



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

**Estudo *in vitro* do efeito isolado ou sinérgico do Ácido
Anacárdico no Câncer de Ovário e Pâncreas**

Juliana Trindade Caleffi

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências, Campus de Botucatu, UNESP,
para obtenção do título de Mestre no Programa
de Pós-Graduação em Biologia Geral e
Aplicada.*

Orientadora: Profa. Dra. Flávia Karina Delella

BOTUCATU – SP

2021



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

**Estudo *in vitro* do efeito isolado ou sinérgico do Ácido
Anacárdico no Câncer de Ovário e Pâncreas**

Juliana Trindade Caleffi

Flávia Karina Delella

Wellerson Rodrigo Scarano

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências, Campus de Botucatu, UNESP,
para obtenção do título de Mestre no Programa
de Pós-Graduação em Biologia Geral e
Aplicada.*

Orientadora: Profa. Dra. Flávia Karina Delella

BOTUCATU – SP

2021

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Caleffi, Juliana Trindade.

Estudo in vitro do efeito isolado ou sinérgico do ácido anacárdico no câncer de ovário e pâncreas / Juliana Trindade Caleffi. - Botucatu, 2021

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Flávia Karina Delella

Coorientador: Wellerson Rodrigo Scarano

Capes: 20601000

1. Ovários - Câncer. 2. Pâncreas - Câncer. 3. Técnicas de cultura de Células. 4. Técnicas in vitro.

Palavras-chave: Ácido anacárdico; Câncer de ovário; Câncer de pâncreas; Cultura celular 3D magnética; Secretoma.

Dedicatória

Dedico este trabalho a minha vó materna, Maria Paulina Louvison Trindade, que durante meu mestrado acabou indo para junto de Deus, alegrando ainda mais o céu com seus encantos, nos deixando morrendo de saudades. Ela que sempre, mesmo sem entender nada do que eu fazia (e olha que eu tentei explicar muitas vezes), tinha orgulho em contar para as pessoas que sua primeira neta fazia faculdade na UNESP, e que iria descobrir a cura do câncer. É vó, quem sabe um dia eu chego lá! Obrigada por todo amor, por toda a oração e por todo abraço que nos últimos meses ficaram apenas na memória. Te dedico esse trabalho, pois assim como você, ele saiu de muita luta, garra, dedicação, persistência, confiança e orgulho ao final!

Agradecimentos

Gostaria de começar agradecendo a pessoa que Fez e Faz tudo na minha vida se tornar possível. Obrigada Deus por sempre me mostrar que a vida se encontra nos pequenos detalhes, e que cada dia é um novo dia. Obrigada por me guiar nessa caminhada e por me prover de luz, mesmo em momentos de trevas. Sei que nunca vais me abandonar, e eu agradeço por sempre me guiar e me orientar nessa jornada que é a vida!

Agradeço a minha mãe, Eliane Trindade, meu pai, Mario Caleffi, minha madrastra, Sônia Isabel, meu padrasto, Guilherme Paccola, e toda a minha família, por todos os ensinamentos e palavras de sabedoria quando precisei. Além de todo colo, abraço, amor e carinho que foram alimentos para a alma e pro coração durante todo esse processo, que foi marcado por uma pandemia e fez tudo se tornar mais difícil. Obrigada por toda a paciência que tiveram comigo, e por entenderem os momentos que estive longe e as comemorações que não consegui participar. Sem o apoio e amparo de vocês, essa caminhada teria sido muito mais difícil!

A minha orientadora por toda a persistência, ensinamento, dedicação e paciência que teve comigo durante todo esse tempo. Só tenho a te agradecer e admirar pela mulher e pesquisadora que és. Você com seu jeito gentil e sábio de nos conduzir, nos fez aprender que a caminhada sozinha é muito mais difícil e triste do que quando podemos ter alguém com quem compartilhar nossos desafios e vitórias. E cada vitória nossa foi sua, e vice e versa. Sem você, nada disso teria sido possível, obrigada!

A Mirian Caroline, que foi mais que uma parceira de laboratório, ela foi amiga, confidente e irmã. Sem ela esse mestrado não teria sido o mesmo! Obrigada por toda a ajuda, por toda conversa, por toda dedicação com minhas análises, por toda ideia que foi muito bem vinda e toda pergunta que sempre gerava um *insight*. Você com certeza é uma pessoa que Deus colocou no meu caminho e eu só tenho a agradecer. Você ainda vai chegar lá amiga, e eu não tenho dúvidas de que estarei ao seu lado para te aplaudir de pé!

Ao Gabriel Caxali, por todos os áudios, conversas e preocupações em me ajudar com as análises e sempre se fazer presente. Você também foi muito mais que um parceiro na equipe, foi um amigo que vou levar pro resto da vida.

Queria agradecer também ao grupo do laboratório, em especial a Carol Barquilha, Caio Cesar, Sergio Alexandre, Flávia Bessi, Matheus Fioretto, Luiz Frediane, Luiza Corrêa e Nilton Santos, por sempre dedicarem um pouco do tempo de vocês para me ajudar. Obrigada por todos os ensinamentos, pelos conselhos, pela companhia e

habilidades de cada um. Vocês contribuíram muito para o meu crescimento pessoal e profissional, e só fez crescer ainda mais minha admiração por todos. Obrigada!

Ao meu ex-companheiro Rafael Juvêncio, por ter sempre acreditado em mim, me apoiado em todas as minhas decisões, e por sempre ter me incentivado a seguir em frente. Você precisou ter muita paciência comigo e eu nunca vou esquecer em como você foi importante nesse momento da minha vida.

As minhas amigas Ana Denadai e Jéssyca Borro, que são minhas irmãs e confidentes em Botucatu. Vocês foram essenciais para essa minha caminhada. Obrigada pelos abraços, pelas risadas, pelo carinho, pelo apoio, pelos conselhos e por toda a amizade. Vocês fizeram e fazem tudo se tornar mais leve.

A minha família de Botucatu, Amanda Rosa e Luisa Suter. Vocês são a família que a vida me apresentou e eu só tenho a agradecer por fazerem parte da minha vida.

A Amanda Vendrami e ao Samuel Gameiro que entraram na minha vida agora ao finalzinho do mestrado, mas que já se tornaram muito especiais e me ajudaram muito com todo o apoio, conselho, sorrisos e abraços que fizeram esse fim se tornar mais alegre e feliz.

A minha banca de qualificação, Flávia Delella, Wellerson Scarano e Glaura Fernandes pelas sugestões e contribuições para este trabalho, e a Paula Freie e Carlos Eduardo por terem aceitado fazer parte da minha banca de defesa.

E finalizo agradecendo a CAPES pela concessão de bolsa. Sem essa ajuda financeira eu não seria capaz de realizar meus estudos.

Homenagem ao orientador

Não tem como começar por outra palavra a não ser **GRATIDÃO**. Gratidão por ter me aceitado fazer parte do grupo lá no meu Bacharel, por ter confiado em mim e acreditado que eu era capaz. Eu sempre te disse isso e volto a repetir: Você é a minha mãe do Lab, e como mãe me acolheu, me confortou, me incentivou, me ensinou, deu seus puxões de orelha, mas sempre fez tudo pensando no meu crescimento pessoal e profissional. Você me inspira como mulher, mãe, pesquisadora e professora. Você é uma mulher muito especial, forte e batalhadora que eu tive a honra de conhecer. Graças ao seu amor pela cultura celular, hoje eu me encontrei no que eu mais gosto fazer e vou levar pro resto da minha vida! Sei que esses dois anos não foram fáceis, mas junto deles veio algo maravilhoso que foi o Rafael e o Enrico. Só tenho a te agradecer por ser essa orientadora extraordinária e essa pessoa maravilhosa. Que orgulho poder ter feito parte da sua história como pesquisadora! Obrigada por TUDO! De verdade.

“Você não precisa que ninguém te ensine a voar, está no seu espírito. Mas é bom ter quem nos lembre de que temos asas.”

Ryane Leão

Epígrafes

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

“Você nunca sabe que resultados virão da sua ação. Mas se você não fizer nada, não existirão resultados.”

Mahatma Gandhi

“A maior recompensa pelo trabalho não é o que a pessoa ganha, é o que ela se torna através dele.”

John Ruskin

SUMÁRIO

Resumo.....	1
Abstract.....	2
Introdução	3
Câncer de Ovário	4
Câncer de Pâncreas.....	7
Agente Antineoplásico - Paclitaxel	11
Ácido Anacárdico.....	14
Objetivos Gerais.....	17
Capítulo 1.....	27
Capítulo 2.....	51
Capítulo 3.....	66

RESUMO

O câncer de ovário e de pâncreas são neoplasias bastante letais, que se encontram dentre os 10 tipos de câncer que mais causam morte no mundo. Isso deve-se aos seus sintomas serem muitas vezes ignorados ou identificados como sinais de outras doenças, causando atrasos na detecção e sendo descobertos na maioria dos casos já em estágios avançados, levando a morte precoce dos pacientes. Compreender melhor o funcionamento de processos fundamentais na evolução dessas doenças, como vias de proliferação e morte, processos de resistência, de inflamação, migração e invasão celular, podem auxiliar na cura ou no tratamento. Por isso, a busca por medicamentos, novos tratamentos e a descoberta de biomarcadores (como possíveis alvos terapêuticos), se fazem necessário. Pensando nisso, o nosso projeto seguiu por diferentes abordagens de estudo, buscando métodos inovadores e eficazes, como a análise de bioinformática com biomarcadores de alta pureza, encontrados no secretoma de câncer de pâncreas, análises laboratoriais *in vitro* de viabilidade e morte celular em células tumorais ovarianas, cultivadas em cultura tridimensional e tratadas com a combinação de quimioterápico de primeira linha e o composto natural Ácido Anacárdico, além de buscar entender e apresentar a técnica tridimensional usada no estudo em uma revisão pioneira sobre cultura celular 3D magnética.

Palavras chave: ácido anacárdico, câncer de ovário, câncer de pâncreas, secretoma, cultura celular 3D magnética.

ABSTRACT

Ovarian and pancreatic cancer are very lethal neoplasms, which are among the 10 most lethal cancers in the world. This is due to the fact that their symptoms are often ignored or identified as signs of other diseases, causing delays in detection and being discovered in most cases already in advanced stages, leading to the early death of patients. To better understand the functioning of fundamental processes in the evolution of these diseases, such as proliferation and death pathways, processes of resistance, inflammation, migration and cellular invasion can help in the cure or treatment. Therefore, the search for drugs, new treatments and the discovery of biomarkers (as possible therapeutic targets), are necessary. With this in mind, our project followed different research approaches, looking for innovative and effective methods such as bioinformatics analysis with high purity biomarkers found in the pancreatic cancer secretome, *in vitro* laboratory viability analyzes and cell death in ovarian tumor cells cultured in three-dimensional model and treated with the combination of first-line chemotherapy and the natural compound Anacardic Acid, in addition to seeking to understand and present the three-dimensional technique used in the study in a pioneering review of 3D magnetic cell culture.

Keywords: anacardic acid, ovarian cancer, pancreatic cancer, secretome, 3D magnetic cell culture.

Introdução

Dentre todas as causas de morte do mundo, o câncer é responsável por mais de 45% delas (Who, 2017), sendo a principal causa de morte nos países desenvolvidos e a segunda principal causa de morte nos países em desenvolvimento. Nos Estados Unidos, para o ano de 2020, foi projetado que ocorressem 1.806.590 novos casos de câncer e 606.520 mortes por esta doença até o final do ano. Para os homens, estimou-se 893.660 novos casos e 912.930 em mulheres (Siegel et al., 2020). Neste país, os cânceres que mais levam a morte nos homens respectivamente são: pulmão e brônquios, próstata, cólon e reto e pâncreas. Enquanto que nas mulheres são: pulmão e brônquios, mama, cólon e reto, pâncreas e ovário (Siegel et al., 2020).

No Brasil, para os anos de 2018 e 2019, o Instituto Nacional de Câncer (INCA), havia estimado a ocorrência de 600 mil casos novos para cada ano no país (INCA, 2017). Para o ano de 2020, foi estimado 309.750 novos casos de câncer em homens e 316.280 em mulheres (INCA, 2020).

De acordo com os dados do registro do câncer no Brasil (INCA, 2020), os tumores mais frequentes no sexo masculino são: traqueia, brônquios e pulmões, próstata, colón e reto e estômago, enquanto que no sexo feminino destacam-se os tumores de: mama, traqueia, brônquios e pulmões, colón e reto e colo do útero.

Na luta contra o câncer, a resistência aos medicamentos continua a ser o principal fator limitante para alcançar a cura (Vasan et al., 2019; Sarmiento-Ribeiro et al., 2019). Mesmo com melhora significativa alcançada na sobrevida global dos pacientes submetidos às terapias, a resistência aos medicamentos antineoplásicos continua sendo um obstáculo (Raz et al., 2016; Vasan et al., 2019; Sarmiento-Ribeiro et al., 2019). Muitos dos pacientes apresentam quimiorresistência intrínseca desde o início da terapia ou após respostas iniciais e ciclos de tratamento repetidos com medicamentos, resultando na progressão da doença e letalidade. A resistência adquirida está principalmente relacionada ao fato de que, embora a maioria das células malignas no tumor possa conter a mutação direcionada, uma série de subclones tumorais abrigam alterações genéticas pré-existentes ou, após a exposição à droga, adquirem novas mutações, apoiando sua sobrevivência e proliferação, tornando-se assim resistente ao(s) medicamento(s) (Burrell et al., 2014; Hata et al., 2016; Vasan et al., 2019; Sarmiento-Ribeiro et al., 2019).

Por isso, o uso de medicamentos combinados, ou o sinergismo junto a agentes naturais, vem sendo a nova ferramenta para tentar otimizar os antineoplásicos que se

encontram em uso na área médica, na tentativa de otimizar o tratamento e diminuir a taxa de mortalidade desses pacientes (Rege et al., 2018; Kushwah et al., 2018).

Câncer de Ovário

O câncer de ovário (CO) é considerado uma das neoplasias malignas mais frequentemente diagnosticadas na ginecologia, sendo mundialmente a quinta doença mais mortal, e a décima quando se consideram ambos os sexos (Ghoneum et al., 2018; Siegel et al., 2019). No Brasil, segundo o INCA, a estimativa de novos casos no ano de 2020 para este câncer aumentou em 3%, sendo considerado o sétimo tipo de câncer mais incidente no país.

O CO deriva da transformação maligna do epitélio da superfície ovariana, que é contígua ao mesotélio peritoneal (Cannistra, 2004; Ottevanger, 2017). Sua classificação baseada na histologia se deve à morfologia das células tumorais. Existem quatro tipos principais de tumores epiteliais de ovário: células serosas, endometrioides, mucinosas e claras (Seidman et al., 2004; Ferreira et al., 2012; Kaldawy et al., 2016; Ottevanger, 2017) (Figura 1). Esta atribuição é dada baseando-se na semelhança das células cancerígenas com as células normais que revestem os diferentes órgãos do trato genital feminino. Independentemente do tipo histológico, os tumores ovarianos podem ser subdivididos em tumores benignos, malignos limítrofes (ou tumores de baixo potencial maligno) e malignos (Fernandes et al., 2003; Kaldawy et al., 2016).

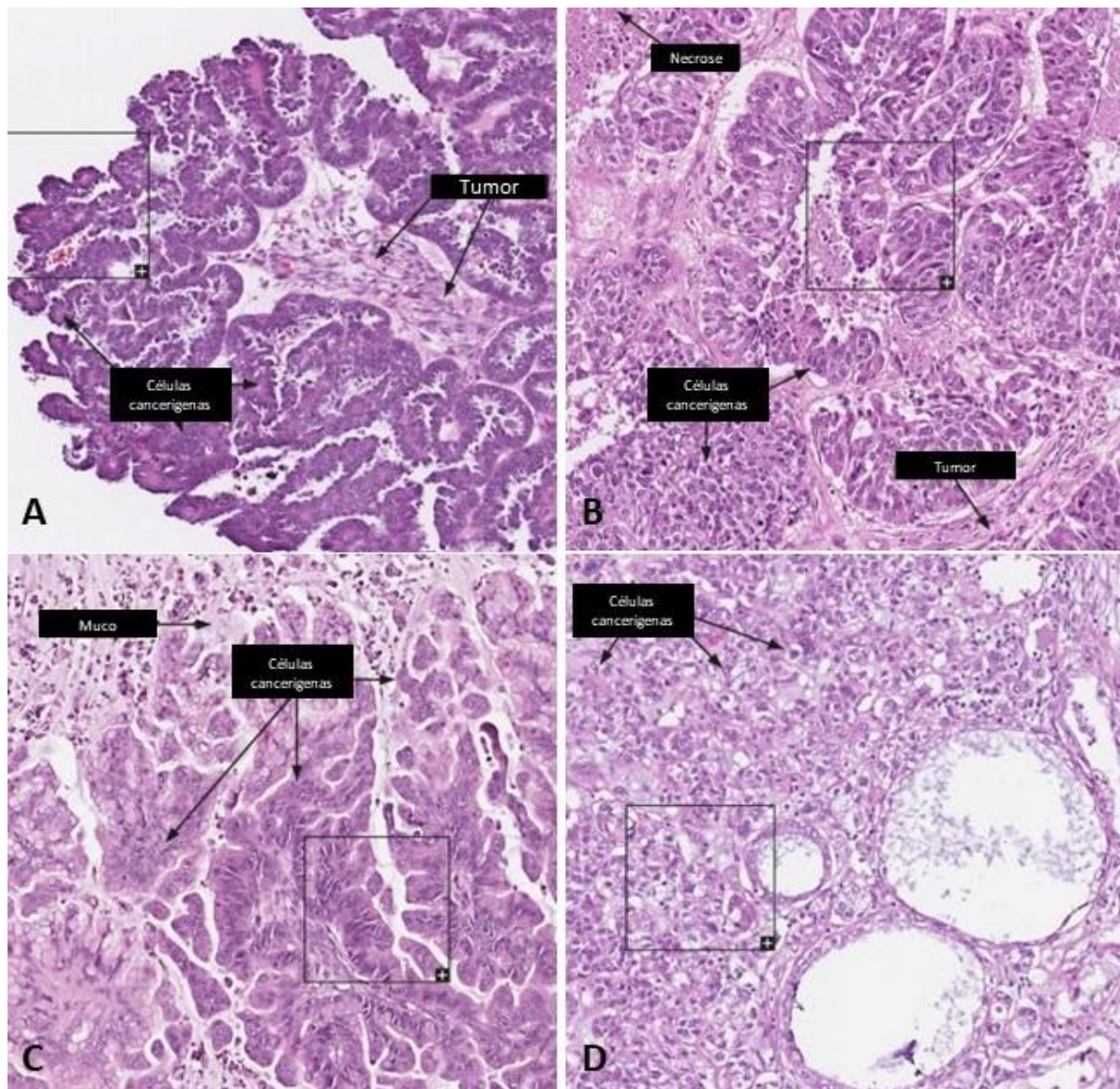


Figura 1. Tipos de câncer de ovário. **(A)** Tumor epitelial de células serosas. **(B)** Tumor epitelial de células de células endometrioides. **(C)** Tumor epitelial de células mucinosas. **(D)** Tumor epitelial de células claras. Imagem modificada do site THE HUMAN PROTEINS ATLAS, 2020.

Segundo Walker (2015) e Chien (2017), o uso dos contraceptivos orais em mulheres de baixo a médio risco, diminui em 40% a 50% as chances de desenvolver CO. Quanto maior o tempo de uso, maior o benefício e a redução dos riscos, além de ser um método não invasivo. Outro fator que também demonstrou diminuir os riscos de CO foi a primeira gravidez acontecer com menos de 25 anos (Jayson et al., 2014).

A partir disso, alguns estudos epidemiológicos apontaram os principais fatores de risco para mulheres com CO, sendo o fator genético um dos mais importantes (Cannistra, 2004; La Vecchia, 2017; Stewart et al., 2019). A nuliparidade (não ter filhos) também está associada a um risco aumentado desta doença, assim como a falta de realizar a amamentação após a gestação (Cannistra, 2004; La Vecchia, 2017; Stewart et al., 2019).

A influência das idades da menarca (primeira menstruação) e da menopausa parecem incertas na literatura.

Os sintomas por trás desta doença são considerados inespecíficos, e na maioria das vezes em estágio inicial são assintomáticos. É relatado pelas pacientes desconforto ou plenitude abdominal, dispepsia (dificuldade de digestão), saciedade precoce ou inchaço, como resultado do aumento da pressão abdominal (Cannistra, 2004; Liu et al., 2018; Stewart et al., 2019). Porém, esses sintomas são propensos a serem identificados e diagnosticados imprecisamente como sinais de outras doenças, causando atrasos na detecção (Gaitskell et al., 2011; Stewart et al., 2019). Além disso, muitas mulheres não se atentam a esses sintomas e não procuram a ajuda médica com antecedência, acarretando consequentemente na identificação de 40% a 50% das pacientes já em estágios avançados (Liu et al., 2018; Stewart et al., 2019).

O diagnóstico tardio tende a levar a uma baixa taxa de sobrevivência entre as mulheres com CO e o prognóstico para estas mulheres está diretamente relacionado ao estágio da doença no momento do diagnóstico (Jayson et al., 2014; Chien & Poole, 2017). Aquelas diagnosticadas em estágio inicial têm taxa de sobrevida em 5 anos de 90% (Vargas, 2014; Stewart et al., 2019). Nas que sofrem de doença regional (o que significa que a doença se espalhou para os tecidos adjacentes), as taxas de sobrevida em 5 anos caem para cerca de 80%, e 25% naquelas com doença metastática (Vargas, 2014; Stewart et al., 2019). Outra razão para essa incidência é que, embora muitas pacientes alcancem uma remissão clínica completa após a terapia primária, a doença se repete em 70% dos casos, levando muitas vezes à resistência dos medicamentos e tratamentos (Chiou et al., 2003; Heintz et al., 2006; Ottevanger, 2017).

Na última década, o tratamento padrão para mulheres com CO foram as cirurgias citorredutoras e a quimioterapia baseada em platina (Rojas et al., 2016; Kim et al., 2017). Os análogos da platina, como a Carboplatina e a Cisplatina, são os agentes considerados mais ativos para essa doença. Seu tratamento se dá através da formação de ligações cruzadas com o DNA que conseguem gerar uma lesão a nível molecular (Cannistra, 2004; Neves et al., 2011). Adicionalmente, devido à grande eficácia do quimioterápico Paclitaxel, este se tornou rapidamente um dos tratamentos de quimioterapia de primeira linha para o CO (Slichenmyer et al., 1991; Hajek et al., 1996; Cella et al., 2003; Priyadarshini et al., 2012; Zhu et al., 2015). O Paclitaxel e Docetaxel, exercem os seus efeitos citotóxicos através de um mecanismo de ação único, envolvendo a ligação e a estabilização dos polímeros de tubulina (Weaver, 2014).

Atualmente, o tratamento mais tradicional para tratar o CO é a combinação de quimioterapia e cirurgia, principalmente com estadiamento cirúrgico do tecido afetado, cirurgia de remoção de tumores e subsequente quimioterapia (Jayson et al., 2014; Stewart et al., 2019). Em alguns casos se faz necessária a diminuição do tamanho do tumor através de terapia neoadjuvante antes da cirurgia (Stewart et al., 2019). Como adjuvantes da terapia pós cirúrgica, as diretrizes atuais da *National Comprehensive Cancer Network*, recomendam os regimes intravenosos de taxano/carboplatina e doxorubicina lipossômica/carboplatina.

A combinação do antineoplásico Paclitaxel e a Carboplatina foi relatada como tão eficaz, que foi utilizada como terapia de primeira linha para tratar este câncer (Katsumata et al., 2009; Chan et al., 2016; Boyd & Muggia, 2018; Stewart et al., 2019), no qual pacientes com a doença já em estágios avançados, ao utilizarem destes fármacos, demonstraram melhor sobrevida global de quase 5 anos (Ozols et al., 2003). Porém, apesar da sobrevida global mediana melhorada em pacientes com a combinação destes medicamentos, a recaída ainda ocorre na maioria das pessoas com doença avançada (Heintz et al., 2006; Monk et al., 2009; Banno et al., 2014) e apenas 10% a 30% dessas pacientes têm a sobrevida estendida (Cannistra, 2004; Banno et al., 2014).

A resistência das células tumorais aos quimioterápicos, como por exemplo o Paclitaxel, tem sido o maior desafio no tratamento de pacientes com CO (An et al., 2017; Liu et al., 2018). O Paclitaxel é um medicamento natural usado como quimioterápico de primeira linha e não induz resistência cruzada aos fármacos à base de platina (Zhu et al., 2015; Liu et al., 2018). Sua inclusão a terapia de primeira linha reduz em 30% o risco de morte por CO (Piccart et al., 2000). Por essas razões, torna-se importante encontrar novas combinações que otimizem o seu papel antineoplásico, para que tal composto possa ser utilizado com maior eficácia contra o CO.

Câncer de Pâncreas

O Câncer de Pâncreas (CP) é um dos cânceres mais letais e continua sendo um grande problema de saúde do século XXI (Li et al., 2004). Estima-se que no ano de 2030, ele seja a segunda principal causa de morte por câncer no mundo, sendo atualmente a sétima (Jemal et al., 2009; Bray et al., 2018).

Na Europa, o CP representa o quarto câncer mais fatal em homens e mulheres, ficando abaixo apenas do câncer de pulmão, colorretal e próstata no sexo masculino, e mama, colorretal e pulmão no sexo feminino (Malvezzi et al., 2014). No Brasil, é

responsável por cerca de 2% de todos os tipos de câncer diagnosticados e 4% do total de mortes causadas por esta doença (INCA, 2018). Entre 2005 e 2012, sua incidência praticamente dobrou no Brasil; um total de 36.332 novos casos de CP foram registrados, sendo mais incidente em pacientes com mais de 70 anos e do sexo masculino (Ilic & Ilic, 2016; de Souza et al., 2017).

O pâncreas é uma glândula do sistema digestório, localizada na parte superior do abdome e atrás do estômago. Ele é responsável pela produção de enzimas que atuam na digestão dos alimentos, e pela produção de insulina, hormônio responsável pela diminuição do nível de glicose (açúcar) no sangue (Nobeschi et al., 2015).

Anatomicamente (Figura 2), este órgão é dividido em três partes principais: cabeça, corpo e cauda; Sendo a cabeça a região onde se desenvolve a maior parte das alterações malignas (aproximadamente 60% a 70%), (Greene et al., 2002; Ries et al., 2006; Nobeschi et al., 2015; INCA, 2018), seguido do corpo (15%) e cauda (15%) (McGuigan et al., 2018). O adenocarcinoma (que se origina no tecido glandular) é o tipo mais comum, correspondendo a 90% dos casos diagnosticados por CP (Nobeschi et al., 2015; INCA, 2018).

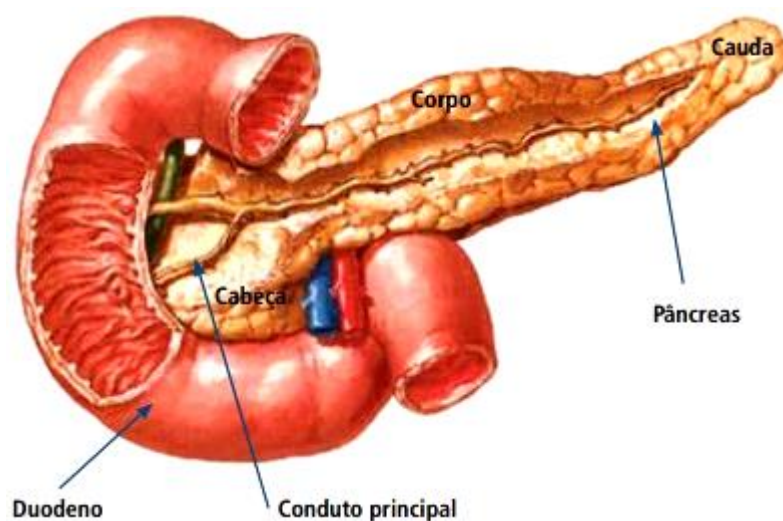


Figura 2. Imagem representativa do órgão pâncreas indicando a cabeça, corpo e cauda. Adaptado de *Atlas interactivo de anatomía humana* (Netter, 2003).

Dentre os fatores de risco estão à idade avançada (80% dos adenocarcinomas pancreáticos ocorrem entre os 60 e 80 anos), sexo e etnia (onde o gênero masculino e a etnia afro-descendente contribuem duas vezes mais para o surgimento desse tumor), histórico familiar e hereditariedade, tabagismo (sendo um dos principais colaboradores para o desenvolvimento de tumores pancreáticos, aumentando 5 vezes mais a probabilidade de adenocarcinoma), baixa ingestão de frutas e vegetais, preparação de

alimentos (grelhar ou carbonizar confere maior risco), diabetes, entre outros fatores (Schneider et al., 2003; Li et al., 2004; Vincent et al., 2011; Howlader et al., 2012; Nobeschi et al., 2015; Fogel et al., 2017).

