

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 17/02/2023.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Botucatu



Efeito do tratamento com melatonina associado ao paclitaxel em células de carcinoma ovariano

LETÍCIA BARBOSA GAIOTTE

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, Área de concentração Biologia Estrutural e Funcional.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Gustavo de Almeida Chuffa.

BOTUCATU – SP

2021

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

Efeito do tratamento com melatonina associado ao paclitaxel em
células de carcinoma ovariano

LETICIA BARBOSA GAIOTTE

PROF. DR. LUIZ GUSTAVO DE ALMEIDA CHUFFA

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, Área de concentração
Biologia Estrutural e Funcional.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Gustavo de Almeida Chuffa.

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

Gaiotte, Leticia Barbosa.

Efeito do tratamento com melatonina associado ao
paclitaxel em células de carcinoma ovariano / Leticia Barbosa
Gaiotte. - Botucatu, 2022

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

Orientador: Luiz Gustavo de Almeida Chuffa

Capes: 20100000

1. Ovários - Tumores. 2. Melatonina. 3. Paclitaxel.
4. Transdução de sinais. 5. Receptores Toll-like.
6. Citometria de fluxo.

Palavras-chave: Câncer de ovário; Células SKOV-3;
Melatonina; Paclitaxel; Sinalização celular.

Dedicatória

Foi pensando nas pessoas que executei este projeto, por isso dedico este trabalho a todos aqueles a quem esta pesquisa possa ajudar de alguma forma.

“Nenhuma pessoa deve ser encarada como uma abstração. Antes, é preciso enxergar em cada pessoa um universo com seus próprios segredos, com seus próprios tesouros, com suas próprias fontes de angústia e com certa dose de triunfo.”

*(Elie Wiesel The Nazi doctors and the
Nuremberg Code)*

Do livro A vida imortal de Henrietta Lacks

Agradecimentos

Um trabalho de mestrado é uma longa viagem, que inclui uma trajetória permeada por inúmeros desafios, tristezas, incertezas, alegrias e muitos percalços pelo caminho, mas apesar do processo solitário a que qualquer investigador está destinado, reúne contributos de várias pessoas, indispensáveis para encontrar o melhor rumo em cada momento da caminhada.

Trilhar este caminho só foi possível com o apoio, energia e força de várias pessoas, a quem dedico especialmente este projeto e agradeço a todos de coração.

Agradeço a todos os professores por me proporcionar o conhecimento não apenas racional, mas a manifestação do caráter e afetividade da educação no processo de formação profissional, por tanto que se dedicaram a mim, não somente por terem me ensinado, mas por terem me feito aprender.

A esta universidade, seu corpo docente, direção e administração que oportunizaram a janela que hoje vislumbro um horizonte superior, eivado pela acendrada confiança no mérito e ética aqui presentes.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz Gustavo de Almeida Chuffa por ter aceitado acompanhar-me neste projeto.

À minha família, pelo amor, incentivo, pela capacidade de acreditar em mim e na minha capacidade.

À Lucas Januário, pessoa com quem amo partilhar a vida. Com você, me sinto viva de verdade. Obrigada pelo carinho, a paciência e por sua capacidade de me trazer paz na correria de cada semestre.

Meus agradecimentos aos amigos Daniel e Fernanda pelas risadas, palavras amigas e conselhos.

Um agradecimento a Vânia, que de certo modo também acabou por auxiliar nos momentos difíceis, e nos bastidores sempre soube com um sorriso singelo dar alento aos apertos da vida.

A Roberta, companheira de trabalho e uma grande amiga, suas palavras de conforto e seu empenho foram essenciais para a minha motivação à medida que as dificuldades iam surgindo ao longo do percurso.

Queria expressar o meu agradecimento a Diego por toda ajuda, de sempre se mostrar disponível nos momentos de necessidade e pela amizade formada no caminho.

Aos colegas de grupo que tanto cooperaram quando necessário: Maira, Henrique, Luiz Antônio e Renan. Desenvolvemos respeito, união, equilíbrio e flexibilidade em nossa amizade, neste período.

Agradeço aos professores participantes da banca examinadora que dividiram comigo este momento tão importante e esperado.

Aos meus amigos que nunca estiveram ausentes, agradeço a amizade e o carinho que sempre me disponibilizaram.

A Fundação de amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP: nº 2020/00544-4) e a coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) cujo auxílio financeiro tornou este projeto possível.

E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte de minha formação, o meu muito obrigado.

Sumário

Capítulo 1	12
1. Introdução	12
1.1. Câncer de ovário: prevalência e mortalidade	12
1.2. O desenvolvimento de quimiorresistência frente a terapia com paclitaxel	15
1.3. Mediadores inflamatórios e progressão tumoral	18
1.4. Melatonina: propriedades antitumorais e sobrevivência no CO.....	21
2. Justificativa	23
3. Hipótese	24
4. Objetivo Geral.....	24
4.1. Objetivos Específicos.....	24
5. Referências Bibliográficas	25
Capítulo 2	33
Combination of melatonin with paclitaxel reduces the TLR4-mediated inflammatory pathway, PD-L1 levels, and survival of ovarian carcinoma cells.....	33
1. INTRODUCTION	34
2. MATERIALS E METHODS	35
2.1. Cell culture and reagents.....	35
2.2. Experimental design.....	35
2.3. Analysis of apoptosis by flow cytometry.	36
2.4. Measurement of intracellular melatonin concentration.	36
2.5. Colorimetric assay for cell viability.	36
2.6. Western blot analysis.	37
2.7. Measurement of cell signaling molecules.	37
2.8. Cell invasion and migration assays.	37
2.9. Statistical analysis.	38
3. RESULTS	38
3.1. Effects of combination of melatonin and PTX on SKOV-3 cell apoptosis.....	38
3.2. Effects of melatonin and PTX on the mitochondrial viability in OC cells.....	39
3.3. Effects of melatonin and PTX on TLR4-mediated inflammatory pathway and PD-L1 in ovarian cancer cells.	40
3.4. The regulatory effects of PTX or melatonin on the expressions of PI3K and AKT levels. ...	41
3.5. Effects of melatonin with PTX on the signaling pathways for cell growth and proliferation.	42
3.6. Effects of melatonin and PTX on the migratory and invasive capacity of SKOV-3 cells.....	43
4. DISCUSSION	43
5. REFERENCES	47

Lista de abreviaturas

AKT: Proteína quinase B;
Apaf-1: Fator de ativação 1 da protease apoptótica;
APCs: células apresentadoras de antígeno;
CDK2: Quinase 2 dependente de ciclina;
CDK4: Quinase 4 dependente de ciclina;
c-Jun: Fator de transcrição AP-1;
CO: Câncer de ovário;
DCs: células dendríticas;
ERK 1/2: Proteína quinase 1 ativada por mitógeno 3;
JNK: c-Jun N- terminal cinase
HER-2: Receptor tirosina quinase;
IFN- β : Interferon-beta;
I κ B- α : Inibidor alfa de NF- κ B;
IL-10: interleucina 10;
IL-6: interleucina 6;
IL-8: interleucina 8;
Mel: melatonina;
MT1: Receptor de melatonina 1;
MT2: Receptor de melatonina 2;
mTOR: Serina/treonina proteína quinase;
MyD88: fator de diferenciação mielóide 88;

NF- κ B: Fator nuclear kappa-B;
NK: célula exterminadora natural;
PAMPs: Padrões moleculares associados a patógenos;
PD-1: Proteína de morte celular programada-1;
PD-L1: ligante de morte celular programada 1;
P-gp: Glicoproteína-P;
PI3K: fosfatidil-inositol 3-quinase;
PTX: Paclitaxel;
SHP2: Proteína tirosina fosfatase;
TAAs: Antígenos associados a tumores;
TCD8+: célula T citotóxica positivo;
TCR: Receptor de células T;
TGF- β : Fator de transformação do crescimento beta;
Th1: resposta polarizada T helper 1;
TILs: Infiltrados linfocitários;
TLR: receptor celular do tipo Toll;
TLR2: receptor celular do tipo Toll 2;
TLR4: receptor celular do tipo Toll 4;
TNF- α : fator de necrose tumoral alfa;
Tregs: células T reguladoras;
VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular;

Lista de tabelas

Tabela 1 – Taxa mundial estimada de incidência e mortalidade de todos os tipos de cânceres a cada 100, 000 mulheres em 2021.	12
Tabela 2 - Incidência estimada de cânceres a cada 100, 000 mulheres no Brasil.	13

Lista de figuras

Figura 1 - Subtipos histológicos do CO, classificação baseada na histologia e grau tumoral	15
Figura 2 - Esquema representativo das vias de sinalização dos receptores HER2, TLR2, TLR4 e PD-L1.....	21
Figura 3 - Representação das vias atuantes da Mel no câncer de ovário.	23

Resumo

O câncer de ovário (CO) é uma doença ginecológica com altas taxas de mortalidade entre as mulheres. Embora a maioria dos pacientes responda à quimioterapia convencional [por exemplo, paclitaxel (PTX)], muitas mulheres se tornam resistentes e a doença progride. A melatonina exerce funções antioxidantes, antitumorais e imunomoduladoras em uma variedade de tumores sólidos. Portanto, este estudo investigou os efeitos do PTX combinado com melatonina na via inflamatória mediada pelo receptor toll-like (TLR), sinalização celular e sobrevivência de células de carcinoma de ovário humano SKOV-3. O ensaio de citometria de fluxo mostrou que a melatonina associada ao PTX promoveu um aumento significativo nas taxas de apoptose/necrose. A migração celular foi atenuada apenas pela melatonina e, após sua associação com PTX, o número de células migradas e invasivas reduziu significativamente. Embora o tratamento combinado de PTX e melatonina não tenha sido capaz de reduzir TLR2, os níveis de TLR4, MyD88, TRIF e PD-L1 foram reduzidos após a combinação de terapia e até melatonina sozinha. Além disso, a terapia combinada reduziu significativamente os níveis de NF- κ B p65, p-PI3K, p-AKT, p38, ERK 1/2, JNK, CREB, p70s6K e STAT 5. Concluímos que o tratamento combinado foi eficaz na redução Viabilidade e capacidade invasiva das células OC enquanto aumenta as taxas de apoptose e necrose. Além disso, a combinação atenuou as moléculas a jusante da via inflamatória mediada por TLR4 e proteínas relacionadas à sinalização celular em células SKOV-3, mostrando-se, assim, capaz de promover alterações na resposta celular e em seu potencial maligno. A melatonina pode melhorar a quimiossensibilidade do PTX, servindo como uma terapia adjuvante eficaz contra OC.

