

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE *CELL-FREE* DNA (cfDNA) ISOLADO DE
LINHAGEM TUMORAL PROSTÁTICA EM CÉLULAS NORMAIS RECIPIENTES**

Letícia Silveira Barcelos

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Ciências Biológicas da Universidade
Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau
de Licenciada em Ciências Biológicas.

Uberlândia - MG
Julho - 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE *CELL-FREE* DNA (cfDNA) ISOLADO DE
LINHAGEM TUMORAL PROSTÁTICA EM CÉLULAS NORMAIS RECIPIENTES**

Letícia Silveira Barcelos

Orientador: Dr. Luiz Ricardo Goulart

Co-orientadora: MsC. Aline Gomes de Souza

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Ciências Biológicas da Universidade
Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau
de Licenciada em Ciências Biológicas.

Uberlândia - MG

Julho - 2018

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer ao Pai Celestial por ter me guiado e protegido durante todos os meus anos de graduação longe do conforto de minha família.

Agradeço aos meus avós maternos Adones e Eliane, pelo apoio e preocupação durante toda a minha caminhada acadêmica e pessoal. Sou grata por todo amor e por sempre acreditarem no que sou capaz de realizar. Aos meus avós paternos Ezio e Anésia, pelas palavras de afeto e apoio em todos os momentos que eu precisei. Obrigada pelos exemplos que sempre me passam de força e dedicação.

Agradeço aos meus pais Luciano e Valéria pelo amor que os uniram e por meio dele me deram a vida. A você meu pai, obrigada pelo exemplo de homem trabalhador e honesto. A você mãe, obrigada por sempre acreditar na minha evolução como pessoa e profissional.

Sou grata a minha orientadora Profa. Dra. Vivian Alonso Goulart por ter me aceitado e me inserido no Grupo de Estudo e Pesquisa com Câncer de Próstata do laboratório, que tanto me engrandece a cada dia. Obrigada prof. Vivian pela confiança, pelo carinho e pelos ensinamentos.

Ao Professor Dr. Luiz Ricardo Goulart que tanto admiro pela sensatez e liderança, obrigada pela oportunidade de trabalhar no laboratório de Nanobiotecnologia e por ser meu orientador neste momento de estudos da Professora Dra. Vivian.

Agradeço à minha co-orientadora MsC. Aline Gomes de Souza por ter contribuído substancialmente nessa etapa, me ensinado com tanta paciência e amor que tem pela genética e, acima de tudo, obrigada por me amparar nessa etapa da vida, com palavras de luz que sempre me fortalecia. Obrigada pela confiança.

Agradeço ao Victor Severo pelo companheirismo durante esses 7 anos de cumplicidade. Seu afeto e amizade foram essenciais na conclusão dessa etapa. Agradeço aos meus amigos, Renata Bianchi, Mariana de Paula, Isadora Nascimento, Letícia de Fátima e Pedro Marinho, por permitirem que a caminhada fosse mais leve e por contribuir tanto no meu amadurecimento pessoal.

Aos órgãos de fomento CAPES e CNPq pelo auxílio financeiro durante meu percurso na graduação em Ciências Biológicas e a Universidade Federal de Uberlândia pelo ensino e pesquisa de qualidade.

Obrigada a todos que de alguma forma contribuíram para a conclusão desta etapa.

RESUMO

Mundialmente, no homem o câncer de próstata (CaP) é o mais incidente depois do câncer de pulmão e a quarta causa de morte por neoplasias no Brasil. Dessa forma, há uma crescente busca por tratamentos mais efetivos, biópsias menos invasivas e a descoberta de biomarcadores específicos para a detecção precoce do CaP. Trabalhos atuais com biópsia líquida, mostram que células malignas e não malignas secretam DNA, no entanto, pacientes que apresentam alguma patologia como o câncer, possuem níveis mais elevados de DNA circulante nos fluidos biológicos comparado a indivíduos saudáveis. Assim, o DNA circulante oriundo de células tumorais mostra-se uma promissora molécula para o monitoramento oncológico. Neste contexto, o presente trabalho teve como propósito quantificar o *cell-free* DNA circulante (cfDNA) das linhagens celulares da próstata (PC-3 e RWPE-1), bem como avaliar a proliferação celular durante a liberação do mesmo e, analisar a linhagem normal da próstata (RWPE-1) após ser tratada com cfDNA isolado da linhagem celular tumoral (PC-3) cultivada em sistema tridimensional (3D), a fim de investigar o papel do cfDNA tumoral na transformação maligna de células normais. Após o tratamento, foi avaliada a expressão dos genes AR, CD133, CD44, ABCG2, PSMA, Ecad, CK5, CK8, CK14 e CK18 por qPCR e a migração celular por ensaio de *scratch*. Os dados mostraram que o cfDNA liberado pela linhagem PC-3 aumentou a expressão dos genes CD44, ABCG2, PSMA, CK5, CK14 e CK18 na RWPE-1, além de promover um aumento na capacidade migratória das células normais recipientes. Com isso, este estudo *in vitro* permitiu verificar que o cfDNA é capaz de promover alterações em células normais recipientes o que sugere um importante papel desta molécula nos processos de progressão e metástase no câncer.

Palavras-chave: Câncer de próstata; Biópsia Líquida; Sistema tridimensional.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	01
1.1 Glândula prostática	01
1.2 Câncer de Próstata	02
1.3 Incidência e Epidemiologia	03
1.4 Biópsia Líquida	04
1.5 Transformação maligna	05
1.6 Estudo sobre Câncer de Próstata utilizando Cultura de Células	06
2 OBJETIVOS	08
2.1 Objetivo Geral	08
2.2 Objetivos Específicos	08
3 MATERIAIS E MÉTODOS	09
3.1 Isolamento e quantificação de cfDNA das linhagens celulares da próstata (PC-3 e RWPE-1) em cultivo 3D	09
3.1.1 Ensaio de proliferação	09
3.2 Ensaio de expressão gênica	10
3.2.1 Extração de RNA total	10
3.2.2 Transcrição Reversa	10
3.2.3 PCR em Tempo Real (qPCR)	10
3.3 Ensaio de migração por <i>scratch</i>	12
3.4 Análises Estatísticas	12
4 RESULTADOS	13
4.1 Cultivo em 3D da linhagem tumoral prostática PC-3 e linhagem normal RWPE-1	13
4.2 Quantificação de cfDNA das linhagens prostáticas (PC-3 e RWPE-1) em cultivo 3D	13
4.2.1 Ensaio de proliferação	14
4.3 Análise da expressão gênica	15
4.4 Análise do ensaio de migração por <i>scratch</i>	16
5 DISCUSSÃO	18
6 CONCLUSÃO	22
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23

1. INTRODUÇÃO

1.1 A glândula prostática

A próstata é uma glândula exócrina integrante do sistema reprodutor masculino, localizada abaixo da bexiga e à frente do reto. Este órgão compreende o segmento proximal da uretra e sua função é produzir e armazenar parte do sêmen (TABOGA et al., 2009). O crescimento normal da glândula prostática é controlado por interações entre o epitélio e o estroma prostático (LEE et al., 2001). O epitélio da próstata humana consiste em três níveis de organização celular: células basais, luminais e neuroendócrinas (LEE et al., 2004). O estroma prostático envolve a parede anterior da próstata e apresenta fibroblastos e células musculares que auxiliam na eliminação de secreções para a uretra (BUSHMAN, 2009).

As células basais são precursoras do epitélio da próstata e independentes de andrógeno para a sua sobrevivência, expressando baixos níveis de Receptor de Andrógeno (AR, inglês *Androgen Receptor*). As células luminais possuem função de secretar parte do plasma seminal, como é o caso do antígeno prostático específico (PSA, do inglês *Prostate Specific Antigen*) e dependem do AR para a sua sobrevivência (WANG et al., 2001). As células neuroendócrinas estão dispersas entre as células epiteliais e são responsáveis por regular diversos peptídeos (e.g., somatostatina, calcitonina) importantes na proliferação das células prostáticas, como também, são insensíveis ao andrógeno (AMORINO; PARSONS, 2004).

Estudos anteriores sugerem que a resposta do epitélio ao andrógeno é regulada por elementos estromais (HEINLEIN; CHANG, 2004). Essa interação epitélio-estroma apresenta sinalizações intracelulares importantes na manutenção e funcionamento das células da glândula prostática (EKMAN, 2000). Porém, quando essa comunicação é alterada, favorece o crescimento desordenado de células do epitélio, propiciando transformações malignas (OLUMI et al., 1999).

O amadurecimento fisiológico da próstata depende de andrógenos, que atuam como sistemas regulatórios no processo de citodiferenciação, produção de secreções, morfogênese e proliferação. Contudo, além de desempenharem um papel importante no desenvolvimento da próstata normal, estes também atuam na iniciação e

manutenção da hiperplasia prostática benigna (HPB) e adenocarcinoma de próstata (CaP) (MEIKLE, 1985; GRIFFITHS; MORTON, 1997).

Essas alterações fazem com que o estroma forneça um microambiente adequado para as células tumorais diferenciarem e proliferarem. Assim, é imprescindível estudos para a compreensão do papel das interações entre o microambiente e as células tumorais prostáticas durante a iniciação e a progressão do CaP (TAYLOR; RISBRIDGER, 2008).

1.2 Câncer de próstata

O câncer de próstata, assim como outros, é caracterizado por ter uma alteração no balanço entre a proliferação e a morte celular, acarretando na invasão de tecidos e órgãos. Lee e colaboradores (1999) sugerem que a manutenção da atividade e diferenciação prostática dependem de vários fatores, sendo eles extrínsecos (e.g., imunológicos, genéticos, ambientais e hormonais) mediada por fatores intrínsecos (e.g., interação epitélio-estroma). Assim, fica claro que o desequilíbrio nessas interações é substancial para a instalação e progressão de doenças (TUXHORN et al., 2002; MARKER et al., 2003).

