

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Análise de *cell free* DNA circulante tumoral em células normais da próstata

Lorrayne Cristina Moura Garcia

Monografia apresentada à  
Coordenação do Curso de  
Biotecnologia, da Universidade  
Federal de Uberlândia, para  
obtenção do grau Bacharel em  
Biotecnologia

Uberlândia – MG  
2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Análise de *cell free* DNA circulante tumoral em células normais da próstata

Lorrayne Cristina Moura Garcia

Profª. Dra. Vivian Alonso Goulart  
(Instituto de Biotecnologia)

Aline Gomes de Souza  
(Universidade de São Paulo)

Homologado pela coordenação do Curso  
de Biotecnologia em / / .

Uberlândia – MG  
2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Análise de *cell free* DNA circulante tumoral em células normais da próstata

Lorrayne Cristina Moura Garcia

Aprovado pela Banca Examinadora em: 01/04/2022 Nota: 95



---

Nome e assinatura do Presidente da Banca Examinadora

Uberlândia,  
2022

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer aos meus pais, Francielle e Marcelo, por todo incentivo, apoio e paciência durante essa caminhada, e por sempre acreditarem em mim. Às minhas irmãs, em especial a Gabrielle, por fazerem meus dias mais leves e serem minha fonte de alegria durante os dias difíceis. Ao meu esposo, Pedro Paulo, que foi meu companheiro durante essa jornada da graduação e se manteve sempre presente para me auxiliar e motivar. Sem vocês nada disso seria possível.

Agradeço também a todos da minha família que estiveram presentes durante todos os anos de graduação, tornando essa etapa mais fácil. Aos meus amigos Ludmilla, Daniely, Pedro, Amanda, Tiago, Laura, Natieli, Ana Gabriela, André, Bárbara, Bianca, Sara, Bethânia, Antonielle, Gabriela, Isabela Lemos e Isabella Castro, por fazerem dos meus anos de faculdade e dos meus dias mais felizes. Aos meus companheiros do laboratório de Nanobiotecnologia (UFU) por contribuírem para o meu conhecimento e crescimento, ao grupo de pesquisa GEP-Mmol, e especialmente a Esther por ter se tornado uma amiga tão querida, por toda ajuda, paciência e cuidado comigo durante todos esses anos.

A minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vivian Alonso Goulart, que foi essencial tanto na minha vida acadêmica quanto pessoal. Obrigada pela paciência, perseverança e gentileza, obrigada por me ensinar a enxergar a ciência com outros olhos, obrigada por estar sempre presente.

A minha coorientadora Aline Gomes de Souza por ter pego na minha mão desde o início e me mostrado como esse mundo de ciência e pesquisa funciona. Obrigada pela amizade, pelos conselhos e ensinamentos.

Finalmente, agradeço a Deus pela sua graça e misericórdia que me trouxeram até aqui. Que Ele seja sempre honrado!

## RESUMO

O câncer de próstata (CaP) é uma das principais neoplasias malignas que atingem os homens após os 50 anos de idade. Devido a isso, pesquisadores tem buscado entender os diferentes mecanismos das células tumorais para que seja possível identificar e tratar precocemente o CaP. Um dos alvos de investigação é o *cell free* DNA circulante (*cfDNA*), que se refere ao DNA circulante derivado de células apoptóticas e da atividade celular e geralmente é encontrado na corrente sanguínea e pode ser capturado por meio da biopsia líquida, através de amostras biológicas como sangue ou soro. Trabalhos atuais mostram que pacientes que são acometidos pelo câncer, possuem maior nível de *cell free* DNA nos fluidos biológicos comparado a indivíduos saudáveis, desta forma, o *cell free* DNA advindo de células tumorais é uma molécula promissora para o controle tumoral. Portanto, este trabalho teve como objetivo quantificar o *cell free* DNA das linhagens celulares da próstata (PC-3 e PNT-2), assim como avaliar a migração e viabilidade celular após a liberação do mesmo, e analisar a linhagem normal da próstata (PNT-2) após ser tratada com *cell free* DNA isolado da linhagem tumoral cultivada em sistema tridimensional (3D). Os dados mostraram que o *cell free* DNA liberado pela linhagem PC-3 é capaz de alterar a morfologia, a capacidade migratória das células normais da próstata e a sua viabilidade, sugerindo um importante papel desta molécula no processo tumoral.

**Palavras-chave:** câncer de próstata; *cell free* DNA; biopsia líquida.

## SUMÁRIO

|                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b>                                                    | 1  |
| 1.1. Glândula Prostática                                                | 1  |
| 1.2. Câncer de Próstata                                                 | 2  |
| 1.3. Biópsia Líquida                                                    | 4  |
| 1.4. Cultura Celular Tridimensional para o estudo do Câncer de Próstata | 6  |
| <b>2. OBJETIVOS</b>                                                     | 6  |
| 2.1. Objetivos Específicos                                              | 6  |
| <b>3. METODOLOGIA</b>                                                   | 7  |
| 3.1. Cultura de Células                                                 | 7  |
| 3.2. Obtenção de <i>cf</i> DNA das células tumorais PC-3                | 7  |
| 3.3. Cultura de Células 3D das células PNT-2                            | 8  |
| 3.4. Obtenção de <i>cf</i> DNA das células tumorais cultivadas em 3D    | 8  |
| 3.5. Tratamentos das células normais PNT-2                              | 8  |
| 3.6. Análise de Migração Celular                                        | 9  |
| 3.7. Viabilidade Celular                                                | 9  |
| 3.8. Análise Estatística                                                | 10 |
| <b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>                                        | 10 |
| 4.1. Cultivo em 3D da linhagem tumoral PC-3 e normal PNT-2              | 10 |
| 4.2. Quantificação de <i>cf</i> DNA                                     | 12 |
| 4.3. Migração Celular                                                   | 13 |
| 4.4. Viabilidade Celular                                                | 14 |
| <b>5. CONCLUSÃO</b>                                                     | 19 |
| <b>6. LIMITAÇÕES</b>                                                    | 19 |

|                                            |           |
|--------------------------------------------|-----------|
| <b>7. PERSPECTIVAS FUTURAS .....</b>       | <b>19</b> |
| <b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b> | <b>20</b> |

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                          |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1:</b> Anatomia da glândula prostática .....                                   | 2  |
| <b>Figura 2:</b> Representação de microplacas moldadas por agarose .....                 | 10 |
| <b>Figura 3:</b> Imagem representativa do cultivo tridimensional .....                   | 13 |
| <b>Figura 4:</b> Imagem representativa da morfologia 3D de um esferóide .....            | 14 |
| <b>Figura 5:</b> Representação gráfica do ensaio de quantificação de <i>cf</i> DNA ..... | 15 |
| <b>Figura 6:</b> Imagens capturadas do ensaio de migração .....                          | 15 |
| <b>Figura 7:</b> Representação gráfica do ensaio de migração celular .....               | 16 |
| <b>Figura 8:</b> Representação gráfica do ensaio de viabilidade celular .....            | 17 |
| <b>Figura 9:</b> Imagem representativa do ensaio de viabilidade celular .....            | 18 |
| <b>Figura 10:</b> Imagem representativa do ensaio de viabilidade com marcadores .....    | 18 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|              |                                                |
|--------------|------------------------------------------------|
| <b>CZ</b>    | Zona central                                   |
| <b>TZ</b>    | Zona de transição                              |
| <b>PZ</b>    | Zona periférica                                |
| <b>PSA</b>   | Antígeno prostático específico                 |
| <b>HPB</b>   | Hiperplasia prostática benigna                 |
| <b>CaP</b>   | Câncer de próstata                             |
| <b>CTCs</b>  | Células tumorais circulantes                   |
| <b>CtDNA</b> | DNA tumoral circulante                         |
| <b>CfDNA</b> | DNA livre de células / <i>Cell-free DNA</i>    |
| <b>EVs</b>   | Vesículas extracelulares                       |
| <b>PC3</b>   | Células epiteliais tumorais de próstata humana |
| <b>LNCaP</b> | Células de adenocarcinomas da próstata humana  |
| <b>PNT2</b>  | Células epiteliais normais da próstata humana  |
| <b>IP</b>    | Iodeto de propídio                             |
| <b>DPBS</b>  | <i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline</i>    |
| <b>CaP</b>   | Câncer de Próstata                             |

