

METABOLOMICA NELLA RICERCA BIOMEDICA

Egidio Iorio, Rossella Canese

Servizio Grandi Strumentazioni e Core Facilities, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

Nell'era della post-genomica è ormai evidente che, oltre all'analisi dell'espressione genica e proteica, sia necessario caratterizzare il metaboloma, cioè l'insieme di molecole a basso peso molecolare di un determinato sistema biologico (dalla singola cellula all'intero organismo). Tra tutte le tecnologie "omiche" la metabolomica è tra le più recenti ed è considerata quella che maggiormente definisce il fenotipo, inteso come risultato dell'interazione tra geni e ambiente. Infatti al centro dello studio del metaboloma vi è il concetto che lo stato metabolico può rappresentare al meglio, tra tutte le scienze "omiche", lo stato globale di un individuo (1-3). In questa visione l'espressione genica potrebbe rappresentare lo specchio della natura interna di un sistema biologico, mentre i metaboliti posti alla fine dei processi metabolici potrebbero rappresentare l'interazione di altri fattori quali l'alimentazione, l'ambiente e lo stile di vita, i microrganismi commensali, gli agenti infettivi, l'esposizione a farmaci e/o sostanze tossiche. Possiamo quindi concludere che la genomica e la proteomica rappresentano le potenzialità di un sistema biologico, mentre lo studio del metaboloma il suo dinamismo reale (Figura 1).

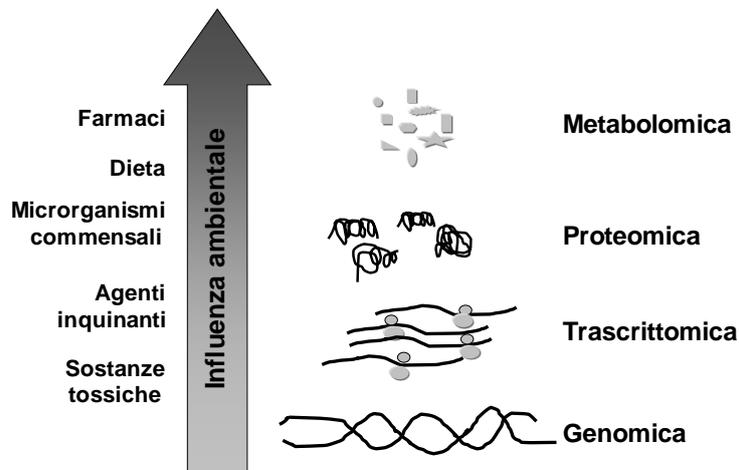


Figura 1. Rappresentazione schematica dell'influenza ambientale a livello genomico (DNA e mRNA), a livello proteomico e metabolomico

Un metabolita viene definito come qualsiasi molecola organica rilevabile nei tessuti e fluidi biologici con un peso molecolare inferiore a 1.500 Dalton. Sono considerati metaboliti ad esempio aminoacidi, lipidi, peptidi, oligonucleotidi, zuccheri, nucleosidi, chetoni, aldeidi, farmaci, tossine, contaminanti intracellulari o secreti. I metaboliti sono parte integrante e unità principali dei sistemi biologici. La metabolomica è connessa alle altre "omiche" in quanto i metaboliti, quali i nucleotidi monofosfati (AMP, CMP, GMP, TMP), sono componenti principali del genoma e

trascrittoma, mentre gli aminoacidi sono componenti principali del proteoma. I metaboliti svolgono molteplici funzioni come componenti principali delle membrane biologiche, assicurando quindi la struttura e l'integrità cellulare (lipidi). Inoltre, i metaboliti servono come substrati per la formazione di energia (zuccheri, aminoacidi, lipidi, ATP), cofattori o come mediatori della trasduzione di segnali cellulari per tutti i processi studiati da proteomica e genomica (4).

Metabonomica e metabolomica: la “firma metabolica”

La medicina sin dal passato ha direttamente o indirettamente valutato lo stato metabolico di un individuo osservando colore, sapore e odori dei fluidi biologici e nell'ultimo secolo, tramite lo sviluppo di strumenti analitici, misurando i livelli di specifici metaboliti quali ad esempio glucosio, colesterolo, creatinina.

Dallo sviluppo di tecnologie “omiche” la ricerca potrebbe in futuro avvalersi di analisi più complesse in grado di rilevare una “firma metabolica” (definita come l'identificazione di pattern metabolici o di singoli metaboliti) dello stato di un individuo.