Nas fases iniciais do crescimento da massa tumoral prostática, as células respondem ao fator regulatório androgênico (hormônio-dependente). Todavia, o distúrbio no sistema regulatório ligado à mutações genéticas, provocam respostas anormais de fatores de crescimento, passando a não responder ao controle androgênico (hormônio-independente) (NEVES, 2007; TONON; SCHOFFEN, 2009).

Variadas aberrações genéticas e cromossômicas possuem o potencial de aumentar, diminuir ou inibir a expressão gênica em células do CaP. Os genes prostáticos relacionados à iniciação da carcinogênese são: ativadores transcricionais, reguladores, sinalizadores, receptores, supressores, específicos e oncogenes, estes atuam modificando os fenótipos e as respostas individuais da neoplasia (SINGH et al., 2002; SHAND; GELMANN, 2006).

Em uma perspectiva histológica, a neoplasia prostática é formada por células cancerígenas, as quais foram originadas dos alvéolos e ductos prostáticos, exibindo graus de comportamento biológico variável (BILLIS, 1997). Essa diversificação encontrada nas lesões prostáticas é definida por locais pré-neoplásicos e neoplásicos. Até o momento, o cenário heterogêneo de células do CaP não foi identificado devido à um evento genético específico. Há premissas que explicam pelo modelo de evolução

clonal e células-tronco do câncer (CSC) (RIBEIRO et al., 2006; SAMPIERI; FODDE, 2012; BARBIERI; TOMLINS, 2014).

O paradigma da evolução clonal do tumor é inadequado, onde cada célula tumoral possui a mesma capacidade de progressão e alterações gênicas, contudo, o segundo modelo das CSCs é o mais aceito (IBRAHIM et al., 2010). Estudos científicos mostraram que as CSCs conferem propriedades análogas às células-tronco normais do organismo (CHEN et al., 2013), demonstrando que essas massas são responsáveis pela iniciação, progressão, reincidência e disseminação tumoral. Dessa forma, tornam-se um dos grandes desafios em trabalhos com câncer (CACKOWSKI; RUSSELL, 2018).

1.3 Incidência e Epidemiologia

O CaP é uma doença altamente prevalente, sendo responsável por 14.484 mortes de homens no Brasil no ano de 2015, apontado como o mais incidente depois do câncer de pele não melanoma (STEWART; WILD, 2014; BRASIL, 2017). No Brasil, estimam-se 68.220 novos casos de câncer de próstata para o ano de 2018, correspondendo a um risco estimado de 66,12 novos casos para cada 100 mil homens (INCA, Estimativa 2017). Dessa maneira, devido à alta mortalidade e incidência, esta doença é considerada um problema de saúde pública, ocorrendo principalmente em regiões brasileiras de maior Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) (BRAY et al., 2012).

A incidência aumentada do CaP ao longo dos anos se deve à melhoria na qualidade dos sistemas de informação, disponibilidade de métodos de rastreamento e pelo aumento na expectativa de vida. Entretanto, este cenário possibilitou estratégias prognósticas que aumentou a sobrevida em cinco anos em média, de indivíduos acometidos por esta neoplasia (HOWLADER et al., 2017).

O fator responsável pelo desenvolvimento da doença mais bem estabelecido atualmente é a idade, visto que cerca de três quartos dos casos ocorrem a partir dos 65 anos (DAMIÃO et al., 2015). Estudos mostram que a ocorrência deste câncer em homens com menos de 29 anos é cerca de 1 a cada 10.000 homens, porém entre as idades de 60 e 79 é de 1 em 8 homens (ROCHA, 2016).

Outra condição é o risco genético. Homens que tenham histórico familiar em primeiro grau de câncer de próstata há maior predisposição de desenvolvimento do

tumor (CHAN et al., 1998; STEWART et al., 2014), do mesmo modo a etnia é significativa na etiologia desse câncer (NAKANDI et al., 2013). Há diferentes premissas controversas descritas na literatura, como alimentação, obesidade (PEREZ-CORNAGO et al., 2017), etilismo e hormônios sexuais, que também podem influenciar no desenvolvimento e estabelecimento do tumor (STEWART; WILD, 2014).

É preconizado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) os instrumentos de rastreio utilizados para diagnosticar o CaP: exame digital transretal da próstata (DRE), dosagem dos níveis séricos de PSA no soro e a biópsia por ultrassonografia transretal (USTR) (GERBER; CHODAK, 1991; RHODEN; AVERBECK, 2010). Apesar disso, evidências científicas revelam sobre os malefícios da detecção com PSA, associado ou não ao toque retal, visto que ambos os rastreios demonstram mais desvantagens do que vantagens (GUIMARÃES; FONSECA, 2016).

Isto se deve ao fato de que a glicoproteína PSA liberada no soro não é específica apenas do sistema genital masculino, sendo produzida por outros fluídos corporais e outros tipos de neoplasias (MONNE, 1994; YU; DIAMANDIS, 1995; MELEGOS, 1997). Outra questão limitante é a crescente incidência de pacientes acometidos por CaP com níveis de PSA ≤ 4 ng/mL. Pesquisadores demonstram que para este tradicional valor de corte a sensibilidade varia de 35% a 71% e a especificidade de 63% a 91%, o que significa que os resultados falsos-positivos são cerca de 28%, verificando-se em torno de 72% de biópsias desnecessárias (CARTOLA et al., 1994; REIS et.al, 2006; RODRIGUES; SALES, 2013). Devido a estas limitações do PSA, novas estratégias para o rastreio precoce e estadiamento do CaP devem ser desenvolvidas.

1.4 Biópsia Líquida

Devido à natureza invasiva da biópsia cirúrgica, incluindo o desconforto sofrido pelos pacientes, pesquisadores na área de oncologia molecular trabalham em busca de marcadores moleculares exclusivos do tumor em diversos fluídos corporais (*e.g.*, urina, sêmen e saliva) (GALVANO et al., 2017). Estudos demonstram que a biópsia líquida é eficiente na detecção de produtos circulantes do câncer, fornecendo o monitoramento do tratamento oncológico (SESTINI et al., 2015; ZHANG et al., 2017).

A biópsia líquida detecta células tumorais circulantes (CTCs), *cell-free* ácido

nucleico (cfDNA, miRNA, cfRNA, ctDNA) e vesículas extracelulares (VEs). Esta nova ferramenta recebeu uma grande atenção clínica, pois células tumorais liberam quantidade significativa destes componentes comparada as células normais, diferente da biópsia cirúrgica, que possui uma capacidade limitada de tumor na peça biopsiada, decaindo a sensibilidade da técnica (PATRÃO et al., 2010; SCHWARZENBACH; PANTEL, 2015).

Quanto a biogênese dos fragmentos de cfDNA, sua fonte permanece desconhecida. Hipóteses presumem que são derivados de vários eventos fisiológicos como a secreção celular ativa, apoptose e/ou necrose de células tumorais, liberando este DNA na circulação sanguínea (BREITBACH et al., 2012). O cfDNA trata-se de pequenos fragmentos de ácido nucleico, não associados a porções celulares, compreendendo regiões codificantes e não-codificantes de DNA. Isto possibilita empregá-lo para avaliar mudanças genômicas como: a instabilidade de microsatélites, polimorfismos, metilações, mutações, integridade, perda de heterozigose, entre outras alterações moleculares (VOLIK et al., 2016).

O DNA circulante é liberado em diferentes níveis e formas, podendo ser eliminado na forma de fita simples e dupla. A taxa de liberação até então não é bem entendida, todavia, sabe-se que a proliferação de células tumorais pode ter um papel substancial nesses eventos (DIAZ; BARDELLI, 2014). Além disso, a quantidade de cfDNA em pacientes com câncer varia muito (ADAMS et al., 2017), sendo possível ser detectada e calculada. Entretanto, ainda não é possível na rotina clínica com tecido tumoral ou com outros biomarcadores circulantes.

Além desses fatores, trabalhos atuais têm demonstrado que o cfDNA ao interagir com outra célula não tumoral, ocasiona transformações malignas, mediadas por alterações genéticas, modificando a biologia da célula receptora. Neste cenário, o estudo com cfDNA torna-se ótimo alvo que pode corroborar com a medicina translacional (DELFAU-LARUE et al., 2018).

1.5 Transformação maligna

O CaP é uma doença de desenvolvimento lento, envolvendo ativação de oncogenes e inativação de genes supressores de tumor, como mencionado anteriormente. Estas alterações específicas são importantes observações que enfatizam que o microambiente pode desempenhar um papel importante na promoção

da carcinogênese e na indução de mudanças genéticas durante a progressão maligna. Embora a modificação na adesão celular do CaP seja um indício, ainda não é claro atualmente, sobre os mecanismos pelos quais ocorrem essas mudanças genéticas (WEBBER et al., 2001).

Há uma variedade de métodos *in vitro* e *in vivo*, para a indução do CaP a fim de se compreender melhor a sua iniciação. Estas técnicas incluem tratamento com carcinógenos hormonal e/ou adição direta de oncogenes prostáticos (WANG et al., 2001). Autores demonstram que pequenas concentrações de oncogenes ativos são suficientes para converter uma célula não tumorigênica em uma célula totalmente tumorigênica. Esses achados enfatizam a alteração genética como determinante para a malignidade prostática (DIGIOVANNI et al., 2000).

Essa comunicação de células tumorais prostáticas e células normais demonstram que tanto o ambiente estromal quanto o epitelial, podem induzir a formação de células tumorigênicas permanentes, estas por sua vez, mediadas por mecanismos epigenéticos ainda desconhecidos (HAYWARD et al., 1998). Dessa maneira, tais processos envolvidos na carcinogênese são ferramentas úteis para experimentos *in vitro* e *in vivo*, permitindo novas aplicações promissoras para resolver necessidades clínicas relacionadas ao CaP (ADAMS et al., 2017).