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. Glândula Prostática**

A próstata é uma glândula exócrina acessória que faz parte do sistema reprodutor masculino, está localizada abaixo da bexiga e à frente do reto e possui função secretora. As secreções prostáticas são ricas em proteínas, lipídeos, ácido cítrico, amilases, fibrinolisinase, zinco, dentre outras substâncias que protegem o trato urinário inferior de infecções e contribuem para a fertilidade masculina, visto que a principal função da próstata é produzir secreções essenciais para o desempenho dos espermatozoides (LEE et al., 2011; HALL, 2011; HARVEY et al., 2014). O crescimento da próstata é controlado pelas interações entre o epitélio e o estroma prostático e ocorre na puberdade, devido ao estímulo da testosterona, atingindo o tamanho estacionário por volta dos 20 anos de idade. Em alguns homens, aproximadamente aos 50 anos de idade, essa glândula começa a regredir associada à redução da produção de testosterona pelos testículos (HALL, 2011; LEE et al., 2004).

A próstata é dividida em quatro áreas: zona central (CZ), zona de transição (TZ), zona periférica (PZ) e o estroma fibromuscular anterior (Figura 1). A zona periférica é a maior delas, responsável por cerca de 70% do tecido glandular e nesta zona é mais comum ocorrer carcinoma, prostatite crônica e atrofia pós-inflamatória. A zona central é responsável por cerca de 25% do tecido glandular e circunda os dutos ejaculatórios. A zona de transição é responsável por apenas 5% do tecido glandular e é essa região que aumenta quando há hiperplasia benigna da próstata. Por fim, o estroma fibromuscular anterior não contém tecido glandular e é composto de elementos musculares lisos e fibrosos (BHAVSAR, et al., 2014).

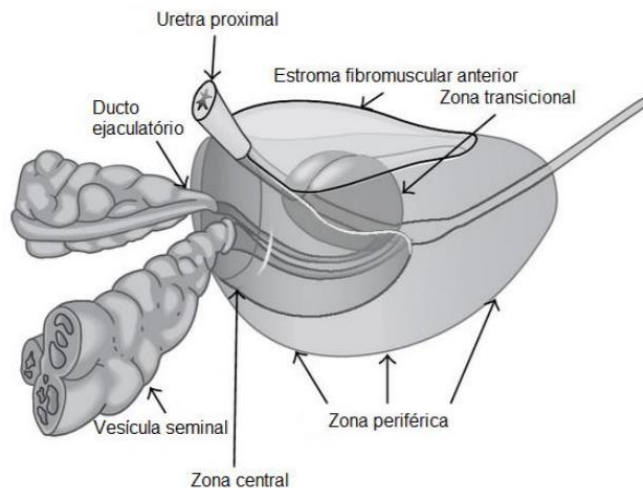


**Figura 1.** Anatomia da glândula prostática (Imagem retirada e adaptada de Bhavsar e Verma, 2014)

Ademais, a próstata também é responsável pela produção do antígeno prostático específico (PSA), um importante marcador funcional que é produzido em massa pelo epitélio glandular e tem como função solubilizar o espermatozoides após a ejaculação. Caso seja encontrado em elevados níveis sanguíneos pode indicar hiperplasia prostática benigna (HPB), prostatite e adenocarcinoma de próstata (CaP) (SILVERTHORN, 2010; KIERSZENBAUM, 2008; LILJA et al., 2008).

## 1.2. Câncer de Próstata

O câncer de próstata (CaP) é o tipo de câncer que mais afeta os homens e é um grande problema de saúde mundial, devido à sua alta incidência e mortalidade (DUNN, M. W., et al., 2011; DAMBER; AUS, 2008). No Brasil, este tipo de câncer é o segundo mais comum entre os homens e em valores totais, considerando homens e mulheres, é o quarto tipo mais comum. No país, estimam-se 65.840 casos novos de câncer de próstata para cada ano do triênio 2020-2022, esse valor corresponde a um risco aproximado de

62,95 casos novos a cada 100 mil homens. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer de próstata ocupa a primeira posição no país em todas as regiões brasileiras, com um risco de 72,35 a cada 100 mil na Região Nordeste; de 65,29 a cada 100 mil na Região Centro-Oeste; de 63,94 a cada 100 mil na Região Sudeste; de 62,00 a cada 100 mil na Região Sul; e de 29,39 a cada 100 mil na Região Norte (INCA, 2022).

Os fatores responsáveis pelo desenvolvimento da doença podem ser externos ao organismo, como por exemplo: alimentação, meio ambiente e estilo de vida ou internos ao organismo, sendo principalmente geneticamente pré-determinados.

O tratamento do câncer pode ser feito através de cirurgia, radioterapia ou quimioterapia. Em muitos casos, é necessário combinar mais de uma modalidade para o sucesso do tratamento, que por sua vez dependerá do tipo e estágio do câncer (KARAYI; MARKHAM, 2004); (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2016).

Quando não tratado o CaP pode se tornar mais agressivo, possibilitando sua progressão para hormônio resistente e culminando com a ocorrência de metástases. A sobrevida de pacientes com CaP está relacionada a muitos fatores, especialmente ao estágio do tumor no momento do diagnóstico (KAWAKAMI; SIEMENS; NICKEL, 2004). Atualmente, o acompanhamento das alterações prostáticas é realizado em 4 etapas: toque retal ("*Digital rectal examination*"), dosagem sérica do antígeno prostático específico ("*Prostate specific antigen*"), ultrasonografia transretal e biópsia tecidual (FRANKEL et al., 2003; WILLEMSE et al., 2021). Contudo, a complexidade do manejo da doença está cada vez maior devido à progressão heterogênea e a presença de subgrupos com diferentes prognósticos (KARAYI; MARKHAM, 2004).

A taxa de sobrevida em cinco anos de homens com câncer confinado à próstata é excelente em comparação ao contexto metastático, visto que aproximadamente 99% dos homens com diagnóstico precoce e tratamento adequado tem uma boa qualidade de vida,

enquanto somente 28,5% dos homens com diagnóstico tardio conseguem se recuperar (GAUDREAU et al., 2016). Assim, sistemas de rastreio são necessários para que possam ser utilizados no diagnóstico preciso de homens assintomáticos portadores de tumores agressivos localizados, afim de reduzir substancialmente a morbidade do CaP, incluindo metástases dolorosas e até mesmo a mortalidade (KARAYI; MARKHAM, 2004).

Os exames padrões de detecção precoce de CaP incluem o exame de toque retal e o exame de quantificação sérica do antígeno prostático específico (PSA), uma glicoproteína produzida por células epiteliais da próstata e um biomarcador muito utilizado, porém específico de órgão e não de CaP (DÍAZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2021) e com valor diagnóstico limitado para distinguir entre os estágios do CaP e as condições benignas como a HPB (hiperplasia prostática benigna) (STANGELBERGER et al., 2007). Além disso, outras variáveis podem alterar os níveis de PSA e dessa forma precisam ser considerados antes do exame, como por exemplo: ejaculação, prostatite bacteriana (KAWAKAMI; SIEMENS; NICKEL, 2004), inflamação prostática assintomática (SIMARDI et al., 2004), dentre outras. Outra questão fundamental é a crescente incidência de CaP em pacientes com nível de PSA < 4 ng/mL. Devido a esses fatores que mostram a ineficiência do teste PSA, atualmente muitas pesquisas buscam novas estratégias para o “*screnning*” do CaP.