Recentemente in letteratura sono stati conati due diversi termini per questo tipo di analisi complesse sul metaboloma: metabonomica e metabolomica. La metabonomica è definita come la misura quantitativa dei metaboliti presenti in un sistema biologico, o delle alterazioni delle concentrazioni dei metaboliti in risposta a stimoli fisiopatologici e/o a modificazioni genetiche e ambientali (5, 6). La metabolomica è invece definita come l'analisi di tutto il profilo metabolomico nel suo insieme in un dato set di condizioni (7). A tutt'oggi c'è ancora un ampio grado di sovrapposizione nell'utilizzo dei termini e spesso sono usati come sinonimi. Entrambe la metabonomica e la metabolomica sono complementari e integranti alla genomica e alla proteomica e altre scienze “omiche” offrendo così una visione integrata del sistema biologico in esame. In questo scenario la metabolomica, identificando specifiche “firme metaboliche”, può risultare uno strumento utile per comprendere l'eziologia di una patologia, descrivere con opportuni parametri la sua evoluzione e consentire quindi di formulare nuove ipotesi patogenetiche. In particolare, la metabolomica può:

- fornire marcatori predittivi di prognosi e/o di diagnosi di malattia (8);
- indagare sui meccanismi molecolari specifici delle malattie (9);
- identificare biomarcatori della risposta ai farmaci, fornendo un mezzo efficace per prevedere la risposta di un soggetto ad uno specifico trattamento (farmacometabolomica) (10);
- monitorare la risposta alla terapia e le recidive di malattia, come nel caso dei tumori;
- sviluppare nuovi farmaci basati su bersagli molecolari responsabili di alterazioni metaboliche specifiche (11);
- rappresentare la base per lo sviluppo di nuovi metodi di “imaging” metabolici come la risonanza magnetica nucleare (*Nuclear Magnetic Resonance*, NMR), la tomografia a emissione di positroni (*Positron Emission Tomography*, PET) e altre tecniche di *imaging* molecolare (12).

Grazie a queste potenzialità della metabolomica oggi sono state acquisite nuove conoscenze sui meccanismi che sono alla base di diverse malattie, tra cui patologie neuropsichiatriche, malattie cardiovascolari, tumori e diabete.

Laboratorio della metabolomica

La metabolomica si basa sullo studio sistematico di una serie completa di metaboliti in un campione biologico di qualsiasi natura (urine, sangue, tessuti, cellule, pus, liquido amniotico, feci ecc.). Come per ogni determinazione analitica le procedure devono essere standardizzate e riproducibili (13-15). Un aspetto cruciale nelle analisi metabolomiche è rappresentato dalle fasi preanalitiche e analitiche, fasi in cui il campione biologico deve essere opportunamente conservato e processato al fine di evitare processi degradativi endogeni in quanto l'attività enzimatica può perdurare oltre il momento della raccolta del campione. Il metabolismo di ciascun campione deve essere ridotto o spento tramite utilizzo di solventi organici o congelamento. Inoltre la contaminazione di macromolecole (DNA e proteine) può essere evitata tramite tecniche di frazionamento. La scelta del campione dipende dal quesito biologico. Negli studi di coorte su larga scala sono maggiormente utilizzati i biofluidi (ad esempio, il siero, plasma, urine, saliva, feci) a causa della loro relativa facilità di raccolta, preparazione e stoccaggio. La saliva rappresenta la scelta di elezione per lo studio delle malattie del cavo orale, le feci per il microbioma, e l'urina per le malattie renali e studi tossicologici, mentre generalmente siero o plasma sono utilizzati per lo studio di malattie cardiovascolari e per studi di farmacocinetica.

Le analisi metabolomiche si possono suddividere in due fasi sequenziali principali:

- 1) una fase sperimentale, basata su analisi effettuate con i metodi spettroscopici;
- 2) l'analisi dei dati e la loro interpretazione (inclusa la consultazione di apposite banche dati).

I principali metodi spettroscopici sono: la spettroscopia NMR e la spettrometria di massa (*Mass Spectrometry*, MS) (16, 17).

La spettroscopia NMR è una tecnica non invasiva (applicabile anche al paziente), non distruttiva, poco sensibile (sensibile fino a concentrazioni micromolari, μM), non selettiva (si osservano tutte le molecole possedenti il nucleo di osservazione) e multinucleare. È una tecnica analitica quantitativa, secondo la quale l'intensità del segnale è proporzionale alla concentrazione del metabolita (18).

