

Artigo  
originalQue outra utilidade clínica  
poderão ter as ascites no  
carcinoma do ovário?*What other clinical use may ovarian carcinoma ascites have?***Autores:**

© Mariana Nunes<sup>1,2</sup>, Diana Nunes<sup>1,3</sup>, Verónica Ferreira<sup>4</sup>, Cláudia Lobo<sup>4</sup>, Paula Monteiro<sup>4</sup>, Miguel Henriques Abreu<sup>5,6</sup>, Carla Bartosch<sup>4,5,7</sup>, Sara Ricardo<sup>1,3,8</sup>

**Afiliação:**

1. Instituto de Investigação e Inovação em Saúde (i3S) da Universidade do Porto, Porto, Portugal
2. Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto, Porto, Portugal
3. Unidade de Investigação em Toxicologia (TOXRUN), Cooperativa de Ensino Superior Politécnico e Universitário (CESPU), Gandra, Portugal
4. Serviço de Anatomia Patológica, Instituto Português de Oncologia do Porto (IPOP), , Porto, Portugal
5. Porto Comprehensive Cancer Center Raquel Seruca (Porto.CCC), Porto, Portugal
6. Serviço de Oncologia Médica, Instituto Português de Oncologia do Porto (IPOP), Porto, Portugal
7. Grupo de Epigenética e Biologia do Cancro do Centro de Investigação do IPOP (CI-OPOP) / RISE@CI-IPOP (Rede de Investigação em Saúde), Instituto Português de Oncologia do Porto (IPOP), Porto, Portugal
8. Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, Porto, Portugal

**ORCID:**

Mariana Nunes - 0000-0002-4733-5778

**Autor para correspondência:**

Sara Ricardo  
Instituto de Investigação e Inovação em Saúde (i3S) da Universidade do Porto,  
4200-135 Porto, Portugal  
sricardo@i3s.up.pt

**Recebido/Received:** 2023-02-06

**Aceite/Accepted:** 2024-03-29

**Publicado/Publicado:** 2024-06-26

© Author(s) (or their employer(s)) and Port J Oncol 2024. Re-use permitted under CC BY-NC. No commercial re-use.  
© Autor (es) (ou seu (s) empregador (es)) e Rev Port Oncol 2024. Reutilização permitida de acordo com CC BY-NC. Nenhuma reutilização comercial.

**Resumo**

A ascite no carcinoma do ovário (CO) é um dos sinais de metastização peritoneal e está presente frequentemente ao diagnóstico nos estadios avançados e na recidiva da doença. Este fluido seroso pode suportar o diagnóstico sendo drenado para alívio sintomático nas fases avançadas e posteriormente descartado. Neste contexto, a análise do líquido ascítico é uma oportunidade única para monitorizar a cinética das células tumorais presentes durante a progressão da doença sem necessidade de procedimentos invasivos adicionais. O objetivo deste trabalho foi estimar o potencial deste material biológico para avaliar a expressão de proteínas associadas com a resistência à quimioterapia (QT). Recebemos as ascites de pacientes do IPOP diagnosticadas com carcinoma seroso de alto grau obtidas ao diagnóstico (n=8) e durante o tratamento (n=8). Após a centrifugação de todo o volume do líquido ascítico drenado, as amostras foram fixadas em formol e incluídas em Histogel™ seguindo-se o processamento histológico. Nestas amostras citológicas, foi realizada a técnica de imunocitoquímica para avaliar a expressão de quatro biomarcadores associados com a resistência à QT (ALDH1, SOX2, CD44v6 e P-gp). Os nossos resultados indicam que a centrifugação do volume total drenado das pacientes contem, em geral, um número de células satisfatório para realizar diversas técnicas histológicas e estudos moleculares. A expressão dos marcadores de células estaminais de cancro, ALDH1, SOX2 e CD44v6, em amostras antes da QT foi frequentemente negativa ou com baixos níveis de expressão. No entanto, nas amostras recebidas após QT, observa-se maior número de amostras com expressão de, pelo menos, um destes biomarcadores. A expressão do marcador de resistência a múltiplas drogas (P-gp) foi exclusivamente observada em amostras de pacientes com doença refratária. Os resultados deste estudo são indicadores do potencial da avaliação de marcadores estaminais ou associados com a resistência à QT nos líquidos ascíticos drenados de pacientes durante o percurso da doença e revelam uma nova utilidade clínica das ascites no contexto do CO.

