



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA

ÍISIS DE ARAUJO OLIVEIRA

**OTIMIZAÇÃO DE MÉTODOS DE SEPARAÇÃO DE CÉLULAS TUMORAIS
CIRCULANTES NO SANGUE PERIFÉRICO**

BRASÍLIA

2018

ÍSYS DE ARAUJO OLIVEIRA

**OTIMIZAÇÃO DE MÉTODOS DE SEPARAÇÃO DE CÉLULAS TUMORAIS
CIRCULANTES NO SANGUE PERIFÉRICO**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como requisito parcial para a
conclusão de curso de graduação em Farmácia
pela Universidade de Brasília.

Orientadora: Profa. Dra. Andréa Barreto
Motoyama

Co-orientadora: Profa. Dra. Fabiana Pirani
Carneiro

BRASÍLIA

2018

ÍISIS DE ARAUJO OLIVEIRA

**OTIMIZAÇÃO DE MÉTODOS DE SEPARAÇÃO DE CÉLULAS TUMORAIS
CIRCULANTES NO SANGUE PERIFÉRICO**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como requisito parcial para a
conclusão de curso de graduação em Farmácia
pela Universidade de Brasília.

Brasília, 24 de junho de 2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Andréa Barreto Motoyama

Faculdade de Ciências da Saúde – FS, Universidade de Brasília

Ma. Nathália de Vargas Haar

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus, fonte inesgotável de todos os dons, pelo seu amor e por toda graça recebida, pois sem Ele eu nada poderia ter realizado.

Aos meus pais, João Carlos e Marisete, por todo amor e suporte durante essa caminhada de estudos. Sem dúvidas, eu não estaria onde estou se não tivesse tido o apoio que vocês me deram.

Quero também agradecer a minha orientadora, Andréa Barreto Motoyama, pela oportunidade, colaboração, incentivo e confiança no meu trabalho. Pela sua disposição em ensinar e todos os conhecimentos que foram passados. Com certeza, a senhora foi de extrema importância para eu me tornar a profissional que estou me tornando.

Agradeço a todos os meus colegas de laboratório, principalmente, Mariane, Larissa, Beatriz F. e Luma. Agradeço também a Fabiana, Tércia e Nathália, pelas trocas de conhecimento e auxílio nos meus experimentos.

Por fim, e não menos importante, agradeço a todos os meus amigos, por todo apoio e incentivo ao longo desses anos e por sempre acreditarem em mim. Agradeço à compreensão, cumplicidade e ajuda nos momentos de desespero.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATCC: American Type Culture Collection

BSA: Albumina de soro bovino

CTCs: Células Tumorais Circulantes

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

PBS: "*Phosphate Buffered Saline*" – Solução Salina à Base de Fosfato

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	20
3. METODOLOGIA	21
3.1. Cultura de células	21
3.2. Amostras de sangue e seu enriquecimento.....	21
3.3. Isolamento de Células Mononucleares do Sangue Periférico com Histopaque-1077®	21
3.4. Isolamento de Células Mononucleares do Sangue Periférico com Hemólise (Lise Seletiva)	22
3.5. Separação Imunomagnética	22
3.6. Separação por Tamanho	23
3.7. Citocentrifugação	24
3.8. Coloração Papanicolau.....	24
3.9. Imuno-citoquímica e imuno-histoquímica	25
4. RESULTADOS	28
4.1. Separação imunomagnética utilizando <i>Large Cell Columns</i> da <i>Milteniy Biotec - MACS®</i>	28
4.2. Separação por tamanho utilizando <i>PluriStrainer®</i> da <i>PluriSelect</i>	35
4.3. Separação por citocentrifugação	40
5. DISCUSSÃO	42
6. CONCLUSÕES	48
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
8. ANEXOS	56

8.1. Anexo A –Aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde (FS/UnB).....	56
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação dos experimentos de separação imunomagnética utilizando Large Cell Columns da Milteniy Biotec - Macs®, apenas com linhagens celulares	30
Tabela 2 - Comparação dos experimentos de separação imunomagnética utilizando Large Cell Columns da Milteniy Biotec - Macs® combinado com Histopaque-1077®	32
Tabela 3 - Comparação dos experimentos de separação imunomagnética utilizando Large Cell Columns da Milteniy Biotec - Macs® combinado com hemólise	34
Tabela 4 - Comparação dos experimentos de separação por tamanho utilizando PluriStrainer® da PluriSelect apenas com linhagem celular e não utilizando nenhum método de isolamento de células mononucleares do sangue periférico	37
Tabela 4 - Comparação dos experimentos de separação por tamanho utilizando PluriStrainer® da PluriSelect combinado com hemólise e Histopaque-1077®	38
Tabela 6 - Recuperação e rendimento das células separadas por citocentrifugação combinada com hemólise	40

LISTA DE IMAGENS

Figura 1 – Imunohistoquímica e imunocitoquímica para PanCK 100x..... 41

RESUMO

O câncer corresponde a várias desordens que compartilham uma profunda desregulação de crescimento. A biópsia líquida trata-se de uma alternativa simples e não invasiva às biópsias cirúrgicas. As células cancerosas que entram na corrente sanguínea são conhecidas como Células Tumorais Circulantes (CTCs) e exibem informações valiosas sobre a composição tumoral, capacidade de invasão, suscetibilidade a medicamentos e resistência à terapia. Apesar de elas ocorrem frequentemente em concentrações muito baixas no sangue periférico, nos últimos anos, muitos ensaios foram desenvolvidos para sua detecção e isolamento.

Neste trabalho foram analisadas e otimizadas as técnicas de separação imunomagnética, por tamanho e citocentrifugação. A técnica de citocentrifugação foi a que gerou os resultados mais consistentes, chegando a um rendimento médio de 78%, mostrando-se como um promissor método de separação de células, além de ser uma técnica rápida e barata. As taxas médias de recuperação do método de imunomagnetismo e separação por tamanho, quando combinados com Histopaque-1077[®] e hemólise foram de 14% e 12%; e 7% e 14%, respectivamente.

Apesar das limitações encontradas nesse estudo, seus resultados podem ser considerados promissores, gerando incentivo para estudos futuros que visem melhorar a taxa de recuperação de células tumorais, validar marcadores em coortes de amostras de pacientes, e avaliar o valor prognóstico de novos marcadores, que podem abordar a heterogeneidade das células tumorais circulantes.

Palavras-chave: Câncer, Células Tumorais Circulantes, Metástase, Separação imunomagnética, separação por tamanho, citocentrifugação.

1. INTRODUÇÃO

O câncer não é apenas uma doença, mas várias desordens que compartilham uma profunda desregulação de crescimento e que podem afetar qualquer parte do corpo. O câncer pode ter origem através de desordem genética que pode ser ocasionada por mutações do DNA que são, em sua maior parte, adquiridas espontaneamente ou induzida por agressões do ambiente, e poderão sustentar e permitir o desenvolvimento de instabilidade genômica. (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013).

As características do câncer, capacidades distintas e complementares que permitem o crescimento do tumor e a disseminação metastática, fornecem uma base sólida para a compreensão da biologia do câncer, compreendendo em: sustentada sinalização proliferativa; ausência de resposta aos supressores de crescimento; imortalidade replicativa; angiogênese para sustentação do crescimento das células cancerosas; evasão da morte celular; e metástase, que é a capacidade de invadir tecidos locais e disseminar-se para locais distantes. (HANAHAN; WEINBERG, 2000).

Pesquisas sugerem que duas características adicionais do câncer estão envolvidas na patogênese de alguns e talvez de todos os cânceres. Uma delas envolve a capacidade de modificar ou reprogramar o metabolismo celular para apoiar de forma mais eficaz a proliferação neoplásica. A segunda permite que as células cancerígenas evitem a destruição imunológica, em particular pelos linfócitos T e B, macrófagos e células exterminadoras naturais.

Além disso, duas características consequentes da neoplasia são tidas como marcadores emergentes. A instabilidade genômica e, portanto, a capacidade de

mutação confere às células do câncer alterações genéticas que impulsionam a progressão do tumor. A inflamação por células do sistema imune inato projetada para combater infecções e cicatrizar feridas pode, em vez disso, resultar no seu apoio inadvertido de múltiplas capacidades dos marcadores, manifestando assim as consequências amplamente divulgadas de promoção de tumores das respostas inflamatórias. (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Tumor é um termo utilizado para descrever uma massa de crescimento anormal de tecido, podendo ser classificado como benigno ou maligno dependendo de seu comportamento clínico. Os benignos são relativamente inofensivos, permanecendo restritos ao local em que se originaram, não se disseminando; enquanto que os malignos possuem a capacidade de invadir e destruir estruturas adjacentes, além de se disseminarem para locais distais e causar a morte. (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013).

