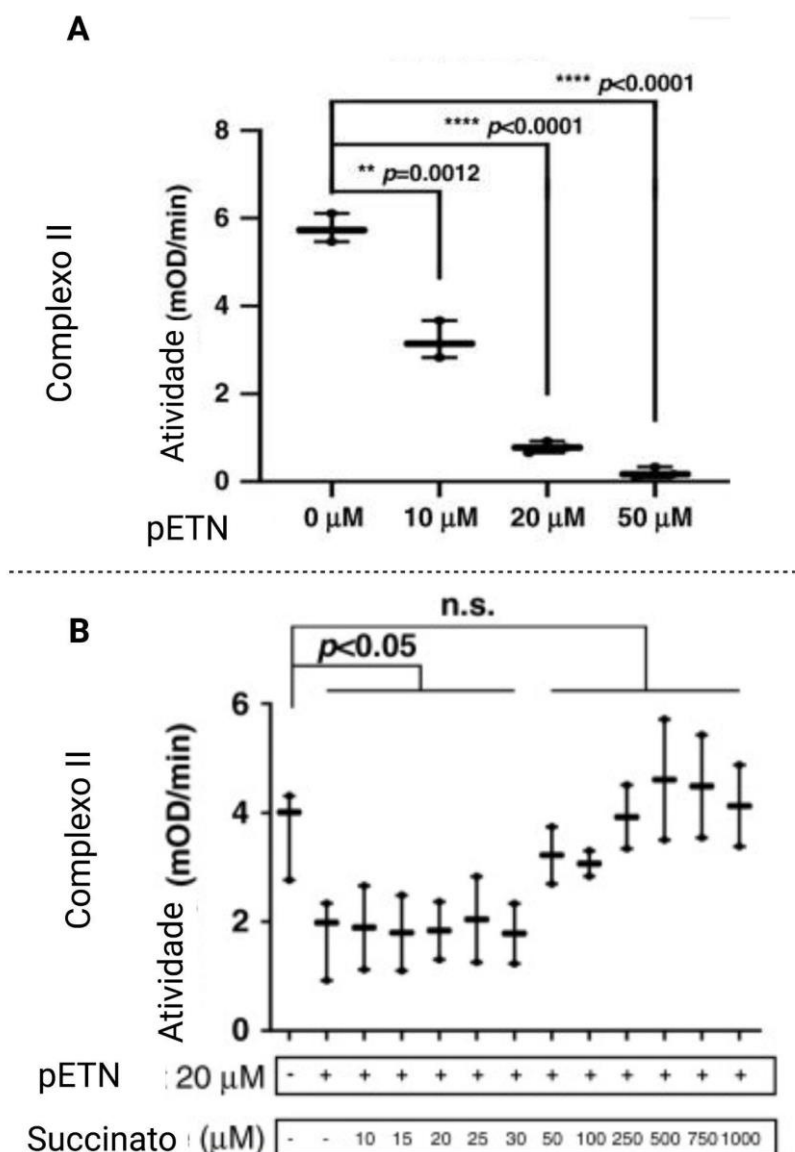
Ensaios controlados em camundongos mostraram que o *knockout* total (-/-) da enzima PCYT2 é incompatível com a vida do animal. Os embriões morreram por volta de 8.5 dias de vida. Esses dados sugerem que, além de fisiológica, é uma via importante e essencial para a sobrevivência de organismos

vivos (Fullerton et al., 2007). Da mesma maneira, outros ensaios em modelos de regeneração hepática apontam que a PCYT2 é essencial para esse processo celular (Guan et al., 2020). Estudos de knockout parcial (PCYT2^{+/-}) associaram a via com a fisiopatologia de esteatohepatite não alcoólica, revelando uma conexão entre o metabolismo de fosfolípido e a resistência insulínica, obesidade, esteatose hepática e dislipidemia (Grapentine et al., 2022). O mecanismo está relacionado ao menor consumo de DAG e consequente acúmulo. A célula aumenta a síntese de ácidos graxos e triacilglicerol (TG) (Grapentine et al., 2022). Interessantemente, quando os animais foram suplementados com pETN na água eles reverteram o quadro de esteatohepatite (Grapentine et al., 2022). A suplementação de pETN foi capaz de estimular o fluxo de DAG pela via Kennedy e produção de PE, aumentando em 32%, 41% e 52% o nível de RNA da PSS1, PSS2 e PSD, respectivamente. Com consequente estimulação, ocorre a conversão de PC e PE em PS e PS em PE (Grapentine et al., 2022).

O conjunto dos dados apontam que a PCYT2 está envolvida em uma importante via reguladora na hierarquia de controle dos processos celulares, tanto fisiológicos quanto em algumas patologias. Em um nível subcelular, ela está presente em regiões do citoplasma e do núcleo da célula; em um nível tecidual, ela pode ser encontrada em diferentes tipos de tecidos, sendo expressa em diferentes quantidades. Ela não foi encontrada apenas nos tecidos musculares lisos e esqueléticos. Nos tumores, é possível observar a presença da PCYT2 nos tecidos de diferentes origens germinativas e, no geral, uma inespecificidade da PCYT2 ao tipo de tumor. Já a plataforma R2 aponta a relação da PCYT2 com doenças específicas ou vias de processos celulares envolvidas em mais de uma patologia. Os dados revelam diversas possibilidades com relevância estatística em hepatócitos normais e hepatocarcinomas. Treze delas estão presentes tanto nas amostras de tecidos normais quanto cancerosos. Entre eles está presente o processo celular de fosforilação oxidativa (*Oxidative phosphorylation*).

O elo que conecta a PCYT2 com a fosforilação oxidativa é o efeito inibitório de seu substrato específico - pETN na CTE [Figura 16A] (Gohil et al., 2013). Em mitocôndrias isoladas dentro de um meio com pETN, o ADP

adicionado (estimulador da CTE) não altera ou altera muito pouco a taxa de consumo de oxigênio (Modica-Napolitano et al., 2004). Nos estudos dos complexos mitocondriais isolados, houve diminuição na atividade do complexo II de maneira proporcional ao aumento da concentração de pETN [Figura 16B] (Fontana et al., 2020); ou seja, constatou-se inibição da succinato desidrogenase no complexo II (Fontana et al., 2020).



Fonte: Adaptado de (Fontana et al., 2020) por Guilherme Ayres Rossini através da plataforma biorender.com

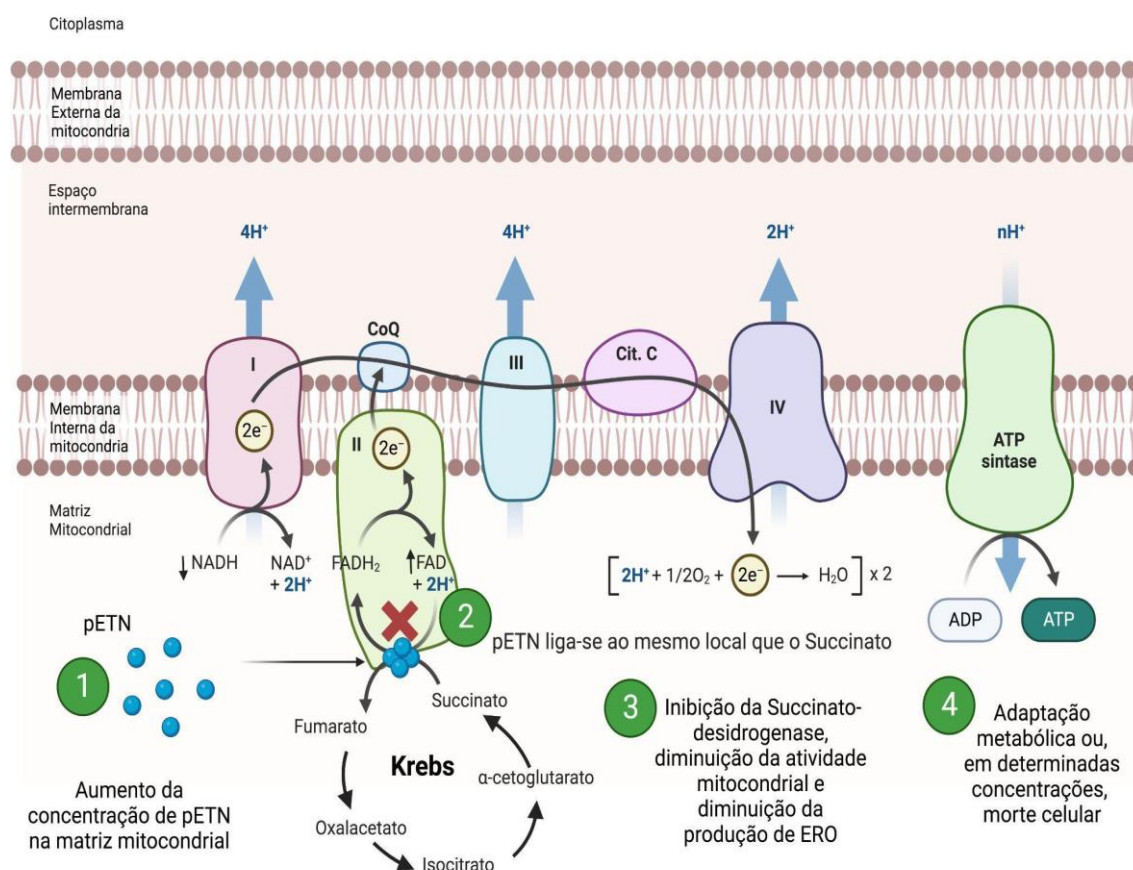
Legenda: PE = fosfatidiletanolamina; P = fosfatidilserina; ETN = etanolamina; ETNK1 = etanolamina quinase-1; pETN = fosfoetanolamina; PCYT2 = fosfoetanolamina citidiltransferase-2; CDP-pETN = citosina difosfato-fosfoetanolamina; EPT = 1,2-diacilglicerol etanolamina fosfotransferase; ETC = cadeia transportador de elétrons.

