

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
FISIOLOGIA

Ana Caroline Hillebrand

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA E PROTEICA DE ISOFORMAS DO  
RECEPTOR DE ANDROGÊNIO E SUA MODULAÇÃO EM HIPERPLASIA  
PROSTÁTICA BENIGNA E CÂNCER DE PRÓSTATA**

Porto Alegre

2018

Ana Caroline Hillebrand

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA E PROTEICA DE ISOFORMAS DO  
RECEPTOR DE ANDROGÊNIOS E SUA MODULAÇÃO EM HIPERPLASIA  
PROSTÁTICA BENIGNA E CÂNCER DE PRÓSTATA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de doutora em Fisiologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ilma Simoni Brum da Silva

Porto Alegre

2018

*Discovery consists of seeing what everyone has seen, and thinking what no one has thought.”*

*- Albert Szent-Gyorgi*

*1937 Nobel Laureate*

*Dedico este trabalho à minha família.*

## AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, pela oportunidade de realização deste trabalho de pesquisa.

À Professora Dra. Ilma Simoni Brum, por todo o empenho e dedicação. Pela confiança em mim depositada, por cada ensinamento, pelo apoio constante e por cada momento que tu dedicaste para me ensinar desde a importância de ler um manual de instrução até elaborar as teses mais incríveis acerca deste trabalho. Profa. Ilma, obrigada por ser essa chefinha tão maravilhosa, a “minha Profe”!

À Lolita Schneider Pizzolato, por cada segundo que passamos juntas, por cada coleta, por cada PCR, por cada cultura! Loli, eu aprendi tanto contigo... sou muito grata de te ter assim, sempre pertinho! Obrigada por ser exatamente do jeitinho que tu és, sempre disposta, sempre correta, sempre presente!

À Gisele Branchini, por ser esse grande exemplo! Gi, tu és muito especial! Sorte daqueles que te tem por perto! Obrigada por dedicar teu tempo mesmo durante os momentos mais inusitados... como num acampamento! Obrigada por estar sempre disposta a me ajudar!

Aos colegas do LaBiMET e do LaGOM, por todo o companheirismo nesses anos de caminhada. Muito obrigada por toda a ajuda!

Aos grandes mestres Professor Brasil Silva Neto e Professora Lúcia Kliemann, por toda a colaboração para o desenvolvimento deste trabalho e por estarem sempre dispostos a ensinar, estimulando o raciocínio crítico.

Ao PPG: Fisiologia, que permitiu meu desenvolvimento acadêmico e profissional. Agradeço também aos colegas do PPG pelo companheirismo e pelo estímulo ao desenvolvimento de uma pesquisa de qualidade!

Aos colegas e amigos do DKFZ e da Universidade de Heidelberg, por terem me recebido tão calorosamente, por apoiarem meu desenvolvimento intelectual e pelos ensinamentos durante o período de doutorado sanduíche.

À Sílvia Barbosa, pelo apoio científico e por essa amizade maravilhosa que iniciou lá em Heidelberg. Obrigada amiga!

Às agências de financiamento (CAPES, CNPq, FAPERGS, FIPE/HCPA), pelo apoio financeiro para o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos amigos de Nova Petrópolis, pela parceria, pelo estímulo e pelos incontáveis momentos de descontração que me possibilitaram continuar essa longa jornada!

Ao Rodrigo, por ser meu porto-seguro, por todo esse amor e admiração! Por me estimular sempre a investir no meu futuro profissional! Obrigada pelo companheirismo e pela paciência! E obrigada pelas imagens!

Aos meus pais Mário e Senaide e ao meu irmão Rafael, por me estimularem a alçar voos cada vez mais distantes e por serem meus maiores exemplos! Obrigada por estarem sempre presentes! Nada disso seria possível sem o apoio de vocês!

## RESUMO

As doenças da próstata atingem cerca de 80% dos homens com idade superior a 50 anos, o que equivale a 14 milhões de brasileiros. Dentre elas, estão os tumores da próstata, classificados em hiperplasia prostática benigna (HPB) e câncer de próstata (CaP), que são alterações do controle de crescimento das células prostáticas. Diversas alterações celulares têm sido propostas para explicar essas alterações de crescimento. Dentre estas, a expressão de variantes do receptor de androgênios (AR-Vs) parece ter papel fundamental. Entretanto, o exato mecanismo pelo qual as AR-Vs participam da fisiopatologia da HBP e do CaP hormônio-sensível necessita ser melhor elucidado. O objetivo do presente trabalho foi identificar a presença das AR-Vs no tecido benigno de HPB e no carcinoma hormônio-sensível e avaliar a possível associação com a agressividade tumoral e a recorrência bioquímica do câncer. Além disso, o presente estudo também teve como objetivo o estudo da modulação androgênica das AR-Vs em cultura celular, bem como avaliar os níveis intratecduais e circulantes de esteroides em amostras de pacientes com CaP e HPB. Os níveis de expressão do AR *full-length* (AR-FL) e das AR-Vs (AR-V1, AR-V4 e AR-V7) foram avaliados por RT-qPCR. A expressão proteica do AR-FL (AR-CTD e AR-NTD) e do AR-V7 foi avaliada pela técnica de imunohistoquímica, utilizando o escore H (H-Score) para quantificação. Todas as AR-Vs investigadas foram expressas nos tecidos de CaP e HPB. Os níveis de mRNA do AR-FL foram similares em ambos grupos. A expressão do mRNA do AR-V4 apresentou maiores níveis no grupo HPB, enquanto que os níveis de mRNA de AR-V1 e AR-V7 foram maiores no grupo CaP. A expressão proteica de AR-V7 apresentou H-Score similar nos grupos avaliados, enquanto que AR-CTD e AR-NTD foram maiores no núcleo das células epiteliais do grupo HPB. A partir das dosagens de esteroides, foram encontrados menores níveis intratecduais de testosterona, 4-androstenediona e progesterona nas amostras de CaP quando comparadas a amostras de HPB. A partir do cultivo celular foi possível observar o efeito da modulação androgênica das AR-Vs, onde foi demonstrado que altos níveis de androgênios modulam negativamente a expressão do AR-FL e das AR-Vs. Ainda que as AR-Vs não apresentem o domínio de ligação para a DHT, elas apresentam importantes alterações dinâmicas sob tratamento com este

hormônio. Também foi observado que o tratamento com flutamida isolada ou associada à baixa dose DHT estimula a proliferação das células prostáticas. Os resultados apresentados na presente tese suportam a hipótese de que há envolvimento destas isoformas constitutivamente ativas na fisiopatologia do CaP hormônio-sensível e também da HPB. Além disso, estes resultados fornecem evidências de que a resposta à modulação androgênica é diferente entre as AR-Vs. Juntos, estes achados colaboram para o entendimento da tumorigênese prostática.

**Palavras-chave:** tumores da próstata, hiperplasia prostática benigna, câncer de próstata, receptor de androgênios, isoformas do receptor de androgênios, *splicing* alternativo, hormônios esteroides, androgênios

## ABSTRACT

Prostatic diseases account for about 80% of men over the age of 50, which is equivalent to 14 million Brazilians. Among them are prostate tumors, classified as benign prostatic hyperplasia (BPH) and prostate cancer (PCa), which are changes in the growth control of prostatic cells. Several cellular alterations have been proposed to explain these alterations of prostate growth. Among these, the expression of variants of the androgen receptor (AR-Vs) seems to play a fundamental role. However, the exact mechanism by which AR-Vs participate in the pathophysiology of BPH and hormone-naïve PCa needs to be better elucidated. The aim of the present study was to identify the presence of AR-Vs in BPH and hormone-naïve carcinoma and to evaluate the possible association with tumor aggressiveness and biochemical recurrence of PCa. In addition, the present work also aimed to study the androgenic modulation of AR-Vs in cell culture as well as to evaluate the intraprostatic and circulating levels of steroids in samples of patients with PCa and BPH. The expression levels of full-length AR (AR-FL) and AR-Vs (AR-V1, AR-V4 and AR-V7) were assessed by RT-qPCR. Protein expression of AR-FL (AR-CTD and AR-NTD) and AR-V7 was assessed by the immunohistochemistry using the H-score for quantification. All investigated AR-Vs were expressed in PCa and BPH tissues. AR-FL mRNA levels were similar in both groups. Expression of AR-V4 mRNA showed higher levels in the BPH group, whereas AR-V1 and AR-V7 mRNA levels were higher in the PCa group. Protein expression of AR-V7 showed similar H-Score, whereas AR-CTD and AR-NTD were higher in the epithelial cell nucleus of BPH. Regarding the steroid dosages, were observed lower intraprostatic levels of testosterone, 4-androstenedione and progesterone in the PCa samples when compared to BPH samples. In cell culture experiments, it was possible to observe the effect of the androgenic modulation on AR-Vs, where high levels of androgens negatively modulated AR-FL and AR-V expression. Although AR-Vs do not exhibit the binding domain for DHT, they showed significant dynamic changes under treatment with this hormone. It has also been observed that treatment with flutamide alone or associated with low dose DHT stimulates the proliferation of prostatic cells. The results presented in this thesis support the hypothesis that these constitutively active isoforms are involved in the pathophysiology of hormone-naïve

CaP and also of BPH. In addition, these results provide evidence that the response to androgen modulation is different between AR-Vs. Together, these findings contribute to the understanding of prostatic tumorigenesis.

