

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a
partir de 20/02/2022.



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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Julio de Mesquita Filho”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

EFEITO DO IMUNOMODULADOR P-MAPA ASSOCIADO À
INTERLEUCINA-12 SOBRE A VIA DE SINALIZAÇÃO DOS
RECEPTORES *TOLL-LIKE* E AGRESSIVIDADE DAS CÉLULAS
SKOV-3 DE CARCINOMA OVARIANO HUMANO

LUIZ ANTONIO LUPI JÚNIOR

BOTUCATU – SP

2020

EFEITO DO IMUNOMODULADOR P-MAPA ASSOCIADO À
INTERLEUCINA-12 SOBRE A VIA DE SINALIZAÇÃO DOS
RECEPTORES *TOLL-LIKE* E AGRESSIVIDADE DAS CÉLULAS
SKOV-3 DE CARCINOMA OVARIANO HUMANO

LUIZ ANTONIO LUPI JÚNIOR

PROF. DR. LUIZ GUSTAVO DE ALMEIDA CHUFFA

PROF^a. DR^a. FLÁVIA KARINA DELELLA

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia Celular e Estrutural

Orientador: Prof. Dr. Luiz Gustavo de Almeida Chuffa

BOTUCATU – SP

2020

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

Lupi Júnior, Luiz Antonio.

Efeito do imunomodulador P-MAPA associado à interleucina-12 sobre a via de sinalização dos receptores toll-like e agressividade das células SKOV-3 de carcinoma ovariana humano / Luiz Antonio Lupi Júnior. - Botucatu, 2020

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Luiz Gustavo de Almeida Chuffa
Coorientador: Flávia Karina Delella
Capes: 20000006

1. Ovários - Tumores. 2. Interleucinas. 3. Receptores Toll-like. 4. Fatores imunológicos.

Palavras-chave: Câncer de ovário; IL-12; P-MAPA; SKOV-3; TLR.

Dedicatória

Dedico este trabalho àqueles que são a base da minha existência e alimentam diariamente minha força de vontade: Deus, meu filho Lorenzo, minha esposa Marcilene, minha mãe Cecília e para meu maior exemplo, que olha por todos nós diariamente ao lado de Deus, meu querido pai Lupi.

Agradecimentos

A Deus, por ter sempre me abençoado com disposição, energia, inteligência e saúde para produzir tudo que fosse necessário e mostrar o melhor caminho para que eu alcançasse meus objetivos.

Ao meu pai, por ter me dado educação, por ter investido tempo e dinheiro em meus sonhos, sempre acreditando que eu seria bem sucedido. Obrigado por ser exemplo, por sempre ter cuidado de mim e continuar olhando por nós e por toda a nossa família daí de cima. Você sempre será lembrado com muito amor.

À minha mãe, que ao lado de meu pai, me providenciou a melhor educação possível e foi meu porto seguro, sempre garantindo que tudo daria certo e que nada faltaria para mim e para minha família amada. Obrigado por ajudar a superar todo e qualquer momento de dificuldade e estar continuamente à disposição para qualquer chamado. Espero um dia poder retribuir toda a ajuda, o carinho e amor que nos deu.

À minha esposa Marcilene, minha companheira de lutas diárias, meu amor. Obrigado por acompanhar diariamente minha jornada, por abdicar de tudo para cuidar de mim e do nosso filho, por aceitar a aventura de viver em família. Obrigado por aceitar e superar as inúmeras dificuldades, as restrições e por dividir e comemorar as alegrias e conquistas comigo. Obrigado por me fazer ter certeza de que, independente de qualquer coisa, sempre posso contar com você para me dizer que tudo vai dar certo e que dias muito melhores virão. Obrigado por respeitar minhas escolhas e por viver cada dia na certeza de que Deus sempre irá nos abençoar.

Ao meu filho Lorenzo, essa criança iluminada, que eu amo com todas as minhas forças, muito além do que eu imaginei que poderia amar um dia. Obrigado por ser uma bênção, por ser tão atento, delicado, amoroso, colaborativo, inteligente, curioso e aventureiro. Obrigado por me ensinar a ser mais simples, a amar mais, a observar mais os detalhes e a entender a importância de cada segundo, de cada sorriso, de cada gesto e atitude, de cada palavra e de cada aventura. Você é minha inspiração!

Às minhas irmãs, cunhados e sobrinhos queridos, que sempre acompanharam e apoiaram minhas escolhas e meu caminho. Obrigado por ser família, por fazerem eu me sentir apoiado e admirado sempre que precisei de uma palavra positiva ou de um gesto de carinho. Tenho certeza que posso contar com vocês para tudo.

Ao meu mestre, orientador, professor e amigo prof. Luiz Gustavo Chuffa. Obrigado por aceitar o desafio de ter um doutorando como seu primeiro orientado de pós-graduação. Obrigado por transformar minha carreira, por dar a oportunidade de fazer, produzir e saber mais. Por sempre se preocupar em ser melhor e fazer de nós cada vez melhores. O melhor líder é aquele

que lidera pelo exemplo e não existem dúvidas que se um dia eu tiver um pouco da sua sabedoria, da sua disposição e da sua capacidade de execução e produção estarei satisfeito.

À minha co-orientadora, professora Flávia Delella e sua equipe, por me acolher em seu laboratório de cultura celular e aceitar o desafio de ensinar as técnicas de cultivo desde o início, além de sempre contribuir para o crescimento do meu trabalho.

A todos os professores e servidores do departamento de Anatomia, que sempre foram companhia diária, sempre garantiram convivência leve e agradável e sempre proporcionaram muita sabedoria. Agradeço especialmente ao prof. Wilson, que me acolheu e orientou durante a iniciação científica e mestrado, me ensinando a base de ser bom aluno, escritor, pesquisador, colega e amigo, com ensinamentos que levarei para sempre.

Aos meus colegas de pós-graduação pela convivência diária, por todos os aprendizados e compartilhamento dos desafios diários, principalmente ao nosso grupo de pesquisa: Maira, Henrique, Letícia e Roberta. Especialmente agradeço ao meu grande companheiro Henrique, sempre disposto a ajudar, aprender e a oferecer uma palavra amiga ou garantir uma boa risada.

A todos os parceiros, amigos e colegas que cruzaram meu caminho e, de alguma forma, me ensinaram sobre a ciência, sobre a educação, o aprendizado, a sala de aula ou sobre a vida. Seria incapaz de ser quem eu sou, mesmo que pequeno, sem a passagem de vocês por minha existência.

Ao Instituto de Biociências, seção de pós-graduação e às agências de fomento e amparo à pesquisa – CAPES (Processo 0708/2018), CNPq (Processo 401040/2016-0) e FAPESP (Processo 2019/00906-6 e Processo 2016/03993-9) - pelo suporte estrutural e financeiro.

