



**PADRONIZAÇÃO DOS ENSAIOS PARA CARACTERIZAÇÃO DA  
POPULAÇÃO CELULAR PRESENTE NO LÍQUIDO ASCÍTICO DE  
PACIENTES COM CÂNCER EPITELIAL DE OVÁRIO ATENDIDAS NO  
SERVIÇO DE GINECOLOGIA ONCOLÓGICA DO HOSPITAL DAS  
CLÍNICAS/UFMG**

*STANDARDIZATION OF ASSAYS FOR CELLULAR POPULATION  
CHARACTERIZATION PRESENTS IN THE ASCITIC FLUID OF PATIENTS WITH  
OVARIAN EPITHELIAL CANCER SERVED AT THE ONCOLOGICAL GYNECOLOGY  
SERVICE OF HOSPITAL DAS CLÍNICAS/UFMG*

Bárbara Raphaella Santos Lopes ALVES<sup>1</sup>, Luciana Maria SILVA<sup>2</sup>, Milene Pereira MOREIRA<sup>3</sup>, Agnaldo Lopes da SILVA FILHO<sup>4</sup>, Eduardo Batista CÂNDIDO<sup>5</sup>,  
Letícia da Conceição BRAGA<sup>6</sup>

**RESUMO**

O câncer de ovário (CO) é a quinta maior causa de mortes de mulheres, por câncer, na América do Norte. No Brasil, segundo o INCA (Instituto Nacional do Câncer), a estimativa é de 6.150 novos casos para esse ano. Uma das dificuldades apresentadas no tratamento é a presença de ascite, normalmente associada a metástases e à doença refratária, o que é um sinal de mal prognóstico. O objetivo deste estudo foi padronizar métodos para isolar, cultivar e caracterizar subpopulações celulares presentes em amostras do líquido ascítico de pacientes com câncer de epitelial de ovário, atendidas no Serviço de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas/UFMG (HC-UFMG), como modelo para estudar mecanismos relacionados a quimioresistência e proliferação tumoral. Três pacientes foram incluídas no estudo e a análise microscópica mostrou grande quantidade e variabilidade celular. O cultivo primário das amostras foi estabelecido, com crescimento confluyente das células no 5º dia. Diferentes ensaios foram realizados na tentativa de caracterizar essas células. O ensaio de imunofluorescência avaliou a presença das moléculas E/P caderina nestas células, que mostrou um resultado negativo, o que é indicativo da passagem das células para um fenótipo metastático ou indicativo da predominância de fibroblastos na placa. O citoesqueleto e núcleo celular também foram marcados para verificar preservação da morfologia dessas estruturas, que revelou núcleos e citoesqueletos irregulares e presença de células binucleadas. A avaliação da expressão de imunomarcadores relacionados às vias de transição epitélio mesenquimal e pluripotência, nas amostras de líquido ascítico das pacientes com CEO, por citometria de fluxo, não foi concluída, pois as células presentes nessas amostras não resistiram ao pré-preparo necessário para este ensaio e mostraram-se aglomeradas, o que impossibilitou a contagem. Estudos estão em andamento para otimização dos ensaios necessários para a caracterização fenotípica e imunofenotípica desse tipo de amostra.

**Palavras-chave:** Líquido ascítico; câncer epitelial de ovário; cultivo primário; imunofluorescência; imunofenotipagem por citometria de fluxo.

<sup>1</sup>Graduanda em Biomedicina pelo Centro Universitário Metodista Izabela Hendrix, Serviço de Biologia Celular da Diretoria de Pesquisa e Desenvolvimento da Fundação Ezequiel Dias.



bbraphaellass28@gmail.com

<sup>2</sup>Bióloga pela Puc-Minas, mestre em Ciência Técnicas Nucleares e doutora em Biologia Celular pela Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG. Atualmente é chefe do Serviço de Biologia Celular da Diretoria de Pesquisa e Desenvolvimento da Fundação Ezequiel Dias e credenciada como docente no programa de pós-graduação em genética do ICB/UFMG. [luciana.silva@funed.mg.gov.br](mailto:luciana.silva@funed.mg.gov.br)

<sup>3</sup>Bióloga pelo Centro Universitário UNA (MG), Mestra e Doutora em Patologia pela Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais. [mipmoreira@gmail.com](mailto:mipmoreira@gmail.com)

<sup>4</sup>Graduado em Medicina pela UFMG, Residência Médica em Cirurgia Geral e do Trauma na Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais e em Ginecologia e Obstetrícia no Hospital das Clínicas da UFMG, Doutorado em Ginecologia e Obstetrícia e Mastologia pela Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP e Pós-Doutoramento pela Universidade do Porto – Portugal. [candidoeb@gmail.com](mailto:candidoeb@gmail.com)

<sup>5</sup>Graduado em Medicina pela UFMG, Residência Médica em Ginecologia e Obstetrícia, Especialização em Oncologia Ginecológica e Residência Médica em Endoscopia Ginecológica pelo Hospital das Clínicas – UFMG. Mestre em Ginecologia pela Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP. Doutor em Saúde da Mulher pela UFMG. Atualmente é Professor Adjunto do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia pela UFMG. [agnaldo.ufmg@gmail.com](mailto:agnaldo.ufmg@gmail.com)