O diagnóstico de tumores sólidos é feito através de punções e biópsias, por meio das quais uma pequena amostra do tumor é retirada do paciente (em procedimento cirúrgico ou semi-cirúrgico). (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013). A biópsia é posteriormente analisada por patologistas, sendo classificada de acordo com a morfologia tecidual e celular, e pela presença de marcadores já estabelecidos que permitam a correta identificação e/ou gradação do tumor. Contudo, esse procedimento invasivo apresenta diversas limitações, dentre as quais se destacam: (1) a heterogeneidade do tumor, que pode comprometer a qualidade de análise patológica a ser realizada; (2) a dificuldade de retirada de biópsias de acompanhamento por ser invasivo, dispendioso, doloroso ou potencialmente arriscado para o paciente, que permitiriam o monitoramento, em tempo real durante a terapia, da resposta do paciente. (LIANIDOU; STRATI; MARKOU, 2014).

Biópsia líquida trata-se de uma alternativa simples e não invasiva às biópsias cirúrgicas, constituindo de um teste feito em amostras biológicas líquidas (por exemplo: sangue, urina, líquido) à procura de fragmentos de DNA de células tumorais ou das próprias que circulam nesses líquidos, sobretudo sangue periférico. (NCI, 2017). Considerando a facilidade de obtenção de sangue e urina, por exemplo, a biópsia líquida se torna uma alternativa factível e atraente para estudo do câncer. Porém, o desenvolvimento de métodos não invasivos para detectar e monitorar tumores continua a ser um grande desafio na oncologia. (KARACHALIOU *et al.*, 2015)

As metástases constituem a principal causa de morte por câncer, que por sua vez é a segunda principal causa de morte em todo o mundo, representando 8,8 milhões de mortes em 2015. (WHO, 2017). Dentre os tipos de câncer com maior incidência, destacam-se o de pulmão e o colo-retal (quando considerados ambos os sexos) e o de mama e de próstata, quando considerados mulheres e homens, respectivamente. (GUERRA; GALLO; MENDONÇA, 2005).

A cascata metastática é um processo que compreende três principais etapas, sendo elas: intravasão, migração e extravasão. A metástase se inicia com a multiplicação celular, invasão do tecido adjacente e angiogênese para formar novos vasos sanguíneos a fim de nutrir e manter a atividade dessas células. (BOCKHORN; JAIN; MUNN, 2007). Uma vez que há invasão de tecidos vizinhos, pode ocorrer a intravasão na circulação, chegando ao interior de vasos sanguíneos ou linfáticos (JOOSE; GORGES; PANTEL, 2015), o que permitirá a essas células disseminar pelo organismo caso sobrevivam ao estresse físico da circulação e evitem a depuração imune, podendo extravasar em locais distais, afetando órgãos diferentes e distantes do seu local de origem. (BOCKHORN; JAIN; MUNN, 2007)

As células cancerosas que entram na corrente sanguínea são conhecidas como Células Tumorais Circulantes, ou CTCs. (LV; ZHANG; YE, 2016). Essas células exibem alterações moleculares dinâmicas e possuem, potencialmente, informações valiosas sobre a composição tumoral, capacidade de invasão, suscetibilidade a medicamentos e resistência à terapia. (GOLD; CANKOVIC; FURTADO, 2015). Essa é a razão pela qual as análises de CTC em sangue periférico são consideradas uma biópsia líquida em tempo real, sendo um método minimamente invasivo para detecção de marcadores, em oposição à biópsia de tecidos. (BENINI *et al.*, 2018). Dessa forma, as CTCs em sangue periférico se mostram uma fonte prontamente disponível com as quais se pode acompanhar este processo dinâmico.

Em pacientes com câncer sólido avançado, as CTCs ocorrem frequentemente em concentrações muito baixas no sangue periférico, variando entre uma a dez células por 10 mL de sangue na maioria dos pacientes. (ALIX-PANABIÈRES; PANTEL, 2014). A concentração extremamente baixa de CTCs representa um desafio para a sua detecção e caracterização, de forma análoga a procurar “uma agulha em um palheiro”. (VAN-DER-TOOM *et al.*, 2016).

A análise de CTCs no sangue de pacientes com câncer representa um enorme desafio técnico, não apenas devido ao seu baixo número absoluto, mas também à extrema abundância de células sanguíneas. Nos estágios iniciais do câncer de mama, as contagens de CTC foram relatadas como de uma a cinco células em 7,5 ml de sangue (ALIX-PANABIÈRES; PANTEL, 2014), enquanto no cenário metastático, mais de 1.000 CTCs por 7,5 ml de sangue foram observados. (CRISTOFANILLI *et al.*, 2004).

Há relatos em que a taxa de sobrevivência de pacientes com câncer colorretal seria muito baixa, quando o número de CTC fosse superior a cinco por 7,5 mL de sangue periférico. (LOW; WAN ABAS, 2015). Portanto, combinada com informações clínicas, a detecção de CTC oportuna e eficazmente pode ajudar os médicos a tratar e monitorar o desenvolvimento da doença e é benéfica para o diagnóstico precoce e monitoramento de metástases. (BENINI *et al.*, 2018).

As CTCs em câncer humano foram previamente detectadas e hipoteticamente correlacionadas com estágio clínico, metástase linfonodal e mau prognóstico. (HOSHIMOTO; SHINGAI; MORTON, 2012). Também há evidências abundantes que insistem em que a presença de CTCs é frequente em cânceres humanos; além disso, seus níveis mostram uma tendência gradual de aumento com o aumento do estadiamento do tumor. (COOLS-LARTIGUE *et al.*, 2013).

As CTCs se mantêm promissores biomarcadores funcionais do processo metastático, tanto para investigação científica e aplicações clínicas, em grande parte devido à facilidade de coleta de amostras, pois abordagens baseadas na biópsia líquida permitem realizar a coleta repetidamente com baixo risco de efeitos colaterais, quando comparada à biópsia convencional, permitindo uma medição de CTCs como um indicador da carga da doença e resposta à terapia. (LIANIDOU; STRATI; MARKOU, 2014).

O sistema *CellSearch*[®] (da Veridex, uma empresa da Johnson & Johnson) foi aprovado pela agência americana *Food and Drug Administration* (FDA) com valor prognóstico para pacientes com tumores metastáticos de mama, próstata e colo-retal, e hoje é o padrão ouro para contagem de CTCs. O método é valioso para a análise clínica de CTCs quanto para a validação de pesquisas científicas sobre

metástase, porém não se encontra disponível em alguns lugares, como no Brasil, além de possuir alto custo e se basear na detecção do marcador epitelial EpCAM. Cabe ressaltar que esse marcador é epitelial, e que, portanto, não se encontra expresso necessariamente em todos os tipos de cânceres; além disso, algumas CTCs, mesmo de origem epitelial, podem sofrer transição epitelial para mesenquimal, perdendo sua expressão (BARROSO, 2014). Por esses motivos buscam-se outros métodos para detecção dessas células.

Nos últimos anos, muitos ensaios foram desenvolvidos para a detecção e isolamento de CTCs. As estratégias de isolamento do CTC podem ser divididas em três categorias principais: seleção positiva (baseia-se no isolamento de células com base em propriedades físicas ou na expressão de marcadores de superfície celular que são exclusivos de células epiteliais, separando as CTCs com essas características), seleção negativa (baseia-se na remoção de glóbulos brancos e outros componentes sanguíneos normais com base em propriedades físicas ou marcadores de superfície celular que são exclusivos de não-CTCs) e livre de seleção (imagens de alto rendimento e métodos em massa que não dependem de seleção positiva ou negativa para a detecção de CTCs ou outras células raras). (VAN-DER-TOOM *et al.*, 2016).

Tanto nas estratégias de seleção positivas quanto nas negativas, há a dependência de propriedades e características diferentes de glóbulos brancos e CTCs dentro do sangue. Estas características podem ser agrupadas em três tipos principais: propriedades físicas, marcadores biológicos e propriedades funcionais. (VAN-DER-TOOM *et al.*, 2016).

Dentre as propriedades físicas usadas para o isolamento de CTCs temos: a exclusão por tamanho, que se baseia no pressuposto fundamental de que as células cancerígenas derivadas do epitélio são maiores do que outras células constituintes normais do sangue (VONA *et al.*, 2000); deformabilidade, em que as células metastáticas são frequentemente mais deformáveis do que as células de menor potencial agressivo (GUCK *et al.*, 2005); densidade, pela qual nos intervalos de densidade entre 1,1020 -1,1040 g/mL há separação da maioria dos glóbulos brancos e CTCs de células anucleadas; e carga superficial, que se fundamenta na suposição de que as células cancerosas têm uma carga de superfície mais negativa, ou zeta-potencial, em comparação com glóbulos brancos. (VAN-DER-TOOM *et al.*, 2016).

