

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 31/12/2020.

FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Medicina de Botucatu

Gustavo Ferreira de Freitas

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE SISTÊMICA E
COMPARTIMENTALIZADA EM PACIENTES
PORTADORAS DE CÂNCER DE OVÁRIO**

Orientador: Agnaldo Lopes da Silva Filho

Co-orientadora: Andréa Teixeira de Carvalho

**Botucatu - SP
2014**

FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Medicina de Botucatu

AVALIAÇÃO DA RESPOTA IMUNE SISTÊMICA E COMPARTIMENTALIZADA EM PACIENTES PORTADORAS DE CÂNCER DE OVÁRIO

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia, Área de Concentração em Tocoginecologia, da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP para obtenção do Título de Doutor.

Aluno: Gustavo Ferreira de Freitas

Orientador: Prof. Dr. Agnaldo Lopes da Silva Filho

Co-orientadora: Dr^a. Andréa Teixeira de Carvalho

**Botucatu - SP
2014**

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

Freitas, Gustavo Ferreira de.

Avaliação da resposta imune sistêmica e compartimentalizada em pacientes portadoras de câncer de ovário / Gustavo Ferreira de Freitas. - Botucatu, 2014

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Agnaldo Lopes da Silva Filho

Coorientador: Andréa Teixeira de Carvalho

Capes: 40101150

1. Ovário - Câncer - Tratamento. 2. Câncer - Cirurgia. 3. Resposta imune
Citometria de fluxo. 4. Citometria de fluxo. 5. Reação em cadeia de polimerase.
6. Inflamação. 7. Quimioterapia.

Palavras-chave: Câncer epitelial de ovário; Citometria de fluxo; Cytometric Bead Array; RT-qPCR; Resposta inflamatória.

*“Quando se olha com o coração é como estar
olhando através do microscópio. Enxergamos
coisas tão pequenas e simples que com um pouco
de amor podem mudar nossas vidas”.*

PTraíman



Dedicatória

Dedico esta tese...

Aos meus avós paternos e maternos, João “In Memoriam” e Iris, José Gomes e Doralice, por estarem sempre ao meu lado apesar da distância.

Aos meus pais Luiz e Vera, pelo apoio, dedicação e amor incondicional.

A Elisa e a pequena Helena, por caminharem ao meu lado.



Agradecimento Especial

Ao Dr Agnaldo Lopes da Silva Filho pela oportunidade de trabalhar sob a sua orientação na realização dessa tese. Pelo privilégio de poder compartilhar sua sabedoria.

A Dra Andréa Teixeira de Carvalho, pelos ensinamentos em biologia molecular, imunologia e citometria, pela disponibilidade em orientar e acima de tudo pelo exemplo de pesquisadora.



Agradecimientos

Ao Dr. Olindo que abriu as portas do seu laboratório para realização deste trabalho.

A Dra Sálua e Dr. João Oscar, bem como toda sua equipe, pelo auxílio na triagem das pacientes e da coleta do material biológico.

Ao Dr. Agnaldo e toda sua equipe do Hospital das Clínicas da UFMG, pelo auxílio na triagem das pacientes e da coleta do material biológico.

Às pacientes cuja participação foi imprescindível para a realização deste trabalho.

A Cristina Martins, pela amizade e incentivo constante pela busca ao conhecimento.

Aos amigos do Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração pela rica convivência.

Ana Carolina, Danielle, Fernanda Freire, Márcio, Matheus, obrigado pela ajuda, incentivo e grata convivência.

Jordana Fradico e Bruno Marteleto pelo apoio técnico de qualidade.

A Jucélia, pelo auxílio com a parte burocrática.

Ao Abílio Manoel Batista Pinto pelo apoio, disponibilidade e capricho na diagramação e formatação da tese.

A Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro.

À Plataforma Tecnológica do Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde-PDTIS-FIOCRUZ pelo uso de suas instalações.

Aos colaboradores da Divisão Técnica de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Medicina de Botucatu da Unesp, pelo serviço de apoio a pesquisa disponibilizado.

Aos colaboradores do Setor de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu da Unesp, Regina, Janete, Vanessa Braite e Ana Cláudia, pela disponibilidade e preciosa ajuda.

Aos professores da Pós-graduação do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Botucatu da UNESP pelos ensinamentos. Em especial ao Professor Paulo Traïman, pelo constante incentivo e apoio durante esta trajetória.