Figura 16: **A:** A figura mostra a relação da atividade do complexo II com a concentração de pETN, em que quanto maior a concentração de pETN menor a atividade mitocondrial de maneira estatisticamente significativa. **B:** A imagem mostra a relação da atividade do complexo II e a pETN e o succinato. É possível observar que a inibição do complexo II causado pela pEN pode ser revertida conforme aumenta a concentração do succinato.

O complexo II possui em parte da sua estrutura a enzima succinato desidrogenase, que transforma o succinato em fumarato a partir da oxidação de FADH₂ em FAD⁺. A inibição da succinato desidrogenase impede o transporte de elétrons proveniente do succinato, mas não dos elétrons provenientes do complexo I - o que explica a diminuição do NADH e aumento do FAD⁺ em mitocôndrias purificadas de células renais expostas a pETN (Gohil et al., 2013). O aumento do succinato pode restaurar a atividade da succinato desidrogenase, sugerindo que a região que a pETN se liga na succinato desidrogenase é a mesma que a do succinato [Figura 16B] (Fontana et al., 2020). Ao mesmo tempo, a pETN evita o escape de elétrons para a matriz mitocondrial através do complexo I e produção de ERO (Fontana et al., 2020). Quanto maior a concentração de pETN, menor é a atividade mitocondrial e menor a produção de ERO (Fontana et al., 2011; 2020). Os tecidos diferenciados podem utilizar este mecanismo de diminuição da atividade mitocondrial naturalmente para amenizar os danos teciduais em situações extremas como resposta fisiológica para proteção contra hipóxia. Em um estudo do líquor de pacientes que sofreram traumatismo cranioencefálico, observou-se como resposta ao edema e hipóxia cerebral o aumento da concentração de pETN e do aminoácido taurina, que se instalam logo após o evento e perduram por aproximadamente 67h - o mesmo tempo aproximado da duração do edema (Seki et al., 2005). As situações de isquemia cardíaca mostram que ela preserva a funcionalidade cardíaca após o evento isquêmico, assim como reduz significativamente a área infartada (Gohil et al., 2010). Nos tumores, a pETN também pode exercer um papel protetor para a célula tumoral. Em situações de escassez de nutrientes como glutamina e oxigênio, a inibição da fosforilação oxidativa e mudança do padrão metabólico gerado pela pETN funcionam como mecanismos adaptativos e de sobrevivência diante do ambiente estressante para a célula tumoral (Osawa et al., 2019). A função inibitória da pETN pode ser atribuída à sua capacidade de se ligar a outras moléculas. Em pH fisiológico, o grupamento fosfato pode se ligar a moléculas ou estruturas celulares (Myller et al., 2013).

As mitocôndrias das células tumorais são mais sensíveis que as mitocôndrias das células diferenciadas quando expostas à pETN, sendo que as doses citotóxicas para células tumorais não afetam as células diferenciadas

(Ferreira et al., 2011). O complexo II pouco influencia na força próton-motriz e voltagem da membrana; porém, existe uma relação entre a concentração de pETN e a voltagem de membrana da mitocôndria (Ferreira et al., 2013c). Uma possível explicação para esse fenômeno pode estar relacionada às características da molécula de pETN em modificar a carga de membranas. Em bactérias, esse mecanismo está envolvido na resistência antimicrobiana (Samantha; Vrielink, 2020). Conforme as concentrações de pETN aumentam, as consequências podem ser diversas, como parada do ciclo celular e até morte celular programada (Ferreira et al., 2012; 2013a; 2013e).



Fonte: Guilherme Ayres Rossini através da plataforma biorender.com

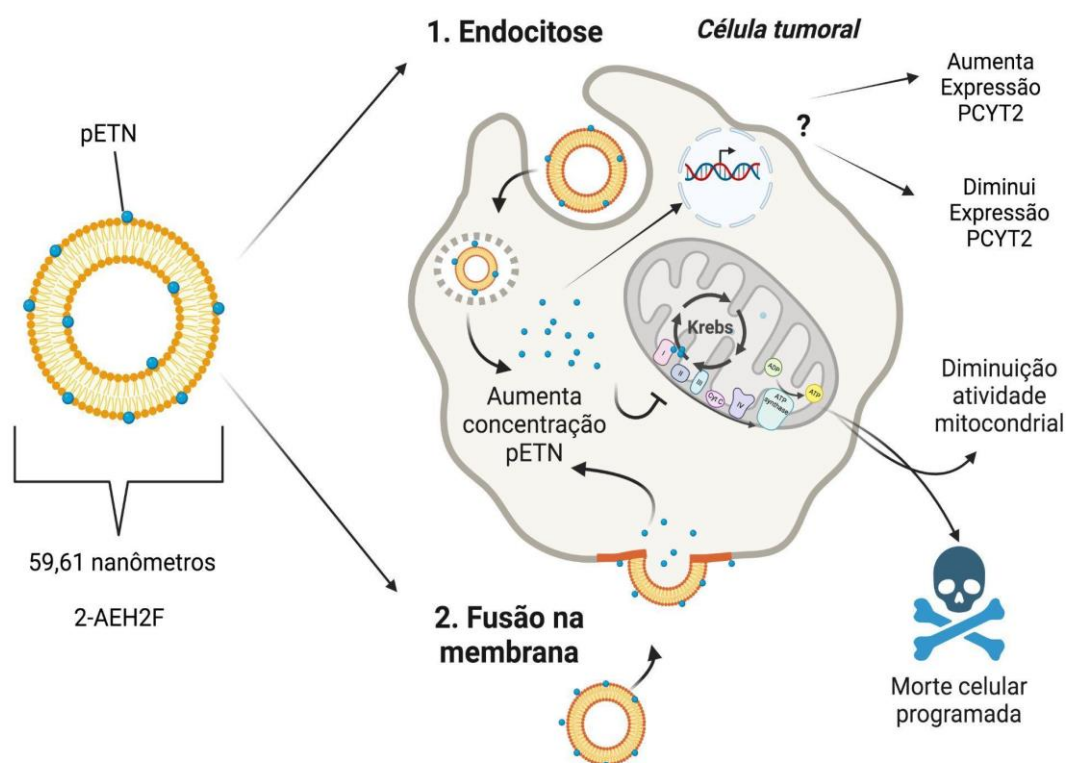
Legenda: pETN = fosfoetanolamina; ERO = espécies reativas de oxigênio

Figura 17: A figura mostra a cadeia transportadora de elétrons sendo afetada pelo aumento da concentração de pETN dentro da matriz mitocondrial representada pelas esferas azuis (1); parte do complexo II é a succinato desidrogenase, uma enzima que também está envolvida no ciclo de Krebs, com o aumento das concentrações de pETN a succinato desidrogenase é inibida representada pelo "X" acima das esferas azuis inibindo a enzima (2); uma das consequências da inibição é a diminuição da atividade mitocondrial (3); após a exposição, a célula pode se adaptar aos níveis elevados de pETN ou, dependendo da concentração, pode desencadear processo de morte celular programada(4).

De maneira geral, os dados sugerem que as concentrações de pETN são determinantes para o efeito biológico de citoproteção ou citotoxicidade. Uma das variáveis que pode influenciar na concentração de pETN é a via de administração. No modelo *in vitro* de simulação do pH do trato gastrointestinal, o pH 1.2 não alterou a concentração de pETN. Já no pH 6.8 foi possível observar um decréscimo de 35% na concentração de pETN (Saxena et al., 2017). Estudos sobre o comportamento do sal de pETN sugerem que entre o pH 1 e 5 ela se comporta como zwitterion e entre o pH 5-11 se comporta como ânion (Myller et al., 2013). Existe um padrão específico de deprotonação da molécula em que o grupo fosfato perde o primeiro próton no pH 1.0 e o segundo próton no pH 5.9. Já o terceiro próton é perdido do grupamento amina no pH 11 (Myller et al., 2013). Além de características intrínsecas da molécula de pETN, fatores externos podem influenciar na biodisponibilidade e concentração da pETN como a microbiota intestinal e degradação enzimática. As reações enzimáticas de fosfatases (PHOSPHO1), por exemplo, podem ser as responsáveis pela conversão do sal de pETN em ETN observada após administração via oral em modelos de animais (Saxena et al., 2017), um dos relatórios do MCTI sugere biodisponibilidade absoluta de 6,3% (Brasil, 2015a). No entanto, um estudo em animais com suplementação oral da pETN em água aponta um impacto biológico do composto, sugerindo que apesar da baixa biodisponibilidade ela possui impacto terapêutico nos animais com esteatohepatite não alcoólica (Grapentine et al., 2022). Possivelmente, esse efeito biológico está relacionado à maior atividade da via de síntese de fosfatidiletanolamina e outros fosfolipídios de membrana (Grapentine et al., 2022).

Para a pETN atingir as concentrações necessárias com efeitos citotóxicos nos tumores, evidenciados em alguns modelos pré-clínicos, é possível que seja necessário melhorias e inovações na tecnologia, incluindo a via de administração endovenosa em bomba de infusão contínua ou embolização tumoral por endovascular. A formulação da 2-AEH2F [Figura 18] manifesta um potencial de driblar ações das fosfatases, uma vez que evidências sugerem que é internalizada para dentro da célula tumoral (Luna et al., 2016; Luna, 2017). Quando comparadas, a pETN possui efeito sinérgico ao da meclizina (Silva, 2020). O sinergismo entre os compostos não significa que o aumento na

quantidade de pETN cause aumentos recíprocos nos níveis de PCYT2. As reações enzimáticas são dinâmicas e os níveis de PCYT2 e pETN podem variar devido a outros fatores não previstos. Até o momento, não existem ensaios controlados sobre o efeito do aumento exógeno de pETN na expressão da PCYT2 [Figura 18].



Fonte: Feito por Guilherme Ayres Rossini através da plataforma biorender.com

Figura 18: Representação do mecanismo de entrada do 2-AEH2F para dentro da célula e aumento da concentração da pETN intracelular. O ponto de interrogação no núcleo da célula tumoral representa a dúvida existente diante da falta de dados na literatura sobre o efeito biológico na expressão de PCYT2.