<sup>6</sup>Bióloga, Doutora em Ciências da Saúde pela Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP e mestre em Genética pela UFMG. Pós-Doutora em Saúde da Mulher pela UFMG. Atualmente é pesquisadora visitante do Serviço de Biologia Celular da Funed e docente do Centro Universitário Metodista Izabela Hendrix. [braga.ltc@gmail.com](mailto:braga.ltc@gmail.com)

## ABSTRACT

Ovarian cancer (OC) is the fifth cause of cancer deaths in North America. In Brazil, 6,150 new cases are estimated for this year according to INCA. One of the difficulties in OC treatment is the refractory disease, wherein the patients present disease progression and ascites. Ascites is associate to intraperitoneal metastasis and/or distant metastasis as results conditions patients normally have bad clinical outcome and poor prognosis. This study aimed standardize methods for isolate, culture and characterize subpopulations present in ascites from Epithelial Ovarian Cancer patients, as study model of tumor proliferation and resistance mechanisms. The samples of ascitic fluid were collected from three patients attended at the Gynecology Oncology Service of Hospital das Clínicas/UFMG (HC-UFMG). The primary cell culture was established, with confluent grow in fifth day. Many assays were done to attempt cell characterization. The immunofluorescence assay evaluated the E/P cadherin presence. The results showed negative expression of these molecules, which could mean passage of the cells through the epithelial-mesenchymal (EMT) transition process, phenomenon that contributes to the metastatic phenotype, or indicate fibroblast presence. In addition, the cytoskeleton and cell nucleus were marked to verify morphology preservation of these structures, which revealed an irregular cell nucleus and cytoskeleton and binuclear cells. The expression of imunomarkers related to the mesenchymal epithelial transition pathways and pluripotency in ascites samples of CEO patients by flow cytometry could not be done, because procedures and counting necessities to this assay were prevented by formation of cell pellets. Studies are in progress to optimize assays for phenotype and immunophenotype characterization of this type of sample.

**Keywords:** Ascitic fluid; ovarian epithelial cancer; primary culture; immunofluorescence; immunophenotyping by flow cytometry



## INTRODUÇÃO

O câncer de ovário (CO) é a quinta maior causa de mortes por câncer, em mulheres, na América do Norte, e no ano de 2012, foram estimados 238.700 novos casos e 151.900 mortes por câncer de ovário em todo o mundo. Para 2018, estima-se que haverá aproximadamente 22.240 novos casos diagnosticados e 14.070 mortes por câncer de ovário, nos EUA, de acordo com a Global Cancer. No Brasil, segundo o INCA (Instituto Nacional do Câncer), a estimativa 2018/2019 é de 6.150 novos casos.

A doença é silenciosa, somente apresenta sintomas em fases avançadas (estágios III e IV) e com isso é pouco detectada em estágios iniciais (I e II). Além disso, a detecção tardia também se dá devido a inexistência de um marcador totalmente eficaz para detecção precoce da mesma, reduzindo assim, as chances de êxito no tratamento. Diante destes fatores, a taxa de sobrevivência relativa de 5 anos das pacientes é de menos de 50% (REID *et al.*, 2017). O marcador CA-125, também conhecido como MUC 16, tem se mostrado o mais sensível em relação ao CO e tem sido o mais utilizado (VALENTE, 2011).

CO representa um grupo heterogêneo de neoplasias classificadas e sub-classificadas de acordo com o tipo histológico e grau de diferenciação do tumor (CHO; SHIH, 2009). O câncer epitelial de ovário (CEO) é o subtipo predominante. Com base em estudos morfológicos, moleculares e genéticos recentemente foi proposto um modelo que agrupa o CEO em duas categorias: tipo I e tipo II (KURMAN; SHIH, 2008). Incluídos na categoria tipo I estão os tumores que tem seu desenvolvimento restrito aos ovários, são mais indolentes e possuem diferentes graus de atipia: carcinomas serosos de baixo grau, endometrióides de baixo grau, mucinosos e de células claras. Estes se geralmente se encontram associados às mutações nos genes *KRAS*, *BRAF*, *PTEN*, *PIK3CA*, *CTNNB1*, *ARID1A* e *PPP2R1A* e são responsáveis por 10% da taxa de mortalidade por CEO. A categoria tipo II é composta por tumores mais agressivos, de difícil diagnóstico e consequentemente mais letais: carcinomas serosos de alto grau, endometrióides de alto grau, indiferenciados. Pode-se dizer que 80% destes estão relacionados com mutações do gene *TP53*, que é um gene supressor tumoral (KURMAN; SHIH, 2008).

Apesar que, a maioria das pacientes apresenta remissão completa da doença após a cirurgia citorrredutora e quimioterapia a base de platina e taxanos, normalmente observa-se recidiva nos primeiros dois anos após o tratamento. A presença de ascite nas pacientes



com CEO pode estar contribuindo para a recidiva da doença. A ascite é caracterizada como o acúmulo de um líquido com alto teor de proteínas séricas e leucócitos (exsudato), na cavidade abdominal. Esse problema atinge cerca de 10% das pacientes e a principal causa desse acúmulo seria um processo inflamatório gerado pelo extravasamento de líquido e células malignas do tumor para a cavidade abdominal. Dados da literatura demonstram a importância da relação entre o influxo de células inflamatórias e o crescimento tumoral bem como a presença de infiltrado inflamatório (macrófagos e polimorfonucleares) no estroma e na periferia de tecidos neoplásicos, como fator prognóstico, reforçando relação entre presença de ascite e metástase intraperitoneal e/ou metástases distância (MEUNIER *et al.*, 2010; SAAD-HOSSNE, 2003).