**Palavras-chave:** Carcinoma do ovário; Ascite; Processamento citológico; Biomarcadores; Resistência à quimioterapia.

**Abstract**

*Ascites in ovarian carcinoma (OC) is one of the signs of peritoneal metastization and is often present at diagnosis in advanced stages and disease recurrence. This serous fluid can support the diagnosis and be drained for symptomatic relief in advanced phases and subsequently discarded. In this context, ascitic fluid analy-*

sis is a unique opportunity to monitor the kinetics of tumour cells during disease progression without the need for additional invasive procedures. The objective of this work was to estimate the potential of this biological material to evaluate the expression of proteins associated with resistance to chemotherapy (QT). We received ascites from IPOP patients diagnosed with high-grade serous carcinoma obtained at diagnosis (n=8) and during treatment (n=8). After centrifugation of the entire volume of the drained ascitic liquid, the samples were fixed in formaldehyde and embedded in Histogel™, followed by histological processing. In these cytological samples, the immunocytochemistry technique was performed to evaluate the expression of four biomarkers associated with resistance to therapy (ALDH1, SOX2, CD44v6 and P-gp). Our results indicate that centrifugation of the total volume drained from patients contains, in general, a satisfactory number of cells to perform several histological techniques and molecular studies. The expression of cancer stem cell markers, ALDH1, SOX2 and CD44v6, in samples before QT was often negative or with low expression levels. However, in the samples received after QT, there is an increase in the number of samples with an expression of at least one of these biomarkers. The expression of the multidrug resistance marker (P-gp) was exclusively observed in samples of patients after QT. The results of this study are indicators of the potential of the evaluation of stem markers associated with resistance to QT in ascitic fluids drained from patients during the disease course and reveal a new clinical utility of ascites in the context of OC.

**Key-words:** Ovarian carcinoma; Ascites; Cytologic processing; biomarkers; resistance to therapy.

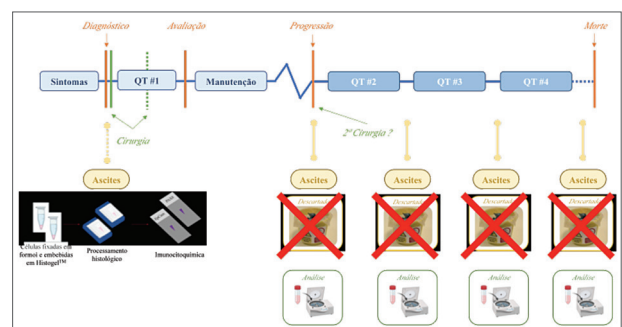
## Introdução

O carcinoma do ovário (CO) permanece como a neoplasia mais letal do aparelho reprodutor feminino, sendo o oitavo cancro com maior incidência e a sétima causa de morte por cancro em mulheres em todo o mundo.<sup>1</sup> O carcinoma seroso de alto grau representa o subtipo histológico mais agressivo, principalmente pela dificuldade de deteção em estadios precoces, sendo diagnosticado frequentemente com presença de disseminação peritoneal.<sup>2</sup> Apesar de alguns avanços nas últimas décadas, nomeadamente com a aprovação dos inibidores da PARP e inibidores da angiogénese, o tratamento *standard* baseia-se na cirurgia de citorredução ótima e a quimioterapia (QT) com o duplete Carboplatina e Paclitaxel.<sup>3</sup> A QT neoadjuvante pode ser efetuada em pacientes para diminuir o volume tumoral e aumentar a probabilidade de sucesso da cirurgia citoredutora (**Figura 1**).<sup>4</sup>

A ascite surge de um processo inflamatório que induz a acumulação anormal de uma grande quantidade de líquido na cavidade peritoneal<sup>5</sup> podendo ocorrer em diferentes patologias, incluindo cirrose, pancreatite, nefrite, insuficiência cardíaca e cancro.<sup>6</sup> Mais de um terço das pacientes com CO apresenta ascite.<sup>7</sup> Quando é detetada ao diagnóstico, é usada como método complementar de diagnóstico, no entanto, após esta

fase, este líquido seroso é drenado para alívio de sintomas e é descartado.<sup>8,9</sup> A composição do líquido ascítico no contexto de malignidade é muito complexa e inclui componentes celulares, tais como, células tumorais, imunológicas, estromais e mesoteliais, e componentes acelulares, como por exemplo, citocinas, quimiocinas e metabolitos, que promovem a disseminação peritoneal, sendo a sua presença e volume um indicador de mau prognóstico.<sup>10,11</sup> As ascites malignas são uma excelente fonte de material para investigação em oncologia devido ao seu volume e localização de fácil acesso, podendo ser utilizadas para avaliação da cinética tumoral resultante da resposta aos tratamentos oncológicos (**Figura 1**).<sup>12</sup>

O foco principal deste trabalho foi avaliar o potencial das ascites para prever a resistência à QT através da avaliação da expressão de proteínas associadas com a quimiorresistência. Para isso, avaliamos vários marcadores através da técnica de imunocitoquímica, nas células presentes nas ascites obtidas de pacientes com carcinoma seroso de alto grau, antes e após QT.