Palavras-chave: Câncer de ovário, melatonina, paclitaxel, receptor toll-like, PD-L1, sinalização celular, células SKOV-3.

Abstract

Ovarian cancer (OC) is a gynecological disease with high mortality rates among women. Although most patients respond to the conventional chemotherapy [e.g., paclitaxel (PTX)], many women become resistant and the disease progresses. Melatonin exerts antioxidants, antitumor, and immunomodulatory functions in a variety of solid tumors. Therefore, this study investigated the effects of PTX combined with melatonin on the toll-like receptor (TLR) mediated inflammatory pathway, cell signaling, and survival of SKOV-3 human ovarian carcinoma cells. The flow cytometry assay showed that melatonin associated with PTX promoted a significant increase in apoptosis/necrosis rates. The cell migration was attenuated by melatonin alone, and after its association with PTX, the number of migrated and invasive cells reduced significantly. Although the combined treatment of PTX and melatonin was unable to reduce TLR2, the levels of TLR4, MyD88, TRIF, and PD-L1 were reduced following therapy combination and even melatonin alone. Furthermore, the combination therapy significantly reduced the levels of NF- κ B p65, p-PI3K, p-AKT, p38, ERK 1/2, JNK, CREB, p70s6K, and STAT 5. We concluded that the combined treatment was effective in reducing OC cell viability and invasive capacity while increasing apoptosis and necrosis rates. Moreover, the combination attenuated the downstream molecules of the TLR4-mediated inflammatory pathway and cell signaling-related proteins in SKOV-3 cells, thus proving to be capable of promoting changes in the cellular response and in its malignant potential. Melatonin may improve the chemosensitivity of PTX, serving as an effective adjuvant therapy against OC.

Keywords: Ovarian cancer, melatonin, paclitaxel, toll-like receptor, PD-L1, cell signaling, SKOV-3 cells.

Capítulo 1

1. Introdução

1.1. Câncer de ovário: prevalência e mortalidade

O câncer de ovário (CO) é a neoplasia ginecológica com uma das mais altas taxas de letalidade entre as neoplasias que acometem o sistema genital feminino (NEERJA; ANNWEN, 2018; WHO, 2021). Mundialmente há uma incidência de 6,6 mil novos casos a cada 100,000 mulheres em 2021 (WHO, 2021)(Tabela 1).

Estima-se que até o final de 2022, serão diagnosticados 19.880 novos casos e ocorrerão 12.810 óbitos em decorrência da doença nos Estados Unidos de acordo com *Surveillance, Epidemiology and End Results* (SEER, 2022). Segundo dados do (Instituto Nacional do Câncer (INCA) para o triênio 2020/2022 serão diagnosticados no Brasil 6,650, novos casos a cada 100, 000 mulheres classificando-o como o 7.º mais incidente (Tabela 2). Em 2017, ocorreram 3,879 óbitos por CO no país o equivalente a 3,75 a cada 100, 000 mulheres (INCA, 2021).

Em decorrência da inespecificidade dos sintomas e métodos de triagem iniciais escassos, muitas mulheres são diagnosticadas apenas quando a doença se encontra em estágio avançado (FEENEY *et al.*, 2020; JESSMON *et al.*, 2017). Os sintomas podem variar de inchaço abdominal, dor pélvica, dificuldade para se alimentar e aumento da frequência urinária (BETHESDA, 2002).

Tabela 1 – Taxa mundial estimada de incidência e mortalidade de todos os tipos de cânceres a cada 100, 000 mulheres em 2021.

Câncer	Incidência	Mortalidade
Mama	47,8	13,6
Colo retal	16,2	7,2
Pulmão	14,6	11,2
Cérvix uterino	13,3	7,3
Tireoide	10,1	0,50
Corpus uterino	8,7	1,8
Estômago	7,0	4,9
Ovário	6,6	4,2
Fígado	5,2	4,8
Linfoma não Hodgkin	4,8	2,1

Fonte: Global Cancer Observatory, World Health Organization, 2021

Tabela 2 - Incidência estimada de cânceres a cada 100, 000 mulheres no Brasil.

Câncer	Casos novos	%
Mama	66,280	29,7
Cólon e Reto	20,470	9,2
Colo do útero	16,710	7,5
Traqueia, Brônquio e Pulmão	12,440	5,6
Glândula Tireoide	11,950	5,4
Estômago	7,870	3,5
Ovário	6,650	3,0
Corpo do útero	6,540	2,9
Linfoma não-Hodgkin	5,450	2,4
Sistema Nervoso Central	5,230	2,3

Fonte: MS/ INCA/ Estimativa de Câncer no Brasil, 2021

O CO abrange grupos tumorais ovarianos divergentes sendo classificados com base nas células de origem (WHO, 2021) em três grandes grupos: origem epitelial, células germinativas e células estromais (KURMAN *et al.*, 2014; PRAT, 2012).

Os tumores provenientes de origem epitelial representam 90% dos diagnósticos (MATULONIS *et al.*, 2016) e são subdivididos em seroso, mucinoso, endometrióide e de células claras (KURMAN *et al.*, 2014). O subtipo seroso ainda é agrupado em carcinoma seroso de baixo grau ou carcinoma seroso de alto grau. Carcinomas de alto grau são diagnosticados em 80% das vezes enquanto os de baixo grau, apenas 5% (Figura 1) (PRAT, 2012; PRAT; D'ANGELO; ESPINOSA, 2018; WHO, 2021).

O carcinoma seroso de alto grau tem classificação tipo II e é o mais letal pois apresenta sintomas em estágios avançados (III ou IV) (KROEGER; DRAPKIN, 2017; LISIO *et al.*, 2019). Esses tumores evoluem a partir de lesões malignas *in situ* no epitélio da fímbria das tubas uterinas e se espalham posteriormente para os ovários (BETHESDA, 2002).

Os tumores serosos sendo de alto ou baixo grau, representam diferenças morfológicas, patogêneses, eventos moleculares e prognósticos distintos. Tumores de alto grau tem a localização na extremidade fimbrial distal da tuba uterina de uma lesão precursora denominada carcinoma intraepitelial tubário seroso, estes, estão relacionados com mutações TP53, deficiência de recombinação homóloga e mutações BRCA enquanto os de baixo grau se estabelecem dentro do ovário, formando tumores serosos benignos e limítrofes e apresentam mutações associadas a BRAF ou KRAS (DE LEO *et al.*, 2021; KURMAN *et al.*, 2014; KURMAN; SHIH, 2010).

O risco de desenvolvimento de CO aumenta em mulheres com mais de 40 anos e atinge o pico de incidência em mulheres com mais de 70 anos de idade (WEBB; JORDAN, 2017). Mulheres com histórico familiar de CO na família possuem três vezes

mais chances de ter a doença (STRATTON *et al.*, 1998). Os processos ovulatórios também se relacionam com o histórico de CO, menopausa tardia e menarca precoce representam altas chances de desenvolvimento CO (WENTZENSEN *et al.*, 2016).

Alguns eventos promovem efeitos protetivos no desenvolvimento tumoral, mulheres que passaram por algumas gestações, há uma estimativa de cada gestação reduzir em 10-20% o risco de CO (WENTZENSEN *et al.*, 2016), a amamentação reduz em até 25% as chances de CO (LUAN *et al.*, 2013), estudos demonstraram que mulheres que fazem o uso contínuo de contraceptivos orais tem 30% menos chances de desenvolver CO (BERAL *et al.*, 2008), a laqueadura tubária também parece estar envolvida com a redução dos riscos de CO em até 30% (SIEH *et al.*, 2013).

O CO conta com vários estágios tumorais, estes descrevem diversos aspectos do tumor como localização e disseminação. A classificação é importante para determinar a extensão tumoral, a disseminação para os órgãos linfáticos, a propagação para locais distantes e, assim, saber o quão avançado o câncer está. Os estágios podem variar de I a IV sendo o IV o estágio mais avançado (PRAT; OLAWAIYE; BERMUDEZ, 2017).

I Estádio: tumor restrito aos ovários;

II Estágio: tumor limitado a pelve;

III Estágio: tumor se estende ao peritônio e pelve;

IV Estágio: Metástase (INCA, 2021; PRAT; OLAWAIYE; BERMUDEZ, 2017).