As principais limitações do presente estudo estão ligadas às limitações dos estudos de bioinformática, incluindo o não controle da qualidade de obtenção e processamento das amostras. A construção de um biobanco envolve diversos processos padronizados que são vulneráveis: sempre pode ocorrer algum tipo de erro ou contaminação durante algum momento de todo o processo. Outra limitação, que independe da qualidade da amostra, está relacionada à quantidade gigante de dados produzidos, aumentando por si só a probabilidade de encontrar correlações estatisticamente significantes (Shanahan; Hill, 2019).

Muitas vezes, ensaios em ambientes controlados devem ser realizados para confirmar os dados provenientes das plataformas computacionais. Ainda existem algumas questões em aberto: como, “qual o transportador intermembrana que transporta a pETN para dentro da célula?” “Existe alguma troca de moléculas entre o transporte?” “Existe gasto energético?” Diante disso, mais estudos necessitam ser realizados para produzirem esses dados, assim como confirmar os dados provenientes do presente trabalho.

Oncologistas afirmam que 95% de seus pacientes expressaram o desejo de tomar a fosfoetanolamina sintética (Rêgo et al., 2017). Muitos pacientes entram na justiça para conseguir acesso ao composto (Ledford, 2015). Perde-se a produção de ciência e conhecimento neste cenário judicializado. De maneira geral, os dados encontrados justificam a continuação das pesquisas em todos os níveis, com foco na realização da translação da tecnologia para chegar ao mercado e impactar positivamente a sociedade (em especial o nosso Sistema Único de Saúde). Nos Estados Unidos, a projeção do custo total com câncer para o ano de 2020 foi de 173 bilhões de dólares (Mariotto et al., 2011). Antes de estudos em busca de eficácia ou aplicabilidade em determinada doença, ainda é preciso entender melhor sobre a relação da administração do sal de pETN via oral com o corpo humano. Variáveis fármaco-fisiológicas básicas, como o impacto da cronobiologia na farmacocinética do composto, ainda não foram estudadas (Stéphanou et al., 2018). É possível visualizar diversas possibilidades de desenhos de estudos do efeito do composto em diferentes cenários médicos que ainda não possuem ou possuem pouca possibilidade terapêutica - e todos guiados por dados deste presente trabalho. Parâmetros anatômicos de avaliação de eficácia como RESCIT não são os mais indicados para avaliar o efeito biológico da administração do sal de pETN. Existem adaptações do RECIST, como o imuno-RECIST, que provavelmente seria o parâmetro anatômico mais indicado para a avaliação da resposta do composto em futuros estudos clínicos. Além disso, outros parâmetros devem ser considerados como a termografia médica e o impacto do composto na qualidade de vida e sobrevida geral dos pacientes.

6. CONCLUSÃO

A fosfoetanolamina é uma molécula multifuncional. Além de participar da síntese de fosfolipídios de membrana, ela também possui outros efeitos biológicos nas células e diferentes rotas de síntese endógena da molécula. Ela comumente está envolvida em processos naturais e fisiológicos; no entanto, também pode estar envolvida na fisiopatologia de doenças. Existem diversas rotas de síntese química do composto. A administração exógena do sal de fosfoetanolamina também possui efeito biológico em organismos vivos. Os efeitos irão depender de diferentes variáveis. Nos tumores, ela possui como principais alvos a mitocôndria, a cadeia transportadora de elétrons e, especificamente, a enzima succinato desidrogenase no complexo II. Ela inibe essa enzima ao se ligar nela, impedindo com que o succinato seja metabolizado. Ademais, ela influencia na passagem dos elétrons pela cadeia diminuindo a atividade mitocondrial. A célula exposta à pETN pode se adaptar ou entrar em processo de morte celular programada. Sua concentração está diretamente relacionada com esse processo de maneira que, quanto maior a concentração de pETN, maior a atividade citotóxica para célula tumoral. A concentração de pETN necessária para ter efeitos citotóxicos depende do tipo de tumor e do estado metabólico (fatores intrínsecos e extrínsecos). A formulação nanoestruturada (2-AEH2F) é capaz de aumentar a biodisponibilidade de pETN e driblar os efeitos de fosfatases, podendo ser considerada uma tecnologia com grande potencial terapêutico a ser confirmado em ensaios clínicos.

No geral, ainda não existem dados suficientes para qualquer tipo de recomendação médica específica. Pela primeira vez mostramos a conexão do braço da fosfatidiletanolamina na via Kennedy com outras engrenagens e processos celulares fisiológicos e patológicos, sendo a pETN uma molécula com múltiplas funções. Observamos, portanto, que o emprego do seu conhecimento na Medicina não se limita apenas ao câncer.

7 REFERÊNCIAS

Al-Asfour SV. *Estudo de equilíbrios químicos com 2-aminoetanol dihidrogenofosfato para fins biológicos* [tese]. São Carlos: Universidade de São Paulo, Instituto de Química de São Carlos; 2008. doi: 10.11606/T.75.2008.tde-10122008-163040.

Almeida, MV. *Aplicação pré-clínica da fosfoetanolamina sintética sobre modelos experimentais de epilepsia* [dissertação]. São Carlos: Universidade de São Paulo, Instituto de Química de São Carlos; 2007. doi: 10.11606/D.82.2007.tde-30072007-162431

Altman B, Stine Z, Dang C. From Krebs to clinic: glutamine metabolism to cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2016;16:619-34. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.71>

Anderson NM, Simon MC. The tumor microenvironment. *Curr Biol*. 2020;30(16):R921-R925. doi: 10.1016/j.cub.2020.06.081.

Araujo AVP. *Estudos pré-clínicos de toxicidade aguda e de doses repetidas da fosfoetanolamina sintética* [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2018. doi: 10.11606/D.5.2018.tde-15032018-092543.

Asgharzadeh MR, Barar J, Pourseif MM, Eskandani M, Niya MJ, Mashayekhi YO. Molecular machineries of pH dysregulation in tumor microenvironment: potential targets for cancer therapy. *Bioimpacts*. 2017;7(2):115-133. doi: 10.15171/bi.2017.

Badrinath N, Yoo SY. Mitochondria in cancer: in the aspects of tumorigenesis and targeted therapy. *Carcinogenesis*. 2018;39(12):1419-30. doi: 10.1093/carcin/bgy148.

Becker HM. Carbonic anhydrase IX and acid transport in cancer. *Br J Cancer*. 2020;122(2):157-67. doi: 10.1038/s41416-019-0642-z.

Benny S, Mishra R, Manojkumar MK, Aneesh TP. From Warburg effect to Reverse Warburg effect; the new horizons of anti-cancer therapy. *Med Hypotheses*. 2020;144:110216. doi: 10.1016/j.mehy.2020.110216.

Bento AF, Chaves JS, Silveira FA. *Estudo de toxicidade oral de dose máxima tolerada e doses repetidas por 7 dias da fosfoetanolamina sintética em ratos*. Brasília; 2016 [citado 20 jun. 2019]. <https://www.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/ciencia/SEPED/Saude/fosfoetanolamina/arquivos/Relatorio-Final-Estudo-021-MTD-022-15.pdf>

Bonfim Neto AP. *O papel pró-apoptótico da fosfoetanolamina sintética na formulação lipossomal DODAC na via envolvida na quimioresistência de células de câncer de mama* [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2018. doi: 10.11606/T.5.2018.tde-31102018-123831.

Brasil. Ministério da Ciência e Tecnologia e Inovação. *Caracterização do conteúdo das cápsulas de fosfoetanolamina (FOS) para MCTI*. Relatório técnico-científico. Eliezer J. Barreiro, Luiz Carlos Dias. Campinas; 2016a [citado 12 jun. 2019]. <https://www.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/ciencia/SEPED/Saude/fosfoetanolamina/arquivos/Relatorio-Completo-de-Sintese-eCaracterizacao.pdf>.

Brasil. Ministério da Ciência e Tecnologia e Inovação. Centro de Inovação e Ensaios Pré-Clínicos (CIEnP). *Relatório final – Avaliação das atividades citotóxica e antiproliferativa da fosfoetanolamina (UNICAMP) e fosfoetanolamina (UNICAMP) em linhagens de células humanas de carcinoma de pulmão, carcinoma de pâncreas e melanoma*. Estudo no 024- VIP-008-16. Brasília, DF; 2016b [citado 12 jun. 2019]. Disponível em: <https://www.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/ciencia/SEPED/Saude/fosfoetanolamina/arquivos/Relatorio-da-Avaliacao-das-Atividades-Citotoxica-e-Antiproliferativa-da-Fosfoetanolamina-Monoetanolamina-e-Fosfobisetanolamina-em-Linhagens-de-Celulas-Humanas-de-Carcinoma-de-Pulmao-Carcinom.pdf>.

Brasil. Ministério da Ciência e Tecnologia e Inovação. Centro de Inovação e Ensaios Pré-Clínicos (CIEnP). *Avaliação das atividades citotóxica e antiprolifera da mistura de fosfoetanolamina + monoetanolamina (100:70) em linhagens de células humanas de carcinoma de pulmão*. Estudo no 024-VIP 006-17. Brasília, DF; 2017. [citado 12 jun. 2019]. Disponível em: <https://www.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/ciencia/SEPED/Saude/fosfoetanolamina/arquivos/Relatorio-Final-Fosfoetanolamina-024-VIP-006-17.pdf>.

Brasil. Ministério da Ciência e Tecnologia e Inovação. Centro de Inovação e Ensaios Pré-Clínicos (CIEnP). Resumo executivo – Avaliação da genotoxicidade da fosfoetanolamina (USP-São Carlos): teste de mutação reversa em *Salmonella typhimurum* (teste de AMES – ensaio *Salmonella* /microsoma). Brasília, DF; 2016a [citado 12 jun. 2019]. <https://www.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/ciencia/SEPED/Saude/fosfoetanolamina/arquivos/Resumo-Executivo-Genotoxicidade-Teste-deAmes.pdf>

Brasil. Ministério da Ciência e Tecnologia e Inovação. Centro de Inovação e Ensaios Pré-Clínicos CIEnP. Relatório final Avaliação da permeabilidade intestinal in vitro da fosfoetanolamina em células CACO-2. Estudo nº: 024-PER-042-19. Brasília, DF: CTIC; 2019b. Disponível em: <https://antigo.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/ciencia/SEPED/Saude/fosfoetanolamina/arquivos/Avaliacao-da-permeabilidade-intestinal-in-vitroda-fosfoetanolamina-em-celulas-caco-2.pdf>.