La spettrometria MS è la tecnica maggiormente utilizzata per le analisi metabolomiche. È una tecnica molto più sensibile rispetto alla spettroscopia NMR (capace di misurare concentrazioni femtomolari, fM). Gli analiti possono ionizzarsi diventando carichi di segno positivo o negativo e gli ioni sono separati secondo il rapporto massa/carica (m/z). Spesso questa tecnica è associata a metodi di separazione cromatografica come la gascromatografia associata alla spettrometria di massa (GC-MS) e la cromatografia liquida associata alla spettrometria di massa (LC-MS) (19).

Analogamente a quanto avviene per altre scienze omiche anche nella metabolomica si genera un'enorme quantità di dati, per cui l'analisi bioinformatica e statistica sono parti cruciali per elaborare le informazioni. In questo modo si creano dei modelli multidimensionali in grado di interpretare le interazioni all'interno del sistema e tra i vari sistemi in studio (20). Inoltre l'analisi metabolomica può focalizzarsi sull'analisi qualitativa e quantitativa di un singolo analita (*targeted analysis*), e/o un gruppo di metaboliti appartenenti ad una specifica via metabolica (*metabolite profiling*). Oltre a queste analisi generalmente ipotesi-guidate, la metabolomica valuta il maggior numero possibile di metaboliti per l'identificazione di una "firma metabolica" associata ad una determinata condizione fisiopatologica. Una volta identificato il pattern specifico, si procede con l'identificazione strutturale dei metaboliti rilevanti (cioè caratteristici di quella particolare condizione fisiopatologica) e quindi l'individuazione di un possibile marcatore biologico. Tra i più grandi vantaggi di questo tipo di approccio a priori non guidato da ipotesi vi è la possibilità di identificare marcatori biologici inattesi se non addirittura sconosciuti, che potrebbero rappresentare la base per lo sviluppo di nuovi bersagli molecolari per nuove terapie. Le tecniche di analisi statistica multivariata maggiormente utilizzate per la metabolomica si dividono in metodi che utilizzano dei modelli non noti a priori (*unsupervised*) che forniscono una

visione oggettiva dell'informazione e metodi che utilizzano dei modelli noti a priori (*supervised*) che guidano l'analisi.

La metabolomica è una tecnologia complessa e richiede non solo tecnologie analitiche avanzate, ma la stretta collaborazione di esperti nel campo analitico, bioinformatico e statistico. Nonostante l'individuazione e pubblicazione di 7900 molecole su *Human Metabolome DataBase* (HMDB, l'unico database ufficiale del metaboloma umano), l'intero metaboloma non è stato ancora mappato completamente e non si conosce ancora il numero esatto dei suoi componenti (21).

Metabolomica nella ricerca oncologica

Le applicazioni della metabolomica nella medicina sono numerose, a partire dagli studi di *screening* neonatali per l'individuazione di disordini metabolici sino a patologie legate all'invecchiamento. Un campo molto promettente di applicazione della metabolomica è la ricerca oncologica. La metabolomica si sta rivelando molto utile sia nella diagnosi che nella identificazione di nuovi bersagli molecolari per le terapie biologiche.

Il cancro è una delle malattie più devastanti e con una elevata mortalità. Numerosi studi hanno evidenziato che i tessuti e in particolare le cellule tumorali presentano un metabolismo alterato rispetto alla corrispondente parte non tumorale. In particolare in molti tumori è stata osservata una riprogrammazione metabolica, tale da permettere alle cellule tumorali un utilizzo flessibile di vie metaboliche alternative a seconda delle loro esigenze (22-24). La dipendenza delle cellule tumorali dal glucosio è nota già dagli inizi del 20° secolo dagli studi di Warburg, in cui era stato osservato che le cellule tumorali utilizzano maggiormente il metabolismo anaerobico come fonte energetica (glicolisi) anche in presenza di livelli fisiologici di ossigeno (22). Oltre al glucosio, la glutammina e gli amminoacidi non essenziali, come serina, prolina e arginina svolgono un ruolo importante nella crescita tumorale. Inoltre, vi sono tumori portatori di mutazioni in geni che codificano enzimi metabolici, i cui prodotti, denominati "oncometaboliti", possono raggiungere livelli elevati come il 2-idrossiglutarato nel glioma, e sulla base di questi, determinare una differente prognosi (25-27).