À Dra. Rívia Lamaíta por ter me mostrado o caminho da pesquisa durante minha primeira iniciação científica.

Ao meu irmão Bruno e sobrinha Manuela, pela amizade e carinho.

Em especial aos meus pais, por dedicarem sua vida à minha formação intelectual e moral.

A Elisa por sempre estar ao meu lado. Esta conquista é nossa.

À querida Helena que está para chegar.

Finalmente, à minha família e amigos, por estarem presentes em todos os momentos, sempre torcendo pelo meu sucesso.



Sumário

Lista de Abreviaturas e Siglas.....	15
Resumo.....	17
Summary.....	20
1 Introdução.....	22
Referências bibliográficas.....	27
2 Objetivos.....	32
2.1 Objetivo geral.....	33
2.2 Objetivos específicos.....	33
3 Artigo – Cytokine and chemokine pattern in epithelial ovarian cancer - type I and type II.....	34
Abstract.....	35
1 Introduction.....	36
2 Patients, Material and methods.....	39
3 Results.....	47
4 Discussion.....	49
References	55
Figures legends.....	63
Tables.....	65
Figures.....	67
4 Considerações Finais.....	73
Anexos.....	75



Lista de Abreviaturas e Siglas

°C	grau Celsius
CA-125	cancer antigen 125
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CBA	cytometric bead array
CCL	(C-C motif) ligand
cDNA	complementary DNA
CEO	Câncer Epitelial de Ovário
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
C _t	threshold
CXCL	(C-X-C motif) ligand
DNA	deoxyribonucleic acid
EOC	Epithelial Ovarian Cancer
FIGO	International Federation of Gynecology and Obstetrics
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FL	Fluorescence
FSC	Forward Scatter
g	unidade de gravidade
IFNG	gene of interferon gamma
IFN γ	Interferon gamma
IL	Interleukin
min	minute
μ L	Microlitro
MoAb	monoclonal antibody
ng	nanograma

NTC	No template control
PCR	Polymerase Chain Reaction
PE	phycoerythrin
qPCR	quantitative real time PCR
r	correlation index
RNA	Ribonucleic acid
SSC	Side Scatter
TP53	tumor protein p53
μm	Micrometro
χ^2	chi-squared



Resumo

Resumo

O câncer epitelial de ovário representa um desafio para Oncologia Ginecológica, devido à sua natureza insidiosa e alta mortalidade. Há também uma compreensão limitada da etiologia da doença ao nível molecular, o que continua a dificultar o desenvolvimento de alvos terapêuticos. Estudos recentes de morfologia, imuno-histoquímica e de genética molecular têm levado ao desenvolvimento de um novo paradigma para a patogênese e a origem do câncer epitelial de ovário, baseado em um modelo dualista de carcinogênese que divide o câncer epitelial de ovário (CEO) em duas grandes categorias chamadas de tipos I e II. O objetivo deste estudo foi avaliar o padrão das citocinas e quimiocinas encontradas no tecido ovariano de mulheres saudáveis e mulheres com CEO tipo I e tipo II. Além disso, descrever a associação desses biomarcadores com os dados clínico-patológicos. Foram analisadas amostras de tecido ovariano e ascite obtidas de mulheres com CEO (n=26) e amostras de tecido ovariano e lavado peritoneal de mulheres sem evidências de malignidade (n=16 - grupo de controle). Nas amostras de tecido, a expressão gênica foi avaliada utilizando a metodologia de PCR quantitativo em tempo real (qPCR) para os genes *IFNG*, *IL-10*, *TGFB1*, *CCL2*, *CCL3*, *CCL5*, *CXCL8*, *CXCL9* e *CXCL10*. A detecção dos níveis de citocinas/quimiocinas nos fluidos peritoneais foi realizada através do método *Cytometric Bead Array* (CBA) os marcadores IL-12p70, TNF, IL-10, IL-6, IL-1- α , IL-8, IL-17A, IFN- γ , IL-4, IL-2, CCL2, CCL5, CXCL-9 e CXCL-10. No grupo das pacientes com CEO, 10 (38,5%) apresentavam estágios I/II e 16 (61,5%) estágios III/IV. Com relação ao tipo de tumor, de acordo com a nova classificação, 8 (30,8%) eram do tipo I e 18 (69,2 %) do tipo II. A citorredução ótima foi obtida em 15 (57,7%) das mulheres com CEO. Mulheres com CEO tipo II apresentaram maiores níveis séricos do marcador CA-125 quando comparado às do tipo I. Não houve óbito no grupo das mulheres com tumor do tipo I, enquanto no grupo das mulheres com tumor tipo II seis (33,3%) foram a óbito. Foi detectado o aumento da expressão gênica no grupo das mulheres com CEO tipo II quando comparado com o tipo I, para os genes *IL-10*, *CXCL8* e *CXCL9*. Houve uma diminuição na expressão de *TGFB1*, *CCL2* e *CXCL10* no grupo de mulheres com CEO tipo II quando comparado ao tipo I. Dentre os genes estudados, não houve diferença com relação os parâmetros clínicos: citorredução cirúrgica (ótima ou subótima) e o marcador CA-125 (<600 U/mL ou >600 U/mL). Nossos resultados suportam a hipótese de que existe uma interferência intercelular entre as células do CEO e o infiltrado de células do sistema imunológico, sugerindo um microambiente imunológico mais supressivo no CEO tipo I, quando comparado com CEO tipo II.