**Keywords:** prostatic tumors, benign prostatic hyperplasia, prostatic cancer, androgen receptor, isoforms of androgen receptor, alternative splicing, steroid hormones, androgens

## SUMÁRIO

RESUMO .....	16
ABSTRACT.....	18
LISTA DE ILUSTRAÇÕES .....	23
LISTA DE TABELAS .....	24
LISTA DE ABREVIATURAS E DE SIGLAS .....	25
1. INTRODUÇÃO .....	14
1.1 Hiperplasia Prostática Benigna .....	14
1.2 Câncer de próstata .....	16
1.3 Androgênios .....	18
1.4 Receptor de androgênios .....	19
1.5 Ativação do AR.....	20
1.6 AR e CaP.....	22
1.7 Modificações no AR.....	22
1.8 Processo de <i>splicing</i> alternativo.....	23
1.9 Isoformas do AR.....	24
2. HIPÓTESES .....	30
2.1 Hipóteses nulas .....	30
2.2 Hipóteses alternativas .....	30
3. OBJETIVOS .....	31
3.1 Objetivos gerais.....	31
3.2 Objetivos específicos.....	31
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
4.1 Delineamento do estudo.....	33

4.2	Critérios de inclusão e exclusão.....	33
4.3	Aspectos éticos .....	33
4.4	Estudo da expressão tecidual das AR-Vs.....	34
	Coleta das amostras de tecido prostático .....	34
	Extração de RNA total.....	35
	Síntese de cDNA.....	35
	Oligonucleotídeos iniciadores (primers).....	36
	Amplificação por PCR em tempo real.....	37
	Imunohistoquímica .....	38
	Coloração com HE .....	39
	H Score.....	40
	Razão N/C terminal .....	40
	Exame anatomopatológico e classificação dos tumores .....	40
4.5	Estudo dos níveis intrateciduals e circulantes de androgênios .....	41
	Dosagem intraprostática de androgênios .....	41
4.6	Estudo <i>in vitro</i> da modulação androgênica das AR-Vs.....	42
	Cultura de linhagem celular .....	42
	Tratamento hormonal .....	42
	Avaliação da expressão gênica do AR e de suas isoformas.....	44
	Avaliação da expressão proteica do AR e do AR-V7 .....	45
	Avaliação da proliferação celular .....	45
4.7	Deposição final de resíduos e biossegurança .....	46
4.8	Análise estatística.....	47
4.9	Local de realização do projeto .....	47

4.10 Fontes de financiamento .....	48
5. RESULTADOS .....	49
Capítulo I - .....	50
Estudo dos níveis intrateciduals e circulantes de esteroides .....	50
Resultados .....	52
Discussão .....	54
Capítulo II - .....	58
Estudo da expressão tecidual das AR-Vs .....	58
Capítulo III - .....	78
Estudo <i>in vitro</i> da modulação androgênica das AR-Vs .....	78
6. DISCUSSÃO GERAL .....	90
7. CONCLUSÃO .....	100
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	102
9. ANEXO I .....	108
10. ANEXO II .....	111

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Prevalência da hiperplasia prostática benigna (HPB).....	15
Figura 2: Incidência mundial do câncer de próstata (CaP). ....	17
Figura 3. Produção e ação dos androgênios. ....	18
Figura 4 Mecanismo de ação dos androgênios. ....	21
Figura 5: Mecanismos associados à manutenção da sinalização do AR. ....	23
Figura 6: Isoformas do AR.....	26
Figura 7 Algoritmo dos grupos experimentais.....	43
Figura 8 Protocolo experimental do cultivo celular. ....	43

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequências dos ensaios para amplificação do mRNA .....	37
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E DE SIGLAS

°C	graus Celsius
4-diona	4-androstenediona
5-diol	5-androstenediol
AR	<i>androgen receptor</i> (receptor de androgênios)
AR-FL	<i>AR full-length</i> (AR total)
AR-Vs	<i>AR variants</i> (Variantes do AR)
AR-V1	<i>AR variant 1</i> (Variante 1 do AR)
AR-V4	<i>AR variant 4</i> (Variante 4 do AR)
AR-V7	<i>AR variant 7</i> (Variante 7 do AR)
ARE	<i>androgen responsive element</i> (elemento responsivo aos androgênios)
CaP	câncer de próstata
CRPC	<i>castration resistant prostate cancer</i> (CaP resistente à castração)
cDNA	<i>complementary DNA</i> (DNA complementar)
CO <sub>2</sub>	dióxido de carbono
Ct	<i>threshold cycle</i> (ciclo limiar)
CTD	<i>carboxy-terminal domain</i> (domínio carboxi-terminal)
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucleico)
dNTPs	<i>deoxynucleoside triphosphate</i> (desoxinucleotídeos trifosfatados)
DHT	dihidrotestosterona
GEE	generalized estimating equations (equações de estimativas generalizadas)
GnRH	<i>gonadotropin-releasing hormone</i> (hormônio liberador de gonadotrofinas)
HE	hematoxilina e eosina
HPB	hiperplasia prostática benigna
HSP	<i>heat shock proteins</i> (proteínas de choque térmico)
IHC	<i>immunohistochemistry</i> (imunohistoquímica)
LBD	<i>ligand binding domain</i> (domínio de ligação ao ligante)

LNCaP	<i>lymph node carcinoma of the prostate</i>
LUTS	<i>lower urinary tract symptoms</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i> (RNA mensageiro)
NTD	<i>amino-terminal domain</i> (domínio amino-terminal)
NR	<i>nuclear receptors</i> (receptores nucleares)
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Tampão salina fosfato)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (reação em cadeia da polimerase)
qPCR	<i>real time PCR</i> (PCR em tempo real)
RPMI 1640	<i>Roswell Park Memorial Institute 1640</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (ácido ribonucleico)
RT	<i>reverse transcription</i> (transcrição reversa)
RT-qPCR	reação em cadeia da polimerase em tempo real a partir de transcrição reversa
RTU	ressecção transuretral
SRB	sulforrodamina B
SD	<i>standard deviation</i> (desvio padrão)
STUI	sintomas do trato urinário inferior
SUS	sistema único de saúde
T	testosterona
TCLE	termo de consentimento livre e esclarecido

## 1. INTRODUÇÃO

As doenças da próstata, como a hiperplasia prostática benigna (HPB), o câncer de próstata (CaP) e a prostatite são bastante frequentes na senescência. Entre a quarta e a nona década da vida, aproximadamente 90% dos homens desenvolvem HPB ou CaP (Chatterjee 2003), que representam as duas formas clinicamente mais importantes de crescimento anormal da próstata que afetam homens de idade avançada (Welen and Damber 2011).

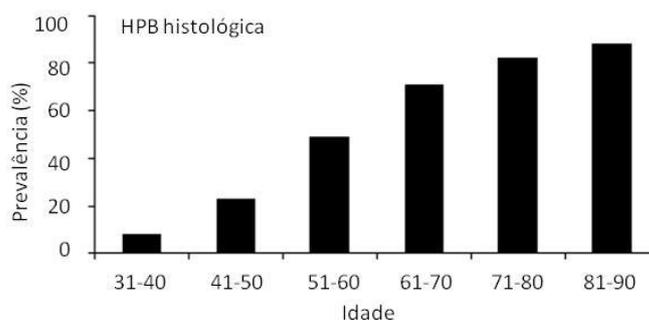
### 1.1 Hiperplasia Prostática Benigna

A HPB é considerada um fenômeno progressivo, definido como um crescimento contínuo da próstata resultante de um processo proliferativo não maligno que ocorre ao redor da uretra, com um crescimento nodular localizado na zona de transição ou zona periuretral (McNeal 1990; Buchanan, Irvine et al. 2001; Carson and Rittmaster 2003; Bushman 2009). O desenvolvimento da HPB recebe influência genética, hormonal e ambiental. Clinicamente, a HPB é caracterizada como um crescimento prostático que leva a um variado grau de obstrução da uretra, que pode ou não ser sintomática (Vasanwala, Wong et al. 2017). Evidências indicam que fatores metabólicos e o estilo de vida são importantes na etiologia da HPB e no desenvolvimento dos sintomas do trato urinário inferior (STUI), também conhecidos pela sigla LUTS (do inglês *Lower Urinary Tract Symptoms*) (Lim 2017). Esses fatores incluem obesidade, diabetes, dieta e exercício físico (Mongiu and McVary 2009; Mobley, Feibus et al. 2015).

Esta alteração é a anormalidade proliferativa da próstata mais comum nos homens, está relacionada com a idade e é muito frequente no período de senescência (Silva Neto, Koff et al. 2008; Egan 2016). Como se pode observar na figura 1a, a prevalência histológica de HPB aumenta com a idade, correspondendo a aproximadamente 10% em homens com 30 anos, 20% em homens com 40 anos, entre 50 e 60% em homens com 60 anos e de 80 a 90% para homens com 70 a 80 anos (Berry, Coffey et al. 1984; Carson and Rittmaster 2003; Roehrborn and Rosen 2008). Um banco de dados recentemente disponibilizado pelo Ministério da Saúde

(DATASUS 2018) indica um grande número de internações por HPB, o que leva a gastos elevados do sistema de único de saúde (SUS), seja com procedimentos cirúrgicos ou internações clínicas, além da morbidade causada ao paciente. De fato, a HPB pode ser considerada um processo fisiológico que apresenta variação na sua incidência entre diferentes subgrupos étnicos, que pode refletir diferenças étnicas nos fatores que influenciam o crescimento nodular prostático, como peso corporal e dieta (Hoke and McWilliams 2008).

Histologicamente, a HPB consiste na proliferação do estroma fibromuscular e do epitélio glandular na região periuretral e na zona de transição da glândula prostática. Os STUI são muito comuns na HPB. Entre eles, estão fluxo urinário fraco, hesitação durante a micção, esforço para iniciar a micção, noctúria e sensação de esvaziamento incompleto da bexiga após a micção (O'Leary, Wei et al. 2008). Esses sintomas decorrem da influência mecânica, onde o aumento do volume tecidual promove a redução do calibre da uretra com aumento da resistência à passagem do fluxo urinário. Quando o tecido fibromuscular é preponderante, os sintomas urinários são frequentemente irritativos (sintomas de armazenamento) ao invés de obstrutivos (sintomas de esvaziamento), e podem estar relacionados ao grau de estimulação alfa-adrenérgica da musculatura lisa (McNeal 1990).



