



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“Júlio de Mesquita Filho”  
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

EFEITO ISOLADO OU COMBINADO DO ÁCIDO ANACÁRDICO  
COM PACLITAXEL NA INVASIVIDADE DE CÉLULAS  
TUMORAIS OVARIANAS

**MIRIAN CAROLINI ESGOTI AAL**

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.

*Prof.<sup>a</sup> Dra. Flávia Karina Delella*



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“Júlio de Mesquita Filho”  
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

EFEITO ISOLADO OU COMBINADO DO ÁCIDO ANACÁRDICO  
COM PACLITAXEL NA INVASIVIDADE DE CÉLULAS  
TUMORAIS OVARIANAS

**MIRIAN CAROLINI ESGOTI AAL**

**FLÁVIA KARINA DELELLA**

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.

*Prof.<sup>a</sup> Dra. Flávia Karina Delella*

**BOTUCATU – SP  
2021**

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

Aal, Mirian Carolini Esgoti.

Efeito isolado ou combinado do ácido anacárdico com  
paclitaxel na invasividade de células tumorais ovarianas /  
Mirian Carolini Esgoti Aal. - Botucatu, 2021

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

Orientador: Flávia Karina Delella

Capes: 20601000

1. Ovários - Tumores. 2. Paclitaxel. 3. Citocinas.  
4. Quimiocinas. 5. Células-tronco neoplásicas.

Palavras-chave: Ácido anacárdico; CXCL6; Citocinas;  
Paclitaxel; Quimiocinas.

*“O dia em que nada aprendi, foi um dia perdido”*  
Leonardo da Vinci

## *Agradecimentos*

Primeiramente, agradeço a Deus por me inspirar e permitir seguir nesse caminho tão sonhado. Obrigada por me dar forças e esperança para persistir mesmo nos momentos mais difíceis, e principalmente por me ensinar a valorizar o amor da família.

Agradeço à minha mãe, Marlene Esgoti, por ter me criado com tanta coragem, ultrapassando todos os limites que nos foram impostos e sempre me ensinado que a educação era o caminho para mudarmos nossas vidas. Serei eternamente grata por seu carinho e apoio incondicional mesmo quando não pude estar presente. Agradeço à minha irmã, Raquel por sempre acreditar em mim, comemorar comigo cada vitória e estar presente em todo o processo. Obrigada à toda minha família por compartilharem comigo essa jornada, vocês deixaram tudo mais leve.

Ao meu companheiro Diego Domingues por sempre me incentivar e ter paciência nos momentos de estresse e dedicação intensa ao meu trabalho. Foi imprescindível ter seu apoio e compreensão da importância que meus estudos representam.

Ao pai que Deus me deu de presente em forma de sogro, João Domingues, por sempre me dar forças e acreditar que meus sonhos eram possíveis e valoráveis. Guardarei comigo todos os momentos de acalento quando eu mais precisava. Muito obrigada!

Aos meus amigos, Gustavo Martins e Greyce R. De Souza por acreditarem em mim quando nem eu acreditava. Sou imensamente grata por cada palavra e puxão de orelha, vocês são incríveis!

À minha orientadora Flávia Delella, por ter me recebido de braços abertos me guiado na ciência, por ensinar com gentileza, por sempre estar disposta a ouvir e nos conduzir da melhor forma. Desde a primeira vez que a vi no curso de férias, a admiração foi instantânea e só tem crescido. Sua força me inspira, como pessoa e como mulher. Você me ensinou a ter paciência, a ouvir mais e que juntas podemos conquistar mais. Eu agradeço por cada ensinamento, e todo sucesso conquistado será nosso, obrigada!

À Juliana Caleffi, que compartilhou comigo seu conhecimento e me iniciou no laboratório. Obrigada por sua amizade, parceria e paciência (mesmo quando eu inventava mais coisas para fazermos). Você é uma pessoa ímpar e eu sou muito grata por ter tido a honra de dividir esses dois anos com você. Acredito no seu sucesso e estarei sempre pronta para comemorá-lo contigo. Obrigada por tudo!

Ao Gabriel Caxali, por me iniciar no mundo da bioinformática, sempre prestativo e solícito. Muito obrigada!

À Paula Freire por ser tão dedicada em me ensinar, você tem sido essencial para o desenvolvimento da minha pesquisa.

Ao Laboratório de Matriz Extracelular (LabMEC), em especial aos queridos Sérgio Alexandre Alcantara dos Santos, Francielle Mosele, Caroline Nascimento Barquilha, Nilton José dos Santos, Luiz

Marcos Frediani Portela, Matheus Naia Fioretto, Flávia Bessi Constantino e Ketlin Thassiani Colombelli por sempre me ajudarem de prontidão. Vocês foram muito importantes para minha integração, crescimento pessoal e profissional, obrigada!

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro durante todo período do mestrado.

## SUMÁRIO

|     |                                                      |    |
|-----|------------------------------------------------------|----|
| 1   | INTRODUÇÃO .....                                     | 10 |
| 1.1 | Morfologia e histologia do Ovário .....              | 10 |
| 1.2 | Câncer de ovário.....                                | 11 |
| 1.3 | A quimioterapia no câncer de ovário.....             | 13 |
| 1.4 | Paclitaxel – Agente Antineoplásico.....              | 14 |
| 1.5 | Ácido Anacárdico.....                                | 16 |
| 1.6 | O Ácido Anacárdico em combinações terapêuticas ..... | 19 |
| 1.7 | Estudos <i>in silico</i> e câncer de ovário.....     | 20 |
| 2.  | JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE.....                        | 20 |
|     | CAPÍTULO 1 .....                                     | 23 |
|     | CAPÍTULO 2 .....                                     | 39 |

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|                                                                                                       |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1</b> - Corte histológico de ovário normal.....                                             | 11 |
| <b>Figura 2</b> - Classificação histológica dos tipos de tumores epiteliais de ovário existentes..... | 12 |
| <b>Figura 3</b> - Representação da estrutura tridimensional do Ácido Anacárdico.....                  | 17 |



## RESUMO

O câncer de ovário é a doença ginecológica que mais mata mulheres no mundo. Este tipo de câncer tende a ser diagnosticado de maneira tardia, devido a sua natureza assintomática, sendo utilizado no tratamento a quimioterapia baseada em taxanos, como o Paclitaxel. Porém, este medicamento vem sofrendo resistência por parte das células neoplásicas ovarianas, comprometendo a recuperação das pacientes. Pesquisas recentes demonstraram que a associação entre quimioterápicos e produtos naturais otimizam a eficácia dos mesmos. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito do ácido anacárdico, isolado ou combinado com o agente antineoplásico Paclitaxel, sobre o potencial invasivo de células humanas de câncer de ovário. Para isso, células da linhagem SKOV-3 foram cultivadas e expostas ao Ácido anacárdico e Paclitaxel, de maneira isolada e combinada, analisando alterações morfológicas, a viabilidade celular e migração por inserto *transwell*. De maneira geral, nosso estudo mostrou que o Ácido anacárdico diminuiu a capacidade migratória das células, assim como afetou a viabilidade celular, tanto isolado quanto em sinergia com o antineoplásico Paclitaxel. Além disso, também identificamos a CXCL6 como um novo potencial alvo terapêutico para o câncer de ovário, através de análises *in silico*. Dessa forma acreditamos que nossos resultados possam contribuir com pesquisas futuras envolvendo associação entre produtos naturais e tratamentos convencionais, particularmente no sucesso da aplicação do Ácido anacárdico no tratamento de câncer de ovário.

## **ABSTRACT**

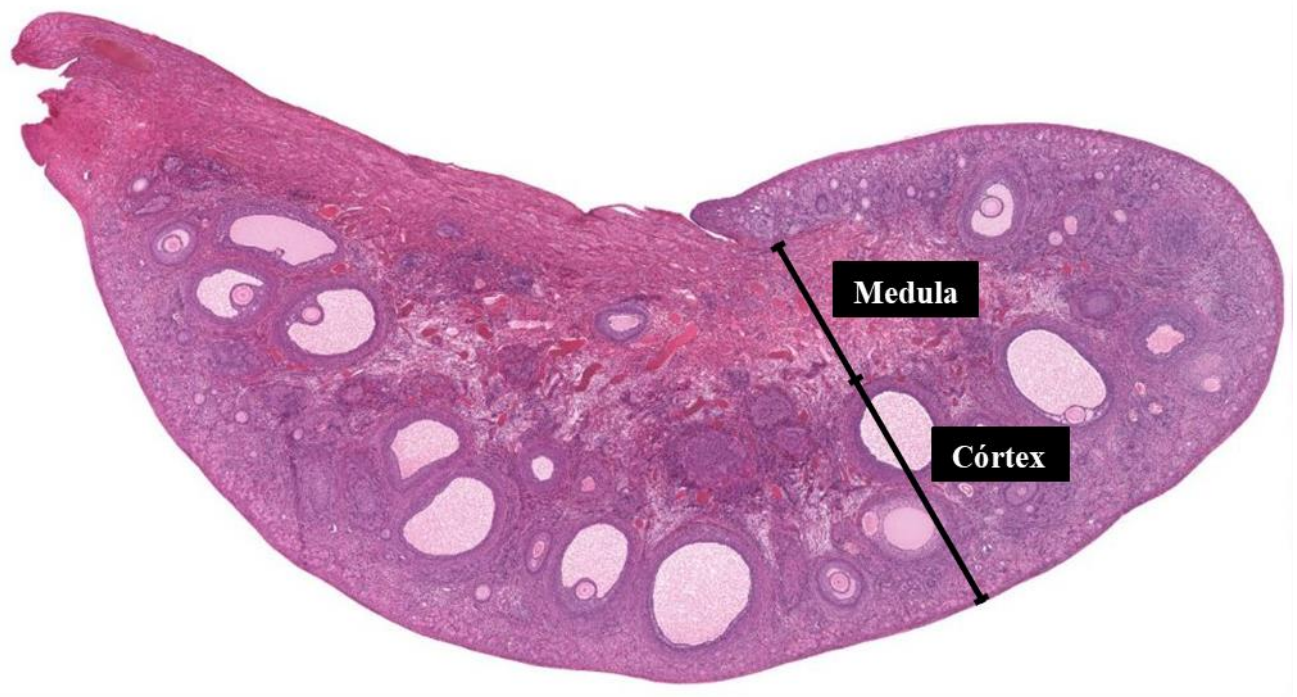
Ovarian cancer is the fifth gynecological disease that kills more women in the world. This type of cancer tends to be diagnosed late, due to its asymptomatic nature, being used in the treatment chemotherapy based on taxanes, such as paclitaxel. However, this drug has suffered resistance from ovarian neoplastic cells, compromising the recovery of patients. Recent researches have demonstrated that the association between chemotherapy and natural products optimizes their efficacy. Thus, the present study aimed to evaluate the effect of anacardic acid, alone or combined with the antineoplastic agent paclitaxel, on the invasive potential of human ovarian cancer cells. To this end, cells of the SKOV-3 lineage were cultured and exposed to anacardic acid and paclitaxel, in isolation and synergistically, analyzing morphological changes, cell viability, and migration by Transwell assay. In general, our study showed that anacardic acid decreased the migratory capacity of cells, as well as affected cell viability, both alone and in synergy with the antineoplastic paclitaxel. In addition, we have also identified CXCL6 as a potential new therapeutic target for ovarian cancer through in silico analyses. Thus, we believe that our results can contribute to future research on the association between natural products and conventional treatments, particularly in the successful application of anacardic acid in the treatment of ovarian cancer.

## 1 INTRODUÇÃO

### *1.1 Morfologia e histologia do Ovário*

Os ovários são órgãos que se encontram em ambos os lados do útero, próximos à parede pélvica lateral, atrás do ligamento largo do útero e anterior ao reto (Uhlén et al., 2014). Têm a forma de amêndoas, medindo aproximadamente 3 cm de comprimento, 1,5 cm de largura e 1 cm de espessura, podendo variar consideravelmente entre mulheres adultas na faixa etária reprodutiva (Uhlén et al. 2014). Este órgão tem como função a produção e a liberação de oócitos, processos que recebem os nomes de ovogênese e ovulação, respectivamente, além da função endócrina, produzindo e secretando os hormônios sexuais femininos estrógeno e progesterona (Peckham; Sorenson; Slomianka, 2009). Esses hormônios desempenham papel importante na formação dos traços femininos, tais como desenvolvimento das mamas, formato corporal e pelos corporais e ainda estão envolvidos no ciclo menstrual, fertilidade e gravidez (National Cancer Institute, 2021).

Histologicamente, o ovário humano é revestido por epitélio pavimentoso ou cúbico simples, chamado de epitélio germinativo, e por uma camada de tecido conjuntivo denso, a túnica albugínea. Em um corte transversal são identificadas duas regiões, a medula interna e o córtex externo com limites indistintos (Figura 1). A medula contém os vasos sanguíneos, nervos e tecido conjuntivo frouxo, enquanto o córtex é ocupado por folículos ovarianos em desenvolvimento e por estroma rico em fibroblastos (Takizawa, 2013; Junqueira & Carneiro, 2013).



**Figura 1-** Corte histológico de ovário normal, corado com hematoxilina e eosina, representando sua composição histológica: Córtex - parte externa do ovário, composta por epitélio germinativo contendo elementos foliculares; Medula - região central do ovário, composta por uma rede neuro-vascular no estroma. Fonte: The Histology Guide, 2021.