### **1.3. Biópsia Líquida**

A biópsia tecidual, apesar de muito utilizada, é um método muito invasivo, pois a análise é realizada em amostras de tecido. Para suprir a carência de novas alternativas, a biópsia líquida trouxe uma nova perspectiva de diagnósticos menos invasivos e determinação de prognósticos através da triagem de biomarcadores (LI *et al.*, 2020; SWAMI *et al.*, 2020).

A biópsia líquida aborda uma nova maneira de detecção das moléculas exclusivas do tumor em fluidos biológicos ou na circulação sanguínea (GINGRAS; SALGADO; IGNATIADIS, 2015). Comparada a biópsia com tecido, a biópsia líquida é um método menos invasivo, o que representa melhorias para o tratamento do paciente, possibilitando o acompanhamento em tempo real do comportamento tumoral (ZHANG et al., 2017). Além disso, comparada ao PSA, a biópsia líquida pode ser mais específica já que abrange a detecção de moléculas oriundas do tumor, que não estão presentes na mesma condição em indivíduos saudáveis ou com HPB (PANTEL; ALIX-PANABIÈRES, 2016).

Os principais tipos de biópsias líquidas tratam-se da detecção de células tumorais circulantes (CTCs), DNA tumoral circulante (ctDNA) ou *cell free* DNA (cfDNA) e vesículas extracelulares (EVs) também derivadas do tumor em fluidos corpóreos (CROWLEY et al., 2013; ZHANG et al., 2017). Geralmente a biópsia é feita utilizando plasma, urina ou mesmo a saliva dos pacientes. Nem sempre os estudos buscam analisar a presença destes três tipos de componentes no material biológico escolhido, a maioria concentra sua atenção na busca de um tipo específico de biópsia, seja a análise de CTCs, EVs ou cfDNA.

Dentre os três tipos de biópsia líquida citados, o cfDNA refere-se ao DNA circulante derivado de células apoptóticas e da atividade celular, geralmente encontrado na corrente sanguínea (HEITZER; ULZ; GEIGL, 2015); (RIVA, et. al, 2016). Este pode ser capturado em amostras biológicas, como sangue ou soro para análise de diferentes doenças, bem como pode ser adequado para uma variedade de aplicações na pesquisa, como PCR em tempo real, PCR digital e sequenciamento da nova geração (*next generation sequencing*). O cfDNA derivado do tumor é particularmente atrativo para o uso em diagnóstico por ser abundante no plasma e sua utilização em sequenciadores de nova geração tem recentemente resultado em estratégias para o monitoramento do tumor

quando livre ou no interior das EVs (LEE et al., 2011); (WANG et al., 2017). Em pacientes com câncer, a quantidade no soro ou plasma de *cfDNA* é maior do que em pacientes saudáveis, podendo também ser utilizado para o prognóstico no câncer (BENNETT et al., 2015; SOUZA et al., 2020); (KIM et al., 2014).

No entanto, quando se avalia *cfDNA* em pacientes há algumas limitações pois nas amostras biológicas o *cfDNA* encontrado não é exclusivo de células tumorais, uma vez que células normais também liberam *cfDNA* (BRONKHORST et al., 2016) (WANG et al., 2017). Além disso, de acordo com estudos, o *cfDNA* é capaz de alterar o fenótipo das células, irrompendo episódios relacionados à transformação maligna nestas células (SOUZA et al., 2020). Assim, é interessante avaliar também *in vitro* a presença e função destes *cfDNAs* liberados por linhagens celulares tumorais, pois pode ser considerado um alvo potencial para o diagnóstico e terapia do câncer.

A linhagem celular PNT-2, é uma linhagem epitelial imortalizada com o vírus SV40 (ECACC, 2021) que representa a linhagem normal da próstata. As linhagens de células tumorais, LNCaP, andrógeno sensível com potencial menos invasivo (HOROSZEWICZ et al., 1983) e a PC3, andrógeno-insensível e mais agressiva (TAI et al., 2011), representam dois estádios tumorais diferentes do câncer de próstata e servem como modelos biológicos para ensaios *in vitro*, bem como para avaliar *cfDNAs* que podem estar presentes também em pacientes com CaP, o que contribui imensamente para a triagem de novos marcadores.

#### **1.4. Cultura Celular Tridimensional para estudo do Câncer de Próstata**

O cultivo celular é um mecanismo importante que possibilita conhecer os mecanismos moleculares das células, identificação de bases genéticas e processos fenotípicos

envolvidos na transformação celular e contrapor o comportamento de linhagens celulares normais e tumorais. Dessa forma, as células em cultura permitem que seja criado um modelo para estudo da formação de tumores em animais e no homem (VILELA et al., 2002).

As linhagens celulares do câncer de próstata humano são derivadas de sítios metastáticos, sendo vantajosa para estudos. Além disso, é possível trabalhar com tais células em ambiente controlado para replicação, amostras uniformes, concentrações equilibradas de fármacos e entre outras características que torna o uso de culturas celulares favorável para a pesquisa (OLGA A TIMOFEEVA, NANCY PALECHOR-CERON et al., 2017).

A fim de validar a cultura celular *in vitro* e aproximar os resultados aos de estudos *in vivo* foi introduzido técnicas de cultura celular como o cultivo de monocamada ou bidimensional (2D) e tridimensional (3D). A cultura de células em 2D é feita em placas planas, causando a divisão celular e formando uma monocamada de células aderidas. Ainda que as células cultivadas em monocamada tenham limitações, elas são facilmente manuseáveis, têm menor custo para manutenção e menor risco de contaminação, tornando sua utilização viável (LAUNDOS et al., 2016; CASTIAUX et al., 2019; BRESLIN et al., 2013). A cultura celular tridimensional (3D) imita um ambiente mais semelhante ao *in vivo* para a célula do que a cultura em monocamada, pois possibilita a interação célula-célula e o desenvolvimento de estruturas tridimensionais, tornando possível avaliar a viabilidade celular, resposta e resistência a drogas anticâncer, expressão de proteínas, atividades enzimáticas, entre outras (S. BRESLIN; L. O'DRISCOLL, 2016). Os modelos em 3D também auxiliam na triagem de drogas pré-clínicas, manutenção e diferenciação de células-tronco tumorais, transdução anormal de sinal e entre outros aspectos (LV, D.; HU, Z.; LU, L.; LU, H.; & XU, X, 2017).

Diante disso, experimentos utilizando cultura de células tridimensional possibilitam uma visão mais ampla a respeito do desenvolvimento e crescimento celular, assim como a diferenciação celular tumoral, progressão, metástase, resistência a drogas para tratamento e influência de fatores externos e internos à célula, como o efeito causado pelo cfDNA tumoral nas células não tumorais.

## **2. OBJETIVOS**

Avaliar a migração e a viabilidade celular em linhagem celular normal (PNT-2) da próstata tratadas com cfDNA de linhagem celular tumoral (PC-3).

### **2.1. Objetivos específicos**

2.1.1. Isolar cfDNA de células tumorais da próstata cultivadas em 2D.

2.1.2. Isolar de cfDNA de células tumorais da próstata cultivadas em 3D.

2.1.3. Cultivar em 3D de células normais da próstata e incubação com cfDNA de células tumorais da próstata.

2.1.4. Analisar a migração das células normais da próstata incubadas com cfDNA de células tumorais.

2.1.5. Analisar a viabilidade das células normais da próstata incubadas com cfDNA de células tumorais.

## **3. METODOLOGIA**

### **3.1. Cultura de Células**

A linhagem tumoral PC-3 e a linhagem normal PNT-2 foram cultivadas em uma garrafa de 75cm<sup>2</sup> com meio RPMI 1640 (*Thermo Fisher Scientific*) e suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado (*Thermo Fisher Scientific*) e 0,1% de

gentamicina (50mg/mL). Todas as células foram cultivadas em atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Logo que atingiram 90% de confluência, as células foram utilizadas para os experimentos subsequentes.