Apesar dos sintomas iniciais serem inespecíficos, conforme há um crescimento tumoral, os estágios iniciais vão avançando e pode ocorrer relatos de pressão, dor ou inchaço no abdômen costas ou pernas, náuseas e cansaço constante (INCA, 2021);

O CO apresenta desenvolvimento rápido e acentuada proliferação na região próxima ao peritônio (WAGNER; DUDLEY, 2013). Células tumorais originadas da extremidade distal das tubas uterinas ou do epitélio superficial ovariano sofrem transição epitelial para mesenquimal, se destacam e espalham-se pela cavidade peritoneal (LENGYEL, 2010).

Os adipócitos secretam fatores de crescimento além de moléculas bioativas tornando o ambiente facilmente proliferativo e favorecendo a viabilidade tumoral (WAGNER; DUDLEY, 2013). A região peritoneal é rica em tecido adiposo e colabora com acentuada proliferação no CO. No processo de metástase, os adipócitos são recrutados pelas células neoplásicas e se associam ao microambiente tumoral (DIRAT *et al.*, 2011, 2010).

Dentre os modelos experimentais existentes, o método de cultivo de células tem diversas vantagens desde facilidade de propagação, grande estabilidade e alta reprodutibilidade (TUDREJ *et al.*, 2019). A linhagem de células SKOV-3 deriva do fluído de ascite peritoneal de paciente caucasiana, de 64 anos diagnosticada com CO em 1973, a linhagem representa alto potencial invasivo e proliferativo e é muito utilizada em experimentos envolvendo tumores de CO epiteliais.

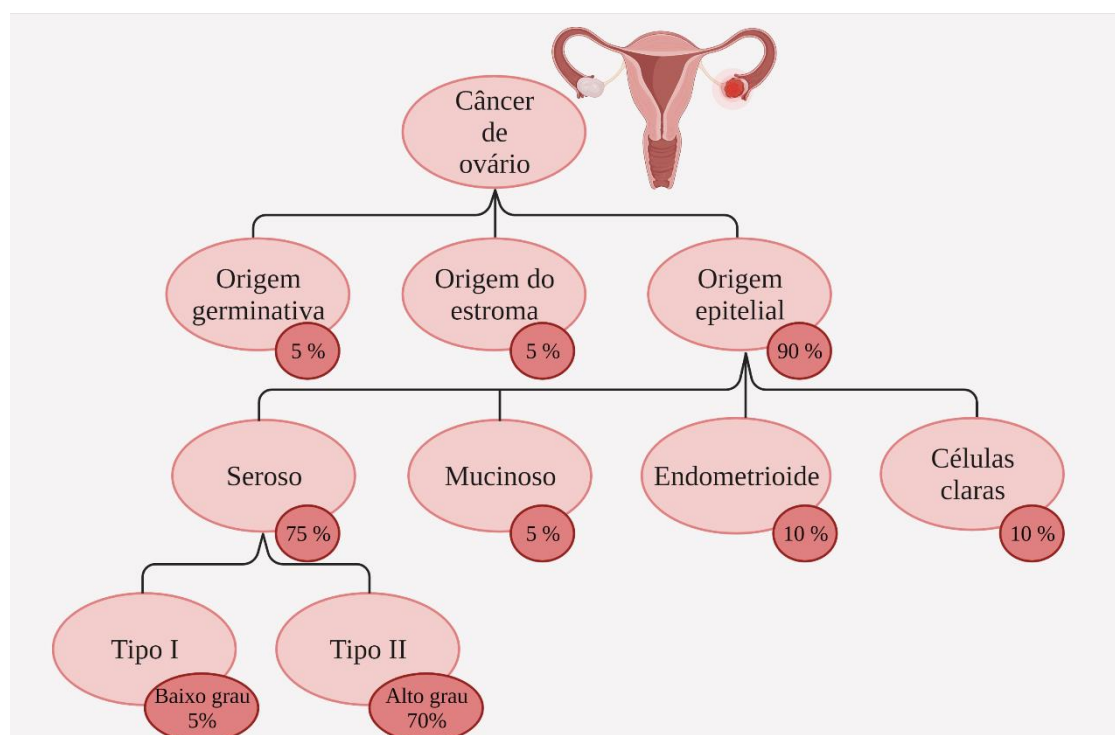


Figura 1- Subtipos histológicos do CO, classificação baseada na histologia e grau tumoral.

1.2. O desenvolvimento de quimiorresistência frente a terapia com paclitaxel

Atualmente existem muitos medicamentos e terapias alvos direcionadas para o tratamento de câncer de ovário (CORTEZ *et al.*, 2018). Entretanto, por apresentarem numerosas variações histológicas, a neoplasia conta com diferentes prognósticos o que torna ainda mais desafiador o tratamento (KUJAWA; LISOWSKA, 2015; KURMAN; SHIH, 2010).

O padrão atual de tratamento para CO inclui quimioterapia, radioterapia, remoção cirúrgica e imunoterapia, mas dependerá do estágio do tumor diagnosticado (JAYSON *et al.*, 2014; STEWART; RALYEA; LOCKWOOD, 2019). Em fases iniciais, o paciente é submetido a cirurgia e quimioterapia com derivados de platina

enquanto em fases avançadas é possível realizar uma terapia combinada com derivados de platina e taxol (ORR; EDWARDS, 2018).

O grupo dos taxanos compreende moléculas que apresentam em sua composição um anel complexo “taxano” e uma função amida (WALL, 1998). Faz parte dos membros da família dos taxanos o paclitaxel (PTX), um dos agentes antineoplásicos mais utilizados para tratar diversos tipos de câncer como: mama, pulmão, bexiga urinária, próstata, gástrico, de cabeça e pescoço e ovário (BERNABEU *et al.*, 2017; FU *et al.*, 2009).

O fármaco é um agente de polimerização que apresenta amplo espectro antitumoral em decorrência da capacidade de estabilizar microtúbulos celulares. Ao se ligar a subunidade β da proteína tubulina, proporciona uma polimerização que acarreta a formação de um fuso mitótico disfuncional. Ao suprimir o fuso dos microtúbulos, consequentemente, irá bloquear a transição metáfase-anáfase; uma vez inibida a mitose, a célula é induzida à morte por apoptose (DERRY; WILSON; JORDAN, 1995; HORWITZ, 1992; KHANNA; ROSENBERG; VAIL, 2015).

O mecanismo de ação do PTX ocorre por ativação de vias pró apoptóticas dependentes da cascata TLR4, MyD88, c-Jun, ERK1/2 e NF- κ B (PFANNENSTIEL *et al.*, 2010). O fármaco por ativar citocinas inflamatórias tem como consequência a morte das células tumorais, entretanto, alterações nessas vias levam ao desenvolvimento de resistência a droga e ineficácia do tratamento (SZAJNIK *et al.*, 2009; YAKIREVICH *et al.*, 2006).

Muitas mulheres desenvolvem resistência ao PTX por diversos mecanismos entre eles, mudanças no mRNA tendo a presença de múltiplos genes ribossomais, alteração na síntese proteica, estresse oxidativo, glicólise e metabolismo da glutatona (AGARWAL; KAYE, 2003). Outro estudo demonstrou que em uma análise com 845 genes, 337 foram alterados em células neoplásicas resistentes a PTX (SHERMAN-BAUST *et al.*, 2011).

A resistência a quimioterapia também denominada quimiorresistência é uma adversidade na eficácia do tratamento de tumores humanos. Seja por mecanismos adquiridos ou naturais, células em estado metastático são resistentes ao tratamento com diversos agentes antitumorais em decorrência da alta adaptabilidade e instabilidade genômica das mesmas (GATTI; ZUNINO, 2005).

A quimiorresistência frente ao tratamento do CO é frequentemente observada e responsável por 90% das mortes de pacientes (SHERMAN-BAUST *et al.*, 2011). A

maquinaria celular para quimiorresistência é muito ampla, podemos citar como fator principal alterações farmacocinéticas da droga que irá modificar absorção, distribuição, metabolismo e eliminação do fármaco no organismo interrompendo o ciclo do tratamento antitumoral. Alterações no influxo e efluxo do fármaco, inativação e alteração no alvo da droga, sistema de reparo do DNA aprimorado, alterações nos checkpoints do ciclo celular, inibição da apoptose, transição epitélio mesenquimal também irão contribuir com a ineficácia do tratamento, escape das células tumorais e quimiorresistência (AGARWAL; KAYE, 2003; GATTI; ZUNINO, 2005; MOSCA et al., 2021).

A capacidade da célula tumoral de diminuir o influxo da droga acarreta ineficácia do tratamento, tal mecanismo é conhecido como resistência a múltiplas drogas do inglês multidrug resistance (MDR) e faz com que as células se tornem resistentes a quimioterapia devido a alteração no microambiente tumoral ou farmacocinética da droga (AGARWAL; KAYE, 2003). MDR pode ser intrínseco quando o paciente já apresenta modificações genéticas pré-existentes ou adquirida, quando a resistência é induzida por quimioterapia (KELDERMAN; SCHUMACHER; HAANEN, 2014; LIPPERT; RUOFF; VOLM, 2008) e é capaz de elevar metabolismo de xenobióticos bem como elevar o sistema de reparo de DNA (BUKOWSKI; KCIUK; KONTEK, 2020).