Palavras-chave: expressão genética, câncer de ovário, tumor, citocinas, quimiocinas



Summary

Summary

The epithelial ovarian cancer represents a challenge to Gynecologic Oncology due to its insidious nature and high mortality. There is also a limited understanding of disease etiology at the molecular level, which continues to hamper targeted therapeutic development. Recent morphological, immunohistochemical, and molecular genetic studies have led to the development of a new paradigm for the pathogenesis and origin of epithelial ovarian cancer based on a dualistic model of carcinogenesis that divides epithelial ovarian cancer into 2 broad categories designated types I and II. The aim of this study was to evaluate the cytokines and chemokines pattern in ovarian tissue from healthy women and women with EOC type I and type II. Also, we described the association of these biomarkers with the clinicopathological data. Samples of ovarian tissue and ascite obtained from women with EOC (n=26), samples of ovarian tissue and peritoneal wash from women with no evidence of malignancy were analyzed (n=16 – control group). In the tissue samples, gene expression were evaluated by quantitative real time PCR (qPCR) *IFNG*, *IL-10*, *TGFB1*, *CCL2*, *CCL3*, *CCL5*, *CXCL8*, *CXCL9* and *CXCL10*. The detection of cytokine/chemokine levels in peritoneal fluids was measured by cytometric bead array immunoassay (CBA), IL-12p70, TNF, IL-10, IL-6, IL-1- α , IL-8, IL-17A, IFN- γ , IL-4, IL-2, CCL2, CCL5, CXCL-9 and CXCL-10. In the group of women with EOC, 10 (38.5 %) had stage I/II and 16 (61.5 %) were stage III/IV. Concerning tumor type, according to the new classification, 8 (30.8 %) were type I and type II were 18 (69.2 %). Optimal cytoreduction was achieved in 15 (57.7 %) women with EOC. The CA-125 showed higher serum levels in patients with EOC type II compared to type I. There were no deaths in women with type I tumor while 6 (33.3 %) of patients with type II tumor died. Increased expression of IL-10, CXCL8 and CXCL9 genes in the group of women with type II EOC was detected as compared to type I. In contrast, there was a decrease in the gene expression of *TGFB1*, *CCL2* and *CXCL10* in the group of women with EOC type II when compared to type I. Among the genes studied there was no association between them and clinical parameters: surgical cytoreduction (optimal or suboptimal) and CA-125 serum marker (<600 U/mL or >600U/mL). Our results support the hypothesis that an intercellular crosstalk between the cells of EOC and infiltrating immune cells suggesting a more suppressive immune microenvironment in EOC type I when compared with EOC type II.

Keywords: gene expression, ovarian cancer, tumor, cytokines, chemokines



1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer Epitelial de ovário

O câncer epitelial do ovário (CEO) representa um desafio à Oncologia Ginecológica devido ao seu caráter insidioso e à sua alta letalidade [1]. Para o ano de 2014, são estimados 21.980 novos casos e 14.270 mortes em mulheres americanas [2]. No Brasil configura-se como o oitavo tumor ginecológico mais comum, porém o de maior letalidade. Estudos mais recentes apontam a incidência de 5.680 novos casos para o ano de 2014 e a ocorrência de 3.027 mortes no ano de 2011 [3]. A sintomatologia inespecífica e a falta de métodos propedêuticos de rastreamento dificultam o diagnóstico precoce dessa neoplasia [4, 5].