**Figura 1.** Esquema representativo da evolução clínica do carcinoma do ovário e uma nova abordagem de aproveitamento dos líquidos ascíticos ao longo do percurso da doença.

## Material e Métodos

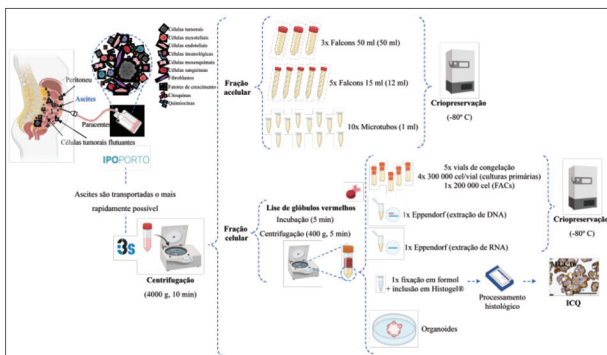
### Coorte de Pacientes

Neste estudo incluímos 13 pacientes diagnosticadas com carcinoma seroso de alto grau do ovário que desenvolveram ascite, em seguimento no IPOP entre 2017 e 2022. Foram usadas 16 amostras de líquidos ascíticos, colhidos destas doentes para Biobanco. Foram colhidas 8 amostras de ascites antes da QT e 8 amostras de ascites após QT. Para 3 pacientes, nomeadamente, HGSC2, HGSC5 e HGSC11 foram colhidas ascites antes da QT (HGSC2.1, HGSC5.1 e HGSC11.1) e após QT (HGSC2.2, HGSC5.2 e HGSC11.2). Todas as amostras foram selecionadas de acordo com as diretrizes éticas locais, conforme estipulado pela Declaração de Helsinki, e aprovadas pelo Comitê de Ética do IPOP (REF CES.092R1/019).

### Processamento e Armazenamento das Ascites

O volume total da ascite foi centrifugado (400 g, durante 10 minutos) na sua totalidade e as frações celulares e acelulares

foram separadas. O sobrenadante foi imediatamente armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  (de acordo com a Figura 2) e a componente celular foi submetida a um tampão de lise das hemácias, de acordo com as instruções do fabricante. Em resumo, as células foram ressuspensas no tampão de lise de glóbulos vermelhos (1x) e incubadas durante 5 minutos, à temperatura ambiente e com agitação ocasional. A reação foi interrompida pela adição de uma solução salina tamponada de fosfato (1x), seguindo-se uma centrifugação a 400 g, durante 5 minutos. A fração celular foi dividida e separada para diferentes propósitos, tal como descrito na **Figura 2**. Especificamente para este estudo, uma porção da fração celular foi fixada em formol tamponado 4% (v/v) (AppliChem, Barcelona, Espanha), durante aproximadamente 1 hora, à temperatura ambiente e com agitação. De seguida, a porção celular foi ressuspensa em Histogel™ aquecido e liquefeito (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EUA) e rapidamente centrifugada a 3000 rpm, durante 1 minuto, à temperatura ambiente, ficando a solidificar durante 30 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . O cone de Histogel™ com o *pellet* de células foi colocado numa cassetete histológica, seguindo para o processamento histológico *standard*, inclusão em parafina e corte histológico.



**Figura 2.** Esquema representativo do processamento e armazenamento das ascites e as possíveis utilidades das frações celulares e acelulares. ICQ – Imunocitoquímica.