A triagem inicial de um paciente com possível ascite deve incluir seu histórico, avaliação física e paracentese abdominal, que é o método utilizado para a coleta do líquido ascítico. A paracentese abdominal, normalmente realizada no quadrante inferior esquerdo do abdômem, permite que sejam realizadas análises citológicas e bioquímicas do líquido ascítico e se apresenta como a forma mais eficiente para confirmar ou diagnosticar a presença de ascite, sua causa e determinar uma possível infecção (JÚNIOR *et al.*, 2009).

Sendo assim, o estudo desta doença utilizando um modelo que possivelmente abrange a pluralidade celular e correlaciona as características clínicas, patológicas e moleculares do CO, como o líquido ascítico, poderá esclarecer mecanismos relacionados à fenômenos de transição epitélio-mesenquimal (EMT), pluripotência, resistência aos fármacos utilizados no tratamento e capacidade de regeneração do tumor após a terapia (KAR *et al.*, 2017).

O objetivo deste estudo foi padronizar técnicas para a caracterização das populações celulares presentes em amostras do líquido ascítico de pacientes com CEO atendidas no Serviço de Ginecologia Oncológica do Hospital das Clínicas/UFMG (HC-UFMG).

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Este trabalho foi realizado no Serviço de Biologia Celular da Fundação Ezequiel Dias, sob responsabilidade da Dra. Luciana Maria Silva, nos meses de abril à outubro de 2018. As amostras biológicas utilizadas, foram coletadas de três pacientes atendidas, entre os anos de 2008 e 2011, no Serviço de Ginecologia Oncológica do HC-UFMG, sob a



responsabilidade dos Professores Dr. Agnaldo Lopes da Silva Filho e Eduardo Batista Cândido.

Este protocolo de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos da UFMG (COEP-UFMG) Parecer nº 0326/2008. As três pacientes incluídas no estudo, tinham idade acima de 18 anos, apresentavam diagnóstico de CEO metastático com proposta de tratamento cirúrgico ou quimioterápico, não apresentavam evidência de algum processo infeccioso agudo peritoneal, história de uso de imunossuppressores, corticosteroides e/ou anti-inflamatórios não esteroides há pelo menos três meses e concordaram através do termo de consentimento livre e esclarecido em participar do estudo.

A participação na pesquisa não implicou modificações no tratamento proposto às pacientes, uma vez que apenas foram coletadas amostras de líquido ascítico. Os riscos do estudo proposto são aqueles inerentes ao procedimento cirúrgico primário, sem riscos adicionais às pacientes. O seu maior benefício seria a possibilidade de expandir os conhecimentos sobre a população celular presente na ascite neoplásica, relacionando-a com os dados clínicos das pacientes acometidas pelo CEO.

### **Processamento das amostras**

As amostras foram processadas de acordo com procedimento operacional padrão do laboratório. Foi realizado um cálculo para que a concentração final do DMSO no tubo com a amostra para congelação fosse de 6% do volume total. Considerando que, a adição do DMSO à suspensão, gera calor, foi necessário adicionar o DMSO em meio de cultura sem suplementação antes de adicioná-lo ao líquido ascítico. Após serem processadas, as amostras foram submetidas à um congelamento rápido utilizando nitrogênio líquido e armazenadas à -80°C.

### **Citologia oncótica**

As lâminas foram realizadas de acordo com Caputo (2010). O líquido ascítico foi descongelado em banho-maria à 37°C e em seguida centrifugado à 1.500 rpm por 5 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi parcialmente descartado e com o auxílio de uma pipeta, o sedimento foi depositado na parte central superior de uma lâmina



limpa e desengordurada e prosseguiu-se com o arraste do líquido até a outra extremidade utilizando uma esfregadeira (esfregaço). A lâmina foi deixada em repouso na posição horizontal para secar naturalmente e em seguida foi realizada a fixação com metanol. A lâmina foi corada com Giemsa e posteriormente analisada.

### **Cultivo das células presentes no líquido ascítico**

O cultivo das células presentes no líquido ascítico foi realizado de acordo com Kar e colaboradores (2017), modificado. O líquido ascítico foi centrifugado à 1500 rpm, durante 5 min e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi resuspenso em 10 ml de meio DMEM alta glicose, suplementado 10% de soro bovino fetal e 1% de antibiótico (estreptomicina e anfotericina B) e adicionado com o auxílio de uma pipeta à frascos de cultura T75. O número de frascos colocados em cultura aumentada, dependia da quantidade de líquido ascítico recebido. Os frascos de cultura foram mantidos com “tampa meia rosca” em uma câmara humidificada com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> à 37° até obter adesão e crescimento celular confluyente. Para a troca de meio, o meio já contido dentro do frasco de cultura foi removido com o auxílio de uma pipeta e foram adicionados 10 mL de meio novo.