Brasil. Ministério da Ciência e Tecnologia e Inovação. Centro de Inovação e Ensaios Pré-Clínicos CIEnP. *Relatório final - Avaliação do perfil farmacocinético da fosfoetanolamina sintética produzida pela USP-São Carlos e padrão Sigma em plasma de rato*. Brasília, DF: MCTIC; 2015A. Disponível em: <https://antigo.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/ciencia/SEPED/Saude/fosfoetanolamina/arquivos/Relatorio-Final-021-PKB-023-15-P.pdf>.

Brasil. Ministério da Ciência e Tecnologia e Inovação. *Fosfoetanolamina*. Brasília, DF; 2015b [citado 12 jun. 2019]. Disponível em https://antigo.mctic.gov.br/mctic/opencms/ciencia/SEPED/Saude/fosfoetanolamina/texto_geral/historico_fosfoetanolamina.html.

Brasil. Ministério da Ciência e Tecnologia e Inovação. *Identificação, caracterização e síntese dos componentes das cápsulas de fosfoetanolamina para MCTI*. Eliezer J. Barreiro, Luiz Carlos Dias. Campinas; 2016b [citado 10 jun. 2019]. https://www.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/ciencia/SEPED/Saude/fosfoetanolamina/arquivos/RelatorioExecutivo_FOSFOETANOLAMINA_09_03_2016.pdf.

Bruhn HD, Jipp P, Ravens KG. Plasma and platelet phospholipids in normal subjects and in patients with chronic arterial obliterations. *Haemostasis*.

1977;6(3):197-202. doi: 10.1159/000214180.

Bui T, Thompson CB. Cancer's sweet tooth. *Cancer Cell*. 2006;9(6):419-20. doi: 10.1016/j.ccr.2006.05.012.

Burke PJ. Mitochondria, Bioenergetics and Apoptosis in Cancer. *Trends Cancer*. 2017;3(12):857-70. doi: 10.1016/j.trecan.2017.10.006.

Cadoux-Hudson TA, Blackledge MJ, Rajagopalan B, Taylor DJ, Radda GK. Human primary brain tumour metabolism in vivo: a phosphorus magnetic resonance spectroscopy study. *Br J Cancer*. 1989;60(3):430-6. doi: 10.1038/bjc.1989.300.

Campello S, Scorrano L. Mitochondrial shape changes: orchestrating cell pathophysiology. *EMBO Rep*. 2010;11(9):678-84. doi:10.1038/embor.2010.115.

Cardone RA, Casavola V, Reshkin SJ. The role of disturbed pH dynamics and the Na⁺/H⁺ exchanger in metastasis. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(10):786-95. doi: 10.1038/nrc1713.

de Carvalho LKH. *Avaliação dos efeitos pró-apoptóticos da fosfoetanolamina sintética e da formulação lipossomal DODAC/FOS em células de carcinoma espinocelular da cavidade oral* [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2017. doi: 10.11606/D.5.2017.tde-31072017-132005.

Chan SHS, Nishino I. *CHKB-Related muscular dystrophy*. GeneReviews[®]. 2023.

Chang YY, Kennedy EP. Biosynthesis of phosphatidyl glycerophosphate in *Escherichia coli*. *J Lipid Res*. 1967;8(5):447-55.

Chen LB. Mitochondrial membrane potential in living cells. *Annu Rev Cell Biol*. 1988;4:155-81. doi: 10.1146/annurev.cb.04.110188.001103.

Cherbuliez E, Gandillon CI, Picciotto A, Rabinowitz J. Recherches sur la formation et la transformation des esters XVIII. Sur la phosphorylation d'alcools tertiaires et sur la vitesse d'hydrolyse des esters mono-t alcoylphosphoriques. *Helvetica*. 1950;42(6):2277-84. <https://doi.org/10.1002/hlca.19590420660>

Chu J, Qian X, Zhang X, Jiang T, Li X, Sun W. ETNK2 Low-expression predicts poor-prognosis in Renal Cell Carcinoma with immunosuppressive tumor

microenvironment. *J Oncol*. 2023;1743357. doi: 10.1155/2023/1743357.

Conceição TO. *Caracterização das propriedades antitumorais da fosfoetanolamina sintética e da formulação lipossomal DODAC/fosfoetanolamina em células de leucemia humana K-562* [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2017. doi: 10.11606/D.5.2017.tde-29112017-083253.

Cone Jr CD. Variation of the transmembrane potential level as a basic mechanism of mitosis control. *Oncology*. 1970;24(6):438-70. doi: 10.1159/000224545.

Cone Jr CD. Unified theory on the basic mechanism of normal mitotic control and oncogenesis. *J Theor Biol*. 1971;30(1):151-81. doi: 10.1016/0022-5193(71)90042-7.

Cone Jr CD, Cone CM. Induction of mitosis in mature neurons in central nervous system by sustained depolarization. *Science*. 1976;192(4235):155-8. doi: 10.1126/science.56781.

Corbet C, Feron O. Tumor acidosis: from the passenger to the driver's seat. *Nat Rev Cancer*. 2017;17(10):577-593. doi: 10.1038/nrc.2017.77.

Cristino L, Bisogno T, Di Marzo V. Cannabinoids and the expanded endocannabinoid system in neurological disorders. *Nat Rev Neurol*. 2020;16(1):9-29. doi: 10.1038/s41582-019-0284-z.

Cunha OGAL. *Estudo da segurança farmacológica e dose escalonada para uso da fosfoetanolamina sintética em cães portadores de neoplasia* [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2019. doi: 10.11606/D.10.2019.tde-08042020-143111.

Cusworth DC. The isolation and identification of phosphoethanolamine from the urine of a case of hypophosphatasia. *Biochem J*. 1958;68(2):262-4. doi:10.1042/bj0680262

Daly PF, Cohen JS. Magnetic resonance spectroscopy of tumors and potential in vivo clinical applications: a review. *Cancer Res*. 1989;49(4):770-9.

Daly PF, Lyon RC, Faustino PJ, Cohen JS. Phospholipid metabolism in cancer cells monitored by ³¹P NMR spectroscopy. *J Biol Chem*. 1987;262(31):14875-8.

De Andrade EL, Leite DFP, Cavalli J. *Farmacologia de segurança do sistema nervoso central: avaliação do potencial efeito neurotóxico da fosfoetanolamina* (USP - São Carlos). São Carlos: Centro de Inovação e Ensaios Pré-clínicos (CIEnP); 2016a. 02-FSN-032-16:1-69.

De Andrade EL, Leite DFP, Rezende E. *Farmacologia de segurança do sistema cardiovascular: o efeito da fosfoetanolamina sintética* (USP - São Carlos) sobre parâmetros hemodinâmicos. São Carlos: Centro de Inovação e Ensaios Pré-clínicos (CIEnP); 2016b. 021-FSC-035-16:1-44.

De Castro PF, Maria DA, Pinto ACBCF, Patricio GCF, Matera JM. Local tumor response to neoadjuvant therapy with 2-aminoethyl dihydrogen phosphate in dogs with soft tissue sarcoma. *Vet Med Sci*. 2022;8(3):900-1000. doi: 10.1002/vms3.757

De Jaeghere EA, Denys HG, De Wever O. Fibroblasts Fuel Immune Escape in the Tumor Microenvironment. *Trends Cancer*. 2019;5(11):704-723. doi: 10.1016/j.trecan.2019.09.009.

DeBerardinis RJ, Chandel NS. Fundamentals of cancer metabolism. *Sci Adv*. 2016;2(5):e1600200. doi: 10.1126/sciadv.1600200.

Diaz-Ruiz R, Rigoulet M, Devin A. The Warburg and Crabtree effects: On the origin of cancer cell energy metabolism and of yeast glucose repression. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1807(6):568-76. doi: 10.1016/j.bbabi.2010.08.010.

Dillon S, Staines KA, Millan JL, Farquharson C. How to Build a Bone: PHOSPHO1, biomineralization and beyond. *JBMR Plus*. 2019;3(7):e10202. doi: 10.1002/jbm4.10202.

Dillon S, Suchaki K, Hsu S, Stephen LA, Wan R, Cawthorn WP, Stewart AJ, Nudelman F, Morton NM, Farquharson C. Ablation of ENPP6 results in transient bone hypomineralization. *JBMR Plus*. 2021;5(2):e10439. doi: 10.1002/jbm4.10439.

Dowhan W, Bogdanov M, Eugene P. Kennedy's legacy: defining bacterial phospholipid pathways and function. *Front Mol Biosci*. 2021;8:168. doi: 10.3389/fmolb.2021.666203

Felippe Jr J. Desvendando os segredos do câncer: pH. In: Fellipe Jr J. *Oncologia*

médica, fisiopatogenia e tratamento. São Paulo: Sarvier; 2019. Cap.11, p.95-99.

Ferrari VE, Ferrari G. *Process for preparing ethanol-2-aminophosphoric acid*. US2730542A; 1951.

Ferreira AK. *Alquil fosfatado sintético precursor dos fosfolipídios da membrana celular com potencial efeito antitumoral e apoptótico em modelos de tumores experimentais* [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2013 [citado 29 dez. 2021]. doi: 10.11606/T.5.2013.tde-20052013-145336.

Ferreira AK, Santana-Lemos B, Rego EM, Mendonça Filho O, Chierice GO, Maria DA. Synthetic phosphoethanolamine has in vitro and in vivo anti-leukemia effects. *Br J Cancer*. 2013a;109:2819- 28. <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.510>

Ferreira AK, Freitas VM, Levy D, Ruiz JL, Bydlowski SP, Rici RE, Filho OM, Chierice GO, Maria DA. Anti-angiogenic and anti-metastatic activity of synthetic phosphoethanolamine. *PLoS One*. 2013b;8(3):e57937. doi: 10.1371/journal.pone.0057937.