## Imunocitoquímica

A imunocitoquímica foi realizada conforme descrito previamente noutra publicação.<sup>13</sup> Resumidamente, após a desparafinação e hidratação, foi realizada a recuperação antigénica através do calor ( $98^{\circ}\text{C}$ ) com uma solução de tampão citrato (1:100 a pH 6,0; ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EUA) ou ácido etilenodiaminotetracético (EDTA; 1:100; ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EUA). A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada por uma solução de peróxido de hidrogénio a 3% (v/v) (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EUA). De seguida, as lâminas foram incubadas com anticorpos monoclonais específicos para detetar as proteínas mucina 16 (MUC16; 1:60, M11, Dako, Santa Clara, CA, EUA), mesotelina (MSLN; 1:50, SP74, ThermoFisher Scientific, Waltham,

MA, EUA), enzima aldeído desidrogenase 1 (ALDH1; 1:200, D9Q8E, Cell Signaling Technology, Massachusetts, MA, EUA), SRY-box fator de transcrição 2 (SOX2; 1:25, SP76, Cell Marque, California, CA, EUA), CD44v6 (1:100; MA54, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e P-glicoproteína (P-gp; 1:1200, EPR10364-57, Abcam, Cambridge, Reino Unido), durante 1 hora, à temperatura ambiente. O sistema de deteção utilizado foi o *kit* da Dako REAL™ EnVision™ Detection System Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse (Agilent Dako, Santa Clara, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Os anticorpos primários foram detetados utilizando um anticorpo secundário com polímero de peroxidase e a diaminobenzidina foi utilizada como cromogénico para visualizar a reação. A hematoxilina foi usada para o contraste nuclear, seguindo-se a desidratação, diafanização e montagem das lâminas. Foram incluídos controlos negativos e positivos em cada uma das reações. As lâminas foram avaliadas num microscópio Brightfield Leica DM2000 LED (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha), por três observadores independentes (SR, MN e DN) que registaram a percentagem de células tumorais marcadas segundo os intervalos: (0%) Negativo; (1 – 10%) Baixo; (11 – 25%) Baixo/Moderado; (26 – 50%) Moderado; (51 – 75%) Moderado/Alto; e (76 – 100%) Alto.<sup>13-15</sup>

## Resultados

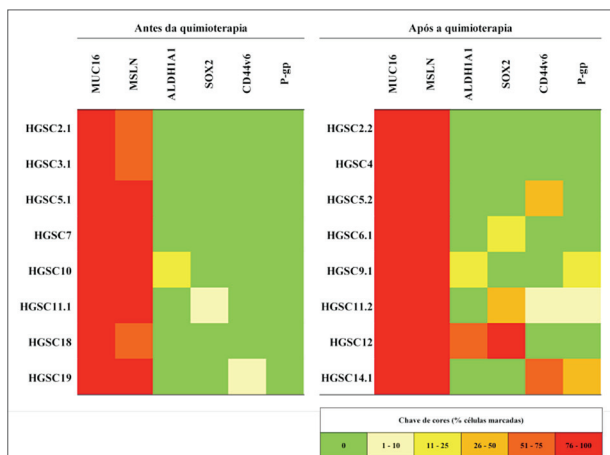
O volume dos líquidos ascíticos recebidos variou entre 1 e 4 litros, aproximadamente. Em geral, a centrifugação da totalidade do líquido permitiu a obtenção de um *pellet* de células nucleadas suficiente para fazer um citobloco e a congelação de parte deste material celular a  $-80^{\circ}\text{C}$ . A grande maioria das amostras foi obtida de pacientes em estadios avançados da doença (FIGO III e IV).

Confirmamos, nas nossas amostras, uma alteração da expressão das glicoproteínas, MUC16 e MSLN, habitualmente descritas como sobre-expressas no carcinoma seroso de alto grau.<sup>16,17</sup> Todas as nossas amostras (16/16) apresentam uma elevada expressão membranar (76 – 100% das células tumorais marcadas) da MUC16, independentemente de serem obtidas antes ou após QT (**Figura 3**). Relativamente à expressão da MSLN, os resultados formam semelhantes, verificando-se uma elevada expressão membranar (51 – 75% e 76 – 100% das células tumorais marcadas, 3/16 e 13/16, respetivamente) em todas as amostras, independentemente de serem obtidas antes ou após QT (**Figura 3**).

A expressão da ALDH1 e do SOX2, previamente descritos como marcadores de células estaminais no CO<sup>13</sup> é variável nas nossas amostras. Observou-se uma baixa expressão da ALDH1 em 1/8 amostras obtidas antes da QT e uma expressão baixa ou moderada/alta em 2/8 amostras obtidas após QT (**Figura 3**). De modo semelhante, a expressão do SOX2 foi, na maioria dos casos, classificada como negativa (7/8) ou baixa expressão (1/8) para as amostras obtidas antes da QT. No entanto, em

3/8 das amostras obtidas após QT, foi observada uma expressão baixa/moderada (2/8) e alta (1/8) do SOX2 (Figura 3). A expressão do CD44v6, outro marcador de células estaminais habitualmente presente na população inicial do CO e associado à metastização<sup>13</sup>, foi frequentemente negativa (7/8) ou baixa/moderada (1/8) em amostras obtidas antes da QT. No entanto, o número de casos com expressão de CD44v6 aumentou nas amostras obtidas após a QT (3/8) (Figura 3).