O CP é um dos tumores que mais apresentam dificuldades para o diagnóstico precoce, pois, este tipo de câncer tende a permanecer por um longo período assintomático, devido ao pâncreas ser um órgão retroperitoneal, ou seja, um órgão que foi coberto por peritônio durante seu desenvolvimento embrionário, sendo a sua inervação sensitiva para dor escassa (Nobeschi et al., 2015). Desta forma, o CP geralmente desenvolve-se de forma imperceptível, sem causar sintomas, o que torna sua detecção precoce difícil e complicada.

Em sua fase inicial, o CP pode gerar desconforto muito parecido com o de uma simples má digestão, ou seja, como uma dor abdominal vaga, de pequena ou média intensidade, localizada na região epigástrica. Esse tipo de sintoma é um acontecimento comum, que muitas vezes é dado como sem importância clínica pelo paciente. Na maioria dos casos essa manifestação só começa a causar preocupação quando outros sinais ou sintomas aparecem, como fraqueza, tontura, diarreia, perda de peso e de apetite, e icterícia quando há obstrução do ducto colédoco (Solicia et al., 1995; Hidalgo, 2010; Pokorny et al., 2018).

Embora a triagem geral baseada na população não seja recomendada, várias campanhas de conscientização foram estabelecidas para destacar os sintomas muitas vezes vagos do CP e incentivar os indivíduos a procurarem atendimento médico mais cedo (McGuigan et al., 2018; Unger et al., 2018). O *International Cancer of the Pancreas Screening Consortium*, recomenda que indivíduos que atendam à definição de câncer pancreático familiar, que possuam câncer hereditário de mama e ovário, síndrome de Peutz-Jeghers, pancreatite hereditária, melanoma atípico familiar de múltiplas toupeiras ou câncer de colorretal hereditário sem polipose, sejam alvo potencial para a triagem (Unger et al., 2018). Se um cisto não suspeito for encontrado, os exames devem ser repetidos a cada 6 a 12 meses (Unger et al., 2018).

A tomografia computadorizada e a ressonância magnética apresentam potencial chance de detecção de tumores pancreáticos por conseguir evidenciar o órgão como um todo, demonstrando precisamente a localização e extensão dos tumores. Contudo, a biópsia pode ser indicada para o conhecimento das características específicas dos tumores pancreáticos (Nobeschi et al., 2015).

A ressecção cirúrgica é o único tratamento que oferece potencial cura para o CP, junto a adição de quimioterapia. Esses dois tratamentos vêm demonstrando melhoras nas

taxas de sobrevivência dos pacientes (McGuigan et al., 2018). Alguns resultados otimistas demonstraram melhora adicional na sobrevida com a administração de quimio-radioterapia no cenário neoadjuvante (McGuigan et al., 2018), mas ainda são necessários mais estudos sobre isso.

Apesar dos muitos esforços nos últimos 50 anos, abordagens terapêuticas convencionais, como cirurgia, radioterapia, quimioterapia ou combinações dessas, tiveram pouco impacto no curso da agressividade deste tumor (Li et al., 2004; WHO, 2017). A sobrevida global dentro de 5 anos entre os pacientes com este câncer é <5% (Jemal et al., 2010). Mesmo com muitos avanços nos esquemas quimioterápicos combinados, o prognóstico para o CP continua muito ruim, principalmente devido ao diagnóstico tardio, progressão local e metastática precoce e agressiva, e alta resistência à quimioterapia convencional e à radioterapia (Awasthi et al., 2013).

Na quimioterapia, a Gemcitabina é considerada um tratamento padrão para o CP, seus efeitos citotóxicos inibem principalmente a síntese de DNA e induzem a célula cancerígena à morte. Porém, seu uso é apenas modestamente eficaz, com sobrevida mediana de aproximadamente 6 meses em ensaios clínicos randomizados (Reni et al., 2005; Olive et al., 2009; Ma et al., 2019). Devido a isso, outros agentes ou combinações de medicamentos foram testados em pacientes com CP avançado e metastático (Cunningham et al., 2009; Colucci et al., 2010).

Os taxanos, como o Docetaxel e o Paclitaxel, demonstraram atividade antitumoral promissora em outros tumores sólidos, o que motivou testes em pacientes com CP (Whitehead et al., 1997; Okada et al., 1999). O Paclitaxel é um dos agentes antineoplásicos mais amplamente utilizados e eficazes com amplo espectro de atividade antitumoral. Este, quando ligado à albumina de nanopartículas (nab), vira uma formulação de 130 nm de partículas de Paclitaxel, solúvel em água, isenta de *cremophor* (solvente também conhecido como óleo de ricínio polietoxilado, responsável na maioria das vezes pelas reações de hipersensibilidade) (Gradishar et al., 2005; Ducreux et al., 2018). Este conjunto, denominado Nab-paclitaxel, foi inicialmente desenvolvido para evitar a toxicidade associada ao solvente *cremophor*, que seria necessário para solubilizar o Paclitaxel, eliminando a necessidade de pré-medicação com esteróides (Gradishar et al., 2005; Desai et al., 2006; Ducreux et al., 2018).

Com isso, Awasthi e colaboradores (2013) testaram o uso deste antineoplásico em diversas células neoplásicas malignas de CP e verificaram que embora a Gemcitabina ou o Docetaxel possam apresentar maior atividade citotóxica *in vitro*, o Nab-Paclitaxel foi o agente quimioterápico mais eficaz *in vivo*, provavelmente devido a seus efeitos no

estroma tumoral (Von Hoff et al., 2011). Em outros estudos, o uso do Paclitaxel, como quimioterapia de agente único para o CP, ou em uso combinado, demonstrou resultados pré-clínicos promissores, gerando sobrevida global mediana de 5 meses em pacientes com câncer avançado (Whitehead et al., 1997; Von Hoff et al., 2013; Ma et al., 2019).

Shetty e colaboradores (2020) relataram que o uso do Paclitaxel auxiliou e melhorou a eficácia do antitumoral Gemcitabina, quando utilizados juntos contra o CP. Yalcin e colaboradores (2020) mostraram o mesmo achado, dizendo que a combinação desses dois quimioterápicos promoveram melhor sobrevida global e livre de progressão do CP. Além disso, a terapia combinada resultou em aumento da taxa de resposta sem toxicidade, o que pode proporcionar um benefício significativo para avanços na pesquisa com este câncer.

Com esses achados, o Paclitaxel se torna um grande alvo quimioterápico que deve ser estudado, isolado ou em combinação a outras substâncias, para que seja possível encontrar mecanismos que levem ao aumento da sobrevida desses pacientes. Além disso, as limitações das atuais estratégias de tratamento do CP reforçam a necessidade de novos estudos utilizando a terapia combinada, a fim de alcançar possíveis avanços.

Agente Antineoplásico - Paclitaxel

Apesar das melhorias e inovações no tratamento de vários tipos de câncer nos últimos anos, a incidência dessa afecção continua a aumentar, fornecendo incentivo crescente ao desenvolvimento de novas abordagens preventivas (Lippman & Hawk, 2009).

O Paclitaxel (Figura 3) (também conhecido como Taxol) é um medicamento natural usado como agente quimioterápico para vários tipos de câncer, sendo primeira linha para o tratamento de câncer de ovário e de mama (Zhu et al., 2015; Kim et al., 2020).

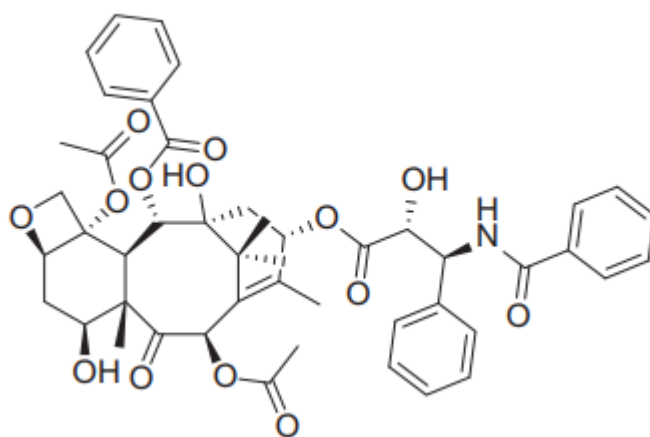


Figura 3. Estrutura molecular do quimioterápico Paclitaxel. Modificado de Alqahtani et al., 2019.

Este quimioterápico foi descoberto através de uma triagem de compostos naturais, na década de 1970, pelo *National Cancer Institute* (NCI) (Jones et al., 2005; Alqahtani et al., 2019), sendo um fármaco isolado da casca da árvore do Teixo do Pacífico (*Taxus brevifolia*) (Brandão et al., 2010) que, devido à sua escassez, (na qual sua única fonte na época era a *T. brevifolia*, e esta possuía crescimento lento) vários ensaios clínicos tiveram que ser parados e sua produção interrompida por mais ou menos uma década. Ainda assim, apesar da escassez do Taxol, um estudo clínico com CO prosseguiu e, finalmente concluiu que 30% dos pacientes com este câncer em estágio avançado responderam à terapia (McGuire et al., 1989). Depois disso, houve uma alta demanda pelo Taxol, que resultou em severa depleção de *T. brevifolia*.

Em 1988, estimou-se que o custo da fabricação do Taxol era 10 vezes o orçamento disponível para o projeto no NCI e as preocupações ambientais em relação às perspectivas de longo prazo para *T. brevifolia* eram grandes (Holton et al., 1994; Nicolaou et al., 1994; Alqahtani et al., 2019). Assim, em 1989, o NCI tomou a decisão de transferir o taxol para uma empresa farmacêutica particular para a sua futura comercialização. Foi assim que a *Bristol-Myers Squibb* (BMS) criou o novo nome genérico Paclitaxel (Walsh & Goodman, 2002) e solucionou a disponibilidade do fármaco (Wang et al., 2015; Alqahtani et al., 2019).

O NCI considerou o fármaco Paclitaxel, como um dos avanços mais significativos na quimioterapia (Singla et al., 2002). Este, além de possuir atividades antineoplásicas contra o câncer de ovário e de mama, é também conhecido por atuar contra outros tipos de tumores, incluindo câncer de próstata, câncer de pulmão, câncer de pâncreas, câncer de estômago entre outros, que são resistentes à terapia tradicional (Spencer et al., 1994; Carvalho, 2006; Ishigami et al., 2009; Journo-Gershfeld et al., 2012; Murono et al.,

2018), além de ser ativo também contra outras malignidades como a leucemia (Chang et al., 1992; Khanna et al., 2015).

Os resultados *in vitro* para os diferentes tipos de câncer, demonstraram excelente atividade antitumoral para o Paclitaxel (Brandão et al., 2010; Khanna et al., 2015). No ano de 1979 essa atividade foi reforçada com os estudos de Susan Horwitz, da Faculdade de Medicina Albert Einstein (Nova York, NY), que descobriu as propriedades estabilizadoras de microtúbulos do fármaco, mecanismo de ação nunca antes observado em outra substância (Souza, 2004; Weaver, 2014; Alves et al., 2018). Isso faz com que seu mecanismo de ação seja único, capaz de interromper o equilíbrio dinâmico dentro do sistema de microtúbulos e bloquear as células nas fases tardias G2 e M do ciclo celular, inibindo assim a replicação das células tumorais (Schiff et al., 1979; Shigemori & Kobayashi, 2004; Brandão et al., 2010; Weaver, 2014; Wang et al., 2015; Alqahtani et al., 2019). Isso ocorre, pois a droga se liga à tubulina e estabiliza os microtúbulos durante a divisão celular, portanto, o ciclo celular é interrompido no limite da metáfase-anáfase, já que a placa metafásica não se forma adequadamente com a estabilização dos microtúbulos (Rowinsky, 1977; Ringel & Horwitz, 1991; Weaver, 2014; Alves et al., 2018; Alqahtani et al., 2019).

O Paclitaxel é capaz de promover a morte seletiva das células cancerígenas sem prejudicar as células normais devido aos pontos de checagem mitóticos. Em uma célula normal, os pontos de checagem funcionam normalmente para que a célula pare de se dividir em caso de injúria, já a célula cancerígena, não responde corretamente à essas checagens e continua a se replicar. Os microtúbulos estabilizados são incompatíveis com a divisão celular, portanto essa célula sofre apoptose (Waters et al., 1998; Wang et al., 2015). Além disso, verificou-se que o Paclitaxel pode causar morte celular independentemente da ocorrência de mitose. Ele pode se ligar à proteína BCL-2, que regula a apoptose e induz a fosforilação, levando à morte celular (Alves et al., 2018). No entanto, a tendência deste fármaco de se ligar a esta proteína é menor do que de se ligar à tubulina (Alves et al., 2018).

Hoje, um dos principais obstáculos do tratamento convencional do câncer é a capacidade da célula tumoral desenvolver resistência à droga quimioterápica ao longo do tempo. Assim, a inovação na abordagem terapêutica que será responsável por sensibilizar as células tumorais resistentes continua a ser um dos maiores desafios (Bonavida et al., 2006). O uso do Paclitaxel para diversos tipos de câncer já é comprovado na literatura, porém, seu maior desafio é o surgimento de resistência por parte das células tumorais (Páez et al., 2012; Fernandes et al., 2015; An & Zhang, 2017; Pereira et al., 2018). Isso

gera um grande problema nos tratamentos clínicos, fazendo com que haja a necessidade de intervenção terapêutica complementar.

Ácido Anacárdico



Figura 4: Estrutura molecular do ácido anacárdico. Modificado de Hemshekhar et al., 2012.

tratamento de distúrbios fisiopatológicos mais graves, como o câncer, danos oxidativos, inflamações e obesidade (Hemshekhkar et al., 2012; Rege et al., 2018; Zafar et al., 2020).

Algumas pesquisas recentes, também indicam que o AA, além de inibir a proliferação de múltiplas células tumorais e induzir a apoptose, possui efeitos antioxidantes e antibióticos (Seong et al., 2014; Hamad & Mubofu, 2015; Tan et al., 2017; Zafar et al., 2020). Algumas lesões celulares que são promovidas por espécies reativas de oxigênio, também vêm sendo descritas como uma das principais causas do desenvolvimento e da progressão de diversas doenças. O AA previne efetivamente esses danos celulares induzidos por H_2O_2 , atuando como um importante antioxidante (Trevisan et al., 2006). Trevisan e colaboradores (2006) demonstraram que a capacidade antioxidante do AA relaciona-se mais com a inibição da geração de superóxido e xantina oxidase do que com a remoção de radicais hidroxila. Nesse sentido, o AA revela ser um composto importante para o tratamento e prevenção de doenças cujos danos fisiológicos induzem o estresse oxidativo, como distúrbios neurodegenerativos, incluindo déficits cognitivos que ocorrem durante o envelhecimento cerebral normal e no tratamento de doenças como Alzheimer e Parkinson.

Como antibiótico, os efeitos antimicrobianos do AA foram testados contra alguns tipos de bactérias responsáveis por infecções cutâneas e doenças respiratórias. O composto inibiu, por exemplo, o crescimento de *Propionibacterium acnes*, *Corynebacterium xerose* e *S. aureus* utilizando-se concentrações mínimas de 0.0015, 0.0062 e 0.025 mg/mL, respectivamente (Bouttier et al., 2002).

Já o papel antiangiogênico, antiproliferativo, próapoptótico, antimetastático, antiinflamatório e imunomodulatório do AA, pode ser visto pela primeira vez em uma pesquisa realizada por Sung e colaboradores (2008), que foi desenvolvida a partir da exposição de diferentes linhagens de câncer humano ao composto. Eles descreveram a ação do AA como um supressor de genes regulados pelo complexo proteico NF- κ B, genes esses que controlam proliferação (*CICLINA D1*, *CICLOOXIGENASE-2*), sobrevivência (*BCL-2*, *BCL-XL*, *cFLIP*, *SURVIVINA*), invasão (*MMP-9*, *ICAM-1*) e angiogênese (*VEGF*) do câncer.

Este papel antiangiogênico do AA foi investigado em detalhes em um estudo *in vitro* desenvolvido com cultura primária de células endoteliais de vasos sanguíneos de cordão umbilical (Wu et al., 2011). Os resultados revelaram que essa atividade antiangiogênica ocorre através do bloqueio, de maneira dependente de tempo e de concentração, da atividade das quinases SRC e FAK, resultando em ativação da proteína RHOA-GTPase e inativação das proteínas RAC1- e CDC42-GTPases.

O mecanismo molecular do potencial antimetastático do AA foi avaliado *in vitro*, em linhagem de células pouco metastáticas (MCF-7, células de câncer de mama) e altamente metastática (U87, células de glioma) (Shilpa et al., 2015). Os resultados mostraram que a exposição das células MCF-7 ao composto resultou na hiper expressão do marcador epitelial e-caderina com concomitante diminuição na expressão dos marcadores mesenquimais Twist e Snail, além de diminuir migração e invasão dessas células. Nas células U87, a exposição reduziu a fosforilação de MAP quinases, diminuiu expressão de *VEGF* e de *FLT-1* (gene que codifica o VEGFR1, receptor para o fator de crescimento endotelial vascular). Em resumo, esses achados são importantes na atuação do AA como um potente inibidor da transição epitélio-mesênquima através do bloqueio da via de sinalização do *VEGF*.

Nos processos de invasão celular, foram encontrados estudos que mostraram o efeito do AA nas MMP-2 e MMP-9 (Omanakuttan et al., 2012). Elas são metaloproteinases de matriz (MMPs) e desempenham um papel predominante na degradação da matriz extracelular (ECM) durante vários processos normais e patológicos, além de participarem na regulação do crescimento do tumor, ajudando na liberação de vários fatores essenciais para a proliferação celular (Westermarck et al., 1999). As MMPs 2 e 9, são conhecidas por desempenharem papéis-chave em várias condições patológicas. Níveis significativamente altos de MMP-2 e MMP-9 foram encontrados em pacientes com CO e câncer de colorretal (Lengyel et al., 2001; Tutton et al., 2003; Périgny et al., 2008). Este estudo de Omanakuttan e colaboradores (2012) demonstrou que o AA inibe diretamente a atividade catalítica da MMP-2 com a porção carboxilato. Além disso, a atividade da gelatinase também foi inibida após o tratamento com diferentes concentrações de AA, sendo estas consideradas biomarcadores potenciais para a terapia do câncer, uma vez que são mais expressas na maioria dos cânceres e desempenham um papel proeminente na promoção da progressão do mesmo (Nambiar et al., 2016).

Como podemos observar, a combinação de compostos naturais às drogas terapêuticas tradicionais vem sendo amplamente utilizada no tratamento de doenças como neoplasias malignas (van Vuuren & Viljoen, 2011; Quispe-Soto et al., 2016; Zhao et al., 2019). A prescrição de terapias múltiplas buscando o efeito sinérgico de dois ou mais compostos promove a atuação desses fármacos em vários alvos terapêuticos e aumenta a eficácia do medicamento comumente utilizado, evitando mecanismos de resistência ao mesmo (Jia et al., 2009; Wagner & Ulrich-Merzenich, 2009). Recentemente, resultados promissores têm sido descritos ilustrando o efeito sinérgico do AA combinado a agentes antineoplásicos.

Park e colaboradores (2018) mostraram que o AA aumentou a citotoxicidade dos quimioterápicos 5-Fluorouracil (5-FU) e Gemcitabina em linhagem de células de CP. Os autores evidenciam em seu estudo a grande promessa do AA como composto complementar no tratamento desse tipo de câncer. Em outro estudo, de Yao e colaboradores, o AA foi capaz de sensibilizar células tumorais prostáticas (DU-145 e PC-3) e otimizar o efeito da terapia de radiação, induzindo a diminuição na expressão das histonas da família H2AX, apoptose e inibindo o processo de invasão celular (Yao et al., 2015). Em um experimento utilizando nanotecnologia, o AA foi conjugado com o Paclitaxel em nanopartículas hidrofóbicas de gelatina para analisar a influência do AA na liberação e atuação do agente antineoplásico em células da linhagem tumoral de mama MCF-7 (Rege et al., 2018). As células tratadas com as nanopartículas contendo os dois compostos apresentaram maior taxa de apoptose e de citotoxicidade, quando comparado ao tratamento com nanopartículas contendo apenas Paclitaxel.

Sendo assim, o AA tem se tornado um composto de alto interesse médico nos últimos anos, principalmente devido às suas propriedades antitumorais evidenciadas em diversos tumores avaliados, como os tumores de pâncreas (Park et al., 2018), melanoma (Legut et al., 2014), mama (Schultz et al., 2010), pulmão (Seong et al., 2014), rim (Al-bataineh et al., 2016), entre outros, em que o composto suprimiu a angiogênese, resultando em redução dos tumores (Wu et al., 2011).

Objetivos Gerais

A partir dessas informações inicialmente apresentadas, este estudo buscou avaliar possíveis resultados quimiopreventivos do composto natural Ácido Anacárdico na progressão do CO e localizar possíveis biomarcadores do CP, afim de auxiliar futuramente na atualização de tratamentos para pacientes pré-dispostos ou que venham a desenvolver um dos cânceres estudados.

Referência da Introdução

- Alam-Escamilla D, Estrada-Muniz E, Solís-Villegas E, et al. 2015. Genotoxic and cytostatic effects of 6-pentadecyl salicylic anacardic acid in transformed cell lines and peripheral blood mononuclear cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 777: 43-53.
- Al-bataineh MM, Alzamora R, Ohmi K, Ho PY, Marciszyn AL, Gong F & Pastor-Soler NM. 2016. Aurora kinase A activates the vacuolar H⁺-ATPase (V-ATPase) in kidney carcinoma cells. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 310(11), F1216-F1228.
- Alqahtani FY, Aleanizy FS, El Tahir E, Alkahtani HM & AlQuadeib BT. 2019. Paclitaxel. In *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology* (Vol. 44, pp. 205-238). Academic Press.
- Alves RC, Fernandes RP, Eloy JO, Salgado HRN & Chorilli M. 2018. Characteristics, properties and analytical methods of paclitaxel: a review. *Critical reviews in analytical chemistry*, 48(2), 110-118.
- An J, Lv W, Zhang Y. 2017. LncRNA NEAT1 contributes to paclitaxel resistance of ovarian cancer cells by regulating ZEB1 expression via miR-194. *Onco Targets and therapy* 10: 5377.
- Awasthi N, Zhang C, Schwarz AM, Hinz S, Wang C, Williams NS. & Schwarz RE. 2013. Comparative benefits of Nab-paclitaxel over gemcitabine or polysorbate-based docetaxel in experimental pancreatic cancer. *Carcinogenesis*, 34(10), 2361-2369.
- Banno K, Yanokura M, Iida M, Adachi M, Nakamura K, Nogami Y. & Kataoka F. 2014. Application of microRNA in diagnosis and treatment of ovarian cancer. *BioMed research international*, 2014.
- Bonavida B, Khineche S, Huerta-Yepez S, Garbá'n H. 2006. Therapeutic potential of nitric oxide in cancer. *Drug Resist Updates* 9(3): 157–173
- Bouttier S, Fourniat J, Garofalo C, et al. 2002. β -Lactamase inhibitors from *Anacardium occidentale*. *Pharm Biol* 40: 231–234.
- Boyd LR & Muggia FM. 2018. Carboplatin/paclitaxel induction in ovarian Cancer: the finer points.
- Brandão HN, David JPD, Couto RD, Nascimento JA & David JM. 2010. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas.
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, & Jemal A. 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 68(6), 394-424.
- Burrell RA, Swanton C. 2014. Tumour heterogeneity and the evolution of polyclonal drug resistance. *Mol. Oncol.* 8,1095-1111.
- Cannistra SA. 2004. Cancer of the ovary. *New England Journal of Medicine* 351(24): 2519-2529.
- Carvalho JE. 2006. Multiciência: construindo a história dos produtos naturais.
- Cella D, Peterman A, Hudgens S, Webster K, & Socinski MA. 2003. Measuring the side effects of taxane therapy in oncology: The Functional Assessment of Cancer Therapy–taxane (FACT-taxane). *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 98(4), 822-831.
- Chan JK, Brady MF, Penson RT, Huang H, Birrer MJ, Walker JL. & Huh WK. 2016. Weekly vs. every-3-week paclitaxel and carboplatin for ovarian cancer. *New England Journal of Medicine*, 374(8), 738-748.
- Chang A, Kim K, Glick J, Anderson T, et al. 1992. Phase II study of taxol in patients with stage IV non-small cell lung cancer (NSCLC): the Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) results. In *Proc Am Soc Clin Oncol* 11: 293.

- Chien J & Poole EM. 2017. Ovarian cancer prevention, screening, and early detection: report from the 11th biennial ovarian cancer research symposium. *International Journal of Gynecologic Cancer*, 27(S5), S20-S22.
- Chiou JF, Liang JA, Hsu WH, Wang JJ, Ho ST. & Kao A. 2003. Comparing the relationship of Taxol-based chemotherapy response with P-glycoprotein and lung resistance-related protein expression in non-small cell lung cancer. *Lung*, 181(5), 267-273.
- Colucci G, Labianca R, Di Costanzo F, Gebbia V, Cartenì G, Massidda B. & Ciaparrone M. 2010. Randomized phase III trial of gemcitabine plus cisplatin compared with single-agent gemcitabine as first-line treatment of patients with advanced pancreatic cancer: the GIP-1 study. *Journal of Clinical Oncology*, 28(10), 1645-1651.
- Cong J, Liu R, Hou J, Wang X, Jiang H & Wang J. 2019. Therapeutic effect of bevacizumab combined with paclitaxel and carboplatin on recurrent ovarian cancer. *JBUON*, 24, 1003-1008.
- Cunningham D, Chau I, Stocken DD, Valle JW, Smith D, Steward W. & Falk S. 2009. Phase III randomized comparison of gemcitabine versus gemcitabine plus capecitabine in patients with advanced pancreatic cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 27(33), 5513-5518.
- de Souza LMP, Moreira JP, Fogaça HS, Luiz RR, & de Souza HS. 2017. Pancreatic cancer incidence and lethality rates in Brazil: An ecological study. *Pancreas*, 46(5), 699-706.
- Desai N, Trieu V, Yao Z, Louie L, Ci S, Yang A. & Noker P. 2006. Increased antitumor activity, intratumor paclitaxel concentrations, and endothelial cell transport of cremophor-free, albumin-bound paclitaxel, ABI-007, compared with cremophor-based paclitaxel. *Clinical cancer research*, 12(4), 1317-1324.
- Dinic J, et al. 2015. New Approaches With Natural Product Drugs for Overcoming Multidrug Resistance in Cancer. *Curr Pharm Des* 21(38): 5589-5604.
- Du Bois A, Lück HJ, Meier W, Adams HP, Mobus V, Costa S, & Olbricht S. 2003. A randomized clinical trial of cisplatin/paclitaxel versus carboplatin/paclitaxel as first-line treatment of ovarian cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 95(17), 1320-1329.
- Du Bois A, Quinn M, Thigpen T, Vermorken J, Avall-Lundqvist E, Bookman M, & Eisenhauer E. 2005. 2004 consensus statements on the management of ovarian cancer: final document of the 3rd International Gynecologic Cancer Intergroup Ovarian Cancer Consensus Conference (GCIIG OCCC 2004). *Annals of oncology*, 16(suppl_8), viii7-viii12.
- Ducreux M, Seufferlein T, Van Laethem JL, Laurent-Puig P, Smolenschi C, Malka D. & Conroy T. 2018. Systemic treatment of pancreatic cancer revisited. In *Seminars in oncology*. WB Saunders.
- Fernandes E, Ferreira JA, Andreia P, Luís L, et al. 2015. New trends in guided nanotherapies for digestive cancers: A systematic review. *Journal of Controlled Release*, 209: 288-307.
- Fernandes LRA, Lippi UG, & Baracat FF. 2003. Índice de Risco de Malignidade para tumores do ovário incorporando idade, ultrasonografia e o CA-125. *Rev Bras Ginecol Obstet*, 25(5).
- Ferreira PAR, Sallum LFTA, Sarian LO, Andrade LA, & Derchain S. 2012. Carcinoma de ovário seroso e não seroso: tipo histológico em relação ao grau de diferenciação e prognóstico. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*.
- Fogel EL, Shahda S, Sandrasegaran K, DeWitt J, Easler JJ, Agarwal DM. & El Hajj I. 2017. A multidisciplinary approach to pancreas cancer in 2016: a review. *The American journal of gastroenterology*, 112(4), 537.
- Gaitskell K, Martinek I, Bryant A, et al. 2011. Angiogenesis inhibitors for the treatment of ovarian cancer. *The Cochrane database of systematic reviews*, (9):7930.
- Ghoneum A, Afify H, Salih Z, Kelly M & Said N. 2018. Role of tumor microenvironment in ovarian cancer pathobiology. *Oncotarget*, 9(32): 22832.
- Gradishar WJ, & Tjulandin S. 2005. Davidson n, Shaw H, Desai n, Bhar P, Hawkins M,

- o'Shaughnessy J. Phase III trial of nanoparticle albumin-bound paclitaxel compared with polyethylated castor oil-based paclitaxel in women with breast cancer. *J. Clin. Oncol*, 23, 7794-7803.
- Greene FL, Balch CM, Fleming ID, Fritz A, Haller DG, Morrow M, & Page DL. 2002. *AJCC cancer staging handbook: TNM classification of malignant tumors*. Springer Science & Business Media.
- Hajek R, Vorlicek J, & Slavik M. 1996. Paclitaxel (Taxol): a review of its antitumor activity in clinical studies Minireview. *Neoplasma*, 43(3), 141-154.
- Hamad FB, Mubofu EB. 2015. Potential biological applications of bio-based anacardic acids and their derivatives. *Int J Mol Sci* 16(4): 8569-8590.
- Harsha Raj M, et al. 2016. Combinatorial treatment with anacardic acid followed by TRAIL augments induction of apoptosis in TRAIL resistant cancer cells by the regulation of p53, MAPK and NF κ B pathways. *Apoptosis* 21(5): 578-593.
- Hata AN, Niederst MJ, Archibald HL, Gomez-Caraballo M, Siddiqui FM, Mulvey HE, Maruvka YE, Ji F, Bhang HE, Krishnamurthy Radhakrishna V, Siravegna G, Hu H, Raoof S, Lockerman E, Kalsy A, Lee D, Keating CL, Ruddy DA, Damon LJ, Crystal AS, Costa C, Piotrowska Z, Bardelli A, Iafrate AJ, Sadreyev RI, Stegmeier F, Getz G, Sequist LV, Faber AC, Engelman JA. 2016. Tumor cells can follow distinct evolutionary paths to become resistant to epidermal growth factor receptor inhibition. *Nat. Med.* 22, 262–269.
- Heintz APM, Odicino F, Maisonneuve P, Quinn MA, Benedet JL, Creasman WT. & Beller U. 2006. Carcinoma of the ovary. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 95, S161-S192.
- Hemshekhkar M, Sebastin Santhosh M, Kemparaju K & Girish KS. 2012. Emerging roles of anacardic acid and its derivatives: a pharmacological overview. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 110(2): 122-132.
- Hidalgo M. 2010. Pancreatic cancer. *New England Journal of Medicine*, 362(17), 1605-1617.
- Holton RA, Kim HB, Somoza C, Liang F, Biediger RJ, Boatman PD. & Kim S. 1994. First total synthesis of taxol. 2. Completion of the C and D rings. *Journal of the American Chemical Society*, 116(4), 1599-1600.
- Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Altekruse SF. & Mariotto A. 2012. SEER cancer statistics review, 1975-2009 (vintage 2009 populations), National Cancer Institute. Bethesda, MD.
- Ilic M, & Ilic I. 2016. Epidemiology of pancreatic cancer. *World journal of gastroenterology*, 22(44), 9694.
- Instituto Nacional de Câncer (INCA). Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva; 2017.
- Instituto Nacional do Câncer (INCA). Estimativa de Câncer no Brasil, 2020. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>> Acesso em: 05/10/2020.
- Instituto Nacional do Câncer (INCA): Câncer de Pâncreas, 2018. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-pancreas>> Acesso em: 24/05/2019.
- Instituto Nacional do Câncer (INCA): Estimativa de Câncer no Brasil, 2019. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>> Acesso em: 24/04/2020.
- Ishigami H, Kitayama J, Otani K, Kamei T, Soma D, Miyato H & Nagawa H. 2009. Phase I pharmacokinetic study of weekly intravenous and intraperitoneal paclitaxel combined with S-1 for advanced gastric cancer. *Oncology*, 76(5): 311-314.
- Jayson, G. C., Kohn, E. C., Kitchener, H. C., & Ledermann, J. A. (2014). Ovarian cancer. *The Lancet*, 384(9951), 1376-1388.
- Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, & Thun MJ. 2009. Cancer statistics. *Ca Cancer J Clin*, 59(4).