Ferreira AK, Meneguelo R, Pereira A, Mendonça Filho O, Chierice GO, Maria DA. Synthetic phosphoethanolamine induces cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells through the mitochondrial pathway. *Biomed Pharmacother*. 2013c;67(6):481-7. doi: 10.1016/j.biopha.2013.01.012

Ferreira AK, Meneguelo R, Pereira A, Mendonça Filho O, Chierice GO, Maria DA. Anticancer effects of synthetic phosphoethanolamine on Ehrlich ascites tumor: an experimental study. *Anticancer Res*. 2012A;32(1):95-104.

Ferreira AK, Meneguelo R, Marques FLN, Radin A, Mendonça Filho O, Claro Neto S, Chierice GO, Maria DA. 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*. 2012b;66(7):541-8. doi: 10.1016/j.biopha.2012.04.008.

Ferreira AK, Meneguelo R, Claro Neto S, Chierice GO, Maria DA. Synthetic phosphoethanolamine induces apoptosis through caspase-3 pathway by decreasing expression of Bax/Bad proteins and changes cell cycle in melanoma. *J Cancer Sci Ther*. 2011;3(3):53-59. doi: 10.4172/1948-5956.1000058.

Figuet E, Romiguier J, Dutheil JY, Galtier N. Mitochondrial DNA as a tool for reconstructing past life-history traits in mammals. *J Evolutionary Biol.* 2014;27(5):899-910. <https://doi.org/10.1111/jeb.12361>

Flis VV, Daum G. Lipid transport between the endoplasmic reticulum and mitochondria. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(6):a013235. doi: 10.1101/cshperspect.a013235.

Finicle BT, Jayashankar V, Edinger AL. Nutrient scavenging in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2018;18(10):619-633. doi: 10.1038/s41568-018-0048-x.

Fontana D, Mauri M, Renso R, Docci M, Crespiatico I, Rost LM, Jang M, Niro A, D`Aliberti D, Massimino L, Bertagna M, Zambrotta G, Bossi M, Citterio S, Crescenzi B, Fanelli F, Cassina V, Corti R, Salerno D, Nardo L, Chinello C, Mantegazza F, Mecucci C, Magni F, Cavaletti G, Bruheim P, Rea D, Larsen S, Gambacorti-Passerini C, Piazza R. ETNK1 mutations induce a mutator phenotype that can be reverted by phosphoethanolamine. *Nat Commun.* 2020;11(1):5938. doi: 10.1038/s41467-020-19721-w.

Freitas CS, Leite DFP, Kobe S, da Cruz F. *Avaliação da genotoxicidade da fosfoetanolamina sintética* (USP - São Carlos): teste de micronúcleos em medula óssea de camundongos. São Carlos: Centro de Inovação e Ensaios Pré-clínicos (CIEnP); 2016. 021-MIC-005-16:1-20.

Fullerton MD, Hakimuddin F, Bakovic M. Developmental and metabolic effects of disruption of the mouse CTP:phosphoethanolamine cytidyltransferase gene (*Pcyt2*). *Mol Cell Biol.* 2007;27(9):3327-36. doi: 10.1128/MCB.01527-06.

Gajewski CD, Yang L, Schon EA, Manfredi G. New insights into the bioenergetics of mitochondrial disorders using intracellular ATP reporters. *Mol Biol Cell.* 2003;14(9):3628-3635. doi:10.1091/mbc.e02-12-0796

Galluzzi L, Vitale I, Abrams J, et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.* 2012;19:107-20). <https://doi.org/10.1038/cdd.2011.96>

Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Math M, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, Martinez P, Matthews N, Stewart A, Tarpey P, Varela I, Phillimore B, Begum S, McDonald NQ, Butler A, Jones D, Raine K, Latimer C, Santos CR, Nohadani

M, Eklund AC, Spencer-Dene B, Clark G, Pickering L, Stamp G, Gore M, Szallasi Z, Downward J, Futreal PA, Swanton C. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med*. 2012;366(10):883-892. doi: 10.1056/NEJMoa1113205. Erratum in: *N Engl J Med*. 2012;367(10):976.

Gibellini F, Smith TK. The Kennedy pathway--De novo synthesis of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine. *IUBMB Life*. 2010;62(6):414-28. doi: 10.1002/iub.337.

Gohil V, Sheth S, Nilsson R, et al. Nutrient-sensitized screening for drugs that shift energy metabolism from mitochondrial respiration to glycolysis. *Nat Biotechnol*. 2010;28:249-55. <https://doi.org/10.1038/nbt.1606>

Gohil VM, Zhu L, Baker CD, Craacan V, Yaseen A, Jain M, Clish CB, Brookes PS, Bakovic M, Mootha VK. Meclizine inhibits mitochondrial respiration through direct targeting of cytosolic phosphoethanolamine metabolism. *J Biol Chem*. 2013;288(49):35387-95. doi: 10.1074/jbc.M113.489237.

Grapentine S, Singh RK, Basu P, Sivanesan S, Mattos G, Oresajo O, Cheema J, Demeke W, Dolinsky VW, Bakovic M. Pcyt2 deficiency causes age-dependant development of nonalcoholic steatohepatitis and insulin resistance that could be attenuated with phosphoethanolamine. *Sci Rep*. 2022;12:1048. doi: 10.1038/s41508-022-05410-y.

Greten FR, Grivennikov SI. Inflammation and cancer: triggers, mechanisms, and consequences. *Immunity*. 2019;51(1):27-41. doi: 10.1016/j.immuni.2019.06.025.

Grossman RL, Heath A, Ferretti V, Varmus HE, Lowy DR, Kibbe WA, Staudt LM. Toward a shared vision for cancer genomic data. *N Engl J Med*. 2016;375(12):1109-12. doi: 10.1056/NEJMp1607591.

Guan X, Luo L, Begum G, Kohanbash G, Song Q, Rao A, Amankulor N, Sun B, Sun D, Jia W. Elevated Na/H exchanger 1 (SLC9A1) emerges as a marker for tumorigenesis and prognosis in gliomas. *J Exp Clin Cancer Res*. 2018;37(1):255. doi: 10.1186/s13046-018-0923-z.

Guan Y, Chen X, Wu M, Zhu W, Arslan A, Takeda S, Nguyen MH, Majeti R, Thomas D, Zheng M, Peltz G. The phosphatidylethanolamine biosynthesis

pathway provides a new target for cancer chemotherapy. *J Hepatol.* 2020;72(4):746-60. doi: 10.1016/j.jhep.2019.11.007.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144(5):646-74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000;100(1):57-70. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81683-9.

Harguindey S, Orive G, Luis Pedraz J, Paradiso A, Reshkin SJ. The role of pH dynamics and the Na⁺/H⁺ antiporter in the etiopathogenesis and treatment of cancer. Two faces of the same coin--one single nature. *Biochim Biophys Acta.* 2005;1756(1):1-24. doi: 10.1016/j.bbcan.2005.06.004.

Hayes JD, Dinkova-Kostova AT, Tew KD. Oxidative stress in cancer. *Cancer Cell.* 2020;38(2):167-97. doi: 10.1016/j.ccell.2020.06.001.

Holthuis J, Menon A. Lipid landscapes and pipelines in membrane homeostasis. *Nature.* 2014;510:48-57. <https://doi.org/10.1038/nature13474>.

Hoy AJ, Nagarajan SR, Butler LM. Tumour fatty acid metabolism in the context of therapy resistance and obesity. *Nat Rev Cancer.* 2021;21:753-66. <https://doi.org/10.1038/s41568-021-00388-4>.

Hu L, Wang R, Cai J, Feng D, Yang G, Xu Q, Zhai Y, Zhang Y, Zhou W, Cai Q. Overexpression of CHKA contributes to tumor progression and metastasis and predicts poor prognosis in colorectal carcinoma. *Oncotarget.* 2016;7(41):66660-66678. doi: 10.18632/oncotarget.11433.

Huang B, Song BI, Xu C. Cholesterol metabolism in cancer: mechanisms and therapeutic opportunities. *Nat Metab.* 2020;2:132-41. <https://doi.org/10.1038/s42255-020-0174-0>

Huang S, Luo Q, Huang J, Wei J, Wang S, Hong C, Qiu P, Li C. A Cluster Metabolic-related genes serves as potential prognostic biomarkers for renal cell carcinoma. *Front Gene.* 2022;13:902064. doi: 10.3389/fgene.2022.902064.

Huang C, Freter C. Lipid metabolism, apoptosis and cancer therapy. *Int J Mol Sci.* 2015;16(1):924-49. doi: 10.3390/ijms16010924.

Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP). *Instituto do câncer inicia*

segunda fase de testes clínicos da fosfoetanolamina sintética. São Paulo; 2016a. Disponível em: <http://www.icesp.org.br/sala-deimprensa/noticias/229-instituto-do-cancer-inicia-segunda-fase-de-testes-clinicos-da-fosfoetanolamina-sintetica>.

Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP). *Testes clínicos da fosfoetanolamina sintética começam na próxima 2 em SP*. São Paulo; 2016b. Disponível em: <http://www.icesp.org.br/sala-de-imprensa/noticias/226-testes-clinicos-da-fosfoetanolamina-sintetica-comecam-na-proxima-2-em-sp>

Januario EV, Melo SR, Maria DA, Lorigados CAB, Ambrosio AM, Kogika MM, Cogliati B, Shimozako HJ, Matera JM. Tolerability and effects of 2-aminoethyl dihydrogene phosphate in dogs with mast cell tumors. *Front Vet Sci*. 2022;9:898077. doi: 10.3389/fvets.2022.898007.

Jiang P, Du W, Wu M. Regulation of the pentose phosphate pathway in cancer. *Protein Cell*. 2014;5(8):592-602. doi: 10.1007/s13238-014-0082-8.