Aproximadamente 2/3 dos casos são diagnosticados nos estádios III e IV, com uma sobrevida em cinco anos variando de 10 a 20%, principalmente pela ausência de métodos de rastreamento e diagnóstico inadequados, tendo os exames de imagem como a ultrassonografia, a tomografia computadorizada e a ressonância nuclear magnética, associadas aos marcadores séricos como o CA-125, baixos valores de predição [6]. Embora o CEO possa ocorrer em qualquer idade, é mais comum em mulheres com mais de 50 anos. O tratamento convencional inclui citorredução cirúrgica seguida de quimioterapia, quando indicada [7].

Citam-se como fatores de risco importantes para o desenvolvimento do câncer de ovário, não relacionados a alterações genéticas, a idade, a menarca precoce, a menopausa tardia, a obesidade e a síndrome dos ovários policísticos. Inibidores da ovulação, como as anticoncepcionais têm um efeito protetor [8]. As manifestações clínicas do câncer de ovário são em sua maioria inespecíficas e variam desde desconforto abdominal com mudanças do hábito intestinal, com anorexia e perda ponderal até o encontro de grande massa no abdome e distensão por ascite nos estágios avançados [9].

O CEO é uma doença heterogênea composta por diferentes tipos de tumores com uma grande variedade de características e comportamentos clínico patológicos [10]. Estudos de morfologia, imunohistoquímica e genética molecular têm levado ao desenvolvimento de um novo paradigma para a patogênese e origem do CEO baseado em um modelo dualista de carcinogênese que divide o CEO em duas grandes categorias designadas tipo I e II. Os tumores tipo I são de baixo grau, geralmente não causam dor e são detectados nos estádios iniciais da doença. Os tumores tipo I possuem maior estabilidade genética e raramente apresentam mutações em TP53, sendo caracterizados por mutações específicas, incluindo KRAS, BRAF, ERBB2, CTNNB1, PTEN, PIK3CA, ARID1A e PPP2R1A. Os tumores do tipo II são mais agressivos e de alto grau, sendo geralmente diagnosticados em estádios avançados, estes tumores apresentam alta frequência de mutações em TP53, mas raramente abrigam as mutações encontradas nos tumores tipo I [11-15].

Um dos sintomas clínicos no CEO é o aumento da circunferência abdominal devido à ascite [16-18]. A ascite surge a partir da desregulação da função endotelial, levando ao aumento da permeabilidade dos vasos peritoneais [19]. Em condições fisiológicas, a permeabilidade vascular é mediada estritamente pela abertura e fechamento das junções célula-célula [20-22]. Por este motivo, qualquer alteração na organização destas junções, podem resultar numa desregulação da função vascular levando a condições patológicas devido as modificações da parede dos vasos [23]. Nas pacientes com CEO, a ascite pode ser evidenciada devido ao aumento da permeabilidade vascular.

O câncer de ovário apresenta alto potencial inflamatório, evidenciado pela presença de infiltrados linfocitários (TILs) no seu microambiente, os quais se relacionam diretamente à sobrevida das pacientes. O fluxo e as atividades destes infiltrados linfocitários são mediados por citocinas, sendo estas um reflexo do estado imunológico do hospedeiro, podendo servir como meio de se entender a resposta imune

O CEO é um tumor imunogênico, que apresenta linfócitos infiltrantes de tumores (TIL), que cria um microambiente supressor imunitário para escapar da eliminação do sistema imune.

Epithelial ovarian cancer is an immunogenic tumor, as indicated by the presence of tumor infiltrating lymphocytes (TIL), which creates an immune suppressive microenvironment in order to escape from the immune elimination[24].

The clinical outcome of EOC is strongly dependent on the immune response, which is critically dependent on macrophages, the most prevalent immune cell within the EOC microenvironment [25, 26]. The ability of expansion of ovarian malignant tumors requires the collaboration between malignant and stromal cells via cellular interactions. Therefore, malignant cells and subsidiary stromal cells communicate and exchange information by direct cell-to-cell contacts as well as the release of signaling molecules, such as soluble factors [27, 28].