- Jemal A, Siegel R, Xu J, & Ward E. 2010. Cancer statistics, 2010. *CA: a cancer journal for clinicians*, 60(5), 277-300.
- Jia J, Zhu F, Ma X, et al. 2009. Mechanisms of drug combinations: interaction and network perspectives. *Nature Reviews Drug Discovery* 8: 111.
- Jones SE, Erban J, Overmoyer B, Budd GT, et al. 2005. Randomized phase III study of docetaxel compared with paclitaxel in metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*, 23(24): 5542-5551.
- Journó-Gershfeld G, Kapp D, Shamay Y, Kopeček J & David A. 2012. Hyaluronan oligomers-HPMA copolymer conjugates for targeting paclitaxel to CD44-overexpressing ovarian carcinoma. *Pharmaceutical research*, 29(4): 1121-1133.
- Kaldawy A, Segev Y, Lavie O, Auslender R, Sopik V, & Narod S. A. 2016. Low-grade serous ovarian cancer: a review. *Gynecologic oncology*, 143(2), 433-438.
- Katsumata N, Yasuda M, Takahashi F, Isonishi S, Jobo T, Aoki D & Ochiai K. 2009. Dose-dense paclitaxel once a week in combination with carboplatin every 3 weeks for advanced ovarian cancer: a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *The Lancet*, 374(9698), 1331-1338.
- Khanna C, Rosenberg M & Vail DM. 2015. A review of paclitaxel and novel formulations including those suitable for use in dogs. *Journal of veterinary internal medicine*, 29(4), 1006-1012.
- Kim JY, Cho CH, & Song HS. 2017. Targeted therapy of ovarian cancer including immune check point inhibitor. *The Korean journal of internal medicine*, 32(5), 798.
- Kim M, Suh DH, Lee KH, Eom KY, Lee JY, Lee YY & Kim JW. 2020. Major clinical research advances in gynecologic cancer in 2019. *Journal of Gynecologic Oncology*, 31(3).
- Kushwah V. 2018. Improved antitumor efficacy and reduced toxicity of docetaxel using anacardic acid functionalized stealth liposomes. *Colloids Surf B Biointerfaces* 172: 213-223.
- La Vecchia C. 2017. Ovarian cancer: epidemiology and risk factors. *European journal of cancer prevention*, 26(1): 55-62.
- Legut M, Lipka, D, Filipczak N, Piwoni A, Kozubek A & Gubernator J. 2014. Anacardic acid enhances the anticancer activity of liposomal mitoxantrone towards melanoma cell lines–in vitro studies. *International journal of nanomedicine*, 9, 653.
- Lengyel E, Schmalfeldt B, Konik E, et al. 2001. Expression of latent matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) predicts survival in advanced ovarian cancer. *Gynecologic oncology*, 82(2): 291-298.
- Li D, Xie K, Wolff R, & Abbruzzese J. L. 2004. Pancreatic cancer. *The Lancet*, 363(9414), 1049-1057.
- Lippman SM & Hawk ET. 2009. Cancer prevention: from 1727 to milestones of the past 100 years. *Cancer Res* 69: 5269–5284.
- Liu S, Zou B, Tian T, Luo X, et al. 2018. Overexpression of the lncRNA FER1L4 inhibits paclitaxel tolerance of ovarian cancer cells via the regulation of the MAPK signaling pathway. *Journal of cellular biochemistry*.
- Ma L, Wei J, Su GH, & Lin J. 2019. Dasatinib can enhance paclitaxel and gemcitabine inhibitory activity in human pancreatic cancer cells. *Cancer biology & therapy*, 1-11.
- Malvezzi M, Bertuccio P, Levi F, La Vecchia C, & Negri E. 2014. European cancer mortality predictions for the year 2014. *Annals of oncology*, 25(8), 1650-1656.
- Marth C, Reimer D, & Zeimet AG. 2017. Front-line therapy of advanced epithelial ovarian cancer: standard treatment. *Annals of Oncology*, 28(suppl_8), viii36-viii39.
- McGuigan A, Kelly P, Turkington RC, Jones C, Coleman HG, & McCain RS. 2018. Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and

- outcomes. *World journal of gastroenterology*, 24(43), 4846.
- McGuire WP, Hoskins WJ, Brady MF, Kucera PR, Partridge EE, Look KY & Davidson M. 1996. Cyclophosphamide and cisplatin compared with paclitaxel and cisplatin in patients with stage III and stage IV ovarian cancer. *New England Journal of Medicine*, 334(1), 1-6.
- McGuire WP, Rowinsky EK, Rosenshein NB, et al. 1989. Taxol: a unique antineoplastic agent with significant activity in advanced ovarian epithelial neoplasms. *Annals of internal medicine*, 111(4): 273-279.
- Monk BJ, & Coleman RL. 2009. Changing the paradigm in the treatment of platinum-sensitive recurrent ovarian cancer: from platinum doublets to nonplatinum doublets and adding antiangiogenesis compounds. *International Journal of Gynecologic Cancer*, 19(Suppl 2), S63-S67.
- Murono K, Nagata H, Ishimaru K, Emoto S, et al. 2018. Safety of intraperitoneal paclitaxel combined with conventional chemotherapy for colorectal cancer with peritoneal carcinomatosis: a phase I trial. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 1-6.
- Nambiar J, Bose C, Venugopal M, Banerji A, Patel TB, et al. 2016. Anacardic acid inhibits gelatinases through the regulation of Spry2, MMP-14, EMMPRIN and RECK. *Experimental cell research*, 349(1): 139-151.
- Netter, F. H. (2003). *Atlas interactivo de anatomía humana*. Icon Learning.
- Neves AP, & Vargas MD. 2011. Complexos de platina (II) na terapia do câncer. *Revista Virtual de Química*, 3(3), 196-209.
- Nicolaou KC, Yang Z, Liu JJ, Ueno H, Nantermet PG, Guy RK. & Sorensen EJ. 1994. Total synthesis of taxol. *Nature*, 367(6464), 630.
- Nobeschi L, Bernardes W, & Favero N. 2015. Diagnóstico e prevenção do câncer de pâncreas. *Ensaio e Ciência: C. Biológicas, Agrárias e da Saúde*, 16(1).
- Okada S, Sakata Y, Matsuno S, Kurihara M, Sasaki Y, Ohashi Y, & Taguchi T. 1999. Phase II study of docetaxel in patients with metastatic pancreatic cancer: a Japanese cooperative study. *British journal of cancer*, 80(3-4), 438.
- Olive KP, Jacobetz MA, Davidson CJ, Gopinathan A, McIntyre D, Honess D. & Frese KK. 2009. Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. *Science*, 324(5933), 1457-1461.
- Omanakuttan A, Nambiar J, Harris RM, et al. 2012. Anacardic acid inhibits the catalytic activity of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9. *Molecular pharmacology*, mol-112.
- Ottevanger PB. 2017. Ovarian cancer stem cells more questions than answers. In *Seminars in cancer biology*(Vol. 44, pp. 67-71). Academic Press.
- Ozols RF, Bundy BN, Greer BE, Fowler JM, Clarke-Pearson D, Burger RA & Baergen R. 2003. Phase III trial of carboplatin and paclitaxel compared with cisplatin and paclitaxel in patients with optimally resected stage III ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group study. *Journal of Clinical Oncology*, 21(17), 3194-3200.
- Páez D, Labonte MJ & Lenz HJ. 2012. Pancreatic cancer: medical management (novel chemotherapeutics). *Gastroenterology Clinics*, 41(1): 189-209.
- Park M, Upton D, Blackmon M, et al. 2018. Anacardic acid inhibits pancreatic cancer cell growth, and potentiates chemotherapeutic effect by Chmp1A-ATM-p53 signaling pathway. *BMC complementary and alternative medicine*, 18(1): 71.
- Paul VJ, Yeddanapalli LM. 1954. Olefinic Nature of Anacardic Acid from Indian Cashew-nut Shell Liquid. *Nature* 174 (4430): 604.
- Pereira I, Sousa F, Kennedy P & Sarmento B. 2018. Carcinoembryonic antigen-targeted nanoparticles potentiate the delivery of anticancer drugs to colorectal cancer cells. *International journal of pharmaceutics*, 549(1-2): 397-403.

- Périgny M, Bairati I, Harvey I, Beauchemin M, Harel F, Plante M & Têtu, B. 2008. Role of immunohistochemical overexpression of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-11 in the prognosis of death by ovarian cancer. *American journal of clinical pathology*, 129(2): 226-231.
- Piccart MJ, Bertelsen K, James K, Cassidy J, Mangioni C, Simonsen E. & Grimshaw R. 2000. Randomized intergroup trial of cisplatin–paclitaxel versus cisplatin–cyclophosphamide in women with advanced epithelial ovarian cancer: three-year results. *Journal of the National Cancer Institute*, 92(9), 699-708.
- Pokorny AM, Chin VT, Nagrial AM, Yip D, & Chantrell LA. 2018. Metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma: diagnosis and treatment with a view to the future. *Internal medicine journal*, 48(6), 637-644.
- Priyadarshini K, & Keerthi A. U. 2012. Paclitaxel against cancer: a short review. *Med chem*, 2(7), 139-141.
- Quispe-Soto ET & Calaf GM. 2016. Effect of curcumin and paclitaxel on breast carcinogenesis. *International journal of oncology*, 49(6), 2569-2577.
- Raz S, Stark M, Assaraf YG. 2016. Folylpoly- γ -glutamate synthetase: A key determinant of folate homeostasis and antifolate resistance in cancer. *Drug Resist Updat*. 28, 43-64
- Rege MD, Ghadi R, Katiyar SS, Kushwah V & Jain S. 2018. Exploring an interesting dual functionality of anacardic acid for efficient paclitaxel delivery in breast cancer therapy. *Nanomedicine*, 14(1): 57-75.
- Reni M, Cordio S, Milandri C, Passoni P, Bonetto E, Oliani C. & Passardi A. 2005. Gemcitabine versus cisplatin, epirubicin, fluorouracil, and gemcitabine in advanced pancreatic cancer: a randomised controlled multicentre phase III trial. *The lancet oncology*, 6(6), 369-376.
- Ries LA, Harkins D, Krapcho M, Mariotto A, Miller BA, Feuer EJ. & Hayat M. 2006. SEER cancer statistics review, 1975-2003.
- Ringel I & Horwitz SB. 1991. Studies with RP 56976 (taxotere): a semisynthetic analogue of taxol. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 83(4): 288-291.
- Rojas V, Hirshfield KM, Ganesan S & Rodriguez-Rodriguez L. 2016. Molecular characterization of epithelial ovarian cancer: implications for diagnosis and treatment. *International journal of molecular sciences*, 17(12): 2113.
- Rowinsky MD, et al 1997. The development and clinical utility of the taxane class of antimicrotubule chemotherapy agents. *Annual review of medicine*, 48(1): 353-374.
- Sarmiento-Ribeiro AB, Scorilas A, Gonçalves AC, Efferth T. & Trougakos IP. 2019. *The emergence of drug resistance to targeted therapies: Clinical evidence. Drug Resistance Updates*, 100646. doi:10.1016/j.drug.2019.100646
- Schiff P, Fant J, Horwitz SB. 1979. Promotion of microtubule assembly in vitro by Taxol. *Nature* 277:665-7.
- Schneider G & Schmid R. M. 2003. Genetic alterations in pancreatic carcinoma. *Molecular cancer*, 2(1), 15.
- Schultz DJ, Wickramasinghe NS, Ivanova MM, Isaacs SM, et al. 2010. Anacardic acid inhibits estrogen receptor α -DNA binding and reduces target gene transcription and breast cancer cell proliferation. *Molecular cancer therapeutics*, 1535-7163.
- Seidman JD, Horkayne-Szakaly I, Haiba M, Boice CR, Kurman RJ, & Ronnett BM. 2004. The histologic type and stage distribution of ovarian carcinomas of surface epithelial origin. *International journal of gynecological pathology*, 23(1), 41-44.
- Seong YA, Shin PG, Yoon JS, et al. 2014. Induction of the endoplasmic reticulum stress and autophagy in human lung carcinoma A549 cells by anacardic acid. *Cell biochemistry and biophysics*, 68(2): 369-377.

- Shetty A, Nagesh PK, Setua S, Hafeez BB, Jaggi M, Yallapu MM, & Chauhan SC. 2020. Novel Paclitaxel Nanoformulation Impairs De Novo Lipid Synthesis in Pancreatic Cancer Cells and Enhances Gemcitabine Efficacy. *ACS Omega*.
- Shigemori H & Kobayashi JI. 2004. Biological Activity and Chemistry of Taxoids from the Japanese Yew, *Taxus cuspidata*. *Journal of natural products*, 67(2): 245-256.
- Shilpa P, Kaveri K, Salimath BP. 2015. Anti-metastatic action of anacardic acid targets VEGF-induced signalling pathways in epithelial to mesenchymal transition. *Drug Discov Ther* 9(1): 53-65.
- Siegel RL, Miller KD & Jemal A. 2019. Cancer statistics, 2019. *CA: a cancer journal for clinicians*, 69(1), 7-34.
- Siegel RL, Miller KD, Jemal A. 2020. Cancer statistics, 2020. *CA: a cancer journal for clinicians*.
- Singla AK, Garg A & Aggarwal D. 2002. Paclitaxel and its formulations. *International journal of pharmaceutics*, 235(1-2): 179-192.
- Slichenmyer WJ & Von DH. 1991. Taxol: a new and effective anti-cancer drug.
- Solicia E & Capella CG. 1995. Klöppel tumores do pâncreas. *Atlas de patologia tumoral*. Série, 3, 20.
- Souza MVND. 2004. New natural products able to act on the stabilization of microtubules, an important target against cancer. *Química Nova*, 27(2): 308-312.
- Spencer CM, Faulds D. 1994. Paclitaxel. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic potential in the treatment of cancer. *Drugs* 48:794-847.
- Stewart C, Ralyea C & Lockwood S. 2019. Ovarian cancer: an integrated review. In *Seminars in oncology nursing*. WB Saunders.
- Sung B, Pandey MK, Ahn KS, et al. 2008. Anacardic acid (6-nonadecyl salicylic acid), an inhibitor of histone acetyltransferase, suppresses expression of nuclear factor-kappaB-regulated gene products involved in cell survival, proliferation, invasion, and inflammation through inhibition of the inhibitory subunit of nuclear factor-kappaBalpha kinase, leading to potentiation of apoptosis. *Blood* 111(10): 4880–4891.
- Tan J, Jiang X, Yin G, He L, Liu J, Long Z & Yao K. 2017. Anacardic acid induces cell apoptosis of prostatic cancer through autophagy by ER stress/DAPK3/Akt signaling pathway. *Oncology reports*, 38(3): 1373-1382
- The Human Proteins Atlas. 2020. Pathology Ovarian Cancer. Disponível em: <<https://www.proteinatlas.org/learn/dictionary/pathology/ovarian+cancer>> Acesso em: 15/10/2020.
- Trevisan MTS, Pfundstein B, Haubner R, et al. 2006. Characterization of alkyl phenols in cashew (*Anacardium occidentale*) products and assay of their antioxidant capacity. *Food Chem Toxicol* 44: 188–197.
- Tutton MG, George ML, Eccles SA, Burton S, Swift RI & Abulafi AM. 2003. Use of plasma MMP-2 and MMP-9 levels as a surrogate for tumour expression in colorectal cancer patients. *International journal of cancer*, 107(4): 541-550.
- Unger K, Mehta KY, Kaur P, Wang Y, Menon SS, Jain SK, & Fogel P. 2018. Metabolomics based predictive classifier for early detection of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncotarget*, 9(33), 23078.
- van Vuuren S, Viljoen A. 2011. Plant-based antimicrobial studies--methods and approaches to study the interaction between natural products. *Planta Med* 77(11): 1168-1182.
- Vargas AN. 2014. Natural history of ovarian cancer. *ecancermedicalscience*, 8.
- Vasan N, Baselga J & Hyman DM. 2019. A view on drug resistance in cancer. *Nature*, 575(7782), 299-309.

- Vincent A, Herman J, Schulick R, Hruban RH, & Goggins M. 2011. Pancreatic cancer. *The lancet*, 378(9791), 607-620.
- Von Hoff DD, Ervin T, Arena FP, Chiorean EG, Infante J, Moore M. & Harris M. 2013. Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. *New England Journal of Medicine*, 369(18), 1691-1703.
- Von Hoff DD, Ramanathan RK, Borad MJ, Laheru DA, Smith LS, Wood TE & Zhang H. 2011. Gemcitabine plus nab-paclitaxel is an active regimen in patients with advanced pancreatic cancer: a phase I/II trial. *Journal of Clinical Oncology*, 29(34), 4548.
- Wagner H, Ulrich-Merzenich G. 2009. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine* 16: 97.
- Walker JL, Powell CB, Chen LM, Carter J, Bae Jump VL, Parker LP & Gibb RK. 2015. Society of Gynecologic Oncology recommendations for the prevention of ovarian cancer. *Cancer*, 121(13), 2108-2120.
- Walsh V & Goodman J. 2002. From Taxol to Taxol®: The changing identities and ownership of an anti-cancer drug. *Medical anthropology*, 21(3-4), 307-336.
- Wang JQ, DeChalus A, Chatterjee DN, Keller ET, Mizokami A, et al. 2015. Extracellular Vesicle-Mediated Reversal of Paclitaxel Resistance in Prostate Cancer. *Critical Reviews™ in Oncogenesis*, 20(5-6).
- Waters JC, Chen RH, Murray AW & Salmon ED. 1998. Localization of Mad2 to kinetochores depends on microtubule attachment, not tension. *The Journal of cell biology*, 141(5): 1181-1191.
- Weaver BA. 2014. How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. *Molecular biology of the cell*, 25(18): 2677-2681.
- Westermarck J & KÄHÄRI VM. 1999. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *The FASEB journal*, 13(8): 781-792.
- Whitehead RP, Jacobson J, Brown TD, Taylor SA, Weiss GR, & Macdonald JS. 1997. Phase II trial of paclitaxel and granulocyte colony-stimulating factor in patients with pancreatic carcinoma: a Southwest Oncology Group study. *Journal of clinical oncology*, 15(6), 2414-2419.
- World Health Organization (WHO) et al. 2017 Global Health Risks-Mortality and burden of disease attributable to selected major risks. **Cancer**.
- World Health Organization (WHO). 2017. Acesso em 20 de Abril de 2020 <<https://www.who.int>>.
- Wu Y, He L, Zhang L, et al. 2011. Anacardic acid (6-pentadecylsalicylic acid) inhibits tumor angiogenesis by targeting Src/FAK/Rho GTPases signaling pathway. *J Pharmacol Exp Ther* 339(2): 403-411.
- Yalcin S, Dane F, Oksuzoglu B, Ozdemir NY, Isikdogan A, Ozkan M, & Ustaoglu MA. 2020. Quality of life study of patients with unresectable locally advanced or metastatic pancreatic adenocarcinoma treated with gemcitabine+ nab-paclitaxel versus gemcitabine alone: AX-PANC-SY001, a randomized phase-2 study. *BMC cancer*, 20, 1-7.
- Yao K, Jiang X, He L, et al. 2015. Anacardic acid sensitizes prostate cancer cells to radiation therapy by regulating H2AX expression. *Int J Clin Exp Pathol* 8(12): 15926-15932.
- Zafar F, Gupta A, Thangavel K, Khatana K, Sani AA, Ghosal A & Nishat N. 2020. Physicochemical and Pharmacokinetic Analysis of Anacardic Acid Derivatives. *ACS omega*, 5(11), 6021-6030.
- Zhao MD, Li JQ, Chen FY, Dong W, Wen LJ, Fei WD & Zheng CH. 2019. Co-Delivery of Curcumin and Paclitaxel by “Core-Shell” Targeting Amphiphilic Copolymer to Reverse Resistance in the Treatment of Ovarian Cancer. *International Journal of Nanomedicine*, 14, 9453.

Zhu Z, Mu Y, Qi C, Wang J, Xi G, Guo J & Zhao F. 2015. CYP1B1 enhances the resistance of epithelial ovarian cancer cells to paclitaxel in vivo and in vitro. *International journal of molecular medicine*, 35(2): 340-348.

CAPÍTULO 1

Ácido Anacárdico apresenta-se mais efetivo contra Células Tumorais Ovarianas quando associado ao quimioterápico Paclitaxel

**Juliana Trindade Caleffi ¹; Mirian Carolini Esgoti Aal ¹; Gabriel Henrique Caxali ¹;
Wellerson Rodrigo Scarano¹; Luiz Gustavo de Almeida Chuffa¹; Flávia Karina
Delella¹**

¹ Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Instituto de Biociências, Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Botucatu, São Paulo, Brasil.

RESUMO

O câncer de ovário (CO) é considerado uma neoplasia maligna bastante letal, pois seus sintomas são muitas vezes ignorados, ou propensos a serem identificados como sinais de outras doenças, causando atrasos na detecção e sendo descoberto na maioria dos casos já em estágios avançados. Para o seu tratamento, a quimioterapia é o mais indicado, e dentre os fármacos, os taxanos se destacam por serem capazes de matar células malignas e cessar o crescimento do tumor. O Paclitaxel (PTX) é um taxano antitumoral potente, mas que apresenta um obstáculo no tratamento convencional do CO, já que as células desenvolvem resistência à essa droga ao longo do tempo. Dessa forma, este estudo avaliou a ação deste antineoplásico, isolado e em combinação a um composto natural com alto potencial antitumoral, o Ácido Anacárdico (AA), sobre parâmetros celulares como viabilidade e morte celular, em células tumorais ovarianas SKOV3. As células SKOV3 foram divididas nos seguintes grupos experimentais, e expostas aos compostos por 24 horas, tanto no modelo celular 2D como no 3D: 1. Controle; 2. 0,625µM de PTX; 3. 10µM de AA; 4. AA + PTX. Nossos achados mostraram que a viabilidade das células SKOV3 em cultura 2D diminuiu em torno de 25% após o tratamento com o AA isolado e 23% com o AA associado ao PTX. Quando cultivadas em cultura 3D, a viabilidade diminuiu em 24% com o AA isolado e 46% com o AA combinado ao PTX. Esses resultados se repetem na análise de morte celular, que foi maior nos grupos AA e AA+PTX. Os nossos achados são inéditos e ilustram importante diferença da ação dos tratamentos quando aplicados nas células tumorais ovarianas em cultura 3D e mostram que, quando combinados, o AA potencializa a ação do PTX na viabilidade e morte dessas células. Novos experimentos serão feitos em nosso grupo de estudo para avaliar a ação desses tratamentos no conjunto global de proteínas das células SKOV3.

Palavras chave: ácido anacárdico, quimioprevenção, câncer de ovário, cultura celular 3D.

1. Introdução

O câncer é uma das principais causas de morte no mundo, e se torna cada vez mais preocupante, já que a Organização Mundial da Saúde (OMS) prevê um significativo aumento na incidência dessa afecção na população em geral (Lewandowska et al., 2021). Um estudo de Ferlay e colaboradores (2021) sobre as estatísticas do câncer no ano de 2020, estimou que houve 19,3 milhões de novos casos de câncer e 10,0 milhões de mortes pela doença no mesmo ano em todo o mundo. Entendendo isso, esbarramos em uma questão importante que é a resistência de células tumorais às drogas quimioterápicas (Wang et al., 2013; Chen et al., 2020; Marine et al., 2020).

Dentre os cânceres, o câncer de ovário (CO) se destaca por ser de alta malignidade e o mais letal na ginecologia (Siegel et al., 2019), além de apresentar alta taxa de recorrência (70%) e forte resistência aos tratamentos (Ottevanger et al; 2017). Algumas pesquisas mostram que mais de 80% dos pacientes respondem à quimioterapia de primeira linha (Taxano e Platina) no entanto, aproximadamente 70% desses pacientes com CO avançado desenvolvem resistência a esses medicamentos (Monk et al., 2009; Kim et al., 2017).

Os estudos *in vitro* representam uma ferramenta de pesquisa importante e crucial para auxiliar no tratamento de doenças, incluindo o câncer (Corrò et al., 2020). O desenvolvimento de terapias alternativas vem sendo um dos grandes esforços de pesquisadores da área acadêmica e do setor farmacêutico (Ravi et al., 2015; Alhaque & Rashidi, 2018). Para avaliar a dose ideal de um fármaco, culturas celulares bidimensionais (2D) são utilizadas previamente aos testes em modelos animais (Jaganathan et al., 2014; Duval et al., 2017), porém os testes em cultura 2D fornecem informações incompletas sobre o tecido ou órgão de origem, já que esse modelo não traduz a complexidade do microambiente celular. Atualmente, o modelo de cultura celular tridimensional (3D) permite conexão intercelular mais fidedigna àquela encontrada *in vivo* e pode preencher lacunas entre os modelos de testes de drogas convencionais *in vitro* e em animais (Leonard & Lehr 2010; Jaganathan et al., 2014; Ravi et al., 2015).