Sumário

<i>Resumo</i>	8
<i>Capítulo 1</i>	9
Introdução	10
Hipótese e relevância do tema	20
Objetivo geral	21
Objetivos específicos	21
<i>Capítulo 2</i>	22
Artigo.....	23
Supplementary material	46
<i>Capítulo 3</i>	49
Artigo.....	50
<i>Conclusões</i>	67
<i>Referências bibliográficas</i>	69

Resumo

O câncer de ovário apresenta elevada incidência em mulheres nos períodos de pós-menopausa e, devido ao seu diagnóstico tardio e baixo prognóstico, é a quinta causa mais comum de morte por câncer em mulheres. A doença responde inicialmente aos tratamentos convencionais, retardando o crescimento da massa tumoral, porém, com o tempo, muitas mulheres desenvolvem quimioresistência, frequentemente relacionada ao processo inflamatório, e a doença recorre. As imunoterapias têm sido propostas como uma alternativa complementar ao tratamento dos tumores de ovário, apesar de sua eficácia ainda não estar totalmente comprovada. O imunomodulador P-MAPA (agregado polimérico de fosfolinoleato-palmitoleato de magnésio e amônio proteico) é um biopolímero que tem apresentado efeitos significativos sobre componentes do sistema imunológico, sendo capaz de estimular os receptores celulares *toll-like* (TLR), particularmente TLR2 e TLR4, e também a produção de linfócitos T, citocinas como a IL-2 e IFN- γ , além de promover o aumento da atividade das células *natural killers* (NKs). Por sua vez, a interleucina (IL)-12 tem sido administrada em pacientes com tumores sólidos, incluindo os de ovário, na tentativa de estimular a resposta inflamatória polarizada T *helper* 1 (Th1), aumentando a produção de interferon-gama (IFN- γ). No entanto, o efeito direto desses dois agentes imunoterapêuticos nas células do câncer de ovário, importante constituinte do microambiente tumoral, permanece sem ser estudado. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi analisar o efeito dos tratamentos com P-MAPA e IL-12, isolados ou em associação, na tumorigenicidade e processo inflamatório na linhagem de células SKOV-3 de carcinoma ovariano. Apesar de não promoverem a morte celular, os compostos P-MAPA e IL-12 diminuíram a atividade metabólica das células em aproximadamente 20% quando administrados isoladamente ou em associação. A combinação P-MAPA+IL-12 diminuiu os níveis de MyD88, IRF3 e NF- κ B, possivelmente reduzindo a quimioresistência ligada ao processo inflamatório mediado por TLRs. Além de reduzir os níveis de TLR2, a terapia com P-MAPA estimulou a secreção de IL-3, IL-9, IL-10, CCL22 e CCL5. Além disso, o P-MAPA aumentou significativamente a sensibilidade das células SKOV-3 ao paclitaxel. Finalmente, a análise proteômica global demonstrou o efeito da combinação P-MAPA+IL-12 na regulação de importantes proteínas estruturais e envolvidas em processos metabólicos e energéticos. Entre elas, proteínas envolvidas em junção celular, adesão focal metabolismo de RNA e função ribossomal tiveram seus níveis aumentados após tratamento com a associação P-MAPA+IL-12. Por sua vez, proteínas relacionadas à sinalização celular, processos mitocondriais e energéticos e à via de sinalização Wnt apresentaram-se diminuídas. Desta forma, a imunoterapia com P-MAPA e/ou IL-12 representa uma alternativa terapêutica promissora no combate ao câncer de ovário, demonstrando efeito direto nas células tumorais, além do efeito imunomodulatório já conhecido nas células do sistema imune.

Palavras-chave: câncer de ovário, SKOV-3, P-MAPA, IL-12, imunoterapia, TLR, proteoma.

Introdução

Ovários

Os ovários são órgãos ovóides pares, localizados na cavidade pélvica feminina. Estão normalmente localizados próximos à fixação do ligamento largo do útero nas paredes laterais da pelve. Fazem contato com as tubas uterinas e o útero, conectados pelo ligamento largo do útero, que por sua vez é formado por três partes: mesométrio, mesossalpinge e mesovário. São as gônadas femininas, responsáveis pela produção dos gametas femininos (oócitos), além de possuírem função de glândula endócrina, produzindo hormônios como o estrógeno e a progesterona. Antes da primeira ovulação, o ovário apresenta-se liso e róseo, porém torna-se branco-acinzentado e rugoso devido à fibrose e distorção progressiva decorrentes dos repetidos processos ovulatórios (DANGELO & FATTINI, 2007). A superfície do ovário é coberta por um epitélio germinativo, de tecido epitelial pavimentoso ou cúbico simples, seguida por uma camada de tecido conjuntivo denso, a túnica albugínea. Abaixo da túnica albugínea encontra-se a região cortical, onde predominam os folículos ovarianos, que são o conjunto do ovócito e das células que o envolvem. A parte mais interna do ovário contém tecido conjuntivo frouxo e um rico leito vascular, sendo denominada região medular (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013).

Câncer de ovário: incidência, fatores de risco, classificação e tratamento

O câncer de ovário é o quinto tipo de câncer mais letal entre todos aqueles que acometem as mulheres, sendo o mais letal entre os cânceres que acometem o sistema genital feminino (SIEGEL *et al.*, 2019) (Figura 1). Estima-se que, até o final de 2019, serão diagnosticados 22.530 novos casos de câncer de ovário e ocorrerão 13.980 óbitos em decorrência da doença nos Estados Unidos (SIEGEL *et al.*, 2019). No Brasil, para cada ano do biênio (2018-2019) são previstos 6.150 novos casos da doença, que causou óbito de aproximadamente 3.771 mulheres no ano de 2016, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2019). Os sintomas relacionados ao câncer de ovário são comumente inespecíficos e costumam ser ignorados, ou tratados de forma a eliminar desconfortos. Os sintomas mais frequentes são aumento do volume abdominal, dor abdominopélvica persistente, dificuldade na alimentação e aumento da urgência ou frequência urinária (LEDERMAN *et al.*, 2013). Associado à inespecificidade dos sintomas, a falta de métodos de diagnóstico precoce para esse tipo de câncer resultam em um alto índice de pacientes diagnosticadas com a doença em estágio avançado, fato que está associado à alta taxa de mortalidade relacionada ao câncer de ovário (JESSMON *et al.*, 2017). De fato, quando as

mulheres são diagnosticadas precocemente, cerca de 90% sobrevive por período maior que cinco anos pós-diagnóstico. No entanto, a taxa de sobrevivência após 5 anos do diagnóstico é de 65% para tumores em estágio II, 34% para tumores em estágio III e de apenas 15% para pacientes com tumor em estágio IV do desenvolvimento (USACH *et al.*, 2015).

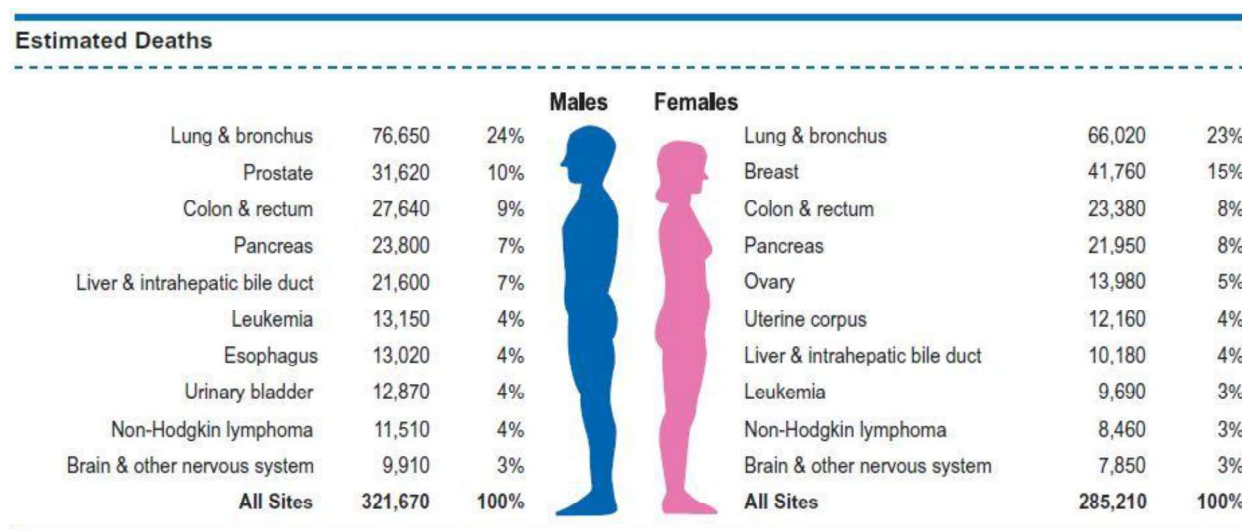


Figura 1. Estimativa dos dez tipos de câncer com maior número de mortes, por sexo, para o ano de 2019. O câncer de ovário figura como a quinta maior causa de morte em decorrência do câncer nas mulheres. Fonte: SIEGEL *et al.*, 2019.