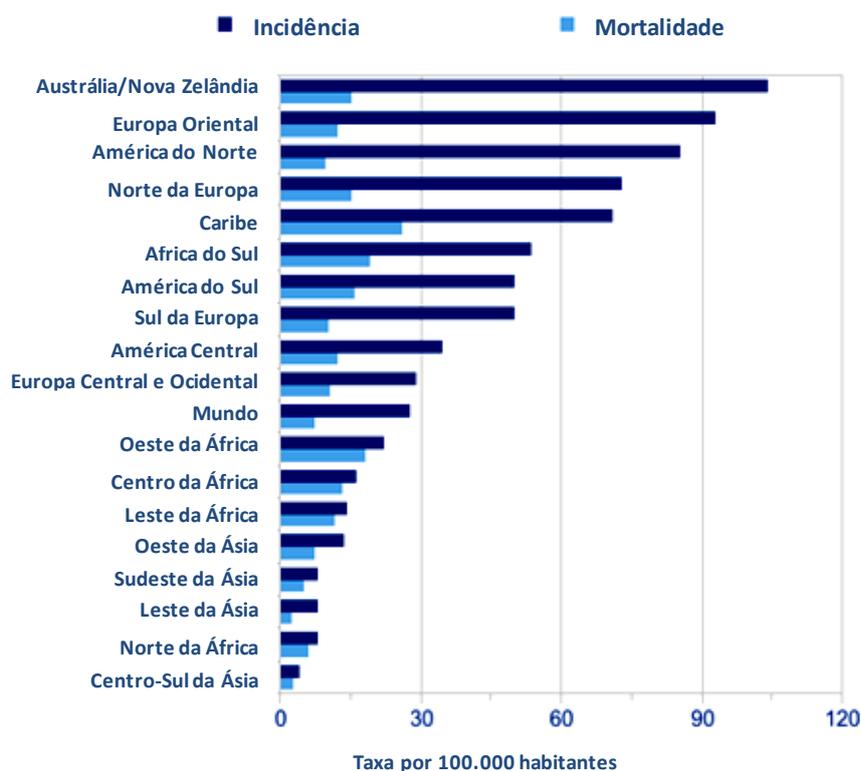
**Figura 1:** Prevalência da hiperplasia prostática benigna (HPB). 1a) Prevalência da HPB histológica em função da idade, adaptada de Berry e colaboradores (1984).

## 1.2 Câncer de próstata

À exceção do câncer de pele não melanoma, CaP é a neoplasia mais comum em homens brasileiros, com estimativa prevista de 68.220 novos casos para o ano de 2018, o que corresponde a um risco estimado de 66,12 novos casos a cada 100 mil homens. De acordo as estimativas para o ano de 2018 publicadas pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA), os 5 tumores mais incidentes para sexo masculino são o câncer de pele não melanoma (85.170 novos casos), de próstata (68.220), de traqueia, brônquio e pulmão (18.740), de cólon e de reto (17.380) e estômago (13.540). Atrás somente dos tumores de pele não melanoma, o CaP é o mais incidente entre os homens em todas as regiões do país: 96,85/100 mil na região Sul, 69,83/100 mil na região Sudeste, 66,75/100 mil na região Centro-Oeste, 56,17/100 mil na região Nordeste e 29,41/100 mil na região Norte (INCA 2017). A incidência e a mortalidade de CaP variam entre os países. Mundialmente, cerca de 1,1 milhões de homens foram diagnosticados com CaP em 2012, representado 15% da totalidade de cânceres diagnosticados em homens, sendo que aproximadamente 70% (759 mil) dos casos ocorreram nas regiões mais desenvolvidas (Ferlay, Soerjomataram et al. 2015), como pode ser observado na figura 2. O aumento na incidência pode ser explicado, em parte, pelo fato do rastreamento (*screening*) realizado com o PSA (antígeno prostático específico) e o exame de biópsia terem se tornado comuns nestas regiões. De acordo com a Sociedade Americana de Câncer (*American Cancer Society*), estima-se que sejam diagnosticados aproximadamente 164.690 casos de CaP nos Estados Unidos no ano de 2018, com expectativa 29.430 mortes relacionadas a este tipo de câncer (Society 2018). Entre os anos 2014 e 2035, prevê-se que as taxas de incidência aumentem 12% no Reino Unido. Isto corresponde, para o ano de 2035, a um risco estimado de 233 casos a cada 100 mil homens (Smittenaar, Petersen et al. 2016). Em relação à morte relacionada ao câncer, o CaP ocupa a quinta posição. A taxa mortalidade é mais elevada em homens negros (29/100.000 casos) e bastante baixa em homens asiáticos (2,9/100.000 casos) (Ferlay, Soerjomataram et al. 2015).

Em seu desenvolvimento inicial, o CaP é assintomático; porém, com o crescimento, pode invadir a vesícula seminal, os ureteres e a base da bexiga, sendo também responsável por metástases ósseas, hepáticas, pulmonares e adrenais (Mazhar and Waxman 2002). A

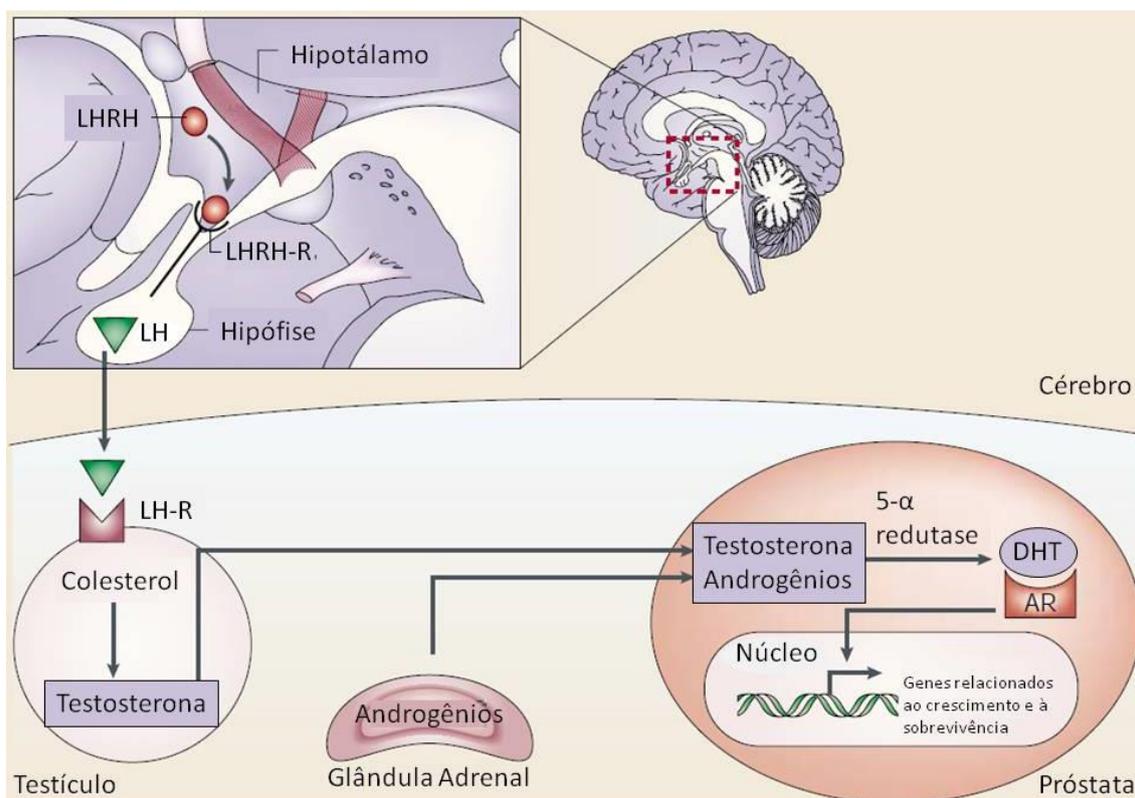
terapia de ablação androgênica resulta, inicialmente, na morte celular ou bloqueio do ciclo celular (Balk and Knudsen 2008). Em 70 a 80% dos homens com CaP submetidos à terapia antiandrogênica ocorre resposta favorável; porém, este efeito é transitório, com muitos pacientes vindo a desenvolver um crescimento independente de androgênios (Edwards, Krishna et al. 2001; Damber and Aus 2008). De acordo com Marcias (2010), após um período de 18 a 24 meses de deprivação androgênica eficaz, muitos pacientes desenvolvem um câncer independente de hormônio, e a terapia de escolha, além da quimioterapia, é o tratamento paliativo dos sintomas (Marcias, Erdmann et al. 2010). Fato intrigante é que, entre 2007 e 2013, a incidência de CaP metastático tem aumentado entre homens americanos, enquanto que a incidência de CaP de baixo risco diminuiu no mesmo período (Weiner, Matulewicz et al. 2016). As explicações para este fato incluem tanto alterações na biologia da agressividade do CaP quanto no aumento da assertividade diagnóstica da doença metastática (Weiner, Matulewicz et al. 2016).



**Figura 2:** Incidência mundial do câncer de próstata (CaP). Incidência e a mortalidade por região mundial para o câncer de próstata a cada 100.000 homens (CancerResearchUK 2011).

### 1.3 Androgênios

Testosterona (T), dihidrotestosterona (DHT), 4-androstenediona (4-diona) e 5-androstenediol (5-diol) são exemplos de androgênios (Dutt and Gao 2009), hormônios esteroides que possuem papel fundamental no desenvolvimento, manutenção e regulação do fenótipo e fisiologia reprodutiva masculina (Aaron, Franco et al. 2016). No homem, a maior parte dos androgênios é produzida nos testículos e, em menor parte, na glândula suprarrenal, enquanto que seu metabolismo ocorre nos tecidos-alvo, como por exemplo, a próstata e a pele. Sua produção é regulada pelo eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (Denmeade and Isaacs 2002; Ntais, Polycarpou et al. 2003) e tem como molécula precursora o colesterol. Os efeitos biológicos dos androgênios ocorrem via ligação ao receptor de androgênios (AR) (Lu, Tsai et al. 1997; Balk and Knudsen 2008) (Figura 3).