O presente estudo investigou então uma alternativa à resistência aos medicamentos já conhecidos para o tratamento do CO, utilizando uma combinação entre a droga antineoplásica e um composto natural. A combinação de drogas antineoplásicas com compostos naturais já foi descrita por Schultz et al., 2010, Dinic et al., 2015, Park et al., 2018 e Rege et al., 2018. A escolha por compostos naturais baseia-se em achados

positivos apresentados recentemente na literatura, onde vários fitoquímicos como a cúrcuma, licopeno, resveratrol, além de derivados de plantas, como os flavonoides, por exemplo, se destacam por serem capazes de inibir a proliferação de células tumorais malignas, induzir a apoptose e aliviar as toxicidades induzidas pela quimioterapia, além de pouparem as células normais (Hosein et al., 2016; Pistollato et al., 2017; Rais et al., 2017).

O composto de interesse deste estudo é o Ácido Anacárdico (*Anacardium occidentale*), extraído do líquido da casca da castanha de caju e da folha do cajueiro, com propriedades antitumorais, antiproliferativas, anti-inflamatórias, antimetastáticas, entre diversas outras já comprovadas na literatura (Sung et al., 2008; Alam-Escamilla et al., 2015; Zafar et al., 2020).

A combinação dos compostos Ácido Anacárdico e do quimioterápico Paclitaxel foi utilizada no tratamento de células de CO cultivadas em modelo de cultura 3D magnética (3Dm), com o objetivo de conseguir resultados importantes e mais fidedignos para a clínica médica, e assim contribuir na atualização de tratamentos preventivos ou coadjuvantes para pacientes com este tipo de câncer.

2. Justificativa e Hipótese

Considerando que o CO é uma das doenças ginecológicas mais frequentemente diagnosticadas no mundo, e que promove um alto número de óbitos por ano, devido ao seu estágio inicial assintomático e a alta taxa de reincidência, buscar tratamentos que ajudem e auxiliem na cura contra o câncer é fundamental. Sabendo disso, quando olhamos para os tratamentos com quimioterápicos existentes de primeira linha, vimos que eles são capazes de fazer este papel, porém, devido à alta taxa de resistência das células pelas drogas antineoplásicas, esses tratamentos se tornam ameaçados, o que faz com que as pesquisas precisem encontrar soluções para colaborar nessa questão.

Por este motivo, devido ao grande potencial antitumoral, antiproliferativo, anti-inflamatório, antiangiogênico, pró apoptótico, antimetastático do composto natural Ácido Anacárdico, acreditamos que seu uso, isolado e combinado ao agente antineoplásico Paclitaxel, seja capaz de atuar na prevenção, progressão e resposta antitumoral contra o CO.

3. Objetivos

3.1 Objetivos Gerais

Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito do ácido anacárdico, isolado ou combinado com o agente antineoplásico Paclitaxel, sobre parâmetros funcionais em células humanas de câncer de ovário.

3.2 Objetivos Específicos

- ✓ Utilizar um sistema 3Dm para o cultivo das células humanas de câncer de ovário;
- ✓ Realizar a exposição dessas células ao ácido anacárdico isolado ou combinado com o agente antineoplásico Paclitaxel;
- ✓ Avaliar a viabilidade das células expostas;
- ✓ Analisar o efeito das exposições sobre o processo de morte das células neoplásicas.

4. Material e Métodos

4.1. Cultura Celular

4.1.1. Linhagem celular

A linhagem celular SKOV3 foi adquirida junto à empresa *American Type Cell Culture* (ATCC) (Manassas, Virginia, USA) e depositada no banco de células nível 2 de biossegurança (Processo CTNBio nº 01200.007359/2001-11) do Laboratório de Cultura Celular do Setor Morfologia/IBB/UNESP. Esta linhagem foi originada de um adenocarcinoma ovariano primário de uma mulher de 64 anos e possui baixa capacidade de diferenciação. Ela é uma linhagem de CO epitelial endometriode, possui propriedades aderentes e seu tempo de duplicação é de aproximadamente 35 horas. É resistente a fatores de necrose tumoral e a várias drogas citotóxicas, incluindo a toxina da Difteria, Cisplatina, Paclitaxel e Doxorubicina. Estas células são consideradas hipodiploides, pois se referem a uma linhagem celular humana altamente rearranjada, contendo duas grandes populações clonais: Clone 1, correspondente a aproximadamente 60% da população total, com 77 a 84 cromossomos por disseminação de metáfase (quase tetraplóide) e, Clone 2, em aproximadamente 40% da população total, com 41 a 45 cromossomos por disseminação de metáfase (hipodiploide) (ATCC). Essa linhagem foi cultivada em meio de cultura RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco/Invitrogen™, EUA) e 1% de antibiótico/antimicótico (Gibco/Invitrogen™, EUA), em estufa com 5% de CO₂ em atmosfera úmida a 37°C. O meio foi trocado a cada 2 dias

durante a expansão em garrafas de poliestireno de 25 e 75 cm² e o monitoramento da cultura foi realizado em microscópio invertido (Zeiss Axiovert®, Alemanha). Quando as células atingiram 80% de confluência foram submetidas à tripsina 0,25% (Gibco/Invitrogen™, EUA) e os experimentos utilizando cultura celular bidimensional ou tridimensional magnética foram montados. O comitê de ética não se fez necessário por tratar-se de uma linhagem celular estabelecida e patenteada pela empresa americana ATCC, que mantém a responsabilidade sobre suas células.

4.1.2. Cultura Tridimensional Magnética

Para as análises de viabilidade e morte celular, as células SKOV3 foram cultivadas em cultura 3Dm utilizando o 96-well *Bio-Assambler™ Kit* (Greiner Bio-One). O princípio do método foi previamente descrito por Haisler et al., 2013. Em resumo (Figura 1), as células cultivadas em 2D foram incubadas com *beads* magnéticas formadas por ouro, ferro e poli-L-lisina (*Nanoshuttles™* - Greiner Bio-One) na proporção de 1µL para cada 10x10³ células (ou 8µL/cm² de cultivo) *overnight* a 37°C. Após a magnetização das células, as mesmas foram tripsinizadas e plaqueadas em uma placa com superfície especificamente tratada para evitar a adesão celular (Greiner Bio-One), em volume total de 200µL/poço, na quantidade de 50.000 células (quantidade determinada após padronização). Imediatamente junto ao plaqueamento das células, o suporte magnético que acompanha o kit (*spheroid driver*) foi colocado embaixo da placa para agregação e concentração das células *overnight*. No dia seguinte, o *spheroid driver* foi removido promovendo a levitação das células e consequentemente levando à formação das estruturas tridimensionais.

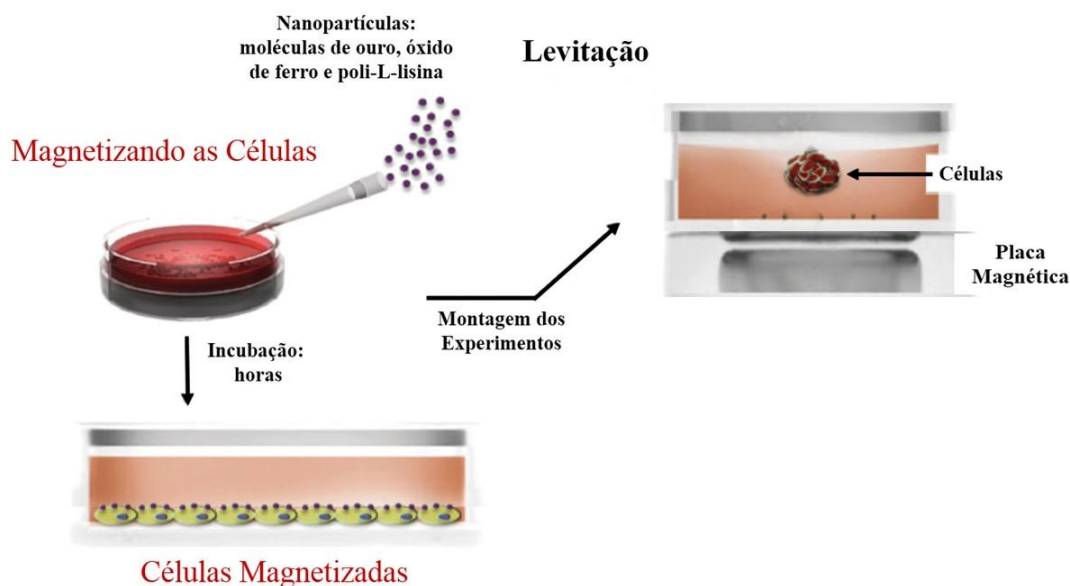


Figura 1. Montagem da cultura 3Dm. Modificado de Greiner Bio-One.

4.2. Exposição das Células ao Ácido Anacárdico e Tratamentos

Origem do ácido anacárdico: o composto purificado foi adquirido da empresa Sigma Aldrich (A7236).

Tratamentos: A linhagem de células tumorais SKOV3 foi primeiramente expandida em cultura bidimensional e, após ser magnetizada, foi transferida para o mecanismo de cultivo 3D e dividida nos seguintes grupos (n=3), como detalhado abaixo:

Grupo Controle: Meio de cultura RPMI suplementado com 10% de SFB (Sigma-Aldrich, EUA) e 1% de antibiótico e antimicótico (Gibco, Thermo Fisher Scientific).

Grupo Ácido Anacárdico: Idem meio de cultura “grupo controle” suplementado com ácido anacárdico 10 μ M (a concentração foi determinada pelo teste de IC50, apresentado no item 6.1, seguindo como princípio Nambiar et al., 2016).

Grupo Paclitaxel: Idem meio de cultura grupo controle suplementado com 0,625 μ M do agente antineoplásico Paclitaxel (seguindo como princípio Lupi et al., 2020) (Sigma-Aldrich, EUA).

Grupo Ácido Anacárdico + Paclitaxel: Idem meio de cultura “grupo ácido anacárdico” suplementado com 0,625 μ M de Paclitaxel (Sigma-Aldrich, EUA).

4.3. Viabilidade Celular e Apoptose

4.3.1 Análise da viabilidade celular

Células SKOV3 (n = 3) foram cultivadas em 3Dm em placas de 96 poços com lateral escura (Synergy 4, BioTek, VT, USA) durante 24 horas (Ornish et al., 2005) em meio de cultura suplementado de acordo com a descrição de cada grupo experimental. Em seguida, foi adicionado a cada poço 100µL de solução incubadora, sendo 90µL de meio de cultura e 10µL do reagente *PrestoBlue® Cell Viability* (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific). As células ficaram incubadas com a solução durante 60 minutos em estufa com 5% de CO₂ em atmosfera úmida a 37°C e em seguida foi feita a leitura em leitor de microplaca em filtro monocromador, 560 nm de excitação e 590nm de emissão. Os valores da intensidade de fluorescência das amostras do grupo controle foram comparados aos valores dos grupos expostos.

4.3.2 Análise da morte celular

O kit Live and Dead Viability/Cytotoxicity Kit (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, USA) permitiu avaliar viabilidade celular e apoptose em uma população celular com base na integridade da membrana plasmática e na atividade da enzima esterase. Como resultado, células vivas e células mortas são identificadas simultaneamente, colorindo com calceína-AM verde fluorescente para indicar atividade esterase intracelular e homodímero-1 de etídio fluorescente vermelho para indicar perda de integridade da membrana plasmática, respectivamente. Para isso, as células SKOV3 foram cultivadas em cultura 3Dm (n=3) em placas de 96 poços durante 24 horas em meio de cultura suplementado de acordo com a descrição de cada grupo. Após esse tempo as células foram lavadas com PBS e fixadas com 100µl de PFA (Paraformaldeído) 4% por 20 minutos. Em seguida, o PFA foi retirado e adicionado 100µl de reagente de marcação (1 ml de PBS + 0,5µl de calceína + 2µl de etídio). As células ficaram incubadas com a solução durante 60 minutos em estufa com 5% de CO₂ em atmosfera úmida a 37°C e em seguida, foi retirado o reagente de marcação e adicionado 100µl de PBS. A placa foi lacrada e analisada em microscópio invertido de fluorescência para obtenção das imagens.

5. Análises Estatísticas

Foi realizado o teste estatístico para análise de variância (one-way ANOVA) com um único fator independente “tratamento”, e complementado com o teste de Tukey. Os resultados também foram comparados dois a dois usando o T test. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

6. Resultados

6.1 Padronização da Concentração do Ácido Anacárdico Através do Teste IC50

Para a escolha da concentração do AA através do teste IC50, a viabilidade das células SKOV3 foi avaliada em modelo bidimensional, em diferentes concentrações, por 24 horas (Figura 2). É válido ressaltar que a concentração do agente antineoplásico PTX foi determinada de acordo com um estudo prévio utilizando também as células SKOV3 (Lupi et al., 2020).

A viabilidade foi detectada com a utilização do composto Prestoblue, através da quantificação da fluorescência emitida, em placas de 96 poços. As concentrações estudadas foram: 1µM, 2,5µM, 5µM, 10µM e 15µM, resultando nos seguintes grupos:

- Controle (CT);
- Paclitaxel (PTX);
- 1µM Ácido Anacárdico (AA);
- 1µM AA + PTX;
- 2,5µM AA;
- 2,5µM AA + PTX;
- 5µM AA;
- 5µM AA + PTX;
- 10µM AA;
- 10µM AA + PTX;
- 15µM AA;
- 15µM AA + PTX.

Para realização dos cálculos, o grupo CT foi considerado 100% viável, e a partir dele calculamos para os demais grupos.

6.1.1 Viabilidade Celular - Teste IC50

O PrestoBlue é um composto baseado em resazurina, que na presença de células metabolicamente ativas, é convertido na forma reduzida resorufina por enzimas mitocondriais, resultando em modificações na fluorescência (Ahmed et al., 1994).

Seguindo por este teste, nós observamos que o composto AA isolado foi capaz de levar às células SKOV3 a uma baixa viabilidade quando comparados ao grupo CT (Figura 2). Os grupos de 5µM AA e 10µM AA diminuíram sua viabilidade quando comparados ao grupo CT, diminuição que se acentuou quando em sinergismo ao antineoplásico PTX.

O grupo com 1µM de AA não apresentou diferença estatística quando comparado ao CT, e os grupos 2,5µM e 15µM de AA apresentaram maior toxicidade do grupo AA sozinho do que quando em sinergismo com o grupo PTX.

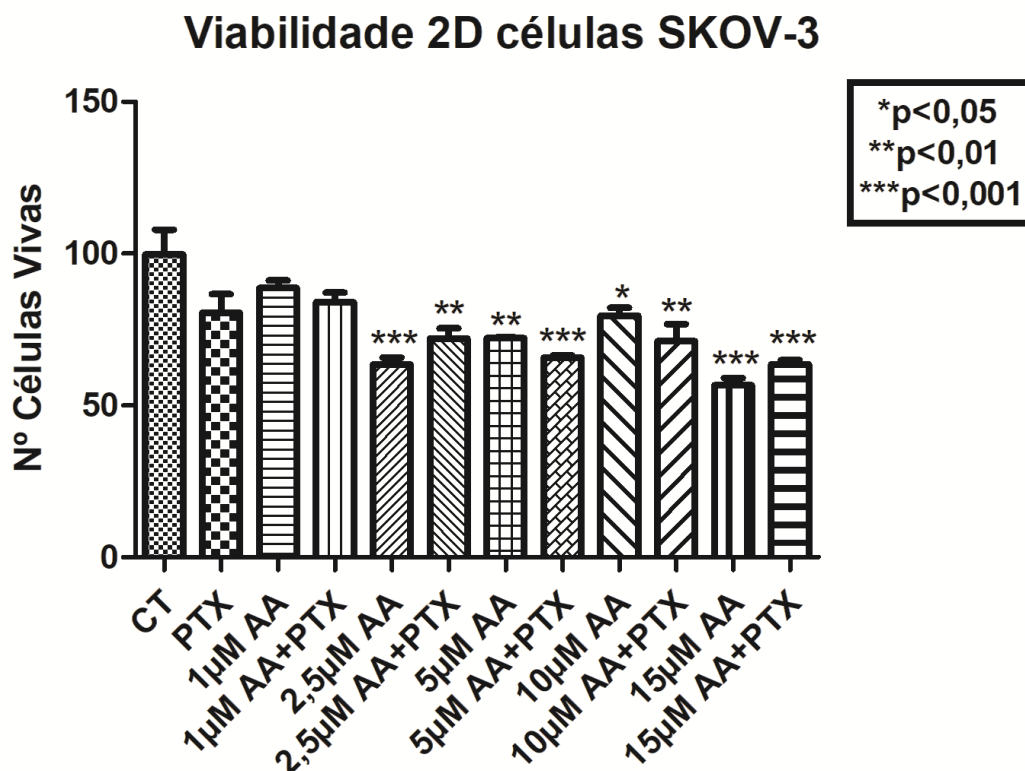


Figura 2. Viabilidade das células SKOV-3 em modelo bidimensional por 24 horas, utilizando o ensaio fluorescente Prestoblue. Grupo CT 100% ($\pm 13,83$); Grupo PTX 80% ($\pm 10,70$); Grupo 1µMAA 88% ($\pm 4,27$); Grupo 1µMAA+PTX 84% ($\pm 5,47$); Grupo 2,5µMAA 63% ($\pm 3,99$); Grupo 2,5µMAA+PTX 72% ($\pm 5,82$); Grupo 5µMAA 72% ($\pm 0,41$); Grupo 5µMAA+PTX 65% ($\pm 1,26$); Grupo 10µMAA 79% ($\pm 4,75$); Grupo 10µMAA+PTX 71% ($\pm 9,67$); Grupo 15µMAA 56% ($\pm 4,01$); Grupo 15µMAA+PTX 63% ($\pm 2,47$).

A partir destes primeiros resultados repetimos o teste de viabilidade, porém, agora apenas para as concentrações de 5µM AA e 10µM AA (Figura 3), com o objetivo de escolher uma delas para seguir com os demais experimentos do projeto.

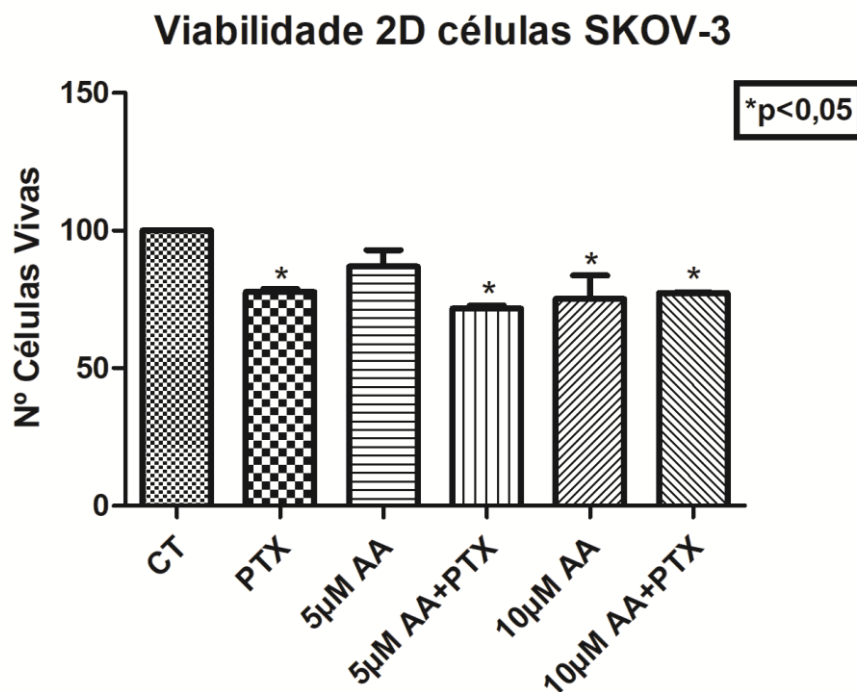


Figura 3. Viabilidade das células SKOV-3 em modelo bidimensional por 24 horas, utilizando o ensaio fluorescente Prestoblu. Grupo CT 100% ($\pm 0,0$); Grupo PTX 77% ($\pm 2,06$); Grupo 5µMAA 86% ($\pm 10,44$); Grupo 5µMAA+PTX 71% ($\pm 1,97$); Grupo 10µMAA 75% ($\pm 14,85$); Grupo 10µMAA+PTX 77% ($\pm 0,49$).

Apesar de as duas concentrações resultarem em diminuição da viabilidade celular, optamos pela concentração de 10µM AA, a qual exibiu diminuição estatística em relação ao grupo CT. Adicionalmente, a literatura traz informações de que as células em modelo tridimensional são mais resistentes quando comparadas com um modelo bidimensional, levando em consideração todas as condições de interação em que as células se encontram.

6.1.2 Morfologia Celular

Para a análise da morfologia, as células foram cultivadas em placas de 24 poços e analisadas em microscópio de luz invertido em aumento de 100X. As células SKOV3 do grupo CP apresentaram-se volumosas, estreladas, aderidas umas às outras e na placa de cultura através de prolongamentos citoplasmáticos numerosos e visíveis.

Através das imagens (Figura 4), observamos que todos os grupos que não continham o antineoplásico PTX apresentaram morfologia semelhante ou igual à do grupo CT (Figura 4, setas pretas). Já o grupo PTX, e todas as concentrações de AA em conjunto com o composto PTX, apresentaram células arredondadas, perda da adesão e da estrutura morfológica e volume tradicionais, células com coloração castanha e soltas pelo poço (Figura 4, setas vermelhas).

Essas características nos levam a acreditar que o composto natural (AA) isolado não foi tóxico para as células no período de 24 horas, ao contrário do quimioterápico PTX, que em um curto espaço de tempo foi capaz de alterar a morfologia celular, tanto isoladamente como em combinação ao composto AA.

Morfologia 2D SKOV-3 24 Horas

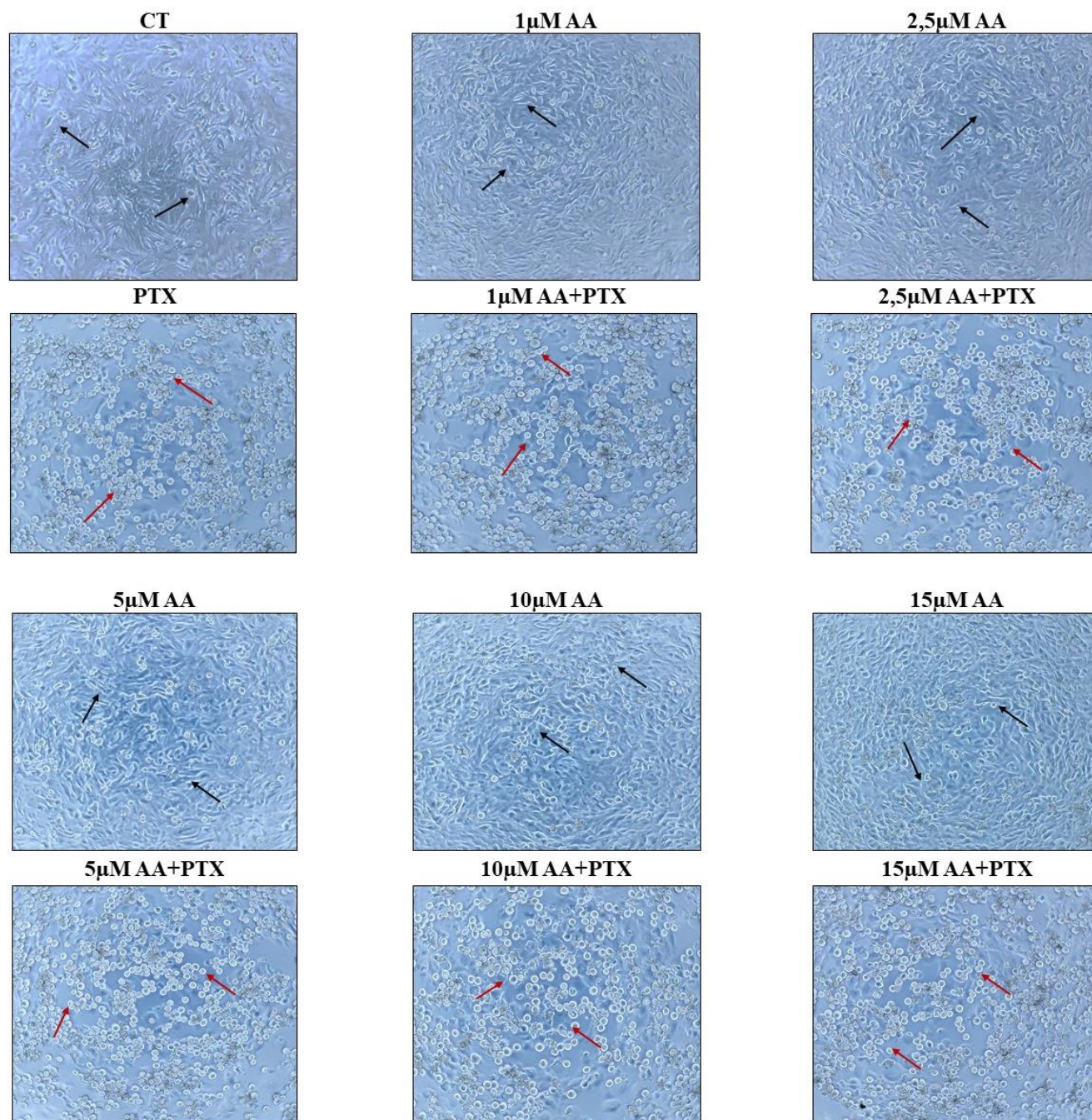


Figura 4. Morfologia das células SKOV-3 em modelo bidimensional em diferentes concentrações por 24 horas. Imagens feitas em microscópio de luz invertido em aumento de 100x. Setas pretas indicam células com morfologia original, alongadas, contendo prolongamento citoplasmáticos e aderidas há placa. Setas vermelhas indicam células arredondadas, em suspensão e com coloração castanha.

6.2 Padronização e Estabilidade dos Esferoides Tridimensionais

Para que o esferoide magnético se mantenha estável, é necessário que ocorram interações célula-célula e célula-matriz extracelular, pois enquanto suspensas, são forçadas a realizar ligações de adesão umas com as outras, sintetizando matriz extracelular.

Desta forma, a padronização dos esferoides é necessária para que os resultados dos experimentos sejam confiáveis e não ocorra a sua desestruturação durante as análises. Para isso, as células SKOV3 foram homogeneizadas com as nanopartículas, plaqueadas em placa de 96 poços *Cell Repellent* em triplicatas contendo 25, 50, 75 e 100 mil células (Figura 5A). A placa foi montada sobre um drive magnético (*spheroid drive*) e após 24 horas foi avaliada a estabilidade dos diferentes esferoides em microscopia de luz invertida.

A estabilidade foi mensurada através da observação da formação de uma zona externa de proliferação, originando um anel regular visível, coesão entre as células e compactação da borda, sem células soltas na periferia do esferoide (Figura 5B). Concluímos que, para o tipo celular do nosso estudo, o esferoide mais estável foi aquele constituído por 50 mil células.

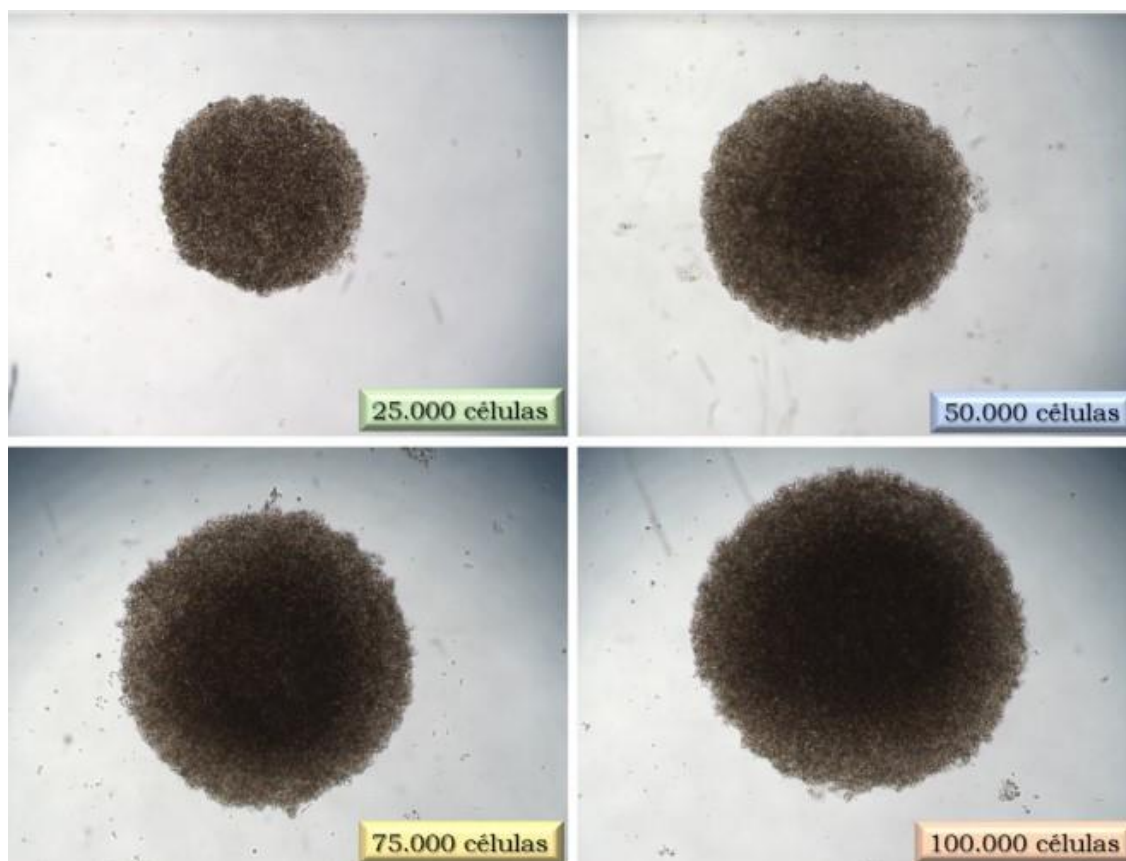


Figura 5A. Avaliação qualitativa da formação dos esferoides nas quantidades de 25.000, 50.000, 75.000 e 100.000 células.