### **3.2. Obtenção de cfDNA das células tumorais PC-3**

As células PC-3 (1 x10<sup>5</sup> por *well*) foram plaqueadas em placas de 12 “*wells*” e cultivadas por 24h. Em seguida, o meio de crescimento foi descartado e as células foram lavadas duas vezes com tampão salino fosfato (“*Phosphate-buffered saline*”-PBS) e incubadas em 1 mL de meio fresco por 24 horas. Ao final da incubação, o meio de crescimento foi coletado em tubos de 2 mL livres de nucleases e centrifugado a 2000 xg por 20 minutos e 1 mL do sobrenadante foi transferido para um tubo de 1,5 mL. As amostras foram estocadas a -80°C para purificação e quantificação do cfDNA.

O DNA do sobrenadante foi extraído a partir de 360 microlitros de meio utilizando *GenElute PCR Clean-up Kit (Sigma-Aldrich)*, de acordo com as informações do fabricante, no terceiro e quinto dia após o cultivo. A quantificação foi feita por espectrômetro Nanodrop, em leitura de absorbância 260/280nm.

### **3.3. Obtenção de cfDNA das células tumorais cultivadas em 3D**

O cultivo 3D foi feito em uma microplaca de 96 poços moldada por micromoldes de agarose (Figura 2). Os micromoldes foram preparados com 1 grama de agarose dissolvida em 50 mL de solução NaCl 0,9%, que foi adicionado 350 microlitros dessa solução para constituir o micromolde. Após 3 minutos, o micromolde com 96 *wells* foi desenformado e introduzido em um *well* da placa de 24. Em seguida, adicionou-se 1 mL de meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado e 0,1% de gentamicina (50 mg/mL) durante 15 minutos para hidratar o micromolde e após esse tempo, o meio foi retirado.

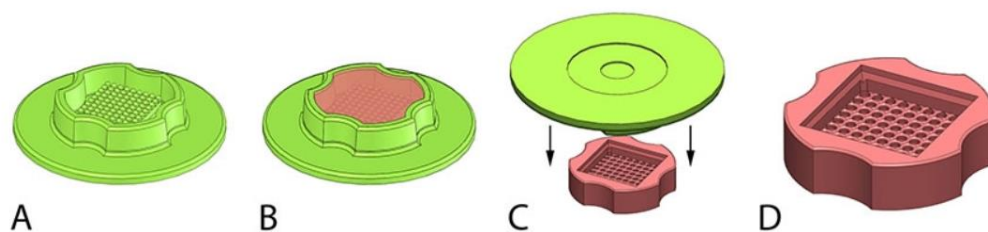


**Figura 2-** Demonstração de uma microplaca de 96 poços moldada por micromoldes de agarose (figura retirada do site *Microtissues*, disponível em <https://www.microtissues.com/>)

As células PC-3 ( $1 \times 10^5$  por *well*) foram plaqueadas em 12 “*wells*” e cultivadas por 24 horas. Ao final da incubação, o meio de crescimento foi descartado e coletado 50 microlitros do meio com sobrenadante das células contido na microplaca, em tubos de 0,6 mL, e centrifugados a 13.000 xg por 10 minutos. Em seguida, a amostra foi incubada com proteinase K durante 1 hora. As amostras foram estocadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  para purificação e quantificação de *cfDNA*.

O DNA do sobrenadante foi extraído a partir de 360 microlitros de meio utilizando *GenElute PCR Clean-up Kit (Sigma-Aldrich)*, de acordo com as informações do

fabricante, no terceiro e quinto dia após o cultivo. A quantificação foi feita por espectrômetro Nanodrop, em leitura de absorbância 260/280nm.

### **3.4. Cultura de Células 3D da linhagem PNT-2**

O cultivo 3D da linhagem PNT-2 foi feito como o descrito no item 3.3, e foi adicionado dentro do micromolde a solução de meio com células ( $130 \times 10^4$ ), e após o tempo de incubação de 1 hora na estufa, adicionou-se 500 microlitros de meio RPMI fora da microplaca. Posterior ao crescimento das células e formação dos esferóides, estas foram utilizadas para os experimentos subsequentes.

### **3.5. Tratamentos das células normais PNT-2**

Tratamento controle: meio fresco RPMI;

Tratamento 1: meio fresco RPMI condicionado com 35,45  $\mu$ l /mL de cfDNA extraído das células PC-3 do 3º dia;

Tratamento 2: meio fresco RPMI condicionado com 35,45  $\mu$ l /mL de cfDNA extraído das células PC-3 do 4º dia.

### **3.6. Análise de Migração Celular**

A análise de migração celular foi feita através do método “*Scratch*”. Após o cultivo das células PNT-2 sob condições normais e a verificação de confluência da monocamada, foi realizada uma ferida nas células, ou seja, é feito uma linha reta na placa utilizando a ponteira da pipeta p200. Em seguida, os “debris” formados foram removidos por meio da

lavagem única das placas usando 1 mL de meio fresco e as placas receberam os tratamentos (controle, 1 e 2). Após esse preparo, a primeira imagem foi captada com câmera digital acoplada ao microscópio invertido utilizando o software *Image J*, que permite calcular a área de migração das células durante o tratamento (0h). Posteriormente, as placas foram colocadas na estufa a 37°C e no período de 24 horas as placas foram novamente colocadas no microscópio invertido para a captura das imagens e posterior análise da migração celular.

### **3.7. Viabilidade Celular**

A análise de viabilidade das células PNT-2 incubadas separadamente com os três tratamentos foi realizada utilizando o kit de ensaio toxicológico *in vitro Neutral Red Based (Sigma)*. As células foram removidas da incubadora para o fluxo laminar e adicionou-se o *Neutral Red Solution* em uma quantidade equivalente a 10% volume do meio de cultura. Em seguida, a placa foi colocada novamente na incubadora por um período de 24 horas. Após o período de incubação, o meio foi removido e as células foram rapidamente lavadas com *Neutral Red Assay Fixative* e então, o fixador foi removido e o corante incorporado foi então solubilizado em um volume de *Neutral Red Assay Solubilization Solution* com um volume igual ao original do meio de cultura. A absorbância foi medida espectrofotometricamente em um comprimento de onda de 540nm e o fundo da placa *multiwell* medido a uma absorbância de 690nm.

Também foi utilizado o protocolo de calceína e iodeto de propídio (IP) para verificação da viabilidade celular através da emissão de fluorescência. O meio celular foi removido e as células foram lavadas uma única vez com 400 µL de 1 x DPBS (*Dullbecco's Phosphate-Buffered Saline*). Foi adicionado 400 µL de 3 µM de calceína e

as células foram incubadas por 30 minutos a 37°. As células foram observadas no microscópio EVOS com os filtros verde e vermelho para observar qualitativamente a fluorescência, afim de verificar se as células estavam viáveis.