**Figura 3.** Produção e ação dos androgênios. No hipotálamo, ocorre a síntese do hormônio liberador do hormônio luteinizante (*luteinizing hormone-releasing hormone*, LHRH), atualmente denominado GnRH (hormônio liberador de gonadotrofinas, do inglês *gonadotrohin releasing hormone*). O GnRH segue até a hipófise onde interage com seu receptor (LHRH-R), estimulando a liberação de LH. O LH secretado pela hipófise liga-se ao seu receptor (LH-R) presente nos testículos, induzindo a produção de testosterona (T) a partir do colesterol. A T entra na célula prostática, onde é convertida em dihidrotestosterona (DHT) pela enzima 5- $\alpha$ -redutase. A DHT liga-se com alta afinidade ao AR no citoplasma celular e o complexo hormônio-receptor é translocado para o núcleo, onde ativa a transcrição de genes que regulam

o crescimento e a sobrevivência celular. Níveis elevados de T são capazes de diminuir a produção de GnRH e LH via alça de retroalimentação negativa (*feedback* negativo), mantendo assim a T sérica em níveis fisiológicos. A glândula adrenal também pode sintetizar androgênios. Figura adaptada de (Denmeade and Isaacs 2002)

Os androgênios regulam o crescimento e a diferenciação da glândula prostática; desta forma, não é surpreendente que o crescimento do CaP seja também estimulado pelos androgênios (Edwards, Krishna et al. 2001). De fato, o desenvolvimento de novas terapias para o tratamento do CaP repousa historicamente sobre a compreensão de como os androgênios influenciam o desenvolvimento desta doença. Em seu marcante trabalho publicado na década de 1940, Huggins e Hodges mostraram que a orquiectomia ou a administração de estrogênios fenólicos resultou em regressão do CaP, enquanto que nos casos não-tratados, a T aumentou a taxa de crescimento desta neoplasia (Huggins and Hodges 1941). Como reconhecimento à importância desses achados, Charles Huggins recebeu o Prêmio Nobel em Fisiologia e Medicina em 1968. No final da década de 1960, foi descrita a interação nuclear entre os androgênios e o AR (Anderson and Liao 1968; Bruchofsky and Wilson 1968). Em seguida, deu-se início ao desenvolvimento dos primeiros fármacos antiandrogênicos para a terapia do CaP.

#### **1.4 Receptor de androgênios**

O AR é uma proteína de 110 kDa que atua como fator transcricional dependente de ligante e pertence à superfamília de receptores nucleares (NR), possuindo papel fundamental na regulação da fisiologia da próstata, como embriogênese, crescimento e diferenciação (Gobinet, Poujol et al. 2002; Aaron, Franco et al. 2016). Os NR são proteínas intracelulares que são ativadas por pequenas moléculas, como os hormônios esteroides, ácidos graxos e retinoides. Dependendo do tipo do ligante, os NR podem ser classificados em receptores de hormônios esteroides, receptores tireoideanos ou retinoides, ou, ainda, receptores órfãos (Nacusi and Tindall 2009).

O gene do AR (GeneID: 367) está localizado no cromossomo X na posição q11-q12, tem tamanho aproximado de 90 kb e possui 8 exons (NM\_000044.2, NP\_000035.2). A ativação

do AR leva a eventos angiogênicos, proliferativos e apoptóticos. De acordo com um estudo anterior, um dos principais efeitos dos androgênios nas células que expressam o AR é um aumento da atividade de cinases dependentes de ciclina e estimulação para que as células entrem na fase S (fase de síntese) do ciclo celular, induzindo, assim, a proliferação celular (Ntais, Polycarpou et al. 2003).

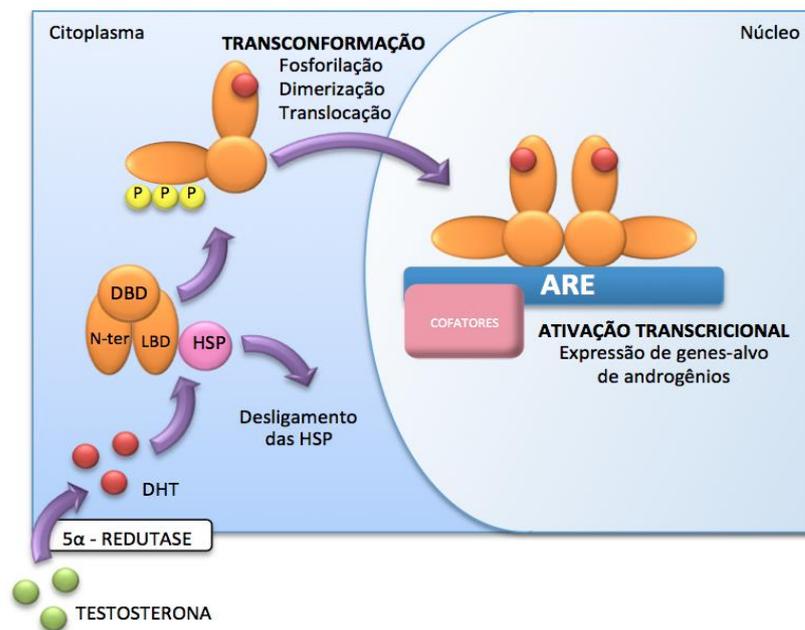
Assim como outros participantes da superfamília dos receptores nucleares, a estrutura do AR é organizada em domínios funcionais. O domínio N-terminal (NTD, do inglês *N-terminal domain*), codificado pelo exon 1, constitui aproximadamente 60% da proteína do AR de 110 kDa (Hu, Dunn et al. 2009), contém a região de ativação transcricional AF-1 (do inglês *activation function 1*), essencial para a atividade da transativação do AR, e a região AF-5, que possui uma forte atividade constitutiva, está envolvida na ativação transcricional e pode participar do recrutamento de cofatores (Gobinet, Poujol et al. 2002). Na região C-terminal, está contido o domínio de ligação ao ligante (LBD, do inglês *ligand binding domain*) que interage, funcionalmente, com fatores intermediários e cofatores nucleares. O domínio de ligação ao DNA (DBD, do inglês *DNA binding domain*) medeia a interação do AR com o elemento responsivo aos androgênios (ARE, do inglês *androgen responsive element*) no DNA (Berrevoets, Doesburg et al. 1998) através de seus dois dedos de zinco altamente conservados. Há também uma pequena sequência de aminoácidos, chamada região *hinge*, ou de dobradura, que confere flexibilidade para o rearranjo apropriado, dimerização e interação específica ao DNA (Nacusi and Tindall 2009). Nesta tese, o AR será referido como AR-FL, que se refere à sua forma selvagem, ou *full-length*, e considera suas isoformas 1 e 2, que são expressas no tecido normal, e apresentam os 8 exons característicos do gene.

## 1.5 Ativação do AR

No citoplasma da célula prostática, a T é convertida, pela ação da enzima 5 $\alpha$ -redutase, ao hormônio ativo DHT, que é o ligante natural do AR mais potente, possuindo uma constante de dissociação ( $K_d$ ) de  $10^{-11}$ , enquanto que a T possui uma  $K_d = 10^{-9}$ , e apresenta, assim, uma potência 100 vezes menor do que a DHT (Penning, Jin et al. 2008). Tanto a T quanto a DHT

ligam-se ao AR e promovem sua ativação, porém a DHT possui uma dissociação mais lenta do AR comparada com a T (Penning, Jin et al. 2008; Cheng, Wu et al. 2010).

O AR, em seu estado inativo, está normalmente associado a um complexo proteico composto por proteínas de choque térmico (HSP, do inglês *heat shock proteins*) e chaperonas. A ligação da DHT induz a dissociação das HSP, fosforilação, mudanças conformacionais e dimerização do AR (Ntais, Polycarpou et al. 2003), que, então, é translocado para o núcleo da célula. O AR dimerizado liga-se a uma sequência específica do DNA, conhecida como elemento responsivo aos androgênios (ARE), onde irá regular (ativando ou inibindo) a transcrição gênica. Este é o mecanismo de ação clássico dos androgênios, onde há interação com genes-alvo, tendo respostas consideradas lentas (Figura 4). É importante notar que células de CaP são notavelmente dependentes do sinal do AR para sua proliferação e sobrevivência (Zegarra-Moro, Schmidt et al. 2002).



**Figura 4** Mecanismo de ação dos androgênios. Demonstração esquemática da ação clássica dos androgênios (neste exemplo, utiliza-se a testosterona, T) na célula-alvo. Figura adaptada de (Gobinet, Poujol et al. 2002)