1.6 Estudos sobre Câncer de Próstata utilizando Cultura de Células

Ensaio com culturas celulares possibilitam a compreensão dos mecanismos moleculares da célula e propiciam significativos desenvolvimentos científicos na área médica. Linhagens celulares do CaP humano demonstram vantagens em estudos, visto que são derivadas de sítios metastáticos, além de permitirem trabalhar em condições controladas de replicação, uniformidade da amostra, redução no número de animais utilizados e concentrações equilibradas de fármacos (PEEHL, 2005).

Com o intuito de otimizar e aproximar dos estudos *in vivo*, técnicas *in vitro* de cultura celular foram introduzidas, como o sistema bidimensional (2D) e tridimensional (3D) (SAMPSON et al., 2013). Embora células cultivadas em 2D apresentem limitações, como perda de arquitetura específica de tecidos (LAUNDOS et al., 2016), elas são absolutamente viáveis devido a sua facilidade de manuseio. A cultura de células 2D é executada em placas planas, dividindo-se e provocando a formação de uma monocamada de células aderidas (BRESLIN et al., 2013).

Experimentos com culturas de células em 3D demonstram um grande avanço, visto que este ensaio oferece um microambiente mais próximo bioquimicamente e morfologicamente ao sistema *in vivo* (ASGHAR et al., 2013). A cultura em 3D apresenta fisiologicamente significativos fenótipos, como o crescimento celular e interação com o seu entorno em uma estrutura multidimensional (RAVI et al., 2015; RYAN et al., 2016).

Diante destas questões supracitadas, testes *in vitro* utilizando a cultura de células possibilitam a análise da ação do cfDNA no desenvolvimento do CaP (KRETZMER, 2002). Análises *in vitro* com cfDNA são limitadas a poucos estudos, por esta razão o presente trabalho visou comparar a quantificação de cfDNA derivado da linhagem celular tumoral da próstata PC-3 *versus* a linhagem normal RWPE-1 cultivadas em cultura 3D, bem como, analisar proliferação celular durante a liberação do mesmo. Além disso, será avaliado o papel do cfDNA derivado da linhagem tumoral PC-3 na linhagem normal RWPE-1, mediante aos ensaios de expressão gênica e migração celular.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o impacto de cfDNA isolado de linhagem tumoral prostática no perfil gênico e na migração celular de células prostáticas não tumorais recipientes.

2.2 Objetivos específicos

- Cultivar as linhagens celulares PC-3 e RWPE-1 em sistema tridimensional (3D);
- Isolar e quantificar a liberação de cfDNA das linhagens prostáticas PC-3 e RWPE-1 cultivadas em 3D em diferentes tempos (24, 48 e 72h);
- Avaliar a proliferação celular durante a liberação de cfDNA das linhagens prostáticas PC-3 e RWPE-1 em diferentes tempos (24, 48 e 72h);
- Avaliar a ação do cfDNA da linhagem tumoral PC-3 na migração celular da linhagem normal RWPE-1;
- Avaliar os níveis de expressão dos genes AR, CD133, CD44, ABCG2, PSMA, Ecad, CK5, CK8, CK14 e CK18 por qPCR em células RWPE-1, quando cultivadas com cfDNA da linhagem tumoral PC-3.

3. METODOLOGIA

3.1 Isolamento e quantificação de cfDNA das linhagens celulares da próstata (PC-3 e RWPE-1) em cultivo 3D

A linhagem celular tumoral PC-3 e a linhagem normal RWPE-1, foram cultivadas em uma garrafa de 75 cm² com meio RPMI-1640 (Cultilab) e *Keratinocyte-SFM* (*Thermo Fisher Scientific*), respectivamente, e suplementadas com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco) e 50 µg/µl de gentamicina (*Thermo Fisher Scientific*). As células foram incubadas a 37°C e 5% de CO₂ até atingirem 80% de confluência. Em seguida, foram adicionados 300 µl de nanopartículas magnéticas (*NanoShuttles*) em cada linhagem para que as estas se integrem nas células a fim de se fazer a cultura 3D, conforme recomendações do fabricante (*Nano3D Biosciences*). Após 24h de internalização, as células foram tripsinizadas e centrifugadas, e em seguida, semeadas em uma placa de 96 poços (2 x 10³), juntamente com 100 µl de meio de cultura. Após esse procedimento, colocou-se uma placa magnética abaixo da placa com as células (*Magnetic 3D bioprinting - Nano3D Biosciences*), que por atração magnética formaram uma estrutura celular em 3D após 24h. O ensaio foi feito em triplicata.

O sobrenadante proveniente do cultivo 3D da linhagem tumoral e normal foram coletados após 24, 48 e 72h para a análise de quantificação, já as células foram utilizadas para o ensaio de proliferação. O cfDNA foi purificado do sobrenadante utilizando *GenElute™ PCR Clean-Up Kit*, conforme as recomendações do fabricante. A concentração total de cfDNA foi quantificada pela absorbância de 260 nm usando o espectrofotômetro Nanodrop™ 1000.

Além disso, o cfDNA tumoral proveniente das coletas de 24 h foram utilizados também para estimular a linhagem normal (RWPE-1) para os ensaios de expressão gênica e migração celular.

3.1.1 Ensaio de proliferação

Para o ensaio de proliferação foi utilizado o reagente *CytoSelect Cell Proliferation Assay Reagent* (*Cell Biolabs Fluorometric*), conforme as recomendações do fabricante. A proliferação celular foi realizada após 24, 48 e 72 h, posteriormete a

cada coleta do sobrenadante para quantificação do cfDNA. A leitura foi feita em 560 e 590 nm.

3.2 Ensaio de expressão gênica

3.2.1 Extração de RNA total

Foram cultivadas 2×10^5 células RWPE-1 em uma placa de 24 poços e incubadas até atingir 100% de confluência. A linhagem celular RWPE-1 foi estimulada com 20 ng/ml cfDNA tumoral, assim como as células controle (sem estímulo) e cultivadas por 24h. Assim, estas foram submetidas a extração do RNA total utilizando o protocolo TRIZOL, seguindo as recomendações do fabricante (*Thermo Fisher Scientific*). Resumidamente, para cada *pellet* de célula foram adicionados 1 ml de TRIZOL e, em seguida, adicionou-se clorofórmio, o qual foi misturado por inversão. Posteriormente, o mesmo foi centrifugado a 12000 x g por 15 minutos, para a separação das fases. O RNA total (fase aquosa), foi passado para outro *ependorf*, o qual foi adicionado isopropanol para precipitação do ácido nucléico e mantido a -20°C *overnight*. Após a incubação os *ependorfs* foram centrifugados e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi lavado com etanol 75%, ressuspendido em 25 μl de água tratada com DEPC (dietilpirocarbonato) e armazenado a -80°C . A concentração de RNA extraído foi verificada no espectrofotômetro (*Nanodrop 1000*).

3.2.2 Transcrição Reversa

A partir do RNA total extraído, foi feita a síntese do cDNA. Assim, foi preparado um mix contendo 0,5 μl de dNTPs (10 μM), 1 μl primer hexâmero (126 pmol), 0,4 μl de enzima transcriptase reversa (*MMLV - Moloney Murine Leukemia Virus*), 4 μl de tampão RT *Buffer*, 0,8 μl de DTT, 13,35 μl de água DEPC e 1 μg de RNA, para cada reação. A solução foi inserida em um termociclador e submetida a um ciclo de 37°C por 60 minutos, o cDNA foi armazenado a -20°C .

3.2.3 PCR em Tempo Real (qPCR)

A expressão gênica foi quantificada a partir do DNA amplificado a cada ciclo por PCR em Tempo Real (qPCR). As reações foram realizadas para os genes AR,

CD133, CD44, ABCG2, PSMA, Ecad, CK5, CK8, CK14 e CK18 e o gene endógeno $\beta 2$ Microglobulina ($\beta 2M$) em placas de 96 poços. Todos estes genes estão relacionados com a iniciação e progressão tumoral. Foi adicionado em cada poço 10 μ l do mix, contendo 5 μ l SYBR Green Master Mix (*Applied Biosystem*), 2 μ l de água DEPC, 1 μ l de cada primer (5 μ M) para cada gene (Tabela 1) e 2 μ l da amostra de cDNA, o ensaio foi feito em triplicata. As reações foram feitas no equipamento 7300 *Real Time PCR System*, sendo processadas em 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

Após o término, foi feito o cálculo da quantificação da expressão gênica, baseando-se na fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$, onde CT (*Cycle Threshold*) é definido como o número de ciclos em que o sinal de fluorescência da reação cruza o limiar. Foi feito o cálculo de normalização com o gene endógeno ($\beta 2M$), a partir da fórmula $\Delta CT = CT \text{ gene alvo} - CT \text{ gene endógeno}$, seguido da calibração, $\Delta\Delta CT = \Delta CT \text{ da mostra} - \Delta CT \text{ da amostra controle}$.