Kaelin Jr WG, McKnight SL. Influence of metabolism on epigenetics and disease. *Cell*. 2013;153(1):56-69. doi: 10.1016/j.cell.2013.03.004.

Kano-Sueoka T, Cohen DM, Yamaizumi Z, Nishimura S, Mori M, Fujiki H. Phosphoethanolamine as a growth factor of a mammary carcinoma cell line of rat. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1979;76(11):5741-5744. doi: 10.1073/pnas.76.11.5741.

Karlsson M, Zhang C, Mear L, Zhong W, Digre A, Katona B, Sjostedt E, Butler L, Odeberg J, Dustart P, Edfors F, Oksvold P, von Feilitzen K, Zwahlen M, Arif M, Altay O, Li X, Ozcan M, Mardinoglu A, Fagerberg L, Mulder J, Luo Y, Ponten F, Uhlen M, Lindskog C. A single-cell type transcriptomics map of human tissues. *Sci Adv*. 2021;7(31):eabh2169. doi: 10.1126/sciadv.abh2169.

KEEG Pathway Database. Available from: <https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>.

Kinnaird A, Zhao S, Wellen KE, Michelakis ED. Metabolic control of epigenetics in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2016;16(11):693-707. doi: 10.1038/nrc.2016.82.

Klockner C, Fernandez-Murray JP, Tavasoli M, Stitch H, Stoltenburg-Didingier G, Scholle LM, Bakhtiari S, Kruer MC, Darvish H, Firouzabadi SG, Pagnozzi A, Shukla A, Girisha KM, Narayanan DL, Kaur P, Maroofian R, Zaki MS, Nouraldeen

MM, Merkenschlager A, Gburek-Augustat J, Cali E, Banu S, Nahar K, Efthymiou S, Houlden H, Jamra RA, Williams J, McMaster CR, Platzer K. Bi-allelic variants in CHKA cause a neurodevelopmental disorder with epilepsy and microcephaly. *Brain*. 2022; 145(6):1916-1923.

Klunk WE, McClure RJ, Xu CJ, Pettegrew JW. Structural determinants of activity at the GABAB receptor. A comparison of phosphoethanolamine related GABA analogs. *Mol Chem Neuropathol*. 1995;26(1):15-30. doi: 10.1007/BF02814938.

Klunk WE, Debnath ML, McClure RJ, Pettigrew JW. Inactivity of phosphoethanolamine, an endogenous GABA analog decreased in Alzheimer's disease, at GABA binding sites. *Life Sci*. 1995;56(26):2377. doi: 10.1016/0024-3205(95)00231-t.

Ledford H. Brazilian courts tussle over unproven cancer treatment. *Nature*. 2015;527:420-21. <https://doi.org/10.1038/527420a>.

Lin XP, Mintern JD, Gleeson PA. Macropinocytosis in different cell types: similarities and differences. *Membranes* (Basel). 2020;10(8):177. doi:10.3390/membranes10080177.

Locasale JW. Serine, glycine and one-carbon units: cancer metabolism in full circle. *Nat Rev Cancer*. 2013;13(8):572-83. doi: 10.1038/nrc3557.

Lorenzo VP, Mendonça Júnior FJB, Barbosa Filho JM, Scotti L. Theoretical study of phosphoethanolamine: a synthetic anticancer agent with broad antitumor activity. *J Chemistry*. 2016:ID4068641. <https://doi.org/10.1155/2016/4068641>.

Luna ACL, Saraiva GKV, Ribeiro Filho OM, Chierice GO, Claro Neto S, Cuccovia IM, Maria DA. Potential antitumor activity of novel DODAC/PHO-S liposomes. *J Nanomedicine*. 2016;11:1577-91. doi: 10.2147/IJN.S90850.

Luna ACL, Santos Filho JRA, Hesse H, Claro Neto S, Chierice GO, Maria DA. Modulation of pro-apoptotic effects and mitochondrial potential B16F10 cells by DODAC/PHO-S liposomes. *BMC Res Notes*. 2018A;11(1):126. doi: 10.1186/s13104-018-3170-7.

Luna ACL, Saraiva GKV, Chierice GO, Hesse H, Maria DA. Antiproliferative and proapoptotic effect of DODAC/synthetic phosphoethanolamine on hepatocellular carcinoma cells. *BMC Pharmacol Toxicol*. 2018B;19(1):44. doi: 10.1186/s40360-

018-0225-2.

Luna ACL. *Potencial antitumoral da formulação lipossomal DODAC/fosfoetanolamina sintética no modelo de hepatocarcinoma* [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2017. doi: 10.11.606/T.5.2017.tde-15122017.

Luo Z-K, Chen Q-F, Qu X, Zhou X-Y. The roles and signaling pathways of phosphatidylethanolamine-binding protein 4 in tumors. *Onco Targets Ther.* 2019;12:7685-7690. doi: 10.214/OTT.S216161.

Marcon R, Freitas CS, Silveira FA. *Avaliação das atividades citotóxica e antiproliferativa da fosfoetanolamina, monoetanolamina e fosfobisetanolamina em linhagens de células humanas de carcinoma de pulmão, carcinoma de pâncreas e melanoma* [Relatório]. Florianópolis, SC: CIEnP; 2016. Disponível em: <https://antigo.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/ciencia/SEPED/Saude/fosfoetanolamina/arquivos/Relatorio-da-Avaliacao-das-Atividades-Citotoxica-e-Antiproliferativa-da-Fosfoetanolamina-Monoetanolamina-e-Fosfobisetanolamina-em-Linhagens-de-Celulas-Humanas-de-Carcinoma-de-Pulmao-Carcinom.pdf>.

Mariotto AB, Yabroff KR, Shao Y, Feuer EJ, Brown ML. Projections of the cost of cancer care in the United States: 2010-2020. *J Natl Cancer Inst.* 2011;103(2):117-28. doi: 10.1093/jnci/djq495. Erratum in: *J Natl Cancer Inst.* 2011 Apr 20;103(8):699.

Martin C, Pedersen SF, Schwab A, Stock C. Intracellular pH gradients in migrating cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2011;300(3):C490-5. doi: 10.1152/ajpcell.00280.2010.

Martinez-Outschoorn UE, Peiris-Pagés M, Pestell RG, Sotgia F, Lisanti MP. Cancer metabolism: a therapeutic perspective. *Nat Rev Clin Oncol.* 2017;14(1):11-31. doi: 10.1038/nrclinonc.2016.60. Erratum in: *Nat Rev Clin Oncol.* 2017;14 (2):113.

Marzzoco A, Torres BB. *Bioquímica básica*. 4a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2018. p.15, 76, 165.

Meneguelo R. *Efeitos antiproliferativos e apoptóticos da fosfoetanolamina*

sintética no melanoma B16F10 [dissertação]. São Carlos: Universidade de São Paulo, Bioengenharia; 2007 [citado 28 dez. 2021]. doi:10.11606/D.82.2007.tde-12022008-135651.

Miller KJ, Kennedy EP. Transfer of phosphoethanolamine residues from phosphatidylethanolamine to the membrane-derived oligosaccharides of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1987;169(2):682-6. doi: 10.1128/jb.169.2.682-686.1987.

Mitroi DN, Karunakaran I, Graler M, Saba JD, Ehninger D, Ledesma MD, van Echten-Deckert G. SGPL1 (shingosine phosphate lyase 1) modulates neuronal autophagy via phosphatidylethanolamine production. *Autophagy.* 2017;13(5):885-899. doi: 10.1080/15548627.2017.1291471.

Miyazaki M, Yamamoto K, Hosoki K. Renin inhibitory effect of synthetic phosphorylethanolamine (PE-104) in the rat. *Clin Sci Mol Med Suppl.* 1976;3:89s-91s. doi: 10.1042/cs051089s.

Modica-Napolitano JS, Renshaw PF. Ethanolamine and phosphoethanolamine inhibit mitochondrial function in vitro: implications for mitochondrial dysfunction hypothesis in depression and bipolar disorder. *Biol Psychiatry.* 2004;55(3):273-7.

Moraes Filho MO, Moura AF, Barreto FS. *Avaliação do potencial citotóxico in vitro da fosfoetanolamina sintética (FS) e da fosfoetanolamina nanoencapsulada (FSNE)*. Laudo técnico do estudo de amostras. Fortaleza, CE: Núcleo de Estudos e Desenvolvimento de Medicamentos; s.d.a. [citado 10 jun. 2019]. Disponível em: https://www.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/ciencia/SEPED/Saude/fosfoetanolamina/arquivos/Relatorio-CI50_Fosfoetanolamina.pdf.

Moraes Filho MO, Moura AF, Barretos FS. *Avaliação do potencial citotóxico e hemolítico in vitro da fosfoetanolamina sintética (FS)*. Laudo técnico do estudo de amostras. Fortaleza, CE: Núcleo de Estudos e Desenvolvimento de Medicamentos; s.d.b. [citado 10 jun. 2019] Disponível em: https://antigo.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/ciencia/SEPED/Saude/fosfoetanolamina/arquivos/Relatorio-CI50-Fosfoetanolamina-v_31-03-2016.pdf

Moraes Filho MO, Moura AF, Barreto FS, Ribeiro WLC. *Avaliação da possível atividade anticâncer da fosfoetanolamina sintética (FS) no carcinossarcoma 256*

de Walker. Laudo Técnico do Estudo da Fosfoetanolamina Sintética. 2016a. LOE02/16:1-10.

Moraes Filho MO, Moura AF, Barreto FS, Ribeiro WLC. *Avaliação do efeito antitumoral da fosfoetanolamina sintética no modelo experimental de melanoma humano murino*. Laudo Técnico do estudo da fosfoetanolamina sintética. 2016b. LOE04/16:1-20.

Moraes Filho MO, Moura AF, Barreto FS, Ribeiro WLC. *Avaliação da possível atividade anticâncer da fosfoetanolamina sintética (FS) no sarcoma 18*. Laudo técnico do estudo da fosfoetanolamina sintética. 2016c. LOE03/16:1-10.