La metabolomica in campo oncologico è molto utile nella identificazione di nuovi biomarcatori, di traccianti metabolici e di bersagli molecolari. Ad esempio, la sarcosina, derivato N-metilico della glicina, è stata proposta come un possibile biomarcatore precoce per i tumori più aggressivi della prostata (28). Inoltre, sono stati sviluppati traccianti di nuova generazione per PET quali 18-fluoro-(F)-timidina, 11-Carbonio-(C)-acetato, 11C-metionina e 18F-colina, oltre al più utilizzato 18F-deossiglucosio (29). Alcuni farmaci antitumorali sono noti come farmaci antimetaboliti (anti-purine, anti-pirimidine e antagonisti dell'acido folico), che bloccano il metabolismo degli acidi nucleici (DNA e RNA), e sono utilizzati da anni nelle terapie oncologiche.

Nuove strategie antitumorali possono sfruttare bersagli molecolari che interferiscono con la disponibilità di specifici metaboliti per esempio con l'uso della lonidamina (un farmaco in grado di ridurre la glicolisi) o con il riposizionamento di farmaci non tumorali in nuovi protocolli anti tumorali per esempio le statine e la metformina (utilizzati, rispettivamente, contro il metabolismo dei lipidi e del glucosio in patologie non tumorali).

Nell'ambito dei biomarcatori, alterazioni specifiche dei profili metabolici di derivati acquosi del ciclo della fosfatidilcolina (PtdCho), rivelate con tecniche di *imaging* molecolare *in vitro* e *in vivo*, potrebbero rappresentare nuovi marcatori di diagnosi, prognosi e predizione della risposta a trattamenti antitumorali (30, 31). A tale proposito, il nostro gruppo presso l'Istituto Superiore di Sanità ha partecipato attivamente a questo percorso di ricerca traslazionale dalla cellula al

paziente, con studi di imaging molecolare e cellulare principalmente focalizzati al ciclo della PtdCho e al ruolo funzionale di enzimi in esso coinvolti in modelli di carcinoma dell'ovaio. I risultati ottenuti hanno evidenziato un alterato metabolismo della PtdCho durante la progressione tumorale del carcinoma ovarico, in linee cellulari cresciute sia *in vitro* che in ascite di topo *in vivo* (32-35). In particolare è stato osservato un accumulo di metaboliti acquosi contenenti colina (tCho, dovuti principalmente ad un aumento di fosfocolina, PCho) in linee umane di carcinoma ovarico a confronto con cellule epiteliali non tumorali della superficie dell'ovaio. Le cause molecolari dell'accumulo di PCho nelle cellule di carcinoma ovarico sono dovute principalmente ad un'attivazione delle vie cataboliche del ciclo della PtdCho (fosfolipasi C), insieme alla via di sintesi mediata dalla colina chinasi. L'inibizione della colina chinasi e di fosfolipasi C specifica per PtdCho hanno determinato una riduzione della crescita tumorale *in vitro* e *in vivo* in modelli sperimentali (32-36). Inoltre l'uso di approcci multidisciplinari che comprendono metodi di *imaging* e spettroscopia mediante NMR (*imaging*, MRI e *magnetic resonance spectroscopy*, MRS) *in vivo* su modelli preclinici idonei hanno contribuito alla comprensione dei meccanismi molecolari di progressione tumorale e di risposta alla terapia (34, 35). Questi risultati hanno fornito le basi per uno studio pilota presso il Policlinico San Donato di Milano in cui il segnale dei metaboliti contenenti colina ha permesso di discriminare con altissima sensibilità e specificità le pazienti affette da carcinoma dell'ovaio rispetto a donne non affette (37, 38). Queste evidenze potrebbero fornire le basi sia per lo sviluppo di metodi clinici non invasivi per la diagnosi e il *follow-up* della risposta a trattamenti farmacologici che per la possibile progettazione futura di terapie antitumorali basate su nuovi target metabolici per questa neoplasia.

Conclusioni

La metabolomica, anche se relativamente giovane, risulta di interesse emergente nella ricerca preclinica e clinica. Ci sono ancora limiti a diversi livelli. Non vi è ancora un approccio tecnologico in grado di misurare simultaneamente l'intero metaboloma. Vi sono ancora limiti nella standardizzazione dei protocolli quantitativi (dalla raccolta e conservazione del campione al suo frazionamento e analisi) rendendo complessi la comparazione di studi indipendenti. Nonostante si sia avviato un progetto sull'identificazione dell'intero metaboloma umano chiamato *human metabolome* sono necessari ancora molti studi per l'integrazione di una banca dati dei metaboliti. Inoltre, l'analisi bioinformatica, l'interpretazione dei dati e la traduzione dei risultati in un significato biologicamente utile richiede approcci di validazione funzionale e studi clinici a lungo termine.