Tabela 1: Primers Forward e Reverse pertencentes aos genes avaliados no ensaio de qPCR

AR	F: 5' AATTGTCCATCTTGTCTCGTCTTCGG3' R: 5' GCCTCTCCTTCCTCCTGTAGTTTC 3'
CD133	F: 5' CATGTTTGGAGGATCTTGCTAGC 3' R: 5' TTCCCGCACAGCCCC 3'
CD44	F: 5' AAGGTGGAGCAAACACAACC 3' R: 5' AGCTTTTTCTTCTGCCACACA 3'
ABCG2	F: 5' ACAGCTCCTTCAGTAAATGCC TTC 3' R: 5' CACAAGGAA ACACCAATGGGC T 3'
PSMA	F: 5' TCAGTGAGAGACTCCAGGACTTTGACA 3' R: 5' GTTGTGGCTGCTTGGAGCATAGAT 3'
Ecad	F: 5' GTCATTGAGCCTGGCAATTTAG 3' R: 5' GTTGAGACTCCTCCATTCTTC 3'
CK5	F: 5' AGATGTTCTTTGATGGGGAGC 3' R: 5' CTGCGGTTGGCAATCTCCT 3'
CK8	F: 5' AGCTGGAGTCTCGCGTGGA 3' R: 5' CAGCTCCCGGATCTCCTCT 3'
CK14	F: 5' ATTGAGGACCTGAGGAACAAGATT 3' R: 5' CGCAGGTTCAACTCTGTCTCAT3'
CK18	F: 5' GCTCTGGGTTGACCGTGG 3' R: 5' GTGGTGCTCTCCTCAATCTGC 3'

3.3 Ensaio de migração por *scratch*

Para o ensaio de migração, foi realizado o ensaio chamado “*scratch*”, no qual é feito uma lesão artificial na monocamada de células em confluência. Assim, as células da borda criada, migram em direção ao centro, até que o contato célula a célula seja estabelecido novamente (LIANG et al., 2007).

Foram cultivadas 2×10^5 células RWPE-1 em uma placa de 24 poços e incubadas até atingir 100% de confluência. Foi feito um risco em linha reta na monocamada com o auxílio de uma ponteira p200. Em seguida, foi feito o estímulo com 20 ng/ml de cfDNA tumoral, anteriormente isolado, para avaliar a migração durante este tratamento.

Para monitorar o processo de migração, foi utilizado o microscópio invertido EVOS (*Thermo Fisher Scientific*) para fazer capturas de imagens no momento em que foi realizado o estímulo (0 horas) e após 24 e 48 h. Todas as imagens foram feitas no mesmo local do *scratch*. Assim, as imagens foram avaliadas utilizando o *software Image J*, que permitiu calcular a área de migração das células durante o tratamento, baseando-se na fórmula $(\frac{At = 0h - At = \Delta h}{At = 0h}) \times 100$, onde $At = 0h$ é a área medida após o risco (tempo 0h) e $At = \Delta h$ é a área medida após os tempos de tratamento (0h, 24h e 48h).

3.4 Análises estatísticas

As análises estatísticas realizadas foram feitas utilizando o software Prism 7.0 (*GraphPad Software*, La Jolla, CA, EUA). Para as análises foram utilizadas os testes *Two-way ANOVA* e *Sidak's multiple comparisons test* (SIDAK, 1967). O teste de *Sidak's* é uma avaliação de comparações múltiplas, sendo este um método conservativo e produz intervalos de confiança simultâneos.

4.RESULTADOS

4.1 Cultivo em 3D da linhagem tumoral prostática PC-3 e linhagem normal RWPE-1

Após o cultivo celular da linhagem tumoral PC-3 e normal RWPE-1 em confluência de 80% (Figura 3 - A e D), as nanopartículas magnéticas (*NanoShuttles*) foram internalizadas (Figura 3 - B e E). Dessa forma, as células foram semeadas em uma placa de 96 poços e colocadas acima do *Magnetic 3D bioprinting* que por atração magnética formou uma estrutura celular em 3D (Figura 3-C e F).

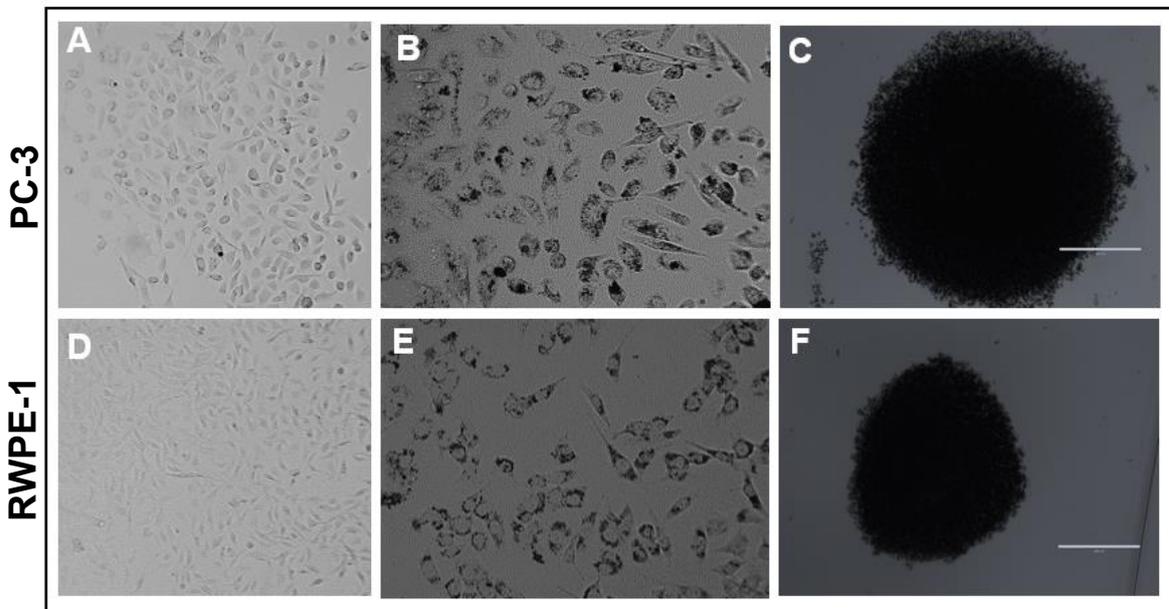


Figura 3: **A e D:** Cultivo em monocamada das linhagens prostáticas PC-3 e RWPE-1, respectivamente. **B e E:** Internalização das nanopartículas magnéticas (*NanoShuttles*) **C e F:** Formação do esferoide em 3D após introdução do *Magnetic 3D bioprinting*. Fotos tiradas na objetiva de 20X.

4.2 Quantificação de cfDNA das linhagens prostáticas (PC-3 e RWPE-1) em cultivo 3D

O cfDNA isolado do sobrenadante da cultura celular em 3D das linhagens celulares PC-3 e RWPE-1, foram quantificados por espectrofotômetro (Figura 1). Os dados mostram que a concentração total de cfDNA da linhagem celular tumoral prostática (PC-3) foi mais alta do que da linhagem celular normal prostática (RWPE-

1). Após 24 h a quantidade de cfDNA tumoral aumentou, enquanto a da linhagem normal diminuiu. Além disso, a quantidade total de cfDNA liberado em ambas linhagens celulares decresceu em 72 h.

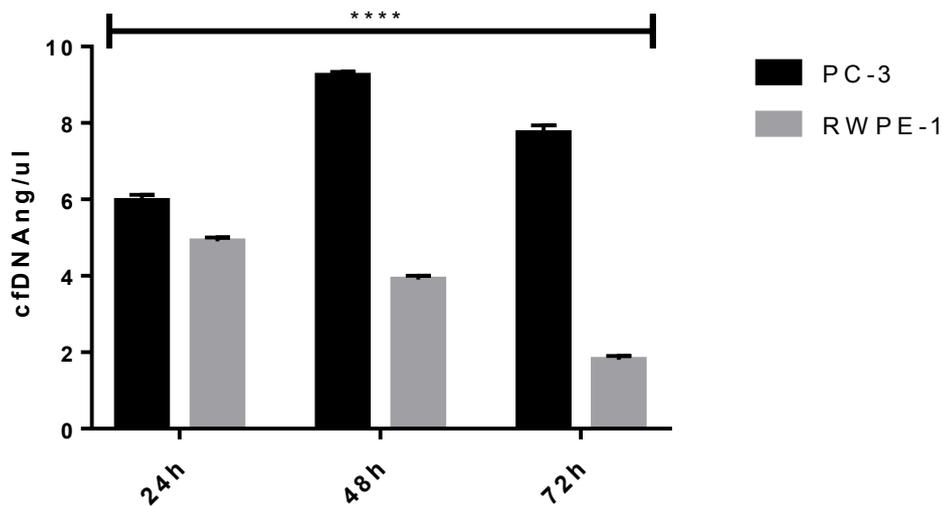


Figura 1: Quantificação de cfDNA liberado pelas linhagens celulares PC-3 e RWPE-1, respectivamente. A concentração de cfDNA liberado por PC-3 foi superior a quantidade liberada por RWPE-1 de acordo com o teste de *Sidak's*, considerando $p < 0,0001$ (****).

4.2.1 Ensaio de proliferação

As células provenientes do sobrenadante dos cultivos em 3D das linhagens celulares PC-3 e RWPE-1 foram utilizadas para o ensaio de proliferação (Figura 2). A partir da análise com teste estatístico *Sidak's test*, foi observado que nos tempos de 48 e 72 h a linhagem tumoral (PC-3) teve uma maior proliferação em relação a linhagem normal (RWPE-1). Os dados mostraram que durante as primeiras 24 h a proliferação de ambas as linhagens foram praticamente iguais. Além disso, na linhagem PC-3 a proliferação celular praticamente se manteve ao longo do tempo, demonstrando diferença estatística significativa apenas em 72 h. Após 48 h a linhagem normal (RWPE-1) teve uma queda em sua proliferação, ao ser comparada com a tumoral (PC-3).