Existe uma profunda correlação entre membros de proteínas transmembranas da superfamília de transportadores ABC e MDR (BUSH; LI, 2002). ABCB1 é o transportador mais evidente dessa superfamília e é também conhecido como glicoproteína-P (P-gp) (FLETCHER et al., 2010; ZHANG et al., 2015). P-gp é altamente expressa na superfície apical de células tumorais epiteliais de CO (FOJO et al., 1987; GOLDSTEIN et al., 1989; SCHINKEL et al., 1997) e associada diretamente ao mau prognóstico (BERGER et al., 2005; DEXTER et al., 1998).

A recorrência do CO deve-se ao fato de tal mecanismo realizar efluxo ativo de moléculas pela membrana celular. O mecanismo envolvendo P-gp está bem elucidado no CO e é responsável por reduzir a concentração intracelular de PTX (DING et al., 2022). GUO et al., (2019) demonstraram que a P-gp está presente na mitocôndria de células de CO humanas associadas com a resistência ao taxol e é mediada pelo efluxo de drogas existentes na organela.

Muitas mulheres desenvolvem resistência ao PTX por diversos mecanismos entre eles, mudanças no mRNA tendo a presença de múltiplos genes ribossomais,

alteração na síntese proteica, estresse oxidativo, glicólise e metabolismo da glutatona (AGARWAL; KAYE, 2003). A resistência ao paclitaxel pode estar juntamente associada com múltiplas alterações no alvo intracelular, é possível encontrar modificações frequentes nos níveis de tubulina α ou β , na mobilidade eletroforética de isoformas e acetilação de α tubulina (ZUNINO et al., 1999). Outro estudo demonstrou que em uma análise com 845 genes, 337 foram alterados em células neoplásicas resistentes a PTX (SHERMAN-BAUST et al., 2011).

Na maioria dos casos, o CO é diagnosticado tardiamente (BOWTELL et al., 2015; HOWLADER et al., 2018) e, embora muitos pacientes respondam ao tratamento padrão (cirurgia e quimioterapia), com o tempo, ocorre recidiva tumoral (BOWTELL et al., 2015; LUO et al., 2016) associada a quimiorresistência (CHUFFA et al., 2015). Assim, a neoplasia conta com um prognóstico ruim tendo uma taxa de sobrevida de 47,6% em 5 anos (HOWLADER et al., 2018).

Como a resistência a fármacos antitumorais é um fenômeno multifatorial, é necessário abordagens terapêuticas que atuem em diversos mecanismos (GATTI; ZUNINO, 2005).

Portanto, tem-se tentado obter resultados melhores com drogas combinadas ao PTX na tentativa de reduzir a quimiorresistência e aumentar sua sensibilidade ao tratamento. Contudo, os resultados são controversos e não foram adotados como padrões de tratamento (MARTH; REIMER; ZEIMET, 2017).

1.3. Mediadores inflamatórios e progressão tumoral

Receptores Toll like (TLR) são moléculas transmembranas capazes de promover inflamação local em resposta a infecções por patógenos e/ou moléculas relacionadas, sendo predominantemente expressos por várias células imunes e algumas células tumorais (GIRLING; HEDGER, 2007). Segundo (CURTIN et al., 2009), a via TLR pode promover o crescimento tumoral. KELLY et al., (2006) sugere que a quimiorresistência ao PTX deve ocorrer através de mecanismos ligados ao receptor TLR4 no CO.

Em decorrência da inflamação crônica gerada pelo processo de quimiorresistência, receptores TLR são ativados (KELLY et al., 2006), estes por sua vez estimulam proteínas quinases MAPKs, p38 e JNK bem como fatores de transcrição como o NF- κ B e outras STATs (LIM; STAUDT, 2013; ZHAO et al., 2021). Por conseguinte, a via composta por MAPK/ERK1/2 regula os fatores de transcrição JNK,

FOS, NF-kB e STATs sendo altamente expressos na progressão tumoral e responsáveis por processos decorrentes de proliferação, diferenciação, crescimento, migração e morte celular (DHILLON et al., 2007; SCHULZE-OSTHOFF et al., 1997).

Uma vez expressa, a via mediada por TLR, frequentemente alterada nos tecidos ovarianos, ativa MyD88 que contribui com a progressão tumoral e metástase além de estimular vias de resistência pró apoptóticas (ZHU et al., 2012). A atuação de TLR4 juntamente com a via de sinalização seguida de MyD88 colabora com a inflamação crônica local (HUANG et al., 2005). Sendo assim, a expressão reduzida e até bloqueio da sinalização de TLR4/MyD88 resulta em atenuação tumoral (CHEN et al., 2007).

Enquanto o TLR4, ativado em células imunes, apresenta atividade antitumoral, sua ativação em células neoplásicas promove secreção de moléculas pró-inflamatórias (IL-6, IL-8, TNF, NO, TGF- β , VEGF), resultando em progressão tumoral, resistência apoptótica, supressão do sistema imune, escape imunológico e resistência a terapias convencionais (LUPI et al., 2020). Estudos realizados em nosso laboratório mostrou aumento da ativação da via de sinalização mediada por TLR4, além da elevação dos níveis de IFN- β , IL-6 e TNF- α pelas células do CO induzido quimicamente (CHUFFA et al., 2015, 2018).

De maneira semelhante ao TLR4, diversos estudos associam o aumento do receptor TLR2 em CO, este estimula mediadores da cascata PI3K e promove progressão tumoral e metástase (PARK; CHUNG; KIM, 2017; ZHANG et al., 2015). Células neoplásicas apresentam, na maioria das vezes, alterações na via de sinalização PI3K e Akt, sendo frequentemente ativada (YUAN; CANTLEY, 2008). Estudos mostram que Akt atua na patogénia do câncer, sendo capaz de modificar a sobrevivência, proliferação e crescimento celular (VIVANCO; SAWYERS, 2002).

CHEFETZ et al., (2013) apontaram, em estudos *in vivo* e *in vitro* de CO, que a via inflamatória TLR2-MyD88-NF-kB, quando deflagrada no momento da cirurgia ou quimioterapia, favorece a liberação de diversos detritos celulares formando um processo de lesão e resultando em reparo tumoral e recidiva da doença. Novas abordagens são esperadas para o reconhecimento da ativação dessa via de sinalização.

A cascata sinalizadora induzida por MAPK é super expressa tanto nos tecidos quanto em linhagens celulares de CO (JIANG et al., 2019), esta transmite sinais extracelulares para alvos intracelulares desempenhando papel fundamental na regulação de processos básicos (KESHET; SEGER, 2010; SABIO; DAVIS, 2014). A via é

composta proteínas quinases como ERK1/2, p38 e c-Jun (JNK1/2/3) responsáveis pelo controle da proliferação celular, sobrevivência celular e morte celular (DAVIS, 2000; JOHNSON; LAPADAT, 2002). As JNKs são ativas através do estresse celular, respondem a estímulos extracelulares e estão constantemente presentes na quimiorresistência do PTX em OC (DHANASEKARAN; REDDY, 2008; HUANG et al., 2016).

A sinalização ERK1/2 é ativada por meio de fatores mitogênicos, e sua redução pode auxiliar no tratamento de OC (ROBERTS; DER, 2007). Mais recentemente, JIANG et al., (2019) reforçaram que a via de sinalização MAPK/ERK é expressa em células OC (por exemplo, células SKOV-3), e tal via desempenha um papel vital no desenvolvimento e progressão da OC. Da mesma forma, o CREB, importante fator de transcrição, pode ser fosforilado por diversas quinases, incluindo ERK 1/2, Akt e p38, e sua ativação está relacionada à proliferação celular, apoptose, angiogênese e metástase (STEVEN et al., 2020).

A família STAT de fatores de transcrição se comunica com a membrana celular até o núcleo (JAMES E. DARNELL, 1997) e assim estão envolvidos em processos apoptóticos, proliferação celular angiogênica e supressão da imunidade antitumoral (LEVY; DARNELL, 2002; YU; PARDOLL; JOVE, 2009). Ativação de STATs principalmente 5 tem importante participação oncogênica envolvida no comportamento maligno do CO (SILVER et al., 2004). Estudos indicam que a ativação de STATs relaciona-se com avanço tumoral, maior resistência à quimioterapia e recorrência (CHEN et al., 2017; JINAWATH et al., 2010).

É comum as células tumorais expressarem níveis de PD-L1, alta expressão do *checkpoint* imunológico corrobora com um ambiente imune adaptativo e favorece o escape imunológico frente ao tratamento quimioterápico (OHAEBULAM et al., 2015). PD-L1 é expresso em macrófagos, linfócitos e algumas células epiteliais em perfil inflamatório (SHARPE et al., 2007). A expressão de PD-L1 se relaciona com um pior prognóstico em pacientes com CO (HAMANISHI et al., 2007). Ao se ligar com o receptor PD-1 presente em células T, o eixo PD-L1/PD-1 é capaz de inibir a ativação dos linfócitos corroborando com um aumento de citocinas e mau prognóstico (TAUBE, 2014; TUMEH et al., 2014).

A ativação da cascata inflamatória promovida por PI3K/AKT tem como consequência a sinalização de PD-L1 (CHEN et al., 2016). A expressão de PD-L1 também pode ser induzida por TLR via NF- κ B (HAN; LIU; LI, 2020). PENG et al.,

(2015) demonstraram que a sinalização de NF- κ B promovida por quimioterapia induz expressão de PD-L1 em células de CO, dessa maneira, outras combinações terapêuticas são necessárias uma vez que a quimioterapia provoca alterações imunológicas importantes no combate ao CO.