O câncer de ovário é relativamente raro em mulheres com menos de 40 anos e, a partir dessa idade, o risco de desenvolvê-lo aumenta até atingir o pico de incidência por volta dos 70 anos de idade (WEBB *et al.*, 2017). É bem estabelecido que mulheres com histórico familiar de câncer de ovário possuem maior risco de desenvolver a doença. O risco para aquelas que possuem pelo menos um parente de primeiro grau com diagnóstico dessa malignidade é aproximadamente três vezes maior comparado àquelas sem histórico familiar (STRATTON *et al.*, 1998). A presença de mutações no gene BRCA1 também parece favorecer o surgimento de tumores ovarianos, apresentando risco 40-50% maior em mulheres com idade próxima aos 70 anos, enquanto o risco associado a mutações do gene BRCA2 é de, aproximadamente, 10-20% (BOYD *et al.*, 2003). Outros conhecidos fatores de risco ao desenvolvimento do câncer de ovário são aqueles relacionados ao número de processos ovulatórios. Neste sentido, a menopausa tardia e a menarca precoce estão associadas à maior incidência da doença e o uso contínuo e combinado de contraceptivos orais parece funcionar como um fator protetor (WENTZENSEN *et al.*, 2016; WEBB *et al.*, 2017). Da mesma forma, a nuliparidade coloca as mulheres sob maior risco de desenvolvimento dessa patologia, enquanto aquelas com pelo menos uma gravidez bem sucedida possuem risco diminuído de forma proporcional ao número de filhos – probabilidade de 10-20% menor de ocorrência a cada filho nascido (WENTZENSEN *et al.*, 2016). Aliado a estas

evidências, a amamentação também diminui cerca de 20-25% o risco de surgimento do câncer de ovário, estando esse cada vez mais diminuído quanto maior o tempo de amamentação (LUAN *et al.*, 2013). Entre outros fatores, a terapia hormonal pós-menopausa, principalmente aquelas que usam exclusivamente estrógeno, e a presença de condições associadas a processos inflamatórios, como endometriose e síndrome do ovário policístico, estão correlacionados positivamente com a incidência de tumores ovarianos (WENTZENSEN *et al.*, 2016; WEBB *et al.*, 2017; LA VECCHIA *et al.*, 2017).

Segundo a classificação do Comitê de Oncologia Ginecológica da Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO), o câncer de ovário pode ser classificado em quatro estágios: estágio I, quando o tumor está confinado aos ovários; estágio II, quando o tumor acomete um ou ambos os ovários e apresenta extensão para a cavidade pélvica; estágio III, quando o tumor acomete um ou ambos os ovários, tem indícios cito ou histológicos de ter se disseminado para o peritônio abdominal e/ou promove metástase para os linfonodos retroperitoneais; estágio IV, quando o câncer apresenta metástases em órgãos mais distantes, além dos implantes peritoneais (DUSKA *et al.*, 2017; BEREK *et al.*, 2018). O câncer de ovário é, na verdade, um termo pouco específico usado para uma grande variedade de tumores que envolvem a gônada feminina. Pode ser classificado de três formas distintas: carcinoma epitelial, de células germinativas e de células estromais, dos quais o carcinoma epitelial é, de longe, o mais frequente e impactante (KROEGER *et al.*, 2017). Por muito tempo, as teorias mais aceitas para o surgimento e desenvolvimento desses tumores sugeriram que este se originava *de novo* ou devido às ovulações incessantes, que causam ciclos repetidos de lesão, inflamação e cicatrização. No entanto, a grande diversidade de aspectos clinicopatológicos e perfis moleculares dos diferentes tumores epiteliais que acometem o ovário levaram ao surgimento de um modelo dualístico de caracterização que acomodou a grande heterogeneidade de lesões, uma vez que tumores mais agressivos parecem se originar fora do órgão, principalmente nas tubas uterinas (KURMAN & SHIH, 2011). Desta forma, o grupo de tumores tipo I é composto por: carcinoma seroso de baixo grau, carcinoma endometriode de baixo grau, carcinoma de células claras e carcinoma mucinoso, todos eles se desenvolvendo a partir de etapas bem definidas que se iniciam com uma lesão precursora, como tumores *borderline* ou endometriose (crescimento endometrial em regiões externas ao útero, como tubas uterinas e ovários). Tumores do tipo I caracterizam-se por apresentarem crescimento lento, desprovido de dor e bom prognóstico, além de normalmente estarem confinados no ovário. São relativamente estáveis geneticamente, apresentando uma sequência de mutações características que incluem *KRAS*, *BRAF*, *PTEN* e *ARIDIA*, mas que raramente envolvem o gene *TP53* (SHIH & KURMAN, 2004; JONES *et al.*, 2010; WIEGAND *et al.*, 2010; KURMAN & SHIH, 2011). Por sua vez, os tumores epiteliais de

ovário do tipo II são compostos por: carcinoma seroso de alto grau, carcinoma endometriode de alto grau, carcinosarcomas (tumores mesodérmicos) e carcinomas indiferenciados. Geralmente se apresentam em estágio avançado no diagnóstico (> 75% dos casos), apresentam rápido crescimento e alta malignidade. Esses tumores apresentam altíssima instabilidade genética e carregam mutações do gene *TP53* em mais de 95% dos casos, raramente possuindo alguma das mutações características dos tumores de tipo I (AHMED *et al.*, 2010).

Dos tumores de ovário diagnosticados, cerca de 80-90% são tumores epiteliais, a maioria deles em estágio avançado (II-IV) (JESSMON *et al.*, 2017). Dentre as alternativas de estudo da tumorigenicidade e das respostas a tratamentos, a cultura celular é uma das mais eficientes atualmente por apresentar alta reprodutibilidade dos experimentos e permitir maior autonomia e agilidade na condução dos procedimentos experimentais. A linhagem de células de câncer de ovário humano SKOV-3 (Figura 2) está entre as mais utilizadas mundialmente em pesquisas científicas sobre tumores epiteliais ovarianos. As células SKOV-3 são derivadas do fluido de ascite peritoneal de uma paciente caucasiana, de 64 anos, diagnosticada com câncer de ovário em 1973. Essa linhagem é resistente a uma variedade de substâncias, como fatores de necrose tumoral, adriamicina e cisplatina e apresenta alto potencial de proliferação e invasão. Sendo assim, as células SKOV-3 representam uma boa alternativa para o estudo do câncer de ovário, uma vez que representam o mais frequente dos tumores, possuindo tumorigenicidade compatível com lesões de estágio avançado.