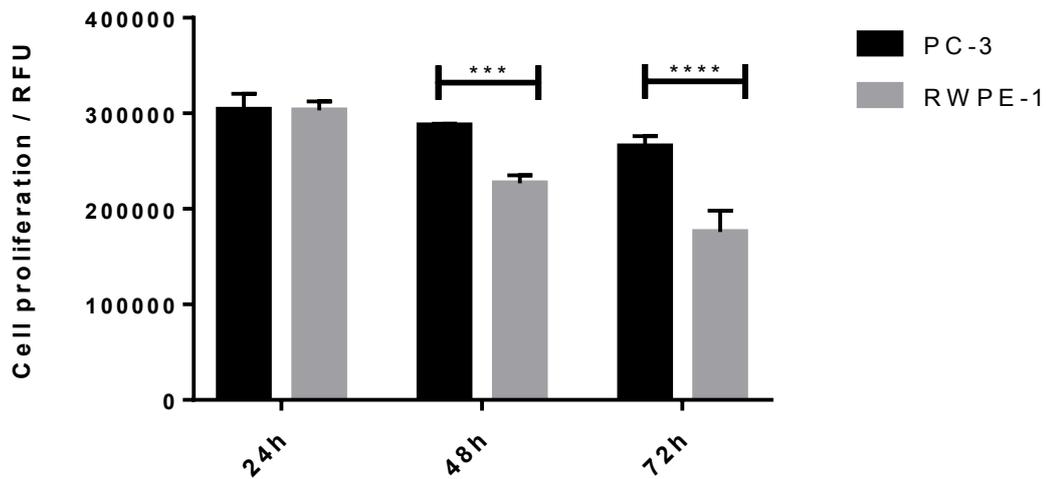


Figura 2: Proliferação durante a coleta de cfDNA nos tempos de 24, 48 e 72 h das linhagens celulares PC-3 e RWPE-1. Os dados mostram que a proliferação celular foi maior na linhagem PC-3 de acordo com o teste *Sidak's*, considerando $p=0,0003$ (***) (48h) e $p<0,0001$ (****) (72h).

4.3 Análise da expressão gênica

Após os cálculos de normalização e calibração, foi possível identificar que o cfDNA tumoral liberado pela linhagem PC-3 alterou a expressão dos genes, mediante ao tratamento na linhagem recipiente RWPE-1 (Figura 4). O cfDNA induziu o aumento de expressão dos genes CD44, ABCG2, PSMA, CK5, CK14 e CK18, em relação ao controle. Contudo, não houve alteração significativa estatisticamente na expressão dos genes em AR, CD133, Ecad e CK8, em relação ao controle.

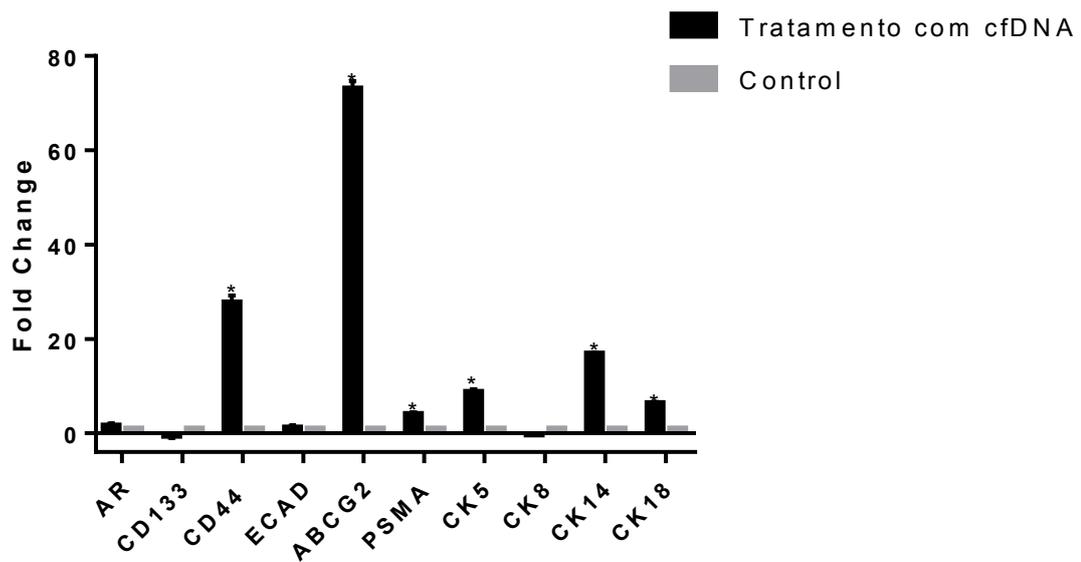


Figura 4: Expressão gênica dos genes AR, CD133, CD44, ABCG2, PSMA, Ecad, CK5, CK8, CK14 e CK18 após o estímulo com o cfDNA tumoral cultivada em sistema 3D *bioprinting*. Os dados mostram que os genes CD44 ($p=0,0101$), ABCG2, PSMA, CK5, CK14 e CK18 ($p<0,0001$), obteve um aumento em sua expressão, comparado ao controle (sem estímulo), de acordo com o teste de *Sidak's*.

4.4 Análise do ensaio de migração por *scratch*

A partir do cálculo da área migrada obtidas pelas imagens em 0, 24 e 48 h (Figura 5), observou-se que após o estímulo com cfDNA, a RWPE-1 apresentou um aumento de aproximadamente 10 e 20% na migração celular nos tempos de 24 e 48 h, respectivamente, quando comparada ao controle sem tratamento com cfDNA (Figura 6).

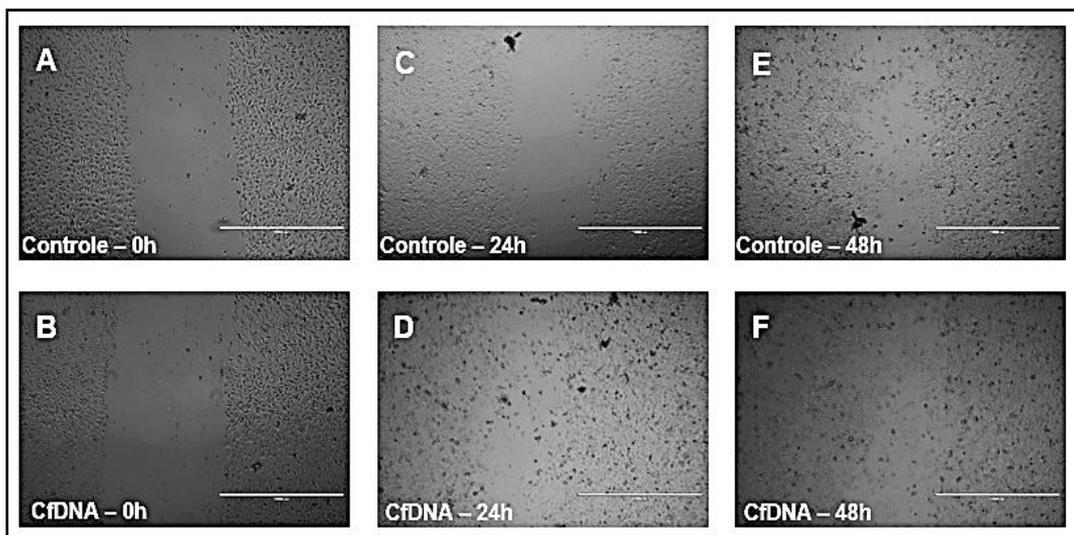


Figura 5: Imagens referentes ao ensaio de migração celular da linhagem normal RWPE-1 nos tempos de 0, 24 e 48 h. A legenda A, C e E evidencia o controle sem estímulo com cfDNA tumoral. As imagens B, D e F são referentes ao tratamento da RWPE-1 com cfDNA tumoral (B, D e F).

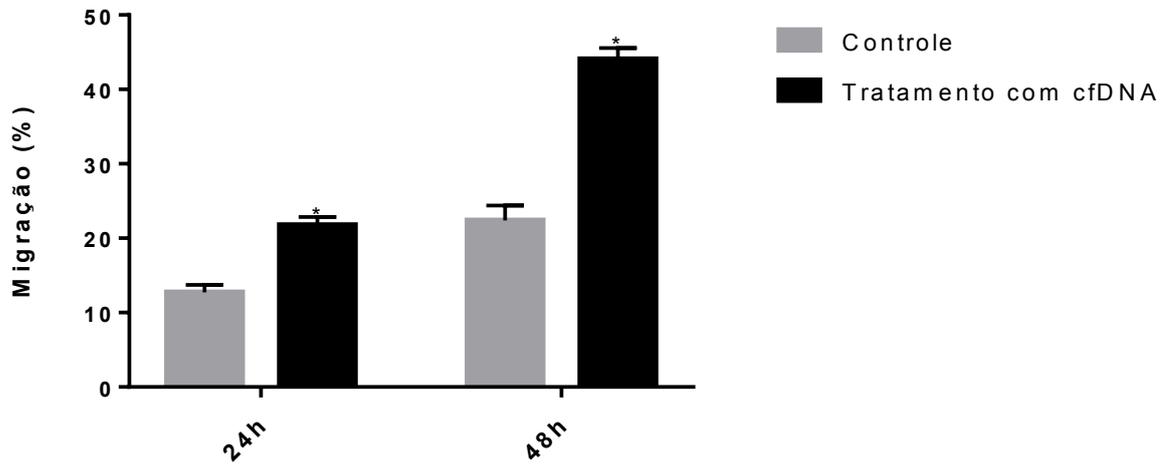


Figura 6: Porcentagem de migração celular da linhagem RWPE-1 após o estímulo com cfDNA tumoral da PC-3 cultivada em sistema 3D *bioprinting*. Os dados mostram que a RWPE-1 apresentou um aumento de aproximadamente 10 e 20% de acordo com o teste *Sidak's*, considerando $p=0,0068$ (24h) e $p=0,0002$ (48h).