A produção desregulada de mediadores inflamatórios em neoplasias ovarianas segue associado com baixa sobrevida de pacientes (SAVANT; SRIRAMKUMAR; O'HAGAN, 2018). Dessa forma, a melhor compreensão da patogênese molecular do CO fornecerá subsídios para que novos alvos terapêuticos possam ser identificados, favorecendo a detecção precoce e a descoberta de novos tratamentos.

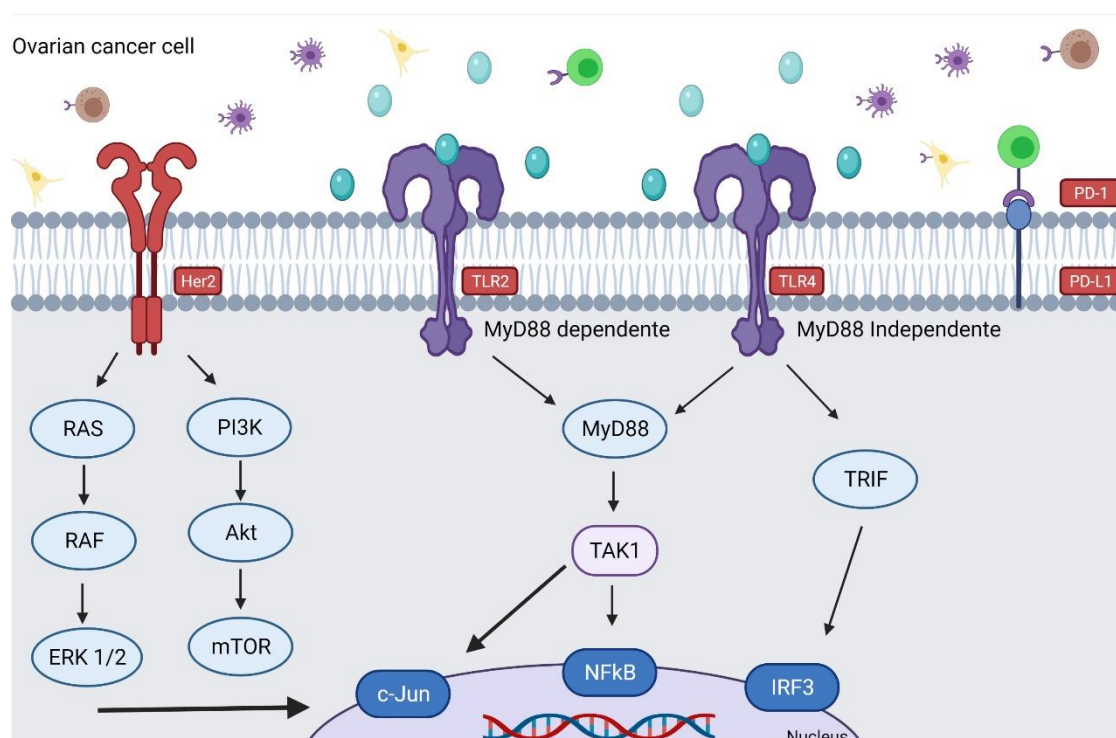


Figura 2 - Esquema representativo das vias de sinalização dos receptores HER2, TLR2, TLR4 e PD-L1. HER2 inicia a cascata sinalizada por RAS-RAF-ERK e PI3K-Akt e mTOR vias altamente expressas no câncer de ovário envolvidas na proliferação e sobrevivência celular. O receptor TLR2 ativa a via canônica enquanto o TLR4 ativa a via canônica e a não canônica, envolvidos na expressão moléculas inflamatórias. O ligante de morte programada PD-L1 é uma proteína altamente expressa em câncer de ovário que ao se ligar no receptor PD-1 tem capacidade de desativação de células T.

1.4. Melatonina: propriedades antitumorais e sobrevivência no CO.

A melatonina (Mel), hormônio secretado pela glândula pineal durante a fase de escuro, possui marcante versatilidade funcional com propriedades antioxidantes, oncostáticas e imunomoduladoras (REITER et al., 2017; REITER, 2004). Várias pesquisas têm chamado atenção para a relação entre o controle neuroimunomodulatório e o aparecimento e progressão do câncer. CONTI et al., (2000) relataram um duplo papel da Mel atuando como agente imunomodulador: 1) por ativação do sistema imune

seguido de um aumento da atividade de macrófagos, linfócitos T helper (Th1) e produção de citocinas; 2) por reajuste a longo-prazo das funções imunológicas devido à regulação circadiana, afetando hematopoiese e divisão celular. Um estudo anterior verificou que a administração de Mel suprimiu a expressão de TLR4 e, consequentemente, reduziu os níveis dos fatores MyD88, TRIF (IRF3), I κ B- α citosólica e NF- κ B/p65 (Figura 2) nuclear em modelo experimental *in vivo* de CO (CHUFFA et al., 2015). Além disso, vários registros apontam a Mel como atuante na prevenção das etapas de iniciação, promoção e progressão tumoral. Foi demonstrado que a eficácia da Mel em limitar a proliferação de células tumorais depende do período de administração, sendo o final da fase clara e início da fase escura mais indicada (SAUER; DAUCHY; BLASK, 2001). Os efeitos oncostáticos da Mel são mais pronunciados em tumores hormônio dependentes (mama e ovário), provavelmente por antagonizar a mitose mediada por estrógeno (HILL et al., 1992). Em adição aos efeitos oncostáticos, a Mel protege os precursores hematopoiéticos de possíveis efeitos tóxicos causado pela quimioterapia (SRINIVASAN et al., 2008).

Estudos mostram que a expressão do receptor de Mel em células ou tecidos tumorais, via ativação de MT1 e MT2, promoveu efeitos antiproliferativos e protetores em vários tipos de câncer (JABLONSKA et al., 2014). SHEN et al., (2016) observaram importantes efeitos na inibição do crescimento tumoral com a administração de Mel nas doses de 400, 600 e 800 μ M em células OVCAR-429 e PA-1; como consequência, houve atraso das fases G1/S e regulação negativa de CDK2 e CDK4. O uso da Mel como adjuvante terapêutico atenuou resposta inflamatória em células CO por meio da inibição de vias de sinalização canônicas (NF- κ B, p38 MAPK) e não canônicas (IRF3), logo, pode-se reduzir a resistência dos efeitos colaterais causados por quimioterapia (CHUFFA; REITER; LUPI, 2017).

Estudos em modelo *in vivo* de CO utilizando doses de 200 μ g de Mel por 60 dias evidenciaram redução na massa e volume tumoral e incidência de adenocarcinomas em ratas adultas, bem como indução de apoptose (CHUFFA et al., 2013, 2016). Esses achados demonstraram a efetividade da Mel contra o CO, porém um melhor detalhamento desses processos em modelo de célula humana frente ao tratamento com PTX pode apontar outros mecanismos envolvidos.

FERREIRA et al., (2014) demonstraram que em ratas tratadas com Mel na dose de 200 μ g/100g peso corpóreo/dia mostraram regulação negativa de Her-2 e de moléculas relacionadas com a via MAPK, Akt e mTOR. Portanto, a diminuição de Her-

2 pode auxiliar na melhora tumoral em CO resistente a quimioterapia. No entanto, é necessário o reconhecimento da ativação desta via pela Mel na presença de PTX.

AKBARZADEH et al., (2017) evidenciaram que a Mel também inibiu a proliferação de células tumorais isoladas de SKOV-3 por meio da modulação de PI3K e MAPK, agindo como um importante mecanismo na supressão tumoral. (WANG et al., (2012) constataram uma inibição por meio da Mel na fosforilação de NF- κ B e Akt/PI3K em células de câncer de mama MDA-MB-361, o que levou, consequentemente, a uma ativação da via apoptótica Apaf-1. Contudo, são necessários mais estudos que examinem as vias da Mel associadas ao PTX, para alcançar maior compreensão dos seus benefícios.