### **Ensaio de imunofluorescência**

O perfil dos marcadores E-caderina e P-caderina foi avaliado nas células do líquido ascítico que estavam em cultura, utilizando os anticorpos primários: anti E-Caderina cat.610182 (BD Biosciences), anti P-caderina cat.610228 (BD Biosciences). As células foram semeadas em microplaca de 8 poços. Após 24 horas, com visualização das células aderidas à placa, o meio de cultura foi sutilmente aspirado em cada poço, as células foram lavadas com PBS 1X e fixadas com formaldeído 4% à temperatura ambiente. Após a fixação, as células foram permeabilizadas com Triton X-100 0,1% em PBS, por 10 minutos. Em seguida, todos os poços foram lavados novamente com PBS 1x por 3 vezes e incubados com tampão de bloqueio (10% de SFB, 1% BSA em PBS) por 60 minutos. Após esse período, as células de dois dos poços foram incubadas com o anticorpo primário E/P caderina diluído em tampão de bloqueio na concentração final de 5 µg, por 45 minutos. Células de um terceiro poço foram incubadas com a faloidina ALEXA FLUOR 488 cat. # A12379 (Molecular Probes) para marcação do citoesqueleto. Os poços foram lavados com PBS 1x por 3 vezes. Em seguida, aplicou-se o anticorpo secundário



anti-IgG mouse conjugado com FITC cat. F5262 (SIGMA<sup>®</sup>) nos poços incubados com os anticorpos primários para E/P caderina. Após 1 hora de incubação, os poços foram lavados 3 vezes com PBS 1X e os núcleos das células marcados com DAPI (4', 6 – Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride) por 5 minutos. Novamente, os poços foram lavados com PBS 1X por 3 vezes. As marcações foram analisadas no microscópio de fluorescência da Carl Zeiss (Axiovert 200M), utilizando o programa Carl Zeiss AxioVision Rel. 4.8.2.

### **Pré-preparo da amostra para o ensaio de imunofenotipagem**

Para o ensaio de imunofenotipagem, por citometria de fluxo, os anticorpos CD34, CD45, CD14, CD90, CD19, CD117, e CD14 foram selecionados, pois estes são marcadores que melhor poderiam auxiliar na caracterização das células para os mecanismos tumorais de interesse como: transição epitélio-mesenquimal (EMT), pluripotência, resistência aos fármacos utilizados no tratamento e capacidade de regeneração do tumor em pacientes com CEO e presença de ascite.

Para realização deste ensaio, as amostras foram descongeladas em banho-maria à 37°C e centrifugada à 1500 rpm durante 5 minutos. Em seguida, após à centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido em 5 mL de PBS 1X juntamente com 1mL de tampão de lise de hemácias. As células foram contadas em câmara de Neubauer, utilizando a solução de azul de tripan na proporção de 150 µL:50 µL de amostra.

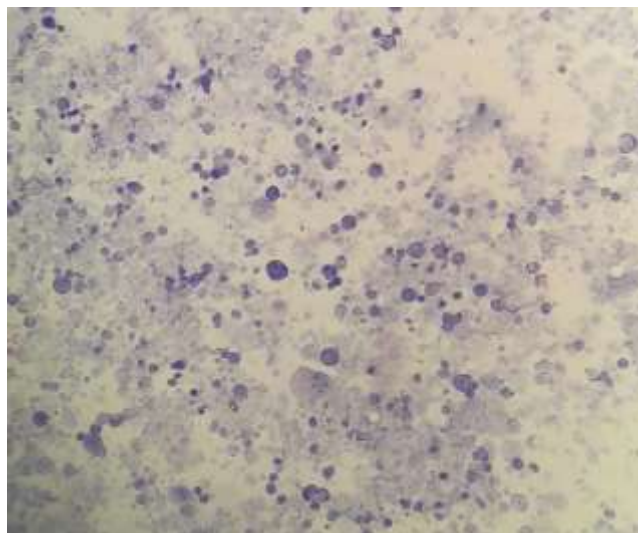
## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Análise das lâminas de citologia oncótica**

A citologia oncótica caracteriza-se pela análise microscópica de células independente da sua origem. As amostras líquidas, são as que possuem maior diversidade de procedimentos. O citodiagnóstico dá ênfase na aparência geral das células e seus núcleos. Em relação ao citoplasma, as características gerais mais importantes incluem tamanho, forma e aparência e em relação ao núcleo incluem o seu tamanho em relação ao citoplasma, sua forma, posição do mesmo dentro da célula, quantidade, padrão da cromatina, aparência do nucléolo e presença de figuras de mitose (COMAR, 2010).



Durante a escrutinação da lâmina foi possível observar anisocitose e alta celularidade, que um seria reflexo da incapacidade dessas células em produzirem matriz extracelular e se diferenciarem. As células em sua maioria, se apresentaram bi e multinucleadas, com dois ou mais nucléolos, bordas apagadas, citoplasma irregular, reduzido e hipocromático. Os núcleos se apresentaram irregulares, aumentados e sem hipercromatismo. Em diversos estudos, essas características celulares atípicas foram descritas, como sendo características de células neoplásicas e da resposta de tecidos à lesões recessivas e inflamação. Esses resultados corroboram com resultados de MEUNIER e colaboradores (2010) e SAAD-HOSSNE (2003), que concluíram que a ascite é um processo inflamatório gerado pelo extravasamento de líquido e células malignas do tumor para a cavidade abdominal.