## 1.6 AR e CaP

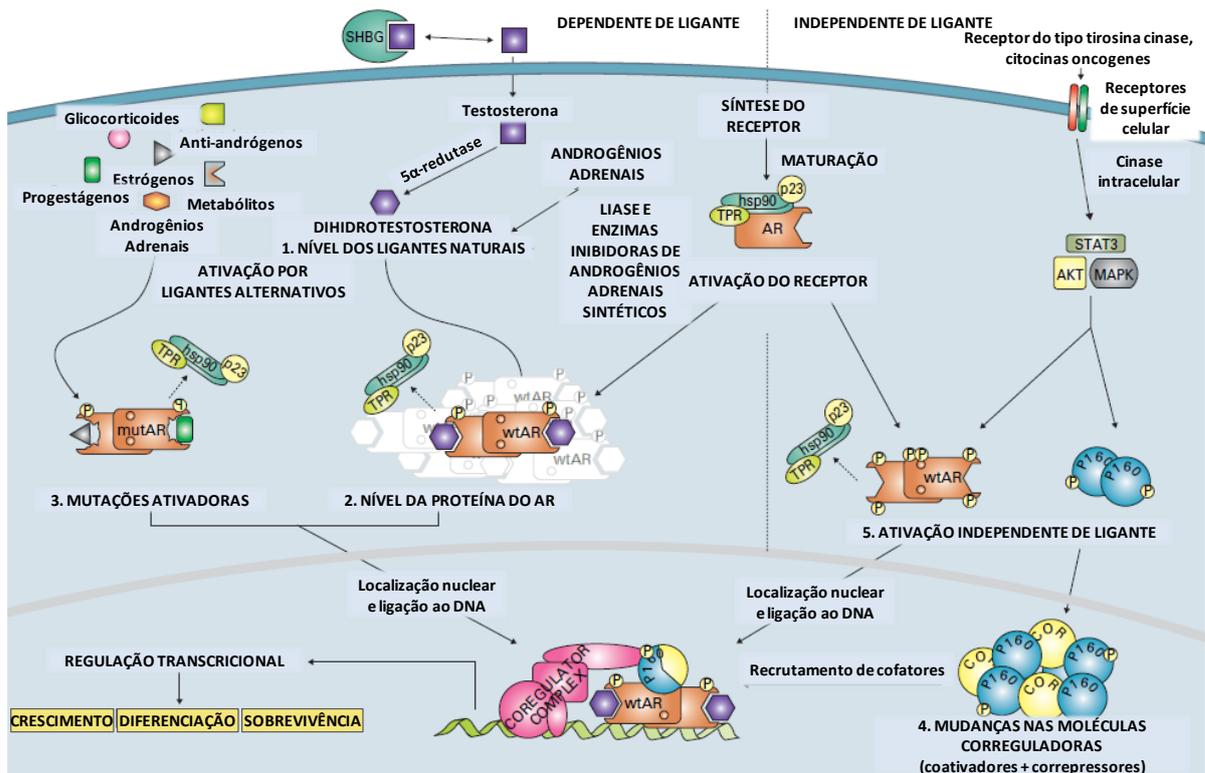
A ação dos androgênios é mediada pelo AR e a remoção destes hormônios (via castração ou administração de estrogênios) resulta em regressão do CaP (Huggins and Hodges 1941; Huggins and Hodges 2002). Estes dados justificaram o desenvolvimento da terapia antiandrogênica, que atualmente representa a abordagem terapêutica mais comum para o tratamento do CaP. A terapia antiandrogênica pode ser realizada tanto por castração cirúrgica (orquiectomia) quanto por castração química (por exemplo: com o uso de um inibidor do AR, Casodex®– em combinação com a inibição da síntese de androgênios por um antagonista do GnRH, leuprolida). Porém, em muitos casos, o câncer evolui para um estágio não responsivo à terapia de deprivação hormonal, conhecido como câncer independente de androgênios. Nesta fase, a ativação do AR pode ocorrer independentemente da sua ligação ao hormônio (Grossmann, Huang et al. 2001; Nacusi and Tindall 2009).

## 1.7 Modificações no AR

Apesar do sucesso da terapia de ablação androgênica para o CaP, a recorrência do tumor independente de androgênio é, em muitos casos, inevitável (Nacusi and Tindall 2009). A célula prostática pode utilizar diferentes mecanismos para compensar a deficiência de androgênios causada pela terapia de ablação hormonal. Dentre os mecanismos propostos para esta compensação estão: a presença de mutações com ganho de função do AR, que podem ocasionar um aumento da afinidade do receptor à DHT ou a outros ligantes esteroides (Nacusi and Tindall 2009); o aumento da expressão do AR (Buchanan, Irvine et al. 2001) ou de seus corretores (Feldman and Feldman 2001); a síntese intrácrina de androgênios pelas próprias células tumorais (Titus, Schell et al. 2005; Locke, Guns et al. 2008) ou, ainda, a transativação do AR independente de ligante por diferentes vias de sinalização (Grossmann, Huang et al. 2001).

Embora a castração reduza os níveis plasmáticos de T, sabe-se que os níveis intracelulares de T podem manter-se suficientes para promover a ativação do AR (Mohler, Gregory et al. 2004). A Figura 5 ilustra esquematicamente diversos mecanismos associados à

ativação do AR, que podem basear-se em: 1) mudanças nos níveis do(s) ligante(s) no tecido tumoral; 2) níveis aumentados da expressão proteica devido à alteração da expressão gênica ou expressão do mRNA; 3) mutações no receptor que afetam sua estrutura e função; 4) mudanças nas moléculas correguladoras (coativadoras ou corressoras); 5) fatores que levam à ativação do receptor independentemente dos níveis do ligante ou do receptor possibilitando a ativação por moléculas cinase (Scher and Sawyers 2005).



**Figura 5:** Mecanismos associados à manutenção da sinalização do AR. Demonstração esquemática de diversos mecanismos que podem levar à ativação do AR, de maneira dependente ou não de ligante (Scher and Sawyers 2005).

### 1.8 Processo de *splicing* alternativo

O processamento do mRNA, ou *splicing*, consiste na retirada de porções do RNA precursor que não codificam aminoácidos, denominadas íntrons, e na junção dos exons, que são segmentos codificantes (Lander, Linton et al. 2001). Na maioria dos casos, cada gene é

composto de vários exons, o que permite que o processo de *splicing* ocorra em diferentes posições no pré-mRNA. Além disso, os genes podem sofrer um processo denominado *splicing* alternativo. Nesse caso, o que é considerado exon em um determinado evento de processamento, pode ser considerado como íntron em outro e vice e versa. De acordo com Ast (2004), a disparidade numérica entre o número de genes codificantes (~ 26.000) e o número de proteínas (mais de 90.000) pode ser explicada pelo fato de 35 a 65% dos genes humanos sofrerem *splicing* alternativo (Ast 2004).

O processo de *splicing* alternativo é reconhecido cada vez mais como um importante mecanismo na expansão de transcritos e complexidade proteica em eucariotos (Castrignano, Rizzi et al. 2006). Além disto, estudos recentes direcionados à caracterização do transcriptoma têm revelado que o *splicing* alternativo é um fenômeno muito comum, afetando mais de 60% dos genes humanos (Matlin, Clark et al. 2005).

Diversas mutações no gene do AR têm sido descritas. Muitas destas foram encontradas em tecidos derivados de CaP e observa-se uma maior frequência naqueles pacientes que apresentam um estágio mais avançado da doença. Estas mutações estão reunidas num banco de dados chamado “*The Androgen Receptor Gene Mutations Database*” (Gottlieb, Beitel et al. 2012). De acordo com este banco de dados, já foram descritas 159 mutações no AR em amostras de CaP, sendo que a maioria destas (45%) ocorre no domínio de ligação ao ligante (LBD). O fator limitante é que, com algumas exceções, ainda não foram realizados experimentos para associar a presença destas mutações com o desenvolvimento do CaP (Gottlieb, Beitel et al. 2012).

## **1.9 Isoformas do AR**

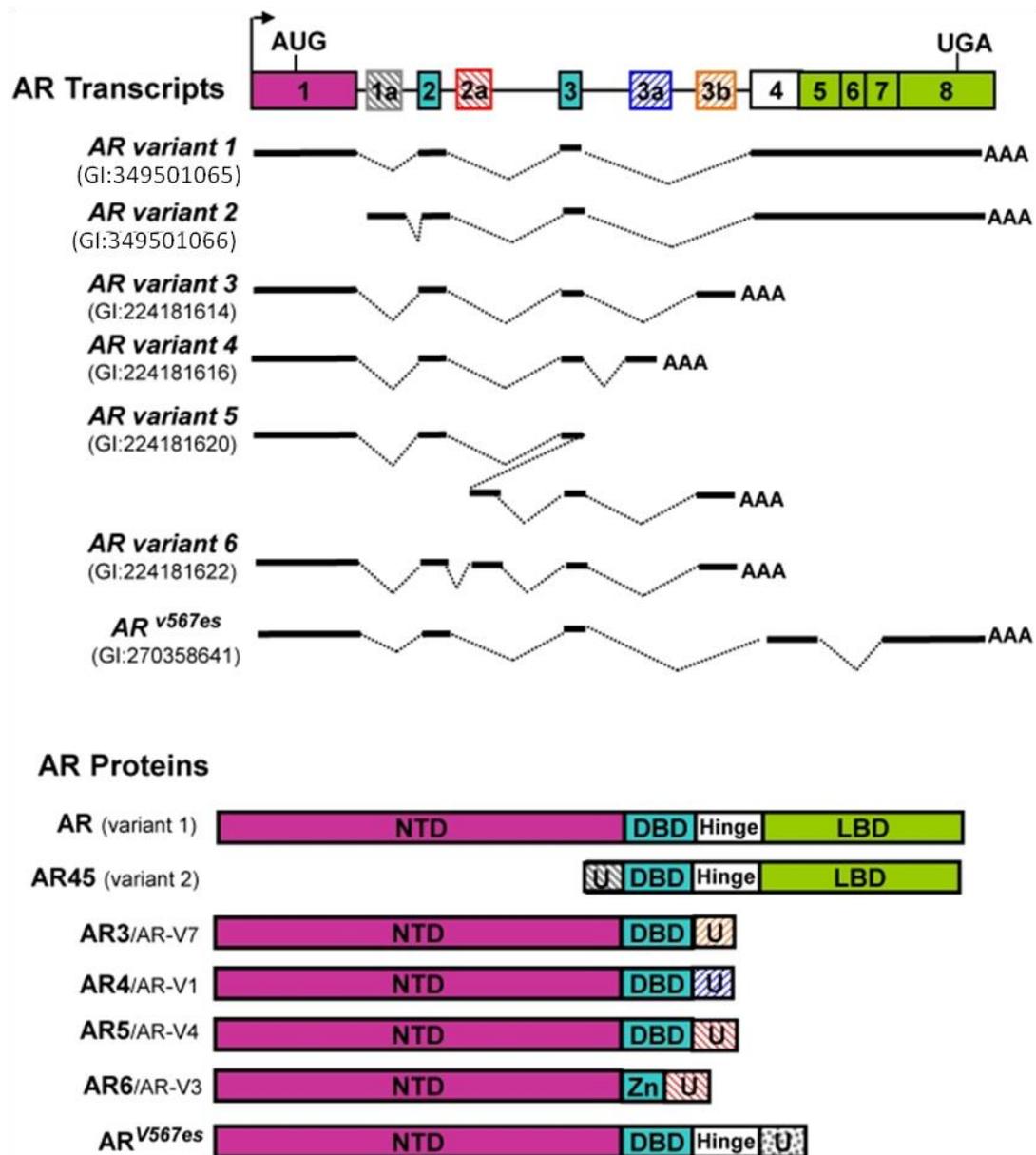
No ano de 2009, foram identificadas novas isoformas do AR, nomeadas AR-V1 (também chamada de AR4), AR-V3 (também chamada de AR6 ou AR1/2/2b), AR-V4 (também chamada de AR5 ou AR1/2/3/2b) e AR-V7 (também chamada de AR3). Essas variantes codificam uma proteína de tamanho similar, em torno de 80 kDa, e acredita-se que elas sejam originadas do processo de *splicing* alternativo do pré-mRNA do AR (Guo, Yang et al. 2009).