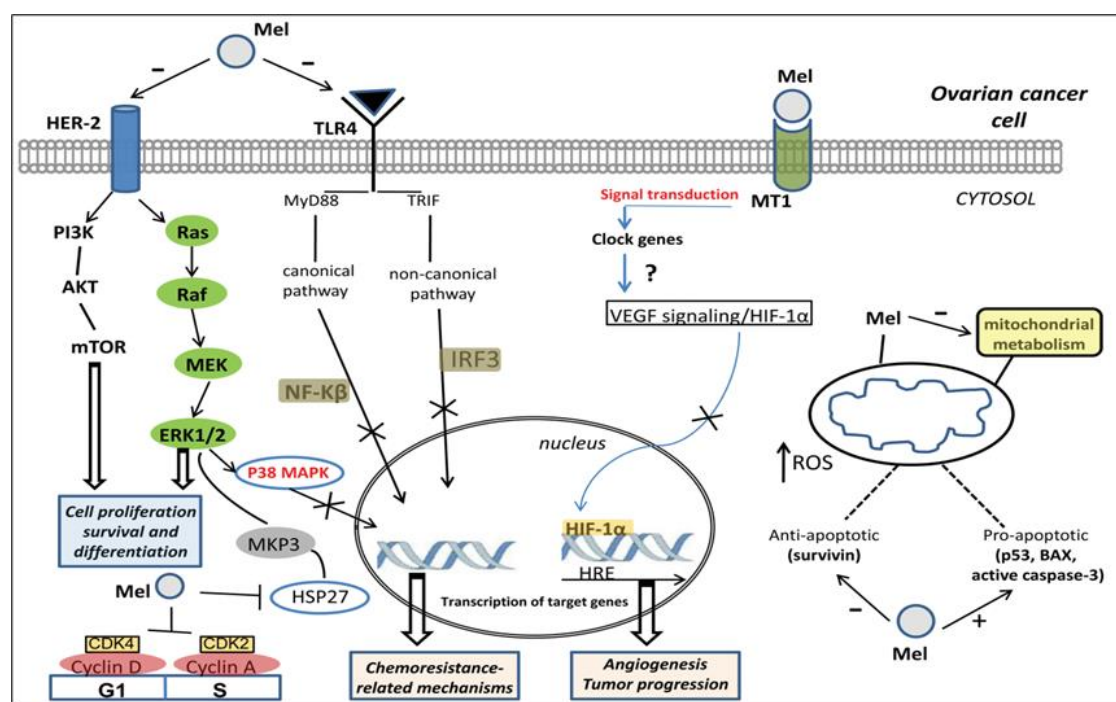


Figura 3 - Representação das vias atuantes da Mel no câncer de ovário. O hormônio tem capacidade de inibir proliferação, sobrevivência, migração celular, inflamação e angiogênese. Mel foi capaz de atenuar vias relacionadas a proliferação e quimiorresistência tais como Her2 e TLR4, ademais, inibiu ERK1/2 e NF- κ B responsáveis por aumentar genes de transcrição que facilitam o mau prognóstico. Adaptado de Chuffa et al. 2017.

2. Justificativa

Mecanismos desconhecidos que participam do desenvolvimento e progressão do CO podem estar diretamente associados à atividade inflamatória e resistência à apoptose. Quimioterápicos desempenham atividades fundamentais no controle do crescimento tumoral; no entanto, de forma súbita, muitas mulheres desenvolvem quimiorresistência e a progressão tumoral avança drasticamente. O mecanismo de quimiorresistência pode estar ligado ao padrão de resposta particular resultando em óbito da paciente. Tendo a propósito as terapias funcionais como ferramentas úteis no

entendimento dos aspectos moleculares que controlam a carcinogênese do CO, o estudo visa explorar os efeitos *in vitro* da melatonina associado ao PTX sobre a via inflamatória mediada por TLRs e sobrevivência celular em linhagem de carcinoma ovariano. Portanto, o presente estudo investigará os seguintes aspectos: 1) Poderia a melatonina reverter a quimioresistência frente ao tratamento com PTX? 2) Qual seria o efeito associado da melatonina com PTX sobre a ação tumoral no CO? 3) Qual a participação das moléculas de *checkpoint* nesse cenário?

Além da terapia com melatonina não promover citotoxicidade em tecidos e órgãos saudáveis, tem mostrado importante ação moduladora sobre alguns mediadores do processo imune em tumores sólidos, podendo favorecer o prognóstico da doença, auxiliar no bem-estar do paciente e, principalmente, no entendimento dos mecanismos ligados a quimioresistência. A avaliação do CO, sob o ponto de vista inflamatório, a sobrevivência da célula tumoral, e o papel da melatonina como adjuvante terapêutico apontam como novas estratégias de combate ao CO.

3. Hipótese

O tratamento com melatonina potencializa os efeitos do PTX, diminui a taxa de migração e invasão celular enquanto promove apoptose. Além disso, a associação dos agentes poderá atenuar os efeitos ligados a quimioresistência e sobrevivência das células SKOV-3.

4. Objetivo Geral

Avaliar o efeito do tratamento com a melatonina associado ao PTX sobre o padrão de resposta inflamatória mediada por TLR e a sobrevivência das células de carcinoma de ovário humano (SKOV-3).

4.1. Objetivos Específicos

1. Avaliar os efeitos dos tratamentos com melatonina associado ao PTX na linhagem de células SKOV-3;
2. Avaliar a viabilidade celular, citotoxicidade, migração e invasão celular, apoptose e necrose frente aos tratamentos específicos;
3. Quantificar os receptores TLR2 e TLR4, e os fatores imunológicos MYD88, TRIF e PD-L1 envolvidos no processo de resposta imune;
4. Quantificar os p-PI3K, p-Akt envolvidos na progressão tumoral;
5. Quantificar os mediadores de sobrevivência celular NF- κ B, ERK1/2, STAT5, CREB, p38 e JNK.

5. Referências Bibliográficas

AGARWAL, R.; KAYE, S. B. Ovarian cancer: strategies for overcoming resistance to chemotherapy. **Nature Reviews. Cancer**, v. 3, n. 7, p. 502–516, jul. 2003.

AKBARZADEH, M. et al. The potential therapeutic effect of melatonin on human ovarian cancer by inhibition of invasion and migration of cancer stem cells. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 17062, dez. 2017.

BERAL, V. et al. Ovarian cancer and oral contraceptives: collaborative reanalysis of data from 45 epidemiological studies including 23,257 women with ovarian cancer and 87,303 controls. **Lancet (London, England)**, v. 371, n. 9609, 26 jan. 2008.

BERGER, W. et al. Multidrug resistance markers P-glycoprotein, multidrug resistance protein 1, and lung resistance protein in non-small cell lung cancer: prognostic implications. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 131, n. 6, p. 355–363, jun. 2005.

BERNABEU, E. et al. Paclitaxel: What has been done and the challenges remain ahead. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 526, n. 1–2, p. 474–495, jun. 2017.

BETHESDA, M. **Ovarian Epithelial, Fallopian Tube, and Primary Peritoneal Cancer Treatment.** Disponível em: <<https://www.cancer.gov/types/ovarian/hp/ovarian-epithelial-treatment-pdq>>. Acesso em: 5 jan. 2022.

BOWTELL, D. D. et al. Rethinking ovarian cancer II: reducing mortality from high-grade serous ovarian cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 15, n. 11, p. 668–679, nov. 2015.

BUKOWSKI, K.; KCIUK, M.; KONTEK, R. Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer Chemotherapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 9, p. 3233, 2 maio 2020.

BUSH, J. A.; LI, G. Cancer chemoresistance: the relationship between p53 and multidrug transporters. **International Journal of Cancer**, v. 98, n. 3, p. 323–330, 20 mar. 2002.

CHEFETZ, I. et al. TLR2 enhances ovarian cancer stem cell self-renewal and promotes tumor repair and recurrence. **Cell Cycle**, v. 12, n. 3, p. 511–521, fev. 2013.

CHEN, J. et al. Regulation of PD-L1: a novel role of pro-survival signalling in cancer. **Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology**, v. 27, n. 3, p. 409–416, mar. 2016.

CHEN, M.-W. et al. The STAT3-miRNA-92-Wnt Signaling Pathway Regulates Spheroid Formation and Malignant Progression in Ovarian Cancer. **Cancer Research**, v. 77, n. 8, p. 1955–1967, 15 abr. 2017.

CHEN, R. et al. Inflammation, Cancer and Chemoresistance: Taking Advantage of the Toll-Like Receptor Signaling Pathway. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 57, n. 2, p. 93–107, fev. 2007.

- CHUFFA, L. G. A. et al. Characterization of Chemically Induced Ovarian Carcinomas in an Ethanol-Preferring Rat Model: Influence of Long-Term Melatonin Treatment. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, p. e81676, 18 dez. 2013.
- CHUFFA, L. G. A. et al. Melatonin attenuates the TLR4-mediated inflammatory response through MyD88- and TRIF-dependent signaling pathways in an in vivo model of ovarian cancer. **BMC Cancer**, v. 15, n. 1, p. 34, dez. 2015.
- CHUFFA, L. G. A. et al. Quantitative Proteomic Profiling Reveals That Diverse Metabolic Pathways Are Influenced by Melatonin in an in Vivo Model of Ovarian Carcinoma. **Journal of Proteome Research**, v. 15, n. 10, p. 3872–3882, 7 out. 2016.
- CHUFFA, L. G. A. et al. P-MAPA immunotherapy potentiates the effect of cisplatin on serous ovarian carcinoma through targeting TLR4 signaling. **Journal of Ovarian Research**, v. 11, n. 1, p. 8, dez. 2018.
- CHUFFA, L. G. DE A.; REITER, R. J.; LUPI, L. A. Melatonin as a promising agent to treat ovarian cancer: molecular mechanisms. **Carcinogenesis**, v. 38, n. 10, p. 945–952, 1 out. 2017.
- CONTI, A. et al. Evidence for melatonin synthesis in mouse and human bone marrow cells. **Journal of Pineal Research**, v. 28, n. 4, p. 193–202, maio 2000.
- CORTEZ, A. J. et al. Advances in ovarian cancer therapy. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 81, n. 1, p. 17–38, jan. 2018.
- CURTIN, J. F. et al. HMGB1 Mediates Endogenous TLR2 Activation and Brain Tumor Regression. **PLoS Medicine**, v. 6, n. 1, p. 22, 2009.
- DAVIS, R. J. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. **Cell**, v. 103, n. 2, p. 239–252, 13 out. 2000.
- DE LEO, A. et al. What Is New on Ovarian Carcinoma: Integrated Morphologic and Molecular Analysis Following the New 2020 World Health Organization Classification of Female Genital Tumors. **Diagnostics**, v. 11, n. 4, p. 697, 14 abr. 2021.
- DERRY, W. B.; WILSON, L.; JORDAN, M. A. Substoichiometric Binding of Taxol Suppresses Microtubule Dynamics. **Biochemistry**, v. 34, n. 7, p. 2203–2211, 12 fev. 1995.
- DEXTER, D. W. et al. Quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction measured expression of MDR1 and MRP in primary breast carcinoma. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 4, n. 6, p. 1533–1542, jun. 1998.
- DHANASEKARAN, D. N.; REDDY, E. P. JNK signaling in apoptosis. **Oncogene**, v. 27, n. 48, p. 6245–6251, 20 out. 2008.
- DHILLON, A. S. et al. MAP kinase signalling pathways in cancer. **Oncogene**, v. 26, n. 22, p. 3279–3290, 14 maio 2007.
- DING, Q. et al. Cardamonin inhibits the expression of P-glycoprotein and enhances the anti-proliferation of paclitaxel on SKOV3-Taxol cells. **Journal of Natural Medicines**, v. 76, n. 1, p. 220–233, jan. 2022.