Cytokines are small polypeptides released from cells to regulate the activities of other cells via interactions with specific cytokine receptors expressed on their surface [29]. At least 16 different cytokines are expressed in normal ovaries, along with many of the corresponding receptors [30]. In ovarian cancer there is increased expression of particular cytokines and/or receptors [31]. These act to enhance key phenotypes associated with tumor progression, such as proliferation, migration and survival, including chemo-resistance [32]. This can be due to direct effects on the cancer cells themselves, or via indirect effects on components of the immune system.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Silva-Filho, A.L.d., et al., *Cirurgia não ginecológica em pacientes com câncer de ovário*. Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia, 2004. 26: p. 411-416.
 2. Siegel, R., et al., *Cancer statistics, 2014*. CA Cancer J Clin, 2014. 64(1): p. 9-29.
 3. INCA, *Estimativa de câncer no Brasil, 2013*, Ministério da Saúde: BRASIL.
 4. Look, K.Y., *Epidemiology, etiology, and screening of ovarian cancer*, in *Ovarian Cancer*, S.C. Rubin and G.P. Sutton, Editors. 2001, Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia. p. 167-180.
 5. Reis, F.M., et al., *Biochemical markers of ovarian cancer: diagnostic and prognostic value*. Italian Journal of Gynaecology & Obstetrics, 2004. 16(3): p. 94-99.
 6. Brewer, M.A., et al., *Prevention of ovarian cancer: intraepithelial neoplasia*. Clin Cancer Res, 2003. 9(1): p. 20-30.
 7. Roett, M.A. and P. Evans, *Ovarian cancer: an overview*. Am Fam Physician, 2009. 80(6): p. 609-16.
 8. George, S.H. and P. Shaw, *BRCA and Early Events in the Development of Serous Ovarian Cancer*. Front Oncol, 2014. 4: p. 5.
-

9. Burges, A. and B. Schmalfeldt, *Ovarian cancer: diagnosis and treatment*. Dtsch Arztebl Int, 2011. 108(38): p. 635-41.
 10. Kurman, R.J. and M. Shih le, *The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer: a proposed unifying theory*. Am J Surg Pathol, 2010. 34(3): p. 433-43.
 11. Shih le, M. and R.J. Kurman, *Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis*. Am J Pathol, 2004. 164(5): p. 1511-8.
 12. Jones, S., et al., *Frequent mutations of chromatin remodeling gene ARID1A in ovarian clear cell carcinoma*. Science, 2010. 330(6001): p. 228-31.
 13. Wiegand, K.C., et al., *ARID1A mutations in endometriosis-associated ovarian carcinomas*. N Engl J Med, 2010. 363(16): p. 1532-43.
 14. Samartzis, E.P., et al., *ARID1A mutations and PI3K/AKT pathway alterations in endometriosis and endometriosis-associated ovarian carcinomas*. Int J Mol Sci, 2013. 14(9): p. 18824-49.
 15. Kurman, R.J. and M. Shih le, *Molecular pathogenesis and extraovarian origin of epithelial ovarian cancer--shifting the paradigm*. Hum Pathol, 2011. 42(7): p. 918-31.
-

16. Ayantunde, A.A. and S.L. Parsons, *Pattern and prognostic factors in patients with malignant ascites: a retrospective study*. Ann Oncol, 2007. 18(5): p. 945-9.
 17. Ayhan, A., et al., *Is there a correlation between tumor marker panel and tumor size and histopathology in well staged patients with borderline ovarian tumors?* Acta Obstet Gynecol Scand, 2007. 86(4): p. 484-90.
 18. Cheng, M.H., et al., *Differential diagnosis of gynecologic organ-related diseases in women presenting with ascites*. Taiwan J Obstet Gynecol, 2008. 47(4): p. 384-90.
 19. Garrison, R.N., et al., *Malignant ascites. Clinical and experimental observations*. Ann Surg, 1986. 203(6): p. 644-51.
 20. Dejana, E., *Endothelial cell-cell junctions: happy together*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. 5(4): p. 261-70.
 21. Bazzoni, G. and E. Dejana, *Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis*. Physiol Rev, 2004. 84(3): p. 869-901.
 22. Walz, A., et al., *Effects of luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin on corpus luteum cells in a spheroid cell culture system*. Mol Reprod Dev, 2005. 72(1): p. 98-104.
-