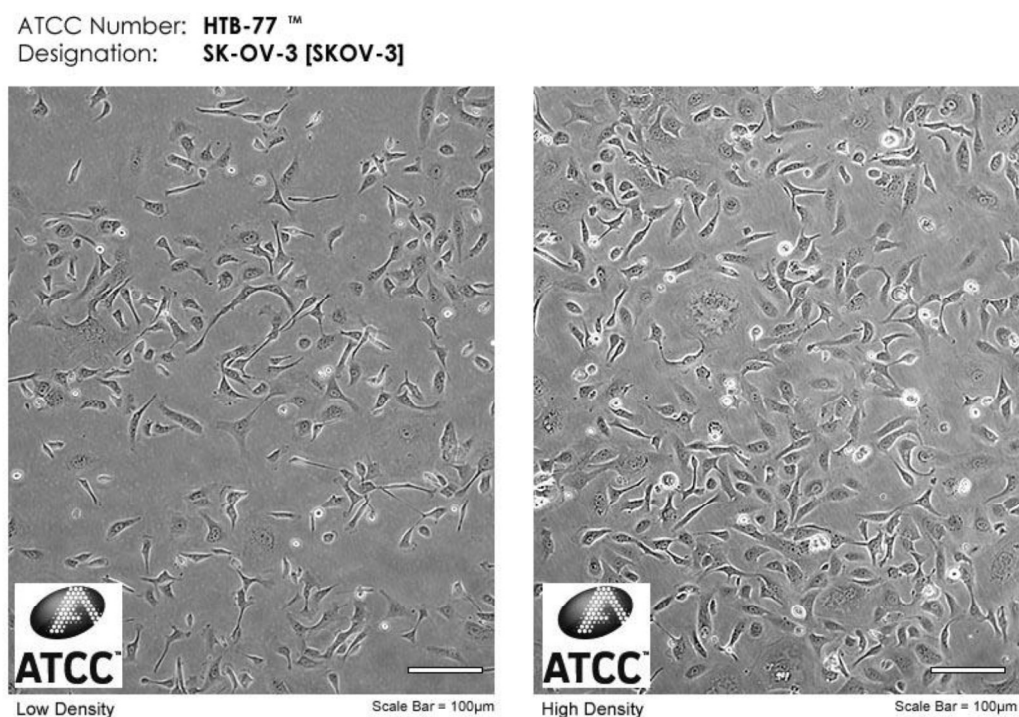


Figura 2. Células SKOV-3. Fonte: ATCC, 2018.

As atuais opções de tratamento para o câncer de ovário incluem quimioterapia, radioterapia, cirurgia de remoção e imunoterapia, dependendo do estágio tumoral e de exposição prévia a outras terapias. Pacientes diagnosticadas no estágio inicial da doença são frequentemente tratadas com cirurgia e administração de quimioterapia com derivados de platina (cisplatina ou carboplatina), enquanto nos estágios mais avançados da doença, o tratamento mais comum é a quimioterapia combinada, comumente com derivados da platina associados aos derivados do taxol (paclitaxel) (JESSMON *et al.*, 2017). De fato, o atual protocolo de tratamento para carcinomas epiteliais de alto grau foi estabelecido a mais de quinze anos atrás e consiste na administração de 75 mg/m² de cisplatina associada a 135 mg/m² de paclitaxel por 24 h a cada três semanas, repetidos até que se completem seis ciclos terapêuticos (MARKMAN, 2003), tendo sido recentemente proposto que a quimioterapia ocorra após cirurgia de citorredução (MATULONIS *et al.*, 2016; LISIO *et al.*, 2019). Terapias alternativas para esses tumores têm sido testadas, mas nenhuma foi aplicada de forma consistente como uma segunda escolha para o combate da doença. Desta forma, apesar de cerca de 70% dos pacientes com carcinoma ovariano responderem inicialmente ao protocolo de tratamento padrão, estima-se que cerca de 80% deles apresentarão recorrência da doença em algum estágio do tratamento, adquirindo quimiorresistência aos principais derivados de platina e taxol (BAST *et al.*, 2009; MATULONIS *et al.*, 2016). Entre diversas vias pelas quais se supõe que os tumores de ovário adquiram resistência aos agentes terapêuticos, uma das mais evidentes atualmente tem sido a via de sinalização inflamatória dos receptores *toll-like* (TLRs).

Via de sinalização dos TLRs

A imunidade inata é a primeira resposta organizada pelo organismo a um desafio imunológico e envolve importantes células do sistema imune, como macrófagos, granulócitos, células dendríticas e células *natural killer* (NK). Ao serem desafiadas por um antígeno, essas células são capazes de organizar uma resposta para eliminá-lo através de uma série de mecanismos, como a fagocitose, geração de espécies reativas de oxigênio e outros sinais pró-inflamatórios (MUCCIOLI *et al.*, 2012). Os TLRs compõe uma família de receptores transmembrana do tipo I dotados de: um ectodomínio rico em leucina capaz de reconhecer ligantes, um domínio transmembrana, e um domínio TIR (*Toll-interleukin 1 receptor domain*) intracelular responsável pela transdução do sinal e ativação da cascata de sinalização (ROCK *et al.*, 1998; KAWAI & AKIRA, 2010) (Figura 3). São receptores especializados em reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs – *pathogen associated molecular patterns*), como lipídios, proteínas e lipoproteínas derivadas de microorganismos, e padrões moleculares associados ao dano celular (DAMPs – *damage-associated molecular*

patterns), como chaperonas e componentes da matriz extracelular, em sua grande maioria provenientes de tecidos em estágio de necrose (NEWTON & DIXIT, 2012; DAJON *et al.*, 2017).

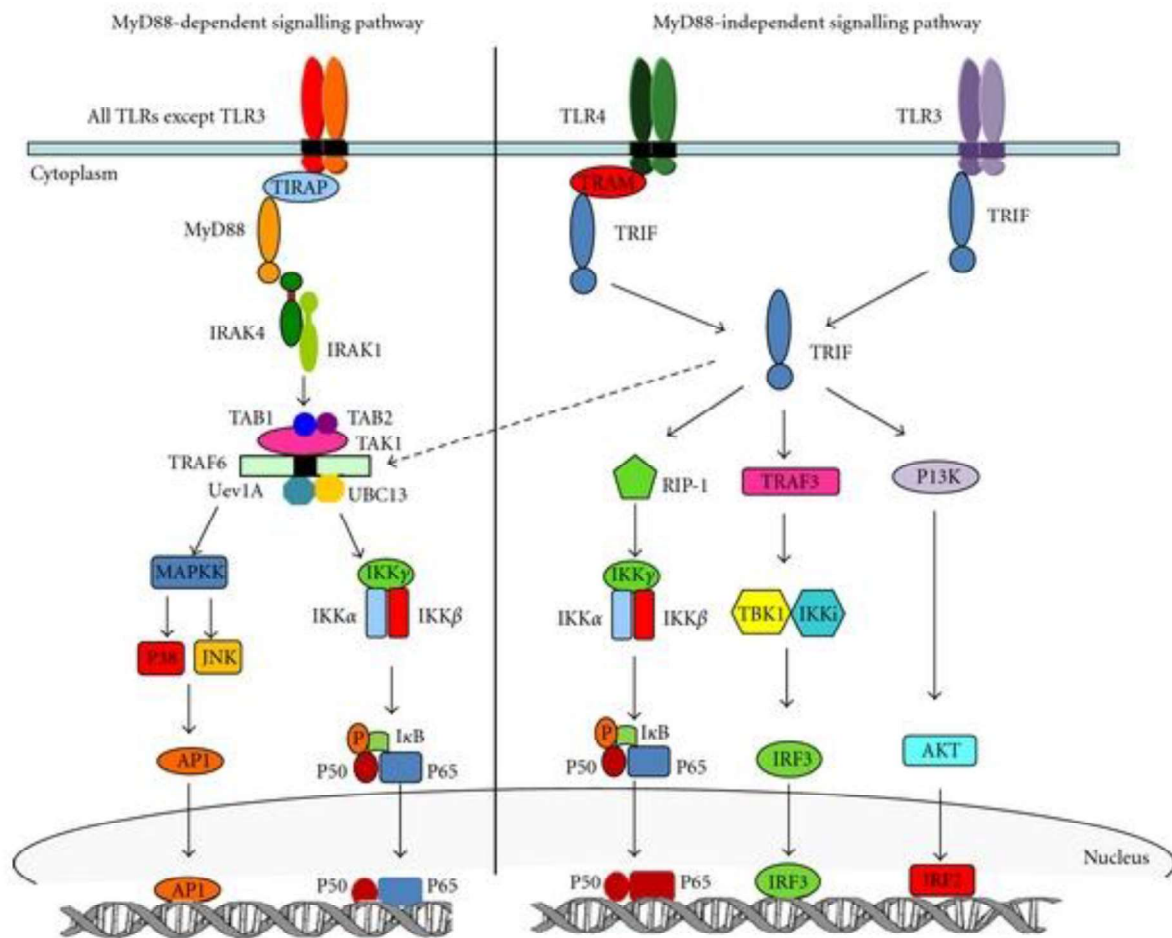


Figura 3. Via de sinalização canônica e não-canônica dos TLRs. Fonte: PATEL *et al.*, 2012.