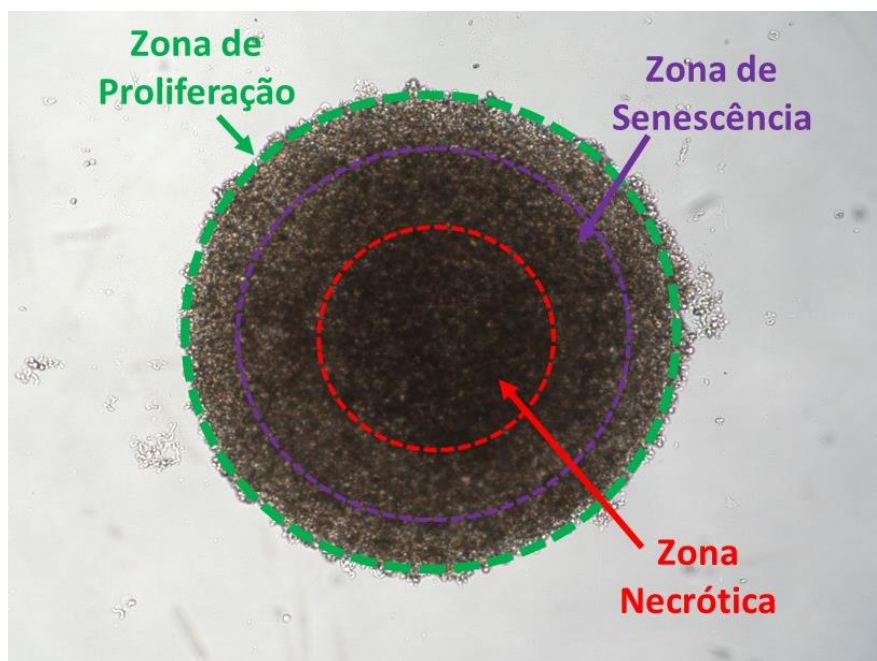


Figura 5B. Esferoide formado por 50.000 células SKOV3 ilustrando as diferentes zonas: **proliferativa** (em verde) é a região mais externa contendo células em divisão celular, ótimo PH, e maior nutrição; **senescência** (em roxo) é a região intermediaria onde as células não estão mais em proliferação e apresentam menor taxa de oxigenação; **necrótica** (em vermelho) onde as células já não recebem mais a oxigenação e nutrientes necessários.

6.3 Viabilidade Celular dos Esferoides Tridimensionais

6.3.1 Ensaio PrestoBlue

A viabilidade das células SKOV3 em modelo 3Dm, foi analisada através da quantificação da fluorescência do composto PrestoBlue (Figura 6). Os grupos experimentais foram CT, PTX, 10 μ M de AA e 10 μ M de AA + PTX, por 24 horas.

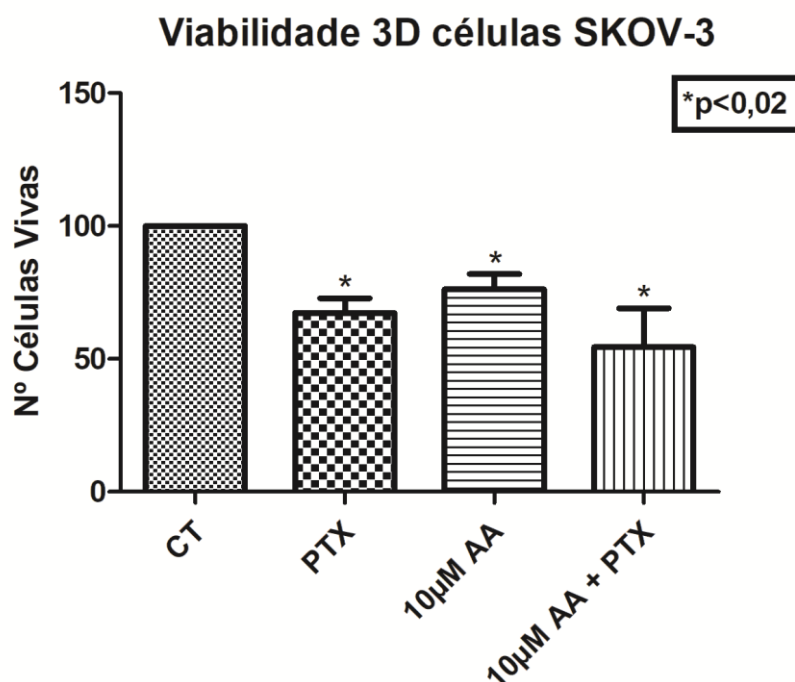


Figura 6. Viabilidade das células SKOV-3 em modelo 3Dm por 24 horas, utilizando o ensaio fluorescente. Grupo CT 100% ($\pm 0,0$); Grupo PTX 67% ($\pm 9,39$); Grupo 10 μ MAA 76% ($\pm 9,95$); Grupo 10 μ MAA+PTX 54% ($\pm 25,37$).

A viabilidade em todos os grupos experimentais foi estatisticamente menor que a do grupo CT, com destaque para o grupo combinado entre composto AA e o antineoplásico PTX, que apresentou diminuição de quase 50% na viabilidade celular.

6.3.2 Ensaio Live and Dead – Viabilidade Celular

Os esferoides das SKOV3 em modelo 3Dm foram tratados por 24 horas com PTX, 10 μ M AA e os compostos em combinação e corados com calceína-AM verde fluorescente para indicar as células que estavam viáveis (Figuras 7 e 9).

O grupo CT apresentou 100% de viabilidade, onde a média dos valores brutos foi igual a 720,21; O grupo PTX apresentou 53% de viabilidade, com a média igual a 380,07; O grupo 10 μ M AA ficou 43% viável com média 311,49; e o grupo 10 μ M AA+PTX 57% viável com média 57,55.

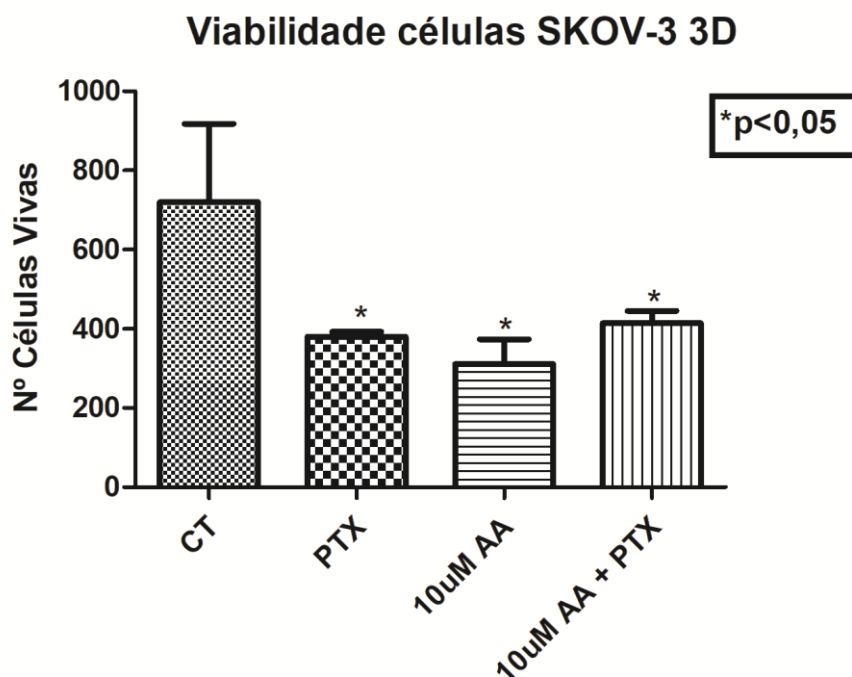


Figura 7. Viabilidade por ensaio de fluorescência Live & Dead em 24 horas com células SKOV-3 em modelo 3Dm. Grupo CT 100% ($\pm 342,65$); Grupo PTX 53% ($\pm 22,54$); Grupo 10 μ MAA 43% ($\pm 107,24$); Grupo 10 μ MAA+PTX 57% ($\pm 53,89$).

Através deste teste, aproximadamente todos os grupos apresentaram células 50% menos viáveis, quando comparadas com o grupo CT, mostrando também a eficácia dos compostos no tratamento de células no modelo tridimensional.

6.4 Ensaio de Apoptose

6.4.1 Ensaio Live and Dead - Apoptose

Para o teste de apoptose celular, os esferoides de células SKOV3 foram tratados por 24 horas com PTX, 10 μ M AA e os compostos em combinação e corados com homodímero-1 de etídio fluorescente vermelho para indicar perda de integridade da membrana plasmática (Figuras 8 e 9).

O grupo CT apresentou apenas 2% de morte celular com média dos valores brutos 15,77; o grupo PTX apresentou 3% de morte celular com média dos valores em 25,74; o grupo 10 μ M AA mostrou 4% de morte com média 35,59; e o grupo 10 μ M AA+PTX 3% de morte com 24,39 de média.

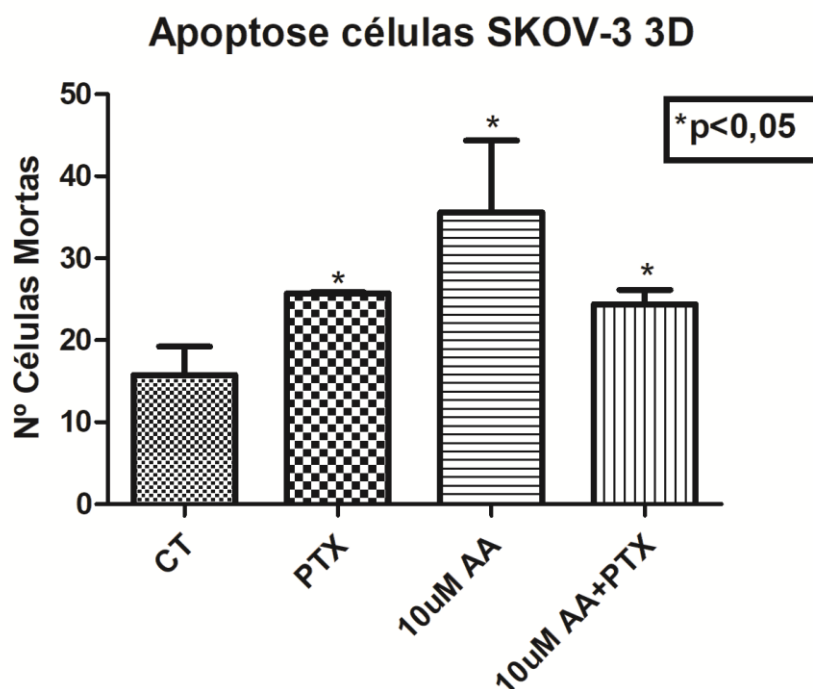


Figura 8. Apoptose por ensaio de fluorescência Live & Dead em 24 horas com células SKOV-3 em modelo 3Dm. Grupo CT 2% ($\pm 5,97$); Grupo PTX 3% ($\pm 0,25$); Grupo 10 μ MAA 4% ($\pm 15,19$); Grupo 10 μ MAA+PTX 3% ($\pm 3,04$).

A maior taxa de mortalidade foi encontrada nos esferoides dos grupos expostos, quando comparados com o CT. Esses resultados se complementam com os anteriores encontrados pelo mesmo teste na viabilidade, como por exemplo, o grupo 10 μ M AA que mostrou uma maior taxa de apoptose e um menor número de células vivas.

Viabilidade e Apoptose SKOV-3 24 horas

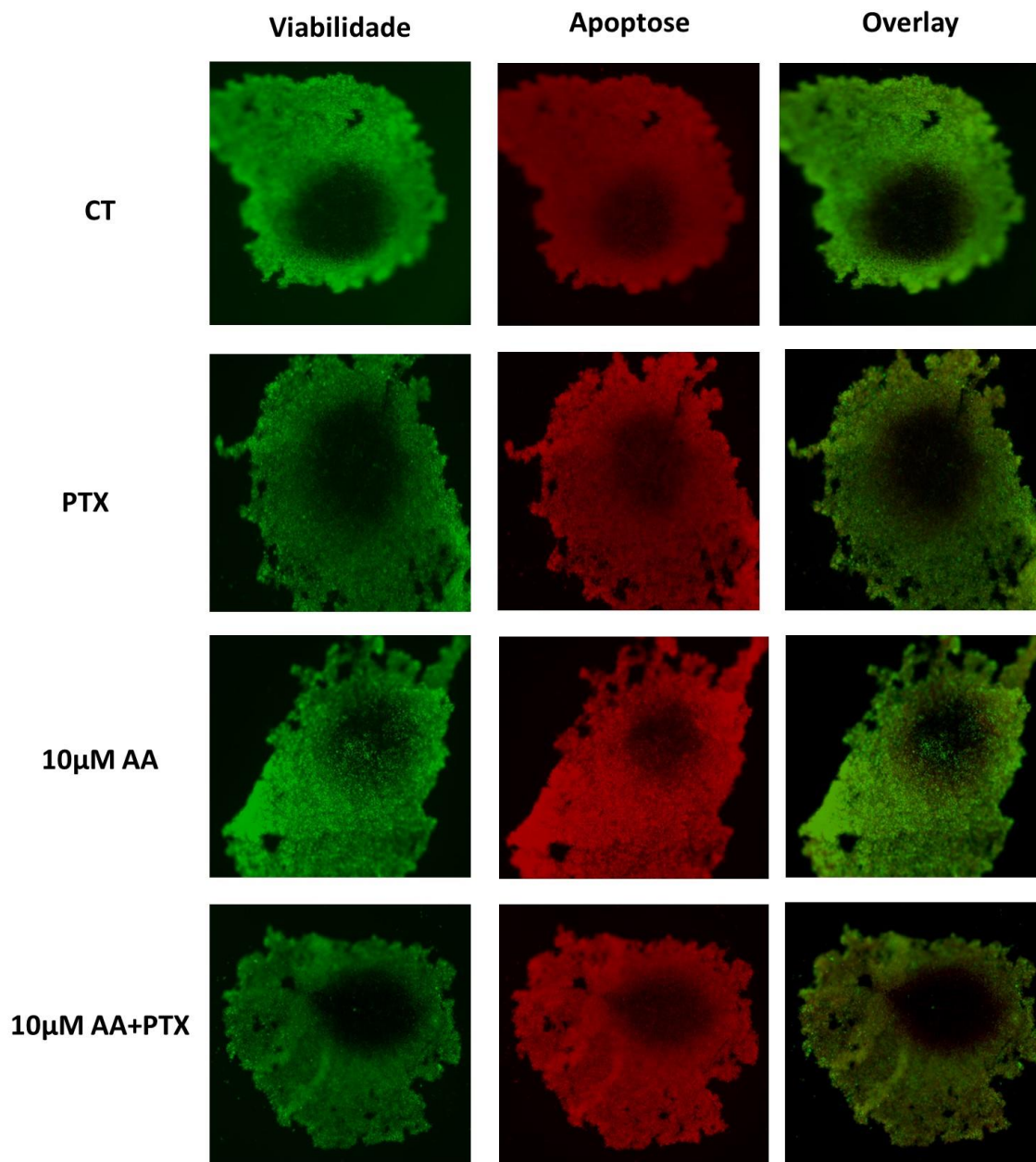


Figura 9. Marcação por fluorescência de calceína (viabilidade) e etídio (apoptose) em esferoides de células SKOV3 nos grupos CT (Controle); PTX (Paclitaxel); 10μM AA e AA + PTX por 24 horas.

7. Discussão e Conclusão

Muitas pesquisas objetivam encontrar uma abordagem terapêutica eficaz que seja capaz de prolongar a sobrevida de pacientes com câncer e que busquem por uma vida livre de progressão do tumor (Fei-Zhang et al., 2016; Zhou et al., 2020). Para isso, alguns estudos avaliam o papel de compostos que auxiliem no tratamento dessa doença, além de restaurarem o potencial de drogas quimioterápicas já existentes e que podem acabar perdendo parte de sua eficácia durante o tratamento (Schultz et al., 2010; Pistollato et al., 2017; Park et al., 2018; Kushwah et al., 2018; Zhou et al., 2020). Pistollato e colaboradores (2017) analisaram mais de 25 compostos naturais que foram capazes de auxiliar no tratamento do CO, mostrando a importância dessa linha de pesquisa e do uso desses compostos na vida desses pacientes.

Os nossos resultados revelaram que o AA diminuiu o crescimento das células tumorais ovarianas cultivadas em 2D e nos esferoides cultivados em 3Dm, além de se mostrar mais efetivo quando combinado ao PTX, o que contempla a hipótese desse estudo.

As células SKOV3 tratadas em 2D com diferentes concentrações do AA (2,5µM, 5µM, 10µM e 15µM), apresentaram viabilidade dose-dependente, que foi inconstante entre os grupos, porém mostrando-se sempre menor que a viabilidade encontrada nos grupos CT e PTX isolado. Quando organizadas no esferoide 3Dm, a viabilidade dessas células caiu para aproximadamente 50% no grupo 10µM AA+PTX, mantendo-se próximo ao valor encontrado no grupo PTX isolado, o que reforça a necessidade de novas repetições experimentais para o melhor entendimento desse resultado.

Os nossos achados para a ação do AA na viabilidade celular corroboram com estudos descritos na literatura. Tan e colaboradores (2012) observaram resultados semelhantes em células de câncer de próstata, onde o AA foi capaz de inibir a proliferação das células LNCaP, induzir a parada do ciclo celular G1 / S e promover a apoptose das células. Park e colaboradores (2018), também observaram queda na viabilidade celular e um aumento da citotoxicidade em células de câncer pancreático cultivadas em 2D ou 3D e tratadas com os quimioterápicos 5-fluorouracil ou gemcitabina associados ao AA.

O aumento da eficácia do PTX no tratamento de células de CO, quando associado a compostos naturais, foi reportado em estudos anteriores (Kuittinen et al., 2017; Pashaei-Asl et al., 2018; Zhou et al., 2020), corroborando com os nossos achados, mas evidenciando os nossos dados inéditos da combinação entre PTX e AA. Kuittinen e

colaboradores (2017), testaram o efeito dos quimioterápicos PTX e Carboplatina (ambos usados no tratamento de primeira linha) combinado a vitamina D em diferentes linhagens de CO. Os seus resultados mostraram que a combinação da vitamina D junto ao PTX e a Carboplatina, foi capaz de diminuir em 61%, 46% e 58% o crescimento das células tumorais nas respectivas linhagens de CO: CO mucinoso, CO seroso e CO endometrióide. Já Pashaei-Asl e colaboradores (2018), mostraram a eficácia do composto silibininina, composto esse extraído da planta *Silybum marianum*, junto ao PTX sobre células SKOV3. Seus achados mostraram a inibição da proliferação celular, super expressão dos genes *P53* e *P21*, que são genes envolvidos no processo de apoptose, mostrando que os compostos associados se mostraram mais eficazes que quando isolados. Zhou e colaboradores (2020), combinaram o composto Tanshinone I (Tan-I), que é utilizado pela medicina Chinesa, com o PTX para o tratamento de células de CO, onde o Tan-I conseguiu aumentar efetivamente a ação do PTX no controle da proliferação, migração e promoção da morte celular.

O estudo de Xiu e colaboradores (2014) tratou células SKOV3 e HO8910 em modelo 2D, com AA nas concentrações de 0µM, 2,5µM, 5µM, 10µM, 15µM e 20µM de AA, sendo o único que aborda a ação do AA em CO. Este estudo mostra que as concentrações de 10, 15 e 20µM de AA induziram aumento significativo na viabilidade dessas células. Eles também avaliaram indicadores relacionados à via de apoptose, como a caspase 3, e descobriram que seus níveis de expressão de mRNA e proteína foram significativamente mais baixos em células expostas ao AA, sugerindo então que o AA possa ter uma função pró-tumoral no CO. Esses resultados são contraditórios aos nossos achados, onde o AA aumentou a taxa de morte celular, analisada tanto pelo teste de viabilidade como pelo teste de apoptose. Novas repetições dos nossos experimentos serão realizadas para a confirmação dos nossos resultados e apresentação dos mesmos na literatura.

Em conclusão, os nossos achados revelam que o AA isolado, mas principalmente combinado com o quimioterápico PTX, diminui a viabilidade e aumenta as taxas de apoptose em células de CO. Como principal achado, destacamos o papel do AA na melhora da eficácia dos efeitos antitumorais do PTX em células de CO, contribuindo com a diminuição da resistência dessas células tumorais aos tratamentos de rotina.

8. Referências Bibliográficas - Capítulo 1

- Ahmed SA, Gogal Jr RM & Walsh JE. 1994. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H] thymidine incorporation assay. *Journal of immunological methods*, 170(2), 211-224.
- Alam-Escamilla D, Estrada-Muniz E, Solís-Villegas E, et al. 2015. Genotoxic and cytostatic effects of 6-pentadecyl salicylic anacardic acid in transformed cell lines and peripheral blood mononuclear cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 777: 43-53.
- Alhaque S, Themis M, & Rashidi, H. 2018. Three-dimensional cell culture: from evolution to revolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 373(1750), 20170216.
- Chen, Z., Li, Y., Tan, B., Zhao, Q., Fan, L., Li, F., & Zhao, X. 2020. Progress and current status of molecule-targeted therapy and drug resistance in gastric cancer. *Drugs of Today (Barcelona, Spain: 1998)*, 56(7), 469-482.
- Corrò, C., Novellasdemunt, L., & Li, V. S. 2020. A brief history of organoids. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 319(1), C151-C165.
- Dinic J, et al. 2015. New Approaches With Natural Product Drugs for Overcoming Multidrug Resistance in Cancer. *Curr Pharm Des* 21(38): 5589-5604.
- Duval K, Grover H, Han LH, Mou Y, Pegoraro AF, Fredberg J, & Chen Z. 2017. Modeling physiological events in 2D vs. 3D cell culture. *Physiology*, 32(4), 266-277
- Fei-Zhang, D. J., Li, C., & Cao, S. (2016). Hawaii natural compounds are promising to reduce ovarian cancer deaths. *Cancer biology & therapy*, 17(7), 709-712.
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Parkin, D. M., Piñeros, M., Znaor, A., & Bray, F. (2021). Cancer statistics for the year 2020: An overview. *International Journal of Cancer*.
- Hosein Farzaei, M., Bahramsoltani, R., & Rahimi, R. 2016. Phytochemicals as adjunctive with conventional anticancer therapies. *Current pharmaceutical design*, 22(27), 4201-4218.
- Jaganathan H, et al. 2014. Three-dimensional in vitro co-culture model of breast tumor using magnetic levitation. *Sci Rep* 4: 6468.
- Kim JY, Cho CH, & Song HS. 2017. Targeted therapy of ovarian cancer including immune check point inhibitor. *The Korean journal of internal medicine*, 32(5), 798.
- Kuittinen, T., Rovio, P., Staff, S., Luukkaala, T., Kallioniemi, A., Grenman, S., & Mäenpää, J. 2017. Paclitaxel, carboplatin and 1, 25-D3 inhibit proliferation of endometrial cancer cells in vitro. *Anticancer research*, 37(12), 6575-6581.
- Kushwah V. 2018. Improved antitumor efficacy and reduced toxicity of docetaxel using anacardic acid functionalized stealth liposomes. *Colloids Surf B Biointerfaces* 172: 213-223.
- Legut M, Lipka, D, Filipczak N, Piwoni A, Kozubek A & Gubernator J. 2014. Anacardic acid enhances the anticancer activity of liposomal mitoxantrone towards melanoma cell lines—in vitro studies. *International journal of nanomedicine*, 9, 653.
- Leonard F, Collnot EM, & Lehr CM. 2010. A three-dimensional coculture of enterocytes, monocytes and dendritic cells to model inflamed intestinal mucosa in vitro. *Molecular pharmaceutics*, 7(6), 2103-2119.
- Lewandowska, A. M., Lewandowski, T., Rudzki, M., Rudzki, S., & Laskowska, B. 2021. Cancer prevention—review paper. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 28(1), 11-19.
- Lupi LA, Delella FK, Cuciolo MS, Romagnoli GG, Kaneno R, Nunes IDS & Chuffa LGDA. 2020. P-MAPA and Interleukin-12 Reduce Cell Migration/Invasion and Attenuate the Toll-Like Receptor-Mediated Inflammatory Response in Ovarian Cancer SKOV-3 Cells: A Preliminary

- Study. *Molecules*, 25(1), 5.
- Marine, J. C., Dawson, S. J., & Dawson, M. A. 2020. Non-genetic mechanisms of therapeutic resistance in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 20(12), 743-756.
- Monk BJ, & Coleman RL. 2009. Changing the paradigm in the treatment of platinum-sensitive recurrent ovarian cancer: from platinum doublets to nonplatinum doublets and adding antiangiogenesis compounds. *International Journal of Gynecologic Cancer*, 19(Suppl 2), S63-S67.
- Nambiar J, Bose C, Venugopal M, Banerji A, Patel TB, et al. 2016. Anacardic acid inhibits gelatinases through the regulation of Spry2, MMP-14, EMMPRIN and RECK. *Experimental cell research*, 349(1): 139-151.
- Ornish D, Weidner G, Fair WR, Marlin R, et al. 2005. Intensive lifestyle changes may affect the progression of prostate cancer. *The Journal of Urology* 174(3): 1065-1070.
- Ottevanger PB. 2017. Ovarian cancer stem cells more questions than answers. In *Seminars in cancer biology*(Vol. 44, pp. 67-71). Academic Press.
- Park M, Upton D, Blackmon M, et al. 2018. Anacardic acid inhibits pancreatic cancer cell growth, and potentiates chemotherapeutic effect by Chmp1A-ATM-p53 signaling pathway. *BMC complementary and alternative medicine*, 18(1): 71.
- Pashaei-Asl, F., Pashaei-Asl, R., Khodadadi, K., Akbarzadeh, A., Ebrahimie, E., & Pashaiasl, M. 2018. Enhancement of anticancer activity by silibinin and paclitaxel combination on the ovarian cancer. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 46(7), 1483-1487.
- Pistollato, F., Iglesias, R. C., Ruiz, R., Aparicio, S., Crespo, J., Lopez, L. D., & Battino, M. 2017. The use of natural compounds for the targeting and chemoprevention of ovarian cancer. *Cancer letters*, 411, 191-200.
- Rais, J., Jafri, A., Siddiqui, S., Tripathi, M., & Arshad, M. 2017. Phytochemicals in the treatment of ovarian cancer. *Frontiers in bioscience (Elite edition)*, 9, 67-75.
- Ravi M, Paramesh V, Kaviya SR, Anuradha E, & Solomon FP. 2015. 3D cell culture systems: advantages and applications. *Journal of cellular physiology*, 230(1), 16-26.
- Rege MD, Ghadi R, Katiyar SS, Kushwah V & Jain S. 2018. Exploring an interesting dual functionality of anacardic acid for efficient paclitaxel delivery in breast cancer therapy. *Nanomedicine*, 14(1): 57-75.
- Schultz DJ, Wickramasinghe NS, Ivanova MM, Isaacs SM, et al. 2010. Anacardic acid inhibits estrogen receptor α -DNA binding and reduces target gene transcription and breast cancer cell proliferation. *Molecular cancer therapeutics*, 1535-7163.
- Seong YA, Shin PG, Yoon JS, et al. 2014. Induction of the endoplasmic reticulum stress and autophagy in human lung carcinoma A549 cells by anacardic acid. *Cell biochemistry and biophysics*, 68(2): 369-377.
- Siegel RL, Miller KD & Jemal A. 2019. Cancer statistics, 2019. *CA: a cancer journal for clinicians*, 69(1), 7-34.
- Sung B, Pandey MK, Ahn KS, et al. 2008. Anacardic acid (6-nonadecyl salicylic acid), an inhibitor of histone acetyltransferase, suppresses expression of nuclear factor-kappaB-regulated gene products involved in cell survival, proliferation, invasion, and inflammation through inhibition of the inhibitory subunit of nuclear factor-kappaBalpha kinase, leading to potentiation of apoptosis. *Blood* 111(10): 4880-4891.
- Tan, J., Chen, B., He, L., Tang, Y., Jiang, Z., Yin, G., & Jiang, X. 2012. Anacardic acid (6-pentadecylsalicylic acid) induces apoptosis of prostate cancer cells through inhibition of androgen receptor and activation of p53 signaling. *Chinese Journal of Cancer Research*, 24(4), 275-283.
- Wang, X., Pan, L., Mao, N., Sun, L., Qin, X., & Yin, J. 2013. Cell-cycle synchronization reverses

- Taxol resistance of human ovarian cancer cell lines. *Cancer cell international*, 13(1), 1-8.
- Xiu YL, Zhao Y, Gou WF, Chen S, Takano Y & Zheng HC. 2014. Anacardic acid enhances the proliferation of human ovarian cancer cells. *PLoS One*, 9(6), e99361.
- Yamada KM & Cukierman E. 2007. Modeling Tissue Morphogenesis and Cancer in 3D. *Cell* 130: 601–610.
- Zafar F, Gupta A, Thangavel K, Khatana K, Sani AA, Ghosal A & Nishat N. 2020. Physicochemical and Pharmacokinetic Analysis of Anacardic Acid Derivatives. *ACS omega*, 5(11), 6021-6030.
- Zhou, J., Jiang, Y. Y., Wang, H. P., Chen, H., Wu, Y. C., Wang, L., & Zhang, L. 2020. Natural compound Tan-I enhances the efficacy of Paclitaxel chemotherapy in ovarian cancer. *Annals of Translational Medicine*, 8(12).