Este processamento faz com que essas variantes do AR (*androgen receptor variants*, AR-Vs) contenham os domínios NTD e DBD intactos, porém percam a região *hinge* e o domínio LBD e apresentem-se constitutivamente ativas (Figura 6). Ainda, de acordo com Guo e cols. (2009), a expressão anormal das AR-Vs pode ser um mecanismo fundamental para a independência de androgênios na progressão tumoral (Guo, Yang et al. 2009). Segundo Sun e colaboradores, as AR-Vs não são expressas no epitélio prostático normal, e raramente estão expressas em níveis substanciais no CaP hormônio-sensível (Sun, Sprenger et al. 2010).

A análise de uma série de amostras de tecido prostático humano tem demonstrado que a expressão das AR-Vs é diminuída na próstata normal e aumentada em amostras de CaP androgênio-independente. Especula-se que o surgimento destas AR-Vs se deva à seleção de clones mais malignos ou resistentes à castração, ou, ainda, a uma regulação da sua expressão de modo dependente de androgênios, ou seja, a presença ou ausência de androgênios pode modular a expressão dessas variantes (Hu, Dunn et al. 2009; Watson, Chen et al. 2010). Além disso, as AR-Vs parecem ser uma das causas primárias da resistência à castração e à terapia antiandrogênica convencional direcionada ao LBD, uma vez que estas AR-Vs perdem esta região. Isto pode justificar a resistência à terapia com o antiandrogênio Enzalutamida (MDV3100), que se liga ao LBD, região esta ausente nas AR-Vs (Watson, Chen et al. 2010; Li, Chan et al. 2013). A linhagem celular CWR22Rv1, que expressa as isoformas AR-V7 e AR-V1, apresenta um notável crescimento sob condições de castração que não é afetado pelos antiandrogênios Enzalutamida e Bicalutamida, ainda que estes fármacos sejam capazes de inibir a atividade do AR selvagem (AR-FL, *full-length*). De maneira interessante, quando realizado o *knockdown* das AR-Vs, observa-se uma redução do crescimento independente de androgênios e restauração do crescimento responsivo aos androgênios, o que é capaz de restabelecer a capacidade inibitória sobre o crescimento celular exercida pelos antiandrogênios (Li, Chan et al. 2013).

Resultados de trabalhos prévios sugerem que a isoforma AR-V7 participa do desenvolvimento da resistência à ablação androgênica, e que esta isoforma parece ser mais ativa quando comparada às outras isoformas, AR-V1 e AR-V4 (Guo, Yang et al. 2009). Neste mesmo trabalho, demonstrou-se que a atividade do AR-V7 não é controlada pela DHT ou antiandrogênios (Casodex®), sugerindo que esta isoforma atue como fator transcricional

constitutivamente ativo independente de ligante e que desempenhe um papel indispensável na promoção da proliferação das células cancerígenas, possivelmente pela regulação de diferentes tipos de genes-alvo. Estes estudos indicam que alterações no AR são importantes para a progressão do CaP resistente à castração e podem conduzir a resistência às terapias que têm como alvo o LBD, que incluem os inibidores de segunda geração (Acetato de Abiraterona, Enzalutamida e Bicalutamida).



**Figura 6:** Isoformas do AR. Representação esquemática da estrutura molecular e proteica das isoformas do AR humano. No desenho dos transcritos, os quadrados hachurados representam os exons alternativos, e as linhas contínuas, as sequências transcritas. Na representação das estruturas proteicas, em U estão representadas as sequências únicas de cada isoforma (Guo and Qiu 2011).

Embora a ablação androgênica reduza os níveis plasmáticos de androgênios, seus níveis intraprostáticos permanecem elevados (Mohler, Gregory et al. 2004), podendo, ainda, haver a síntese intrácina de T (Locke, Guns et al. 2008). Estes achados sugerem que existem mecanismos alternativos que mantêm a atividade do AR em situações de ablação androgênica (Sun, Sprenger et al. 2010), o que, de acordo com Watson e colaboradores (2010), pode ser devido à presença das AR-Vs (Watson, Chen et al. 2010).

Apesar das AR-Vs permanecerem ativas mesmo na ausência de hormônios, sua origem e relevância biológica permanecem incertas (Nacusi and Tindall 2009). O mecanismo de *splicing* alternativo é o mais aceito entre diversos autores para explicar a gênese dessas isoformas (Guo, Yang et al. 2009; Hu, Dunn et al. 2009; Nacusi and Tindall 2009; Marcias, Erdmann et al. 2010). Dados de Watson e cols (2010) sugerem que as AR-Vs sejam geradas por erros de *splicing* que ocorrem em tecidos tumorais, mas também em tecidos normais. Assim, os níveis das isoformas seriam dependentes dos níveis de AR-FL, e mutações de ponto afetariam o sítio de reconhecimento durante o processamento do pré-mRNA, podendo favorecer a produção de certas variantes (Watson, Chen et al. 2010). Independente do exato mecanismo de formação destas isoformas, a relação funcional entre as AR-Vs e o AR-FL levanta questões sobre seu repertório de genes-alvo (Watson, Chen et al. 2010). Uma possibilidade é que as AR-Vs simplesmente mimetizem a ação dos hormônios androgênios, formem heterodímeros com o AR-FL e ativem o conjunto de genes-alvo conhecidos do AR (Watson, Chen et al. 2010). No entanto, análises do transcriptoma após *knockdown* seletivo do AR-FL ou de AR-Vs revelaram subconjuntos distintos de genes regulados pelas isoformas, pelo AR-FL ou ambos. Mesmo entre genes-alvo clássicos do AR-FL, dados mostraram diferentes níveis de expressão dependentes do gene em particular e da isoforma presente, fornecendo evidências de que a biologia das variantes não é inteiramente sinônima àquela estimulada pelo AR-FL (Watson, Chen et al. 2010). Embora os níveis de expressão das AR-Vs sejam inferiores aos do AR-FL, algumas variantes são constitutivamente ativas e sua supressão resulta na diminuição da proliferação em linhagens celulares de CaP (Guo, Yang et al. 2009).

Ao estudar a expressão de genes-alvo das variantes, foi visto que a presença ou a ausência do AR-FL não altera o perfil de expressão dos genes-alvo das AR-Vs, mostrando que a atividade das variantes independe do AR-FL. Além disto, após a supressão do AR-FL, ocorre um aumento da expressão das AR-Vs (Hu, Lu et al. 2012), embora alguns autores sugiram que a atividade das AR-Vs requeira a presença do AR-FL (Watson, Chen et al. 2010). Para demonstrar esta independência das AR-Vs do AR-FL, Hu e cols (2012) utilizaram clones de LNCaP e CWR22Rv1 com e sem a expressão da proteína do AR-FL, que foram transfectados com AR-Vs (AR-V7 e AR-V567es) em condições de deprivação androgênica. Nestes experimentos, foi observado que quando é realizada uma superexpressão do AR-FL, não ocorre aumento da expressão dos genes de ciclo celular, demonstrando que o AR-FL não tem influência sobre a indução da expressão destes genes, que é realizada pelas AR-Vs. Estes achados podem ajudar a explicar o motivo pelo qual a inibição do AR-FL resulta em supressão do crescimento tumoral em alguns tipos de CaP resistentes à castração, enquanto que em outros não, sugerindo que o suporte ao crescimento independente à castração é fornecido pelas AR-Vs ao invés do AR-FL (Hu, Lu et al. 2012).

Diversos autores têm realizado análises de expressão gênica em linhagens celulares de CaP também por qPCR (Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa), porém, pouco se encontra na literatura sobre a análise em tecido prostático morfológicamente normal coletado de pacientes submetidos à remoção cirúrgica da próstata. Isto demonstra a importância do estudo da expressão destas variantes no tecido normal e hiperplásico benigno (Hu, Dunn et al. 2009; Nacusi and Tindall 2009; Marcias, Erdmann et al. 2010; Sun, Sprenger et al. 2010).