### **3.8. Análise Estatística**

Todos os dados numéricos obtidos nos ensaios foram submetidos a avaliações estatísticas. A princípio, os dados foram avaliados em relação à distribuição normal das amostras e então, realizou-se o teste de ANOVA (análise de variância), *Kruskal-Wallis* e teste *t-Student* quando apropriado para verificar se havia diferença significativa. Todas as avaliações estatísticas foram realizadas por meio do software *GraphPad Prism 9.0*.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1. Cultivo em 3D da linhagem tumoral PC-3 e normal PNT-2**

A linhagem tumoral PC-3 e normal PNT-2 foram cultivadas de forma tridimensional através dos micromoldes de agarose. Após alguns dias de cultivos, as células tumorais PC-3 e normais PNT-2 apresentaram uma aglomeração celular formando pequenos esferóides. A figura abaixo (Figura 3) mostra o crescimento celular nos poços da microplaca em cultivo 3D utilizando a microscopia eletrônica. Devido ao seu mecanismo de crescimento com proliferação celular mais rápida, a PC-3, que é uma linhagem tumoral, resultou em esferóides celulares maiores e densos quando comparada a PNT-2.

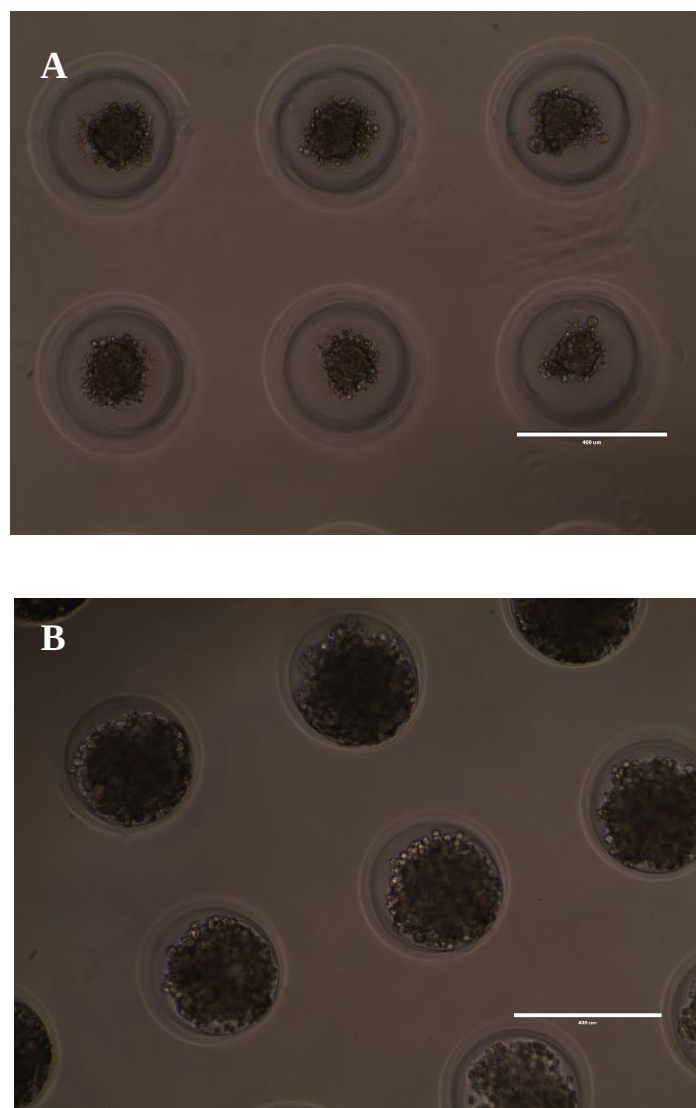


**Figura 3:** Cultivo tridimensional da linhagem celular PNT-2 **(A)** e PC-3 **(B)**. Fotografia obtida através de microscopia no aumento de 4x.

Diferentemente do cultivo em monocamada, o cultivo tridimensional promove maior contato célula-célula, visto que os esferóides formados são agregados de células compactadas que são capazes de rememorar a interação célula-célula promovendo a adesão necessária para a progressão do tumor (BRANCATO et al, 2020). Devido a esse fato, a linhagem tumoral PC-3 formou esferóides lisos, porém irregulares (Figura 4 – B), pois obteve no cultivo 3D um ambiente mais favorável (em relação ao cultivo 2D), que favoreceu o seu crescimento acelerado. Já a linhagem normal PNT-2 cultivada em 3D também demonstrou a formação de esferóides lisos, porém com uma morfologia suave e

bem compactados (Figura 4 -A), visto que o crescimento celular dessa linhagem não ocorre de forma tão exacerbada quanto a linhagem tumoral.

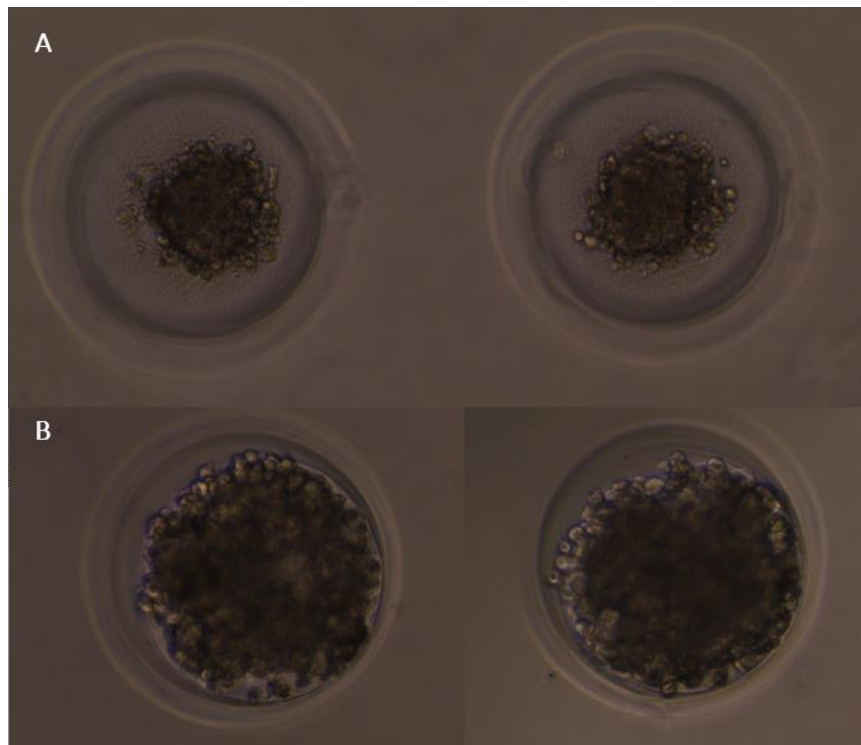


**Figura 4:** Morfologia tridimensional de um esferoide celular da linhagem celular PNT-2 (**A**) e PC-3 (**B**). Fotografia obtida através de microscopia no aumento de 10x.

#### 4.2. Quantificação de *cfDNA*

Ao final de cada dia de cultivo, durante o período de 5 dias, o *cfDNA* da linhagem normal e tumoral foi extraído e quantificado. De acordo com a medição realizada através do espectrômetro, a maior quantidade de *cfDNA* liberada pela linhagem tumoral em cultivo 3D foram nos dias 3 e 4, já a linhagem normal da próstata obteve uma maior quantidade de *cfDNA* nos dias 4 e 5 de cultivo (Figura 5). Após a análise observou-se que não houve diferença estatística significativa entre as duas linhagens celulares e entre os diferentes dias analisados.