**Figura 1:** Aspectos morfológicos das células do líquido ascítico coradas com Giemsa. Aumento 5X.

### **Análise do cultivo primário das células do líquido ascítico**

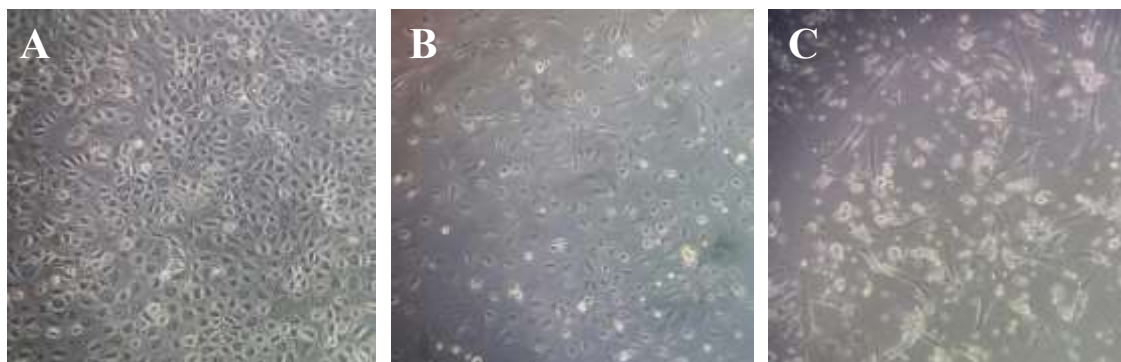
O líquido ascítico fornece uma boa fonte de células tumorais que são eliminados a partir do tumor primário (ALVES *et al.*, 2010). O cultivo primário estabelecido a partir do crescimento de células provindas de um tecido ou líquido pode ser obtido de forma mecânica ou enzimática e as células que conseguem aderir ao frasco de cultura formam a primeira monocamada de células daquele tecido (KAR *et al.*, 2017). Essas células possuem as características do local de origem e podem crescer em cultura por um determinado período de tempo, sendo denominadas células primárias. Assim, o estudo das populações celulares obtidas do líquido ascítico, poderá permitir a identificação de



biomarcadores adequados para o manejo clínico das pacientes, o que poderá contribuir para um tratamento preciso, melhorando a expectativa de vida das mulheres afetadas.

Apesar que, essas células em cultivo normalmente possuem um tempo de vida curto, esta é a forma mais utilizada para estudar o comportamento de determinadas células devido a capacidade de conservação de muitas características genotípicas e fenotípicas da amostra de origem. À medida que a cultura é repicada, as células com uma maior capacidade de proliferação predominam na garrafa de cultivo em detrimento das células que não se adaptaram bem ou que, devido a traumas do processo de desagregação, não mantiveram uma taxa normal de proliferação (ALVES *et al.*, 2010).

No presente estudo foi possível, através do cultivo, visualizar crescimento confluinte com formação de monocamada, em frasco T75, no 5º dia de cultivo (Figura 2A). Contudo, pôde-se observar que as células não resistiam à expansão para outros frascos de cultura, o que inviabilizou que fossem realizados todos os ensaios propostos para o andamento do trabalho. Observou-se ainda o aumento progressivo da presença de fibroblastos e redução da confluência na monocamada após o 7º dia de cultivo (Figuras 2B e C).



**FIGURA 2: Aspecto morfológico das células do líquido ascítico no estabelecimento da cultura primária. (A)** Monocamada confluinte após 5 dias de armazenamento à 37°C/ 5% de CO<sub>2</sub>; **(B)** Células senescentes; **(C)** Perda da confluência e predominância de fibroblastos. Aumento 10X.

### **Análise do ensaio de imunofluorescência**

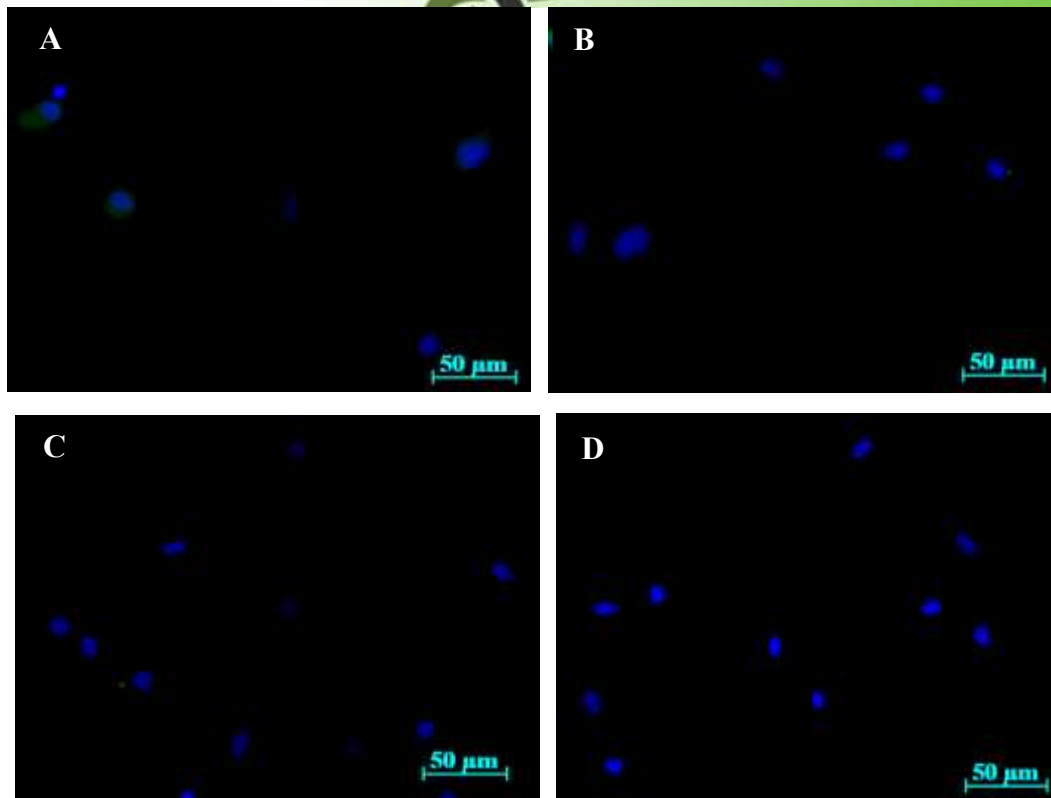
As condições adequadas de cultivo das células do líquido ascítico devem possibilitar a produção de células viáveis e com morfologia característica, principalmente de estruturas, como o núcleo e citoesqueleto, que são essenciais à sua sobrevivência. Neste estudo, foi realizada a análise por imunofluorescência dos marcadores E/P caderina. As células também foram marcadas com faloidina e DAPI.