Do mesmo modo, dentre os diversos trabalhos já publicados, a grande maioria aborda o CaP metastático. Nesta condição, se estuda o uso das AR-Vs como preditores de resposta à terapia e de desfecho clínico, especialmente para o AR-V7, que tem sido estudado como biomarcador para seleção de tratamento em homens com CaP metastático (Antonarakis, Armstrong et al. 2016; Luo 2016). A relação entre a expressão do AR-FL e das AR-Vs também tem sido estudada. Watson e cols. (2010), ao analisarem a expressão do AR-FL e das AR-Vs em cultura celular das linhagens VCaP e LUCaP35, verificaram que a expressão das isoformas ocorre concomitantemente à expressão do AR-FL, porém, as isoformas são expressas em

níveis inferiores ao AR-FL, cuja expressão varia de 0,1 a 2,5% da expressão da forma selvagem (Watson, Chen et al. 2010). Hu e cols. (2009), ao analisarem a expressão de AR-V7 e AR-V1 em tecido prostático pelas técnicas de PCR semiquantitativo, qPCR, sequenciamento e cultura celular com transfecção, também observaram uma expressão das AR-Vs em níveis menores em relação ao AR-FL (Hu, Dunn et al. 2009). Fato bastante relevante é de que nas amostras de CaP resistentes à ablação androgênica, os níveis de expressão das AR-Vs são significativamente maiores do que amostras de CaP primário, o que é associado a um pior desfecho clínico (Guo, Yang et al. 2009; Hu, Dunn et al. 2009). Esta observação é apoiada pelo fato de que a expressão aumentada das AR-Vs está associada a uma maior recorrência da doença após a prostatectomia radical quando comparada com pacientes com baixa expressão das AR-Vs (Hu, Dunn et al. 2009). Visto isso, pacientes que apresentam a expressão das AR-Vs provavelmente não terão benefícios com as terapias antiandrogênicas convencionais (Hornberg, Ylitalo et al. 2011). Ainda, de acordo com Hornberg (2011), metástases ósseas de CaP resistentes à castração expressam proteínas do AR sem a região LBD em níveis comparáveis à expressão da proteína do AR-FL, mesmo quando o nível do mRNA das isoformas é muito menor do que o do AR-FL (Hornberg, Ylitalo et al. 2011).

Como descrito acima, a expressão das AR-Vs em tecido metastático tem sido alvo de inúmeros estudos. Entretanto, pouco se discute a respeito da expressão dessas variantes no câncer hormônio-sensível responsivo à ablação androgênica. Igualmente, sabe-se pouco sobre a importância e sobre o papel dessas variantes nessa situação. Por um lado, já se demonstrou que a expressão das AR-Vs é capaz de manter a proliferação das células neoplásicas do CaP numa situação de deprivação androgênica e que a readministração de androgênios atua regulando negativamente sua expressão. Mas por outro lado, quando expressas, qual seria o papel dessas isoformas constitutivamente ativas no tecido benigno e no tecido neoplásico androgênio-dependente? E ainda, haveria alguma modulação androgênica sobre a expressão dessas isoformas nesses tecidos? Essa modulação androgênica seria via regulação dos níveis de expressão gênica ou via regulação da translocação nuclear?

## **2. HIPÓTESES**

### **2.1 Hipóteses nulas**

- Os tecidos oriundos de CaP hormônio-sensível e HPB não expressam as AR-Vs.
- O CaP expressa isoformas do AR em níveis semelhantes à HPB.
- A localização celular das AR-Vs é semelhante entre CaP e HPB.
- Não há associação entre a expressão das AR-Vs e a agressividade e recidiva tumoral no grupo CaP.
- A expressão das AR-Vs não sofre modulação androgênica.

### **2.2 Hipóteses alternativas**

- Os tecidos oriundos de CaP hormônio-sensível e HPB expressam as AR-Vs.
- O CaP expressa isoformas do AR em níveis diferentes da HPB.
- A localização celular das AR-Vs é diferente entre CaP e HPB.
- A expressão das AR-Vs está associada à agressividade e à recidiva tumoral no grupo CaP.
- A expressão das AR-Vs é modulada por diferentes concentrações de androgênios.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivos gerais

Analisar a expressão do mRNA e da proteína do AR-FL e de suas isoformas em tecido prostático proveniente de pacientes com HPB ou CaP hormônio-sensível, assim como a possível associação da expressão gênica dessas isoformas do AR com a agressividade tumoral e a recidiva bioquímica no câncer e avaliar a possível modulação androgênica das AR-Vs em linhagens celulares de CaP (C4-2B e LNCaP).

#### 3.2 Objetivos específicos

- Quantificar os níveis séricos e intratecduais de esteroides em amostras de pacientes com CaP e HPB;
- Quantificar e comparar a expressão gênica do *AR-FL* e de suas isoformas *AR-V1*, *AR-V4* e *AR-V7* em tecido de CaP hormônio-sensível e HPB;
- Analisar a possível associação entre a expressão gênica do *AR-FL* e de suas isoformas *AR-V1*, *AR-V4* e *AR-V7* com a idade de desenvolvimento da HPB ou do CaP e com o estadiamento tumoral do CaP;
- Quantificar e comparar a expressão proteica do AR-FL e de sua isoforma *AR-V7* em tecido de CaP e HPB;
- Comparar a localização celular do AR-FL e de sua isoforma *AR-V7* entre tecido de CaP e HPB;
- Quantificar a expressão gênica do *AR-FL* e de suas isoformas *AR-V1*, *AR-V4* e *AR-V7* em linhagem celular (C4-2B) sob modulação androgênica;
- Analisar a modulação androgênica da proliferação celular de linhagem celular androgênio-independente (C4-2B) e androgênio-dependente (LNCaP);

- Comparar a localização celular do AR-FL e de sua isoforma AR-V7 em linhagens celulares (C4-2B e LNCaP) sob modulação androgênica.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Delineamento do estudo**

As análises foram realizadas a partir de dois desenhos experimentais: o primeiro foi transversal, utilizando amostras de tecido prostático para a análise de expressão gênica e proteica, e o segundo, experimental *in vitro* utilizando linhagem celular.

### **4.2 Critérios de inclusão e exclusão**

Para o grupo CaP, foram selecionados pacientes provenientes do Serviço de Urologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), com idade entre 40 e 85 anos, com diagnóstico de câncer de próstata primário, que não receberam hormonioterapia ou quimioterapia prévias, que não possuíam diagnóstico de outra neoplasia concomitante e que foram submetidos à cirurgia para retirada do CaP.

Para o grupo HPB, foram selecionados pacientes com diagnóstico de hiperplasia prostática benigna, com volume prostático medido por ecografia abdominal acima de 30g, toque retal sem suspeita de neoplasia, que não receberam hormonioterapia, que não possuíam diagnóstico de neoplasia concomitante, que estavam em acompanhamento no Serviço de Urologia do HCPA e que foram submetidos à cirurgia para ressecção da HPB neste mesmo hospital.

### **4.3 Aspectos éticos**

O presente trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e aprovado em seus aspectos éticos e científicos, sendo registrado sob número 14-0397. Após aprovação, todos os pacientes que foram arrolados no presente

estudo foram consultados sobre a utilização do material e, aqueles que concordaram, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo I).

O tecido prostático utilizado neste trabalho foi proveniente de amostra de ressecção transuretral (RTU) de próstata, prostatectomia aberta, prostatectomia radical ou prostatovesiculectomia. Aos pacientes, foi garantido sigilo quanto às informações obtidas e seu uso foi absolutamente restrito para fins de pesquisa científica.

Não foi oferecido aconselhamento genético, pois, até o momento, não existem evidências clínicas que justifiquem mudanças do manejo dos pacientes quando da presença de isoformas do gene estudado, e nem para que se faça uma abordagem diagnóstica diferente para pessoas saudáveis que apresentem tais isoformas.

#### **4.4 Estudo da expressão tecidual das AR-Vs**

##### *Coleta das amostras de tecido prostático*

Durante as cirurgias de prostatovesiculectomia e prostatectomia radical para a retirada do tumor maligno, a próstata foi fatiada pelo urologista para detectar a localização do nódulo tumoral. Depois de localizado, uma fração do nódulo tumoral foi excisada, retirada e dividida em duas partes. Um fragmento foi enviado para o Serviço de Patologia a fim de confirmar ou não o diagnóstico de adenocarcinoma de próstata, e o outro fragmento foi armazenado em um criotubo plástico de 2,0 mL, imediatamente congelado em N<sub>2</sub> líquido para transporte ao laboratório, sendo após armazenado em freezer -80 °C.

Na cirurgia de prostatectomia para a retirada da HPB e na RTU de próstata, após a remoção do espécime cirúrgico, em campo limpo, os nódulos hiperplásicos foram identificados e pequenos fragmentos foram cortados e armazenados em 2 criotubos plásticos de 2,0 mL. Em seguida, os criotubos foram armazenados em N<sub>2</sub> líquido para transporte ao laboratório, e então foram armazenados em freezer -80 °C.

### *Extração de RNA total*

Foi realizada extração de RNA total a partir de 0,2g de tecido de cada amostra utilizando o reagente TRIzol® segundo o protocolo do fabricante. Após a extração de RNA, foi realizada a purificação do RNA utilizando o sistema PureLink™ RNA Mini Kit (Ambion by Life Technologies). A quantificação foi feita a partir de 1 µL da solução de RNA diluída em água com DEPC (dietilpirocarbonato). Essa solução foi lida em duplicata em um espectrofotômetro para ácidos nucleicos (NanoDrop 1000 Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, EUA), nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. A pureza do RNA foi considerada satisfatória quando a razão das absorbâncias a 260 e 280 nm for superior a 1,6. A quantidade de RNA foi calculada a partir da fórmula:

$$[\text{RNA}] = A_{260} \times D \times 40 \mu\text{g/mL}$$

Onde:  $A_{260}$  = absorbância obtida a 260 nm e D = diluição da alíquota usada para a quantificação.

### *Síntese de cDNA*

Foi realizada a síntese do cDNA a partir de 1µg de RNA total utilizando o conjunto de reagentes específicos Super Script III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, Life Technologies). Após a desnaturação do RNA adicionado de Oligo(dT) e dNTPmix 10 mM a 65°C por 5 minutos, foi acrescentada uma mistura de Tris-HCl 200 mM (pH 8.4) mais KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 25 mM, ditioneitol (DTT) 0.1 M, 40 U de RNaseOUT e 50 U de transcriptase reversa (SuperScript III) em cada amostra, que foi incubada a 50°C por 50 minutos. A mistura foi então aquecida a 85°C por 5 minutos a fim de interromper a reação, centrifugada e refrigerada em gelo. Posteriormente, cerca de 2 U de *E. coli* RNase (RNase H) foram adicionadas à mistura, que foi incubada a 37°C por 20 minutos a fim de eliminar o RNA remanescente. A reação teve um volume final de 21µL, e foi estocada a -20°C antes de ser utilizada para a reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR).