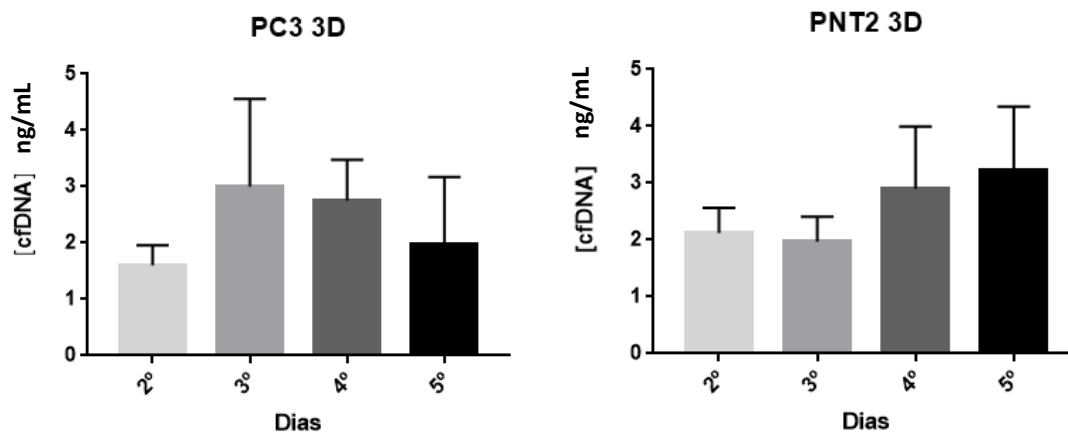


**Figura 5:** Análise da quantificação do *cell free* DNA obtido em cultivo tridimensional da linhagem tumoral PC-3 e da linhagem normal PNT-2 durante o período de 96 horas. Análise de variância (ANOVA),  $p < 0.001$ . Todos os valores estão sendo representados como média  $\pm$  SD.

A maior quantidade de *cfDNA* tumoral foi obtida no 3º e 4º dia provavelmente devido ao mecanismo de crescimento celular. Visto que as células crescem em esferóides, as células que ficam mais distantes das bordas dos esferóides não recebem a quantidade necessária de nutrientes, resultando na diminuição da produção de *cfDNA* (EDMONDSON, et al. 2014).

### 4.3. Migração Celular

Através deste ensaio foi possível observar a capacidade migratória das células PNT-2 incubadas com *cfDNA* extraído da PC-3 no 3º e 4º dia de cultivo celular (tratamento 1 e 2, respectivamente). Em relação ao controle, percebe-se que o grupo T1 aumentou a migração celular, visto que manteve cerca de 10% da área aberta, enquanto que no grupo T2 a migração celular foi reduzida uma vez que a área aberta não apresentou diferença significativa, quando comparada ao controle no mesmo tempo de tratamento (Figura 6 e 7).

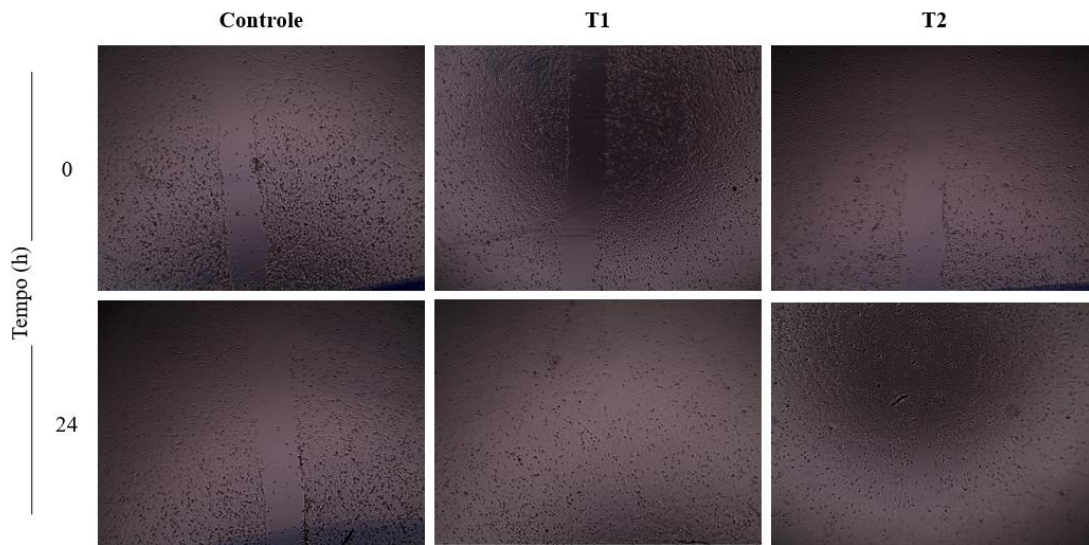


**Figura 6:** Imagens capturadas do ensaio de migração através de microscópio de luz invertido em objetiva de 4x, após o cultivo de células PNT-2 nos meios controle, Tratamento 1 (PNT-2 incubadas com *cf*DNA extraídas da PC3 no 3º dia de cultivo) e Tratamento 2 (PNT-2 incubadas com *cf*DNA extraídas da PC3 no 4º dia de cultivo) nos tempos de exposição de 0h e 24h.

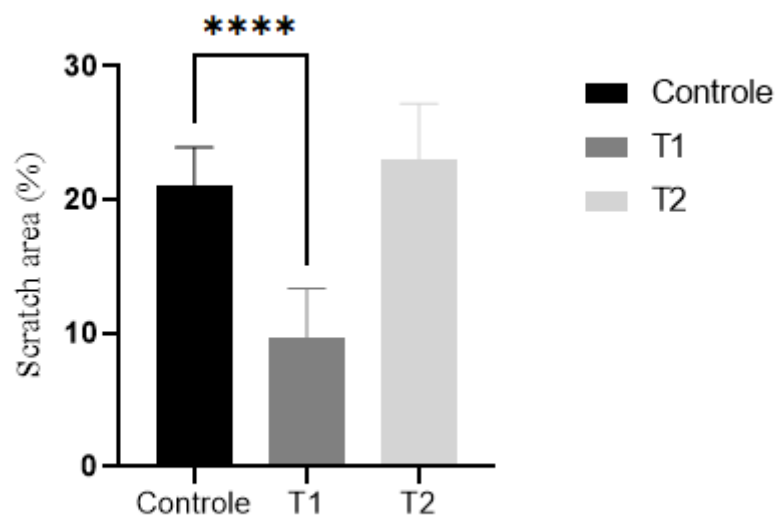


**Figura 7:** Representação gráfica do ensaio de migração, após cultivo de células PNT-2 incubadas com *cf*DNA extraídos das células PC-3 nos grupos Controle, Tratamento 1 (PNT-2 incubadas com *cf*DNA extraídas da PC3 no 3º dia de cultivo) e Tratamento 2 (PNT-2 incubadas com *cf*DNA extraídas da PC3 no 4º dia de cultivo). O gráfico mostra a área absoluta do traço/risco. \*: representa diferença estatística em relação ao grupo controle no tempo de 24 horas ( $p < 0.001$ ). Todos os valores estão sendo representados como média  $\pm$  SD.

O processo migratório ocorre em inúmeros casos inclusive em processos patológicos, como na metástase tumoral. A metástase é compreendida como a migração de células tumorais individuais ou coletivas que se soltaram do tumor primário e migram para o compartimento estromal, dirigindo-se aos vasos linfáticos e sanguíneos (VINGJEVI; MONTAGNAC, 2008). As células tumorais possuem uma multiplicidade de mecanismos que modificam a expressão gênica e aumentam a mudança morfológica celular, promovendo a migração celular (WOLF, 2003).

Desta forma, o micro ambiente tumoral possui uma composição celular que favorece o desenvolvimento e proliferação das células cancerosas, favorecendo a tumorigênese (CAMUSSI et al., 2013). Portanto, o aumento da quantidade de *cfDNA* tumoral aumenta a migração das células normais da próstata, visto que além de ter um ambiente suscetível ao crescimento, esse DNA tem um papel importante na interação entre células sendo capaz de modular as suas funções, induzindo ao crescimento mais rapidamente (GARCÍA-OLMO et al., 2000).

#### **4.4. Viabilidade Celular**

A viabilidade celular é de grande valia para diversos processos como o desenvolvimento de novas drogas para o tratamento do câncer. Desta forma, entender o quão essas células são viáveis pode abrir caminhos para diversas possibilidades (MOORE, 2019). A leitura das células foi realizada em espectrofotômetro de placas com absorvância de 540 nm e a viabilidade celular foi obtida através do cálculo: média da absorvância dos tratados/média dos controles \* 100 (WANG et al., 2011).