As moléculas de E-caderina, localizadas nas superfícies das células de tecido epitelial, e suas interações dependentes de cálcio, são cruciais para a formação e manutenção de junções aderentes em áreas de contato célula-célula. As moléculas P-caderina, também encontram-se localizadas nas junções intercelulares, do tipo aderente, mas apresentam diferentes características das E-caderinas, como: distinto peso molecular, distinta especificidade de ligação e distinta distribuição tecidual. Estas são expressas por uma grande variedade de tecidos durante a embriogênese. (PAREDES *et al.*, 2002). As moléculas E-caderina e P-caderina, consideradas caderinas clássicas, e seus papéis na determinação do fenótipo epitelial, na migração e diferenciação celular, e na disseminação tumoral, tem estimulado um enorme interesse nesta família de moléculas de adesão (PECINA-SLAUS, 2003; PAREDES *et al.*, 2002).

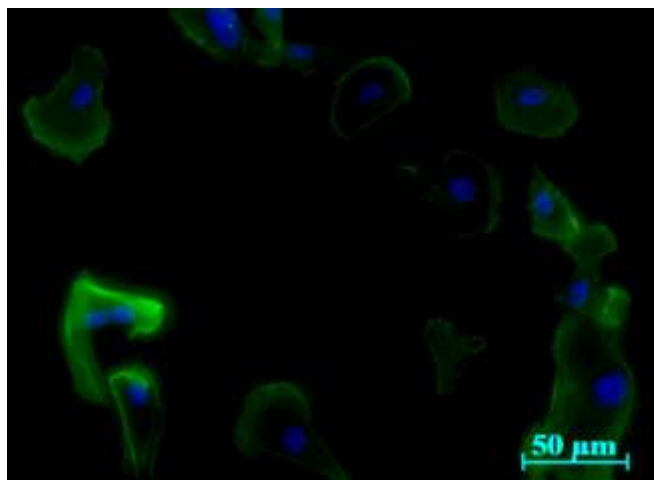
A faloidina é um peptídeo bicíclico tóxico, de ação rápida, extraído do cogumelo *Amanita phalloides*, que possui alta afinidade com filamentos de actina, possibilitando sua utilização na marcação de citoesqueleto (LENGSFELD *et al.*, 1974), enquanto que os núcleos foram marcados com DAPI, um composto fluorescente que se integra no material genético celular, preferencialmente, entre os pares de bases GC ou sequências com GC e AT intercalados (TANIOUS, 1992).

No presente estudo, as células se apresentaram negativas para E/P caderina (Figura 4). A perda da adesão mediada por essas caderinas, normalmente, caracteriza a presença de células provindas de tumores primários em transição para câncer metastático invasivo (PECINA-SLAUS, 2003; PAREDES *et al.*, 2002) e/ou presença de fibroblastos, que por serem são mesenquimais não expressam E/P caderina. Esses resultados corroboram com estudos que apontam a ascite como a disseminadora de células tumorais pelo peritônio causando metástases a longa distância e corroboram com o fato de que as células primárias apresentam senescência precoce, seguida da predominância de fibroblastos.



**FIGURA 4: Visualização microscópica das células marcadas para E/P caderina. (A) (B) Células negativas para a marcação com E-caderina. (C) (D) Células negativas para a marcação com P-caderina. Aumento 20X.**

A marcação com faloidina, por sua vez, revelou núcleos e citoesqueletos irregulares e presença de células binucleadas. Foi possível visualizar células com marcação acentuada do filopódio e morfologias distintas indicando possível variabilidade da população celular presente na amostra (Figura 5).



**FIGURA 5: Visualização microscópica das células marcadas. Células marcadas com DAPI (núcleo) e Faloidina (citoesqueleto). Aumento 20X.**



## **Análise do pré-preparo das amostras para o ensaio de imunofenotipagem**

A imunofenotipagem por citometria de fluxo é uma técnica que permite análise rápida, objetiva e quantitativa de células em suspensão (FALDYNA et al., 2001). Essa técnica foi introduzida em meados do século XX e era utilizada em centros tecnológicos apenas para a obtenção de parâmetros simples como forma e tamanho, porém com os avanços da tecnologia e a produção dos anticorpos monoclonais, hoje a citometria de fluxo pode ser utilizada de forma ampla (MARTINS; GAGLIANI, 2008).