5. DISCUSSÃO

A origem do cfDNA permanece questionável. Várias premissas são investigadas, incluindo apoptose, necrose e atividade celular (FLEISCHHACKER; SCHMIDT, 2007). As alterações na quantidade de cfDNA liberado nas duas linhagens prostáticas, tumoral (PC-3) e a normal (RWPE-1), sugerem uma influência estatisticamente significativa e importante biologicamente. Este presente estudo investigou qual linhagem libera maior concentração deste fragmento, bem como, seus padrões de liberação ao longo do tempo.

Com base nos resultados, foi possível perceber que a concentração de cfDNA liberado pela linhagem tumoral, foi maior do que na linhagem normal. Alguns autores têm demonstrado que pacientes com câncer apresentam valores significativamente mais elevados de DNA circulante no sangue, do que indivíduos saudáveis ou que possuem massa tumoral benigna (AZAD et al., 2015). Além disso, estudos feitos por Stroun e colaboradores (1989), correlacionaram a maior concentração destes fragmentos com indivíduos em fase metastática do câncer.

Foi observado que na linhagem tumoral ocorreu um aumento de cfDNA em 48 h e diminuindo posteriormente. Este contexto foi observado também pelo grupo do Bronkhorst (2015) com experimentos *in vitro* sobre caracterização do cfDNA liberado por células tumorais, demonstrando o nível baixo e estável de cfDNA após 40 h. Segundo estes pesquisadores, a atividade celular seria uma das explicações sobre as fontes de liberação do cfDNA e talvez associado a complexos proteicos, visto que em seus estudos, quando os valores de cfDNA tumoral decaíram, foi possível perceber a mesma tendência em termos de proteína.

As células provenientes do sobrenadante para o ensaio de quantificação, foram utilizadas para a análise de proliferação. Os dados obtidos revelam que houve uma proliferação mais elevada na linhagem tumoral, quando comparada à linhagem normal. Isto é explicado pelo próprio perfil agressivo das células cancerígenas, exibindo uma grande variedade de sintomas relacionados a distúrbios funcionais e proliferativos, contudo, células em um microambiente normal, possuem uma proliferação controlada (ONUCHIC; CHAMMAS, 2010).

Nesta perspectiva, estudos científicos demonstram que a maior proporção de cfDNA, está relacionada à alta taxa de proliferação celular e apoptose. Isto, por sua vez, implica que as células tumorais apoptóticas também são uma fonte de cfDNA.

Dessa maneira, outra interpretação para decaimento na quantidade de cfDNA da linhagem normal e tumoral, seria pela concomitante redução na proliferação dos mesmos, visto que estas atividades ocorreram no mesmo microambiente. No caso da linhagem tumoral, os intensos sinais proliferativos oncogênicos que estão ligados a uma variedade de processos inibitórios de crescimento, tais como a diferenciação e indução da apoptose, fornecem um suporte à expansão clonal e, conseqüentemente à novas neoplasias (PELENGARIS et al., 2000; EVAN; VOUSDEN, 2001). Dessa maneira, isto poderia explicar o nível elevado de cfDNA da linhagem tumoral em 48 h, correlacionando este perfil com a intensa proliferação neste intervalo de tempo, desencadeada por processos de suporte para a progressão tumoral.

Os dados apontam alterações na expressão dos genes CD44, ABCG2, PSMA, CK5, CK14 e CK18 da linhagem normal prostática mediante ao tratamento com cfDNA tumoral cultivado em 3D. Há anos, estudos demonstram que componentes tumorais estão associados a processos complexos envolvendo a comunicação celular (CALVO; SAHAI, 2011). Essas comunicações possibilitam interações físicas e químicas entre as células, e possivelmente intensificam na mudança da biologia da célula receptora e na iniciação, progressão e agressividade tumoral (JONES et al., 2016).

A maioria das células basais da glândula prostática normal expressam CD44, já no CaP sua expressão varia entre as pesquisas, em virtude de possuir diferentes funções de sinalização. Nagabhushan e colaboradores (1997) relataram moderados níveis de expressão em lesões de CaP e altos níveis em tumores primários. No geral, CD44 atua em tumores menos malignos, pois promove uma adesão intercelular, conservando a arquitetura do tecido, além de inibir a disseminação local e o comportamento metastático (GUNTHERT et al., 1991). Dessa forma, o significativo aumento de expressão do gene CD44 da célula normal, em relação ao controle, provavelmente relaciona-se a um preliminar fator patológico que o cfDNA tumoral causou na mesma. Assim, esta hipótese deve ser investigada em um futuro próximo.

O gene ABCG2 é conhecido por ter alta expressão em muitos tipos de câncer sólidos, incluindo o CaP. A literatura traz que sua função é evitar o acúmulo de toxinas extracelulares e intracelulares, desempenhando um papel importante na quimiorresistência e a recorrência do CaP, demonstrando-se uma boa ferramenta prognóstica (GUZEL et al., 2014). Outros estudos mostram que o ABCG2 é altamente expresso em meios celulares normais sob hipóxia (KRISHNAMURTHY et al., 2004). Esse perfil pode estar associado com a alta expressão desse gene no presente

estudo, visto que linhagens normais foram tratadas com cfDNA tumoral anteriormente cultivado em sistema 3D, estando este por sua vez, em baixa tensão de oxigênio no interior da massa celular. É importante enfatizar que a hipóxia é uma das principais características do microambiente tumoral, contribuindo para o fenótipo das CSCs, tumorigenicidade e metástases (MIFTAKHOVA et al., 2017). Assim o aumento na sua expressão pode estar vinculado a um processo progressivo carcinogênico causado pelo tratamento com cfDNA.

O antígeno de membrana específico da próstata (PSMA) sofreu um moderado aumento em sua expressão em células normais da próstata ao serem cultivadas com cfDNA tumoral. Sabendo que o PSMA é uma glicoproteína transmembrana restrita à próstata, pesquisas revelam uma regulação positiva deste gene associado com o CaP, principalmente em indivíduos com o alto risco de progressão da doença. Esta relação é interessante para aplicações diagnósticas e prognósticas, visto que estudos conseguiram diferenciar significativamente os níveis de expressão entre CaP, tecido prostático benigno e metástases linfonodais (PERNER et al., 2007). Assim, o aumento da expressão desse gene pode estar relacionado a uma alteração no comportamento da linhagem normal devido à transferência de cfDNA tumoral no microambiente.

As citoqueratinas são as principais proteínas estruturais encontradas em células epiteliais, as células basais expressam as citoqueratinas 5 e 14 (CK5, CK14, respectivamente), enquanto que as luminais expressam CK8 e CK18. Autores mostram que as citoqueratinas são produzidas por clivagem de caspases durante a apoptose celular, sendo então liberadas na circulação humana (SHERWOOD et al., 1990).

Estudos *in vitro* demonstram que os altos níveis expressos de CK8 está associada ao processo de ciclo e sinalização celular, enquanto que a CK18 se relacionam à motilidade e progressão tumoral. Porém, a maioria dos estudos afirmam que a CK5 se encontra expressa no tecido prostático benignos, mas não em linhagens tumorais (SHERWOOD et al., 1990). Assim, propõe-se que o aumento da expressão das CK14 e C18 representa potenciais marcadores séricos para avaliar a progressão de neoplasias epiteliais.

A migração celular é um processo que acontece em condições fisiológicas, ocorrendo no tráfego de células do sistema imune, morfogênese embrionária, e em processos patológicos, como é o caso da metástase tumoral. O processo de metástase de células tumorais é compreendido como a migração de células

individuais e/ou coletivas que se soltaram do tumor primário e vão para o compartimento estromal, deslocando-se aos vasos linfáticos e sanguíneos (VIGNJEVIC; MONTAGNAC, 2008).

As células cancerosas possuem um amplo espectro de mecanismos que alteram a expressão gênica e acentuam a mudança na morfologia celular, promovendo a migração e invasão celular (FRIEDL; WOLF, 2003). Essas alterações gênicas estão associadas com eventos de sinalização e motilidade celular. Por isso, pode-se afirmar que o aumento na expressão do gene CK18 foi uma das formas em que o cfDNA tumoral promoveu o aumento na porcentagem de migração celular.

Dessa maneira, o microambiente tumoral consiste em uma composição celular que favorece o desenvolvimento e proliferação do câncer (CAMUSSI et al., 2013). Estudos promissores de comunicação celular têm proposto hipóteses em que o DNA circulante pode ser transferido entre células cancerígenas e outras células somáticas, e essa ação potencialmente fornece um mecanismo denominado genometástase. Assim, os cfDNAs desempenham um importante papel na interação entre células, modulando funções da célula alvo (GARCÍA-OLMO et al., 1999; 2000).

Portanto, as análises referentes à expressão gênica permitiram identificar a indução de um perfil tumoral em células RWPE-1, avaliando os genes CD44, ABCG2, PSMA, CK5, CK8 e CK18. Indicando assim, que o cfDNA liberado por células tumorais da próstata durante seu cultivo, são importantes componentes do processo de carcinogênese, fornecendo uma melhor compreensão do microambiente do CaP.

6. CONCLUSÃO

Dentro deste contexto, este estudo permitiu demonstrar que, a liberação de cfDNA de células tumorais é mais elevada que em células normais, além disso verificou-se que o aumento da concentração de cfDNA pode estar correlacionado com a proliferação celular. Como também, o cfDNA tumoral foi capaz de influenciar de forma considerável nos níveis de expressão dos genes CD44, ABCG2, PSMA, CK5, CK14 e CK18 e na capacidade migratória das células normais da próstata, de forma que, tanto as alterações gênicas quanto o aumento na migração celular revelaram mudanças características de células tumorais em células normais, considerando um processo de genometástase, no qual metástases podem se desenvolver como um resultado da transfecção de células suscetíveis em órgãos distantes.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, M.; HENDERSON, J.; LEE, M.; MORGAN, T.; PALAPATTU, G. e ZASLAVSKY, A. Mp87-07 the biological ramifications of prostate cancer associated cell free dna: effect on platelet function and disease progression. **The Journal of Urology**, v.197(4), p.1168, 2017.