É provável, ainda, que a maioria das tecnologias relevantes dependa de uma combinação dessas características físicas, quanto bioquímicas (ex: deformabilidade e presença de marcadores específicos). Além disso, existem diferentes métodos para separação de CTCs, destacando-se a separação com anticorpos ligados a “beads” magnéticos ou fluidos magnéticos, ou por tamanho, através de filtração.

Um marcador de CTC ideal seria aquele expresso em todas as células tumorais circulantes, mas não nas outras células do sangue e que manteria sua expressão ao longo da progressão da doença. Dessa forma, deve-se primeiro definir os critérios para se classificar uma célula como sendo uma CTC utilizando-se como base biomarcadores específicos da doença.

As CTCs isoladas utilizando tecnologias combinatórias de propriedades físicas e/ou marcadores biológicos podem ser adicionalmente caracterizadas por meio de ensaios funcionais, como por exemplo, ensaios de viabilidade celular, cultura de células e implantação tumoral em camundongos. Cabe ressaltar contudo,

que embora os ensaios funcionais sejam o padrão ouro na caracterização das CTCs, do ponto de vista clínico, sua utilização seria inviável, dada sua complexidade e requerimentos técnicos e materiais.

Portanto, observa-se a necessidade de desenvolver e aperfeiçoar métodos para a detecção e isolamento de células tumorais circulantes, uma vez que o uso desses métodos aplicados à biópsia líquida permite uma medição dinâmica de CTCs como indicadores de carga da doença e resposta à terapia, sendo uma possibilidade de fornecimento de prognóstico independente e complementar aos métodos hoje empregados a pacientes com câncer metastático.

2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi analisar e otimizar diferentes técnicas de separação de células tumorais circulantes do sangue periférico.

3. METODOLOGIA

3.1 Culturas de Células

Todas as linhagens celulares foram obtidas do *American Type Culture Collection, USA* (ATCC). As células de interesse MCF-7, MDA-MB-231 e BT474 foram cultivadas em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), lavadas com tampão fosfato-salino 1X (*Phosphate Buffered Saline*, PBS) e desprendidas das placas adicionando-se tripsina 0,25%. Adicionou-se, então, o meio para inativar a tripsina e ser realizada a contagem das células em quantidade desejada nas amostras de sangue de doador saudável.

3.2 Amostras de sangue e seu enriquecimento

Diferentes diluições de MCF-7, MDA-MB231 e BT474 foram adicionadas em amostras de sangue de 6 a 10 ml de doadores saudáveis. Todas as amostras de sangue foram obtidas por meio de procedimento padrão de punção de veias, por profissional, sendo as seringas, agulhas e tubos de coletas estéreis e descartáveis.

Todos os doadores deram seu consentimento para participar do estudo assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, o qual foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde da UnB (CAAE - 34710214.9.0000.5558), coordenado pela Professora Dr. Andréa Barreto Motoyama.

3.3 Isolamento de células mononucleares do sangue periférico com Histopaque-1077[®]

Células mononucleares juntamente com as células de linhagem foram isoladas do sangue com Histopaque-1077[®] através da centrifugação por gradiente

de densidade a 4.000 rpm por 10 minutos. Essas células foram lavadas duas vezes com PBS 1X e centrifugadas a 1.500 rpm por 5 minutos.

3.4 Isolamento de células mononucleares do sangue periférico com hemólise (Lise seletiva)

As amostras de sangue, depois de enriquecidas com as correspondentes linhagens celulares, foram diluídas em tampão de hemólise (1:4/ v:v) e agitadas por 15 minutos sob refrigeração. As amostras foram centrifugadas a 2.000 rpm por 5 minutos, descartado grande parte do sobrenadante e repetido o passo de hemólise e centrifugação.

3.5 Separação imunomagnética

Utilizou-se o Kit de separação de células *Large Cell Columns* da *Milteniy Biotec* - MACS[®], que compreende em uma seleção positiva de células grandes, separando-as através da marcação com anticorpos ligados a “*beads*” magnéticos.

A matriz da coluna de separação imunomagnética da *Milteniy* é composta por esferas ferromagnéticas, que são cobertas com um revestimento biocompatível hidrofílico que permite a separação rápida e suave das células. Quando colocadas no campo magnético de um separador MACS[®], as esferas amplificam o campo magnético em 10.000 vezes, induzindo assim um gradiente de força magnética elevado dentro da coluna. Isto é crucial para o isolamento de células que são apenas minimamente marcadas com MACS[®] MicroBeads, deixando muitos epítomos livres para análises subsequentes que utilizam anticorpos, como coloração fluorescente e citometria de fluxo, por exemplo. O espaço dentro da matriz da coluna garante que células não marcadas fluam facilmente enquanto que as células marcadas são mantidas em suspensão dentro da coluna, ficando gentis- e efetivamente ali retidas,

minimizando o estresse nas células e permitindo uma lavagem eficiente, evitando agregação celular. (MILTENYI BIOTEC, 2018).

Após o isolamento de células mononucleares do sangue periférico, as células foram lavadas duas vezes com 5 mL de PBS 1X, centrifugou-se a 1.500 rpm por 5 minutos, retirou parte do sobrenadante, deixando 500 µl no tubo. Adicionou-se, então, 500 µl do Tampão MACS (0,5% Albumina de soro bovino, BSA; 2 mM de Ácido etilenodiamino tetra-acético, EDTA; PBS 1X) e 5 µl do anticorpo primário anti-EpCAM (clone MOC-31), incubando-se a solução com células e anticorpo sob agitação por 1 hora e 30 minutos à temperatura ambiente, ou pernoite sob refrigeração. A solução foi centrifugada a 300 xg por 10 minutos e foi retirado o sobrenadante, tomando-se cuidado para que as células não fossem retiradas junto com o sobrenadante. A solução de células juntamente com o anticorpo foi lavada uma vez com 4 mL de PBS 1X, centrifugando a 300 xg por 10 minutos e retirou-se o sobrenadante. Colocou-se 1 ml do tampão MACS e 20 µl do anticorpo secundário (*Anti-Mouse IgG MicroBeads, MicroBeads conjugated to goat anti-mouse IgG (H+L) F(ab')₂ fragments (human serum absorbed)*) e incubou-se por 30 minutos sob agitação e refrigeração. Centrifugou-se a 300 xg por 10 minutos e retirou-se o sobrenadante. Lavou-se adicionando 2 ml do tampão MACS e centrifugou-se a 300 xg por 10 minutos, retirando grande parte do sobrenadante após isso. Ressuspendeu-se em 500 µl do tampão MACS.

No passo da separação magnética colocou-se a coluna em um campo magnético de um separador MACS adequado e acoplou-se a agulha (resistor de fluxo), colocando um tubo de 15 ml para coletar a fração negativa. Preparou-se a coluna, lavando com 3 ml de tampão MACS, para, então, aplicar a suspensão de células. Lavou-se a coluna com 2 ml de tampão MACS para remover as células não

marcadas, que foram coletadas, gerando a fração negativa. Removeu-se a coluna do tubo e retirou-a do campo magnético, assim como a agulha. Colocou-se em um novo tubo de 15 ml, para conter a fração positiva, e aplicou-se 1 ml do tampão MACS na coluna, eluindo as células em tampão usando o êmbolo fornecido com a coluna, obtendo-se assim, a fração positiva.

3.6 Separação por tamanho

Utilizou-se o kit *PluriStrainer*[®] da *PluriSelect*, que consiste em filtros que separam por exclusão de tamanho.

O filtro de célula *pluriSelect*[®] da *pluriStrainer* é um dispositivo de peneiramento estéril para obter suspensões de células únicas ou para remover agregados de células. Além disso, ele pode ser combinado com um anel conector para controle de fluxo e para usar pressão negativa para indução da filtração. Os filtros são empilháveis para permitir a filtração direta com diferentes tamanhos de malha e podem ser invertidos para recuperar o material peneirado. Eles se encaixam em tubo cônico de centrífuga de 50 ml rotineiramente utilizados no laboratório. Para grandes volumes de amostra, pode ser combinado com um funil. (PLURISELECT, 2018).

Conectou-se o filtro num tubo de 50 ml em cerca de 50 mm do tubo. Umedeceu-se o filtro com 2 ml de PBS 1X antes de se adicionar a amostra, e então se lavou com 4 ml de PBS 1X. Retirou-se o filtro e o colocou virado para baixo em um novo tubo de 50 ml, e lavou-se o filtro com 4 ml de PBS 1X para que as células, que estavam presas no filtro, se direcionassem para o tubo.