Já foram descritos dez genes (TLR1 – TLR10) e três pseudogenes (TLR11, TLR12 e TLR13) codificadores desses receptores. Uma vez que reconhecem seus ligantes, a transdução do sinal se inicia com a dimerização e ativação dos domínios TIR, que formam uma espécie de plataforma de recrutamento de moléculas adaptadoras. Este processo leva à ativação de uma complexa cascata de sinalização que termina com a ativação de fatores transcripcionais e, finalmente, ao aumento na produção de fatores pró-inflamatórios (MUCCIOLI *et al.*, 2012; DAJON *et al.*, 2017). As principais moléculas adaptadoras capazes de se associar ao domínio TIR dos TLRs são: MyD88 (*myeloid differentiation primary response gene 88*), TIRAP (*TIR domain-containing adapter protein*) ou Mal (*MyD88-adaptor like*), TRIF (*TIR domain-containing adaptor inducing interferon*), TRAM (*TRIF-related adaptor molecule*) e SARM (*armadillo-motif containing protein*) (BASITH *et al.*, 2011). Muitos estudos têm demonstrado que cada TLR possui vias individuais, que convergem para duas cascatas de sinalização, uma

dependente de MyD88 (canônica) e outra dependente de TRIF (não-canônica) (TAKEDA & AKIRA, 2015). Os principais TLRs envolvidos na via de sinalização dependente de MyD88 são TLR2 e TLR4. Quando estimulados, esses receptores modificam seus domínios TIR com os quais as moléculas adaptadoras MyD88 estão associadas. O recrutamento destas leva à fosforilação e ativação de variados fatores intermediários, como IRAK-4, IRAK-1, TRAF6 e IKKs, que resultam na ativação dos importantes fatores de transcrição AP-1 e NF- κ B (*nuclear factor-kappa B*) (AKIRA & TAKEDA, 2004). O NF- κ B compreende uma família de fatores que regulam a transcrição de diversos genes inflamatórios e estimulam a produção de citocinas, quimiocinas e agentes antiapoptóticos e de resposta ao estresse, como fatores de crescimento e pró-angiogênicos (LI *et al.*, 2002). Além da via de sinalização canônica, a ativação de TLR4 também é capaz de desencadear a via dependente de TRIF, na qual esta molécula está associada ao domínio TIR do TLR4 e seu estímulo resulta no aumento dos níveis de IRF3 (*interferon regulatory factor 3*) (FITZGERALD *et al.*, 2003). Por sua vez, níveis aumentados de IRF3 levam ao aumento da produção de interferons (IFNs) e ativação da atividade citotóxica de linfócitos e células NK (MUCCIOLI *et al.*, 2012).

Além de sua característica expressão em células do sistema imune, os TLRs também são encontrados em outras células, inclusive células endoteliais e epiteliais, a fim de funcionar como um primeiro mecanismo de defesa em mucosas (MEDZHITOV *et al.*, 1997; HOPKINS & SRISKANDAN, 2005). Especificamente no ovário, são altamente expressos os subtipos TLR2, TLR3, TLR4 e TLR5, tanto no epitélio saudável, quanto naquele relacionado às neoplasias ovarianas (ZHOU *et al.*, 2009). Desta forma, apesar de seu importante papel na ativação da resposta imune e potencial função protetora nas mucosas, a expressão dos TLRs no microambiente tumoral tem sido amplamente discutida na literatura como um fator favorável ao desenvolvimento do câncer. Utilizando dos DAMPs provenientes, principalmente, de células necróticas como fator de estímulo endógeno, a hiperativação desses receptores em tumores de ovário mantém um microambiente pró-inflamatório, estando relacionado ao aumento das citocinas indutoras de inflamação crônica, supressão da resposta imune e quimiorresistência (SATO *et al.*, 2009; ZHOU *et al.*, 2009; GATA & LAURENTIU, 2017). De fato, o maior impacto causado pela ativação das vias de sinalização dos TLRs é o aumento da expressão de MyD88 e NF- κ B, estando os níveis aumentados dessas duas moléculas diretamente relacionados com diminuição da expectativa de vida pós-diagnóstico, além da maior tumorigenicidade já discutida anteriormente (ZHU *et al.*, 2012; D'ADHEMAR *et al.*, 2014).

O paclitaxel é uma das primeiras escolhas para o tratamento do câncer de ovário, no entanto também é um agonista de TLR4 e seu efeito na ativação da via de sinalização TLR4/MyD88 tem sido sugerida como um importante fator na aquisição de resistência ao

tratamento (HUANG *et al.*, 2005; ZHU *et al.*, 2012). Estudos já demonstraram que células de tumores epiteliais do ovário que não expressam essa via de sinalização são mais responsivas a estímulos pró-apoptóticos e, conseqüentemente, são menos agressivos. De forma contrária, quando células negativas para MyD88 são transfectadas com a molécula adaptadora passam a apresentar resistência ao tratamento com paclitaxel (YANG *et al.*, 2010; CHEN *et al.*, 2012). No que se refere às linhagens celulares de câncer de ovário, as células SKOV-3, que possuem a via de sinalização do TLR2 e TLR4 ativas, são mais resistentes ao tratamento com paclitaxel quando comparadas às células A2780, que não expressam atividade dessa via de sinalização (ZHU *et al.*, 2012). Esses achados sugerem fortemente que são necessárias novas alternativas terapêuticas para o câncer de ovário, sendo uma promissora possibilidade o uso de compostos capazes de modular a via de sinalização dos TLRs, inclusive como terapias adjuvantes que restaurem a sensibilidade aos principais quimioterápicos.

Propriedades antitumorais do P-MAPA e IL-12

Avanços no uso de imunoterapias têm sido descritos para o tratamento de diversos tipos de câncer, entre eles o câncer de ovário. Uma diversidade de modalidades de tratamento têm sido exploradas, entre elas: o uso de imunomoduladores (e.g. CTLA-4, moduladores de PD-1 e PD-L1), terapias baseadas em anticorpos (e.g. bevacizumab, cetuximab) e vacinas contra o câncer (KRISHNAN *et al.*, 2017). O P-MAPA (agregado polimérico de fosfolinoleato-palmitoleato de magnésio e amônio proteico, Farmabrasilis®) é um biopolímero com propriedades imunomoduladoras, sendo uma molécula produzida através da fermentação do fungo *A. oryzae*. O P-MAPA tem sido utilizado experimentalmente em pesquisas envolvendo o câncer de bexiga, e vem apresentando bom prognóstico e baixa toxicidade (ausência de hepatotoxicidade e nefrototoxicidade). Seu principal mecanismo de ação é o aumento dos níveis da proteína p53, que possui atividade regulatória sobre os TLRs e está diretamente associada com o grau de agressividade do tumor (FÁVARO *et al.*, 2012) (Figura 4).