AMORINO, G. P. e PARSONS, S. J. Neuroendocrine cells in prostate cancer. **Critical reviews in eukaryotic gene expression**, v. 14, n. 4, p. 287-300, 2004.

ASGHAR, W.; SHAFIEE, H.; CHEN, P.; TASOGLU, S.; GUVEN, S.; GURKAN, U. A. e DEMIRCI, U. In vitro three-dimensional cancer culture models. **In Cancer Targeted Drug Delivery**, p. 635-665, 2013.

AZAD, A.A; VOLIK, S.V.; WYATT, A.W.; HAEGERT, A.; STEPHANE, L. B.; ROBERT, H. B.; SHAWN, A. A.; BRIAN, M.; ROBERT, S.; JENNY, B. et al. Androgen receptor gene aberrations in circulating cell-free DNA: biomarkers of therapeutic resistance in castration-resistant prostate cancer. **Clin. Cancer Res**; 21:2315–24, 2015.

BARBIERI, C. E. e TOMLINS, S. A. The prostate cancer genome: Perspectives and potential. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v. 32, n. 1, p. 95-102, 2014.

BILLIS, A. Uropatologia: Próstata. Guia prático para o diagnóstico anatopatológico. **Editora UFG**, 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Informática do SUS. Sistema de informações sobre mortalidade. Brasília, DF, 2017. Disponível em: <http://www.datasus.gov.br>. Acesso em: 13 abr. 2018.

BRAY, F. Global cancer transitions according to the Human Development. **The lancet oncology**, v. 13, n. 8, p. 790-801, 2012.

BREITBACH, S.; TUG, S.; SIMON, P. Circulating cell-free DNA. **Sports medicine**, 42(7), 565-586, 2012.

BRESLIN, S. e O'DRISCOLL, L. Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. **Drug discovery today**, v. 18, n. 5, p. 240-249, 2013.

BRONKHORST, A. J. et al. Characterization of the cell-free DNA released by cultured cancer cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1863, n. 1, p. 157-165, 2016.

BUSHMAN, W. Etiology, pathophysiology, epidemiology, and natural history of benign prostatic hyperplasia. **Urol Clin North Am.**;36(4):403-15, 2009.

CAKOWSKI, F. C. e TAICHMAN, R. S. Parallels between hematopoietic stem cell and prostate cancer disseminated tumor cell regulation. **Bone**, 2018.

- CALVO, F.; SAHAI, E. Cell communication networks in cancer invasion. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 23, n. 5, p. 621–629, 2011.
- CAMUSSI, G.; DEREGIBUS, M. C.; TETTA, C. Tumor-derived microvesicles and the cancer microenvironment. **Current molecular medicine**, v. 13, n. 1, p. 58–67, 2013.
- CATALONA, W.J.; RICHIE, J.P.; AHMANN, F.R.; HUDSON, M.A.; SCARDINO, P.T.; FLANIGAN RC, et al. Comparison of digital rectal examination and serum prostate specific antigen in the early detection of prostate cancer: results of a multicenter clinical trial of 6,630 men. **J Urol**, 151:1283-90, 1994.
- CHAN, J. M.; STAMPFER, M. J.; GIOVANNUCCI, E. L. What causes prostate cancer? A brief summary of the epidemiology. **Seminars in cancer biology**, London, v. 8, n. 4, p. 263-273, 1998.
- CHEN, X.; RYCA, K.; LIU, X.; TANG, D. G. New insights into prostate cancer stem cells. **Cell cycle**, v. 12, n.4, p. 579-86, 2013.
- DAMIÃO, R.; FIGUEIREDO, R. T.; DORNAS, M. C.; LIMA, D. S.; KOSCHORKE, M. A. Câncer de próstata. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, 14, 2015.
- DELFAU-LARUE, M. H.; VAN DER GUCHT, A.; DUPUIS, J.; JAIS, J. P.; NEL, I.; BELDI-FERCHIOU, A. e HAIOUN, C. Total metabolic tumor volume, circulating tumor cells, cell-free DNA: distinct prognostic value in follicular lymphoma. **Blood advances**, 2(7), 807-816, 2018.
- DIAZ JR, L. A. e BARDELLI, A. Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. **Journal of clinical oncology**, 32(6), 579, 2014.
- DIGIOVANNI, J., KIGUCHI, K., FRIJHOFF, A., WILKER, E., BOL, D. K., BELTRAN, L., MOATS, S., RAMIREZ, A., JORCANO, J., AND CONTI, C. Deregulated expression of insulin-like growth factor 1 in prostate epithelium leads to neoplasia in transgenic mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 97: 3455–3460, 2000.
- EKMAN, P. The prostate as an endocrine organ: androgens and estrogens. **The Prostate**. 10: 14–8, 2000.
- EVAN G.I. e VOUSDEN K. H. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. **Nature**, v. 411, n. 6835, p. 342, 2001.
- FLEISCHHACKER, M. e SCHMIDT B. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer-a survey. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, v. 1775, n. 1, p. 181-232, 2007.
- FRIEDL, P.; WOLF, K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. **Nature reviews. Cancer**, v. 3, n. 5, p. 362–74, 2003.
- GALVANO, A.; PAPADIMITRIOU, K.; DI, S. B.; CASTIGLIA, M.; ROLFO, C. Liquid Biopsy in Prostate Cancer. In **Liquid Biopsy in Cancer Patients** Humana Press, Cham, pp. 95-102, 2017.
- GARCÍA-OLMO, D.; GARCÍA-OLMO, D.C.; ONTANÓN, J.; MARTINEZ, E.; VALLEJO, M. Tumor DNA circulating in the plasma might play a role in metastasis. The hypothesis of the genomestasis. **Histol Histopathol**, 14:1159-1164, 1999.

GARCÍA-OLMO, D.; GARCÍA-OLMO, D. C.; ONTAÑÓN, J.; MARTINEZ. Horizontal transfer of DNA and the "genometastasis hypothesis". **Blood**, 95(2), 724-725, 2000.

GERBER, G.S. e CHODAK G.W. Routine screening for cancer of the prostate. **J Natl Cancer Inst**, 83:329-335, 1991.

GRIFFITHS K, MORTON MS, NICHOLSON RI. Androgens, androgens receptors, antiandrogens and treatment of prostate cancer. **Eur Urol** 1997;32:24-40, 1997.

GUIMARÃES, J. V. D. A. e FONSECA, I. M. Vantagens E Desvantagens Do PSA Em Relação Aos Principais Biomarcadores Proteômicos No Diagnóstico Do Câncer De Próstata: Revisão De Literatura. **NBC-Periódico Científico do Núcleo de Biociências**, v. 6, n. 11, p. 18-25, 2016.

GÜNTHERT, U. et al. A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. **Cell**, v. 65, n. 1, p. 13-24, 1991.

GUZEL E., KARATAS O.F., DUZ M.B., SOLAK M., ITTMANN M. AND OZEN M. Differential expression of stem cell markers and abcg2 in recurrent prostate cancer. **Prostate**, 74, 1498-1505, 2014.

HAYWARD, S. W.; GROSSFELD, G. D.; TLSTY, T. D. e CUNHA, G. R. Genetic and epigenetic influences in prostatic carcinogenesis. **Int. J. Oncol.**, 13: 35–47, 1998.

HAYWARD, S. W.; WANG, Y.; CAO, M.; HOM, Y. K.; ZHANG, B.; GROSSFELD, G. D.; CUNHA, G. R. Malignant transformation in a nontumorigenic human prostatic epithelial cell line. **Cancer research**, 61(22), 8135-8142, 2001.

HEINLEIN, C. A. e CHANG, C. Androgen receptor in prostate cancer. **Endocrine reviews**, 25(2), 276-308, 2004.

HOWLADER, N. et al. **SEER Cancer Statistics Review**, 1975-2014. Bethesda: National Cancer Institute, 2017. Disponível em: https://seer.cancer.gov/csr/1975_2014/. Acesso em: 1 ago. 2017.

IBRAHIM, T.; FLAMINI, E.; MERCATALI, L.; SACANNA, E.; SERRA, P.; AMADORI, D. Pathogenesis of osteoblastic bone metastases from prostate cancer. **Cancer**, v. 116, n. 6, p. 1406–1418, 2010.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/estimativa-2018.pdf> . Acesso em: 20 de março de 2017.

JONES, V. S. et al. Cytokines in cancer drug resistance: Cues to new therapeutic strategies. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1865, n. 2, p. 255–265, 2016.

JUSTUS, C. R. et al. In vitro cell migration and invasion assays. **Journal of visualized experiments : JoVE**, v. 752, p. 51-46, 2014.

KRETZMER, G. Industrial processes with animal cells. **Applied microbiology and biotechnology**, Hannover, v. 59, n. 2-3, p. 135-142, 2002.

KRISHNAMURTHY, Partha et al. The stem cell marker Bcrp/ABCG2 enhances hypoxic cell survival through interactions with heme. **Journal of Biological Chemistry**, 2004.

LAUNDOS, T. L. et al. Rotary orbital suspension culture of embryonic stem cell-derived neural stem/progenitor cells: impact of hydrodynamic culture on aggregate yield, morphology and cell phenotype. **Journal of tissue engineering and regenerative medicine**, 2016.

LEE C, COCKETT A, CUSSENOT O, GRIFFITHS K, ISAACS W E SCHALKEN J. Regulation of prostate growth. In: Chatelain C, Denis L, Foo JKT, editors, et al. Fifth International Consultation on Benign Prostatic Hyperplasia. Plymouth, United Kingdom: **Health Publications**, p. 81–106, 2001.

LEE K.L. e PEEHL D.M. Molecular and cellular pathogenesis of benign prostatic hyperplasia. **J Urol**, 172:1784–91, 2004.