### *1.2 Câncer de ovário*

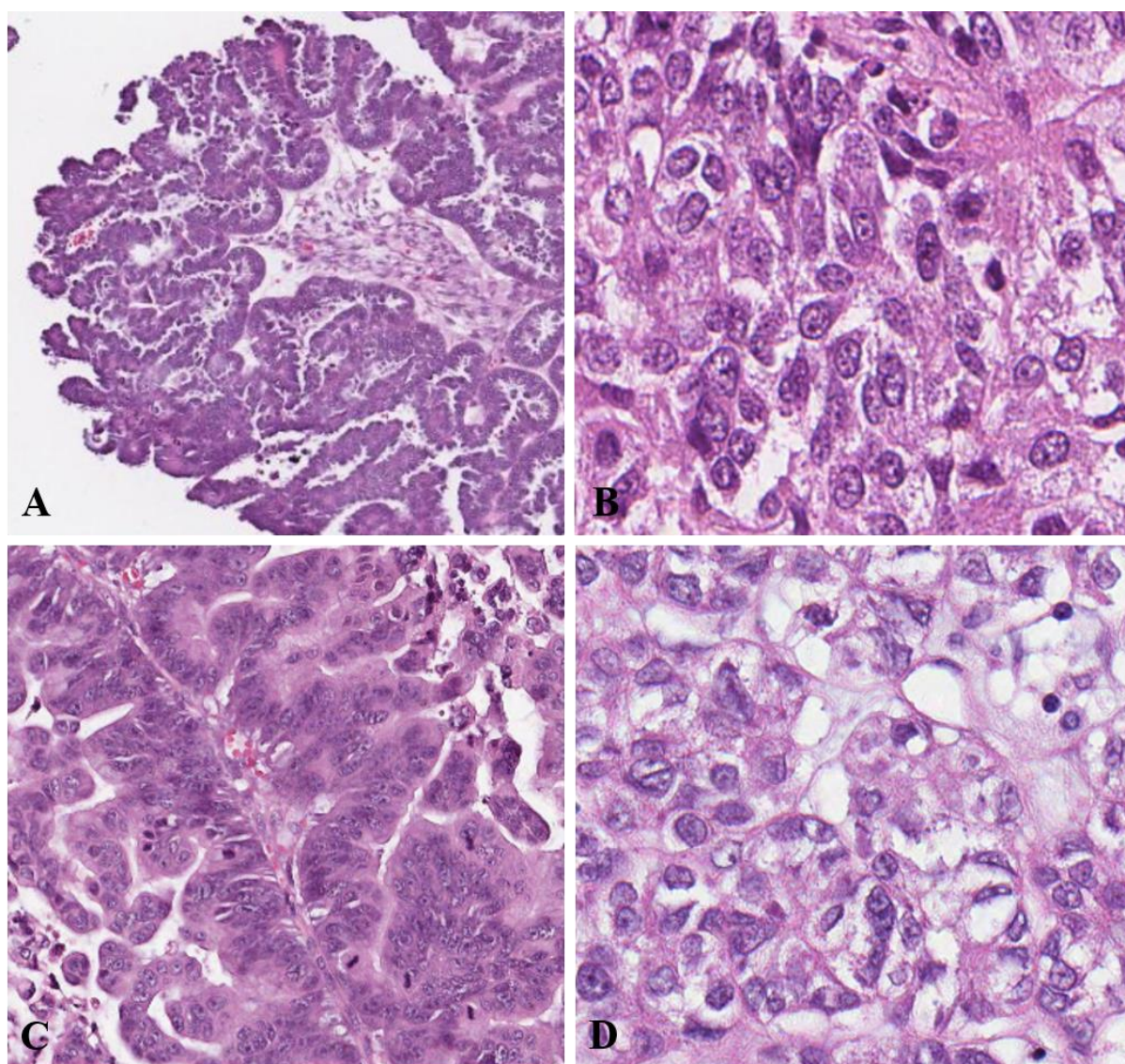
Dentre todas as causas de morte do mundo, o câncer é responsável por mais de 45% delas (Who, 2017), sendo a principal causa de morte nos países desenvolvidos e a segunda principal causa de morte nos países em desenvolvimento. No Brasil, esta doença é superada apenas pelas doenças cardiovasculares (Garófalo et al., 2004). Para o ano de 2020, o Instituto Nacional de Câncer (INCA, 2020), estimou a ocorrência de 600 mil casos novos no país, sendo 157 mil apenas no estado de São de Paulo.

Para as mulheres, 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 considera ambos os sexos (Ghoneum et al., 2018; Siegel et al., 2020). 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 principalmente 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. A figura 2 ilustra os quatro tipos principais de tumores epiteliais de ovário existentes: células serosas, endometrioides, mucinosas e claras (Seidman et al., 2004; Ferreira et al., 2012; Kaldawy et al., 2016; Ottevanger, 2017). Esta atribuição é dada baseando-se na semelhança das células cancerígenas com as células normais que revestem os diferentes órgãos do sistema 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 2** - Classificação histológica dos tipos de tumores epiteliais de ovário existentes. (A) Câncer seroso. (B) Câncer endometriode. (C) Câncer mucinoso. (D) Câncer de células claras. Fonte: Imagens adaptadas do site The Human Protein Atlas, 2021.

Alguns estudos epidemiológicos tem apontado os principais fatores de risco para mulheres com CO, sendo o fator genético um dos mais importantes (Cannistra, 2004; La Vecchia, 2017). A nuliparidade também está associada a um risco aumentado de CO, assim como a falta de amamentação. Já o uso de contraceptivos orais, gravidez e lactação estão associados a um risco reduzido (Cannistra, 2004; La Vecchia, 2017). A influência das idades da menarca e da menopausa são pouco embasadas na literatura.

Os sintomas são considerados inespecíficos, e na maioria das vezes em estágio inicial são assintomáticos. É relatado pelos pacientes desconforto ou plenitude abdominal, dispepsia, saciedade precoce ou inchaço, como resultado do aumento da pressão abdominal (Cannistra, 2004; Liu et al., 2018). Porém, esses sintomas são propensos a serem identificados e diagnosticados imprecisamente como sinais de outras doenças, causando atrasos na detecção (Gaitskell et al., 2011). Consequentemente, 40% a 50% dos pacientes são identificados apenas quando o CO já se desenvolveu em estágios avançados (Liu et al., 2018). Este diagnóstico tardio tende a levar a uma baixa taxa de sobrevivência entre as mulheres com CO. Outra razão para este incidente é que, embora muitos pacientes alcancem uma remissão clínica completa após a terapia primária, a doença se repete em 70% dos casos, levando a uma resistência aos medicamentos (Chiou et al., 2003; Heintz et al., 2006; Ottevanger, 2017).

### *1.3 A quimioterapia no câncer de ovário*

Na última década, o tratamento padrão para mulheres com CO foram as cirurgias citoredutoras 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 mecanismo de funcionamento se dá através da formação de adutos com o DNA (ligações irreversíveis) que inviabilizam a divisão celular, levando a célula a entrar em apoptose (Cannistra, 2004; Neves et al., 2011). Porém, 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). Junto com o Docetaxel, também da família dos taxanos, exercem os seus efeitos citotóxicos através de um mecanismo de ação único, envolvendo a ligação e a estabilização das subunidades de tubulina na formação dos microtúbulos (Weaver, 2014).

Hoje, a quimioterapia baseada em taxanos e platina é o padrão de cuidados para pacientes com CO (McGuire et al., 1996; Piccart et al., 2000; Cannistra, 2004). Essa

combinação do antineoplásico Paclitaxel e a Carboplatina foi relatada como tão eficaz, que é utilizada como terapia de primeira linha para tratar CO (Katsumata et al., 2009; Chan et al., 2016), visto que pacientes com a doença já em estágios avançados, ao utilizarem destes fármacos, demonstraram melhor sobrevida global de quase cinco 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% desses pacientes tem sobrevida a longo prazo (Cannistra, 2004; Banno et al., 2014).

Devido a essa resistência às drogas, a quimioterapia vem se tornando uma preocupação por sua baixa resposta em alguns casos. Particularmente, a resistência ao Paclitaxel tem sido uma das principais causas de resistência à terapêuticas clínicas de CO (An et al., 2017; Liu et al., 2018). Sua inclusão a terapia de primeira linha reduz em 30% o risco de morte por CO (Piccart et al., 2000) e, de acordo com a literatura, este medicamento não induz resistência cruzada aos fármacos à base de platina (Zhu et al., 2015; Liu et al., 2018). Por essas razões, torna-se importante avaliar este fármaco junto a outros compostos na tentativa de otimizar seu papel antineoplásico, para que possa ser utilizado com maior eficácia contra o CO.

#### 1.4 Paclitaxel – Agente Antineoplásico

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

O Paclitaxel (também conhecido como Taxol) é um medicamento natural usado como agente quimioterápico para vários tipos de câncer, sendo usado em primeira linha para o tratamento do CO e do câncer de mama (Zhu et al., 2015). Ele foi descoberto através de uma triagem de compostos naturais, na década de 1970, pelo *National Cancer Institute* (NCI) (Jones et al., 2005). É 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 teve que ser interrompida por mais ou menos uma década. Ainda assim, apesar da escassez do Taxol, um estudo clínico com CO prosseguiu e, finalmente concluiu-se 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 da *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). Dessa forma, em 1989, o NCI tomou a decisão de transferir o taxol para uma empresa farmacêutica particular para sua futura comercialização. Foi assim que a *Bristol-Myers Squibb* (BMS) criou o novo nome genérico Paclitaxel (Walsh & Goodman, 2002) e resolveu o problema da disponibilidade do fármaco (Wang et al., 2015).

O Paclitaxel foi considerado pelo NCI um dos avanços mais significativos na quimioterapia (Singla et al., 2002) e os seus resultados se estendem 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; Muroño et al., 2018), além de ser ativo também contra outras malignidades como a leucemia (Chang et al., 1992).

Este fármaco mostrou possuir excelente atividade anticancerígena *in vitro* (Brandão et al., 2010), o que em 1979, foi ainda mais reforçado, após Susan Horwitz da Faculdade de Medicina Albert Einstein (Nova York, NY) descobrir suas propriedades estabilizadoras de microtúbulos, este, um mecanismo de ação nunca antes observado em outra substância (Souza, 2004; Weaver, 2014). 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 (Schiff et al., 1979; Shigemori & Kobayashi, 2004; Brandão et al., 2010; Weaver, 2014; Wang et al., 2015). 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 metafase-anáfase, já que a placa metafásica não se forma adequadamente devido à estabilização dos microtúbulos (Rowinsky, 1977; Ringel & Horwitz, 1991; Weaver, 2014).

A partir desse princípio, 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 adequadamente para que a célula pare de se dividir, 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).

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), que se estende ao



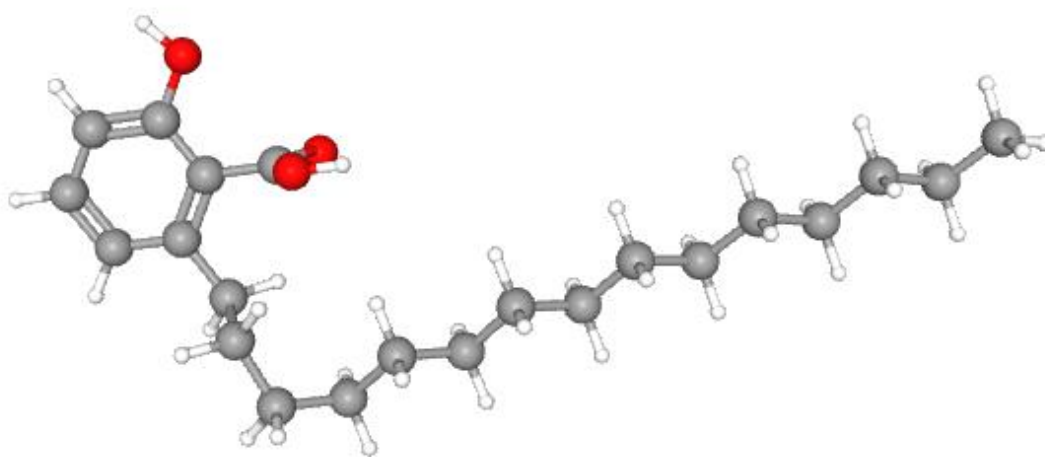
uso do Paclitaxel (Fernandes et al., 2015; Pereira et al., 2018). A resistência adquirida está principalmente relacionada ao fato de que, embora a maioria das células malignas no tumor possa conter a mutação direcionada, uma série de subclones tumorais abrigam alterações genéticas pré-existentes ou, após a exposição à droga, adquirem mutações de novo, 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).

Isso gera um grande problema nos tratamentos clínicos, fazendo com que haja a necessidade de intervenção terapêutica complementar. Nesse sentido, estudos experimentais *in vitro* e *in vivo* ilustram que muitos compostos naturais podem otimizar o papel de drogas antineoplásicas, criando um sinergismo entre os compostos e otimizando o tratamento ou restaurando o potencial antineoplásico de drogas clássicas (Schultz et al., 2010; Dinic et al., 2015; Harsha Raj et al., 2016; Tan et al., 2017; Park et al., 2018; Rege et al., 2018; Kushwah et al., 2018).

Pashaei-Asl e colaboradores (2018) demonstraram esse sinergismo em seu estudo, utilizando células da linhagem de câncer de ovário SKOV-3 tratadas com a combinação do Paclitaxel e de um composto natural, a Silibinina. Os resultados indicaram que o tratamento combinado destes compostos foi mais eficaz do que quando analisados separadamente. Pashaei-Asl em 2017, também investigou as células SKOV-3 com extrato de gengibre, onde o mesmo foi capaz de inibir seu crescimento.

### 1.5 Ácido Anacárdico

O ácido anacárdico (AA) (Ácido 2-hidroxi-6-pentadecilbenzóico) (Figura 3) é um composto natural extraído do líquido da casca da castanha de caju e das folhas do cajueiro (*Anacardium occidentale*) (Paul & Yeddanapalli, 1954). Este composto vem atraindo muito interesse em pesquisas que analisam seu potencial terapêutico para diferentes doenças, por possuir importante ação antitumoral (Alam-Escamilla et al., 2015). Tradicionalmente, o AA era utilizado como um remédio medicinal para tratar úlceras, gastrites, câncer gástricos, amebicidas, gengivite, malária e sífilis (Hemshekhkar et al., 2012; Alam-Escamilla et al., 2015). Hoje, com as pesquisas e evidências recentes, o AA é classificado como excelente agente terapêutico no tratamento de distúrbios fisiopatológicos mais graves, como o câncer, danos oxidativos, inflamações e obesidade (Hemshekhkar et al., 2012; Rege et al., 2018).



**Figura 3** - Representação da estrutura tridimensional do Ácido anacárdico. Fonte: PubChem, 2021.

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). 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 ocorre 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- $\kappa$ 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. O mecanismo de ação do ácido anacárdico parte de sua propriedade anfipática, que permite ao composto adentrar as células se incorporando facilmente a membrana plasmática das células e induzindo a apoptose em células de linhagens transformadas. Foi visto que o mecanismo de ação do AA está relacionado principalmente a capacidade de induzir a apoptose, em leucemia linfocítica crônica e carcinoma pulmonar, mediado pelo retículo endoplasmático e câncer gástrico (AGS) mediado pela caspase-8 (Toyomizu, 2002).

O 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). 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.

As propriedades de interesse do ácido anacárdico também foram testadas quanto a seu desempenho em modelos *in vivo*. Carvalho (2011) e colaboradores testaram a toxicidade aguda e subaguda do ácido anacárdico em camundongos Balb/c. Foi visto que a dose letal mínima é superior a 2.000 mg/kg de peso corporal (pc). No teste subagudo foram notadas apenas anormalidades leves em fêmeas, em altas doses de 1.000 mg/kg pc. Quando tratados com 300 mg/kg de peso corporal, os animais não apresentaram nenhuma alteração significativa o que indica a segurança da administração do composto. Também foi testada a mutagenicidade, em uma dose inferior a 300 mg/kg pc, obtendo que o AA não aumentou a frequência de micronúcleos, comparado ao controle positivo (Carvalho, 2011).

### *1.6 O Ácido Anacárdico em combinações terapêuticas*

Como citado acima, a combinação de compostos naturais às drogas terapêuticas tradicionais tem sido amplamente utilizada no tratamento de doenças como o câncer (van Vuuren & Viljoen, 2011). A prescrição de terapias múltiplas buscando o efeito combinado 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 combinado 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 câncer de pâncreas. Os autores evidenciam em seu estudo a grande promessa do AA como composto complementar no tratamento desse tipo de câncer. Em outro estudo, 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.

O efeito antitumoral do AA combinado com o Taxol foi testado em um modelo animal de câncer de mama de camundongo Balb/c. Para este estudo foram cultivadas células derivadas de tumor mamário 4T1/balb c e transplantadas em fêmeas de camundongos Balb/c. Os animais foram tratados com AA isolado e em combinação com Taxol, sendo que o cotratamento (CoT) diminuiu mais significativamente o tamanho do tumor, quando comparado aos demais grupos separadamente. Ambos os tratamentos diminuíram a metástase pulmonar. O tratamento com taxol aumentou em apenas 2 dias a taxa de sobrevivência, enquanto o AA aumentou em 40% a taxa de sobrevivência de ratos e quando combinado com o taxol, o resultado foi ainda mais relevante, aumentando em 60% antes que atingisse o limite de 2cm<sup>3</sup>. Os animais inoculados com o tumor, quando tratados com AA e CoT aumentaram o peso corporal, concomitantemente ao aumento da taxa de sobrevivência. Também foi visto a diminuição dos efeitos colaterais

provocados pelo tratamento com Taxol (Gnanaprakasam, 2021).