Para serem introduzidas no citômetro, as amostras celulares são marcadas com anticorpos, ligados à fluorocromos, anti os receptores selecionados para avaliar o perfil de expressão destes marcadores nas populações presentes na amostra. Assim que as células atravessam a câmara são envolvidas por uma solução tampão, e passam em fila simples pela luz emitida pelo laser por meio de um sensor eletrônico. O fluxo utiliza iluminação por laser de argônio (azul), que tem uma energia de luz incidente de 488nm. O fluorocromo acoplado ao anticorpo absorve a energia do laser e emite essa energia em forma de luz, em comprimentos de ondas específicos para o fluorocromo empregado. A luz emitida é captada por um sistema óptico que é sensível a diferentes comprimentos de onda, permitindo que um ou mais marcadores sejam lidos ao mesmo tempo. Essas informações são transferidas para um computador acoplado a um sistema. Um programa especializado representa graficamente, em formatos uni, bi ou tridimensional, as populações celulares marcadas. (FANG & RAMASAMY, 2015). As células são mensuradas individualmente com relação ao tamanho, granulosidade e intensidade de emissão de fluorescência (NAKAGE *et al.*, 2004; FUNED 2015). Os resultados obtidos são analisados em um software específico.

Durante o pré-preparo das amostras para o ensaio de imunofenotipagem pôde-se observar que as células estavam altamente coradas pelo azul de tripan, indicando perda de viabilidade. Foi possível observar, também, que as células estavam agrupadas em grandes grumos, impossibilitando a contagem. Diante disso, não foi possível dar continuidade ao protocolo para a realização da imunofenotipagem, uma vez que, para este ensaio as células devem, principalmente, estar viáveis.



**FIGURA 6:** Visualização microscópica das células na câmara de Neubauer com azul de tripan. Células agrupadas altamente coradas de azul, indicando perda de viabilidade. Aumento 20X.

## CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Diante do exposto, foi possível concluir, que o cultivo primário foi realizado de forma satisfatória até o quinto dia. A análise citológica revelou que o líquido ascítico apresenta boa pluralidade celular. Contudo, a população celular presente se mostrou instável em relação ao crescimento e confluência mesmo diante de condições ótimas de armazenamento e cultivo, demonstrou baixa resistência à procedimentos que causam traumas mecânicos e apresentou período de senescência precoce seguida da predominância de fibroblastos, característica de culturas primárias. Esses fatores, em conjunto, geraram dificuldade na realização de todos os ensaios propostos.

As células, em estudo, se apresentaram negativas para os marcadores E/P caderina, corroborando com estudos que apontam a ascite como disseminadora de células tumorais a partir da transição do fenótipo epitelial para o fenótipo mesenquimal (EMT), que lhes confere maior motilidade, permitindo metástases a longa distância e consequentemente resistência quimioterápica. A marcação acentuada dos filopódios pela faloidina, em algumas células, confirmou a presença de fibroblastos na placa.

Em relação à preparação da amostra para a citometria de fluxo, pôde-se concluir que é necessário o desenvolvimento de estratégias para manter as células viáveis após a preparação e para desfazer os agrupamentos celulares que impossibilitam a contagem das células e consequentemente comprometem o desenvolvimento e a realização do ensaio.



Finalmente, ressalta-se que estudos de padronização de ensaios envolvendo amostras clínicas são extremamente relevantes e necessários. A padronização garante a redução de publicação de resultados não confiáveis, facilita a reprodutibilidade dos resultados obtidos, melhora a comparabilidade entre estudos, oferecendo condições para tradução dos resultados da bancada para a prática clínica.

## AGRADECIMENTO

Os autores agradecem a FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE MINAS GERAIS – FAPEMIG (PROCESSO N.: CDS - APQ-03223-17) pelo apoio financeiro que subsidiou este estudo.

## REFERÊNCIAS

ALVES, Emanuele Amorim et al. Histórico de desenvolvimento da tecnologia de cultura de tecidos. **Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde:** 2010, v. 2, p. 216-252. Disponível em: <[http://www.epsjv.fiocruz.br/sites/default/files/capitulo\\_5\\_vol2.pdf](http://www.epsjv.fiocruz.br/sites/default/files/capitulo_5_vol2.pdf)>. Acesso em: 30 mai. 2018

CHO, Kathleen R.; SHIH, Ie-Ming. Ovarian Cancer. **Annual Review of Pathology:** 2009, v.4, p. 287–313. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2679364/pdf/nihms85735.pdf>>. Acesso em: 05 jun. 2018

COMAR, Samuel Ricardo et al. Análise citológica do líquido peritoneal. **Estudos de Biologia:**2010, v. 32, n. 76/81, p.73-79. Disponível: <<http://www2.pucpr.br/reol/index.php/BS?dd1=5945&dd99=view>>. Acesso em: 05 jun. 2018

FANG, Y.; RAMASAMY, R. P. Current and Prospective Methods for Plant Disease Detection. **Biosensors:** 2015, v. 4, p. 537-561. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26287253>>. Acesso em: 05 jun. 2018

FALDYNA, M. *et al.* Lymphocyte subsets in peripheral blood of dogs – a flow cytometric study. **Veterinary Immunology and Immunopathology:** 2001, v. 82, n.1-2, p.23-37. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165242703001351?via%3Dihub>>. Acesso em: 5 jun. 2018