Alternativamente, para aumentar o tamanho das células, como forma de facilitar sua recuperação do filtro, utilizou-se *pluriBeads*, que são partículas que se

ligam à anticorpos previamente encubados na superfície da célula. Para tal, adicionou-se 500 µl de albumina e 5 µl de anticorpo primário para encubar por 2 horas. Centrifugou-se a 300 xg por 10 minutos e retirou-se o sobrenadante. Lavou-se duas vezes com 500 µl de tampão TBS + Tween 0,1%, centrifugando e retirando o sobrenadante. Completou-se o volume para 500 µl de albumina e adicionou-se 0,5 µl do anticorpo secundário, encubando-se por 1 hora. Centrifugou-se e retirou o sobrenadante, lavou-se duas vezes com 500 µl de tampão TBS + Tween. Centrifugou-se a 300 xg por 10 minutos e retirou o sobrenadante e, então, completou-se o volume com PBS 1X para 2 ml para realizar a filtração.

3.7 Citocentrifugação

A citocentrifugação possibilita a análise citológica de líquidos com baixíssima densidade celular. Esse método é útil para concentrar as células em suspensão, que com a centrifugação se depositam diretamente sobre uma região das lâminas de vidro (CAPUTO; MOTA; GITIRANA, 2010).

Após a hemólise, 150 µl da amostra foram pipetados em citofunil previamente acoplado ao citoclipe e à lâmina, centrifugado a 2.000 rpm por 2 minutos e, então, as lâminas foram fixadas em etanol 99% para, então, ser feita coloração Papanicolau e marcação imunocitoquímica e posterior contra-coloração com Hematoxilina.

3.8 Coloração Papanicolau

Após a citocentrifugação, realizou-se a coloração Papanicolau, que consiste em uma coloração policromática.

Iniciou-se com uma hidratação gradativa, passando as lâminas por três cubas contendo etanol nas concentrações de 95%, 75% e 50%, para então hidratar as lâminas em água.

As lâminas foram colocadas por dois minutos em hematoxilina e então lavadas em água corrente. As lâminas foram lavadas duas vezes em etanol 95% e deixadas por 30 segundos no corante *Orange-G*. Lavou-as duas vezes em etanol 95% para então colocar por dois minutos no corante EA-55.

As lâminas foram lavadas sete vezes em etanol, sendo a primeira lavagem em etanol 95% e o restante em etanol absoluto. Passou-se em xilol três vezes e montaram-se as lâminas.

3.9 Imuno-citoquímica e imuno-histoquímica

Para as lâminas obtidas da citocentrifugação foram realizadas as técnicas de imuno-citoquímica e imuno-histoquímica para localizar antígenos nas células anormais.

Antes de se iniciar, preparou-se a solução de recuperação (250 ml de tampão citrato, constituído de 2,5g de ácido cítrico mono-hidratado e 1000 mL de água destilada, e 500 µL de Tween 20) e o vaporizador (*steamer*), aguardando até a solução de recuperação atingir a temperatura de 95°C dentro de cubas de plástico no interior do vaporizador.

Para as lâminas histológicas, realizou-se a desparafinização e hidratação. A desparafinização consistiu em quatro banhos de 5 minutos cada em xilol 100%, seguindo de um banho em xilol 50%/etanol 50%. Já a hidratação, consistiu em três banhos em etanol 100%, um banho em etanol 95%, um banho em etanol 80%, um

banho em etanol 70% e um banho em etanol 50%, todos por um minuto, seguido de três banhos por 2 minutos em água destilada, nessa ordem.

Transferiram-se as lâminas histológicas dentro de suporte plástico para as cubas de plástico que se encontravam dentro do vaporizador com a solução de recuperação. Aguardou-se atingir a temperatura de 95°C, e então, aguardaram-se mais 20 minutos com as lâminas dentro do suporte que se encontrava dentro do vaporizador. Após isso, deixaram-se as lâminas por 20 minutos em temperatura ambiente. Para as lâminas citológicas, obtidas através da citocentrifugação, colocou-as juntamente com as lâminas histológicas na solução de recuperação durante os 20 minutos à temperatura ambiente.

Lavaram-se as lâminas para retirar a solução de recuperação nove vezes em cubas contendo água destilada e, então, realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena, misturando 450 ml de água destilada com 140 ml de peróxido de hidrogênio, e colocaram-se as lâminas em cubas contendo essa mistura, realizando dois banhos de 10 minutos nessa solução.

Lavaram-se as lâminas em cinco cubas contendo água destilada e realizou-se o bloqueio de proteínas inespecíficas, colocando o bloqueador de proteínas nas amostras e aguardando-se por 10 minutos.

Realizou-se um banho de cinco minutos em tampão de lavagem (500 ml de TBS, 500 µL de Tween 20), e colocaram-se as lâminas sobre esponjas umidificadas e acondicionadas para realizar uma nova lavagem com o tampão de lavagem. Enxugaram-se as lâminas em lenços de papel e gotejou-se o anticorpo primário (PanCK 1:1500), encubando-se por duas horas a temperatura ambiente ou pernoite na geladeira.

Ainda sobre as esponjas, lavaram-se as lâminas três vezes com o tampão de lavagem, enxugaram-nas novamente após um minuto e gotejou-se o anticorpo secundário, encubando-se por 20 minutos a temperatura ambiente. Repetiram-se as lavagens e então se gotejou o reagente estreptovidina peroxidase, encubando-se por 20 minutos a temperatura ambiente, e lavando-se três vezes com o tampão de lavagem.

Enxugaram-se as lâminas e aplicou-se o DAB líquido (K-3466), aguardando até que houvesse a revelação para, então, colocar as lâminas em um berço mergulhado em água destilada por dois minutos.

Mergulhou-se o berço contendo as lâminas em uma cuba contendo Hematoxilina de Harrys por 30 segundos e lavou-se em água corrente. Passou-se, então por 11 cubas contendo etanol nas seguintes concentrações: duas cubas com etanol 50%, duas com etanol 70%, duas cubas com etanol 80%, duas cubas com etanol 95% e três cubas com etanol 100%. Transferiu-se o berço para uma cuba contendo xilol 100% e realizou-se a montagem das lâminas.

4. RESULTADOS

4.1 Separação imunomagnética utilizando *Large Cell Columns* da Milteniy Biotec - MACS®

Os experimentos utilizando a técnica de imunomagnetismo foram realizados com diferentes números de células MCF-7, MDA-MB231 e BT474 conforme descrito nas tabelas 1, 2 e 3.

Considerando-se que esses métodos de separação de células tumorais não haviam sido previamente descritos para todas as linhagens aqui testadas, buscou-se primeiro verificar se seria possível a recuperação das células, na ausência de sangue, cujos componentes poderiam impedir ou diminuir a eficácia do processo. Nesse sentido, buscou-se recuperar células das linhagens MCF-7, MDA-MB-231 e BT474 a partir de um número definido de células e calculou-se o rendimento (recuperação), considerando-se quantas células foram recuperadas (fração positiva) ao término do experimento, conforme contagem em Câmara de Neubauer.

Considerando-se todas as linhagens conjuntamente, a taxa média de recuperação da coluna apenas com as células de linhagem, sem sangue, foi de aproximadamente 52% (variando de 0% a 94%). As taxas médias de recuperação correspondente ao imunomagnetismo combinado com Histopaque-1077® e hemólise foram de 14% (variando de 0% a 33%) e 12% (variando de 1% a 26%), respectivamente.

Para a primeira linhagem, MCF-7, o rendimento variou de 0% a 94%. Para a linhagem MDA-MB-231, a taxa de recuperação variou de 0 a 20%, já para a linhagem BT474, a taxa de recuperação variou de 0% a 17%. Essa variação não pode ser relacionada ao número total de células iniciais. Foram utilizados dois

anticorpos primários, anti-PanCK (1:100) e anti-EpCAM (MOC-31; 1:200), para se determinar qual seria o melhor para separação. A utilização de PanCK para separação foi feita apenas duas vezes, o que resultou em rendimento de 0%. Por isso, deu-se prosseguimento aos demais experimentos com o anticorpo anti-EpCAM (MOC-31).

Tabela 1. Comparação dos experimentos de separação imunomagnética utilizando Large Cell Columns da Milteniy Biotec - Macs®, apenas com linhagens celulares

Experimento	Linhagem celular	Quantidade inicial	Fração positiva	Fração negativa	Rendimento (%)	Alteração no protocolo
1	MCF-7	25.000	7.500	Ausência	30	As células foram centrifugadas a 300 xg por 10 minutos e o sobrenadante foi retirado, lavou-se uma vez com 4 mL de PBS 1X, centrifugando e retirando grande parte do sobrenadante. Foi adicionado 1 mL do tampão MACS e 5 µL do anticorpo primário anti-EpCAM (MOC-31). Na separação magnética, após a aplicação da suspensão de células, a coluna foi lavada com 1 mL do tampão MACS.
2	MCF-7	15.000	12.000	Ausência	80	Seguiu conforme o experimento 1.
3	MCF-7	10.000	7.500	Ausência	75	Seguiu conforme o experimento 1.