Sendo assim, o AA tem se tornado um composto de interesse médico nos últimos anos, principalmente devido às suas propriedades antitumorais evidenciadas em diversos tumores avaliados, como os tumores de pâncreas, cólon, melanoma, mama, pulmão, cervical, rim, em que o composto suprimiu a angiogênese, resultando na redução dos tumores (Wu et al., 2011). Este composto junto ao agente antineoplásico Paclitaxel, pode nos trazer grandes resultados sobre importantes vias celulares como o ciclo celular, proliferação e morte celular, e a sinalização celular no câncer de ovário, podendo contribuir na atualização de tratamentos preventivos ou adjuvantes para pacientes pré-dispostos ou que desenvolvam o câncer estudado.

### 1.7 Estudos *in silico* e câncer de ovário

Modelos de estudos clínicos que contemplem estudos *in vivo*, *in vitro* e *in silico* são necessários para integração de resultados visando compreender a complexidade do tumor. Um sistema biológico compreende uma gama de diferentes fatores dinâmicos interconectados, os quais dependem de diferentes estratégias para serem estudados. A integração de experimentos biológicos com análises computacionais pode ajudar a diminuir o número de experimentos necessários e consequentemente, o uso de animais, além de melhorar a qualidade das informações obtidas à partir deles (Schwartz et al., 2009).

Atualmente, dados ômicos e modelos computacionais tem sido colocados em prática. Modelos computacionais de câncer incluem a utilização de dados genômicos, transcriptômicos, proteômicos e metabolômicos, através dos quais é possível obter informações acerca da identificação de mutações específicas ligadas a resposta à drogas, identificação de novos biomarcadores e alvos terapêuticos, abordagens moleculares para avaliação de vias relacionadas à toxicidade, além da rápida e robusta geração de dados (Sajjad et al., 2021).

Estudos baseados em computador têm sido amplamente aplicados para diagnosticar, observar e prever o crescimento do câncer. Além disso, a modelagem computacional e matemática são usadas para entender a evolução do câncer. Ferramentas computacionais fornecem a perspectiva de identificar novos biomarcadores em cascatas de sinalização e alvos favoráveis para terapia antitumoral (Sajjad et al., 2021).

Através de ferramentas de bioinformática, (Guo et al., 2019) identificaram seis RNA circulares (circ\_0031356, 0093477, 0110166, 0126526, 0130590 e 0135175) como biomarcadores prognósticos. Foram utilizados dados de sequenciamento disponíveis na base de dados Gene Expression Omnibus. A partir disso, foi estabelecido um modelo de “*risk score*” onde os pacientes foram divididos em alto e baixo risco, associando em seguida dados de sobrevivência

global, sobrevivência livre de progressão e sobrevivência livre de doença em pacientes com câncer de ovário. Outro estudo também utilizando a base de dados Gene Expression Omnibus, além de meta-análise, identificou uma família de microRNAs (miR200A, miR200B, miR200C e miR429) altamente expressa no câncer de ovário como possíveis biomarcadores prognósticos. Essa família de miRNAs está relacionada a metástase, favorecendo a transição epitélio-mesenquimal, reforçando a relevância no diagnóstico (Wu et al., 2019).

A busca pela utilização de marcadores circulantes vem ocupando cada vez mais espaço nas pesquisas atuais, pois consiste em um método pouco invasivo e de resultado rápido.

## 2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

O CO é a segunda neoplasia maligna do sistema genital mais frequentemente diagnosticada, sendo o câncer ginecológico que mais promove óbitos em mulheres no mundo. Sabe-se que o CO é assintomático nos estágios iniciais, assim, seu diagnóstico ocorre de maneira tardia, culminando em reincidência da doença e resistência ao tratamento, o que interfere diretamente na qualidade de vida das pacientes.

Atualmente padrão ouro de tratamento de câncer de ovário consiste na administração de quimioterápicos da classe dos taxanos como o Paclitaxel, aliado às cirurgias citoredutoras, tem sido muito utilizado para o tratamento desse tipo de câncer. Este tratamento apresenta bons resultados, entretanto as células tumorais tem apresentado resistência, culminando em reincidência. devido ao estágio avançado em que o tratamento muitas vezes é iniciado, acaba-se por ocorrer a reincidência, e/ou resistência das células ao medicamento.

O benefício em aliar produtos naturais no tratamento de câncer tem sido demonstrado na literatura, como o AA, produto de nosso estudo. Dessa forma, considerando a problemática da resistência ao Paclitaxel, faz-se necessário o estudo de novas abordagens para otimizar a ação do fármaco. Assim, este estudo torna-se essencial para contribuir com novos achados científicos para o tratamento do CO, na tentativa de prolongar a expectativa de vida com maior qualidade das pacientes acometidas por esta afecção.

Ainda levando em conta a problemática do diagnóstico tardio, outro ponto a ser considerado além do tratamento, é a busca por novos biomarcadores prognósticos. Análises *in silico* tem se mostrado relevantes para identificar moléculas que possam atuar como marcadores prognósticos, uma vez que não necessitam de métodos invasivos para pesquisa, assim como diminuem ou ainda excluem o uso de animais.

À partir das informações acima descritas, a hipótese levantada neste trabalho, é a de que

o AA seja capaz de potencializar a atividade citotóxica do Paclitaxel, reduzindo a resistência das células neoplásicas ao mesmo, ou que ainda, exerça função antitumoral, diminuindo a atividade migratória e, portanto, metastática do CO quando utilizado isoladamente. Além disso, espera-se identificar moléculas de alto valor prognóstico à partir do secretoma de câncer de ovário.

### **3. OBJETIVOS**

#### *3.1 Objetivos Gerais*

Este estudo tem como objetivo avaliar o efeito do ácido anacárdico, isolado ou combinado com o agente antineoplásico Paclitaxel, sobre o potencial invasivo de células humanas de câncer de ovário.

#### *3.2 Objetivos Específicos*

- ✓ Avaliar a viabilidade das células humanas de câncer de ovário da linhagem SKOV-3, expostas ao ácido anacárdico isolado ou em combinação com o agente antineoplásico Paclitaxel;
- ✓ Analisar o efeito das exposições sobre o processo migração das células neoplásicas;

## **CAPÍTULO 1**



## **Efeito isolado ou combinado do ácido anacárdico com paclitaxel sobre a invasividade de células tumorais ovarianas**

**Mirian Carolini Esgoti Aal<sup>1</sup>; Juliana Trindade Caleffi<sup>1</sup>; Gabriel Henrique Caxali<sup>1</sup>; Luiz Gustavo de Almeida Chuffa<sup>1</sup>; Flávia Karina Delella<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Botucatu, São Paulo, Brasil

Corresponding Author:

Flávia Karina Delella

250 Professor Doutor Antonio Celso Wagner Zanin St, Botucatu, SP, Brazil. 18618-689

Phone: +55 14 3880 0500

e-mail: [flavia.delella@unesp.br](mailto:flavia.delella@unesp.br)

## Resumo

O câncer de ovário é a quinta doença ginecológica que mais mata mulheres no mundo. Este tipo de câncer tende a ser diagnosticado de maneira tardia, devido a sua natureza assintomática, sendo utilizado no tratamento a quimioterapia baseada em taxanos, como o Paclitaxel. Porém, este medicamento vem sofrendo resistência por parte das células neoplásicas ovarianas, comprometendo a recuperação das pacientes. Pesquisas recentes demonstraram que a associação entre quimioterápicos e produtos naturais otimizam a eficácia dos mesmos. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito do ácido anacárdico, isolado ou combinado com o agente antineoplásico Paclitaxel, sobre o potencial invasivo de células humanas de câncer de ovário. Para isso, células da linhagem SKOV-3 foram cultivadas e expostas ao Ácido anacárdico e Paclitaxel, de maneira isolada e combinada, analisando alterações morfológicas, a viabilidade celular e migração por inserto *transwell*. De maneira geral, nosso estudo mostrou que o Ácido anacárdico diminuiu a capacidade migratória das células, assim como afetou a viabilidade celular, tanto isolado quanto em sinergia com o antineoplásico Paclitaxel. Dessa forma acreditamos que nossos resultados possam contribuir com pesquisas futuras envolvendo a associação entre produtos naturais e tratamentos convencionais, particularmente no sucesso da aplicação do Ácido anacárdico no tratamento de câncer de ovário.

Palavras-chave: Ácido anacárdico, paclitaxel, câncer de ovário, composto natural, quimioterapia

## INTRODUÇÃO

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 considera ambos os sexos (Ghoneum et al., 2018; Siegel et al., 2020)). Possíveis fatores de risco para seu desenvolvimento incluem a hereditariedade, a nuliparidade, assim como a falta de amamentação. Já o uso de contraceptivos orais, gravidez e lactação estão associados a um risco reduzido (Cannistra, 2004; La Vecchia, 2017). A influência das idades da menarca e da menopausa são pouco embasadas na literatura.

Os sintomas são inespecíficos, tais como desconforto ou plenitude abdominal, dispepsia, saciedade precoce ou inchaço e na maioria das vezes em estágio inicial são assintomáticos. (Cannistra, 2004; Liu et al., 2018). Consequentemente, 40% a 50% dos pacientes são identificados apenas quando o CO já se desenvolveu em estágios avançados, levando a uma alta taxa de mortalidade (Liu et al., 2018). Outra razão é que embora muitos pacientes alcancem uma remissão clínica completa após a terapia primária, a doença se repete em 70% dos casos, levando a uma resistência aos medicamentos (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). 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 exerce os seus efeitos citotóxicos através de um mecanismo de ação único, envolvendo a ligação e a estabilização das subunidades de tubulina na formação dos microtúbulos (Weaver, 2014). 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% desses pacientes tem sobrevida a longo prazo (Cannistra, 2004; Banno et al., 2014).

A resistência ao Paclitaxel tem sido uma das principais causas de preocupação em relação à terapêuticas clínicas de CO (An et al., 2017; Liu et al., 2018). 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 mutações, apoiando sua sobrevivência e proliferação tornando-se assim resistente ao medicamento (Burrell et al., 2014;

Hata et al., 2016; Vasan et al., 2019; Sarmiento-Ribeiro et al., 2019).

Devido a resistência das células tumorais aos quimioterápicos convencionais, produtos naturais derivados de plantas estão sendo investigados como alternativos ou adjuvantes para uma variedade de tipos tumorais. O ácido anacárdico (AA) (Ácido 2-hidroxi-6-pentadecilbenzóico) é um composto natural extraído do líquido da casca da castanha de caju e das folhas do cajueiro (*Anacardium occidentale*) (Paul & Yeddanapalli, 1954), que possui importante ação antitumoral (Alam-Escamilla et al., 2015).

Pesquisas recentes 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). O papel antiangiogênico do AA foi investigado em cultura primária de células endoteliais de vasos sanguíneos de cordão umbilical, onde os resultados revelaram que a 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 (Wu et al., 2011).

Carvalho (2011) e colaboradores testaram a toxicidade aguda e subaguda do ácido anacárdico em camundongos Balb/c. Foi visto que a dose letal mínima é superior a 2.000 mg/kg de peso corporal (pc). No teste subagudo foram notadas apenas anormalidades leves em fêmeas, em altas doses de 1.000 mg/kg pc. Quando tratados com 300 mg/kg de peso corporal, os animais não apresentaram nenhuma alteração significativa. Também foi testada a mutagenicidade, em uma dose inferior a 300 mg/kg pc, obtendo que o AA não aumentou a frequência de micronúcleos, comparado ao controle positivo (Carvalho et al., 2011).

Recentemente, resultados promissores têm sido descritos ilustrando o efeito combinado do AA à 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 câncer de pâncreas. Em outro estudo, 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).

O efeito antitumoral do AA combinado com o Taxol foi testado em um modelo animal de câncer de mama de camundongo Balb/c. Os animais foram tratados com AA isolado e em combinação com Taxol, sendo que o cotratamento (CoT) diminuiu mais significativamente o tamanho do tumor, quando comparado aos demais grupos separadamente. Além disso, ambos os tratamentos diminuíram a metástase pulmonar. Também foi visto que o tratamento com AA

aumentou em 40% a taxa de sobrevivência de ratos e quando combinado com o taxol, o resultado foi ainda mais relevante, aumentando em 60%. Os animais inoculados com o tumor, quando tratados com AA e CoT aumentaram o peso corporal, concomitantemente ao aumento da taxa de sobrevivência (Gnanaprakasam et al., 2021).

O ácido anacárdico em combinação como agente antineoplásico Paclitaxel, pode nos trazer grandes resultados sobre importantes vias celulares como o ciclo celular, proliferação e morte celular, e a sinalização celular no câncer de ovário, podendo contribuir na atualização de tratamentos preventivos ou adjuvantes para pacientes pré-dispostos ou que já tenham desenvolvido o câncer estudado.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Cultura Celular

As células SKOV3 (células de câncer ovariano humano), derivadas de ascites malignas de uma paciente caucasiana, de 64 anos, foram adquiridas junto à empresa American Type Cell Culture (ATCC) (Manassas, Virginia, USA) por colaboradores e depositadas no banco de células nível 2 de biossegurança (Processo CTNBio nº 01200.007359/2001-11) do Laboratório de Cultura Celular do Departamento de Morfologia/IBB/UNESP. Foram cultivadas 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 CO<sub>2</sub> em atmosfera úmida a 37°C. Os meios foram trocados a cada 2 dias durante a expansão em garrafas de poliestireno de 25 e 75 cm<sup>2</sup> e o monitoramento das culturas 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 foram montados. O comitê de ética não se faz necessário por tratar-se de linhagem celular estabelecida e patenteada pela empresa ATCC, que mantém a responsabilidade sobre as células.

### 2.2 Exposição das Células ao Ácido anacárdico e Grupos Experimentais

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

**Grupos Experimentais:** As células SKOV-3 foram divididas em 4 grupos experimentais, como detalhado abaixo:

- i. **Grupo Controle:** Meio de cultura específico para cada tipo celular suplementado

com 10% de SFB (Sigma-Aldrich, EUA) e 1% de antibiótico e antimicótico (Gibco, Thermo Fisher Scientific).

ii. **Grupo Paclitaxel:** Idem meio de cultura grupo controle suplementado com Paclitaxel na concentração de 0,625  $\mu\text{M}$  diluído em DMSO (segundo como princípio Lupi et al., 2020) (Sigma-Aldrich, EUA).

iii. **Grupo Ácido Anacárdico:** Idem meio de cultura grupo controle suplementado com ácido anacárdico na concentração de 10  $\mu\text{M}$  diluído em DMSO (a concentração foi determinada pelo teste de IC<sub>50</sub>, seguindo como princípio Nambiar et al., 2016).

iv. **Grupo Ácido Anacárdico + Paclitaxel:** Idem meio de cultura grupo controle suplementado com ácido anacárdico na concentração de 10  $\mu\text{M}$  diluído em DMSO e Paclitaxel na concentração de 0,625  $\mu\text{M}$  diluído em DMSO (Sigma-Aldrich, EUA).

### 2.3 Viabilidade Celular

Para a análise de viabilidade as células (n=3) foram cultivadas em placa de 96 poços células da linhagem SKOV-3 por 24 horas, expostas ao Ácido anacárdico isolado e em sinergia e avaliadas através do ensaio de MTT (3,4,5- dimethylthiazol-2yl-2,5 difenil tetrazolium bromide). Esse ensaio baseia-se na capacidade das desidrogenases mitocondriais clivarem o anel de tetrazolium, promovendo a formação de cristais roxos.