23. Herr, D., et al., *Human chorionic gonadotropin controls luteal vascular permeability via vascular endothelial growth factor by down-regulation of a cascade of adhesion proteins*. Fertil Steril, 2013. 99(6): p. 1749-58.
 24. Yigit, R., et al., *Cytokine analysis as a tool to understand tumour-host interaction in ovarian cancer*. Eur J Cancer, 2011. 47(12): p. 1883-9.
 25. Zhang, L., et al., *Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer*. N Engl J Med, 2003. 348(3): p. 203-13.
 26. Kumar, J. and A.C. Ward, *Role of the interleukin 6 receptor family in epithelial ovarian cancer and its clinical implications*. Biochim Biophys Acta, 2014.
 27. Yellapa, A., et al., *Interleukin 16 expression changes in association with ovarian malignant transformation*. Am J Obstet Gynecol, 2013.
 28. Dong, Y.L., et al., *CXCR2-Driven Ovarian Cancer Progression Involves Upregulation of Proinflammatory Chemokines by Potentiating NF-kappaB Activation via EGFR-Transactivated Akt Signaling*. PLoS One, 2013. 8(12): p. e83789.
 29. Leonard, W.J. and J.X. Lin, *Cytokine receptor signaling pathways*. J Allergy Clin Immunol, 2000. 105(5): p. 877-88.
 30. Burke, F., et al., *A cytokine profile of normal and malignant ovary*. Cytokine, 1996. 8(7): p. 578-85.
-

31. Nash, M.A., et al., *The role of cytokines in both the normal and malignant ovary*. Endocr Relat Cancer, 1999. 6(1): p. 93-107.
32. Shield, K., et al., *Alpha2beta1 integrin affects metastatic potential of ovarian carcinoma spheroids by supporting disaggregation and proteolysis*. J Carcinog, 2007. 6: p. 11.

4. Considerações Finais

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo da resposta imune sistêmica e compartimentalizada em pacientes portadoras de câncer de ovário associados aos genes *IFNG*, *CCL2*, *CCL3*, *CXCL8*, *CXCL9*, *CXCL10*, *IL10*, *CCL5*, *TGFB1* e citocinas e quimiocinas *IL-1-β*, *IL-6*, *IL-10*, *TNF*, *IL-12p70*; *IL-2*, *IL-4*, *IFN-γ*, *IL-17A*, *CXCL8*, *CXCL9*, *CXCL10*, *CCL5* e *CCL2* permite concluir que:

- ✓ Foi detectado o aumento da expressão gênica no grupo das mulheres com CEO tipo II quando comparado com o tipo I, para os genes *IL-10*, *CXCL8* e *CXCL9*. Houve uma diminuição na expressão de *TGFB1*, *CCL2* e *CXCL10* no grupo de mulheres com CEO tipo II quando comparado ao tipo I. Os resultados suportam a hipótese de que existe uma interferência intercelular entre as células do CEO e o infiltrado de células do sistema imunológico, sugerindo um microambiente imunológico mais supressivo no CEO tipo I, quando comparado com CEO tipo II.
 - ✓ Com a metodologia de análise proposta, não foi possível detectar níveis mínimos necessários de citocinas e quimiocinas no líquido ascítico ou lavado peritoneal em um número suficiente de casos para realização da análise estatística.
 - ✓ Não houve diferença significativa com relação aos níveis de expressão gênica associados aos níveis séricos de CA-125, citorredução ótima, estadiamento e mortalidade em mulheres com CEO tipo I quando comparadas com tipo II.
-

- ✓ Enquanto no tumor do tipo I as correlações existentes entre *TGFB1*, *CCL-2* e *CXCL-10* são negativas, no tumor do tipo 2 elas são fortes e positivas e embora envolvam também a participação de *CCL-2*, as interações com essa quimiocinas ocorrem com *IL-10* e *CXCL-9*. Há ainda uma correlação positiva entre duas quimiocinas responsáveis pelo recrutamento de células com potencial pró-inflamatório (*CCL-5* e *CCL-3*). Essa interação pode estar contribuindo para um desfecho clínico mais grave da patologia. De forma geral, podemos dizer que as redes do tumor do tipo I e tipo II reforçam a existência de duas entidades clínicas distintas.
-