CAPÍTULO 2

Análise de Genes Diferencialmente Expressos no Secretoma de Câncer de Pâncreas a partir de amostras de Alta Pureza

**Juliana Trindade Caleffi ¹; Mirian Carolini Esgoti Aal ¹; Gabriel Henrique Caxali ¹;
Robson Francisco Carvalho ¹; Flávia Karina Delella ¹**

¹ Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Instituto de Biociências, Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Botucatu, São Paulo, Brasil.

RESUMO

O Câncer de Pâncreas (CP) é um dos mais letais, sendo a sétima causa de morte por câncer no mundo. Isso ocorre, pois seu diagnóstico é tardio, devido à falta de sintomas, o que acaba levando a uma rápida progressão do tumor e a morte do paciente. Esse câncer é considerado uma doença agressiva, de alta resistência e metastática, mostrando sobrevida menor que 5% para os pacientes com este tipo de câncer. Devido a esses fatores, identificar potenciais biomarcadores para o prognóstico do CP se torna extremamente necessário, e o secretoma vem ganhando destaque neste contexto, permitindo a identificação de moléculas relacionadas com processos de invasão, migração tumoral e de resistência a quimioterápicos. Assim, nosso estudo teve como objetivo identificar genes diferencialmente expressos em amostras do secretoma de CP, através de plataformas da web como *XenaBrowser*, *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) e *Genotype-Tissue Expression* (GTEx), além dos bancos de dados pela web *EnrichR*, para identificação de vias moleculares associadas a esses genes. Nossos resultados identificaram um conjunto de quimiocinas das famílias CC e CXC relacionadas a progressão do tumor, metástase e quimioressistência no CP. Esses genes podem ser considerados possíveis biomarcadores para este tipo de câncer, além de serem potentes candidatos a possíveis alvos terapêuticos.

Palavras chave: câncer de pâncreas, secretoma, bioinformática, inflamação.

1. Introdução

O câncer de pâncreas (CP) é uma doença grave e um importante problema de saúde nos dias atuais (Li et al., 2004; Bray et al., 2018). Isso acontece devido ao diagnóstico clínico tardio, pela falta de sintomas iniciais e pela predisposição metástática (Li et al., 2004; Motoo et al., 2011; Momi et al., 2012; Bray et al., 2018). Sua detecção pode ser feita através de tomografia computadorizada, ressonância magnética e biópsias (Nobeschi et al., 2015). Porém, devido a sua localização, realizar biópsia se torna um grande desafio, além de ser extremamente invasivo (Turanli et al., 2021).

A forma mais comum de obter amostras de CP é por aspiração com agulha fina (Nobeschi et al., 2015). Esse método utiliza uma agulha calibre 21 a 25 e uma seringa, para retirar uma pequena quantidade de material do tumor (Turanli et al., 2021). A principal vantagem desse método é não requerer uma incisão, e em alguns casos é possível fazer o diagnóstico no mesmo dia, porém, é retirada apenas uma parte pequena do tecido. Um outro método, é a biópsia com agulha de núcleo, que pode fornecer uma amostra maior, e muitas vezes mais útil para o perfil molecular (Turanli et al., 2021).

Alguns métodos menos invasivos vem sendo propostos, como as biópsias líquidas, que oferecem biomarcadores tumorais circulantes em fluidos corporais, como o sangue, fluido de cisto, suco pancreático, bile, urina, saliva, entre outros fluidos (Wang et al., 2017; Zhang et al., 2020), trazendo uma alternativa para substituir as biópsias tradicionais do CP. Esses biomarcadores são moléculas secretadas pelo tumor, que recebem o nome de secretoma, e estão muitas vezes relacionadas com o diagnóstico e prognóstico do câncer, já que regulam processos que são fundamentais para a progressão, invasão e até mesmo resistência a fármacos (Jayanthi et al., 2017). Assim, esses biomarcadores tumorais vem ganhando grande interesse e destaque pelas pesquisas em geral (Capece et al., 2018; Turanli et al., 2021).

O melhor entendimento da progressão do CP e a inovação nas abordagens de detecção precoce por meio de rastreamento eficazes e rápidos, são passos cruciais para melhorar o prognóstico da doença. O uso de biomarcadores circulantes para rastreamento primário e a sua combinação com resultados de imagem e histopatológicos, mostram-se estratégias promissoras para o diagnóstico de CP. Além disso, esses biomarcadores podem servir para auxiliar no entendimento do câncer e na busca por alvos terapêuticos.

Uma técnica que pode ser usada para esse meio é a análise *in silico*, que devido a praticidade e confiabilidade dos dados, vem ganhando destaque nas pesquisas de biomarcadores. Essa análise se refere a estudos realizados em bancos de dados disponíveis

na internet como o *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) e *Genotype-Tissue Expression* (GTEx) (Jean-Quartier et al., 2018).

2. Justificativa e Hipótese

Conseguir intervir nos estágios iniciais do CP é um grande desafio, devido principalmente às dificuldades no diagnóstico. A detecção precoce desse câncer, auxilia em melhor prognóstico e melhor taxa de sobrevivência dos pacientes. Pensando nisso, as pesquisas recentes têm se esforçado para identificar novos biomarcadores que permitam a detecção precoce sem a necessidade de exames invasivos, como a biópsia.

Assim, acreditamos que os estudos *in silico* possibilitem melhor compreensão do tumor, além de auxiliar na procura por alvos terapêuticos, através do acesso à diversos bancos de dados de expressão gênica de amostras de pacientes disponíveis gratuitamente. Com isso, esperamos identificar genes de alta pureza secretados exclusivamente pelas células do CP, analisando quais estão diferencialmente expressos, as vias moleculares em que atuam e entender prognósticos atrelados aos mesmos, a partir dessas ferramentas computacionais.

3. Objetivos

3.1 Objetivos Gerais

Este estudo teve como objetivo realizar o levantamento e avaliar genes diferencialmente expressos no secretoma de câncer de pâncreas, a partir de amostras de alta pureza.

3.2 Objetivos Específicos

- ✓ Selecionar as amostras de alta pureza para o câncer de pâncreas;
- ✓ Identificar a expressão dos genes diferencialmente expressos (DEGs) que codificam proteínas secretadas;
- ✓ Observar vias metabólicas que são influenciadas por esses DEGS;
- ✓ Relacionar esses DEGs com processos fundamentais da progressão tumoral;
- ✓ Realizar a curva de sobrevivência atrelada aos DEGs.

4. Material e Métodos

4.1 Escolha do Secretoma de Referência

A lista com o secretoma utilizado como referência, foi obtida através do banco de dados *The Human Protein Atlas* (<https://www.proteinatlas.org/>). Foi selecionada a lista com 1708 proteínas secretadas no sangue, pelo cérebro, no sistema digestório, nos sistemas reprodutores masculino e feminino, na matriz extracelular, em locais variados como olho ou pele e locais desconhecidos. Tal lista foi escolhida, pois exclui as proteínas que estão associadas a membrana ou em compartimentos intracelulares, como endossomos ou lisossomos, e assim enfatiza apenas proteínas que são de fato secretadas pelos diversos tipos celulares.

4.2 Download dos Dados com as Amostras Normais e Tumerais

Após obter a lista com 1708 proteínas, esta foi submetida a plataforma *Xena Browser* (<https://xenabrowser.net/>). Nesta, foram colocados como parâmetros estudos que contemplassem amostras de tecido normal de pâncreas, obtidas do GTEx (*Genotype Tissue Expression*), e de tumor primário de adenocarcinoma pancreático do TCGA (*The Cancer Genome Atlas*). Posteriormente, foram selecionados os parâmetros: *Data type: Phenotypic; Phenotypic: sample type e primary site*. Enfim foram aplicados os filtros para tumores primários de pâncreas. Após isso, a lista do secretoma foi submetida à ferramenta, obtendo os dados do transcriptoma destas nas diferentes amostras encontradas nos demais bancos de dados. Os dados de expressão fornecidos pelo *Xena Browser* são valores transformados para viabilizar a comparação entre bases de dados diferentes (GTEx e TCGA), sendo expressos em $\log_2$ (normalized count +1).

4.3 Filtragem das Amostras Tumerais de Alta Pureza

As amostras de alta pureza de CP contidas na tabela suplementar do estudo de Raphael et al., 2017, foram confrontadas com as amostras de CP do TCGA obtidas através da ferramenta *Xena Browser*. Assim, apenas os dados de alta pureza seguiram para a análise de expressão diferencial, excluindo os demais.

As amostras de alta pureza do estudo de Raphael foram analisadas por duas etapas: eles dividiram sua coorte com base na pureza média em um conjunto de "alta pureza" de 76 amostras com pureza ABSOLUTA $\geq 33\%$ e um conjunto de "baixa pureza" de 74 amostras que tinha pureza ABSOLUTA $< 33\%$. Eles agruparam amostras de alta pureza usando abordagens não supervisionadas, obtendo conjuntos de genes e marcadores que eram mais propensos a refletir a biologia das células neoplásicas, ao invés da biologia do estroma misturado e outras células.

4.4 Análise de Expressão Diferencial

Para determinar quais genes estavam alterados no tecido tumoral em comparação ao normal, foi utilizada a ferramenta de análise estatística disponível no *Xena Browser*, a qual utiliza o método *Welch's test*. Os genes foram selecionados tomando um valor de $p < 0,01$.

4.5 Enriquecimento Funcional dos Genes Diferencialmente Expressos Encontrados

Para determinar as vias e processos biológicos influenciados pelos DEGs, foi utilizada a plataforma *EnrichR* (<https://maayanlab.cloud/Enrichr/>). Dentro desta, foram utilizados para as análises os bancos de dados: *Biological Process 2018*, *KEGG 2019 Human*, *Molecular Function* e *Reactome*. Dentre as bases de dados observadas, a base de dados *Biological Process 2018* apresentou maior relevância, pois contemplava os mesmos termos enriquecidos das demais, dessa forma optamos por utilizar apenas ela.

O uso deste banco de dados permitiu a identificação das vias que sofriam influência dos DEGs identificados, além dos processos biológicos envolvidos. Os genes diferencialmente expressos foram analisados e os gráficos foram gerados de acordo com o valor de p da ferramenta e porcentagem de genes enriquecidos por termo.

4.6 Construção de Rede de Interação entre os Genes Diferencialmente Expressos

Os conjuntos de genes relacionados aos termos enriquecidos foram submetidos à uma análise de interação proteína-proteína na ferramenta online *Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins* (STRING). Para análise da relação entre os genes consideramos os top 4 dos termos com menor *False Discovery Rate (FDR)* e, para a construção das redes, foram utilizados os seguintes parâmetros já estabelecidos por de Oliveira (2020): *Meaning of network edges: confidence; Active interaction sources: Experiments, database, co-expression, neighborhood, co-occurrence; Minimum required interaction score: high confidence de 0.900; Display simplifications: hide disconnected nodes in the network*.

4.7 Determinação de Prognóstico Arelado a DEGs

Com a identificação das vias e processos em destaque no tumor estudado, foram determinadas quais genes estão diretamente relacionados com tais processos. Posteriormente, foi avaliado o prognóstico atrelado a estes genes, através do dataset CBioPortal, *for câncer genômics* (<https://www.cbioportal.org/>), utilizando o banco de dados do estudo *Pancreatic*

Adenocarcinoma (TCGA, Firehose Legacy). Desta forma foram geradas as curvas de sobrevida geral para os genes destacados em um cluster gerado no String.

5. Resultados

5.1 Enriquecimento do Perfil de Expressão Gênica do Secretoma de Câncer de Pâncreas

Foram obtidas 244 amostras, sendo 167 amostras de tecido normal pertencentes a plataforma GTEx, e 77 pertencentes a tumores primários de pâncreas, depositados no banco de dados do TCGA. Após a seleção de apenas amostras de alta pureza, a análise de expressão diferencial revelou 414 genes diferencialmente expressos, considerando um valor de $p < 0,01$.

Para investigar a função dos DEGs, realizamos a análise de enriquecimento na plataforma online *EnrichR*. Selecionamos as bases de dados *Biological Process 2018*, *KEGG 2019 Human*, *Molecular Function* e *Reactome* e separamos os 5 primeiros termos de cada base de dados (Figura 1). Foi então que percebemos que uma única base de dados contemplava os mesmos termos das demais quando selecionávamos os 15 primeiros.

Biological Process 2018	Kegg 2019 Human	Molecular Function	Reactome
cytokine-mediated signaling pathway	Cytokine-cytokine receptor interaction	cytokine activity	Chemokine receptors bind chemokines Homo sapiens
cellular response to cytokine stimulus	Chemokine signaling pathway	chemokine activity	Cytokine Signaling in Immune system Homo sapiens
inflammatory response	IL-17 signaling pathway	chemokine receptor binding	Immune System Homo sapiens
chemokine-mediated signaling pathway	TNF signaling pathway	CCR chemokine receptor binding	Signaling by Interleukins Homo sapiens
lymphocyte chemotaxis	MAPK signaling pathway	CXCR chemokine receptor binding	Extracellular matrix organization Homo sapiens
granulocyte chemotaxis			
neutrophil chemotaxis			
monocyte chemotaxis			
neutrophil migration			
positive regulation of leukocyte chemotaxis			
positive regulation of MAPK cascade			
cellular response to tumor necrosis factor			
response to interleukin-1			
response to tumor necrosis factor			
regulation of inflammatory response			

Figura 1. Sequência dos termos apresentados pelas diferentes bases de dados encontradas na plataforma *EnrichR*.

Com isso, optamos por analisar apenas os termos apresentados pela base de dados do *Biological Process* (Figura 2). Observamos que os termos que mais se destacavam foram “*Chemokine*”, “*Cytokine*” e as células do sistema imune (“*Lymphocyte chemotaxis*”, “*Granulocyte chemotaxis*”, “*Neutrophil chemotaxis*”, “*Monocyte chemotaxis*”).

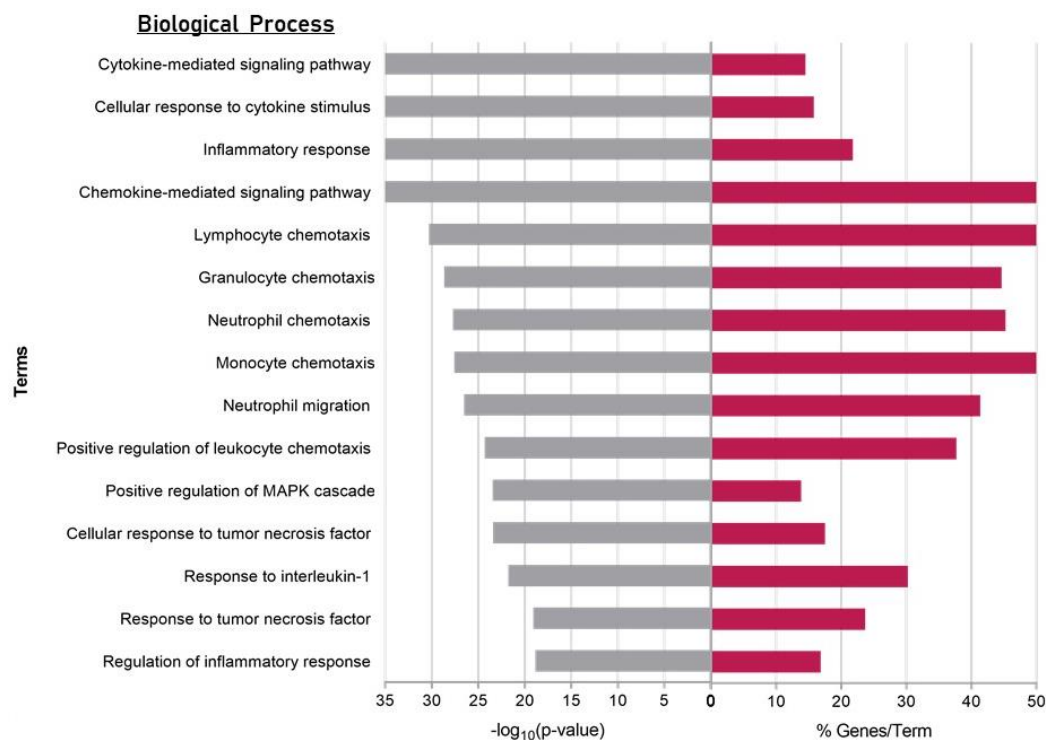


Figura 2. Análise de enriquecimento funcional dos DEGs obtidos no *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) em comparação aos tecidos normais correspondentes do *Genotype-Tissue Expression* (GTEx). Os dados são expressos em $-\log_{10}$ do valor de p (à esquerda, em cinza) e em porcentagem de genes enriquecidos por termo (à direita, em rosa).

5.2 Rede de Interação Proteína-proteína

Dentro dos 15 termos selecionados, submetemos os genes envolvidos nessas vias à uma análise de interação proteína-proteína (PPI) na ferramenta online *Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins* (STRING) (Figura 3).

Na análise do conjunto de genes diferencialmente expressos, dentre os 5 principais termos enriquecidos no UniProt, escolhemos 4 de maior interesse: *Cytokine*, *Secreted*, *Chemotaxis* e *Signal*, representados pelas cores contidas em cada nódulo da rede.

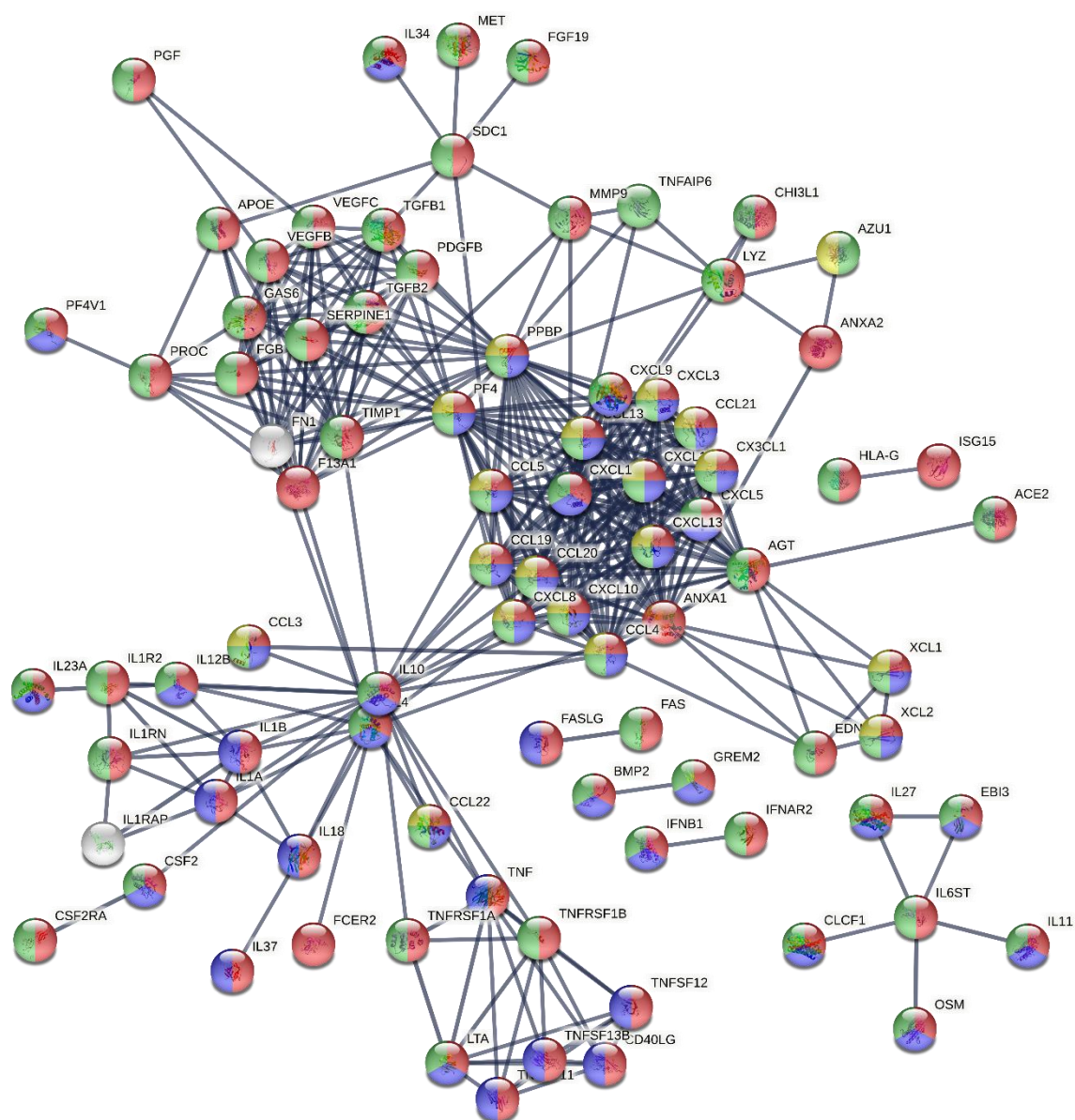


Figura 3. Rede de interação proteína-proteína dos genes diferencialmente expressos secretados no CP. A análise de STRING (<http://www.string-db.org>) ilustra as numerosas interações possíveis entre as proteínas secretadas com pontuação de confiança mínima de 0,9. Os quatro principais termos do UniProt enriquecidos são representados pelos nódulos coloridos da rede e indicam as proteínas envolvida em cada termo. Vermelho: *Secreted*; Azul: *Cytokine*; Verde: *Signal* e Amarelo: *Chemotaxis*.

Após a formação das possíveis interações dentro da rede de proteínas expressas, notamos a presença de um cluster em destaque contendo os genes *CCL19*, *CCL20*, *CCL5*,

CCL21, CCL13, CCL4, CXCL10, CXCL1, CXCL5, CXCL9, CXCL3, CXCL13, CXCL16 (Figura 4).

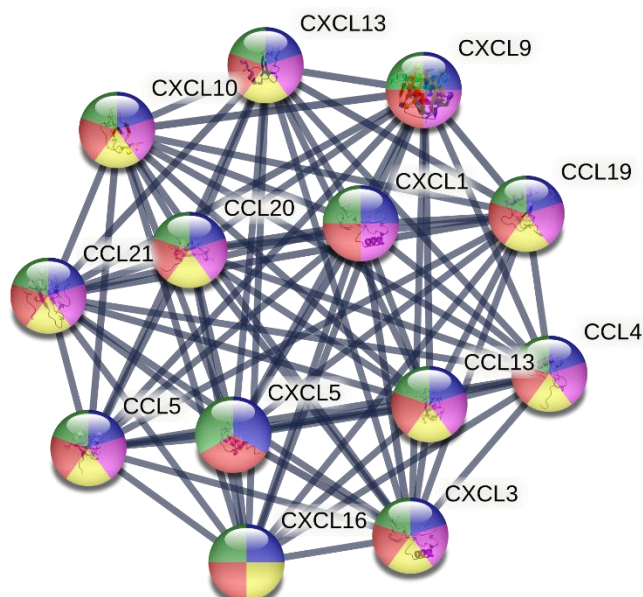


Figura 4. Cluster central gerando uma rede de interações entre genes relacionados à quimiocinas de resposta imune inflamatória. Os cinco principais termos do UniProt enriquecidos são representados pelos nódulos coloridos da rede e indicam as proteínas envolvida em cada termo. Vermelho: *Secreted*; Azul: *Cytokine*; Verde: *Signal*, Amarelo: *Chemotaxis* e Rosa: *Inflammatory response*.

Esse cluster traz genes que estão ligados a famílias CC e CXC de quimiocinas. Essas quimiocinas são mediadores pró-inflamatórios secundários induzidos por citocinas que estimulam o recrutamento de leucócitos. Elas estão muitas vezes relacionadas a promoção da tumorigênese, proliferação, metástase e angiogênese de uma variedade de cânceres (Kandikattu et al., 2020).

Devido a isso, escolhemos explorar esses genes para entender melhor qual é o papel dessas quimiocinas e como elas atuam no CP.

5.3 Curva de Sobrevida

O conjunto de 13 genes identificados na rede de interação PPI, foi analisado através do *dataset CBioPortal* e comparado aos dados do estudo do TCGA de *Firehose Legacy: Pancreatic Adenocarcinoma*, gerando curvas de sobrevida geral (A) e livre de doenças (B) destes genes, quando relacionados a pacientes com CP (Figura 5).

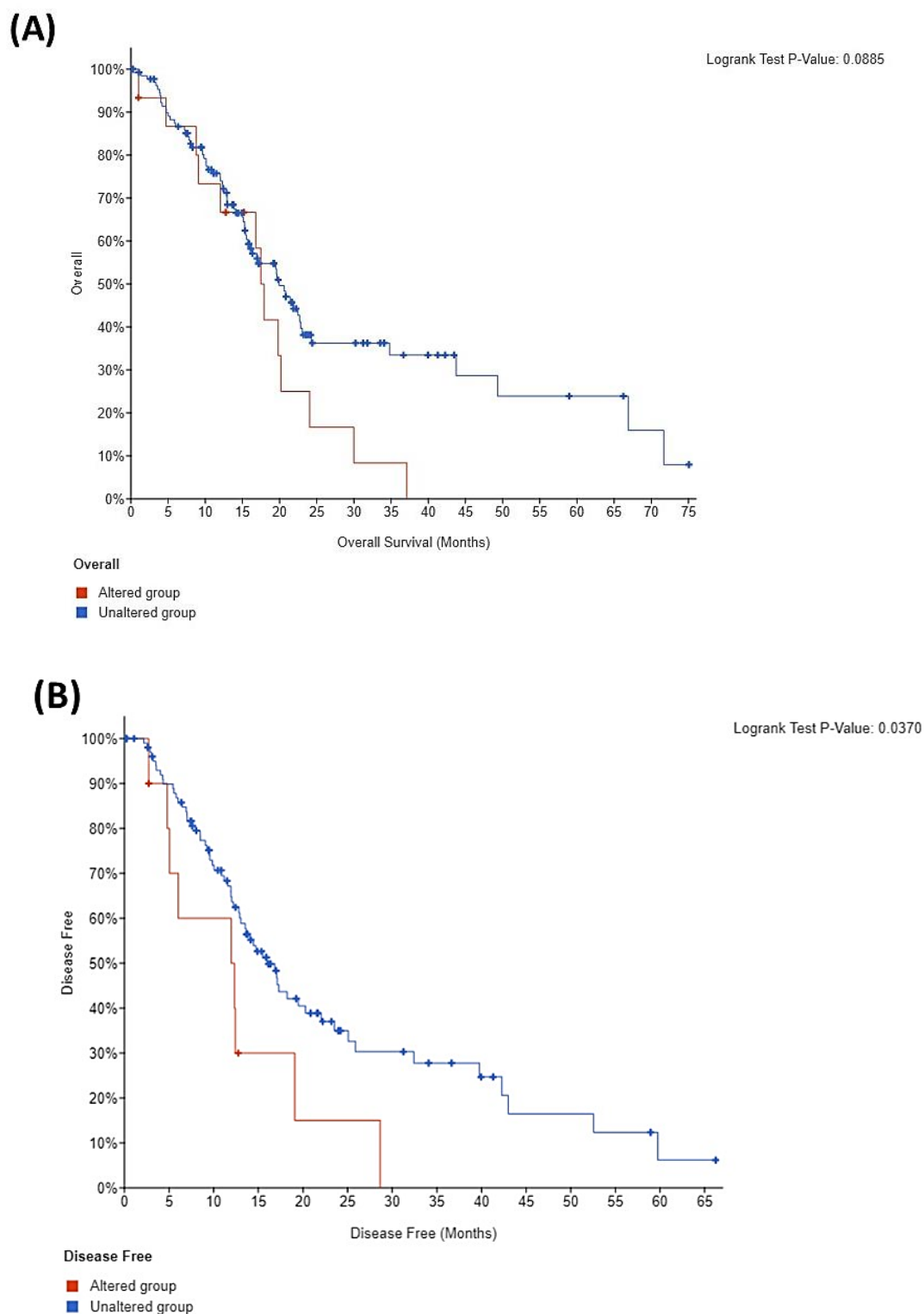


Figura 5. Curvas de sobrevida geradas para pacientes que apresentação uma alteração nos 13 genes do cluster de quimiocinas em CP. (A) Curva de sobrevida geral ($p\text{-value} < 0,08$). (B) Curva de sobrevida livre de doenças ($p\text{-value} < 0,03$).