O ensaio de viabilidade foi feito através do *MTT Cell Viability Assay* (Sigma-Aldrich<sup>TM</sup>, M2128), seguindo as instruções do fabricante. Os experimentos utilizaram triplicatas experimentais. As concentrações das células foram estabelecidas de acordo com a taxa de crescimento da linhagem celular mostrado pela empresa *American Type Culture Collection* (ATCC), sendo:  $1,3 \times 10^4$  células/poço

Após exposição as diferentes concentrações de Ácido anacárdico por 24 horas, colocamos 100 $\mu\text{L}$  de MTT (5mg/mL) diluído em meio sem SFB nos poços de cultura (placa de 96 poços). A incubação do MTT foi realizada por 4 horas à 37°C. O sobrenadante foi então removido e a cada poço adicionou-se 200 $\mu\text{L}$  DMSO antes da leitura, realizada em um aparelho de leitura ELISA em filtro de 580nm.

### 2.4 Migração Celular através do ensaio Transwell

Para elaboração deste ensaio foram utilizados insertos ThinCert com membranas de poros de 8  $\mu\text{m}$  em placas de 24 poços. Na parte superior do inserto foram plaqueadas  $2 \times 10^4$  células (SKOV-3) por poço, em 300  $\mu\text{L}$  de meio RPMI contendo o tratamento de seu respectivo

grupo (CT, PTX, AA e AA+PTX). Abaixo do inserto foram colocados 800 µl de meio RPMI suplementado com 10% SFB como um quimioatrator. A placa com os insertos foi incubada por 24 horas em estufa de CO<sub>2</sub>. Após a incubação, as células não invasivas na parte superior do inserto foram lavadas com cotonetes. As células migradas no fundo da membrana foram fixadas com metanol e coradas com hematoxilina a 0,1% para visualização. As células foram contadas em quatro campos, com uma ampliação de 400x utilizando um microscópio de luz invertido.

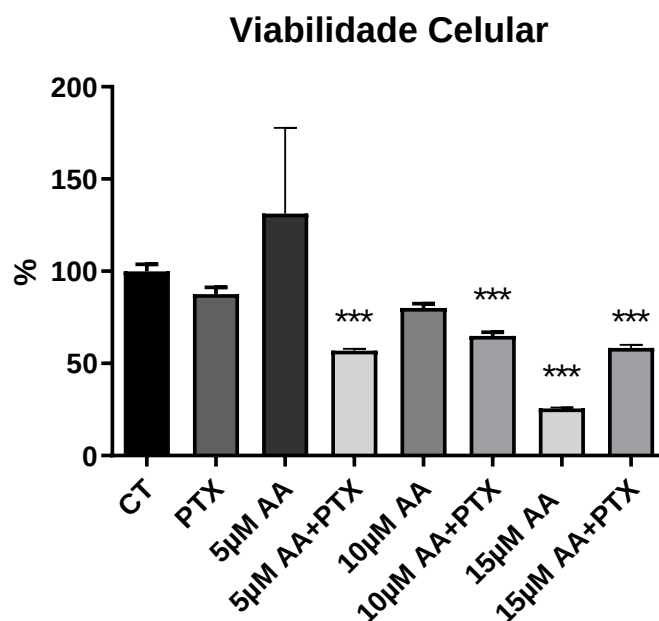
### **3. ANÁLISES ESTATÍSTICAS**

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, através do programa de análise estatística “Prism-versão 8.0.1”. As diferenças serão consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$ .

### **4. RESULTADOS**

#### *4.1 Viabilidade Celular*

Após o tratamento dos diferentes grupos experimentais, as células da linhagem SKOV-3 apresentaram diminuição na viabilidade em comparação com o grupo controle. O grupo 5µM AA+PTX apresentou diminuição de 43% da viabilidade em relação ao grupo controle, seguidos por diminuição de 20 e 35% nos grupos 10µM AA e 10µM AA+PTX respectivamente. Os grupos tratados com 15µM AA e 15µM AA+PTX obtiveram maior diminuição da viabilidade, com 75 e 42%.

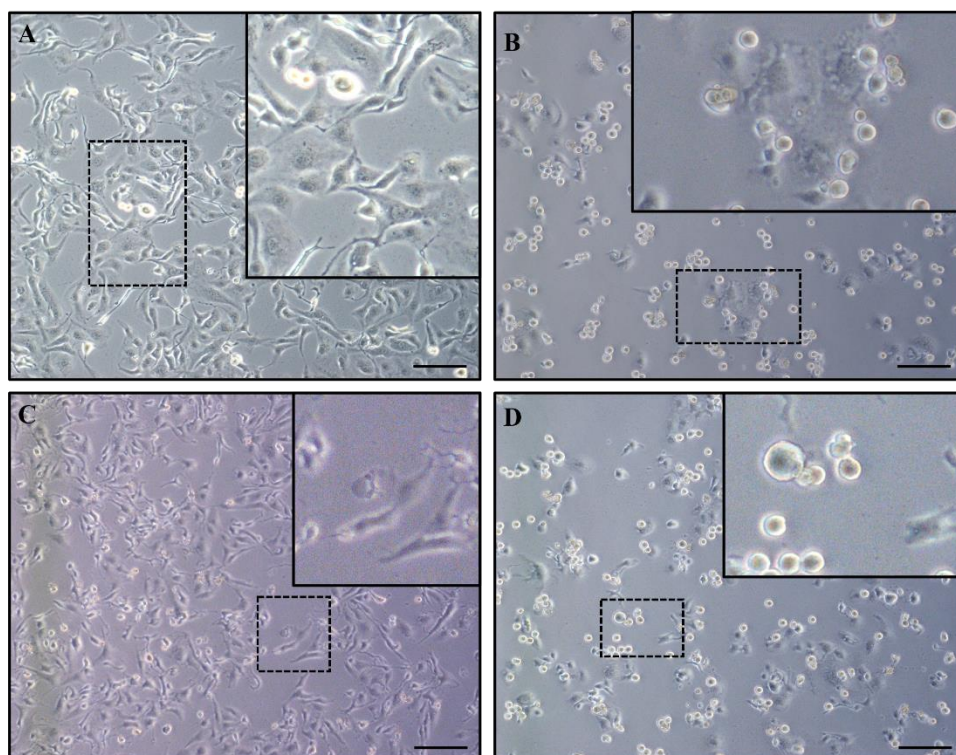


**Figura 5** - Efeito do Ácido anacárdico isolado ou em combinação com o Paclitaxel, na viabilidade das células SKOV-3 após 24 horas de exposição. CT: Controle; PTX: Paclitaxel; AA: Ácido Anacárdico. Os asteriscos correspondem à diferença estatística em relação ao controle, por One Way ANOVA e teste post hoc de Tukey (\*\*\*p <0,0001).

#### 4.2 Morfologia Celular

Através das imagens feitas pelo microscópio de luz invertido (Figura 6), foi possível observar a morfologia das células SKOV-3, a qual possuem formato fusiforme com prolongamentos celulares, aderidas a placa de cultivo em meio padrão (Figura 6A). O grupo tratado apenas com PTX (Figura 6B) apresentou retração parcial desses prolongamentos. O grupo tratado com ácido anacárdico na concentração de 10µM (Figura 6C) apresentou alterações na morfologia das células, tais como estreitamento dos prolongamentos celulares e diminuição da aderência célula-célula e célula-substrato, o que indica possível estresse celular. Quando observado o efeito do composto combinado com o antineoplásico PTX (Figura 6D), nota-se a retração total dos prolongamentos e perda da adesão celular. Essas características nos levam a deduzir que o composto natural (AA) isolado demonstra menor toxicidade para as células no período de 24 horas, comparado ao quimioterápico PTX, porém o tratamento combinado foi efetivo em alterar a morfologia celular.

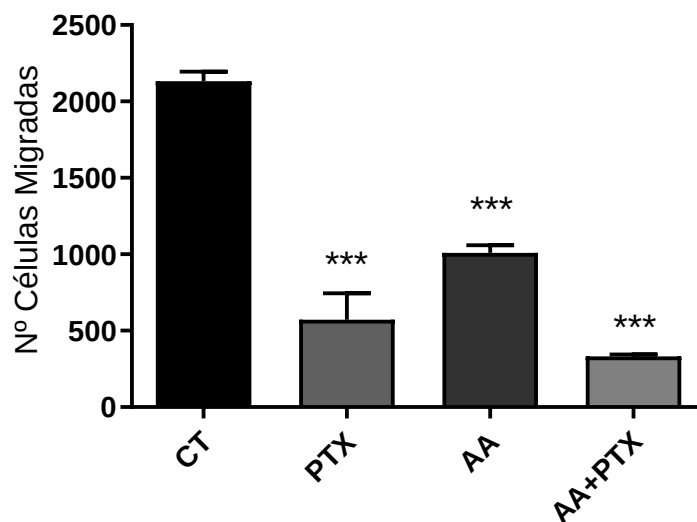
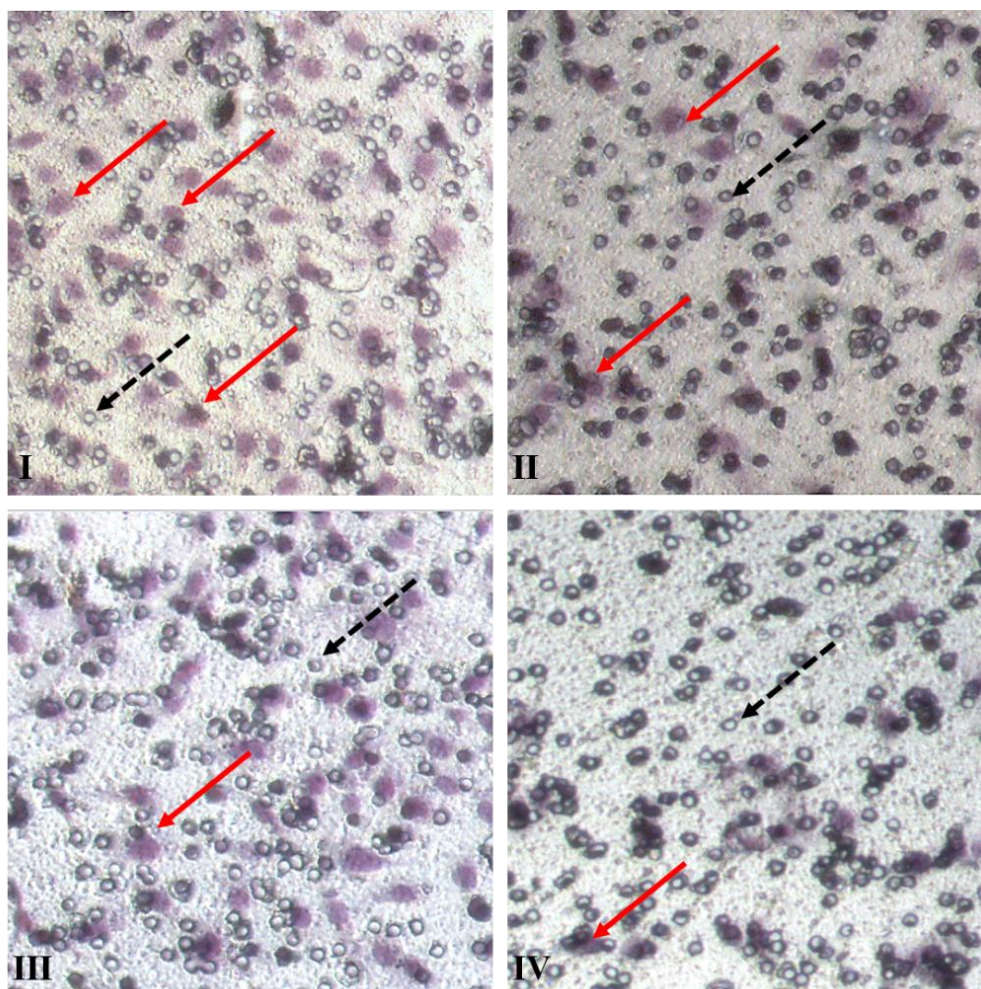




**Figura 6.** Alterações na morfologia das células SKOV-3 após exposição ao Ácido anacárdico isolado ou em combinação com Paclitaxel, após 24 horas. (A) Controle, (B) PTX, (C) AA, (D) AA+PTX. Os quadrados pontilhados destacam os detalhes das mudanças na morfologia celular de cada grupo experimental em comparação com o controle (A), como diminuição dos prolongamentos celulares (B), estreitamento celular (C) e desaparecimento dos prolongamentos e perda de adesão celular (D). Barra de escala = 30  $\mu$ m.

#### 4.3 Migração Celular através do Ensaio Transwell

A elaboração do ensaio de migração celular através de insertos *transwell* mostrou que o Ácido Anacárdico associado ao Paclitaxel diminuiu a taxa desse processo nas células SKOV-3 tratadas. Para avaliar sua possível atuação na migração de células tumorais ovarianas, plaqueamos células SKOV-3 em insertos *ThinCert* em meio contendo os tratamentos. O ensaio revelou que o Ácido anacárdico foi capaz de diminuir o número de células migradas, tanto isolado quanto em combinação com o quimioterápico Paclitaxel, sendo mais relevante a associação, onde observamos a diminuição em cinco vezes do número de células migradas em relação ao controle ( $P < 0,0001$ ).

**A****Migração celular****B**

**Figura 7** - Efeitos do Ácido anacárdico isolado ou em combinação com o Paclitaxel, na capacidade de migração das células SKOV-3. **(A)** A migração celular foi medida pela quantidade de células localizadas na parte inferior do inserto. **(B)** Representação da visualização dos insertos. I – Controle; II – PTX; III – AA; IV – AA+PTX. Células migradas são apontadas pelas setas vermelhas, poros de 8 µm do inserto são apontados pelas setas pretas tracejadas.

Imagens representativas do ensaio foram obtidas com ampliação de 20X. As amostras foram analisadas em triplicada biológica e técnica. Os resultados são expressos como média + SEM. Os asteriscos correspondem à diferença estatística em relação ao controle, por One Way ANOVA e teste post hoc de Tukey (\*\*\*p <0,0001).

## 5. DISCUSSÃO

As terapias convencionais para o câncer de ovário são baseadas em abordagens cirúrgicas e administração de quimioterápicos tradicionais. O ácido anacárdico é um extrato natural considerado promissor no tratamento de diversas malignidades, como o câncer. A atuação do AA na viabilidade de células tumorais ovarianas parece ser alterada de maneira dose-dependente. Quando expostas à concentração de 5 $\mu$ M de AA, observou-se efeito proliferativo, assim como visto no estudo de Xiu et. al. (2014). Entretanto, no tratamento combinado com o paclitaxel não houve efeito proliferativo na mesma concentração. Ao aumentarmos a dose para 10 $\mu$ M de AA, a viabilidade foi reduzida substancialmente. Tan e colaboradores descreveram a regulação negativa da atividade de histona acetiltransferase (HAT) de p300 pelo AA em células tumorais prostáticas (LNCaP), de forma não competitiva. Embora não afete a transcrição de DNA diretamente, a transcrição dependente de HAT é fortemente inibida (Hemshekhhar et al., 2011). Esses dados corroboram com nossos achados e indicam sua possível atuação citotóxica em células de câncer de ovário de acordo com a dose administrada.