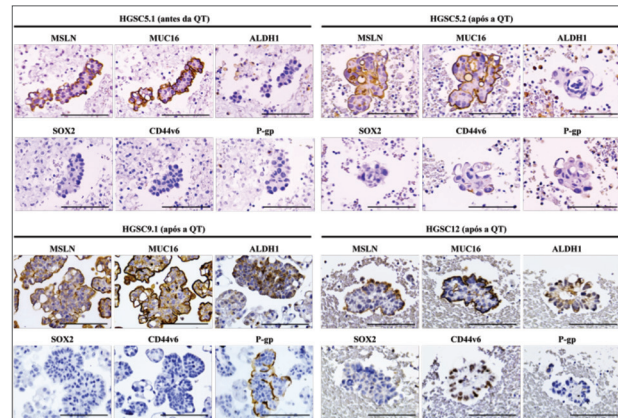
A expressão da P-gp, uma bomba de efluxo transmembranar que impede a captação de drogas antineoplásicas<sup>18</sup> foi variável. Em todas as amostras obtidas ao diagnóstico, a expressão da P-gp foi negativa (8/8), mas nas amostras obtidas após QT foi observado um aumento de expressão (3/8 amostras positivas) (Figura 3).



**Figura 3.** Mapa de calor demonstrando a percentagem de células tumorais marcadas para MUC16, MSLN, ALDH1, SOX2, CD44v6 e P-gp em ascites de pacientes com cancro do ovário obtidas antes (n=8) e após (n=8) os tratamentos com quimioterapia.

Na Figura 4, apresentamos imagens representativas para a expressão de MUC16, MSLN, ALDH1, SOX2, CD44v6 e P-gp de amostras de pacientes obtida antes (HGSC5.1) e após (HGSC5.2, HGSC9.1 e HGSC12) tratamento com QT, que apresentam diferentes perfis de expressão. Em todas as amostras obteve-se elevada expressão das glicoproteínas MUC16 e a MSLN, independente de serem obtidas antes ou após QT. Na amostra HGSC5.1, obtida de uma paciente antes da QT, observou-se negatividade para a ALDH1, o SOX2, o CD44v6 e a P-gp (Figura 3 e 4). Para a mesma paciente, mas após QT (HGSC5.2), manteve-se a ausência de expressão para a ALDH1, SOX2 e P-gp, mas foi registado o aparecimento de uma expressão moderada (26 – 50% de células tumorais marcadas) de CD44v6 (Figura 3 e 4). Na amostra HGSC9.1, obtida de uma paciente após QT, observou-se uma baixa/moderada expressão (cerca de 11 – 25% das células tumorais marcadas) para a ALDH1 e a P-gp; e negatividade para o SOX2 e o CD44v6 (Figura 3 e 4). Por outro lado, a amostra HGSC12, também obtida após QT, apresentou uma elevada expressão (51 – 75% e 76 – 100% de células tumorais marcadas) para a ALDH1 e o

SOX2, respetivamente, mas foi negativa para o CD44v6 e a P-gp (Figura 3 e 4). Os perfis de expressão destes biomarcadores são variados, mas observa-se uma tendência para um aumento da positividade em pacientes após QT.



**Figura 4.** Imagens representativas das expressões para a MSLN, MUC16, ALDH1, SOX2, CD44v6 e P-gp, em amostras obtidas antes da quimioterapia, nomeadamente a paciente HGSC5.1 e amostras obtidas após quimioterapia, designadamente as pacientes HGSC5.2, HGSC9.1 e HGSC12. Nas amostras destas pacientes podemos observar diferentes perfis de expressão para os biomarcadores estudados. Todas as imagens foram obtidas num microscópio de campo claro Leica DM2000 LED (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha), numa ampliação de 400x. A escala representa 100 µm.