Moreira CG, Benedet PO, Macron R. *Avaliação da interação da fosfoetanolamina com o canal de potássio kv11.1 em células hek293 transfectadas com o canal hERG humano*. Estudo nº: 024-ERG-023-19. Brasília: MICTIC, CIEnP; 2019a. Disponível em: <https://antigo.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/ciencia/SEPED/Saude/fosfoetanolamina/arquivos/Avaliacao-da-interacao-da-fosfoetanolamina-com-o-canal-de-potassio-kv11-1-em-celulas-hek293-transfectadas-com-o-canal-herg-humano.pdf>

Moreno-Sánchez R, Rodríguez-Enríquez S, Marín-Hernández A, Saavedra E. Energy metabolism in tumor cells. *FEBS J*. 2007;274(6):1393-418. doi: 10.1111/j.1742-4658.2007.05686.x.

Moreno-Sánchez R, Rodríguez-Enríquez S, Saavedra E, Marín-Hernández A, Gallardo-Pérez JC. The bioenergetics of cancer: is glycolysis the main ATP supplier in all tumor cells? *Biofactors*. 2009;35(2):209-25. doi: 10.1002/biof.31.

Muller K, Schulz J, Oemus R. Phosphoethanolamine – a substrate of alkaline phosphatase isolated from rat calvaria. *Biomed Biochim Acta*. 1989;48(8):495-504.

Munir R, Lisec J, Swinnen JV, et al. Lipid metabolism in cancer cells under metabolic stress. *Br J Cancer*. 2019;120:1090-1098. doi: 10.1038/s41416-019-0451-4

Myller AT, Karhe JJ, Hauka M, Pakkanen TT. The pH behaviour of a 2-aminoethyl dihydrogen phosphate zwitterion studied with NMR-titrations. *J Mol Structure*. 2013;1033(6):171-5. doi: 10.1016/j.molstruc.2012.08.033

Nagarajan SR, Butler LM, Hoy AJ. The diversity and breadth of cancer cell fatty acid metabolism. *Cancer Metab.* 2021;9(1):2. doi: 10.1186/s40170-020-00237-2.

Naguro T, Nakane H, Inaga S. *Mitochondrial continuous intracellular network-structures visualized with high-resolution field-emission scanning electron microscopy.* *Scanning electron microscopy for the life sciences.* Cambridge: Cambridge University Press; 2012. Cap.4, p.50-70.

Neish W, Rylett, A. Accumulation of phosphoethanolamine in the livers of rats injected with hepatocarcinogens. *Br J Cancer.* 1960;14:737-45. <https://doi.org/10.1038/bjc.1960.84>

Neuzil E, Jensen H, LePogam J. Chromatographic separation of ciliatine and phosphoethanolamine. *J Chromatogr.* 1969;39(2):238-40. doi: 10.1016/s0021-9673(01)98006-9.

Nieper HA. *The colamine phosphate salts as membrane integrity factor.* *Paracelsus Clinic am Bilbersee Medical Department.* Hannover, Germany; 1989. p.1-6. Available from: <https://brewersciencelibrary.com/proddetail.php?prod=Colamine+Phosphate+Salts+as+Membrane+Integrity+Factor>

Nieper, HA. *Suppression of cellular malignization by calcium colamine phosphate and by calcium 1-dl- aspartate.* The World Congress on Cancer. Sydney; 1995. Available from: <https://brewersciencelibrary.com/proddetail.php?prod=Letter+on+CaEAP+results+with+Cancer>

Oberhaensli RD, Hilton-Jones D, Bore PJ, Hands LJ, Rampling RP, Radda GK. Biochemical investigation of human tumours in vivo with phosphorus-31 magnetic resonance spectroscopy. *Lancet.* 1986;2(8497):8-11. doi: 10.1016/s0140-6736(86)92558-4.

Ortega AD, Sánchez-Aragó M, Giner-Sánchez D, Sánchez-Cenizo L, Willers I, Cuezva JM. Glucose avidity of carcinomas. *Cancer Lett.* 2009;276(2):125-35. doi: 10.1016/j.canlet.2008.08.007.

Osawa T, Shimamura T, Saito K, Hasegawa Y, Ishii N, Nishida M, Ando R, Kondo A, Anwar M, Tsuchida R, Hino S, Sakamoto A, Igarashi K, Saitoh K, Kato K, Endo K, Yamano S, Kanki Y, Matsumura Y, Minami T, Tanaka T, Anai M, Wada Y,

- Wanibuchi H, Hayashi M, Hamada A, Yoshida M, Yachida S, Nakao M, Sakai J, Aburatani H, Shibuya M, Hanada K, Miyano S, Soga T, Kodama T. Phosphoethanolamine Accumulation Protects Cancer Cells under Glutamine Starvation through Downregulation of PCYT2. *Cell Rep.* 2019;29(1):89-103.e7. doi: 10.1016/j.celrep.2019.08.087.
- Outhouse EL. Amino-ethyl phosphoric ester from tumours. *Biochem J.* 1936;30(2):197-201. doi: 10.1042/bj0300197.
- Outhouse EL. Further studies of amino-ethyl phosphoric ester-a compound apparently specific to malignant tumours. *Biochem J.* 1937;31(9):1459-63. doi: 10.1042/bj0311459.
- Ow Y, Green D, Hao Z, et al. Cytochrome c: functions beyond respiration. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9:532–542. <https://doi.org/10.1038/nrm2434>
- Palma M, Biziato D, Petrova TV. Microenvironmental regulation of tumor angiogenesis. *Nat Rev Cancer.* 2017;17(8):457-474. doi: 10.1038/nrc.2017.51.
- Patel D, Witt SN. Ethanolamine and phosphatidylethanolamine: partners in health and disease. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:4829180. doi: 10.1155/2017/4829180.
- Patra KC, Hay N. The pentose phosphate pathway and cancer. *Trends Biochem Sci.* 2014;39(8):347-54. doi: 10.1016/j.tibs.2014.06.005.
- Pavlidis S, Whitaker-Menezes D, Castello-Cros R, Flomenberg N, Witkiewicz AK, Frank PG, Casimiro MC, Wang C, Fortina P, Addya S, Pestell RG, Martinez-Outschoorn UE, Sotgia F, Lisanti MP. The reverse Warburg effect: aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma. *Cell Cycle.* 2009;8(23):3984-4001. doi: 10.4161/cc.8.23.10238.
- Pavlovic Z, Bakovic M. Regulation of Phosphatidylethanolamine Homeostasis - The Critical Role of CTP: Phosphoethanolamine Cytidylyltransferase (Pcyt2). *Int J Mol Sci.* 2013;14(2):2529-50. doi: 10.3390/ijms14022529.
- Pedersen AK, Mendes Lopes de Melo J, Mørup N, Tritsarlis K, Pedersen SF. Tumor microenvironment conditions alter Akt and Na⁺/H⁺ exchanger NHE1 expression in endothelial cells more than hypoxia alone: implications for endothelial cell function in cancer. *BMC Cancer.* 2017;17(1):542. doi:

10.1186/s12885-017-3532-x.

Purohit V, Simeone DM, Lyssiotis CA. Metabolic Regulation of Redox Balance in Cancer. *Cancers* (Basel). 2019;11(7):955. doi: 10.3390/cancers11070955.

Rêgo JF, Lopes G, Riechelmann RP, Sternberg C, Ferrari C, Fernandes G. A "miracle" cancer drug in the era of social media: a survey of Brazilian oncologists' opinions and experience with phosphoethanolamine. *Rev Assoc Med Bras.* 2017;63(1):70-77. doi: 10.1590/1806-9282.63.01.70.

Reshkin SJ, Bellizzi A, Caldeira S, Albarani V, Malanchi I, Poignee M, Alunni Fabbroni M, Casavola V, Tommasino M. Na⁺/H⁺ exchanger-dependent intracellular alkalinization is an early event in malignant transformation and plays an essential role in the development of subsequent transformation associated phenotypes. *FASEB J.* 2000;14(14):2185-97. doi: 10.1096/fj.00-0029com.

Ribeiro Filho OM, Chierice GO. *Síntese, caracterização, estudo de equilíbrio químico e agregação do 2-aminoetanol dihidrogenofosfato*. São Carlos: USP IQSC; 1998.

Rockenfeller P, Koska M, Pietrocola F, Minois N, Knittelfelder O, Sica V, Franz J, Carmona-Gutierrez D, Kroemer G, Madeo F. Phosphatidylethanolamine positively regulates autophagy and longevity. *Cell Death Differ.* 2015;22(3):499-508. doi: 10.1038/cdd.2014.219.

Rose GA, Kerr AC. The amino acids and phosphoethanolamine in salivary gland secretions of normal men and of patients with abnormal calcium, phosphorus and amino acid metabolism. *Q J Exp Physiol Cogn Med Sci.* 1958;43(2):160-8. doi: 10.1113/expphysiol.1958.sp001303.

Saito RF, Colquhoun A, Chammas R. O metabolismo da célula tumoral. In: Saito RF, Lana MVG, Medrano RFV, Chammas R. *Fundamentos da oncologia molecular*. São Paulo: Atheneu; 2016. Cap.8, p.139-141.

Samantha A, Vrieling A. Lipid A phosphoethanolamine transferase: regulation, structure and immune response. *J Mol Biol.* 2020;432:5184-5196. doi: 10.1016/j.jmb.2020.04.022.

Sanderson SM, Gao X, Dai Z, et al. Methionine metabolism in health and cancer: a nexus of diet and precision medicine. *Nat Rev Cancer.* 2019;19:625- 37.

<https://doi.org/10.1038/s41568-019-0187-8>

São Paulo (Estado). Secretaria da Saúde. Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP). *Efficacy and Safety of Synthetic Phosphoethanolamine in Solid Tumor Patients*. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02950103. São Paulo; 2019. Available from: <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT02950103?term=phosphoethanolamine&rank=1&view=record>

Saxena R, Yang C, Rao M, Turaga RC, Garlapati C, Gundala SR, Myers K, Ghareeb A, Bhattarai S, Kamalinia G, Bristi S, Su D, Gadda G, Rida PCG, Cantuaria GH, Aneja R. Preclinical development of a nontoxic oral formulation of monoethanolamine, a lipid precursor, for prostate cancer treatment. *Clin Cancer Res*. 2017;23(14):3781-93. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-1716.