A literatura recente indica 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). Em nosso estudo, o AA na dose de 10 $\mu$ M foi capaz de diminuir a migração em cinco vezes quando comparado ao controle. Wu e colaboradores (2011) descreveram que a inibição da HAT poderia suprimir as quinases Src e FAK, as quais interagem física e funcionamente para regular diversas funções celulares como o processo migratório. Essa inibição poderia explicar a redução da migração vista em nosso estudo, ao contrário do que descreveu Xiu e colaboradores (2014), onde o AA potencializou a proliferação e inibiu a apoptose em células de CO, além de aumentar a migração e invasão celular. Apesar de ser o único trabalho encontrado na literatura até o momento que avalia o papel do AA no câncer de ovário, trabalhos que utilizam outros tumores apresentam resultados semelhantes aos encontrados no presente estudo, como diminuição da atividade proliferativa e aumento da apoptose em células de câncer de próstata (Tan et al., 2012); e diminuição acentuada da migração (90%) após a exposição ao AA em células HT1080 (Nambiar, 2016).

Um estudo utilizando células de câncer colorretal descreveu a presença de células vivas

flutuantes após a exposição ao composto Fucoxanthinol, oriundas da indução do anoikis (apoptose induzida pela perda de adesão a matriz extracelular) (Terasaki, 2017). Em nosso estudo, observamos grande quantidade de células flutuantes, como resultado da exposição ao AA, além de apresentarem alterações morfológicas até mesmo nas células que permaneciam aderidas. Essas alterações foram vistas principalmente na associação entre os compostos. A resistência das células tumorais ao anoikis é importante para a habilidade delas para sobreviverem, crescerem e para metástase. Durante o processo de anoikis a ativação da FAK é conhecida por atuar como um sinal de sobrevivência (Frisch et al., 1996). Dada a potente inibição da FAK pelo AA já descrita, hipotetizamos que o evento visto em nosso estudo, seja fruto da indução de anoikis pelo AA e portanto, possa atuar na prevenção de metástase tumoral (Wu et al., 2011). Entretanto, esta suposição precisa ser melhor avaliada em nosso estudo, como parte das análises complementares a esses resultados.

## **6. CONCLUSÃO**

O presente estudo demonstrou que o AA pode reduzir a viabilidade de células tumorais ovarianas, além de reduzir a migração celular. Esses efeitos podem ser derivados da regulação negativa da atividade de histona acetiltransferase de p300 pelo AA e consequentemente, a supressão das quinases Src e FAK. AA apresentou resultados mais significativos quando combinado ao agente antineoplásico paclitaxel, tais como, maior redução de viabilidade e redução da capacidade migratória. Dessa forma, nossos achados sugerem que o ácido anacárdico pode servir como um agente terapêutico coadjuvante para o tratamento de câncer de ovário.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS – CAPÍTULO 1

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Carvalho, A. L. N., Annoni, R., Silva, P. R. P., Borelli, P., Fock, R. A., Trevisan, M. T. S., & Mauad, T. (2011). Acute, subacute toxicity and mutagenic effects of anacardic acids from cashew (*Anacardium occidentale* Linn.) in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 135(3), 730–736. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.04.002>.
- 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.
- 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.
- Frisch, S. M., Vuori, K., Ruoslahti, E., Chan-Hui, Y., Bristol, \*, & Squibb, M. (1996). *Control of Adhesion-dependent Cell Survival by Focal Adhesion Kinase*. <http://rupress.org/jcb/article-pdf/134/3/793/1265975/793.pdf>
- Ghoneum A, Afify H, Salih Z, Kelly M & Said N. 2018. Role of tumor microenvironment in ovarian cancer pathobiology. *Oncotarget*, 9(32): 22832.
- Gnanaprakasam, J. N. R., López-Bañuelos, L., & Vega, L. (2021). Anacardic 6-pentadecyl salicylic acid induces apoptosis in breast cancer tumor cells, immunostimulation in the host and decreases blood toxic effects of taxol in an animal model. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 410. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2020.115359>
- 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.
- 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., Santhosh, M. S., Kemparaju, K., & Girish, K. S. (2011). Emerging Roles of Anacardic Acid and Its Derivatives: A Pharmacological Overview. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2011.00833.x>
- 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.
- La Vecchia C. 2017. Ovarian cancer: epidemiology and risk factors. *European journal of cancer prevention*, 26(1): 55-62.
- 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*.
- 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.
- 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.
- Paul VJ, Yeddnapalli LM. 1954. Olefinic Nature of Anacardic Acid from Indian Cashew-nut Shell Liquid. *Nature* 174 (4430): 604.
- Priyadarshini K, & Keerthi A. U. 2012. Paclitaxel against cancer: a short review. *Med chem*, 2(7), 139-141.
- 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.
- 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
- 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, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2020). Cancer statistics, 2020. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 70(1), 7–30. <https://doi.org/10.3322/caac.21590>
- Slichenmyer WJ & Von DH. 1991. Taxol: a new and effective anti-cancer drug.
- Tan J, Chen B, He L, Tang Y, Jiang Z, Yin G, Wang J, Jiang X. Anacardic acid (6-pentadecylsalicylic acid) induces apoptosis of prostate cancer cells through inhibition of androgen receptor and activation of p53 signaling. *Chin J Cancer Res*. 2012 Dec;24(4):275-83. doi: 10.3978/j.issn.1000-9604.2012.10.07. PMID: 23359208; PMCID: PMC3551327
- 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
- Terasaki, M.; Maeda, H.; Miyashita K.; Mutoh, M. (2017). Induction of Anoikis in Human Colorectal Cancer Cells by Fucoxanthinol, *Nutrition and Cancer*, DOI: 10.1080/01635581.2017.1339814
- Vasan N, Baselga J & Hyman DM. 2019. A view on drug resistance in

- cancer. *Nature*, 575(7782), 299-309.
- Weaver BA. 2014. How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. *Molecular biology of the cell*, 25(18): 2677-2681.
- 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.
- Xiu YL, Zhao Y, Gou WF, Chen S, Takano Y, Zheng HC. Anacardic acid enhances the proliferation of human ovarian cancer cells. *PLoS One*. 2014 Jun 12;9(6):e99361. doi: 10.1371/journal.pone.0099361. PMID: 24921663; PMCID: PMC4055655.
- 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.
- 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

## CAPÍTULO 2



## **Analysis of differentially expressed genes in the secretome of ovarian cancer**

**Mirian Carolini Esgoti Aal<sup>1</sup>; Juliana Trindade Caleffi<sup>1</sup>; Gabriel Henrique Caxali<sup>1</sup>; Luiz Gustavo de Almeida Chuffa<sup>1</sup>; Paula Paccielli Freire<sup>2</sup>; Robson Francisco Carvalho<sup>1</sup>; Flávia Karina Delella<sup>1</sup>**

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

<sup>2</sup> Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

Corresponding Author:

Flávia Karina Delella

250 Professor Doutor Antonio Celso Wagner Zanin St, Botucatu, SP, Brazil. 18618-689

Phone: +55 14 3880 0500

e-mail: [flavia.delella@unesp.br](mailto:flavia.delella@unesp.br)

## **Abstract**

Ovarian cancer is the fifth deadliest gynecological disease worldwide. Due to its asymptomatic nature in the early stages, it tends to be diagnosed late. The present study aimed to identify differentially expressed genes and related pathways in the secretory of ovarian cancer patients. Gene expression profiles of tumor tissue and normal tissue samples were obtained using XenaBrowser web-based tools, which use the public databases of The Cancer Genome Atlas (TCGA) and Genotype-Tissue Expression (GTEx), respectively. The genes were selected from a p-value <0.01 and subjected to differential expression analysis establishing a fold change cutoff of 1.2. Subsequently, we performed the functional enrichment of differentially expressed genes using the web-based tool EnrichR. Secretome analysis revealed 628 up-regulated genes, of which 21 formed a cluster with higher gene interaction. The analysis indicated alterations in the expression of signaling pathways related to inflammatory response, like cytokines and chemokines. Next, we investigated which molecules would affect the survival rate of patients with ovarian cancer and found that high-risk ovarian cancer patients show elevated gene expression index CXCL6 and short overall survival. Thus, among the molecules analyzed, this study highlighted CXCL6 as a novel potential therapeutic target for ovarian cancer.

**Keywords:** bioinformatics, cytokines, chemokines, enrichment, CXCL6, prognostic biomarker

## 1 Introduction

Cancer accounts for almost half of all deaths in the world, being more prominent in developed countries (Who, 2017). In women, ovarian cancer (OC) is described as the most lethal gynecological disease (Siegel et al., 2020). Due to its characteristic of not manifesting symptoms or even manifesting non-specific symptoms, it tends to be diagnosed late, with a high recurrence (Ottevanger, 2017; Liu et al., 2018). Thus, research that encompasses the nature of ovarian cancer development have been needed to seek new methods of diagnosis, prevention, or treatment.

For the progress of cancer, tumor cells need to develop strategies to evade the immune system, since it can recognize and eliminate tumor cells (Vesely, 2011). Among the evasion, mechanisms can reduce antigen presentation, upregulation of anti-apoptotic molecules, modified cancer antigens resulting from genomic instability, and co-option of immune cells to promote tumor proliferation and dissemination (Busutil, 2014). Another relevant factor for cancer progression is the connections from the tumor's communication with its tumor microenvironment. This communication has resulted from the secretion of proteins responsible for the interaction between normal and tumor cells (cytokines) (Collisson, 2019).

The presence of cytokines it is linked to the inflammatory process. The balance between pro and anti-inflammatory cytokines is critical for the host's antitumor immune response (Macciò, 2012). Inflammation contributes to all stages of carcinogenesis, including tumor initiation, promotion, and progression. However, tumor cells can produce immunogenic proteins recognized as foreign, inducing an anti-neoplastic immune response (Mantovani, 1999). In turn, tumor cells develop mechanisms to evade anti-tumor immunity, creating an immunosuppressive microenvironment. This microenvironment produces different cytokines, which impair the differentiation, maturation, and function of antigen-presenting cells (Macciò, 2012).

The analysis of these molecular mechanisms can contribute to differential strategies to treat different malignancies (Collisson, 2019). Thus, this study used bioinformatics tools and public databases: The Human Protein Atlas (HPA), The Cancer Genome Atlas (TCGA), Genotype tissue Expression (GTEx), Xena Browser, EnrichR and, Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/ Proteins (STRING) to identify and analyze differentially expressed genes within the secretome of ovarian cancer patients.

## 2. Material and Methods

### 2.1 Data Collection and Differential Expression Analysis

Transcriptional profiles from TCGA of ovarian tumor samples were compared with matched normal tissues from GTEx. The download of normal and tumor samples was performed using the online tool Xena Browser (<https://xenabrowser.net/>). Subsequently, the parameters were selected: Data type: Phenotypic; Phenotypic: sample type, and the primary site. Then, we applied a filter to select only samples from the primary ovarian tumor (TCGA) and ovarian tissue (GTEx). After that, we analyzed the expression of 1708 secreted protein-coding genes. We used RNA-Seq data uniformly processed and unified by Xena Browser (<https://xenabrowser.net/>). The transcriptome data were expressed in  $\log_2$  (normalized count +1) to enable the comparison between different TCGA and GTEx. Differentially expressed genes between tumor and normal samples were determined with *Welch's t test* applying the statistical cut-offs of  $|\text{fold change}| (\text{FC}) \geq 1.2$ , and  $p\text{-value} < 0.01$ .

### 2.2 Secreted protein-coding genes

We obtained the list of secreted protein-coding genes (secretome) used as a reference from The Human Protein Atlas database (<https://www.proteinatlas.org/>). We selected a list of 1708 proteins secreted in the blood, the brain, the digestive system, the male and female reproductive systems, the extracellular matrix. We choose this list because it excludes proteins that are membrane-associated or in intracellular compartments, such as endosomes or lysosomes. Thus, we emphasize only proteins secreted by different cell types.

### 2.4 Functional Enrichment Analysis

To determine the biological processes and pathways enriched by the differently expressed genes (DEGs) identified above, we used the EnrichR platform (<https://maayanlab.cloud/Enrichr/>). We analyzed the output of KEGG 2019 Human and Gene Ontology Biological Process 2018. We performed analyzes for the up-regulated genes and the down-regulated genes. We represented in graphs the transformed p-value ( $-\log_{10} p\text{-value}$ ) and the percentage of enriched genes per term. We generated the graphs with GraphPad Prism v.8.0.1 (GraphPad Software).

### 2.5 Construction of interaction network between differentially expressed genes

The sets of genes related to the enriched terms were submitted to the online tool Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins (STRING). To analyze the relationship between genes, we considered the top 5 terms with the lowest False Discovery Rate (FDR) and, for the construction of networks, we used the following parameters already established by Oliveira (2020): *Meaning of network edges: confidence; Active interaction sources: Experiments, database, co-expression, neighborhood, co-occurrence; Minimum required interaction score: high confidence of 0.900; Display simplifications: hide disconnected nodes in the network.*

### 2.5 Survival analysis and risk assessment

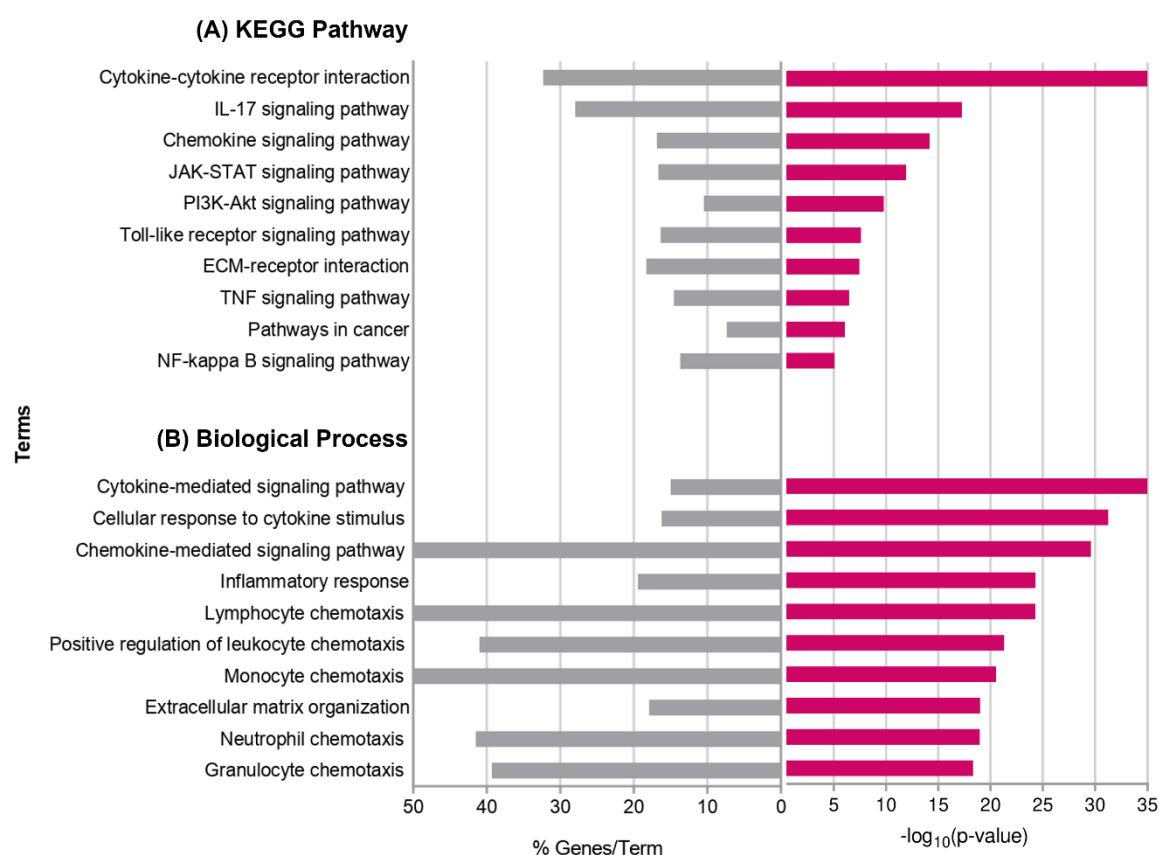
The prognostic values of the Overall Survival (OS) of each gene within the evident cluster (differentially expressed genes) were investigated via the SurvExpress platform (<http://bioinformatica.mty.itesm.mx:8080/Biomatec/SurvivaX.jsp>). High and low-risk groups were divided based on the maximized risk algorithm (Aguirre-Gamboa, 2013). This online tool allowed us to assess the tumor gene expression and analyzed their association with the survival of patients by Cox proportional hazard regression in high-risk and low-risk, as determined through the SurvExpress optimization algorithm.