- DIRAT, B. et al. Cancer-associated adipocytes exhibit an activated phenotype and contribute to breast cancer invasion. **Cancer Research**, v. 71, n. 7, p. 2455–2465, 1 abr. 2011.
- DIRAT, B. A. et al. Unraveling the obesity and breast cancer links: a role for cancer-associated adipocytes? **Endocrine Development**, v. 19, p. 45–52, 2010.
- FEENEY, L. et al. Liquid biopsy in ovarian cancer: Catching the silent killer before it strikes. **World Journal of Clinical Oncology**, v. 11, n. 11, p. 868–889, 24 nov. 2020.
- FERREIRA, G. M. et al. Melatonin Attenuates Her-2, p38 MAPK, p-AKT, and mTOR Levels in Ovarian Carcinoma of Ethanol-Preferring Rats. **Journal of Cancer**, v. 5, n. 9, p. 728–735, 2014.
- FLETCHER, J. I. et al. ABC transporters in cancer: more than just drug efflux pumps. **Nature Reviews Cancer**, v. 10, n. 2, p. 147–156, fev. 2010.
- FOJO, A. T. et al. Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 84, n. 1, p. 265–269, 1 jan. 1987.
- FU, Y. et al. Medicinal Chemistry of Paclitaxel and its Analogues. p. 20, 2009.
- GATTI, L.; ZUNINO, F. Overview of Tumor Cell Chemoresistance Mechanisms. In: BLUMENTHAL, R. D. (Ed.). **Chemosensitivity: Volume II: In VIVO Models, Imaging, and Molecular Regulators**. Methods in Molecular Medicine™. Totowa, NJ: Humana Press, 2005. p. 127–148.
- GIRLING, J. E.; HEDGER, M. P. Toll-like receptors in the gonads and reproductive tract: emerging roles in reproductive physiology and pathology. **Immunology & Cell Biology**, v. 85, n. 6, p. 481–489, ago. 2007.
- GOLDSTEIN, L. J. et al. Expression of Multidrug Resistance Gene in Human Cancers. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 81, n. 2, p. 116–124, 18 jan. 1989.
- GUO, W. et al. Mitochondria P-glycoprotein confers paclitaxel resistance on ovarian cancer cells. **OncoTargets and Therapy**, v. Volume 12, p. 3881–3891, maio 2019.
- HAMANISHI, J. et al. Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 9, p. 3360–3365, 27 fev. 2007.
- HAN, Y.; LIU, D.; LI, L. PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. p. 16, 2020.
- HILL, S. M. et al. The growth inhibitory action of melatonin on human breast cancer cells is linked to the estrogen response system. **Cancer Letters**, v. 64, n. 3, p. 249–256, jul. 1992.
- HORWITZ, S. B. Mechanism of action of taxol. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 13, n. 4, p. 134–136, abr. 1992.
- HOWLADER, N. et al. **SEER Cancer Statistics Review, 1975-2018**. Disponível em: <https://seer.cancer.gov/csr/1975_2016/index.html>. Acesso em: 13 set. 2021.

- HUANG, B. et al. Toll-like receptors on tumor cells facilitate evasion of immune surveillance. **Cancer Research**, v. 65, n. 12, p. 5009–5014, 15 jun. 2005.
- HUANG, C. et al. B7-H3, B7-H4, Foxp3 and IL-2 expression in cervical cancer: Associations with patient outcome and clinical significance. **Oncology Reports**, v. 35, n. 4, p. 2183–2190, abr. 2016.
- INCA, I. N. DO C. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>>. Acesso em: 13 set. 2021.
- JABLONSKA, K. et al. Expression of the MT1 Melatonin Receptor in Ovarian Cancer Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 12, p. 23074–23089, 12 dez. 2014.
- JAMES E. DARNELL, J. STATs and Gene Regulation. **Science**, 12 set. 1997.
- JAYSON, G. C. et al. Ovarian cancer. **The Lancet**, v. 384, n. 9951, p. 1376–1388, out. 2014.
- JESSMON, P. et al. Epidemiology and treatment patterns of epithelial ovarian cancer. **Expert Review of Anticancer Therapy**, v. 17, n. 5, p. 427–437, 4 maio 2017.
- JIANG, X. L. et al. [Expression and significance of MAPK/ERK in the specimens and cells of epithelial ovarian cancer]. **Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi**, v. 54, n. 8, p. 541–547, 25 ago. 2019.
- JINAWATH, N. et al. Oncoproteomic Analysis Reveals Co-Upregulation of RELA and STAT5 in Carboplatin Resistant Ovarian Carcinoma. **PLOS ONE**, v. 5, n. 6, p. e11198, 18 jun. 2010.
- JOHNSON, G. L.; LAPADAT, R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. **Science (New York, N.Y.)**, v. 298, n. 5600, p. 1911–1912, 6 dez. 2002.
- KELDERMAN, S.; SCHUMACHER, T. N. M.; HAANEN, J. B. A. G. Acquired and intrinsic resistance in cancer immunotherapy. **Molecular Oncology**, v. 8, n. 6, p. 1132–1139, 12 set. 2014.
- KELLY, M. G. et al. TLR-4 Signaling Promotes Tumor Growth and Paclitaxel Chemoresistance in Ovarian Cancer. **Cancer Research**, v. 66, n. 7, p. 3859–3868, 1 abr. 2006.
- KESHET, Y.; SEGER, R. The MAP kinase signaling cascades: a system of hundreds of components regulates a diverse array of physiological functions. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 661, p. 3–38, 2010.
- KHANNA, C.; ROSENBERG, M.; VAIL, D. M. A Review of Paclitaxel and Novel Formulations Including Those Suitable for Use in Dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 29, n. 4, p. 1006–1012, jul. 2015.
- KROEGER, P. T.; DRAPKIN, R. Pathogenesis and heterogeneity of ovarian cancer: **Current Opinion in Obstetrics and Gynecology**, v. 29, n. 1, p. 26–34, fev. 2017.

- KUJAWA, K. A.; LISOWSKA, K. M. [Ovarian cancer--from biology to clinic]. **Postepy Higieny I Medycyny Doswiadczalnej (Online)**, v. 69, p. 1275–1290, 2 dez. 2015.
- KURMAN, R. J. et al. **WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs**. 4th. ed. [s.l.] IARC: Lyon 2014, 2014.
- KURMAN, R. J.; SHIH, I.-M. The Origin and Pathogenesis of Epithelial Ovarian Cancer- a Proposed Unifying Theory. **The American journal of surgical pathology**, v. 34, n. 3, p. 433–443, mar. 2010.
- LENGYEL, E. Ovarian Cancer Development and Metastasis. **The American Journal of Pathology**, v. 177, n. 3, p. 1053–1064, set. 2010.
- LEVY, D. E.; DARNELL, J. E. Stats: transcriptional control and biological impact. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 3, n. 9, p. 651–662, set. 2002.
- LIM, K.-H.; STAUDT, L. M. Toll-Like Receptor Signaling. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 5, n. 1, p. a011247, jan. 2013.
- LIPPERT, T. H.; RUOFF, H.-J.; VOLM, M. Intrinsic and acquired drug resistance in malignant tumors. The main reason for therapeutic failure. **Arzneimittel-Forschung**, v. 58, n. 6, p. 261–264, 2008.
- LISIO, M.-A. et al. High-Grade Serous Ovarian Cancer: Basic Sciences, Clinical and Therapeutic Standpoints. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 4, p. 952, 22 fev. 2019.
- LUAN, N.-N. et al. Breastfeeding and ovarian cancer risk: a meta-analysis of epidemiologic studies. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 98, n. 4, p. 1020–1031, 1 out. 2013.
- LUO, Z. et al. Tumor microenvironment: The culprit for ovarian cancer metastasis? **Tumor microenvironment: The culprit for ovarian cancer metastasis?**, v. 377, n. 2, p. 174–182, 2016.
- LUPI, L. A. et al. The role of Toll-like receptor 4 signaling pathway in ovarian, cervical, and endometrial cancers. **Life Sciences**, v. 247, p. 117435, abr. 2020.
- MARTH, C.; REIMER, D.; ZEIMET, A. G. Front-line therapy of advanced epithelial ovarian cancer: standard treatment. **Annals of Oncology**, v. 28, n. suppl_8, p. viii36–viii39, 1 nov. 2017.
- MATULONIS, U. A. et al. Ovarian cancer. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, n. 1, p. 1–22, 25 ago. 2016.
- MOSCA, L. et al. Taxanes in cancer treatment: Activity, chemoresistance and its overcoming. **Drug Resistance Updates**, v. 54, p. 100742, jan. 2021.
- NEERJA, B.; ANNWEN, J. **The world ovarian cancer coalition atlas. Global trends in incidence , mortality and survival**World ovarian cancer coalition, , 2018.
- OHAEGBULAM, K. C. et al. Human cancer immunotherapy with antibodies to the PD-1 and PD-L1 pathway. **Trends in Molecular Medicine**, v. 21, n. 1, p. 24–33, jan. 2015.