## Discussão

Neste trabalho pretendemos chamar a atenção para a utilidade clínica do líquido ascítico no CO, principalmente no contexto após QT. O procedimento atual de descarte destes líquidos deverá ser reavaliado, equacionando-se a pertinência da avaliação da expressão de marcadores associados com a resistência à QT através da técnica de imunocitoquímica e/ou outras técnicas de biologia molecular. A baixa celularidade ao nível das populações tumorais presentes nas ascites tem vindo a ser descrita como a principal desvantagem do seu estudo.<sup>19</sup> Atualmente, relativamente a efusões serosas para diagnóstico, são aceites que sejam estudados entre 50 e 75 ml de fluídos para diminuir o potencial de resultados falso-negativos.<sup>20</sup> No entanto, é importante refletir sobre esta técnica de processamento dos líquidos ascíticos, sendo avaliada a importância de processar/centrifugar o volume total do líquido drenado para que se possa obter o máximo de rendimento. Esta reflexão poderá também ser feita noutros modelos tumorais cujo processo de metastização se associa a ascite, por exemplo, cancro gástrico difuso, cancro pancreático, entre outros. A maximização da celularidade deste tipo de amostras possibilitará a preservação destas células nos biobancos nacionais, permitindo vários estudos ao longo do decurso da doença.

Os nossos resultados relativamente à expressão da MUC16 e MSLN demonstraram elevada expressão membranar para to-



das as amostras, o que está de acordo com as evidências publicadas.<sup>16,21</sup> Neste estudo, foram avaliadas as expressões de alguns marcadores associados com estaminalidade e resistência à QT (SOX2, ALDH1, CD44v6 e P-gp) em apenas 16 amostras. No entanto, salientamos que será importante avaliar a expressão de outros biomarcadores preditivos da resistência à QT, por exemplo, o RAD51<sup>22,23</sup> e CTR1<sup>24,25</sup>, e aumentar a coorte de pacientes para que os resultados obtidos sejam validados. A expressão de SOX2 e ALDH1 foi descrita em células de carcinoma seroso de alto grau com maior capacidade tumorigênica e de invasão, e foram correlacionados com a quimiorresistência e pior prognóstico.<sup>26-28</sup> Os nossos resultados mostram que a expressão destes dois biomarcadores, e também do CD44v6, foi mais elevada em amostras obtidas após QT em comparação com as amostras obtidas ao diagnóstico. A P-gp é frequentemente expressa por células de várias neoplasias, incluindo carcinomas do ovário e foi correlacionada com um fenótipo de multirresistência<sup>29</sup> e com pior prognóstico<sup>30</sup>. Os nossos resultados mostram que a P-gp está mais frequentemente expressa em amostras após QT em comparação com amostras obtidas antes do tratamento com QT. Algumas amostras apresentam expressão destes marcadores associados à resistência à QT ao diagnóstico. Estes diferentes fenótipos antes da QT revelam uma heterogeneidade tumoral que, nestes casos, pode estar associada com a resistência intrínseca.<sup>31</sup> Assim, tanto em amostras obtidas antes como após QT, o estudo imunocitoquímico da componente celular dos líquidos ascíticos permite uma caracterização fenotípica dos diferentes perfis tumorais de resistência e obter informações que poderão ter utilidade na prática clínica.

## Conclusão

Os resultados deste estudo são indicadores do potencial da avaliação de marcadores estaminais ou associados com a resistência à QT nos líquidos ascíticos drenados de pacientes durante o percurso da doença, revelando uma nova utilidade clínica das ascites no CO. A centrifugação do volume total das amostras permitiu um elevado rendimento a nível de celularidade, possibilitando o estudo imunocitoquímico com vários biomarcadores. Nestas amostras citológicas, observamos agrupamentos de células tumorais com expressão de duas glicoproteínas (MUC16 e MSLN) tipicamente expressas nos tumores sólidos. A expressão de marcadores de células estaminais de cancro e/ou marcadores de quimiorresistência foi mais frequentemente observada em amostras após QT em comparação com amostras obtidas antes da QT. Estes resultados destacam a importância da avaliação do material celular presente nas ascites, constituindo uma oportunidade única para realizar estudos longitudinais em contextos tumorais onde a obtenção de amostras biológicas do tumor (biópsias) é difícil ou não é clinicamente possível.

## Agradecimentos

Mariana Nunes e Diana Nunes agradecem à FCT/MCTES e UE pelo apoio financeiro das bolsas de doutoramento (2020.04720.BD e 2021.05081.BD, respetivamente) que foram cofinanciadas pelo Fundo Social Europeu (FSE) através do Programa Operacional Regional Norte (Norte 2020).