FRANKEN, *et al.* Clonogenic assay of cells in vitro. **Nature Protocols:** 2006, v.1, n.5, p.2315-2319. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17406473>>. Acesso em: 22 out. 2018

FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS. UNIDADE DE GESTÃO DO SISTEMA DA



**QUALIDADE – Elaboração de Procedimento Operacional Padrão – GA/MET (UGSQ-GA-0001):** 2015, Belo Horizonte, MG, p.20. Revisão 4

GUZMÁN C *et al.* ColonyArea: An ImageJ Plugin to Automatically Quantify Colony Formation in Clonogenic Assays. **PLOS ONE**: 2014, v. 9, n.3. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092444>> Acesso em: 23 out. 2018

INCA- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/ovario>>. Acesso em: 30 mai. 2018

JÚNIOR *et al.* Ascite - estado da arte baseado em evidências. **Revista da Associação Médica Brasileira**: 2009, v. 55, n.4, p. 489-96. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/ramb/v55n4/a28v55n4.pdf>>. Acesso em: 24 out. 2018

KAR, Rajarshi *et al.* Establishment of Primary Cell Culture From Ascitic Fluid and Solid Tumor Obtained From Epithelial Ovarian Carcinoma Patient. **Int J Gynecol Cancer**: 2017, v.27, n. 9, p.2000-2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28816710>>. Acesso em: 28 mai. 2018

KURMAN, Robert J; SHIH, Ie-Ming. Pathogenesis of Ovarian Cancer. Lessons from Morphology and Molecular Biology and their Clinical Implications. **International Journal of Gynecological Pathology**: 2008, v. 27, n.2, p.151–160. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2794425/pdf/nihms45906.pdf>>. Acesso em: 02 jun. 2018

LENGSFELD, Anneliese M *et al.* Interaction of Phalloidin with Actin. **Proc. Nat. Acad. Sci**: 1974, v. 71, n.7, p. 2803-2807. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC388560/pdf/pnas00060-0217.pdf>> Acesso em: 22 out. 2018

MARTINS, Daniele Minguini; GAGLIANI, Luiz Henrique. Importância da citometria de fluxo no diagnóstico diferencial das leucemias. **Revista UNILUS ensino e pesquisa**: 2008, São Paulo. v.5, n. 8, p. 6- 24. Disponível em: <<http://revista.unilus.edu.br/index.php/ruep/article/view/39>>. Acesso em: 02 jun. 2018

MEUNIER, Liliane *et al.* Effect of Ovarian Cancer Ascites on Cell Migration and Gene Expression in an Epithelial Ovarian Cancer In Vitro Model. **Translational Oncology**: 2010.v.3, n.4, p. 230–238. Disponível em: <[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2915414/pdf/tlo0304\\_0230.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2915414/pdf/tlo0304_0230.pdf)>. Acesso em: 20 mai. 2018

NAKAGE, Ana Paula Massae *et al.* Metodologia e aplicação da citometria de fluxo na hematologia veterinária. **Ciência Rural**: 2005, Santa Maria, v. 35, n. 4, p. 966-973. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S010384782005000400040&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010384782005000400040&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em: 29 mai. 2018

PAREDES, J *et al.* P-cadherin expression is associated with high-grade ductal carcinoma



in situ of the breast. **Virchows Archiv**: 2002, v.440, n.1, p. 16-21. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11942571>>. Acesso em: 21 out. 2018

PEĆINA-ŠLAUS, Nives. Tumor suppressor gene E-cadherin and its role in normal and malignant cells. **Cancer Cell International**: 2003, v.3, n.14. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC270068/>> Acesso em: 21 out. 2018

RAFEHI, Haloom *et al.* Clonogenic Assay: Adherent Cells. **Journal Visualized Experiment**: 2011, v. 49, n. 2573. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3197314/>>. Acesso em: 22 out. 2018

REID, Brett M.; PERMUTH, Jennifer B.; SELLERS Thomas A. Epidemiology of ovarian cancer: a review. **Cancer Biology & Medicine**: 2017, v.4, n.1, p. 10-32. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5365187/pdf/cbm-14-1-9.pdf>>. Acesso em: 28 mai. 2018

SAAD-HOSSNE, Rogério; SAAD-HOSSNE, Willian; PRADO, Renê Gamberini. Ascite neoplásica. Efeito da solução aquosa de fenol, ácido acético e glicerina sobre o tumor ascítico de Ehrlich. **Acta Cirúrgica Brasileira**: 2003, São Paulo v. 18, n 6, p. 518-516. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/%0D/acb/v18n6/a09v18n6.pdf>> Acesso em: 03 mai. 2018

TANIOUS, FA *et al.* DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole) binds differently to DNA and RNA: minor-groove binding at AT sites and intercalation at AU sites. **Biochemistry**:1992 v. 31 n.12, p. 3103-12. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1372825>>. Acesso em: 22 out. 2018

VALENTE, Vivian; MASSABKI Paulo Sergio. Marcadores tumorais de câncer de ovário: o que há de novo?. **Revista Brasileira de Clínica Médica**: 2011, São Paulo, v.9, n.5, p. 377-81. Disponível em: <<http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=601359&indexSearch=ID>> Acesso em: 03 jun. 2018