- ORR, B.; EDWARDS, R. P. Diagnosis and Treatment of Ovarian Cancer. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, Ovarian Cancer. v. 32, n. 6, p. 943–964, 1 dez. 2018.
- PARK, G. B.; CHUNG, Y. H.; KIM, D. Induction of galectin-1 by TLR-dependent PI3K activation enhances epithelial-mesenchymal transition of metastatic ovarian cancer cells. **Oncology Reports**, v. 37, n. 5, p. 3137–3145, maio 2017.
- PENG, J. et al. Chemotherapy Induces Programmed Cell Death-Ligand 1 Overexpression via the Nuclear Factor- κ B to Foster an Immunosuppressive Tumor Microenvironment in Ovarian Cancer. **Cancer Research**, v. 75, n. 23, p. 5034–5045, 1 dez. 2015.
- PFANNENSTIEL, L. W. et al. Paclitaxel enhances early dendritic cell maturation and function through TLR4 signaling in mice. **Cellular Immunology**, v. 263, n. 1, p. 79–87, 2010.
- PRAT, J. Ovarian carcinomas: five distinct diseases with different origins, genetic alterations, and clinicopathological features. **Virchows Archiv: An International Journal of Pathology**, v. 460, n. 3, p. 237–249, mar. 2012.
- PRAT, J.; D'ANGELO, E.; ESPINOSA, I. Ovarian carcinomas: at least five different diseases with distinct histological features and molecular genetics. **Human Pathology**, v. 80, p. 11–27, out. 2018.
- PRAT, J.; OLAWAIYE, A.; BERMUDEZ, A. Ovary, fallopian tube, and primary peritoneal carcinoma. 2017.
- REITER, R. et al. Melatonin, a Full Service Anti-Cancer Agent: Inhibition of Initiation, Progression and Metastasis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 4, p. 843, 17 abr. 2017.
- REITER, R. J. Melatonin Relieves the Neural Oxidative Burden that Contributes to Dementias. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1035, n. 1, p. 179–196, 1 dez. 2004.
- ROBERTS, P. J.; DER, C. J. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. **Oncogene**, v. 26, n. 22, p. 3291–3310, maio 2007.
- SABIO, G.; DAVIS, R. J. TNF and MAP kinase signalling pathways. **Seminars in Immunology**, v. 26, n. 3, p. 237–245, jun. 2014.
- SAUER, L. A.; DAUCHY, R. T.; BLASK, D. E. Polyunsaturated fatty acids, melatonin, and cancer prevention. **Biochemical Pharmacology**, p. 8, 2001.
- SAVANT, S.; SRIRAMKUMAR, S.; O'HAGAN, H. The Role of Inflammation and Inflammatory Mediators in the Development, Progression, Metastasis, and Chemoresistance of Epithelial Ovarian Cancer. **Cancers**, v. 10, n. 8, p. 251, 30 jul. 2018.
- SCHINKEL, A. H. et al. Normal viability and altered pharmacokinetics in mice lacking *mdr1*-type (drug-transporting) P-glycoproteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 8, p. 4028–4033, 15 abr. 1997.

SCHULZE-OSTHOFF, K. et al. Regulation of NF- κ B Activation by MAP Kinase Cascades. **Immunobiology**, v. 198, n. 1, p. 35–49, 1 dez. 1997.

SEER. **Cancer Facts & Figures 2022**. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/ovarian-cancer>>.

SHARPE, A. H. et al. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. **Nature Immunology**, v. 8, n. 3, p. 239–245, mar. 2007.

SHEN, C.-J. et al. Melatonin Suppresses the Growth of Ovarian Cancer Cell Lines (OVCAR-429 and PA-1) and Potentiates the Effect of G1 Arrest by Targeting CDKs. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 2, p. 176, 29 jan. 2016.

SHERMAN-BAUST, C. A. et al. Gene expression and pathway analysis of ovarian cancer cells selected for resistance to cisplatin, paclitaxel, or doxorubicin. **Journal of Ovarian Research**, v. 4, p. 21, 5 dez. 2011.

SIEH, W. et al. Tubal ligation and risk of ovarian cancer subtypes: a pooled analysis of case-control studies. **International Journal of Epidemiology**, v. 42, n. 2, p. 579–589, 1 abr. 2013.

SILVER, D. L. et al. Activated signal transducer and activator of transcription (STAT) 3: localization in focal adhesions and function in ovarian cancer cell motility. **Cancer Research**, v. 64, n. 10, p. 3550–3558, 15 maio 2004.

SRINIVASAN, V. et al. Therapeutic Actions of Melatonin in Cancer: Possible Mechanisms. **Integrative Cancer Therapies**, v. 7, n. 3, p. 189–203, set. 2008.

STEVEN, A. et al. What turns CREB on? And off? And why does it matter? **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 77, n. 20, p. 4049–4067, out. 2020.

STEWART, C.; RALYEA, C.; LOCKWOOD, S. Ovarian Cancer: An Integrated Review. **Seminars in Oncology Nursing**, v. 35, n. 2, p. 151–156, abr. 2019.

STRATTON, J. F. et al. A systematic review and meta-analysis of family history and risk of ovarian cancer. **BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**, v. 105, n. 5, p. 493–499, 1998.

SZAJNIK, M. et al. TLR4 signaling induced by lipopolysaccharide or paclitaxel regulates tumor survival and chemoresistance in ovarian cancer. **Oncogene**, v. 28, n. 49, p. 4353–4363, dez. 2009.

TAUBE, J. M. Unleashing the immune system: PD-1 and PD-Ls in the pre-treatment tumor microenvironment and correlation with response to PD-1/PD-L1 blockade. **OncoImmunology**, v. 3, n. 11, p. e963413, 2 nov. 2014.

TUDREJ, P. et al. Characteristics of in vitro model systems for ovarian cancer studies. v. 15, n. 5, p. 246–259, 2019.

TUMEH, P. C. et al. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. **Nature**, v. 515, n. 7528, p. 568–571, 27 nov. 2014.

- VIVANCO, I.; SAWYERS, C. L. The phosphatidylinositol 3-Kinase–AKT pathway in human cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 7, p. 489–501, jul. 2002.
- WAGNER, M.; DUDLEY, A. C. A three-party alliance in solid tumors: Adipocytes, macrophages and vascular endothelial cells. **Adipocyte**, v. 2, n. 2, p. 67–73, abr. 2013.
- WALL, M. E. Camptothecin and taxol: Discovery to clinic. **Medicinal Research Reviews**, v. 18, n. 5, p. 299–314, 1998.
- WANG, J. et al. Simultaneous modulation of COX-2, p300, Akt, and Apaf-1 signaling by melatonin to inhibit proliferation and induce apoptosis in breast cancer cells: Melatonin modulates COX-2, p300, Akt, and Apaf-1. **Journal of Pineal Research**, v. 53, n. 1, p. 77–90, ago. 2012.
- WEBB, P. M.; JORDAN, S. J. Epidemiology of epithelial ovarian cancer. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 41, p. 3–14, maio 2017.
- WENTZENSEN, N. et al. Ovarian Cancer Risk Factors by Histologic Subtype: An Analysis From the Ovarian Cancer Cohort Consortium. **Journal of Clinical Oncology**, v. 34, n. 24, p. 2888–2898, 20 ago. 2016.
- WHO, W. H. O. **CANCER TODAY**. Disponível em: <<http://gco.iarc.fr/today/home>>. Acesso em: 13 set. 2021.
- YAKIREVICH, E. et al. Multidrug resistance-related phenotype and apoptosis-related protein expression in ovarian serous carcinomas. **Gynecologic Oncology**, v. 100, n. 1, p. 152–159, 1 jan. 2006.
- YU, H.; PARDOLL, D.; JOVE, R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 11, p. 798–809, nov. 2009.
- YUAN, T. L.; CANTLEY, L. C. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. **Oncogene**, v. 27, n. 41, p. 5497–5510, set. 2008.
- ZHANG, XIAOJIE et al. Expression and function of Toll-like receptors in peripheral blood mononuclear cells from patients with ovarian cancer. **Cancer Immunol Immunother**, v. 3, n. 64, p. 275–86, 2015.
- ZHAO, H. et al. Inflammation and tumor progression: signaling pathways and targeted intervention. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 6, p. 263, 12 jul. 2021.
- ZHU, Y. et al. Prognostic significance of MyD88 expression by human epithelial ovarian carcinoma cells. **Journal of Translational Medicine**, v. 10, n. 1, p. 77, 25 abr. 2012.
- ZUNINO, F. et al. Molecular mechanisms of resistance to taxanes and therapeutic implications. **Drug Resistance Updates: Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy**, v. 2, n. 6, p. 351–357, dez. 1999.