Experimento	Linhagem celular	Quantidade inicial	Fração positiva	Fração negativa	Rendimento (%)	Alteração no protocolo
4	MCF-7	8.000	5.000	Ausência	63	Seguiu conforme o experimento 1.
5	MCF-7	8.000	7.500	Ausência	94	Seguiu conforme o experimento 1.
6	MDA-MB231	6.000	Ausência	Ausência	0	As células foram centrifugadas a 300 xg por 10 minutos e o sobrenadante foi retirado antes de se adicionar o tampão MACS e anticorpo primário anti-EpCAM (MOC-31). Antes de ser adicionado o anticorpo secundário, as células foram ressuspensas em 80 µL do tampão MACS.
7	MDA-MB231	25.000	5.000	Ausência	20	As células foram centrifugadas a 300 xg por 10 minutos e o sobrenadante foi retirado, lavou-se duas vezes com 4 mL de PBS 1X, centrifugando e retirando grande parte do sobrenadante. Foi adicionado 1 mL do tampão MACS e 5 µL do anticorpo primário anti-EpCAM (MOC-31).

Tabela 2. Comparação dos experimentos de separação imunomagnética utilizando Large Cell Columns da Milteniy Biotec - Macs® combinado com Histopaque-1077®

Experimento	Quantidade de sangue (mL)	Linhagem celular	Quantidade inicial	Fração positiva	Fração negativa	Rendimento (%)	Alteração no protocolo
1	8	BT474	15.000	2.500	Presença	17	Foram adicionados 2,5 µL do anticorpo primário anti-EpCAM (MOC-31).
2	8,5	BT474	15.000	2.500	Presença	17	Após a incubação com o anticorpo primário anti-EpCAM (MOC-31), foi centrifugado por 6 minutos a 1.500 rpm.
3	8,5	BT474	15.000	Ausência	Presença	0	Foi utilizado 100 µL de PanCK como anticorpo primário e após sua incubação, foi centrifugado por 6 minutos a 1.500 rpm.
4	6	MCF-7	15.000	2.500	2.500	17	Seguiu conforme descrito na Metodologia.
5	6,5	MCF-7	15.000	5.000	Presença	33	Na separação magnética, após a aplicação da suspensão de células na coluna, a coluna foi lavada com apenas 1 mL de tampão MACS.

Experimento	Quantidade de sangue (mL)	Linhagem celular	Quantidade inicial	Fração positiva	Fração negativa	Rendimento (%)	Alteração no protocolo
6	6,5	MCF-7	15.000	Ausência	2.500	0	Foi utilizado 100 µL de PanCK como anticorpo primário. Na separação magnética, após a aplicação da suspensão de células na coluna, a coluna foi lavada com apenas 1 mL de tampão MACS.

Tabela 3. Comparação dos experimentos de separação imunomagnética utilizando Large Cell Columns da Milteniy Biotec - Macs® combinado com hemólise

Experimento	Quantidade de sangue (mL)	Linhagem celular	Quantidade inicial	Fração positiva	Fração negativa	Rendimento (%)	Alteração no protocolo
1	7	MDA-MB231	500.000	5.000	Presença	1	Após a incubação com o anticorpo primário anti-EpCAM (MOC-31), lavou-se uma vez com 5 mL de PBS 1X. Na separação magnética, após a aplicação da suspensão de células na coluna, a coluna foi lavada com apenas 1 mL de tampão MACS.
2	7	MDA-MB231	100.000	5.000	3	5	Seguiu conforme o experimento 1.
3	7	MCF-7	500.000	130.000	2.500	26	Seguiu conforme o experimento 1.
4	7	MCF-7	100.000	15.000	Ausência	15	Seguiu conforme o experimento 1.

4.2 Separação por tamanho utilizando *PluriStrainer*[®] da *PluriSelect*

Os experimentos utilizando a técnica de separação por tamanho foram realizados utilizando diferentes números de células MCF-7 e MDA-MB231 conforme descrito nas tabelas 4 e 5.

A fim de comprovar se as células ficariam retidas no filtro, realizou-se um experimento inicial com a linhagem MDA-MB231, o qual teve um rendimento de 8%. Para comprovar se essas células poderiam ser recuperadas quando adicionadas ao sangue, sem a necessidade de pré-processamento, células MDA-231 foram adicionadas a sangue periférico (Tabela 4). Foram realizados experimentos com a linhagem MCF-7 adicionada a sangue, sendo este submetido à separação prévia por Histopaque-1077[®], ou hemólise (Tabela 5). A taxa média de recuperação, quando as células foram adicionadas a 7 mL de sangue, correspondente à separação por tamanho combinada com Histopaque-1077[®] foi de 7% (variando de 0% a 16%), a separação por tamanho combinada com a hemólise foi de 14%.

Para a linhagem MCF-7, o rendimento variou de 0% a 16% e para a linhagem MDA-MB231 variou de 0% a 8%. Essa variação não pode ser relacionada ao número total de células iniciais. Quanto ao tamanho do filtro utilizado, o de 15 μ m aparenta ser melhor, sugerindo seu uso para a separação das células utilizadas.

Tabela 4. Comparação dos experimentos de separação por tamanho utilizando PluriStrainer® da PluriSelect apenas com linhagem celular e não utilizando nenhum método de isolamento de células mononucleares do sangue periférico.

Experimento	Quantidade de sangue (mL)	Linhagem celular	Quantidade inicial	Fração positiva	Fração negativa	Rendimento	Alteração no protocolo
1	0	MDA-MB231	3.950.000	295.000	57.500	8	Foi utilizado um filtro de 10 µm. Duas lavagens da amostra foram feitas com 10 ml de solução hipotônica (NaCl, KCl, glicose e água destilada), foi centrifugado e retirado o sobrenadante, completando, então, o volume para 10 ml com PBS 1X e a filtração foi realizada. O filtro não foi umedecido antes de ser colocada a amostra.
2	7	MDA-MB231	500	0	0	0	Dois filtros acoplados foram utilizados, um de 10 µm e um de 20 µm, além do anel conector para controle de fluxo juntamente com uma seringa para forçar a passagem da amostra pelo filtro. O filtro não foi umedecido antes de ser colocada a amostra.
3	7	MDA-MB231	2.000	0	0	0	Dois filtros acoplados foram utilizados, um de 10 µm e um de 20 µm, além do anel conector para controle de fluxo juntamente com uma seringa para forçar a passagem da amostra pelo filtro. O filtro não foi umedecido antes de ser colocada a amostra.

Tabela 5. Comparação dos experimentos de separação por tamanho utilizando PluriStrainer® da PluriSelect combinado com hemólise e Histopaque-1077®

Experimento	Linhagem celular	Quantidade inicial	Fração positiva	Fração negativa	Rendimento (%)	Alteração no protocolo
1	MCF-7	500.000	67.500	7.500	14	Técnica combinada com hemólise. Um filtro de 15 μm foi utilizado, previamente umedecido com PBS 1X. PluriBeads foram usados para aumentar o tamanho da célula e a técnica foi realizada conforme descrito em Metodologia, apenas com a diferença da quantidade do anticorpo secundário que foi de 40 μL .
2	MCF-7	15.000	2.400	1.800	16	Técnica combinada com Histopaque-1077®. Um filtro de 15 μm foi utilizado, previamente umedecido com PBS 1X, e plurirBeads para aumentar o tamanho da célula e a técnica foi realizada conforme em Metodologia, com a diferença da quantidade do anticorpo secundário que foi de 40 μL .
3	MCF-7	15.000	Ausência	2.400	0	Técnica combinada com Histopaque-1077®. Um filtro de 30 μm foi utilizado, previamente umedecido com PBS 1X, e plurirBeads para aumentar o tamanho da célula e a técnica foi realizada conforme em Metodologia, com a diferença da quantidade do anticorpo secundário que foi de 40 μL .

Experimento	Linhagem celular	Quantidade inicial	Fração positiva	Fração negativa	Rendimento (%)	Alteração no protocolo
4	MCF-7	50.000	1.800	1.800	4	Seguiu conforme o experimento 3.

4.3 Separação por citocentrifugação

A taxa média de recuperação das células MCF-7 que foram adicionadas a 10 mL de sangue de doadores normais foi de 78%. Já a taxa de recuperação das amostras separadas variou de 10% a 268%.

As médias de rendimentos para as concentrações 1000 células/mL, 100 células/mL, 10 células/mL e 1 células/mL foram 12,5%, 20,5%, 235% e 40%, respectivamente.

Essas quantidades de células recuperadas foram obtidas através da contagem em lâminas que foram submetidas à imunocitoquímica, utilizando o microscópio em aumento de 100x. As células positivas contadas nas lâminas foram computadas na tabela abaixo e encontram-se representadas na Figura 1.