LEE, M.A.; PALACE, J.; STABLER, G.; FORD, J.; GEARING, A.; MILLER, K. Serum gelatinase B, TIMP-1 and TIMP-2 levels in multiple sclerosis. **Brain**, 122:191- 197, 1999.

LIANG, C.; PARK, A. Y.; GUAN, J. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nature Protocols** v. 2, n. 2, p. 329–333, 2007.

MARKER PC, DONJACOUR AA, DAHIYA R, CUNHA GR. Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. **Developmental biology**, 253: 165–74, 2003.

MEIKLE, A.W. Endocrinology of the prostate and of benign prostate hyperplasia. **Endocrinology**. 2459-73, 1985

MELEGOS, D. N.; FREEDMAN, M. S.; DIAMANDIS, E. P. Prostate-specific antigen in cerebrospinal fluid. **Clinical chemistry**, 43(5), 855, 1997.

MIFTAKHOVA, R. R.; AKHUNZHYANOV, A.; FILINA, J. V.; KHAIBOULLINA, S. F.; RIZVANOV, A. A. Antibiotics target MCF-7 breast cancer stem cells in hypoxic environment. **J. clinical oncology**, 2017.

MONNE, M.; CROCE, C. M.; YU, H.; DIAMANDIS, E. P. Molecular characterization of prostate-specific antigen messenger RNA expressed in breast tumors. **Cancer research**, 54(24), 6344-6347, 1994.

NAGABHUSHAN M, PRETLOW TG, GUO YJ, AMINI SB, PRETLOW TP, SY MS. **Am J Clin Pathol**, 106: 647–651, 1996.

NAKANDI, H. et al. Knowledge, attitudes and practices of Ugandan men regarding prostate cancer. **African Journal of Urology**, Cairo, v. 19, n. 4, p. 165-170, 2013.

NEVES, A. F. **Varições transcricionais dos genes AR, SRD5A2, KLK2, PCA3, KLK3 e PSMA e implicações no diagnóstico molecular do câncer de próstata**. 2007. 130 f. Tese (Genética e Bioquímica) - Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, 2007.

OLUMI, A.F.; GROSSFELD, G.D.; HAYWARD, S.W.; CARROLL, P.R.; TLSTY, T.D.; CUNHA, G.R. Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. **Cancer research** 59: 5002–11, 1999.

ONUCHIC, A. C. e CHAMMAS, R. Câncer e o microambiente tumoral. **Revista de Medicina**, 89(1), 21-31, 2010.

PATRÃO, R.; NUNES, P.; BASTOS, C.; ROSEIRO, A.; MOTA, A. e CUNHA, M. F. X. D. Subgradação do carcinoma da próstata localizado: limitações da biópsia prostática. **Acta Urológica Associação Portuguesa de Urologia**, v. 27, n.3, p. 33-38, 2010.

PEEHL D.M. Primary cell cultures as models of prostate cancer development. **Endocrinorelated cancer**, v. 12, n. 1, p. 19–47, 2005.

PELENGARIS, S.; RUDOLPH, B.; LITTLEWOOD, T. Action of Myc in vivo—proliferation and apoptosis. **Current opinion in genetics & development**, 10(1), 100-105, 2000.

PEREZ-CORNAGO A. et al. Tall height and obesity are associated with an increased risk of aggressive prostate cancer: results from the EPIC cohort study. **BMC Medicine**, v. 15, n. 1, p. 115, 2017.

PERNER, S.; HOFER, M. D.; KIM, R.; SHAH, R. B.; LI, H.; MÖLLER, P.; RUBIN, M. A. Prostate-specific membrane antigen expression as a predictor of prostate cancer progression. **Human pathology**, 38(5), 696-701, 2007.

RAVI, M. et al. 3D cell culture systems: advantages and applications. **Journal of cellular physiology**, v. 230, n. 1, p. 16-26, 2015.

REIS, J.P.; FERRAZ, J.; VARELA, J.; ROMÃO, A. Diagnóstico Precoce do Carcinoma da Próstata. **Acta urológica**, 23(2): 77-83, 2006.

RHODEN, E. L.; AVERBECK, M. A. Câncer de próstata localizado. **Rev AMRIGS**, v. 54, n. 1, p. 92-9, 2010.

RIBEIRO, F.R.; DIEP, C.B.; JERONIMO, C.; HENRIQUE, R.; LOPES, C.; EKNÆS, M.; LINGJÆRDE, O.C.; LOTHE, R.A.; TEIXEIRA, M.R. Statistical dissection of genetic pathways involved in prostate carcinogenesis. **Genes, Chromosomes & Cancer**. 45:154-163. 2006.

ROCHA, L. S. Práticas de profissionais de saúde na perspectiva de idosos que convivem com câncer. **Revista da Rede de Enfermagem do Nordeste**, v. 17, n. 2, p. 301–308, 2016.

RODRIGUES, R. e SALES C. A. Aspectos Epidemiológicos e Diagnósticos do Carcinoma Prostático. **Revista Saúde e Pesquisa**; 2013, 6(1): 131- 140.

RYAN, S. L. et al. Drug discovery approaches utilizing three-dimensional cell culture. **Assay and drug development technologies**, v. 14, n. 1, p. 19-28, 2016.

SAMPIERI, K. e FODDE, R. Cancer stem cells and metastasis. **Seminars in Cancer Biology**, v.22,n.3,p. 187-193,2012.

- SAMPSON, N.; NEUWIRT, H.; PUHR, M., KLOCKER, H.; EDER, I.E. In vitro model systems to study androgen receptor signaling in prostate cancer. **Endocrine-related cancer**, 20: 49–64, 2013.
- SCHWARZENBACH, H. e PANTEL, K. Circulating DNA as biomarker in breast cancer. **Breast Cancer Res.:** BCR 17, 136, 2015.
- SESTINI, S.; BOERI M.; A. MARCHIANO et al., Circulating microRNA signature as liquid-biopsy to monitor lung cancer in low-dose computed tomography screening, **Oncotarget**, vol. 6, no. 32, pp. 32868–32877, 2015.
- SHAND, R. L. e GELMANN, E. P. Molecular biology of prostate-cancer pathogenesis. **Current opinion in urology**, v. 16, n. 3, p. 123-131, 2006.
- SHERWOOD, E. R.; BERG, L. A.; MITCHELL, N. J.; MCNEAL, J. E.; KOZLOWSKI, J. M.; LEE, C. Differential cytokeratin expression in normal, hyperplastic and malignant epithelial cells from human prostate. **The Journal of urology**, 143(1), 167-171, 1990.
- SIDAK, Z. Rectangular Confidence Regions for Means of Multivariate Normal Distributions. **Journal of the American Statistical Association**, 62, 626-633, 1967.
- SINGH, D.; FEBBO, P. G.; ROSS, K.; JACKSON, D. G.; MANOLA, J.; LADD, C.; LANDER, E. S. Gene expression correlates of clinical prostate cancer behavior. **Cancer cell**, 1(2), 203-209, 2002.
- STEWART, B. W. e WILD, C. P. World Cancer Report. **Health**, 2014.
- STROUN M, ANKER P, MAURICE P, LYAUTEY J, LEDERREY C, BELJANSKI M. Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. **Oncology**;46:318–22, 1989.
- TABOGA, S. R.; VILAMAIOR, P. S. L.; GÓES, R. M. Modulação androgênica e estrogênica na próstata: uma abordagem em modelos experimentais de roedores com enfoque na biologia estrutural. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, 946-955, 2009.
- TAYLOR R.A e RISBRIDGER, G.P. Prostatic tumor stroma: a key player in cancer progression. **Current cancer drug targets** 8: 490–7, 2008.
- TONON, T. C. A. e SCHOFFEN, J. P. F. Câncer de próstata: uma revisão da literatura. **Saúde e Pesquisa**, 2(3), 2009.
- TUXHORN, J.A.; AYALA, G.E.; SMITH, M.J.; SMITH, V.C.; DANG, T.D.; ROWLEY, D.R. Reactive stroma in human prostate cancer: Induction of myofibroblast phenotype and extracellular matrix remodeling. **Clin Cancer Res** 8:2912–2923, 2002.
- VOLIK, S., ALCAIDE, M., MORIN, R. D., & COLLINS, C. Cell-free DNA (cfDNA): clinical significance and utility in cancer shaped by emerging technologies. **Molecular Cancer Research**, 14(10), 898-908, 2016.
- WANG, Y. Z., SUDILOVSKY, D., ZHANG, B., HAUGHNEY, P. C., ROSEN, M. A., WU, D. S., CUNHA, T. J., DAHIYA, R., CUNHA, G. R., e HAYWARD, S. W. A human prostatic epithelial model of hormonal carcinogenesis. **Cancer Res.**, 61: 6064–6072, 2001.

WANG, Y.; WANG, Y.; HAYWARD, S. W.; CAO, M.; THAYER, K. A.; CUNHA, G. R. Cell differentiation lineage in the prostate. **Differentiation**, v. 68, n. July 2016, p. 270–279, 2001.

WEBBER, M. M.; QUADER, S. T.; KLEINMAN, H. K.; BELLO-DEOCAMPO, D.; STORTO, P. D.; BICE, G.; DEMENDONCA-CALACA, W; WILLIAMS, D. E. Human cell lines as an in vitro/in vivo model for prostate carcinogenesis and progression. **Prostate**, 47: 1–13, 2001.

YU, H. e DIAMANDIS, E.P. Prostate-specific antigen in milk of lactating wome. **Chem. Clin**, 1995.

ZHANG, W.; XIA, W.; LV, Z.; XIN, Y.; NI, C.; YANG, L. Liquid Biopsy for Cancer: Circulating T umor Cells, Circulating Free DNA or Exosomes? **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 41, n. 2, p. 755–768,2017.