Através desses gráficos, podemos observar que a atuação desses genes pode estar relacionada a uma pior taxa de sobrevivência dos pacientes com CP.

6. Discussão e Conclusão

O CP se desenvolve e progride por meio de processos biológicos complexos e cumulativos que envolvem distúrbio metabólico, inflamação local e vias moleculares desreguladas (Motoo et al., 2011). A progressão iniciada pela inflamação se dá muitas vezes em consequência a um processo inflamatório crônico, onde essa resposta prolongada favorece o microambiente tumoral devido aos fatores de crescimento e as espécies reativas de oxigênio (ROS) que ali se encontram (Momi et al., 2012).

Nossos achados trazem as duas principais famílias de quimiocinas inflamatórias, que são CC e CXC (Turner et al., 2014; Kandikattu et al., 2020). Essas quimiocinas são proteínas básicas que atuam como mediadores pró-inflamatórios secundários, induzidos por citocinas que estimulam o recrutamento de leucócitos (Kadomoto et al., 2020; Kandikattu et al., 2020; Wu et al., 2020). Além disso, também estão envolvidas na cicatrização de feridas, angiogênese, doenças inflamatórias, tumorigênese, proliferação, metástase e progressão de uma variedade de tumores (Singh et al., 2007; O'Hayre et al., 2008; Lee et al., 2018; Kadomoto et al., 2020; Kandikattu et al., 2020; Wu et al., 2020).

Embora as quimiocinas exerçam efeitos antitumorais, incluindo a indução de células T citotóxicas em tecidos tumorais, elas também são conhecidas por auxiliar as células que suprimem a imunidade tumoral, como macrófagos associados a tumor, células supressoras imunológicas derivadas de mielóide e células T reguladoras (Marcuzzi et al., 2019; Kadomoto et al., 2020; Liu et al., 2020).

As quimiocinas da família CC são conhecidas por influenciarem a inflamação alérgica e a progressão do câncer (Lee et al., 2018; Matsuo et al., 2009; Kandikattu et al., 2020). Já as quimiocinas da família CXC, regulam a angiogênese associada ao tumor, bem como as metástases de células cancerosas (Keeley et al., 2010; Lee et al., 2018; Kandikattu et al., 2020).

Quando procuramos por essas quimiocinas relacionadas ao CP, verificamos que praticamente todas estão ligadas a um pior prognóstico da doença. *CCL21*, *CCL5*, *CCL20*, *CXCL5*, *CXCL3*, *CXCL13*, *CXCL10* e *CXCL1* estão relacionadas a progressão e proliferação do CP; *CCL5*, *CCL20* e *CXCL5* estão associadas a invasão e metástase; e *CCL20*, *CXCL5*, *CXCL10* e *CXCL1* estão relacionadas a quimiorresistência (Keeley et al., 2010; Lee et al., 2018; Matsuo et al., 2009; Kandikattu et al., 2020).

As quimiocinas *CCL13*, *CXCL9*, *CCL19* e *CXCL16* não estão descritas na literatura estando relacionadas ao CP.

Um estudo de Hirth et al. (2020) apresentou que as quimiocinas *CCL21* e *CXCL10* promovem a migração de células de CP em direção aos neurônios sensoriais, o que relaciona essas quimiocinas a dor neste tipo de câncer. Além disso, como vimos em nossa análise de sobrevida, a maioria dos pacientes com CP que apresentam esse conjunto de quimiocinas, mesmo depois de não ter mais o câncer, estão relacionados a uma baixa taxa de sobrevida e podem apresentar metástase, já que pacientes com CP podem desenvolver doença metastática no momento do diagnóstico ou após a ressecção cirúrgica (Lee et al., 2018).

Dessa forma, concluímos que os genes encontrados e destacados nesse estudo podem servir como biomarcadores para o CP, além de serem possíveis alvos terapêuticos, onde o silenciamento desses genes pode auxiliar em uma melhor sobrevida dos pacientes.

7. Referências Bibliográficas - Capítulo 2

- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, & Jemal A. 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 68(6), 394-424.
- Capece, D., Verzella, D., Tessitore, A., Alesse, E., Capalbo, C., & Zazzeroni, F. 2018. Cancer secretome and inflammation: the bright and the dark sides of NF- κ B. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 78, pp. 51-61). Academic Press.
- de Oliveira, G., Paccielli Freire, P., Santiloni Cury, S., de Moraes, D., Santos Oliveira, J., Dal-Pai-Silva, M., & Francisco Carvalho, R. 2020. An Integrated Meta-Analysis of Secretome and Proteome Identify Potential Biomarkers of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancers*, 12(3), 716.
- Hirth, M., Gandla, J., Höper, C., Gaida, M. M., Agarwal, N., Simonetti, M., & Kuner, R. 2020. CXCL10 and CCL21 promote migration of pancreatic cancer cells toward sensory neurons and neural remodeling in tumors in mice, associated with pain in patients. *Gastroenterology*, 159(2), 665-681.
- Jayanthi, V. S. A., Das, A. B., & Saxena, U. 2017. Recent advances in biosensor development for the detection of cancer biomarkers. *Biosensors and Bioelectronics*, 91, 15-23.
- Jean-Quartier, C., Jeanquartier, F., Jurisica, I., & Holzinger, A. 2018. In silico cancer research towards 3R. *BMC cancer*, 18(1), 408.
- Kandikattu, H. K., Venkateshaiah, S. U., & Mishra, A. 2020. Chronic pancreatitis and the development of pancreatic cancer. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Immune, Endocrine & Metabolic Disorders)*, 20(8), 1182-1210.
- Kadomoto, S., Izumi, K., & Mizokami, A. 2020. The CCL20-CCR6 Axis in Cancer Progression. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(15), 5186.
- Keeley, E. C., Mehrad, B., & Strieter, R. M. 2010. CXC chemokines in cancer angiogenesis and metastases. *Advances in cancer research*, 106, 91-111.
- Li, D., Xie, K., Wolff, R., & Abbruzzese, J. L. 2004. Pancreatic cancer. *The Lancet*, 363(9414), 1049-1057.
- Liu, H., Yang, Z., Lu, W., Chen, Z., Chen, L., Han, S. & Cai, Y. 2020. Chemokines and chemokine receptors: A new strategy for breast cancer therapy. *Cancer medicine*, 9(11), 3786-3799.
- Lee, N. H., Nikfarjam, M., & He, H. 2018. Functions of the CXC ligand family in the pancreatic tumor microenvironment. *Pancreatology*, 18(7), 705-716.
- Marcuzzi, E., Angioni, R., Molon, B., & Calì, B. 2019. Chemokines and chemokine receptors: orchestrating tumor metastasization. *International journal of molecular sciences*, 20(1), 96.
- Matsuo, Y., Raimondo, M., Woodward, T. A., Wallace, M. B., Gill, K. R., Tong, Z. & Guha, S. 2009. CXC-chemokine/CXCR2 biological axis promotes angiogenesis in vitro and in vivo in pancreatic cancer. *International journal of cancer*, 125(5), 1027-1037.
- Momi, N., Kaur, S., Krishn, S. R., & Batra, S. K. 2012. Discovering the route from inflammation to pancreatic cancer. *Minerva gastroenterologica e dietologica*, 58(4), 283.
- Motoo, Y., Shimasaki, T., Ishigaki, Y., Nakajima, H., Kawakami, K., & Minamoto, T. 2011. Metabolic disorder, inflammation, and deregulated molecular pathways converging in pancreatic cancer development: Implications for new therapeutic strategies. *Cancers*, 3(1), 446-460.
- Nobeschi L, Bernardes W, & Favero N. 2015. Diagnóstico e prevenção do câncer de pâncreas. *Ensaio e Ciência: C. Biológicas, Agrárias e da Saúde*, 16(1).
- O'Hayre, M., Salanga, C. L., Handel, T. M., & Allen, S. J. 2008. Chemokines and cancer:

- migration, intracellular signalling and intercellular communication in the microenvironment. *Biochemical Journal*, 409(3), 635-649.
- Raphael, B. J., Hruban, R. H., Aguirre, A. J., Moffitt, R. A., Yeh, J. J., Stewart, C., & Lolla, L. 2017. Integrated genomic characterization of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer cell*, 32(2), 185-203.
- Singh, S., Sadanandam, A., & Singh, R. K. 2007. Chemokines in tumor angiogenesis and metastasis. *Cancer and Metastasis Reviews*, 26(3), 453-467.
- Turanli, B., Yildirim, E., Gulfidan, G., Arga, K. Y., & Sinha, R. 2021. Current State of “Omics” Biomarkers in Pancreatic Cancer. *Journal of Personalized Medicine*, 11(2), 127.
- Turner, M. D., Nedjai, B., Hurst, T., & Pennington, D. J. 2014. Cytokines and chemokines: at the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1843(11), 2563-2582.
- Wang, X., Kaczor-Urbanowicz, K. E., & Wong, D. T. 2017. Salivary biomarkers in cancer detection. *Medical Oncology*, 34(1), 1-8.
- Wu, B., Wang, J., Wang, X., Zhu, M., Chen, F., Shen, Y., & Zhong, Z. 2020. CXCL5 expression in tumor tissues is associated with poor prognosis in patients with pancreatic cancer. *Oncology letters*, 20(5), 1-1.
- Zhang, W. H., Wang, W. Q., Han, X., Gao, H. L., Li, T. J., Xu, S. S., & Liu, L. 2020. Advances on diagnostic biomarkers of pancreatic ductal adenocarcinoma: A systems biology perspective. *Computational and Structural Biotechnology Journal*.

CAPÍTULO 3

Magnetic 3D Cell Culture: State of the Art and Current Advances

Juliana Trindade Caleffi ¹; Mirian Carolini Esgoti Aal ¹; Helena Gallindo ¹; Bruno Pereira Crulhas ²; Amanda de Oliveira Ribeiro ¹; Flávia Karina Delella ¹

¹ São Paulo State University (UNESP), Institute of Biosciences, Department of Structural and Functional Biology, Botucatu, São Paulo, Brazil;

² Mayo Clinic, 200 1st Street SW St-11-14, Rochester, MN 55905, USA.

ABSTRACT

Cell culture is an important tool for the understanding of cell biology and behavior. *In vitro* cultivation has been increasingly indispensable for biomedical, pharmaceutical, and biotechnology research. Nevertheless, with the demand for *in vitro* experimentation strategies more representative of *in vivo* conditions, tridimensional (3D) cell culture models have been successfully developed. Although these 3D models are efficient and address important questions from different research areas, there are considerable differences between the existing techniques regarding both elaboration and cost. In the light of this, this review aims to describe the construction of 3D spheroids using magnetization, as well as to bring the most recent updates in this field. Magnetic 3D cell culture consists of the magnetization of monolayered cells using a mixture of gold, iron oxide, and poly-L-lysine nanoparticles, and posterior 3D spheroid formation in special plates with the assistance of magnets. Here we discuss the advances obtained by the utilization of this particular technique, such as tumor environment mimicking, *in vitro* reconstruction of tissues, cardiomyocytes, blood vessels engineering, bronchioles, pancreatic islets, toxicology, and cytotoxicity, among other aspects.

Keywords: tridimensional cell culture, magnetic nanoparticles, magnetic spheroid formation, magnetic ring formation.

Introduction

Cell culture technology is a traditional and well-established, very convenient method for studying cell characteristics and their responses to treatments in a more defined resolution without the variations found in vivo system. Briefly, cell culture is the process of maintaining and propagating cells in a favorable artificial environment, under defined conditions, and receiving adequate nutrition and supplementation [1].

Cell culture-based experiments offer some reliable advantages, such as the possibility to control both the physicochemical environment and the physiological conditions of the cells, usage of homogeneous and well-characterized cell populations, and to some extent the reduction of animal use [2]. In addition to the advantages of using cell culture, it is essential to understand its limitations, for example, concerns related to genomic instability of some lineages [3].

However, a range of researches has a positive outcome when using cultured cells, such as understanding of intracellular processes, genomics, proteomics, drug screening, toxicology, cell-cell-interactions, as well as applications based on cell products and secretions – bioreactor designs, gene therapy, and tissue engineering [2].

Traditionally, cells in culture grow in monolayers at the bottom of some culture vessel [1]. In these two-dimensional systems, all cells are exposed to similar levels of nutrients, growth factors, and cytokines, which do not appropriately mimic the tridimensional in vivo environment, and these factors are dynamically controlled in spatial gradients of concentration [4]. To improve the cell culture technique, several 3D *in vitro* cell cultures were proposed and have been used – based on hanging drop cultures, biopolymeric scaffolds, hydrogels, cell sheets, and others [5,6].

Overall, 3D platforms for cell culture mimic a better microenvironment where cells reside in vivo. Several researchers have shown that cells cultured in tridimensional architectures exhibit morphological, physiological, and transcriptional responses that accurately resemble in vivo cells but are lost or altered when the same cells are grown in 2D systems [7–10]. Nevertheless, while 3D cell culture platforms are available today, some of these systems hold technical challenges such as long times for spheroids formation, arduous handling – which impairs high throughput trials –, limited lifespan of the cell aggregate, and the use of non-human derived attachment substrates, such as Matrigel – which may restrain their clinical potential [11].

Among the diverse 3D methodologies for cell culture, the use of magnetic forces to obtain tridimensional cell aggregates emerged as a promising technique with the potential to

engineer *in vivo*-like structures to recapitulate native tissues. Magnetic 3D (m3D) cell culture methods rely on the magnetization of 2D cells culture platforms using treated nanoparticles, with subsequent application of a magnetic field generated by magnets displayed according to the m3D design used – to form spheroid [12,13] or toroidal [14,15] structures. Notably, the magnetic nanoparticles used in this cell culture platform have been demonstrated to be non-toxic, not affect cell proliferation and metabolism, and not inducing pro-inflammatory responses and oxidative stress [16,17].

Here, in this review, we will provide an overview of the m3D cell culture techniques, discussing technical aspects, differences for other tridimensional culture methods, implications in cell behavior, highlight the short and medium-term challenges of this technique. In addition, we sought to compile and analyze the recent studies that used m3D cell culture methods, we aim to discuss the advantages and limitations of this technique and point future directions towards the mimicking of the *in vivo* microenvironment with all the benefits of the *in vitro* manipulation.

General 3D cell culture

The term spheroid is often mistakenly associated with organoid as if they were synonyms. However, there are differences between these types of three-dimensional culture. Usually, the spheroid is defined by the use of only one type of epithelial cells, and the organoid has an association between several types of epithelial cells, and it always includes epithelial and mesenchymal cells [18].

The explant culture was one of the first three-dimensional cultures to be developed. It is carried out from the collection of a tissue fragment kept *in vitro* gels or semi-permeable membranes in the presence of an isotonic solution or nutrient medium. This method preserves the original architecture and the pool of cells within the tissue [19,20], however, the maintenance of the culture is limited to three weeks with subsequent tissue degradation. In addition, this technique does not allow the application of flow cytometry and imaging techniques [20].

When thinking about three-dimensional cultures, it is necessary to evaluate the main goal to which the product of the culture will be applied. In this way, it is possible to choose between techniques that include the use of scaffolds or scaffolds-free.

The scaffold-free technique is based on the cells' ability to form an extracellular matrix under high confluence [21]. This concept is characterized by two processes, first, the cellular self-organization without the use of external forces (such as cell sheet and scaffold-

free bioprinting), and self-assembly depending on natural characteristics without any external forces (use of non-adherent substrates) [22]. The main advantage of techniques is an easier visualization of spheroids in light microscopy, fluorescence, or confocal microscopy.

Secondly, The Cell Sheet technique is based on temperature difference, in which the use of a thermo-responsive plate enables the control of cell adhesion and detachment due to surface hydrophobicity [23]. One of the main advantages of using this method is the possibility of direct implantation to the host without the need for scaffolds. In addition, it preserves cell-cell and cell-matrix interactions, keeping signaling closer to *in vivo* [23]. However, this technique is expensive due to its high specificity, and it is also limited by cell numbers because it can produce a thick layer of cells leading to hypoxia [21].

There are several techniques to produce spheroids, such as hanging-drop and spinner flasks [19,24]. Hanging-drop is a scaffold-free technique in which droplets of the cell suspension are dispensed at the bottom of a Petri dish lid, from which they hang due to surface tension and spontaneously aggregate into spheroids by gravity. To prevent the droplet from drying out, a PBS solution is placed on the plate [20]. The main limitations of this technique are the difficulty of execution and dependence on the quality of the tissue available for analysis [20,25].

Spinner flasks (RWV) are most commonly used for large-scale production of tumor spheroids, in which cells are grown as multicellular aggregates in a stirred suspension [26]. The oxygenation and distribution of nutrients are guaranteed by a magnetic stirrer, which rotates by gently dragging the fluid, and any particles in it [27]. Although this system forms regular spheroids, continuous agitation adversely affects cell physiology, and fragmentation of the spheroids may occur [26].

Scaffolds are three-dimensional porous structures made up of biomaterials that support gas exchange, supply of nutrients, and growth factors. They can also function as vehicles for delivering therapies [28]. The most commonly used scaffolds are agarose, collagen, fibronectin, gelatin, laminin, and vitronectin. There are several types of scaffolds, which can be of organic and inorganic origin, the choice is based on the cell type, and the purpose of the study [6]. This type of structure allows cells to grow according to the extracellular matrix model [21]. Techniques using scaffolds can be divided into Hydrogels and Solid Scaffolds.

Hydrogels are derived from natural, synthetic, or semi-synthetic polymers [20]. They can be designed to provide structural support for cells to grow in specific shapes, trapping cells in an artificial extracellular matrix (matrix-embedded) environment or causing cells to migrate into the gel (matrix-on-top) [20,29]. One of the main characteristics of hydrogels for

3D culture is the generally isolated cells aggregates grow within the gel, which is beneficial for certain types of cells and assays [29]. These systems have some technical disadvantages, such as the sampling of secreted cellular products, as they are in the center of the gel [30].

Solid scaffolds have the advantage of withstanding greater mechanical forces, in addition to the possibility of being created following the exact needs of the microenvironment, ensuring and more excellent reproducibility. According to the need, there are a wide variety of various methods and applications of this type of scaffold, which can be produced with porous or fibrous matrices. Solid scaffolds have great commercial use, but one difficulty encountered is concerning the need for sutures during transplantation to the host to avoid displacement [29].

Microfluidics use microfabrication technology to study human physiology in the context of an organ, integrating different cell types through fluid circulation microchannels [30]. Currently, the three most relevant points of this technique are: a) ability to co-culture cells in a spatially controlled manner; b) generation and control of signaling gradients; c) perfusion integration. Through this model, analyzes involving the metastatic cascade are possible, from the co-culture of endothelial vessels with cancer cells, thus, this method has good reproducibility, cost-benefit, and easy handling [30,31]. Among the disadvantages of microfluidics are the slower growth rate and the increased occurrence of necrosis due to confinement [20].

The magnetic 3D cell culture technology

The use of nanoparticles in a controlled magnetized environment to cultivate cells was developed by the research group led by Glauco Souza, in 2010. Briefly, they reported the use of cell uptake and subsequent magnetic levitation of a bioinorganic hydrogel composed of M13-derived phage particles, and magnetic iron oxide and gold nanoparticles [13]. This assembling results in a material that preserves the biocompatibility of phage and gold nanoparticles [32] while acquires the capability of magnetic manipulating cultured cells [13]. Importantly, both the phage and gold nanoparticles used in this technique are approved by the United States Food and Drug Administration for use in several applications [33], while the magnetic iron oxide nanoparticles are proved to be harmless for mammalian cells [34,35]. Souza et al. [13] also demonstrated the cell culture shape could be manipulated with the intensity of the magnetic field and, after the assembling of the cell aggregate the shape remains even with the removal of the magnet.

After this first publication, the technique continued to be improved. Haisler et al. [12] proposed the use of a mixture of gold, iron oxide, and poly-L-lysine nanoparticles, named magnetic nanoparticles, that are no longer used in a hydrogel, but delivered to cells cultured in a 2D platform [12]. Posterior works also developed a strategy for the bioprinting of m3D structures [16] and a ring-shaped model for cell aggregation [15].

m3D models for cells aggregate formation

The three m3D cell culture methods – levitation, bioprinting, and ring formation (Figure 1) – use the same methodology for cell magnetization, which is based on the incubation of 2D-cultured cells with the magnetic nanoparticles for 12-24 hours for the absorption of the nanoparticles [14,17]. After magnetization, the 2D clusters of cells are dissociated by enzymatic digestion and the cells in suspension are transferred to the 3D apparatus, according to the specific m3D methodology to be followed.

In the *magnetic levitation method*, the magnetized and resuspended cells are seeded in 6 or 24-well culture plates or Petri dishes made of materials that prevent cell attachment. A neodymium magnet is then placed at the top of the plate, inducing the magnetized cells to levitate to the air-liquid interface where they aggregate by cell-cell and cell-extracellular matrix interactions, forming 3D structures. Thus, the magnetic levitation model uses no artificial substrate or specialized medium, and the obtained spheroids can be cultivated for long periods [12].

When using the *m3D bioprinting method*, the magnetized cells are seeded in 96, 384, or 1536-well culture plates, allocated atop of a structure containing individual neodymium magnets for each well of the culture plate. This apparatus applies gentle magnetic force to induce cell aggregation and matrix formation, printing spheroids at the bottom of each well plate. Posteriorly, these structures can be cultivated for long periods without the presence of magnets. This system overcomes the limitations of other platforms, allowing rapid, reproducible, and scalable spheroid formation. Besides, these magnetic forces can also be used to cultivate different cell lineages in co-culture with a proper spatial organization [16].

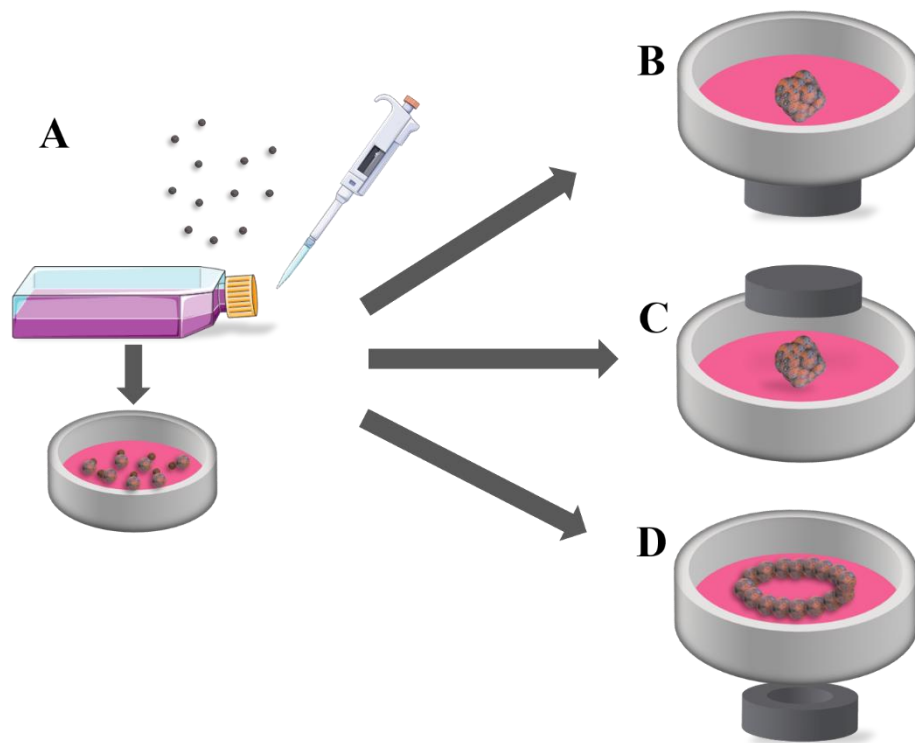


Figure 1: Schematic representation of the m3D culture methodology. A) Cells are cultured in 2D systems until the desired confluency, and posteriorly magnetized by nanoparticles. B) The magnetized cells may be printed in spheroids using low-adherence plates paced upon a neodymium magnet. C) Cells may also be printed in spheroids by levitation, in which a magnet placed on the top of the low-adherent plate attracts the spheroid to the air-liquid surface. D) It is also possible to perform contractility assays through the formation of rings using the magnetized cells. To perform such assays, it is necessary to use one of the aforementioned procedures to produce the matrix, and, subsequently, the spheroid is dissociated and re-seeded in a low-adherence well plate, placed on the top of a ring-shaped neodymium magnet.

Another method used for m3D cell culture is the formation of a ring-shaped tridimensional cell structure. In the ring formation model, the spheroids formed from the magnetized cells are broke-down by pipetting and transferred to 96-well non-adherent cell culture plates. This plate is added to a magnetic unit with ring-shaped neodymium magnets under each well, which induces the aggregation of the cells in a toroidal shape [15].

Applications of the magnetic 3D cell culture

Many studies have shown an enhanced representation of the cell *in vivo* microenvironment through m3D techniques (table 1). Souza-Araújo et al. [36] were able to mimic low-grade serous ovarian carcinoma growth through the magnetic levitation model, using the cell line CAISMOV24. They stated that obtained cell aggregates in 3D culture were

cytologically similar to cells found in peritoneal lavages or ascites from patients with ovarian cancer and the cells also exhibited morphology and molecular phenotypes that resembled functional epithelial ovarian cancer cells. They also reported the co-culture with peripheral blood mononuclear cells and the CAISMOV24 cells resulted in aggregates containing different subsets of lymphocytes, indicating that the m3D culture system is adequate for the investigation of lymphocytes interaction inside a tumoral microenvironment. Lastly, this study showed that the cell aggregates were shaped not only for the influence of the magnetic field but also for the self-organizing capacity of cells in a suitable co-culture configuration [36].

To investigate the effectivity of 3D cell aggregates in the representation of heterogeneous breast tumors, Jaganathan and colleagues [37] co-cultured several mammary tumor cell lines with fibroblasts in 3D environments. They focused on the effects of tumor stroma of the 3D cell aggregates on the transport and efficiency of anticancer drugs. The 3D tumor model formed by the m3D levitation technique was able to form bigger cell aggregates when compared to other culture systems – and at a faster growth rate – which is useful to evaluate hypoxic regions inside the tumor. Also, in the 3D co-culture microenvironment, tumor cells and fibroblasts interact with each other forming a complex extracellular matrix without artificial scaffolds or non-human derived compounds, mimicking the *in vivo* tumor microenvironment more precisely in terms of cell composition and density but also regarding the cells' response to drugs [37].

m3D culture systems are also promising for clinical applications not only related to cancer research, such as establishing an aortic valve model developed by Tseng and colleagues [38]. Although it is known that valve interstitial cells and endothelial cells act synergistically to maintain the cardiac valve structure and function, there are only a few co-culture models for these cell types. These authors then proposed a m3D system for the co-culture of VICs and VECs using levitation and, using immunohistochemistry techniques associated with phenotypic and functional biomarkers; they showed that the cells phenotype, function, and extracellular matrix formation was maintained [38]. Thus, this study is an essential step for future experiments towards the engineering of an artificial aortic valve with therapeutic applications.

Table 1: Major studies on m3D cell culture.