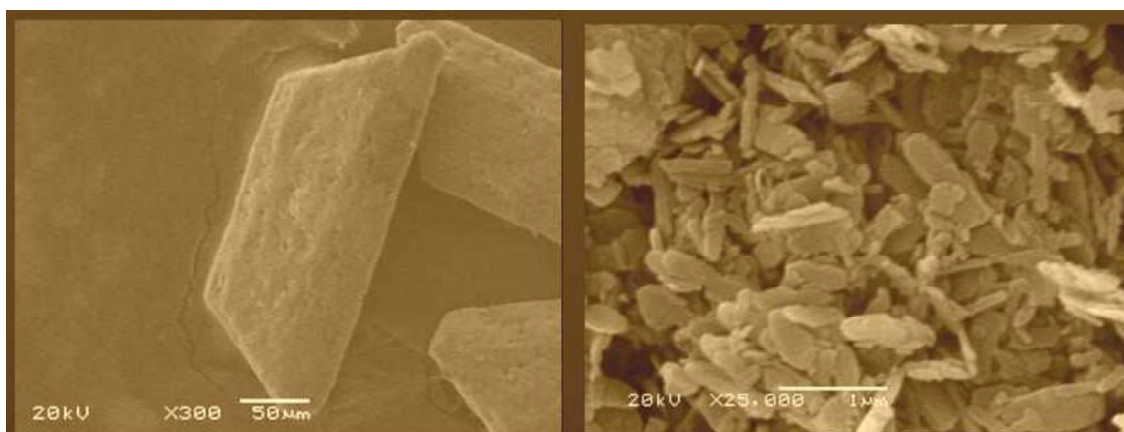


Figura 4. Micro e nanocristais de P-MAPA. Fonte: FARMABRASILIS, 2008.

O P-MAPA é um modificador de resposta biológica que apresenta efeitos significativos sobre componentes do sistema imunológico, sendo capaz de estimular os receptores TLR2 e TLR4, e aumentar a produção de linfócitos T, de citocinas como a IL-2 e o IFN- γ , além de promover o aumento da atividade das células *natural killers* (NKs), com concomitante produção e liberação de óxido nítrico pelos macrófagos (FARMABRASILIS, 2008). As citocinas tem a capacidade de regular as funções de proliferação, apoptose e diferenciação celular, sendo produzidas por vários tecidos e células, incluindo a célula tumoral. Em estudos clínicos com portadores de HIV, o P-MAPA levou ao aumento dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ e de granulócitos, trazendo-os de volta à normalidade. Resultados semelhantes foram encontrados em pesquisas experimentais, indicando que o P-MAPA possui capacidade de estimular o sistema imune (FARMABRASILIS, 2008). Estudos recentes *in vivo* e *in vitro* sugerem que o P-MAPA atua na modulação da resposta imune em tumores malignos, restaurando a imunocompetência celular (FÁVARO *et al.*, 2012). Em modelo de câncer de ovário experimental, o tratamento com P-MAPA reduziu o volume tumoral, aumentou a taxa de sobrevivência dos animais e potencializou a via mediada por TLR4 na presença de cisplatina (CHUFFA *et al.*, 2018). Recentemente, demonstrou-se que o P-MAPA é capaz de reduzir a migração e invasão de células SKOV-3 do câncer de ovário, além de diminuir os níveis de MyD88, IRF3 e NF- κ B p65 nessas células. Quando associado com paclitaxel, o P-MAPA aumentou a sensibilidade das células de câncer de ovário ao tratamento, sugerindo que esse composto pode apresentar efeito contra a quimiorresistência associada à via de sinalização dos TLRs (LUPI *et al.*, 2019). Desta forma, o P-MAPA pode apresentar resultados promissores como estratégia terapêutica adicional aos tratamentos padrões contra o câncer de ovário, tornando-se relevante elucidar a sua ação direta nas células tumorais, já que apresenta baixa toxicidade e pode ser de grande valor para os casos de quimioresistência aos tratamentos convencionais.

A interleucina 12 (IL-12) (Figura 5) é uma citocina relacionada com a imunidade inata e adaptativa (TRINCHIERI, 1995). É produzida pelas células apresentadoras de antígenos (APCs), linfócitos B, células dendríticas e outras. A IL-12 atua sobre as células T e NK estimulando a atividade de linfócitos citotóxicos e induzindo proliferação e produção de citocinas, especialmente o IFN- γ (COLOMBO & TRINCHIERI, 2002). Além disso, a IL-12 é a citocina responsável pela diferenciação da resposta polarizada Th1, que por sua vez, também resulta na produção de IFN- γ . O IFN- γ aumenta a habilidade das APCs em produzir IL-12 (MA *et al.*, 1996) atuando como um potente feed-back positivo em várias respostas celulares. SMYTH *et al.* (2002) mostraram que altas doses dessa citocina levam à indução da imunidade tumoral mediada por células NKs, enquanto baixas doses não mostraram atividade anti-tumoral. Importaneamente, diversos estudos experimentais têm apontado que a administração sistemática de IL-12 leva a

resposta imune antitumoral, principalmente através do aumento da produção de IFN- γ . Especificamente no câncer de ovário recorrente, o tratamento intravenoso com IL-12 mostrou ser uma estratégia funcional benéfica (HURTEAU *et al.*, 2001). Nesse estudo, após os ensaios pré-dosagens para limitar a toxicidade, pacientes receberam 250 ng/kg de IL-12 em dose única, seguido por um intervalo de duas semanas, com ciclos subsequentes de administração durante cinco dias consecutivos, seguido de intervalo de 16 dias, até alcançar a regressão do tumor.

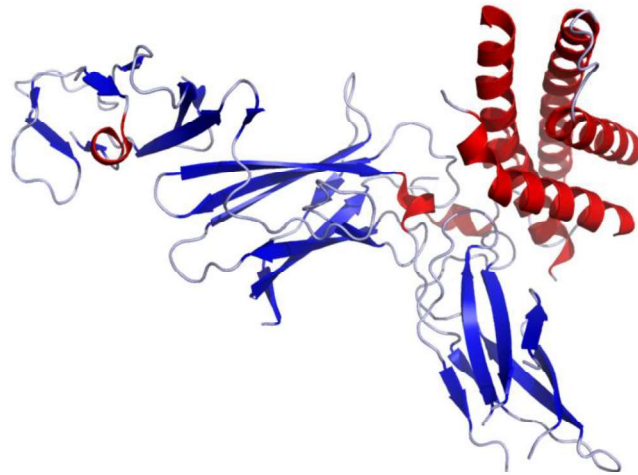


Figura 5. Estrutura quaternária da IL-12. Fonte: domínio público (*Protein data bank, PDB:1F45*)

As células T NK têm seu papel bem estabelecido na imunidade tumoral (SMYTH *et al.* 2002), apesar de estudos adicionais serem necessários para sua aplicabilidade terapêutica. A terapia antitumoral mediada por IL-12 também está relacionada com ativação dessas células T NK em camundongos (CUI *et al.* 1997), e seu uso como agente imunoterapêutico parece potencializar a rejeição tumoral, conforme já descrito em modelos experimentais de tumores como melanoma, timoma e sarcoma (KAWANO *et al.* 1997, SMYTH *et al.* 2002). Em modelo de câncer de ovário murino, o tratamento com IL-12 (0.33 mcg/dia, via i.p., durante 20 dias) resultou em redução no crescimento tumoral com aumento no número de células NK agrupadas em seu interior (SILVER *et al.* 1999). Diante desse cenário, a IL-12, associada ou não com P-MAPA, também pode representar uma importante alternativa como agente adjuvante no combate a diversos tipos de câncer, inclusive o câncer de ovário.