## 3 Results

### 3.1 Differential expression profiles of secretome genes across human ovarian cancers

We obtained a total of 507 samples, 88 samples of normal ovarian tissue belonging to the GTEx platform, and 419 primary ovarian tumors from the TCGA database. Differential expression analysis revealed 628 up-regulated and 411 down-regulated genes.

DEGs had the most significant enrichment within the Gene Ontology database in Biological Process (BP) and the KEGG 2019 (human) signaling pathways. Among the enriched DEGs, it was noted that with the up-regulated genes we found the terms “Cytokine-cytokine receptor interaction”; “IL-17 signaling pathway”; “Chemokine signaling pathway” and others (Figure 1-A). In the Biological Process database, there was an enrichment of terms such as “Cytokine-mediated signaling pathway”; “Cellular response to cytokine stimulus”; “Chemokine-mediated signaling pathway”; “Inflammatory response”; and others (Figure 1-B). The enrichment of down-regulated genes is showed in Supplementary Figure 1.



**Figure 1.** Enrichment analysis of ovarian cancer secretome obtained from The Cancer Genome Atlas (TCGA) up-regulated compared to Genotype-Tissue Expression (GTEx) corresponding normal tissues. (A) Top 10 KEGG pathways enriched with the up-regulated genes; (B) Top 10 biological processes (GO) enriched with the up-regulated genes; The data express the percentage of enriched genes per term (left in gray) and  $-\log_{10}$  of the p-value (right in pink). KEGG (The Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes 2019 Human).

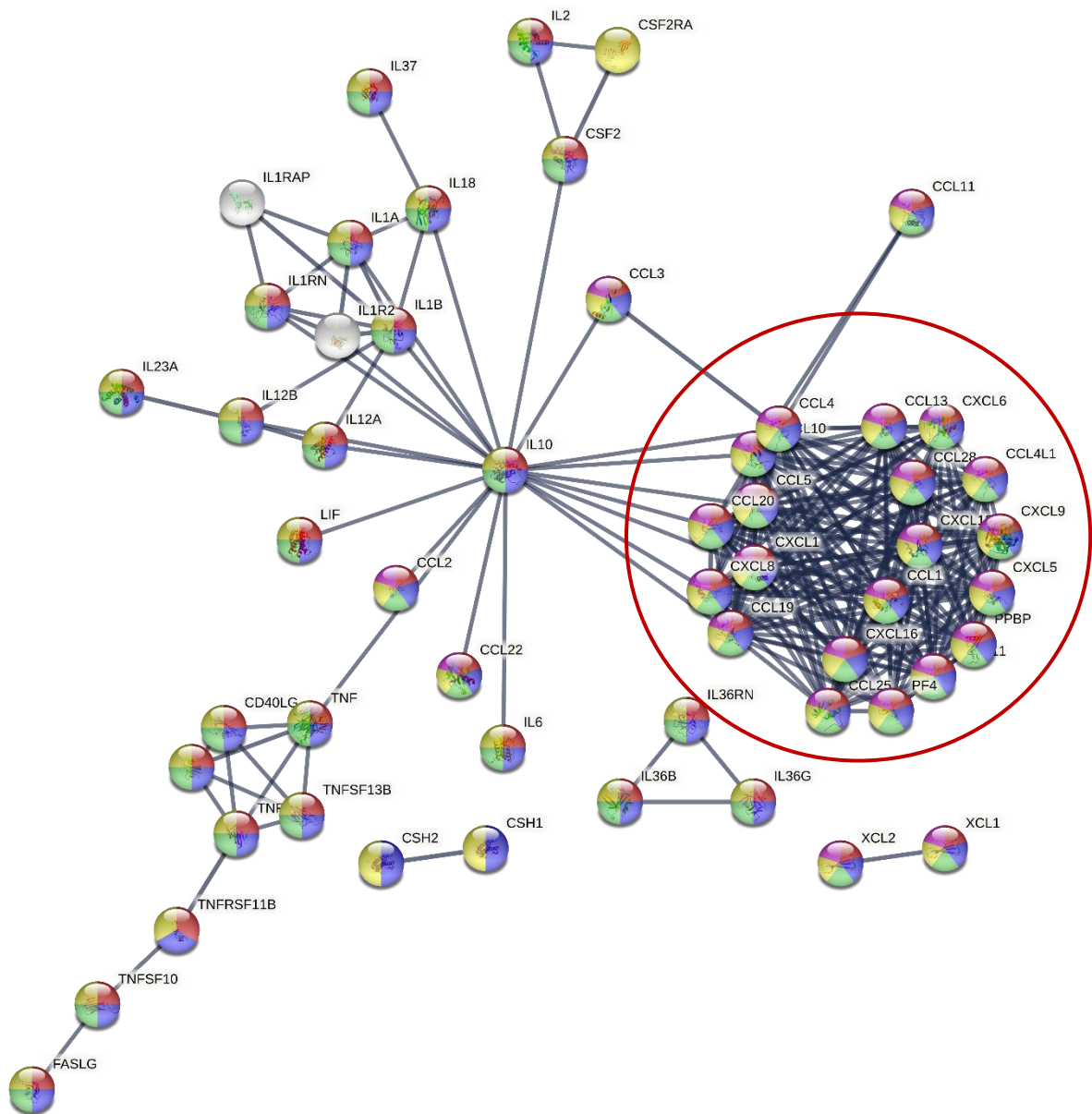
### 3.2 Gene interaction network

In the analysis of the set of up-regulated genes, we choose five terms enriched in Molecular Function (Gene Ontology), according to the lowest FDR: cytokine activity, receptor-ligand activity, cytokine receptor binding, molecular function regulator, and chemokine activity (Table 1).

**Table 1** – Description of the molecular functions found in the central cluster.

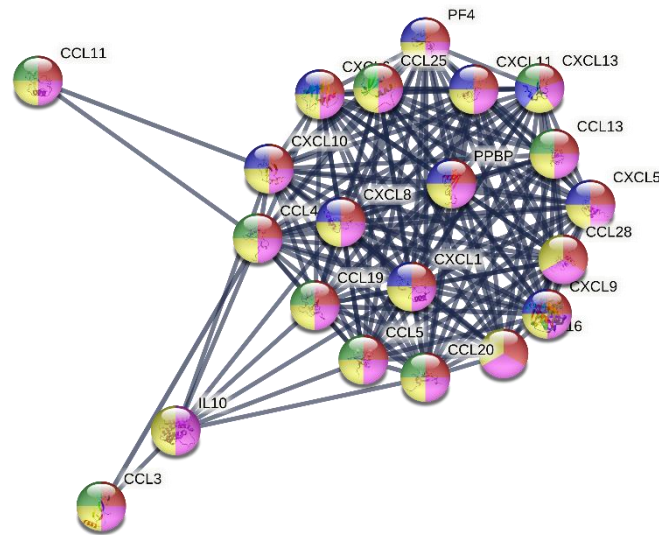
| Molecular Function (Gene Ontology) |                                  |                      |
|------------------------------------|----------------------------------|----------------------|
| GO - Term                          | Description                      | False discovery rate |
| GO:0008009                         | Chemokine activity               | $1.87^{-44}$         |
| GO:0045236                         | CXCR chemokine receptor binding  | $9.62^{-25}$         |
| GO:0048020                         | CCR chemokine receptor binding   | $7.25^{-14}$         |
| GO:0048248                         | CXCR3 chemokine receptor binding | $5.68^{-13}$         |
| GO:0031735                         | CCR10 chemokine receptor binding | $7.07^{-08}$         |

We observed the formation of an evident cluster containing the genes, *CCL4*, *CCL5*, *CCL13*, *CCL19*, *CCL20*, *CCL25*, *CCL28*, *CXCL1*, *CXCL5*, *CXCL6*, *CXCL8*, *CXCL9*, *CXCL10*, *CXCL11*, *CXCL13*, *CXL16*, *PF4*, *PPBP* more interconnected and others more distant attachments such as *CCL11*, *CCL3*, *IL10* and other secondary clusters (Figure 2 – red circle). We observed the formation of an evident cluster and other secondary connections mediated by *IL10*. From that, we isolated this cluster to study it (Figure 3).



**Figure 2:** Gene interaction network of setting up-regulated genes enriched in the term Cytokine-cytokine receptor interaction secreted in ovarian cancer. The STRING analysis (<http://www.string-db.org>) illustrates the numerous possible interactions between secreted genes with a minimum confidence score of 0.9. In the resulting network, genes are represented as nodes connected by edges. The five main terms of Molecular Function (Gene Ontology)

enriched with lower False discovery rate (FDR) are represented by the color of the nodes: cytokine activity (red), receptor-ligand activity (blue), cytokine receptor binding (green), molecular function regulator (yellow), chemokine activity (pink) and without functional enrichment (white).

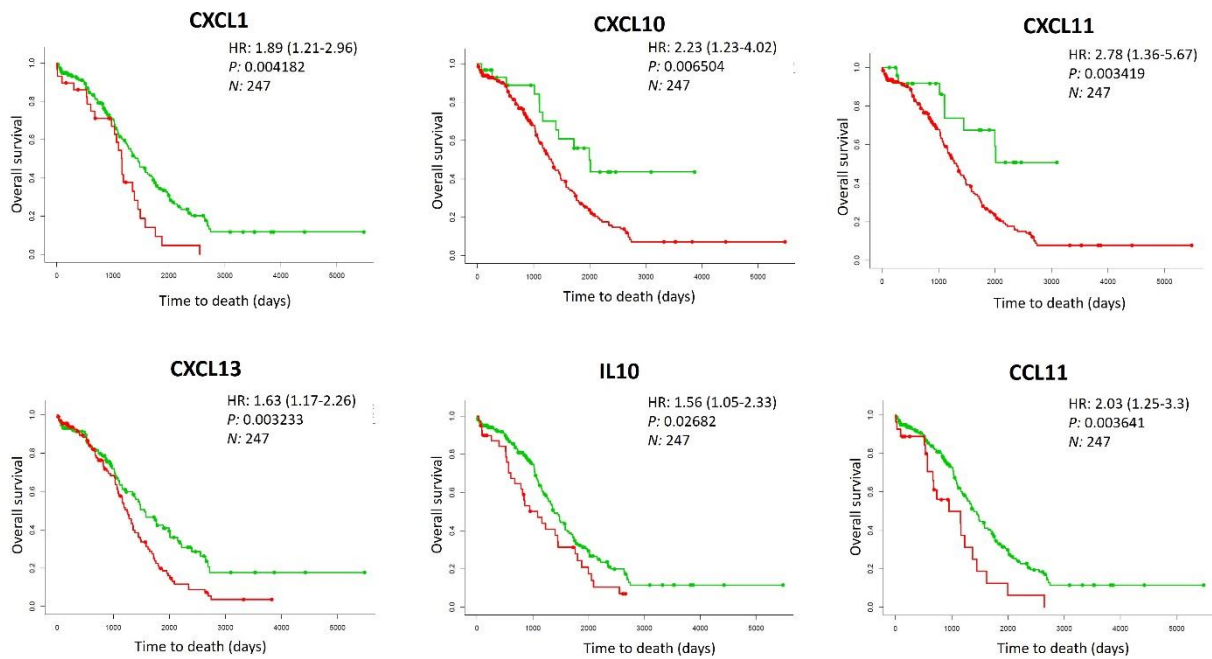


**Figure 3:** The central cluster formed from the gene interaction network of the regulated set of genes enriched in the term “Cytokine-cytokine receptor interaction” secreted in ovarian cancer. The STRING analysis (<http://www.string-db.org>) illustrates the numerous possible interactions between secreted genes with a minimum confidence score of 0.9. In the resulting network, genes are represented as nodes connected by edges. The five main terms of Molecular Function (Gene Ontology) enriched with lower False discovery rate (FDR) are represented by the color of the nodes: Chemokine activity (red), CXCR chemokine receptor binding (blue), CCR chemokine receptor binding (green), cytokine receptor binding (yellow) and cytokine activity (pink).

### 3.3 Survival analysis

To evaluate the prognostic value of the differentially expressed genes, we used the genes from the cluster above to analyze overall survival. Patients were divided into two groups, high risk, and low risk, maximizing the number of patients into risk groups by an optimization algorithm from the ordered prognostic index (Figure 4). High expression levels of *CCL11*, *IL10*, *CXCL1* genes in high-risk group were associated with lower survival rates. High expression levels of *CXCL10* and *CXCL11* in low-risk patients also were associated with lower survival rates. On the other hand, high levels of *CXCL13* expression in low-risk patients were associated with higher survival rates.

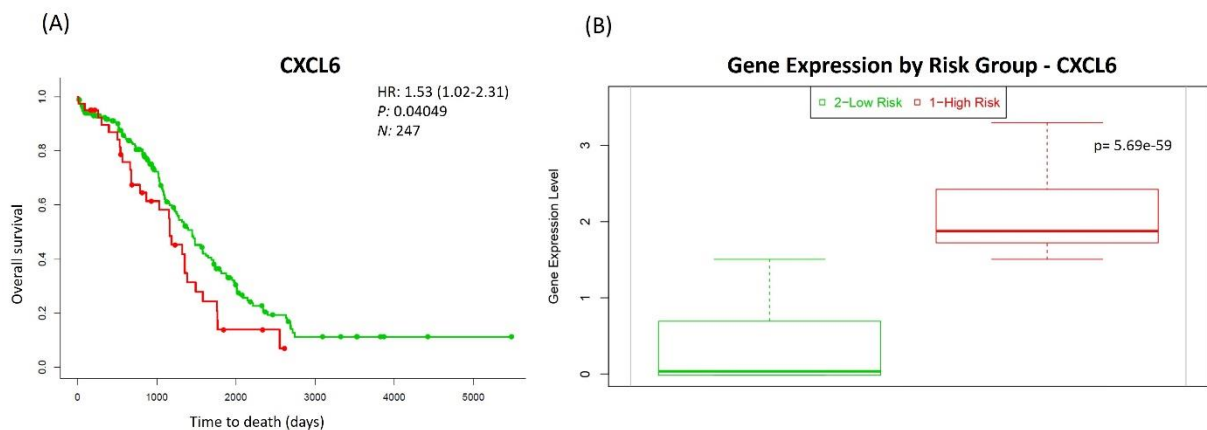




**Figure 4:** The survival analysis of genes differentially expressed in the secretome of the ovarian cancer. The data were calculated using the data set of The Cancer Genome Atlas of the ovarian cancer in the web-based tool Surv-Express, which stratified the cancer patients in high-risk and low-risk (red and green respectively). The adjusted hazard ratio (HR) with corresponding 95% confidence intervals, log-rank  $P$ -value ( $P$ ), and the number of patients successfully stratified ( $N$ ) determined by univariate Cox regression analyses are shown on each survival Kaplan-Meier Curve.