Nonostante questi limiti la metabolomica, però, ha permesso di identificare alcuni possibili biomarcatori, di comprendere meccanismi molecolari, individuare nuovi bersagli molecolari, e sviluppare traccianti metabolici per studi di *imaging* funzionale. Così, nonostante i numerosi ostacoli, il crescente utilizzo della metabolomica nella ricerca clinica potrebbe presto trasformare questa tecnologia innovativa in uno dei più potenti strumenti per l'identificazione, il monitoraggio e il trattamento di numerose patologie.

Bibliografia

1. Kell DB, Oliver SG. The metabolome 18 years on: a concept comes of age. *Metabolomics* 2016;12(9):148.
2. Beger RD, Dunn W, Schmidt MA, Gross SS, Kirwan JA, Cascante M, Brennan L, Wishart DS, Oresic M, Hankemeier T, Broadhurst DI, Lane AN, Suhre K, Kastenmüller G, Sumner SJ, Thiele I, Fiehn O,

- Kaddurah-Daouk R; for “Precision Medicine and Pharmacometabolomics Task Group”-Metabolomics Society Initiative. Metabolomics enables precision medicine: “A White Paper, Community Perspective”. *Metabolomics* 2016;12(10):149.
3. Karahalil B. Overview of systems biology and omics technologies. *Curr Med Chem* 2016;23(37):4221-30.
 4. Mamas M, Dunn WB, Neyses L, Goodacre R. The role of metabolites and metabolomics in clinically applicable biomarkers of disease. *Arch Toxicol* 2011;85(1):5-17.
 5. Nicholson JK, Lindon JC, Systems biology - Metabonomics. *Nature* 2008;455:1054-6.
 6. Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. Metabonomics’: understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica* 1999;29(11):1181-9.
 7. Fiehn O. Metabolomics--the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol Biol* 2002;48(1-2):155-71.
 8. van der Greef J, Stroobant P, van der Heijden R. The role of analytical sciences in medical systems biology. *Curr Opin Chem Biol* 2004;8(5):559-65.
 9. Fan TW, Lane AN. Applications of NMR spectroscopy to systems biochemistry. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc* 2016;92-93:18-53.
 10. Everett JR. From metabonomics to pharmacometabonomics: the role of metabolic profiling in personalized medicine. *Front Pharmacol* 2016;7:297.
 11. Olivares O, Däbritz JH, King A, Gottlieb E, Halsey C. Research into cancer metabolomics: Towards a clinical metamorphosis. *Semin Cell Dev Biol* 2015;43:52-64.
 12. Lin G, Chung YL. Current opportunities and challenges of magnetic resonance spectroscopy, positron emission tomography, and mass spectrometry imaging for mapping cancer metabolism *in vivo*. *Biomed Res Int* 2014;2014:625095.
 13. Bernini P, Bertini I, Luchinat C, Nincheri P, Staderini S, Turano P. Standard operating procedures for pre-analytical handling of blood and urine for metabolomic studies and biobanks. *J Biomol NMR* 2011;49(3-4):231-43.
 14. Yin P, Peter A, Franken H, Zhao X, Neukamm SS, Rosenbaum L, Lucio M, Zell A, Häring HU, Xu G, Lehmann R. Preanalytical aspects and sample quality assessment in metabolomics studies of human blood. *Clin Chem* 2013;59(5):833-45.
 15. Veneroni S, Dugo M, Daidone MG, Iorio E, Valeri B, Pincioli P, De Bortoli M, Marchesi E, Miodini P, Taverna E, Ricci A, Canevari S, Pelosi G, Bongarzone I. Applicability of under vacuum fresh tissue sealing and cooling to omics analysis of tumor tissues. *Biopreserv Biobank* 2016;14(6):480-90.
 16. Naz S, Moreira dos Santos DC, García A, Barbas C. Analytical protocols based on LC-MS, GC-MS and CE-MS for nontargeted metabolomics of biological tissues. *Bioanalysis* 2014;6(12):1657-77.
 17. Beckonert O, Keun HC, Ebbels TM, Bundy J, Holmes E, Lindon JC, Nicholson JK. Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. *Nat Protoc* 2007;2(11):2692-703.
 18. Markley JL, Brüschweiler R, Edison AS, Eghbalian HR, Powers R, Raftery D, Wishart DS. The future of NMR-based metabolomics. *Curr Opin Biotechnol* 2016;43:34-40.
 19. Emwas AH. The strengths and weaknesses of NMR spectroscopy and mass spectrometry with particular focus on metabolomics research. *Methods Mol Biol* 2015;1277:161-93.
 20. Yi L, Dong N, Yun Y, Deng B, Ren D, Liu S, Liang Y. Chemometric methods in data processing of mass spectrometry-based metabolomics: A review. *Anal Chim Acta* 2016;914:17-34.
 21. Wishart DS, Mandal R, Stanislaus A, Ramirez-Gaona M. Cancer metabolomics and the human metabolome database. *Metabolites* 2016;6(1).