Após a análise, verificou-se que apesar das células tratadas com o *cfDNA* extraídas do 4º dia terem tido uma maior viabilidade, quase 80%, não houve uma diferença significativa entre os grupos tratados.

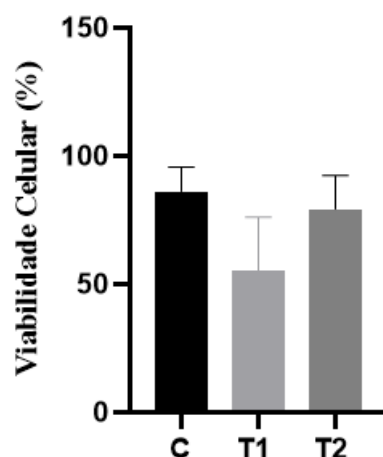


**Figura 8:** Representação gráfica do ensaio de viabilidade celular, após cultivo de células PNT-2 incubadas com *cf*DNA extraídos das células PC-3 nos grupos Tratamento 1 (PNT-2 incubadas com *cf*DNA extraídas da PC3 no 3º dia de cultivo) e Tratamento 2 (PNT-2 incubadas com *cf*DNA extraídas da PC3 no 4º dia de cultivo). O gráfico mostra a porcentagem de células viáveis no tempo de 24 horas. Todos os valores estão sendo representados como média  $\pm$  SD.

As células cultivadas em 3D, principalmente as células de linhagens tumorais (GURSKI, et al. 2010; MARIA et al. 2011; CHITCHOLTAN et al. 2012), podem ter uma maior taxa de crescimento e consequentemente maior quantidade de células viáveis devido a interação célula-célula, que ocorre de forma mais profunda em razão do crescimento ocorrer em forma de esferóides, porém isso acaba implicando em uma viabilidade de forma desigual, visto que as bordas dos esferóides podem ser mais proliferativos do que o núcleo (EDMONDSON, et al. 2014).

Para verificação da viabilidade celular é necessário saber se a célula está em apoptose ou não, por isso existem marcadores nucleares e corantes fluorescentes que são comumente utilizados para verificar essa hipótese, entre eles destacam-se: iodeto de propídio, brometo de etídio, homodímero de etídio, acridine Orange, anexina-V-FITC e calcéina AM (LECOEUR & GOUGEON, 1996; GATTI et al, 1998). O iodeto de propídio (IP) é marcador de DNA impermeável a membrana celular, pois possui elevado peso

molecular, não consegue penetrar na célula intacta e também não marca células se não houver alterações na permeabilidade da membrana plasmática, por isso ele é usado para verificar alterações nucleares características dos estágios tardios de apoptose (WILLINGHAM, 1999). Devido a presença do IP as células não viáveis (mortas) produzirão uma forte fluorescência vermelha.

Já a calceína permite a verificação da viabilidade celular por meio da diminuição da atividade esterásica, pois o acetóxi-metil-éster de calceína é um diéster fluorogênico que atravessa passivamente a membrana celular e é convertido por esterases intracelulares, que são ativas somente em célula íntegra, a seu análogo negativo, impermeável e emite fluorescência verde intensa: calceína (NERI et al., 2001; FLANAGAN PRODUTKE, 2003). Desta forma, a calceína permite determinar as células viáveis (GATTI et al, 2004).

Ao observar os esferóides tratados com IP e calceína após 24 horas no *microscópio* invertido EVOS, percebe-se a emissão de fluorescência verde, resultante da calceína, indicando que há células viáveis, principalmente nas bordas dos esferóides (figura 10). Isso ocorre, pois, as camadas externas de um esferoide são compostas principalmente por células viáveis em proliferação porque estão mais expostas ao meio e em vista disso recebem uma maior quantidade de nutrientes (EDMONDSON, et al. 2014).

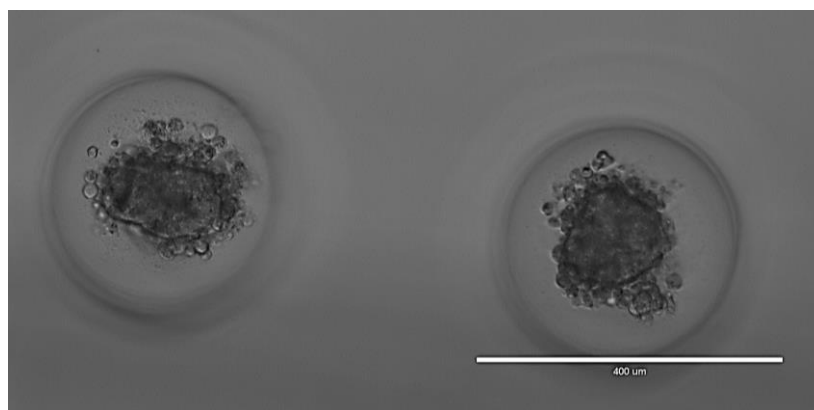


**Figura 9:** Imagem de esferóides de linhagem celular PNT-2 tratadas com *cf*DNA da linhagem PC-3 capturada pelo microscópio invertido EVOS na objetiva de 20x. Esferóides sem marcação de IP/calceína.

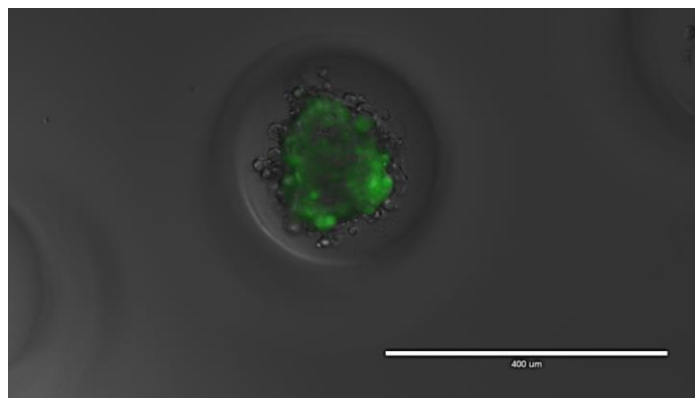


**Figura 10:** Imagem de esferóides de linhagem celular PNT-2 tratadas com *cf*DNA da linhagem PC-3 capturada pelo microscópio invertido *EVOS* na objetiva de 20x. Esferóides com marcação de IP/calceína, emitindo fluorescência verde indicando as células viáveis.

Devido ao formato e ao fato dos esferóides 3D serem compostos por células em vários estágios, incluindo células proliferativas, quiescentes, apoptóticas, hipóxicas e necróticas torna-se mais difícil que o corante integre no núcleo das células, impossibilitando perceber se houve penetração do IP e, conseqüentemente, quantificar as células não viáveis (EDMONDSON, et al. 2014).

## 5. CONCLUSÃO

- O cultivo tridimensional proporciona uma visão das células semelhante ao funcionamento *in vivo*, gerando um melhor entendimento do metabolismo e crescimento do que o cultivo 2D.
- A utilização de *cf*DNA tumoral em linhagem prostática normal é capaz de alterar a capacidade migratória das células e a viabilidade celular, indicando uma possível mudança na formação de tumores.

- É necessário a realização de mais ensaios acerca do *cfDNA* tumoral para que haja maior conhecimento e assim tenha novas possibilidades para diagnóstico precoce do câncer de prostata.

## 6. LIMITAÇÕES

Em razão da crise sanitária mundial iniciada no ano de 2020 em virtude do Covid-19 e que se mantém até os dias de hoje, não foi possível executar os experimentos como o planejado, visto que algumas técnicas não foram realizadas (análise de metabolômica), tal como a repetição de técnicas que apresentaram grande variação ou resultados muito diferentes do esperado.