### 3.4 CXCL6 as a novel biomarker in ovarian cancer

The survival analysis revealed that high levels of expression of *CXCL6* in high-risk patients were associated with lower survival rates, as show in Figure 5.

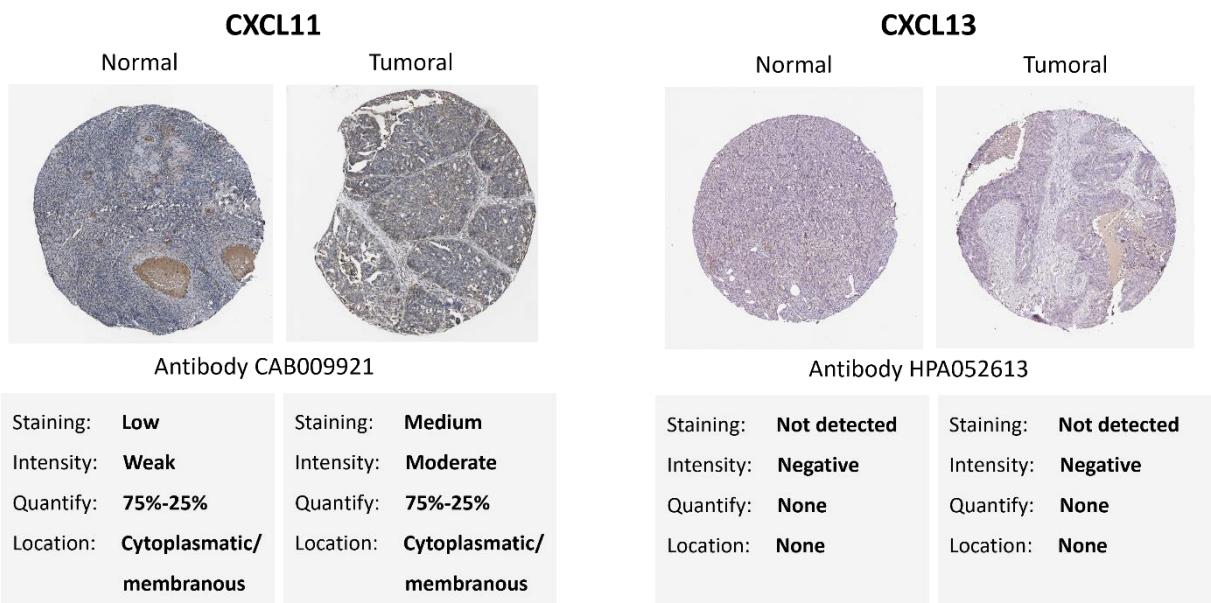


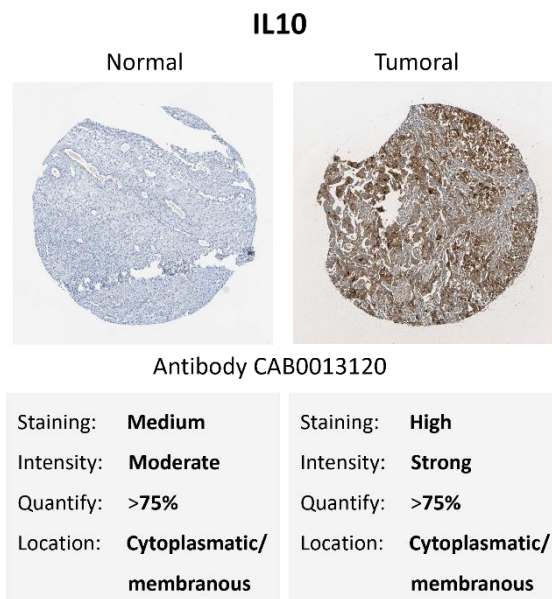
**Figure 5:** The survival analysis of *CXCL6* gene in secretome of ovarian cancer patients. The data were calculated using the data set of The Cancer Genome Atlas of the ovarian cancer in the web-based tool Surv-Express, which

stratified the cancer patients in high-risk and low-risk (red and green respectively). (A) The adjusted hazard ratio (HR) with corresponding 95% confidence intervals, log-rank *P*-value (*P*), and the number of patients successfully stratified (*N*) determined by univariate Cox regression analyses are shown on each survival Kaplan-Meier Curve. (B) The gene expression by Risk Group, p-value (*p*).

### 3.4 In Silico Validation of Secreted Proteins

Immunohistochemical staining for the genes identified with increased gene expression in ovarian tumoral samples by the HPA database. Ovarian (OV) immunohistochemical images were analyzed, and two genes (CXCL11 and IL10) showed high or medium immunostaining in OV tumor tissue while low or medium in normal OV tissue. CXCL13 was not detected in immunostaining of tumor or normal tissue. The chemokines CXCL1, CXCL10, and CCL11 did not have images available in the HPA database, despite having established data about their involvement in OC. CXCL6 also did not have available images in the HPA database, further has no data in the literature concerning its role in ovarian cancer.





**Figure 6:** Identification of secreted genes in normal and ovarian cancer (OV) tissues using immunohistochemical staining data available at The Human Protein Atlas database. These proteins were selected based on their significant increased gene expression, as identified using the Xena Browser tool.

## 4 Discussion

Ovarian cancer is one of the gynecological malignancies that most affect women worldwide, and its mortality rate exceeds that of uterine cancer (Li, 2019). The conditions for its development remain unknown but it seems that inflammation can influence the recruitment of cancer cells (Jia, 2018). We sought to characterize the molecular and biological functions of differentially expressed genes within ovarian cancer secretome. Our results revealed genes described as mediators of the inflammatory response and cytokines that promote the chemotaxis of immune system cells (STRING, 2021).

The chemokines found of the CXC type belong to both the ELR+ and the ELR- groups. CXC ELR+ chemokines promote neutrophil chemotaxis and angiogenesis, such as *CXCL1* and *CXCL6* found in our study (Strieter et al., 1995). Recent research has found that the co-culture of human cervical cancer cells and autologous fibroblasts is associated with higher levels of *CXCL5* and *CXCL1* and their *CXCR2* receptor involved in a pro-angiogenic pathway (Spurgeon, 2017). Elevated levels of *IL10* were related to malignant and benign tumors of ovarian cancer, being more significant in malignant tumors. Furthermore, the survival rate was significantly higher in patients with lower serum levels of *IL8* and *IL10* (Zhang et al., 2019).

ELR-type CXC chemokines are known to be angiostatic, and to attract lymphocytes and

natural killer (NK) cells (Strieter et al., 1995). In our study, we found the chemokines *CXCL11* belonging to this group. Mediators *CXCL11* and *CXCL13* (belonging to ELR+ group), *CXCR3* receptor ligands, have been associated with better survival rates among ovarian cancer patients (Nakamura, 2019). However, *CXCL11* has also been described as angiogenic due to its binding to a different portion of the *CXCR3* receptor. That may be associated with decreased effector T cell function (Karin, 2018).

CC chemokines induce the recruitment of dendritic cells, monocytes, lymphocytes, NK cells, eosinophils, and basophils (Verbeke, Struyf, Laureys, et al., 2011). In our study, we found the presence of the chemokine *CCL11* as a biomarker in the worsening prognosis of patients with ovarian cancer. Recent findings implicate *CCL11* as a direct mediator of ovarian tumorigenesis was also seen significant levels of *CCL11* and its receptors *CCR2*, *CCR3*, and *CCR5*, on ovarian cell lines and tissue sections with a strong positive correlation between individual receptor expression and tumor grade (Nolen & Lokshin, 2010).

Under normal physiological conditions, it was seen that *CXCL6*, an ELR+CXC chemokine also known as *GCP2*, participates in cardiac repair and regeneration through its paracrine secretion by human cardiac progenitor cell (CPCs). In turn, it works by favoring the recovery of affected vessels, acting on cardiac mesenchymal cells through its angiogenic properties (Torán et al., 2017). However, these same characteristics appear to be crucial in determining a worse prognosis in cancer. In our study, the high expression of the *CXCL6* were significantly associated with a poor survival index in the ovarian cancer samples. In a cervical cancer model, up-regulation of *CXCL6* level restored the proliferation, colony formation, migration, and invasion of cervix squamous cell carcinomacells (Shen et al., 2019). In addition, a previous study indicates that the modulation promoted by the upregulation of miR-515-5p in the *CXCL6* gene was able to suppress cell proliferation, migration and promote apoptosis in non-small cell lung cancer (NSCLC), confirming its carcinogenic role (J. Li et al., 2018). In a study with human brain microvascular endothelial cells (HBMEC), *CXCL6* regulated ischemia-reperfusion injury-induced permeability and proliferation by modulating Sirt3 expression via AKT/FOXO3a activation (Wang et al., 2021). GCP-2 was predominantly induced in mesenchymal cells by IL-1 but down-regulated by IFN-. This suggests a more selective role of GCP-2 in inflammation (Wuyts et al., 2003).

Verbeke et al (2011), demonstrated the involvement of *CXCL6* in melanoma growth and metastasis by neutralizing it with an anti-muGCP-2 monoclonal antibody. In addition, it was described an inverse correlation existing between the residual amount of antibodies in the blood circulation and the tumor size in mice (Verbeke, Struyf, Berghmans, et al., 2011). *CXCL6* was

up-regulated in ovarian cancer lineage (OVCAR-3) after treatment with the demethylating agent 5-aza-deoxycytidine (5-aza-dC). In addition, it was also found hypermethylated in ovarian cancer compared to control tissues, indicating that this gene can undergo functionally significant changes in methylation during cancer development (Menendez et al., 2007).

The role of this chemokine in ovarian cancer has not been elucidated in the literature so far. However, the mediation promoted by its *CXCR1* and *CXCR2* receptors was associated with cancer progression, besides decreasing apoptosis and improving angiogenesis in OC (Z. Li et al., 2014; Taki et al., 2018; Yang et al., 2010). These data indicate that *CXCL6* is important for the metastasis and progression of cancer overall. We believed that it plays an oncogenic role in ovarian cancer; once the survival index to this chemokine was lower in high-risk patients that had higher gene expression index. As future steps, new experimental studies should be carried out to clarify the *CXCL6* mechanisms involved in this process.

## 5 Conclusions

The findings gathered in this article characterize differentially expressed genes that encode secretome proteins. Among them, signaling pathways involved in the inflammatory process stood out. Moreover, many chemokines were identified in OC secretome, with known roles in the literature. However, the role of *CXCL6* in this cancer type is unclear. In this study, we demonstrated that *CXCL6* was up-regulated in ovarian cancer and decrease the survival index. These events indicated a role for *CXCL6* as an inedited prognostic biomarker in OC. Therefore, suppression of *CXCL6* should be studied as a potential therapeutic tool in OC patients.

## 6 References

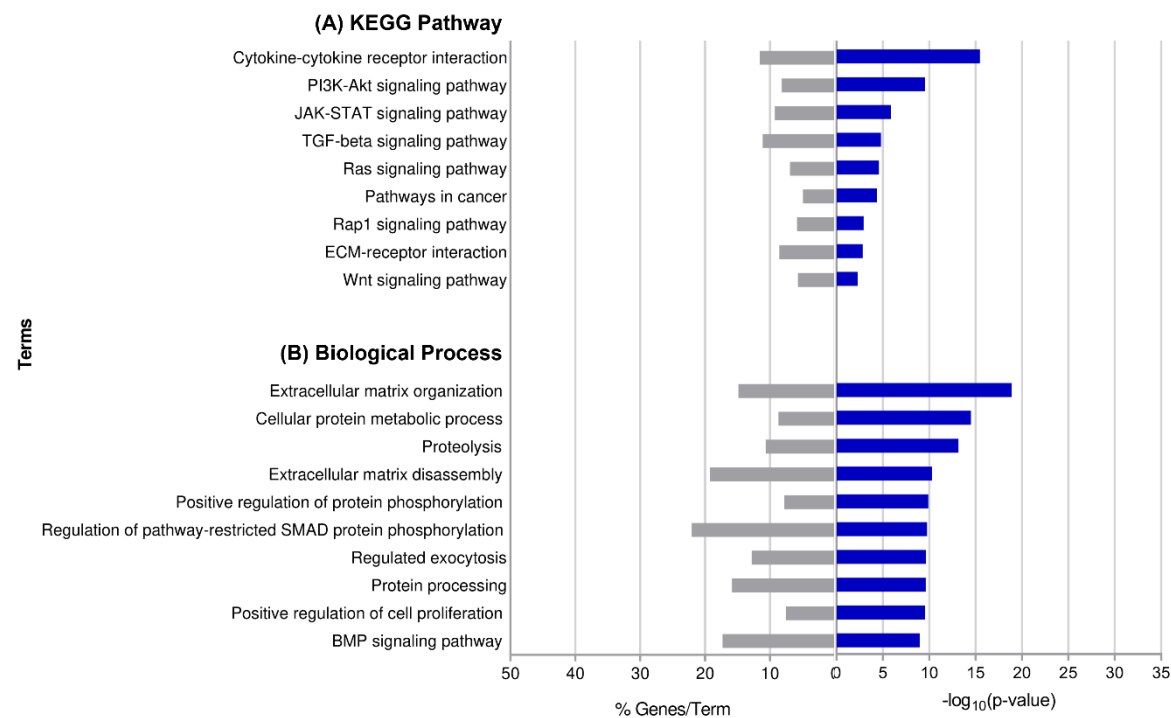
- Aguirre-Gamboa R, Gomez-Rueda H, Martínez-Ledesma E, Martínez-Torteya A, Chacolla-Huaringa R, Rodriguez-Barrientos A, et al. SurvExpress: an online biomarker validation tool and database for cancer gene expression data using survival analysis. *PLoS ONE* 2013;8:e74250
- Busuttil, R. A., George, J., Tothill, R. W., Ioculano, K., Kowalczyk, A., Mitchell, C., Boussioutas, A. A Signature Predicting Poor Prognosis in Gastric and Ovarian Cancer Represents a Coordinated Macrophage and Stromal Response. 2014. *Clinical Cancer Research*, 20(10), 2761–2772.
- Collisson, E. A., Bailey, P., Chang, D. K., & Biankin, A. V. Molecular subtypes of pancreatic cancer. 2019. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*.
- de Oliveira G, Freire PP, Cury SS, de Moraes D, Oliveira JS, Dal-Pai-Silva M, Reis PP, Carvalho RF. An Integrated Meta-Analysis of Secretome and Proteome Identify Potential Biomarkers of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancers (Basel)*. 2020 Mar 18;12(3):716. doi: 10.3390/cancers12030716. PMID: 32197468; PMCID: PMC7140071.