Tabela 6. Recuperação e rendimento das células separadas por citocentrifugação combinada com hemólise.

Células/mL	Quantidade recuperada em 150 μ L	Rendimento (%)	Média de rendimento (%)
1000/mL	523	10	12,5
	1260	25	
100/mL	89	18	20,5
	113	23	
10/mL	101	202	235
	134	268	
1/mL	1	20	40
	3	60	

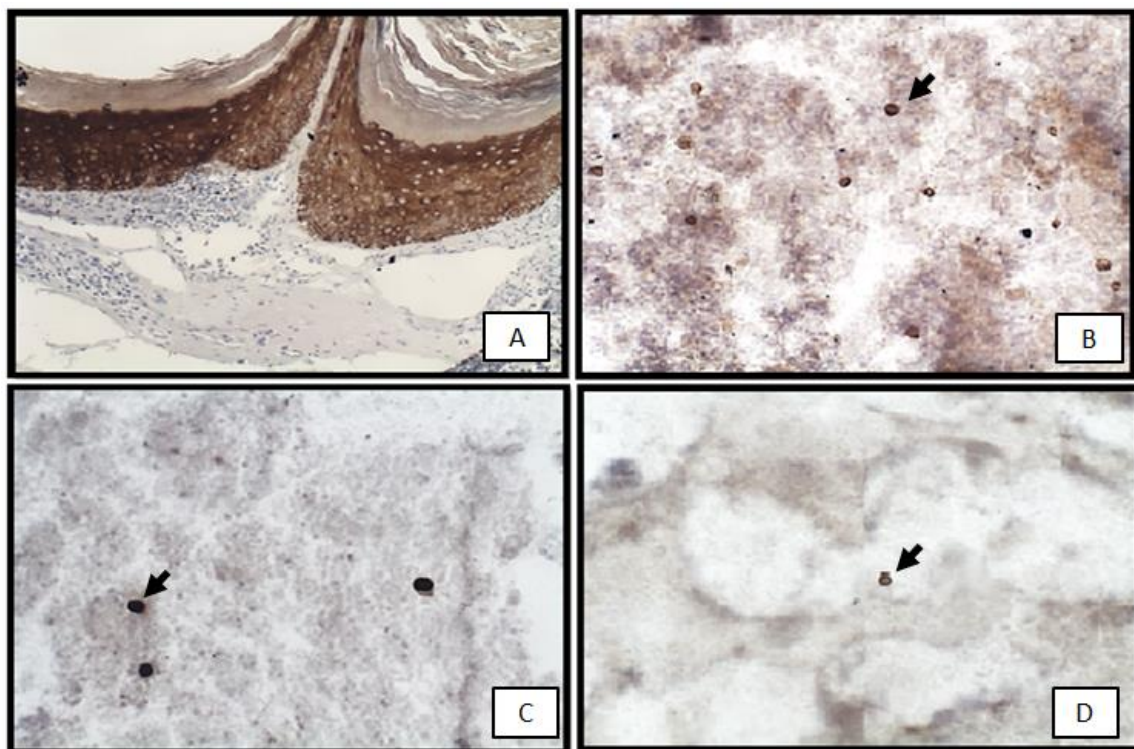


Figura 1. Imunohistoquímica (A) e imunocitoquímica (B, C e D) para PanCK 100x. Controle positivo: corte histológico de pele com expressão na epiderme (A). Citocentrifugado de sangue com células (seta) da linhagem MCF-7, em diferentes concentrações celulares: 1000 células/mL (B), 100 células/mL (C) e 1 célula/mL (D).

5. DISCUSSÃO

Nesse estudo, buscou-se comparar três métodos de separação de células tumorais, sendo um baseado em marcadores de superfície (imunomagnetismo), um em tamanho, ambos em combinação com separação por gradiente de densidade ou lise seletiva e outro em citocentrifugação, combinado com marcação de antígenos de superfície. Dentre os métodos analisados, a citocentrifugação foi o que gerou os resultados mais consistentes, chegando a um rendimento médio de 78%, conseguindo recuperar 40% das células em uma concentração extremamente baixa de 1 célula/mL (ver Tabela 6). Este é um dado relevante, pois nos outros métodos foram utilizadas quantidades maiores de células o que poderia ter facilitado a recuperação. A combinação de centrifugação por gradiente de densidade (Histopaque-1077[®]) com a tecnologia de imunomagnetismo MACS demonstrou um rendimento de 94% com as células sozinhas e 33% quando as células MCF-7 foram adicionadas ao sangue de doadores saudáveis (ver Tabela 1 e 2). No caso da linhagem MDA-MB-231, os melhores rendimentos foram de 20% na ausência de sangue e de 5% na presença. Esses resultados podem ser provavelmente atribuídos pela quantidade de epítomos presentes em cada célula. MDA-MB231 é mais agressiva e mais “mesenquimal” ao passo que MCF7 é mais epitelial e expressa maiores quantidades de EpCAM (TRIANAFILLU *et al.*, 2017), o epítomo utilizado para separação imunomagnética. Por fim, o método que utilizou os filtros da PluriStrainer[®] da PluriSelect quando combinado com Histopaque-1077[®] obteve uma taxa média de 7% e quando combinado com a hemólise de 14%.

Em trabalho semelhante a este, Kallergi e seus colaboradores (2016) também comparam as taxas de recuperação de diferentes métodos, utilizando

linhagens celulares. Eles, contudo, não utilizaram a combinação de técnicas para separação de células de linhagens. Quando comparadas a hemólise e a separação por gradiente de Ficoll no referido trabalho, a primeira foi melhor, tanto para MCF7 (com taxas de recuperação que variavam de 34 a 50%), e quanto para MDA-MB231 (taxas de recuperação de 21% a 50%). Esses pesquisadores testaram também a seleção imunomagnética, tanto positiva, quanto negativa, e notaram que a seleção negativa (baseada em CD45, marcador de leucócitos) resultou em recuperações melhores que a positiva (97% vs 75%, respectivamente). Os melhores rendimentos aqui obtidos, quando as células foram adicionadas ao sangue periférico, foram observados com a linhagem MCF7, e na combinação de Histopaque-1077[®] e separação imunomagnética positiva. A discordância em relação ao referido trabalho pode ter várias origens, sobretudo técnicas, entre as quais pode-se citar: o tipo de separação magnética (“beads” vs coluna de separação), marcador celular e anticorpo utilizados para a seleção. Por exemplo, somente para EpCAM, molécula muito utilizada na detecção de CTCs, há pelo menos 3 anticorpos distintos disponíveis comercialmente, com capacidades de detecção marcadamente distintas, como demonstrado por trabalhos anteriores (PAI;WEST, 2009).

A detecção, a enumeração e a caracterização molecular de CTCs são extremamente desafiadoras, pois as CTCs são muito raras e a quantidade de amostra disponível é bastante limitada. (LIANIDOU; STRATI; MARKOU, 2014). Em pacientes com cânceres sólidos avançados, as CTCs geralmente ocorrem em concentrações muito baixas, na ordem de aproximadamente uma CTC por dez milhões de glóbulos brancos em uma amostra de 7,5 mL de sangue,

representando um desafio para sua detecção e caracterização. (VAN-DER-TOOM *et al.*, 2016).

Riethdorf e seus colaboradores (2007) validaram o desempenho analítico do sistema CellSearch[®] para uso clínico em pacientes com câncer de mama metastático em dois laboratórios distintos, cuja diferença foi o método de contagem de células utilizado. Levando em consideração a acurácia e precisão desse teste, utilizaram quantidades definidas da linhagem SK-BR-3 de câncer de mama que foram adicionadas a tubos contendo 10 mL de sangue de doadores saudáveis. A taxa média de recuperação de células na faixa de 4 a 12 células foi de 82% e 80% em cada laboratório, sendo que os dados de recuperação das amostras variaram de 30% a 200% e 60% a 90%, respectivamente. Essa variação na taxa de recuperação pode ser atribuída à variação inerente na adição de números baixos de células. No entanto, em todas as amostras, independentemente do baixo número adicionado, foram detectadas células, o que confirmou a confiabilidade deste sistema para medição de CTCs e demonstrou sua aplicabilidade para a avaliação de rotina da eficácia terapêutica em pacientes com câncer de mama metastático. (RIETHDORF; COITH; PANTEL, 2007).