Schito L, Semenza GL. Hypoxia-inducible factors: master regulators of cancer progression. *Trends Cancer*. 2016;2(12):758-70. doi: 10.1016/j.trecan.2016.10.016.

Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(10):721-32. doi: 10.1038/nrc1187.

Seki Y, Kimura M, Mizutani N, Fujita M, Aimi Y, Suzuki Y. Cerebrospinal fluid taurine after traumatic brain injury. *Neurochem Res*. 2005;30(1):123-8.

Seyfried TN, Arismendi-Morillo G, Mukherjee P, Chinopoulos C. On the origin of ATP synthesis in cancer. *iScience*. 2020;23(11):101761. doi: 10.1016/j.isci.2020.101761.

Seyfried TN. Cancer as a mitochondrial metabolic disease. *Front Cell Dev Biol*. 2015;3:43. doi: 10.3389/fcell.2015.00043.

Sezgin E, Levental I, Mayor S, Eggeling C. The mystery of membrane organization: composition, regulation and roles of lipid rafts. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2017;18(6):361-74. doi: 10.1038/nrm.2017.16.

Shanahan F, Hill C. Language, numeracy and logic in microbiome science. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019;16:387-88. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0163-5>.

Silva MGL. *Avaliação antitumoral da fosfoetanolamina sintética e da formulação lipossomal DODAC/fosfoetanolamina em células tumorais de mama humana*

[dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2016. doi: 10.11606/D.5.2017.tde-11052017-142120.

Silva MGL. *Efeitos moduladores da atividade mitocondrial do cloridrato de Meclizina, 2-4-dinitrofenol e metil-beta-ciclodextrina, associados com a fosfoetanolamina sintética em linhagem de câncer de mama triplo negativo* [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2020. doi: 10.11606/T.5.2020.tde

08092021-170717.

Silwood CJL, Lynch E, Claxson AWD, Grootveld MC. ¹H and (¹³C) NMR spectroscopic analysis of human saliva. *J Dent Res.* 2002;81(6):422-7.

Smith LC, Rossi FM. Occurrence and enzymatic degradation of phosphoethanolamine. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1958;99(3):754-7. doi: 10.3181/00379727-99-24491.

Stéphanou A, Fanchon E, Innominato PF, Ballesta A. Systems biology, systems medicine, systems pharmacology: the what and the why. *Acta Biotheor.* 2018;66(4):345-65. doi: 10.1007/s10441-018-9330-2.

Stroka KM, Jiang H, Chen S, Tong Z, Wirtz D, Sun SX, Konstantopoulos K. Water permeation drives tumor cell migration in confined microenvironments. *Cell.* 2014;157(3):611-23. doi: 10.1016/j.cell.2014.02.052.

Tannock IF, Rotin D. Acid pH in tumors and its potential for therapeutic exploitation. *Cancer Res.* 1989;49(16):4373-84.

Tennant DA, Durán RV, Boulahbel H, Gottlieb E. Metabolic transformation in cancer. *Carcinogenesis.* 2009;30(8):1269-80. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp070>

Thul PJ, Akesson L, Wiking M, Mahdessian D, Geladaki A, Blal HA, Alm T, Asplund A, Bjork L, Breckels LM, Backstrom A, Danielsson F, Fagerberg L, Fall J, Gatto L, Gnann C, Hober S, Hjelmare M, Johansson F, Lee S, Lindskog C, Mulder J, Mulvey CM, Nilsson P, Oksvold P, Rockberg J, Schutten, Schwenk JM, Sivertsson A, Sjostedt E, Skogs M, Stadler C, Sullivan DP, Tegel H, Winsnes C, Zhang C, Zwahlen M, Mardinoglu A, Ponten F, von Feilitzen K, Lilley KS, Uhlen M, Lundberg E. A subcellular map of the human proteome. *Science.*

2017;356(6340):eaal3321 doi: 10.1126/science.aal3321.

Tian Y, Jackson P, Gunter C, Wang J, Rock CO, Jackowski S. Placental thrombosis and spontaneous fetal death in mice deficient in ethanolamine kinase 2. *J Biol Chem*. 2006; 281(38): 28438-49. doi: 10.1074/jbc.M605861200.

Tilokani L, Nagashima S, Paupe V, Prudent J. Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms. *Essays Biochem*. 2018;62(3):341-60. doi: 10.1042/EBC20170104.

Twelves CJ, Lowry M, Porter DA, Dobbs NA, Graves PE, Smith MA, Richards MA. Phosphorus-31 metabolism of human breast--an in vivo magnetic resonance spectroscopic study at 1.5 Tesla. *Br J Radiol*. 1994;67(793):36-45. doi: 10.1259/0007-1285-67-793-36.

Uhlen M, Oksvold P, Fagerberg L, Lundberg E, Kalle, Jonasson, Fosberg M, Zwahlen M, Kampf C, Wester K, Hober S, Wenerus H, Bjorling L, Ponten F. Towards a knowledge-based Human Protein Atlas. *Nat Biotechnol*. 2010;28(12):1248-50. doi: 10.1038/nbt1210-1248.

Uhlen M, Zhang C, Lee S, Sjostedt E, Fagerberg L, Bidkhori G, Benfeitas R, Arif M, Liu Z, Edfors F, Sanli K, von Feilitzen K, Oksvold P, Lundberg E, Hober S, Nilsson P, Mattsson J, Scwenk JM, Brunnstrom H, Glimelius B, Sjoblom T, Edqvist P, Djureinovic D, Micke P, Lindskog C, Mardinoglu A, Ponten F. A pathology atlas of the human cancer transcriptome. *Science*. 2017;357(6352):eaan2507. doi: 10.1126/science/aan2507.

Ulivieri C. Cell death: insights into the ultrastructure of mitochondria. *Tissue Cell*. 2010;42(6):339-47. doi: 10.1016/j.tice.2010.10.004.

Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*. 2009;324(5930):1029-33. doi:10.1126/science.1160809

Veiga-Da-Cunha M, Hadi F, Balligand T, Stroobant V, van Schaftingen E. Molecular identification of Hydroxylysine Kinase and of ammoniophospholyases acting on 5-phosphohydroxy-L-lysine and phosphoethanolamine. *J Bio Chem*. 2012; 287(10):2746-7255. doi: 10.1074/jbc.M111.323484.

Vettore L, Westbrook RL, Tennant DA. New aspects of amino acid metabolism

in cancer. *Br J Cancer*. 2020;122:150-6. <https://doi.org/10.1038/s41416-019-0620-5>

Warburg O, Wind F, Negelein E. The metabolism of tumors in the body. *J Gen Physiol*. 1927;8(6):519-30. doi: 10.1085/jgp.8.6.519.

Warburg OH. *The Nobel Prize in Physiology or Medicine*. 1931. Available from: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1931/warburg/facts/>

Whitaker-Menezes D, Martinez-Outschoorn UE, Lin Z, Ertel A, Flomenberg N, Witkiewicz AK, Birbe R, Howell A, Pavlides S, Gandara R, Pestell RG, Sotgia F, Philp NJ, Lisanti MP. Evidence for a stromal-epithelial “lactate shuttle” in human tumors. *Cell Cycle*. 2011;10:11:1772-83. doi: 10.4161/cc.10.11.15659

Wiggins PM. Intracellular pH and the structure of cell water. *J Theor Biol*. 1972;37(2):363-71. doi: 10.1016/0022-5193(72)90029-x.

Wishart DS, Feunang YD, Marcu A, Guo AC, Liang K, Vazquez-Fresno R, Sajed T, Johnson D, Li C, Karu N, Sayeeda Z, Lo E, Assempour N, Berjanskii M, Sandeep S, Arndt D, Liang Y, Badran H, Grant J, Serra-Cayuela A, Liu Yifeng, Mandal R, Neveu V, Pon A, Knox C, Wilson M, Manach C, Scalbert A. HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018. *Nuclei Acids Res*. 2018;46(D1)D608-D617. doi:10.1093/nar/gkx1089.

Wong P, Kleemann HW, Tannock IF. Cytostatic potential of novel agents that inhibit the regulation of intracellular pH. *Br J Cancer*. 2002;87(2):238-45. doi: 10.1038/sj.bjc.6600424.

Xie N, Zhang L, Gao W, et al. NAD⁺ metabolism: pathophysiologic mechanisms and therapeutic potential. *Sig Transduct Target Ther*. 2020;5:227. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00311-7>

Yamagata M, Tannock IF. The chronic administration of drugs that inhibit the regulation of intracellular pH: in vitro and anti-tumour effects. *Br J Cancer*. 1996;73(11):1328-34. doi: 10.1038/bjc.1996.254.

Ye C, Sutter BM, Wang Y, Kuang Z, Tu BP. A metabolic function for phospholipid and histone methylation. *Mol Cell*. 2017;66(2):180-93.e8. doi: 10.1016/j.molcel.2017.02.026.

Zhang B, Wang D, Guo F, Xuan C. Mitochondrial membrane potential and

reactive oxygen species in cancer stem cells. *Fam Cancer*. 2015;14(1):19-23. doi: 10.1007/s10689-014-9757-9.

Zhang L, Chen P, Yang S, Li G, Bao W, Wu P, Jiang S. *Oncol Lett*. 2016; 12(3):1849-1853. doi: 10.3892/ol.2016.4810.

Zhang Q, Tamura Y, Roy M, Adachi Y, Iijima M, Sesaki H. Biosynthesis and roles of phospholipids in mitochondrial fusion, division and mitophagy. *Cell Mol Life Sci*. 2014;71(19):3767-78. doi:10.1007/s00018-014-1648-6

Zhang X, Lin Y, Gilles RJ. Tumor pH and its measurement. *J Nucl Med*. 2010;51(8):1167-1170. doi: 10.2967/jnumed.109.068981.