22. Warburg O, Wind F, Negelein E. The metabolism of tumors in the body. *J. Gen. Physiol* 1927;8:519-30.
23. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 2009;324(5930):1029-33
24. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144(5):646-74.
25. Yoshida GJ. Metabolic reprogramming: the emerging concept and associated therapeutic strategies. *J Exp Clin Cancer Res* 2015;34:111.
26. Cairns RA, Harris IS, Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer* 2011;11(2):85-95.
27. Sciacovelli M, Frezza C. Oncometabolites: Unconventional triggers of oncogenic signalling cascades. *Free Radic Biol Med.* 2016;100:175-181.
28. Lima AR, Bastos Mde L, Carvalho M), Guedes de Pinho P. Biomarker discovery in human prostate cancer: an update in metabolomics studies. *Transl Oncol* 2016;4:357-70.
29. Challapalli A, Aboagye EO. Positron emission tomography imaging of tumor cell metabolism and application to therapy response monitoring. *Front Oncol* 2016;6:44.
30. Glunde K, Bhujwala ZM, Ronen SM. Choline metabolism in malignant transformation. *Nat Rev Cancer* 2011;11:835-48.
31. Podo F, Canevari S, Canese R, Pisanu ME, Ricci A, Iorio E. MR evaluation of response to targeted treatment in cancer cells. *NMR Biomed* 2011;24:648-72.
32. Iorio E, Mezzanzanica D, Alberti P, Spadaro F, Ramoni C, D'Ascenzo S, Millimaggi D, Pavan A, Dolo V, Canevari S, Podo F. Alterations of choline phospholipid metabolism in ovarian tumor progression. *Cancer Res.* 2005;65:9369-76.
33. Iorio E, Ricci A, Bagnoli M, Pisanu ME, Castellano G, Di Vito M, Venturini E, Glunde K, Bhujwala ZM, Mezzanzanica D, Canevari S, Podo F. Activation of phosphatidylcholine cycle enzymes in human epithelial ovarian cancer cells. *Cancer Res* 2010;70:2126-35.
34. Canese R, Pisanu ME, Mezzanzanica D, Ricci A, Paris L, Bagnoli M, Valeri B, Spada M, Venditti M, Cesolini A, Rodomonte A, Giannini M, Canevari S, Podo F, Iorio E. Characterization of *in vivo* ovarian cancer models by quantitative ¹H magnetic resonance spectroscopy and diffusion-weighted imaging. *NMR Biomed* 2012;25:632-642.
35. Pisanu ME, Ricci A, Paris L, Surrentino E, Liliac L, Bagnoli M, Canevari S, Mezzanzanica D, Podo F, Iorio E, Canese R. Monitoring response to cytostatic cisplatin in a HER2(+) ovary cancer model by MRI and *in vitro* and *in vivo* MR spectroscopy. *Br J Cancer* 2014;110:625-35.
36. Granata A, Nicoletti R, Perego P, Iorio E, Krishnamachary B, Benigni F, Ricci A, Podo F, Bhujwala ZM, Canevari S, Bagnoli M, Mezzanzanica D. Global metabolic profile identifies choline kinase alpha as a key regulator of glutathione-dependent antioxidant cell defense in ovarian carcinoma. *Oncotarget* 2015;6(13):11216-30.
37. Podo F, Sardanelli F, Iorio E, Canese R, Carpinelli G, Fausto A, Canevari S. Abnormal choline phospholipid metabolism in breast and ovary cancer: Molecular bases for noninvasive imaging approaches. *Curr Med Imaging Rev* 2007;3:123-37.
38. Esseridou A, Di Leo G, Sconfienza LM, Caldiera V, Raspagliesi F, Grijuela B, Grijuela B, Hanozet F, Podo F, Sardanelli F. *In vivo* detection of choline in ovarian tumors using 3D magnetic resonance spectroscopy. *Invest Radiol* 2011;46:377-82.