Como alternativa independente de expressão de epítomos, existe a possibilidade de separação por tamanho. Neste estudo, a taxa de recuperação pelo PluriStrainer[®] da PluriSelect não foi boa, mas outros estudos apresentam a separação por tamanho como uma opção promissora ao CellSearch[®]. A separação por tamanho descrita por Kallergi e seus colaboradores. (2016) resultou em taxas de recuperação superiores a 80% em todas as linhagens celulares de câncer de mama testadas, nas diferentes concentrações. No presente trabalho, entretanto, a separação por tamanho foi a de menor eficácia, resultando em menos de 10% de

recuperação. As diferenças de resultados podem ser devido aos métodos empregados. Aqui, utilizaram-se filtros de porosidade distinta, através do quais a passagem de solução de células era mediada por gravidade, na maioria dos casos, ou por pressão exercida por êmbolo. Kallergi e seus colaboradores. 2016, por outro lado, utilizaram o sistema ISET, através do qual as células são previamente tratadas em tampão próprio e depois forçadas através de filtros, por meio de pressão negativa. É provável que a pressão exercida por esse aparelho seja maior que aquela exercida pela gravidade, ou mesmo, pelo êmbolo acoplado ao filtro Pluriselect®, o que pode ter resultado em passagem menos eficiente de células. Ainda, não se sabe se o tampão utilizado para preparação da amostra para passagem das células pelo filtro ISET é hipotônico, o que promoveria o aumento de tamanho das células por osmose e, conseqüentemente, favoreceria a retenção nos filtros.

Van-der-Toom e seus colaboradores (2016) mostraram que a variação do diâmetro das células MCF-7 e MDA-MB231 suspensas seriam de 10 μm -14 μm e 14 μm -17 μm , respectivamente. Levando isso em consideração, o esperado seria que o filtro que tivesse a melhor recuperação fosse o de 10 μm , porém, os resultados aqui obtidos, mostraram que o filtro que teve a melhor recuperação foi o de 15 μm . Sabendo-se, então, que a MCF-7 teria um diâmetro menor em suspensão, foram utilizados os pluriBeads para aumentar o tamanho da célula e, por conseguinte, recuperá-las melhor.

Em outro trabalho comparativo entre métodos de separação, Gogoi e seus colaboradores (2016) compararam os valores de enumeração entre o sistema Celsee PREP 400 e CellSearch® usando amostras de 18 pacientes com câncer de próstata metastático. O sistema Celsee é baseado em diferenças no tamanho da

célula e deformação, sendo constituído de uma rede paralela de 4 chips microfluídicos, cada um com aproximadamente 56.320 câmaras de captura que asseguram que pequenas células do sangue escapem enquanto as células maiores fiquem presas e isoladas. As CTCs foram detectadas em 61% (11/18) dos pacientes, enquanto que a detecção por Celsee PREP foi de 94% (17/18). Mostrando que as contagens maiores de CTCs desse último sistema implicam em uma maior sensibilidade. Uma possível explicação para isso pode ser devido a presença de uma população de CTCs heterogêneas com uma baixa ou ausente expressão de EpCAM, não sendo possível capturá-las pelo anticorpo anti-EpCAM usado pelo sistema CellSearch®. (GOGOI *et al.*, 2016). É preciso, contudo, levar em consideração o tamanho amostral utilizada neste trabalho, o que indicaria a necessidade de validação em uma população maior.

Houve grande progresso na detecção de CTCs no sangue periférico na última década devido ao desenvolvimento de tecnologias baseadas na expressão da molécula de adesão da célula epitelial (Epithelial Cell Adhesion Molecule – EpCAM). Entretanto, foi relatado que apenas 70% dessas células expressariam esse antígeno de superfície (WENT, 2004), pois as células tumorais epiteliais geralmente sofrem transição epitelial-mesenquimal, através do qual CTCs sofrem mudança fenotípica, como a perda da expressão de marcadores epiteliais, e adquirem um fenótipo semelhante ao das células tronco, além de adquirir capacidade metastática e de sobrevivência na corrente sanguínea. Portanto, a perda da expressão de EpCAM, resultaria em limitação para as tecnologias de enriquecimento que dependem da captura de CTCs baseadas na imunodeteção com o anticorpo anti-EpCAM. (HYUNG; JUNG, 2016).

O isolamento e a caracterização de CTCs é uma forma de melhorar o diagnóstico e tratamento de câncer, e monitoramento de doença residual mínima. A biópsia líquida utilizando o sangue periférico tem a vantagem de fornecer um método minimamente invasivo para avaliação precoce e seriada de múltiplos marcadores preditivos e prognósticos durante a progressão da doença em diversos estágios. Entretanto, estudos exploratórios precisarão levar em consideração a possibilidade de heterogeneidade tumoral, tanto no tumor quanto nas CTCs, sendo necessários mais estudos para validar a utilidade clínica de marcadores moleculares precisos para uma variedade de tipos de tumores, como por exemplo, no câncer de pâncreas, câncer de pulmão de células não pequenas, câncer de ovário, mama, próstata, testicular, colorretal e carcinoma hepatocelular. (GOLD; CANKOVIC; FURTADO, 2015).

Várias tecnologias de isolamento de CTC existem, incluindo detecção baseada em ácido nucléico, captura usando anticorpos contra antígenos de superfície celular (microesferas e esferas magnéticas), citometria de fluxo e detecção baseada em propriedades biofísicas como diferenças de tamanho, densidade, forma, deformabilidade e carga. As vantagens dessas abordagens são que elas permitem a coleta de CTCs heterogêneas intactas, independentemente do nível de expressão do marcador de superfície epitelial EpCAM, com alto rendimento e baixo custo. (HYUNG; JUNG, 2016).

Em resumo, novas tecnologias aparecem a cada dia, porém, continua a haver necessidade de testes simples, com melhores detecções, não invasivos, de baixo custo, para detecção de cânceres, monitoramento e determinação da resposta à terapia. Através de uma separação e contagem de CTCs melhorada e sua caracterização molecular, com o desenvolvimento adicional das tecnologias

apresentadas, pode ser possível facilitar as estratégias de tratamento personalizado e melhores resultados.

6. CONCLUSÕES

Foram analisadas diferentes técnicas de separação de células tumorais circulantes do sangue periférico com base em tamanho, separação imunomagnética baseada em epítomos de superfície celular, e citocentrifugação seguida de imunocitoquímica. Aqui a citocentrifugação foi o método que apresentou os melhores resultados, mostrando-se como promissor método de separação de células, além de ser uma técnica rápida e barata.

Apesar de a citocentrifugação ter apresentado os melhores resultados, deve-se observar que o imunomagnetismo oferece uma promissora caracterização, facultando pesquisas adicionais e detecção molecular de CTCs em estudos clínicos. Não obstante, a taxa de recuperação do método aqui utilizado para a separação por tamanho não foi considerável, porém, diversos outros estudos apresentam esse método como tendo uma alta sensibilidade.

Embora tenha se encontrado um bom rendimento para a recuperação em baixa concentração de células de linhagem adicionadas a sangue, este estudo possui algumas limitações, levando em consideração o tamanho da amostra utilizada, a quantidade de vezes que os experimentos foram realizados e até as quantidades de células utilizadas em cada método. Isso indicaria a necessidade de validação em amostras maiores, sendo realizadas triplicatas, com correlação nas quantidades de células utilizadas nos diferentes experimentos, ou seja, há a necessidade de realização de estudos mais rigorosos para demonstrar o valor real das técnicas aqui empregadas.

Por fim, apesar das limitações encontradas nesse estudo, seus resultados podem ser considerados promissores, gerando incentivo para estudos futuros que

visem melhorar a taxa de recuperação de células tumorais, validar marcadores em coortes de amostras de pacientes, e avaliar o valor prognóstico de novos marcadores, que podem abordar a heterogeneidade das células tumorais circulantes.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALIX-PANABIÈRES C., PANTEL K. **Challenges in circulating tumour cell research.** Nature Reviews Cancer. 2014; 14(9):623-31.

BARROSO, A. F. A. **Nanobiossensores:** conceito e aplicações na avaliação de parâmetros bioquímicos e diagnóstico precoce de patologias. 2014. 66f. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade do Algarve, Portugal.

BENINI S., GAMBERI G., COCCHI S., GARBETTA J., ALBERTI L., RIGHI A, GAMBAROTTI M., PICCI P., FERRARI S. **Detection of circulating tumor cells in liquid biopsy from Ewing sarcoma patients.** Bolonha, Itália. Cancer Management and Research. 2018; 10:49-60

BOCKHORN M.; JAIN R.K.; MUNN L.L. **Active versus passive mechanisms in metastasis: do cancer cells crawl into vessels, or are they pushed?** Essen, Alemanha. Lancet Oncol. 2007; 8(5):444-8.

COOLS-LARTIGUE J., SPICER J., MCDONALD B., et al. **Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis.** Quebec, Canadá. The Journal of Clinical Investigation. 2013; 123(8):3446.

CRISTOFANILLI M., BUDD G.T., ELLIS M.J., STOPECK A., MATERA J., MILLER M.C., REUBEN J.M., DOYLE G.V., ALLARD W.J., TERSTAPPEN L.W., HAYES D.F. **Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer.** Houston, Estados Unidos. The New England Journal of Medicine. 2004; 351:781–91.