## Declaração de Contribuição / Contributorship Statement

MN, DN: Execução do estudo, processamento de amostras, análise e interpretação de dados, elaboração do manuscrito

VF, CL, PM: Recolha e processamento de amostras, interpretação de dados e revisão crítica no manuscrito

SR, CB, MHA: Desenho e execução do estudo, análise e interpretação dos dados, revisão crítica e alterações ao manuscrito

MN, DN: Execution of the study, processing of samples, analysis and interpretation of data, preparation of the manuscript

VF, CL, PM: Sample collection and processing, data interpretation and critical review of the manuscript

SR, CB, MHA: Study design and execution, data analysis and interpretation, critical review and manuscript changes

## Responsabilidades Éticas / Ethical Disclosures

**Conflitos de Interesse:** Os autores declaram não haver conflitos de interesse

**Confidencialidade dos dados:** Durante todo o processo de investigação, foi assegurada a confidencialidade dos dados dos doentes

**Fontes de financiamento:** Este projeto foi apoiado pelo projeto "HOPE – Improving Ovarian Cancer Patient's survival" uma doação de uma paciente com cancro do ovário ao Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto (IPATIMUP).

**Proteção de Pessoas e Animais:** O estudo foi realizado de acordo com a Declaração de Helsínquia e aprovado pela Comissão de Ética do CES Instituto Português de Oncologia do Porto (IPO-PORTO, Ref.92R1/019).

**Proveniência e Revisão por Pares:** Não comissionado, revisão externa por pares

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflicts of interest

**Data confidentiality:** Throughout the investigation pro-

cess, the confidentiality of patient data was ensured

**Funding sources:** This project was supported by the project “HOPE – Improving Ovarian Cancer Patients Survival”, a donation from an ovarian cancer patient to the Institute of Molecular Pathology and Immunology of the University of Porto (IPATIMUP).

**Protection of People and Animals:** The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee of the CES Portuguese Institute of Oncology of Porto (IPO-PORTO, Ref.92R1/019).