Cell Lines	Magnetic 3D Cell Culture Type	Application of Spheroids	References
<i>ASMCs and A10s</i>	Bioprinting of rings	Validate ring contraction as a measure of vasoactivity, using known vasoactive drugs.	[49]
<i>HEK293s and SMCs</i>	Bioprinting of rings	Magnetic ring closure as a novel 3D assay for drug toxicity screening.	[14]
<i>HUtSMCs and primary human uterine smooth muscle cells (SMCs)</i>	Bioprinting of rings	3D <i>in vitro</i> model for the evaluation of human uterine contractility.	[15]
<i>3T3 embryonic fibroblasts</i>	Bioprinting	Validate spheroid contraction as a cytotoxicity factor in response to 5 toxic compounds.	[16]
<i>Human dental pulp mesenchymal stem cell</i>	Bioprinting	Generate innervated secretory epithelial organoids from hDPSC.	[17]
<i>Valve interstitial cells (VICs) and valve endothelial cells (VECs)</i>	Levitation	Build a layered co-culture of the aortic valve.	[38]
<i>3T3-L1 preadipocytes and murine endothelial bEND.3</i>	Levitation	Simulate the complex 3D architecture of white adipose tissue, adding different populations of fat cells.	[39]
<i>Kras, HT-29, PANC-1, hM1, hT1, hM1-CAF and hT1-CAF</i>	Levitation	High-throughput screening to produce organoids in standard flat-bottom 384- and 1536- well plates.	[48]
<i>Primary cardiac rat cells</i>	Levitation	Use of magnetic nanoparticles and primary cardiac myocytes to levitate and cultivate multicellular cardiac aggregates.	[44]
<i>EpiCs, SMCs, PFs and PECs</i>	Levitation	Build a 3D co-culture model of the bronchioles wall.	[42]
<i>KRAS mutant A549 and EGFR mutant PC-9 cells</i>	Levitation	Response to the drug and the expression of cytokines IL-6 and IL-8 in relation to cellular proliferation and migration.	[46]
<i>EndoC-βH3, HUVECs and INS-1E</i>	Levitation	Understand whether the spatial distribution of the EndoC-βH3 cells and human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) impact the insulin production within 3D pseudo-islet cultures	[40]
<i>CAISMOV24 and donor peripheral blood mononuclear cells</i>	Levitation	To characterize the growth of low-grade serous ovarian carcinoma cells in a m3D culture system and evaluate aggregates of malignant cells	[36]

containing lymphocytes.			
<i>SUM159, MDA-MB-231, 293T, Hs785bst and Hs371.t</i>	Levitation	Simulate heterogeneous breast tumors without using a scaffold, allowing cell-cell and tumor-fibroblast interactions.	[37]

The *in vitro* reproduction of the unilocular adipose tissue is a challenging task due to its complex *in vivo* histoarchitecture – this tissue is composed of differentiated adipocytes, stromal mesenchymal stem cells, endothelial vascular cells, and infiltrating leucocytes. Since traditional *in vitro* studies do not successfully recapitulate this tissue complexity, Daquinag et al. [39] proposed a model for adipose tissue developed in a 3D platform using magnetic levitation. The authors showed that pre-adipocytes of the 3T3-L1 cell line remain viable in spheroids for an extended period rather than when they are cultivated in 2D systems. Moreover, when compared to cells cultured on flat surfaces, the differentiated 3D adipospheres exhibit more efficient lipid droplet accumulation and maintain the multicellular composition of the tissue – while 2D cultures tend to lose leucocytes. Besides, 3D adipospheres present an incipient vascularization represented by vessel-like structures, indicating that magnetically levitated cultures can recapitulate important events of the white adipose tissue organogenesis [39].

Urbanczyk et al. [40] pursued to recreate the complex microenvironment of the pancreatic islets using the m3D levitation method. Pancreatic beta cells are naturally surrounded by a vascular system that provides nutrition and oxygenation and facilitates cell-cell and cell-extracellular matrix interactions – and the loss of this microenvironment is a major limitation for successful pancreatic islets transplantation [41]. Thus, the authors co-cultured human beta-cells along with human umbilical cord epithelial cells in a 3D levitation platform and reported the formation of heterotypic pseudo-islets with defined spatial distributions of the two cell types – which was not possible in a spontaneous aggregation model because of the umbilical cord cells disassembling over time. In this study, the authors were able to successfully stimulate the secretory function of these beta-cells and verified that the histoarchitecture of the pseudo-islets – represented by the spatial distribution of the co-cultures – significantly affects beta-cells function [40].

Another example of m3D methods to recreate tissues with complex histoarchitecture was conducted by Tseng et al. [42]. These authors developed an organized m3D co-culture of bronchioles cultivating human lung microvascular endothelial cells, human tracheal smooth

muscle cells, human lung fibroblasts, and human bronchial epithelial cells using a magnetic levitation model. Using immunohistochemistry staining, they confirmed each of the four cells' phenotype and verified the formation of an organized extracellular matrix presenting type I collagen, laminin, and fibronectin synthesis. On the other hand, these extracellular matrix components were only poorly stained in 2D cell cultures. They also observed production and secretion of mucus by the epithelial cells – demonstrated by positive mucin-5AC staining – in the 3D co-culture for over 7 days, in the presence and absence of fetal bovine serum, indicating the maintenance of the epithelial function [42]. This model correlates with a previous lung tissue model for the study of airway remodeling, designed using cylindrical collagen gels coated with human pulmonary cells [43]. Nevertheless, while this collagen gel took 2–3 weeks to be assembled, and the coating cells were cultured for over 60 days, the m3D model takes only a few hours to be ready to use.

Nonetheless, Hogan et al. [44] recreated functional primary cardiomyocytes able to exhibit perceivable contraction after cultivated for four days, remaining contractile for an even longer culture period. The authors verified that the assembled cells had phenotypic stability, which is frequently difficult to observe in primary cardiomyocytes under culture conditions, representing a critical essential step in the culture of cardiac muscle-like tissue. This study also mimicked a 3D muscular cardiac tissue with functional and phenotypic stability. The authors also highlighted that the m3D model used in this study are more convenient than other methods, for example, the microfluidic- or scaffold-based systems, and rotational bioreactors – because of size or cost limitations, process complexity, and even constraints due to type or complexity of the employed material [44].

Spheroids made by the m3D bioprinting of human dental pulp stem cells, developed by Adine and colleagues [17], were transplanted to an *in vivo* model to evaluate their epithelial growth and innervation and their potential to assist in the regeneration of the salivary gland. After differentiation, these spheroids – exhibiting high cell viability rates and stable intracellular ATP activity compared to spheroids formed using methods free from magnetic nanoparticles – could express salivary gland epithelial compartments, product α -amylase upon FGF10 stimulation, and respond to neurostimulation. When transplanted, these artificial structures showed a significant capacity to stimulate the damaged *in vivo* salivary gland [17]. Although a previous study had already reported the development of functional salivary gland cells from human dental follicles [45], this result was accomplished using a xenogeneic scaffold upon more than 25 days of cells differentiation which may impair its

clinical translation potential. Therein, the m3D method used by Adine et al. [17] showed, in this context, to be a valuable tool for tissue engineering.

Magnetic 3D platforms are also useful for one continuous challenge in biomedical research – the need for robust but straightforward assays for cytotoxicity evaluation. Kiss et al. [46] used cell aggregates formed by the m3D bioprinting of lung adenocarcinoma cells as a model to predict the sensitivity of cancer cells to drugs commonly used for patients with advanced non-small-lung cancer (cisplatin and erlotinib). To better understand the drug effects on different mutation backgrounds, the 3D aggregates were formed using primary cancer cells obtained from patient samples, along with established immortalized lineages. The authors found the *in vitro* sensitivity tests using bioprinted cell aggregates presented results highly similar to the *in vivo* tests involving patients [46]. In addition, since mutations affect the response to therapeutic drugs [47], this technique is a promising tool for evaluating a more individualized drug choice for the treatment of cancer patients.

Tseng et al. [16] also analyzed, by the bioprinting technique, the cytotoxicity of 3T3 murine embryonic fibroblasts, by the contraction of the spheroid, in response to 5 toxic compounds: All-trans retinoic acid, Dexamethasone, Doxorubicin, 5'-fluorouracil, and Forskolin. The spheroids were able to contract immediately upon contact with the compounds due to cell reorganization and compacting, evidencing the response regarding the viability and organization of the cytoskeleton. Thus, the size of the spheroid is used as a simple metric for toxicity. The authors concluded that all compounds significantly reduced contraction in a dose-dependent manner and that m3D cells were more resistant to toxicity than 2D cells [16].

Following this line, Hou et al. [48] compared 2D and 3D cell culture assays in response to the cytotoxicity of 3300 drugs in 4 primary cell types associated with patient-derived pancreatic cancer KRAS mutants, including cancer-associated fibroblasts (CAFs). Their findings show that the bioprinting technique can be readily applied to optimize large-scale drug screening since when compared to 2D results, they showed better responses in 3D tumor models harvested directly from patients [48]. The group concludes the study as a key milestone for personalized medicine.

However, as in the spheroid model, the ring model also seeks to mimic the *in vivo* using an *in vitro* platform, seeking to understand better the cellular mechanisms and how diseases progress. An example is the mimicking of blood vessels, shown by Tseng and colleagues [49], who tested the potential of cell vasoactivity as a substitute for *in vivo* assessment of vasodilation and vasoconstriction. They used primary human aorta smooth muscle cells and rat vascular smooth muscle cells, printed on a m3D ring, altering the

contraction dynamics in response to a diverse set of vasodilators and vasoconstrictors. The *in vitro* responses of the rings corresponded to results predicted by *in vivo* pharmacology, structurally and functionally mimicking the main facets of the blood vessel segments. According to the authors, the nanoparticles were able to assist in the image by providing enhanced contrast and did not interfere in any clinical trial. Immunohistochemistry and the gene expression profile of these cells revealed that the contraction properties of the magnetically printed rings were consistent with the known vasoactive responses without affecting cell viability. In addition, the results and methods used in this study demonstrated the high adaptability of this assay for high-throughput and high-content screening, which can help overcome the limitations of existing *in vivo* assessments of vascular contraction and can replace the need to isolate fresh tissue from a live animal [49].

Human uterine contractility has also been studied in an *in vitro* model through the m3D ring formation with myometrial smooth muscle cells derived from patients [15]. This study is of great physiopathological importance since the deregulation of uterine contractility can cause common disorders of the female reproductive system. Magnetic uterine rings were exposed to uterine contractility inhibitors already used in medical practice, such as Indomethacin and Nifedipine, responding in a dose-dependent manner to the different compounds. Their results showed that the feasibility of using the m3D assay in uterine contractility may help in the future to personalize therapies for uterine contractility disorders.

In the study developed by Timm et al. [14], it was observed the closure of the rings formed with human embryonic kidney cells (HEK293) and tracheal smooth muscle cells submitted to the compounds Ibuprofen and sodium Dodecyl sulfate (SDS), correlating with the results of viability and migration of the cells in 2D. The ring closure rate was analyzed through images obtained by a mobile device and related to the concentrations of the compounds in m3D. Some differences were found in the responses between the closure of the ring and cell migration and viability in 2D, which can be partially explained due to the difference in the microenvironment of these two experiments. The cells exhibit different behaviors about matrix adhesion, migration, and proliferation between the 2D and 3D environment [14]. Thus, the authors concluded that the closure of the ring could serve as a promising quantitative assay to recreate native environments *in vitro*, in addition to predicting the toxicity of drugs *in vivo* in humans.

Comparison with other methods

There are many 3D cell culture systems, as mentioned in the text. However, these methods often involve extensive fabrication and time-consuming analysis [50,51]. For example, some protocols for spheroids take 3 to 4 days to form [43], whereas the m3D technique takes about 16 hours to form 3D cultures [12]. This technique also creates 3D cultures without an artificial protein substrate and can synthesize extracellular matrix during its formation. m3D also does not require any specialized medium or minimum serum concentration, proving to be suitable for any cell culture.

Benefits and Limitations

The 3D magnetic cell culture model allows the cultivation of single-cell lineage, as well as the co-cultivation of different types of cells, which allows heterotypic intercellular contacts, providing additional advances in the realistic representation of tissue functionality and differentiation [12,18]. The technique was also shown to be able to present the self-organization of cells, in addition to the formation of extracellular matrix and specific microenvironments [12] mimicking the in vivo environment.

This model also managed to form a region of central hypoxia in the spheroid, which makes it more advantageous for the area of oncology, due to its similarity to non-vascularized tumor nodules [18]. In addition, the technique allows the handling of cell cultures and the monitoring of activities and responses in real time, such as medical interactions or external interferences [12] in addition to the ability to offer micro physiological environments that mimic the morphology and function of cells in vivo, resembling tissues and organs.

The use of patient cells in this model also brings great advantages to the medical field, since it is possible to generate specific cultures for specific and individual treatments [18]. This leads us to another great advantage, which is the replacement of animals in research, following the recommendation of the 3Rs (Reduce, Reuse and Recycle).

One significant limitation of this technique is its cost since unique accessories are needed to generate m3D spheroids. Regarding the technique, although the magnetic fields have not been shown to interfere with cell culture, some stronger magnets (800-4,000 G) have been shown to influence cell behavior [52]. In addition, the presence of iron oxide in the set of magnetic nanoparticles will color the 3D culture brown, and although this can increase contrast and be good for some imaging diagnoses, the dark color can also be seen as a disadvantage for some applications. There is also the possibility of cell loss due to incomplete attachment of cells to magnetic nanoparticles during incubation that could adhere to the

bottom of the plate instead of levitating, but this limitation can be resolved with the use of ultra-low attachment plates [12].

Conclusions

In vitro study techniques are advancing more and more to approach those *in vivo* in terms of maintaining the physiology and characteristics of the cells of interest. Among several models of three-dimensional cell culture, m3D culture brings innovations in this field that allow cells to organize and maintain contact with each other in a very similar way to the original tissue, producing their extracellular matrix, which generates a differential for maintaining the spheroidal or ring structure, in addition to being an easy method to execute. An interesting observation made from the results obtained in the works detailed in this review is that even using magnetic force for cell aggregation at the beginning of technique development, the m3D culture does not change the typical biology of the cells. As a still recent method in the biotechnology scenario of *in vitro* studies, new results using the m3D culture should emerge to clarify doubts and optimize their use.

References

- [1] A. Verma, M. Verma, A. Singh, Animal tissue culture principles and applications, in: *Animal Biotechnology*, Elsevier, 2020. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811710-1.00012-4>.
- [2] R.I. Freshney, *Culture of animal cells : a manual of basic technique and specialized applications*, 6th ed., John Wiley & Sons, Inc., 2010.
- [3] J.S. Draper, K. Smith, P. Gokhale, H.D. Moore, E. Maltby, J. Johnson, L. Meisner, T.P. Zwaka, J.A. Thomson, P.W. Andrews, Recurrent gain of chromosomes 17q and 12 in cultured human embryonic stem cells, *Nature Biotechnology*. 22 (2004). <https://doi.org/10.1038/nbt922>.
- [4] M.W. Tibbitt, K.S. Anseth, Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture, *Biotechnology and Bioengineering*. 103 (2009). <https://doi.org/10.1002/bit.22361>.
- [5] K. Duval, H. Grover, L.-H. Han, Y. Mou, A.F. Pegoraro, J. Fredberg, Z. Chen, Modeling physiological events in 2D vs. 3D cell culture, *Physiology*. 32 (2017). <https://doi.org/10.1152/physiol.00036.2016>.
- [6] M. Ravi, V. Paramesh, S.R. Kaviya, E. Anuradha, F.D.P. Solomon, 3D cell culture systems: advantages and applications, *Journal of Cellular Physiology*. 230 (2015). <https://doi.org/10.1002/jcp.24683>.
- [7] H. Baharvand, S.M. Hashemi, S. Kazemi Ashtiani, A. Farrokhi, Differentiation of human embryonic stem cells into hepatocytes in 2D and 3D culture systems in vitro, *The International Journal of Developmental Biology*. 50 (2006). <https://doi.org/10.1387/ijdb.052072hb>.
- [8] K.M. Hakkinen, J.S. Harunaga, A.D. Doyle, K.M. Yamada, Direct comparisons of the morphology, migration, cell adhesions, and actin cytoskeleton of fibroblasts in four different three-dimensional extracellular matrices, *Tissue Engineering Part A*. 17 (2011). <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2010.0273>.
- [9] T.B. Puschmann, C. Zandén, Y. de Pablo, F. Kirchhoff, M. Pekna, J. Liu, M. Pekny, Bioactive 3D cell culture system minimizes cellular stress and maintains the in vivo-like morphological complexity of astroglial cells, *Glia*. 61 (2013). <https://doi.org/10.1002/glia.22446>.
- [10] A. Riedl, M. Schleder, K. Pudelko, M. Stadler, S. Walter, D. Unterleuthner, C. Unger, N. Kramer, M. Hengstschlager, L. Kenner, D. Pfeiffer, G. Krupitza, H. Dolznig, Comparison of cancer cells in 2D vs 3D culture reveals differences in AKT–mTOR–S6K signaling and drug responses, *Journal of Cell Science*. 130 (2017). <https://doi.org/10.1242/jcs.188102>.
- [11] G. Mazzoleni, D. di Lorenzo, N. Steimberg, Modelling tissues in 3D: the next future of pharmacotoxicology and food research?, *Genes & Nutrition*. 4 (2009). <https://doi.org/10.1007/s12263-008-0107-0>.
- [12] W.L. Haisler, D.M. Timm, J.A. Gage, H. Tseng, T.C. Killian, G.R. Souza, Three-dimensional cell culturing by magnetic levitation, *Nature Protocols*. 8 (2013). <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.125>.
- [13] G.R. Souza, J.R. Molina, R.M. Raphael, M.G. Ozawa, D.J. Stark, C.S. Levin, L.F. Bronk, J.S. Ananta, J. Mandelin, M.-M. Georgescu, J.A. Bankson, J.G. Gelovani, T.C. Killian, W. Arap, R. Pasqualini, Three-dimensional tissue culture based on magnetic cell levitation, *Nature Nanotechnology*. 5 (2010). <https://doi.org/10.1038/nnano.2010.23>.
- [14] D.M. Timm, J. Chen, D. Sing, J.A. Gage, W.L. Haisler, S.K. Neeley, R.M. Raphael, M. Dehghani, K.P. Rosenblatt, T.C. Killian, H. Tseng, G.R. Souza, A high-throughput three-dimensional cell migration assay for toxicity screening with mobile device-based macroscopic image analysis, *Scientific Reports*. 3 (2013). <https://doi.org/10.1038/srep03000>.
- [15] G. Souza, H. Tseng, J. Gage, A. Mani, P. Desai, F. Leonard, A. Liao, M. Longo, J. Refuerzo, B. Godin, Magnetically bioprinted human myometrial 3D cell rings as a model for uterine contractility, *International Journal of Molecular Sciences*. 18 (2017). <https://doi.org/10.3390/ijms18040683>.
- [16] H. Tseng, J.A. Gage, T. Shen, W.L. Haisler, S.K. Neeley, S. Shiao, J. Chen, P.K. Desai, A. Liao, C. Hebel, R.M. Raphael, J.L. Becker, G.R. Souza, A spheroid toxicity assay using magnetic 3D bioprinting and real-time mobile device-based imaging, *Scientific Reports*. 5 (2015). <https://doi.org/10.1038/srep13987>.
- [17] C. Adine, K.K. Ng, S. Rungarunlert, G.R. Souza, J.N. Ferreira, Engineering innervated secretory epithelial organoids by magnetic three-dimensional bioprinting for stimulating epithelial growth in salivary glands, *Biomaterials*. 180 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.06.011>.

- [18] M.E. Sakalem, M.T. de Sibio, F.A. da S. da Costa, M. de Oliveira, Historical evolution of spheroids and organoids, and possibilities of use in life sciences and medicine, *Biotechnology Journal*. (2021). <https://doi.org/10.1002/biot.202000463>.
- [19] F. Pampaloni, E.G. Reynaud, E.H.K. Stelzer, The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 8 (2007). <https://doi.org/10.1038/nrm2236>.
- [20] S. Nath, G.R. Devi, Three-dimensional culture systems in cancer research: Focus on tumor spheroid model, *Pharmacology & Therapeutics*. 163 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.03.013>.
- [21] A. Alghuwainem, A.T. Alshareeda, B. Alsowayan, Scaffold-free 3-D cell sheet technique bridges the gap between 2-D cell culture and animal models, *International Journal of Molecular Sciences*. 20 (2019). <https://doi.org/10.3390/ijms20194926>.
- [22] K.A. Athanasiou, R. Eswaramoorthy, P. Hadidi, J.C. Hu, Self-organization and the self-assembling process in tissue engineering, *Annual Review of Biomedical Engineering*. 15 (2013). <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071812-152423>.
- [23] N. Matsuda, T. Shimizu, M. Yamato, T. Okano, Tissue engineering based on cell sheet technology, *Advanced Materials*. 19 (2007). <https://doi.org/10.1002/adma.200701978>.
- [24] J.W. Haycock, 3D cell culture: a review of current approaches and techniques, in: 2011. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-984-0_1.
- [25] A. Jørgensen, J. Young, J.E. Nielsen, U.N. Joensen, B.G. Toft, E. Rajpert-De Meyts, K.L. Loveland, Hanging drop cultures of human testis and testis cancer samples: a model used to investigate activin treatment effects in a preserved niche, *British Journal of Cancer*. 110 (2014). <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.160>.
- [26] M. Ingram, G.B. Techy, R. Saroufeem, O. Yazan, K.S. Narayan, T.J. Goodwin, G.F. Spaulding, Three-dimensional growth patterns of various human tumor cell lines in simulated microgravity of a NASA bioreactor, *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*. 33 (1997). <https://doi.org/10.1007/s11626-997-0064-8>.
- [27] M.A. Phelan, A.L. Gianforcaro, J.A. Gerstenhaber, P.I. Lelkes, An air bubble-isolating rotating wall vessel bioreactor for improved spheroid/organoid formation, *Tissue Engineering Part C: Methods*. 25 (2019). <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2019.0088>.
- [28] B. Dhandayuthapani, Y. Yoshida, T. Maekawa, D.S. Kumar, Polymeric scaffolds in tissue engineering application: a review, *International Journal of Polymer Science*. 2011 (2011). <https://doi.org/10.1155/2011/290602>.
- [29] E. Knight, S. Przyborski, Advances in 3D cell culture technologies enabling tissue-like structures to be created in vitro, *Journal of Anatomy*. 227 (2015). <https://doi.org/10.1111/joa.12257>.
- [30] D. Huh, G.A. Hamilton, D.E. Ingber, From 3D cell culture to organs-on-chips, *Trends in Cell Biology*. 21 (2011). <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.09.005>.
- [31] V. van Duinen, S.J. Trietsch, J. Joore, P. Vulto, T. Hankemeier, Microfluidic 3D cell culture: from tools to tissue models, *Current Opinion in Biotechnology*. 35 (2015). <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.05.002>.
- [32] G.R. Souza, E. Yonel-Gumruk, D. Fan, J. Easley, R. Rangel, L. Guzman-Rojas, J.H. Miller, W. Arap, R. Pasqualini, Bottom-up assembly of hydrogels from bacteriophage and Au nanoparticles: the effect of cis- and trans-acting factors, *PLoS ONE*. 3 (2008). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002242>.
- [33] R. Langer, D.A. Tirrell, Designing materials for biology and medicine, *Nature*. 428 (2004). <https://doi.org/10.1038/nature02388>.
- [34] J. Dobson, Remote control of cellular behaviour with magnetic nanoparticles, *Nature Nanotechnology*. 3 (2008). <https://doi.org/10.1038/nnano.2008.39>.
- [35] A. Ito, K. Ino, T. Kobayashi, H. Honda, The effect of RGD peptide-conjugated magnetite cationic liposomes on cell growth and cell sheet harvesting, *Biomaterials*. 26 (2005). <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.03.039>.
- [36] C.N. Souza-Araújo, C. Rodrigues Tonetti, M.R. Cardoso, L.A.L. de A. Andrade, R.F. Silva, L.G.R. Fernandes, F. Guimarães, Three-dimensional cell culture based on magnetic fields to assemble low-grade ovarian carcinoma cell aggregates containing lymphocytes, *Cells*. 9 (2020). <https://doi.org/10.3390/cells9030635>.
- [37] H. Jaganathan, J. Gage, F. Leonard, S. Srinivasan, G.R. Souza, B. Dave, B. Godin, Three-dimensional in vitro co-culture model of breast tumor using magnetic levitation, *Scientific Reports*. 4 (2015). <https://doi.org/10.1038/srep06468>.

- [38] H. Tseng, L.R. Balaoing, B. Grigoryan, R.M. Raphael, T.C. Killian, G.R. Souza, K.J. Grande-Allen, A three-dimensional co-culture model of the aortic valve using magnetic levitation, *Acta Biomaterialia*. 10 (2014). <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.09.003>.
- [39] A.C. Daquinag, G.R. Souza, M.G. Kolonin, Adipose tissue engineering in three-dimensional levitation tissue culture system based on magnetic nanoparticles, *Tissue Engineering Part C: Methods*. 19 (2013). <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2012.0198>.
- [40] M. Urbanczyk, A. Zbinden, S.L. Layland, G. Duffy, K. Schenke-Layland, Controlled heterotypic pseudo-islet assembly of human β -cells and human umbilical vein endothelial cells using magnetic levitation, *Tissue Engineering Part A*. 26 (2020). <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2019.0158>.
- [41] Y. Takahashi, K. Sekine, T. Kin, T. Takebe, H. Taniguchi, Self-condensation culture enables vascularization of tissue fragments for efficient therapeutic transplantation, *Cell Reports*. 23 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.03.123>.
- [42] H. Tseng, J.A. Gage, R.M. Raphael, R.H. Moore, T.C. Killian, K.J. Grande-Allen, G.R. Souza, Assembly of a three-dimensional multitype bronchiole coculture model using magnetic levitation, *Tissue Engineering Part C: Methods*. 19 (2013). <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2012.0157>.
- [43] C. Miller, S. George, L. Niklason, Developing a tissue-engineered model of the human bronchiole, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 4 (2010). <https://doi.org/10.1002/term.277>.
- [44] M. Hogan, G. Souza, R. Birla, Assembly of a functional 3D primary cardiac construct using magnetic levitation, *AIMS Bioengineering*. 3 (2016). <https://doi.org/10.3934/bioeng.2016.3.277>.
- [45] Q.L. Xu, A. Furuhashi, Q.Z. Zhang, C.M. Jiang, T.-H. Chang, A.D. Le, Induction of salivary gland-like cells from dental follicle epithelial cells, *Journal of Dental Research*. 96 (2017). <https://doi.org/10.1177/0022034517711146>.
- [46] E. Kiss, E.H.M.M. Abdelwahab, A. Steib, E. Papp, Z. Torok, L. Jakab, G. Smuk, V. Sarosi, J.E. Pongracz, Cisplatin treatment induced interleukin 6 and 8 production alters lung adenocarcinoma cell migration in an oncogenic mutation dependent manner, *Respiratory Research*. 21 (2020). <https://doi.org/10.1186/s12931-020-01389-x>.
- [47] C.J. Langer, Roles of EGFR and KRAS mutations in the treatment of patients with non-small-cell lung cancer, *Pharmacy & Therapeutics*. 36 (2011) 263–268.
- [48] S. Hou, H. Tiriach, B.P. Sridharan, L. Scampavia, F. Madoux, J. Seldin, G.R. Souza, D. Watson, D. Tuveson, T.P. Spicer, Advanced development of primary pancreatic organoid tumor models for high-throughput phenotypic drug screening, *SLAS DISCOVERY: Advancing the Science of Drug Discovery*. 23 (2018). <https://doi.org/10.1177/2472555218766842>.
- [49] H. Tseng, J.A. Gage, W.L. Haisler, S.K. Neeley, T. Shen, C. Hebel, H.G. Barthlow, M. Wagoner, G.R. Souza, A high-throughput in vitro ring assay for vasoactivity using magnetic 3D bioprinting, *Scientific Reports*. 6 (2016). <https://doi.org/10.1038/srep30640>.
- [50] P. Bernstein, M. Dong, D. Corbeil, M. Gelinsky, K.-P. Günther, S. Fickert, Pellet culture elicits superior chondrogenic redifferentiation than alginate-based systems, *Biotechnology Progress*. 25 (2009). <https://doi.org/10.1002/btpr.186>.
- [51] F. Hirschhaeuser, H. Menne, C. Dittfeld, J. West, W. Mueller-Klieser, L.A. Kunz-Schughart, Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again, *Journal of Biotechnology*. 148 (2010). <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.01.012>.
- [52] Z. Wang, P. Yang, H. Xu, A. Qian, L. Hu, P. Shang, Inhibitory effects of a gradient static magnetic field on normal angiogenesis, *Bioelectromagnetics*. 30 (2009). <https://doi.org/10.1002/bem.20501>.