GOGOI P., SEPEHRI S., ZHOU Y., GORIN M.A., PAOLILLO C., CAPOLUONGO E., GLEASON K., PAYNE A., BONIFACE B., CRISTOFANILLI M., MORGAN T.M., FORTINA P., PIENTA K.J., HANDIQUE K., WANG Y. **Development of an Automated and Sensitive Microfluidic Device for Capturing and Characterizing Circulating Tumor Cells (CTCs) from Clinical Blood Samples.**

Michigan, Estados Unidos. PLoS One. 2016 Jan 25;11(1):e0147400.

GOLD B., CANKOVIC M., FURTADO L.V., et al. **Do circulating tumor cells, exosomes, and circulating tumor nucleic acids have clinical utility?** A report of the association for molecular pathology. Baltimore, Maryland. Elsevier. 2015; 17(3):209–224.

GUCK J., SCHINKINGER S., LINCOLN B., WOTTAWAH F., EBERT S., ROMEYKE M., LENZ D., ERICKSON H.M., ANANTHAKRISHNAN R., MITCHELL D, KÄS J, ULVICK S, BILBY C. **Optical deformability as an inherent cell marker for testing malignant transformation and metastatic competence.** Leipzig, Alemanha. Biophysical Journal. 2005; 88(5):3689-98.

GUERRA, M. R.; GALLO, C. V. M.; MENDONÇA, G. A. S. **Risco de Câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes.** Rio de Janeiro, Brasil. Revista Brasileira de Cancerologia, 2005; 51(3), p.227-234.

HANAHAN D., WEINBERG R.A. **Hallmarks of cancer: the next generation.** Lausana, Suíça. Cell, Elsevier. 2011 Mar 4;144(5):646-74.

HANAHAN D., WEINBERG R.A. **The hallmarks of cancer.** . Lausana, Suíça. Cell-Elsevier. 2000 Jan 7;100(1):57-70.

HOSHIMOTO S., SHINGAI T., MORTON D.L., et al. **Association between circulating tumor cells and prognosis in patients with stage III melanoma with sentinel lymph node metastasis in a phase III international multicenter trial.** Los Angeles, Califórnia. Journal Clinical Oncology. 2012; 30(31):3819–3826.

HYUN K.A., KOO G.B., HAN H., SOHN J., CHOI W., KIM S.I., JUNG H.I., KIM Y.S. **Epithelial-to-mesenchymal transition leads to loss of EpCAM and different physical properties in circulating tumor cells from metastatic breast cancer.** Seul, Coreia do Sul. Oncotarget. 2016 Apr 26;7(17):24677-87.

JOOSSE S.A., GORGES T.M., PANTEL K.. **Biology, detection, and clinical implications of circulating tumor cells.** Hamburg, Germany. EMBO Molecular Medicine. 2015; 7(1):1-11.

KALLERGI G., POLITAKI E., ALKAHTANI S., STOURNARAS C., GEORGOULIAS V. **Evaluation of Isolation Methods for Circulating Tumor Cells (CTCs).** Héракlion, Grécia. Cell Physiology and Biochemistry. 2016;40(3-4):411-419.

KARACHALIOU, N.; MAYO-DE-LAS-CASAS, C.; MOLINA-VILA, M. A.; ROSELL, R. **Real-time liquid biopsies become a reality in câncer treatment.** Barcelona, Espanha. Annals of Translational Medicine 2015; v. 3(3):36.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K; ASTER, J.C.; Robbins, **Patologia Básica**. 9. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. Cap. 5.

LIANIDOU, E.S.; STRATI, A.; MARKOU, A. **Circulating tumor cells as promising novel biomarkers in solid cancers**. Atenas, Grécia. Crit Rev Clin Lab Sci. 2014; 51: 160-171.

LOW W.S., WAN ABAS W.A. **Benchtop technologies for circulating tumor cells separation based on biophysical properties**. Kuala Lumpur, Malásia. Hindawi Publishing Corporation, Biomed Research International. 2015; 2015:239362.

LV Q.; ZHANG T.; YE J. **Prognostic value of circulating tumor cells in metastatic breast cancer: a systemic review and meta-analysis**. China. Clinical and Translational Oncology. 2016; 18:322-330.

MILTENYI BIOTEC. **MACS Cell Separation - Large Cell Columns**. Disponível em: <<http://www.miltenyibiotec.com/en/products-and-services/macs-cell-separation/columns/large-cell-columns-1.aspx>>. Acesso em: 25 mar. 2018.

MOTA E.M., GITIRANA L.B. **Técnicas citológicas**. In: CAPUTO, L.F.G. (Ed.). Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde. Rio de Janeiro, Brasil. Instituto Oswaldo Cruz, 2010. p. 190-231.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. **NCI Dictionary of Cancer Terms**. Disponível em: <<https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms?cdrid=779095>>. Acesso em: 03 nov. 2017.

PAI R.K., WEST R.B. **MOC-31 exhibits superior reactivity compared with Ber-EP4 in invasive lobular and ductal carcinoma of the breast: a tissue microarray study**. Stanford, Califórnia. Applied

Immunohistochemistry and Molecular Morphology. 2009 May;17(3):202-6.

PLURISELECT. **Cell Strainer - pluriStrainer**. Disponível em: <<https://www.pluriselect.com/products/cell-strainer/pluristrainer.html>>.

Acesso em: 25 mar. 2018.

RIETHDORF S., FRITSCHE H., MÜLLER V., RAU T., SCHINDLBECK C., RACK B., JANNI W., COITH C., BECK K., JÄNICKE F., JACKSON S., GORNET T., CRISTOFANILLI M., PANTEL K. **Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the CellSearch system**. Hamburgo, Alemanha. Clinical Cancer Research. 2007 Feb 1;13(3):920-8.

TRIANAFILLU U.L., PARK S., KLAASSEN N.L., RADDATZ A.D., KIM Y. **Fluid shear stress induces cancer stem cell-like phenotype in MCF7 breast cancer cell line without inducing epithelial to mesenchymal transition**. Tuscaloosa, Alabama. International Journal of Oncology. 2017 Mar;50(3):993-1001.

VAN-DER-TOOM, E. E.; VERDONE, J.E.; GORIN, M.A.; PIENTA, K.J. **Technical challenges in the isolation and analysis of circulating tumor cells**. Baltimore, Estados Unidos. Oncotarget, 2016; v. 7, n. 38.

VONA G., SABILE A., LOUHA M., SITRUK V., ROMANA S., SCHÜTZE K., CAPRON F., FRANCO D., PAZZAGLI M., VEKEMANS M., LACOUR B., BRÉCHOT C., PATERLINI-BRÉCHOT P. **Isolation by size of epithelial tumor cells : a new method for the**

immunomorphological and molecular characterization of circulating tumor cells. Paris, França. American Journal of Pathology. 2000; 156(1):57-63.



WENT P.T., LUGLI A., MEIER S., BUNDI M., MIRLACHER M., SAUTER G. **Frequent EpCam protein expression in human carcinomas.** Human Pathology. 2004;35:122–8.


WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cancer.** Disponível em: <<http://www.who.int/cancer/en/>>. Acesso em: 20 out. 2017.

8. ANEXOS

8.1 ANEXO A – Autorização do Comitê de Ética

Saúde

 Informe o E-mail
 Informe a Senha

[Esqueceu a senha?](#) [Cadastre-se](#) 

Você está em: [Público](#) > [Confirmar Aprovação pelo CAAE ou Parecer](#)

CONFIRMAR APROVAÇÃO PELO CAAE OU PARECER

Informe o número do CAAE ou do Parecer:

Número do CAAE:	Número do Parecer:	
<input type="text" value="34710214.9.0000.5558"/>	<input type="text"/>	<input type="button" value="Pesquisar"/>

Esta consulta retorna somente pareceres aprovados. Caso não apresente nenhum resultado, o número do parecer informado não é válido ou não corresponde a um parecer aprovado.

DETALHAMENTO

Título do Projeto de Pesquisa:		
<input type="text" value="genética para descoberta de biomarcadores"/>		
Número do CAAE:	Número do Parecer:	
<input type="text" value="34710214.9.0000.5558"/>	<input type="text" value="2406278"/>	
Quem Assinou o Parecer:	Pesquisador Responsável:	
<input type="text" value="Antônio Carlos Rodrigues da Cunha"/>	<input type="text" value="Andréa Barretto Motoyama"/>	
Data Início do Cronograma:	Data Fim do Cronograma:	Contato Público:
<input type="text" value="01/09/2014"/>	<input type="text" value="01/04/2016"/>	<input type="text" value="Andréa Barretto Motoyama"/>

Este sistema foi desenvolvido para os navegadores Internet Explorer (versão 7 ou superior), ou Mozilla Firefox (versão 9 ou superior).