- Jia, D., Nagaoka, Y., Katsumata, M., & Orsulic, S. (2018). Inflammation is a key contributor to ovarian cancer cell seeding. *Scientific Reports*, 8(1). doi:10.1038/s41598-018-30261-8
- Karin, N. (2018). Chemokines and cancer: new immune checkpoints for cancer therapy. In *Current Opinion in Immunology* (Vol. 51, pp. 140–145). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2018.03.004>
- Li G, Zhang K, Gong F, Jin H. A study on changes and clinical significance of blood glucose, blood lipid and inflammation in patients with ovarian cancer. *J BUON*. 2019 Nov-Dec;24(6):2322-2326. PMID: 31983101.
- Li, J., Tang, Z., Wang, H., Wu, W., Zhou, F., Ke, H., Lu, W., Zhang, S., Zhang, Y., Yang, S., Ni, S., & Huang, J. (2018). CXCL6 promotes non-small cell lung cancer cell survival and metastasis via down-regulation of miR-515-5p. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 97, 1182–1188. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.11.004>
- Li, Z., Wang, Y., Dong, S., Ge, C., Xiao, Y., Li, R., Ma, X., Xue, Y., Zhang, Q., Lv, J., Tan, Q., Zhu, Z., Song, X., & Tan, J. (2014). Association of CXCR1 and 2 expressions with gastric cancer metastasis in ex vivo and tumor cell invasion in vitro. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2014.05.004>
- 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*.
- Macciò A, Madeddu C. Inflammation and ovarian cancer. *Cytokine*. 2012 May;58(2):133-47. doi: 10.1016/j.cyto.2012.01.015. Epub 2012 Feb 19. PMID: 22349527.
- Mantovani G, Macciò A, Massa E, Lai P, Manca G, Mudu C, et al. Relationships between Fas expression, activation molecule CD25, and functional activity of tumor-associated lymphomonocytes from neoplastic effusions. *Oncol Rep* 1999;6:235–9.
- Menendez, L., Walker, D. E., Matyunina, L. v., Dickerson, E. B., Bowen, N. J., Polavarapu, N., Benigno, B. B., & McDonald, J. F. (2007). Identification of candidate methylation-responsive genes in ovarian cancer. *Molecular Cancer*, 6. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-6-10>
- Nakamura, M., Bax, HJ, Scotto, D., Souri, EA, Sollie, S., Harris, RJ, Karagiannis, SN (2019). Immune mediator expression signatures are associated with improved outcome in ovarian carcinoma. *OncoImmunology*, 8 (6), e1593811. doi: 10.1080 / 2162402x.2019.1593811
- Nolen, B. M., & Lokshin, A. E. (2010). Targeting CCL11 in the treatment of ovarian cancer. In *Expert Opinion on Therapeutic Targets* (Vol. 14, Issue 2, pp. 157–167). <https://doi.org/10.1517/14728220903512983>
- Ottevanger PB. 2017. Ovarian cancer stem cells more questions than answers. In *Seminars in cancer biology* (Vol. 44, pp. 67-71). Academic Press.
- Shen, W., Xie, X.-Y., Liu, M.-R., & Wang, L.-L. (2019). MicroRNA-101-5p inhibits the growth and metastasis of cervical cancer cell by inhibiting CXCL6. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 1957–1968. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Shen, W., Xie, X.-Y., Liu, M.-R., & Wang, L.-L. (2019). MicroRNA-101-5p inhibits the growth and metastasis of cervical cancer cell by inhibiting CXCL6. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 1957–1968. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2020). Cancer statistics, 2020. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 70(1), 7–30. <https://doi.org/10.3322/caac.21590>
- Spurgeon, M. E., den Boon, J. A., Horswill, M., Barthakur, S., Forouzan, O., Rader, J. S., Lambert, PF (2017). Human papillomavirus oncogenes reprogram the cervical cancer microenvironment independently of and synergistically with estrogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114 (43), E9076 – E9085. doi: 10.1073 / pnas.1712018114
- Strieter, R. M., Polverini, P. J., Kunkel, S. L., Arenberg, D. A., Burdick, M. D., Kasper, J., Dzuiba, J., van Damme, J., Walz, A., Marriott, D., Chan, S.-Y., Roczniak, S., & Shanafelt,



- A. B. (1995). The Functional Role of the ELR Motif in CXC Chemokine-mediated Angiogenesis\*.
- Taki, M., Abiko, K., Baba, T., Hamanishi, J., Yamaguchi, K., Murakami, R., Yamanoi, K., Horikawa, N., Hosoe, Y., Nakamura, E., Sugiyama, A., Mandai, M., Konishi, I., & Matsumura, N. (2018). Snail promotes ovarian cancer progression by recruiting myeloid-derived suppressor cells via CXCR2 ligand upregulation. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03966-7>
- Torán, J. L., Aguilar, S., López, J. A., Torroja, C., Quintana, J. A., Santiago, C., Abad, J. L., Gomes-Alves, P., Gonzalez, A., Bernal, J. A., Jiménez-Borreguero, L. J., Alves, P. M., R-Borlado, L., Vázquez, J., & Bernad, A. (2017). CXCL6 is an important paracrine factor in the pro-angiogenic human cardiac progenitor-like cell secretome. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-017-11976-6>
- Verbeke, H., Struyf, S., Berghmans, N., van Coillie, E., Opdenakker, G., Uyttenhove, C., van Snick, J., & van Damme, J. (2011). Isotypic neutralizing antibodies against mouse GCP-2/CXCL6 inhibit melanoma growth and metastasis. *Cancer Letters*, 302(1), 54–62. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2010.12.013>
- Verbeke, H., Struyf, S., Laureys, G., & van Damme, J. (2011). The expression and role of CXC chemokines in colorectal cancer. In *Cytokine and Growth Factor Reviews* (Vol. 22, Issues 5–6, pp. 345–358). Pergamon. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2011.09.002>
- Vesely, M. D.; Kershaw M. H.; Schreiber R. D.; Smyth M. J. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annual review of Immunology*. 2011. 29:1, 235-271
- Wang, X., Dai, Y., Zhang, X., Pan, K., Deng, Y., Wang, J., & Xu, T. (2021). CXCL6 regulates cell permeability, proliferation, and apoptosis after ischemia–reperfusion injury by modulating Sirt3 expression via AKT/FOXO3a activation. *Cancer Biology and Therapy*, 22(1), 30–39. <https://doi.org/10.1080/15384047.2020.1842705>
- World Health Organization (WHO) et al. 2017 Global Health Risks-Mortality and burden of disease attributable to selected major risks. *Cancer*. Wu, L., Shang, W., Zhao, H., Rong, G., Zhang, Y., Xu, T., Zhang, J., Huang, P., & Wang, F. (2019). In Silico Screening of Circulating MicroRNAs as Potential Biomarkers for the Diagnosis of Ovarian Cancer. *Disease Markers*, 2019, 7541857. <https://doi.org/10.1155/2019/7541857>
- Wuyts, A., Struyf, S., Gijsbers, K., Schutyser, E., Put, W., Conings, R., Lenaerts, J. P., Geboes, K., Opdenakker, G., Menten, P., Proost, P., & van Damme, J. (2003). The CXC chemokine GCP-2/CXCL6 is predominantly induced in mesenchymal cells by interleukin-1 $\beta$  and is down-regulated by interferon- $\gamma$ : Comparison with interleukin-8/CXCL8. *Laboratory Investigation*, 83(1), 23–34. <https://doi.org/10.1097/01.LAB.0000048719.53282.00>
- Yang, G., Rosen, D. G., Liu, G., Yang, F., Guo, X., Xiao, X., Xue, F., Mercado-Uribe, I., Huang, J., Lin, S. H., Mills, G. B., & Liu, J. (2010). CXCR2 promotes ovarian cancer growth through dysregulated cell cycle, diminished apoptosis, and enhanced angiogenesis. *Clinical Cancer Research*, 16(15), 3875–3886. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-0483>
- Zhang, L., Liu, W., Wang, X., Wang, X., & Sun, H. (2019). Prognostic value of serum IL-8 and IL-10 in patients with ovarian cancer undergoing chemotherapy. *Oncology Letters*, 17(2), 2365–2369. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.9842>

Supplementary Figures



**Supplementary Figure 1:** Gene expression analysis of ovarian cancer secretome components obtained from The Cancer Genome Atlas (TCGA) down-regulated compared to Genotype-Tissue Expression (GTEx) corresponding normal tissues. (A) Gene Ontology-Biological Process; (B) The Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) 2019 Human. Data are expressed as the percentage of enriched genes per term (left in gray) and  $-\log_{10}$  of the p-value (right in blue).



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 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.
- 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.
- 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.  $\beta$ -Lactamase inhibitors from *Anacardium occidentale*. *Pharm Biol* 40: 231–234.
- Brandão HN, David JPDL, Couto RD, Nascimento JA & David JM. 2010. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas.
- 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 J E. 2006. Multiciência: construindo a história dos produtos naturais.
- Carvalho, A. L. N., Annoni, R., Silva, P. R. P., Borelli, P., Fock, R. A., Trevisan, M. T. S., & Mauad, T. (2011). Acute, subacute toxicity and mutagenic effects of anacardic acids from cashew (*Anacardium occidentale* Linn.) in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 135(3), 730–736. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.04.002>.
- 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.
- 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.
- Dinic J, et al. 2015. New Approaches With Natural Product Drugs for Overcoming Multidrug Resistance in Cancer. *Curr Pharm Des* 21(38): 5589-5604.
- 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*.
- 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.
- Garófalo A, Avesani CM, Camargo KG, Barros ME, Silva SRJ, et al. 2004. Dieta e câncer: um

- enfoque epidemiológico. *Revista de Nutrição*.
- Ghoneum A, Afify H, Salih Z, Kelly M & Said N. 2018. Role of tumor microenvironment in ovarian cancer pathobiology. *Oncotarget*, 9(32): 22832.
- Gnanaprakasam, J. N. R., López-Bañuelos, L., & Vega, L. (2021). Anacardic 6-pentadecyl salicylic acid induces apoptosis in breast cancer tumor cells, immunostimulation in the host and decreases blood toxic effects of taxol in an animal model. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 410. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2020.115359>
- Guo, Q., He, Y., Sun, L., Kong, C., Cheng, Y., & Zhang, G. (2019). In silico detection of potential prognostic circRNAs through a re-annotation strategy in ovarian cancer. *Oncology Letters*, 17(4), 3677–3686. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.10021>
- 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 NFκβ 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.
- 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.
- Instituto Nacional de Câncer (INCA). Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva; 2020.
- Instituto Nacional do Câncer (INCA): Estimativa de Câncer no Brasil, 2020. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer> > Acesso em: 06/04/2020.
- Ishigami H, Kitayama J, Otani K, Kamei T, Soma D, Miyato H & Nagawa H. 2009. Phase pharmacokinetic study of weekly intravenous and intraperitoneal paclitaxel combined with S-1 for advanced gastric cancer. *Oncology*, 76(5): 311-314.
- Jia J, Zhu F, Ma X, et al. 2009. Mechanisms of drug combinations: interaction and network perspectives. *Nature Reviews Drug Discovery* 8: 111.
- JNCI: Journal of the National Cancer Institute, 83(4): 288-291.
- 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.
- Journo-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.
- Junqueira, L. C.; Carneiro, J. *Histologia Básica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. 12 ed. 428-429.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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*.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Paul VJ, Yeddanapalli LM. 1954. Olefinic Nature of Anacardic Acid from Indian Cashew-nut Shell Liquid. *Nature* 174 (4430): 604.
- Peckham, M. *The Histology Guide: Ovary*. Faculty of Biological Sciences, University of Leeds. Disponível em: <<https://www.histology.leeds.ac.uk/female/ovary.php>>. Acesso em 15/04/2020
- 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.
- 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.
- Priyadarshini K, & Keerthi A. U. 2012. Paclitaxel against cancer: a short review. *Med chem*, 2(7), 139-141.
- 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.
- Ringel I & Horwitz SB. 1991. Studies with RP 56976 (taxotere): a semisynthetic analogue of taxol.
- 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
- Sajjad, H., Imtiaz, S., Noor, T., Siddiqui, Y. H., Sajjad, A., & Zia, M. (2021). Cancer models in preclinical research: A chronicle review of advancement in effective cancer research. *Animal Models and Experimental Medicine*, 4(2), 87–103. <https://doi.org/10.1002/ame2.12165>
- Schultz DJ, Wickramasinghe NS, Ivanova MM, Isaacs SM, et al. 2010. Anacardic acid inhibits estrogen receptor  $\alpha$ –DNA binding and reduces target gene transcription and breast cancer cell proliferation. *Molecular cancer therapeutics*, 1535-7163.
- Schwartz, A. S., Yu, J., Gardenour, K. R., Finley, R. L., & Ideker, T. (2009). Cost-effective strategies for completing the interactome. *Nature Methods*, 6(1), 55–61. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1283>
- 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.
- 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, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2020). Cancer statistics, 2020. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 70(1), 7–30. <https://doi.org/10.3322/caac.21590>
- 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.
- Slomianka L. 2009. School of Anatomy and Human Biology - The University of Western Australia. Female Reproductive System. Disponível em: <<https://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140/CorePages/FemaleRepro/femalerepro.htm>>. Acesso em 15/04/2020
- Sorenson, R. L.; Brelje, T. C. Histology Guide. Virtual Histology Laboratory. Ovary. Disponível em: <<http://www.histologyguide.com/slidebox/18-female-reproductive-system.html>>. Acesso em 15/04/2020
- 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.
- 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.
- Takizawa, P. Department of Cell Biology. Yale University. Histology: Ovary. Disponível em: <[http://medcell.med.yale.edu/histology/ovary\\_follicle.php](http://medcell.med.yale.edu/histology/ovary_follicle.php)>. Acesso em 15/04/2020
- 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
- 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.
- Toyomizu M, Okamoto K, Ishibashi T, Chen Z, Nakatsu T. 2000. Uncoupling effect of anacardic acids from cashew nut shell oil on oxidative phosphorylation of rat liver mitochondria. *Life Sciences*, 66, 229–234.
- Uhlén M, Fagerberg L, Hallström BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, Sivertsson Å, Kampf C, Sjöstedt E, Asplund A, Olsson I, Edlund K, Lundberg E, Navani S, Szigartyo CA, Odeberg J, Djureinovic D, Takanen JO, Hober S, Alm T, Edqvist PH, Berling H, Tegel H, Mulder J, Rockberg J, Nilsson P, Schwenk JM, Hamsten M, von Feilitzen K, Forsberg M, Persson L, Johansson F, Zwahlen M, von Heijne G, Nielsen J, Pontén F. Tissue-based map of the human proteome. *Science* 2015 347(6220):1260419. PubMed: 25613900 DOI: 10.1126/science.1260419
- 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.
- Vasan N, Baselga J & Hyman DM. 2019. A view on drug resistance in cancer. *Nature*, 575(7782), 299-309.
- Wagner H, Ulrich-Merzenich G. 2009. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine* 16: 97.
- 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).
- Wang, H., Guan, X., Tu, Y., Zheng, S., Long, J., Li, S., ... Zhang, Y. (2015). MicroRNA-29b attenuates non-small cell lung cancer metastasis by targeting matrix metalloproteinase 2 and PTEN. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 34(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13046-015-0169-y>
- 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.
- World Health Organization (WHO) et al. 2017 Global Health Risks-Mortality and burden of disease attributable to selected major risks. *Cancer*.
- 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.

Wu, L., Shang, W., Zhao, H., Rong, G., Zhang, Y., Xu, T., Zhang, J., Huang, P., & Wang, F. (2019). In Silico Screening of Circulating MicroRNAs as Potential Biomarkers for the Diagnosis of Ovarian Cancer. *Disease Markers*, 2019, 7541857. <https://doi.org/10.1155/2019/7541857>

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.

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.