**Provenance and Peer Review:** Not commissioned, external peer review

## References

1. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Dyba T, Randi G, Bettio M, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018. *Eur J Cancer*. 2018;103:356-87.
2. Lisio MA, Fu L, Goyeneche A, Gao ZH, Telleria C. High-Grade Serous Ovarian Cancer: Basic Sciences, Clinical and Therapeutic Standpoints. *Int J Mol Sci*. 2019;20(4).
3. Cannistra SA. Cancer of the ovary. *N Engl J Med*. 2004;351(24):2519-29.
4. Vergote I, Trope CG, Amant F, Kristensen GB, Ehlen T, Johnson N, et al. Neoadjuvant chemotherapy or primary surgery in stage IIIC or IV ovarian cancer. *N Engl J Med*. 2010;363(10):943-53.
5. Nunes M, Ricardo S. Chemoresistance in Ovarian Cancer: The Role of Malignant Ascites. In: Lele S, editor. *Ovarian Cancer*. Brisbane (AU)2022. p. 27-42.
6. Chiejina M, Kudaravalli P, Samant H. Ascites. *StatPearls*. Treasure Island (FL)2022.
7. Ahmed N, Riley C, Oliva K, Rice G, Quinn M. Ascites induces modulation of alpha6beta1 integrin and urokinase plasminogen activator receptor expression and associated functions in ovarian carcinoma. *Br J Cancer*. 2005;92(8):1475-85.
8. Kipps E, Tan DS, Kaye SB. Meeting the challenge of ascites in ovarian cancer: new avenues for therapy and research. *Nat Rev Cancer*. 2013;13(4):273-82.
9. Rickard BP, Conrad C, Sorrin AJ, Ruhli MK, Reader JC, Huang SA, et al. Malignant Ascites in Ovarian Cancer: Cellular, Acellular, and Biophysical Determinants of Molecular Characteristics and Therapy Response. *Cancers (Basel)*. 2021;13(17).
10. Hinshaw DC, Shevde LA. The Tumor Microenvironment Innately Modulates Cancer Progression. *Cancer Res*. 2019;79(18):4557-66.
11. Worzfeld T, Pogge von Strandmann E, Huber M, Adhikary T, Wagner U, Reinartz S, et al. The Unique Molecular and Cellular Microenvironment of Ovarian Cancer. *Front Oncol*. 2017;7:24.
12. Zhang X, Chen L, Liu Y, Xu Y, Zhang X, Shi Y, et al. Improving the cytological diagnosis of high-grade serous carcinoma in ascites with a panel of complementary biomarkers in cell blocks. *Cytopathology*. 2018;29(3):247-53.
13. Nunes M, Pacheco F, Coelho R, Leitao D, Ricardo S, David L. Mesothelin Expression Is Not Associated with the Presence of Cancer Stem Cell Markers SOX2 and ALDH1 in Ovarian Cancer. *Int J Mol Sci*. 2022;23(3).
14. Marcos-Silva L, Ricardo S, Chen K, Blixt O, Arigi E, Pereira D, et al. A novel monoclonal antibody to a defined peptide epitope in MUC16. *Glycobiology*. 2015;25(11):1172-82.
15. Ricardo S, Marcos-Silva L, Pereira D, Pinto R, Almeida R, Soderberg O, et al. Detection of glyco-mucin profiles improves specificity of MUC16 and MUC1 biomarkers in ovarian serous tumours. *Mol Oncol*. 2015;9(2):503-12.
16. Coelho R, Marcos-Silva L, Ricardo S, Ponte F, Costa A, Lopes JM, et al. Peritoneal dissemination of ovarian cancer: role of MUC16-mesothelin interaction and implications for treatment. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2018;18(2):177-86.
17. Coelho R, Ricardo S, Amaral AL, Huang YL, Nunes M, Neves JP, et al. Regulation of invasion and peritoneal dissemination of ovarian cancer by mesothelin manipulation. *Oncogenesis*. 2020;9(6):61.
18. Seelig A. P-Glycoprotein: One Mechanism, Many Tasks and the Consequences for Pharmacotherapy of Cancers. *Front Oncol*. 2020;10:576559.
19. Nambirajan A, Jain D. Cell blocks in cytopathology: An update. *Cytopathology*. 2018;29(6):505-24.
20. Pinto D, Chandra A, Crothers BA, Kurtycz DFI, Schmitt F. The international system for reporting serous fluid cytopathology-diagnostic categories and clinical management. *J Am Soc Cytopathol*. 2020;9(6):469-77.
21. Zurawski VR, Jr., Orjaseter H, Andersen A, Jellum E. Elevated serum CA 125 levels prior to diagnosis of ovarian neoplasia: relevance for early detection of ovarian cancer. *Int J Cancer*. 1988;42(5):677-80.
22. Feng Y, Wang D, Xiong L, Zhen G, Tan J. Predictive value of RAD51 on the survival and drug responsiveness of ovarian cancer. *Cancer Cell Int*. 2021;21(1):249.
23. Hoppe MM, Jaynes P, Wardyn JD, Upadhyayula SS, Tan TZ, Lie S, et al. Quantitative imaging of RAD51 expression as a marker of platinum resistance in ovarian cancer. *EMBO Mol Med*. 2021;13(5):e13366.
24. Kilari D, Guancial E, Kim ES. Role of copper transporters in platinum resistance. *World J Clin Oncol*. 2016;7(1):106-13.
25. Yoshida H, Teramae M, Yamauchi M, Fukuda T, Yasui T, Sumi T, et al. Association of copper transporter expression with platinum resistance in epithelial ovarian cancer. *Anticancer Res*. 2013;33(4):1409-14.
26. Baath M, Westbom-Fremer S, Martin de la Fuente L, Ebbesson A, Davis J, Malander S, et al. SOX2 is a promising predictor of relapse and death in advanced stage high-grade serous ovarian cancer patients with residual disease after debulking surgery. *Mol Cell Oncol*. 2020;7(6):1805094.
27. Fischer AK, Pham DL, Bosmuller H, Lengerke C, Wagner P, Bachmann C, et al. Comprehensive in situ analysis of ALDH1 and SOX2 reveals increased expression of stem cell markers in high-grade serous carcinomas compared to low-grade serous carcinomas and atypical proliferative serous tumors. *Virchows Arch*. 2019;475(4):479-88.
28. Kaipio K, Chen P, Roering P, Huhtinen K, Mikkonen P, Ostling P, et al. ALDH1A1-related stemness in high-grade serous ovarian cancer is a negative prognostic indicator but potentially targetable by EGFR/mTOR-PI3K/aurora kinase inhibitors. *J Pathol*. 2020;250(2):159-69.
29. Goldstein LJ, Galski H, Fojo A, Willingham M, Lai SL, Gazdar A, et al. Expression of a multidrug resistance gene in human cancers. *J Natl Cancer Inst*. 1989;81(2):116-24.
30. Penson RT, Oliva E, Skates SJ, Glyptis T, Fuller AF, Jr., Goodman A, et al. Expression of multidrug resistance-1 protein inversely correlates with paclitaxel response and survival in ovarian cancer patients: a study in serial samples. *Gynecol Oncol*. 2004;93(1):98-106.
31. Dagogo-Jack I, Shaw AT. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. *Nat Rev Clin Oncol*. 2018;15(2):81-94.