## 7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Pretende-se a realização de ensaios complementares para maior entendimento do mecanismo de ação do *cell-free* DNA nas diferentes linhagens celulares, assim como o estudo para possíveis novos marcadores tumorais.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARON, L.; FRANCO, O. E.; HAYWARD, S. W. Review of Prostate Anatomy and Embryology and the Etiology of Benign Prostatic Hyperplasia. **Urologic Clinics Of North America**, [s.l.], v. 43, n. 3, p.279-288, ago. 2016. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.ucl.2016.04.012.

Aslantürk, Ö. (2018). **In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages. Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World.**

BHAVSAR, ANIL; VERMA, SADHNA. Anatomic Imaging of the Prostate. Biomed Research International. v. 2014, p.1-9, 2014. **Hindawi Limited.**

BRANCATO, V., REIS, R. L., & KUNDU, S. C. (2020). 3D cancer spheroids and microtissues. **Biomaterials for 3D Tumor Modeling**, 217–234. doi:10.1016/b978-0-12-818128-7.00010-1

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.

CHITCHOLTAN K, SYKES P, EVANS J: The resistance of intracellular mediators to doxorubicin and cisplatin are distinct in 3D and 2D endometrial cancer. **J Transl Med** 2012;10:1–16

DÍAZ-FERNÁNDEZ, ANA et al. Impedimetric aptamer-based glycan PSA score for discrimination of prostate cancer from other prostate diseases. **Biosensors and Bioelectronics**, [s. l.], v. 175, p. 112872, 2021.

EDMONDSON, R., BROGLIE, J. J., ADCOCK, A. F. & YANG, L. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. **Assay Drug Dev Technol** 12, 207-218, 2014.

EUROPEAN COLLECTION OF AUTHENTICATED CELL CULTURES. Disponível em: <https://www.phe-culturecollections.org.uk/collections/ecacc.aspx>

FARGHADANI, R. et al. (2016) “35Year Research History of Cytotoxicity and Cancer: a Quantitative and Qualitative Analysis.” **Asian Pacific journal of cancer prevention**, pp. 3139-45.

FLANAGAN PRODUKTE. TOXIZITÄTSSTUDIEN ZU MEGAHYDRIN. Disponível em: [www.flanaganprodukte.de/MegaHydrin/MegaHydrin\\_Studie/megahydrin\\_studie.html](http://www.flanaganprodukte.de/MegaHydrin/MegaHydrin_Studie/megahydrin_studie.html). Acesso em: fevereiro de 2022.

FRIEDL, P.; WOLF, K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. **Nature reviews. Cancer**, v. 3, n. 5, p. 362–74, 2003.

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.

GATTI, R., et al. Comparison of annexin V and calcein-AM as early vital markers of apoptosis in adherent cells by confocal laser microscopy. **J. Histochem. Cytochem., Baltimore**, v.46, p.895-900, 1998.

GAUDREAU et al. The Present and Future of Biomarkers in Prostate Cancer: Proteomics, Genomics, and Immunology Advancements. **Biomarkers in Cancer** 2016;8(S2) 15–33 doi:10.4137/BIC.S31802

GURSKI L, PETRELLI N, JIA X, FARACH-CARSON M: Three-dimensional matrices for anti-cancer drug testing and development. **Oncol Issues** 2010;25:20–25

HARVEY, B., SIMON, M. D. Prostate Enlargement (Benign Prostatic Hyperplasia). **National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases**, 2014.

INCA. **Câncer de próstata**, 2021. Disponível em: . Acesso em: 07 dez. 2021.

LECOEUR, H., GOUGEON, M.L. Comparative analysis of flow cytometric methods for apoptosis quantization in murine thymocytes and human peripheral lymphocytes from controls and HIV-infected persons. Evidence for interference by granulocytes and erythrocytes. **J. Immunol. Methods, Amsterdam**, v.198, p.87-99, 1996.

LI, BO et al. Facile fluorescent aptasensor using aggregation-induced emission luminogens for exosomal proteins profiling towards liquid biopsy. **Biosensors and Bioelectronics**, [s. l.], v. 168, n. August, p. 1–9, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112520>

MARIA OM, MARIA O, LIU Y, KOMAROVA SV, TRAN SD: Matrigel improves functional properties of human submandibular salivary gland cell line. **Int J Biochem Cell Biol** 2011;43:622–631

MOORE, S. Overview of Cell Viability and Cytotoxicity. News medical life sciences. 2019.

NERI, S., et al. Calcein-acetoxymethyl cytotoxicity assay: Standardization of a method allowing additional analyses on recovered effector cells and supernatants. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, Washington, v.8, n.6, p.1131-1135, 2001.

RIVA, F. et al. Clinical applications of circulating tumor DNA and circulating tumor cells in pancreatic cancer. **Mol. Oncol.** 10, 481–493 (2016).

SIDAK, Z. Rectangular Confidence Regions for Means of Multivariate Normal Distributions. **Journal of the American Statistical Association**, 62, 626-633, 1967.

SOUZA, A. G., B. SILVA, I. B., CAMPOS-FERNÁNDEZ, E., MARANGONI, K., F. BASTOS, V. A., ALVES, P. T., ALONSO-GOULART, V. Extracellular vesicles as

drivers of epithelial-mesenchymal transition and carcinogenic characteristics in normal prostate cells. **Molecular Carcinogenesis**, 57(4), 503–511, 2018.

SOUZA, A. G. DE, BASTOS, V. A. F., FUJIMURA, P. T., FERREIRA, I. C. C., LEAL, L. F., DA SILVA, L. S., GOULART, V. A. Cell-free DNA promotes malignant transformation in non-tumor cells. **Scientific Reports**, 10(1), 2020.

SOUZA, A. G., SILVA, I. B. B., CAMPOS-FERNANDEZ, E., BARCELOS, L. S., SOUZA, J. B., MARANGONI, K., ALONSO-GOULART, V. (2018). Comparative Assay of 2D and 3D Cell Culture Models: Proliferation, Gene Expression and Anticancer Drug Response. **Current Pharmaceutical Design**, 24(15), 1689–1694.

SWAMI, Umang et al. Advanced Prostate Cancer: Treatment Advances and Future Directions. **Trends in Cancer**, [s. l.], v. 6, n. 8, p. 702–715, 2020.

VIKAS, B., & ANIL, S. Cell-Based Assays in Cancer Research. **Cell Growth**. 2020.

VIGNJEVIC, D., & MONTAGNAC, G. Reorganisation of the dendritic actin network during cancer cell migration and invasion. **Seminars in Cancer Biology**. 2008.

VOLIK, S., ALCAIDE, M., MORIN, R. D. & COLLINS, C. Cell-free DNA (cfDNA): clinical significance and utility in cancer shaped by emerging technologies. **Mol. Cancer Res.** 14, 898–908 (2016)

WANG, J-p.; RUAN, J-l.; CAI, Y-l.; LUO, Q.; XU, H-x.; WU, Y-x.; *In vitro* and *in vivo* evaluation of the wound healing properties of *Siegesbeckia pubescens*. **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam, v. 134, p. 1033-1038, 2011.

WILLEMSE, PP, M. Systematic Review of Active Surveillance for Clinically Localised Prostate Cancer to Develop Recommendations Regarding Inclusion of Intermediate-risk

Disease, Biopsy Characteristics at Inclusion and Monitoring, and Surveillance Repeat Biopsy Strategy. Elsevier.

WILLINGHAM, M.C. Cytochemical methods for the detection of apoptosis. **J. Histochem. Cytochem.**, Baltimore, v.47, n.9, p.1101-1109, 1999.