Conclusões

O presente estudo avaliou o efeito das imunoterapias com P-MAPA e IL-12, isolados ou combinados, na agressividade e na via de sinalização dos TLRs. Foi observado que ambos os tratamentos produzem efeitos anti-tumorigênicos nas células SKOV-3, como redução da viabilidade, metabolismo e motilidade celular. O P-MAPA é capaz de diminuir o potencial invasivo das células tumorais e de aumentar a sensibilidade das mesmas ao tratamento com paclitaxel. A terapia combinada com P-MAPA e IL-12 apresenta um potente efeito na via de sinalização dos TLRs, sendo capaz de diminuir os níveis de moléculas adaptadoras e produtos finais envolvidos na indução da inflamação e, potencialmente, na quimiorresistência das células de câncer de ovário. Particularmente, o tratamento com P-MAPA e P-MAPA+IL-12 estimula a secreção de mediadores pró e anti-inflamatórios, sendo capaz de modular eficientemente a imunogenicidade do microambiente tumoral. Adicionalmente, através da estratégia de análise proteômica global, observa-se que o P-MAPA e IL-12 isolados regulam os níveis de proteínas estruturais e de sinalização celular tradicionalmente envolvidas na progressão do câncer. A associação dos dois compostos também promove a modulação de importantes proteínas envolvidas em diversos processos celulares, como oxidação celular, senescência, processos metabólicos e energéticos, alterações estas que podem levar à instabilidade das células tumorais, disfunções metabólicas e resultar no aumento dos índices de morte celular. Este trabalho descreve uma série de efeitos importantes dos compostos P-MAPA e IL-12 que os tornam potenciais candidatos a estudos mais aprofundados de seus papéis como agentes adjuvantes para o tratamento do câncer de ovário, uma vez que, além de seu conhecido efeito na modulação do sistema imune, também influenciam diretamente as células tumorais ovarianas, favorecendo a eficácia dos tratamentos mais tradicionais e reduzindo a sua agressividade.

Referências bibliográficas

AHMED, A.A.; ETEMADMOGHADAM, D.; TEMPLE, J.; LYNCH, A.G.; RIAD, M.; SHARMA, R.; *et al.* Driver mutations in TP53 are ubiquitous in high grade serous carcinoma of the ovary. **The Journal of Pathology**, v.221; p.49-56, 2010.

AKIRA, S.; TAKEDA, K. Toll-like receptor signalling. **Nature Reviews Immunology**, v.4, p.499-511, 2004.

AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION. SK-OV-3 [SKOV-3; SKOV3] (ATCC® HTB-77™) Product Sheet. Disponível em: <https://www.atcc.org/products/all/HTB-77.aspx#characteristics>. Acesso em: 08 de agosto de 2019.

BASITH, S.; MANAVALAN, B.; LEE, G.; KIM, S.G.; CHOI, S. Toll-like receptormodulators: a patent review (2006–2010). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v.21, 927-944, 2011.

BAST, R.C. JR.; HENNESSY, B.; MILLS, G.B. The biology of ovarian cancer: New opportunities for translation. **Nature Reviews Cancer**, v.9, p.415-428, 2009.

BEREK, J.S.; KEHOE, S.T.; KUMAR, L.; FRIEDLANDER, M. Cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, v.143, p.59-78, 2018.

BOYD, J. Specific keynote: hereditary ovarian cancer: what we know. **Gynecologic Oncology**, v.88, p.S8e10, 2003.

CHEN, S.S.; MICHAEL, A.; BUTLER-MANUEL, S.A. Advances in the treatment of ovarian cancer: a potential role of antiinflammatory phytochemicals. **Discovery Medicine**, v.13, p.7-17, 2012.

CHUFFA, L.G.; DE MOURA FERREIRA, G.; LUPI, L.A.; DA SILVA NUNES, I.; FÁVARO, W.J. P-MAPA immunotherapy potentiates the effect of cisplatin on serous ovarian carcinoma through targeting TLR4 signaling. **Journal of Ovarian Research**, v.11, p.8, 2018.

COLOMBO, M.P.; TRINCHIERI, G. Interleukin-12 in anti-tumor immunity and immunotherapy. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v.13, p.155-168, 2002.

CUI, J.; SHIN, T.; KAWANO, T.; SATO, H.; KONDO, E.; TOURA, I.; *et al.* Requirement for Valpha14 NKT cells in IL-12-mediated rejection of tumors. **Science**, v.278, p.1623-1626, 1997.

D'ADHEMAR, C.J.; SPILLANE, C.D.; GALLAGHER, M.F.; BATES, M.; COSTELLO, K.M.; BARRY-O'CROWLEY, J.; *et al.* The MyD88+ phenotype is an adverse prognostic factor in epithelial ovarian cancer. **PLoS One**, v.9, p.e100816, 2014.

DAJON, M.; IRIBARREN, K.; CREMER, I. Toll-like receptor stimulation in cancer: A pro- and anti-tumor double-edged sword. **Immunobiology**, v.222, p.89-100, 2017.

DANGELO, J.G.; FATTINI, C.A. Anatomia humana sistêmica e segmentar. 3 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2007.

DUSKA, L.R.; KOHN, E.C. The new classifications of ovarian, fallopian tube, and primary peritoneal cancer and their clinical implications. **Annals of Oncology**, v.28, p.viii8-viii12, 2017.

FARMABRASILIS. P-MAPA, Propriedades gerais da molécula. Disponível em: http://www.farmabrasilis.org/todos_conteudos_interna.php?idioma=br&id=108. Acesso em: 08 de agosto de 2019.

FÁVARO, W.J.; NUNES, O.S.; SEIVA, F.R.; NUNES, I.S.; WOOLHISER, L.K.; DURÁN, N.; *et al.* Effects of P-MAPA Immunomodulator on toll-like receptors and p53: potential therapeutic strategies for infectious diseases and cancer. **Infectious Agents and Cancer**, v.7, p.14, 2012.

FITZGERALD, K.A.; ROWE, D.C.; BARNES, B.J.; CAFFREY, D.R.; VISINTIN, A.; LATZ, E.; *et al.* LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. **Journal of Experimental Medicine**, v.198, p.1043-1055, 2003.

GATA, V.; FLORIN LAURENTIU, I. The role of Toll-like receptors in ovarian cancer. **Journal of the Balkan Union of Oncology**, v.22, p.1092-1096, 2017.

- HOPKINS, P.A., SRISKANDAN, S. Mammalian Toll-like receptors: to immunity and beyond. **Clinical and Experimental Immunology**, v.140, p.395-407, 2005.
- HUANG, B.; ZHAO, J.; LI, H.; HE, K.L.; CHEN, Y.; CHEN, S.H.; *et al.* Toll-like receptors on tumor cells facilitate evasion of immune surveillance. **Cancer Research**, v.65, p.5009-5014, 2005.
- HURTEAU, J.A.; BLESSING, J.A.; DeCESARE, S.L., CREASMAN, W.T. Evaluation of recombinant human interleukin-12 in patients with recurrent or refractory ovarian cancer: a gynecologic oncology group study. **Gynecologic Oncology**, v.82, p.7-10, 2001.
- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Estatísticas de câncer. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>. Acesso em: 24 de julho de 2019.
- JESSMON, P.; BOULANGER, T.; ZHOU, W.; PATWARDHAN, P. Epidemiology and treatment patterns of epithelial ovarian cancer. **Expert Review of Anticancer Therapy**, v.17, p.427-437, 2017.
- JONES, S.; WANG, T.L.; SHIH, I.M.; MAO, T.L.; NAKAYAMA, K.; RODEN, R.; *et al.* Frequent mutations of chromatin remodeling gene ARID1A in ovarian clear cell carcinoma. **Science**, v.330, p.228-231, 2010.
- JUNQUEIRA, L.C.U; CARNEIRO, J. Histologia básica. 12 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.
- KAWAI, T.; AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. **Nature Immunology**, v.11, p.373-384, 2010.
- KAWANO, T.; CUI, J.; KOEZUKA, Y.; TOURA, I.; KANEKO, Y.; MOTOKI, K.; *et al.* CD1d-restricted and TCR-mediated activation of valpha14 NKT cells by glycosylceramides. **Science**, v.278, p.1626-1629, 1997.
- KRISHNAN, V.; BEREK, J.S.; DORIGO, O. Immunotherapy in ovarian cancer. **Current Problems in Cancer**, v.41, p.48-63, 2017.

KROEGER, P.T. JR.; DRAPKIN, R. Pathogenesis and heterogeneity of ovarian cancer. **Current Opinion in Obstetrics and Gynecology**, v.29, p.26-34, 2017.

KURMAN, R.J.; SHIH, I.M. Molecular pathogenesis and extraovarian origin of epithelial ovarian cancer--shifting the paradigm. **Human Pathology**, v.42, p.918-931, 2011.

LA VECCHIA, C. Ovarian cancer: epidemiology and risk factors. **European Journal of Cancer Prevention**, v.26, p.55-62, 2017.

LEDERMANN, J.A.; RAJA, F.A.; FOTOPOULOU, C.; GONZALEZ-MARTIN, A.; COLOMBO, N.; SESSA, C.; ESMO GUIDELINES WORKING GROUP. Newly diagnosed and relapsed epithelial ovarian carcinoma: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of Oncology**, v.S6, p.24-32, 2013.

LI, Q.; VERMA, I.M. NF- κ B regulation in the immune system. **Nature Reviews Immunology**, v.2, p.725-734, 2002.

LISIO, M.A.; FU, L.; GOYENECHÉ, A.; GAO, Z.H.; TELLERIA, C. High-grade serous ovarian cancer: basic sciences, clinical and therapeutic standpoints. **International Journal of Molecular Sciences**, v.20, p.E952, 2019.

LUAN, N.N.; WU, Q.J.; GONG, T.T.; VOGTMANN, E.; WANG, Y.L.; LIN, B. Breastfeeding and ovarian cancer risk: a meta-analysis of epidemiologic studies. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.98, p.1020e31, 2013.

LUPI, L.A.; DELELLA, F.K.; CUCIELO, M.S.; ROMAGNOLI, G.G.; KANENO, R.; NUNES, I.D.S.; *et al.* P-MAPA and interleukin-12 reduce cell migration/invasion and attenuate the toll-like receptor-mediated inflammatory response in ovarian cancer SKOV-3 Cells: a preliminary study. **Molecules**, v.25, p.E5, 2019.

MA, X.; CHOW, J.M.; GRI, G.; CARRA, G.; GEROSA, F.; WOLF, S.F.; *et al.* The interleukin 12 p40 gene promoter is primed by interferon gamma in monocytic cells. **Journal of Experimental Medicine**, v.183, p.147-157, 1996.

MARKMAN, M. Optimizing primary chemotherapy in ovarian cancer. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v.17, p.957-968, 2003.

MATULONIS, U.A.; SOOD, A.K.; FALLOWFIELD, L.; HOWITT, B.E.; SEHOULI, J.; KARLAN, B.Y. Ovarian cancer. **Nature Reviews Disease Primers**, v.2, p.16061, 2016.

MEDZHITOV, R., PRESTON-HURLBURT, P., JANEWAY, C.A. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. **Nature**, v.388, p.394-397, 1997.

MUCCIOLI, M.; SPRAGUE, L.; NANDIGAM, H.; PATE, M.; BENENCIA, F. Toll-like receptors as novel therapeutic targets for ovarian cancer. **ISRN Oncology**, v.2012, p.642141, 2012.

NEWTON, K.; DIXIT, V.M. Signaling in innate immunity and inflammation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v.4, p.a006049, 2012.

PATEL, H.; SHAW, S.G.; SHI-WEN, X.; ABRAHAM, D.; BAKER, D.M.; TSUI, J.C. Toll-like receptors in ischaemia and its potential role in the pathophysiology of muscle damage in critical limb ischaemia. **Cardiology Research and Practice**, v.2012, p.121237, 2012.

ROCK, F.L.; HARDIMAN, G.; TIMANS, J.C.; KASTELEIN, R.A.; BAZAN, J.F. A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.95, p.588-593, 1998.

SATO, Y.; GOTO, Y.; NARITA, N.; HOON, D.S. Cancer cells expressing toll-like receptors and the tumor microenvironment. **Cancer Microenvironment**, v.2, p.205-214, 2009.

SHIH, I.M.; KURMAN, R.J. Ovarian tumorigenesis- a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. **The American Journal of Pathology**, v.164, p.1511-1518, 2004.

SIEGEL, R.L.; MILLER, K.D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2019. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v.69, p.7-34, 2019.

SILVER, D.F.; HEMPLING, R.E.; PIVER, M.S.; REPASKY, E.A. Effects of IL-12 on human ovarian tumors engrafted into SCID mice. **Gynecologic Oncology**, v.72, p.154-160, 1999.

SMYTH, M.J.; CROWE, N.Y.; HAYAKAWA, Y.; TAKEDA, K.; YAGITA, H.; GODFREY, D.I. NKT cells - conductors of tumor immunity? **Current Opinion in Immunology**, v.14, p.165-171, 2002.

STRATTON, J.F.; PHAROAH, P.; SMITH, S.K.; EASTON, D.; PONDER, B.A. A systematic review and meta-analysis of family history and risk of ovarian cancer. **British Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v.105, p.493e9, 1998.

TAKEDA, K.; AKIRA, S. Toll-like receptors. **Current Protocols in Immunology**, v.109, p.1-10, 2015.

TRINCHIERI, G. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen specific adaptive immunity. **Annual Review of Immunology**, v.13, p.251-276, 1995.

USACH, I.; BLANSIT, K.; CHEN, L.M.; UEDA, S.; BROOKS, R.; KAPP, D.S.; CHAN, J.K. Survival differences in women with serous tubal, ovarian, peritoneal, and uterine carcinomas. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.212, p.188.e181-188.e186, 2015.

WEBB, P.M.; JORDAN, S.J. Epidemiology of epithelial ovarian cancer. **Best Practice & Research: Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v.41, p.3-14, 2017.

WENTZENSEN, N.; POOLE, E.M.; TRABERT, B.; WHITE, E.; ARSLAN, A.A.; PATEL, A.V.; *et al.* Ovarian cancer risk factors by histologic subtype: an analysis from the Ovarian Cancer Cohort Consortium. **Journal of Clinical Oncology**, v.34, p.2888e98, 2016.

WIEGAND, K.C.; SHAH, S.P.; AL-AGHA, O.M.; ZHAO, Y.; TSE, K.; ZENG, T.; *et al.* ARID1A mutations in endometriosis-associated ovarian carcinomas. **The New England Journal of Medicine**, v.363, p.1532-1543, 2010.

YANG, J.M.; HUNG, C.M.; FU, C.N.; LEE, J.C.; HUANG, C.H.; YANG, M.H.; *et al.* Hispidulin sensitizes human ovarian cancer cells to TRAIL-induced apoptosis by AMPK

activation leading to Mcl-1 block in translation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58, p.10020-10026, 2010.

ZHOU, M.; MCFARLAND-MANCINI, M.M.; FUNK, H.M.; HUSSEINZADEH, N.; MOUNAJJED, T.; DREW, A.F. Toll-like receptor expression in normal ovary and ovarian tumors. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v.58, p.1375-1385, 2009.

ZHU, Y.; HUANG, J.M.; ZHANG, G.N.; ZHA, X.; DENG BF. Prognostic significance of MyD88 expression by human epithelial ovarian carcinoma cells. **Journal of Translational Medicine**, v.10, p.77, 2012.