*Oligonucleotídeos iniciadores (primers)*

Para amplificação do gene do *AR-FL* foi utilizado o ensaio Hs00171172\_m1 (Life Technologies) e para o gene de referência foi utilizada a beta-2microglobulina (*β2m*), ensaio Hs00984230\_m1 (Life Technologies). Este ensaio para o *AR-FL* não amplifica nenhuma das isoformas em estudo, sendo específico para os transcritos 1 (GI:349501065) e 2 (GI:349501066) deste gene, que são correspondentes ao *AR* completo (*AR-FL, full-length*), contendo 8 exons. Para as análises moleculares das *AR-Vs* foram utilizados ensaios desenhados pelo nosso grupo de pesquisa, sintetizados pela empresa Life Technologies. Na tabela 1 estão descritas as sequências dos ensaios utilizados. A fim de inferir um valor para a expressão do *AR-V7*, foi analisada a razão entre as expressões *AR-V4V7 / AR-V4*, que se admitiu corresponder aos níveis de expressão da isoforma *AR-V7*.

Para o estudo da expressão gênica dos genes envolvidos com o ciclo celular e com a apoptose (*TP53, MDM2, CDKNA1, BAX* e *BCL2*) foram utilizados ensaios TaqMan inventariados da empresa Life Technologies (Tabela 1).

**Tabela 1:** Sequências dos ensaios para amplificação do mRNA do *AR-V1*, *AR-V4* e *AR-V4V7*. Oligonucleotídeos sense, antisense e sonda. Para a amplificação dos transcritos *AR-FL*,  $\beta 2m$ , *TP53*, *MDM2*, *CDKNA1*, *BAX* e *BCL2* foram utilizados ensaios inventariados da empresa LifeTechnologies.

<b>AR-V1</b>	
<b>SENSE</b>	5' - AGGGTGTGGAGTCTCAGA - 3'
<b>ANTISENSE</b>	5' - CCAGGAATGAATCATCTACAAA - 3'
<b>SONDA</b>	5' - TTCCTTAAAGACTACCTTCAGACTC - 3' (VIC)
<b>Tamanho do Fragmento</b>	106 pb
<b>AR-V4</b>	
<b>SENSE</b>	5' - GACACTAACCCCAAGCCATAC - 3'
<b>ANTISENSE</b>	5' - ACTGTCTGATGTTGCTCTGTG - 3'
<b>SONDA</b>	5' - TTGTTTTCTGTCAGTCCCATTGGTGC - 3' (VIC)
<b>Tamanho do Fragmento</b>	182 pb
<b>AR-V4V7</b>	
<b>SENSE</b>	5' - CTCTTGATTGCTGACTCCCTC - 3'
<b>ANTISENSE</b>	5' - ACAACTACATGAGTGGTAACCA - 3'
<b>SONDA</b>	5' - AGGTAGGAAAACACTATTGGTCCCGC - 3'(VIC)
<b>Tamanho do Fragmento</b>	108 pb
<b>AR-FL</b>	
* vide ensaio Hs_00171172 (LifeTechnologies)	
<b>BAX</b>	
* vide ensaio Hs00180269_m1 (LifeTechnologies)	
<b>BCL2</b>	
* vide ensaio Hs00608023_m1 (LifeTechnologies)	
<b>CDKN1A</b>	
* vide ensaio Hs00355782_m1 (LifeTechnologies)	
<b>TP53</b>	
* vide ensaio Hs01034249_m1 (LifeTechnologies)	
<b>MDM2</b>	
* vide ensaio Hs00242813_m1 (LifeTechnologies)	

#### *Amplificação por PCR em tempo real*

A análise molecular foi realizada através da PCR em Tempo Real, com sistema de detecção de sondas (ensaio) TaqMan® (Applied Biosystems). Os ensaios TaqMan® são desenhados para detectar e quantificar com precisão a expressão de mRNA em uma reação de RT-PCR realizada em dois passos. O primeiro passo consiste na transcrição reversa (RT,

*reverse transcription*), descrita no item “Síntese de cDNA”. Na reação subsequente, o produto da transcrição reversa serve como molde para a reação de PCR utilizando sondas TaqMan® específicas para o mRNA que se deseja avaliar. Os ensaios TaqMan® (*Gene Expression Assays*) consistem em um par de *primers* não-marcados e uma sonda TaqMan® com marcação FAM™ ou VIC® na extremidade 5' e MGB (*minor groove binder*) e NFQ (*nonfluorescent quencher*) na extremidade 3'. Este ensaio é baseado na atividade 5'-nuclease da enzima Taq DNA polimerase. Durante o passo de amplificação, a sonda TaqMan® anela especificamente à sequência complementar em uma posição entre os locais onde os *primers sense* e *antisense* estão anelados. Quando a sonda está intacta, a proximidade entre o *reporter dye* e o *quencher dye* resulta na supressão da fluorescência do *reporter*. Quando a amplificação ocorre, a DNA polimerase cliva a sonda que está hibridizada na sequência-alvo. Esta clivagem separa o *reporter dye* e o *quencher dye*, o que resulta na emissão de sinal fluorescente pelo *reporter dye*. Assim, o processo de amplificação que ocorre durante a PCR resulta na hidrólise da sonda gerando um aumento do sinal fluorescente. O nível de fluorescência é então registrado por um detector de *laser* ao final de cada ciclo e é utilizado para a produção do gráfico de amplificação. O equipamento utilizado foi o PCR *real time* StepOne Plus (Applied Biosystems).

As condições de reação foram: desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos, e 45 ciclos continuando a desnaturação em 94 °C por 50 segundos, anelamento e extensão a 60 °C por 45 segundos. Uma curva-padrão com 5 pontos em triplicata com concentração conhecida de cDNA foi utilizada para quantificar as amostras (quantificação relativa). Os valores quantitativos foram obtidos a partir do ciclo limiar (Ct, *threshold cycle*), onde o aumento do sinal fluorescente foi associado com um aumento exponencial do produto da qPCR detectado.

### *Imunohistoquímica*

Para avaliação da expressão proteica de AR-FL e AR-V7 foi utilizada a técnica de imunohistoquímica no tecido proveniente de blocos de parafina (FFPE, do inglês *formalin-fixed paraffin-embedded*). Os espécimes fixados em formalina e incluídos em parafina, foram submetidos ao corte histológico em micrótomo regulado para a espessura de 4 µm. Os cortes foram posicionados em lâminas previamente silanizadas. Para proceder com a técnica de

imunohistoquímica, as lâminas foram aquecidas em estufa a 80°C por uma hora, desparafinizadas em xilol, reidratadas em álcool etílico e posteriormente em água destilada. A recuperação antigênica foi realizada em banho-maria por uma hora a 95°C no tampão citrato. A atividade de peroxidase endógena foi bloqueada com solução de peróxido de hidrogênio a 3% em metanol por 30 minutos. Os cortes foram posteriormente incubados, overnight a 4°C, com os seguintes anticorpos primários: Anti-AR-V7, *mouse monoclonal* (Fabricante: Precision Antibody) na diluição 1:200, AR (C-19) *rabbit polyclonal* (Fabricante: Santa Cruz) na diluição 1:400 ou AR (PG21) *rabbit polyclonal* (Fabricante: Millipore) na diluição 1:400. Após a incubação, foi aplicado o sistema de detecção anticorpo secundário *goat anti-mouse IgG*-HRP (Marca: Santa Cruz Biotechnology, cód: 2005) ou anticorpo secundário *goat anti-rabbit IgG antibody*, (H+L) HRP *conjugate* (Marca: Merck Millipore, cód: AP307P) e a visualização da reação foi obtida com Liquid Dab (Dako, K3468), conforme recomendações do fabricante. Após a visualização, as lâminas foram contra-coradas em hematoxilina de Harris por 1 minuto, os cortes foram desidratados em álcool absoluto e colocados em xilol para a montagem das lâminas em resina do tipo Entellan.

#### *Coloração com HE*

Todas as amostras que foram utilizadas na técnica de imunohistoquímica também foram coradas com Hematoxilina-Eosina (HE) para visualização histológica. Os espécimes fixados em formalina tamponada 10%, processados e incluídos em parafina, foram submetidos ao corte histológico em micrótomo regulado para a espessura de 4 µm. Os cortes colocados em lâminas foscas foram aquecidos em estufa a 80°C por uma hora, desparafinizados em xilol, reidratados em álcool etílico e posteriormente lavados em água destilada.

As lâminas foram colocadas no corante Hematoxilina de Harris por 5 minutos, depois lavadas em água corrente, diferenciadas em álcool-ácido por 1 minuto, lavadas novamente em água corrente e mergulhadas em carbonato de lítio 1%. Posteriormente, as lâminas foram colocadas no corante eosina por 3 minutos, desidratadas em álcool absoluto e colocadas em xilol para a montagem com resina do tipo Entellan.

### *H Score*

Os resultados da imunohistoquímica foram analisados semi-quantitativamente pela porcentagem de intensidade de coloração. Pela fórmula [(1 x % de células coradas com intensidade fraca) + (2 x % de células coradas com intensidade média) + (3 x % de células coradas com intensidade forte)], obteve-se o escore H (H-Score) (Detre, Saclani Jotti et al. 1995; Welti, Rodrigues et al. 2016). O escore H variou de 0 a 300, sendo as amostras que apresentaram um escore <100 foram consideradas fracas, aquelas que apresentaram um escore entre 100 e 200 foram consideradas médias, e aquelas que apresentaram um escore >200 foram consideradas fortes (Welti, Rodrigues et al. 2016).

### *Razão N/C terminal*

A determinação da expressão as AR-Vs tem sido algo desafiador, dada a ausência de anticorpos capazes de detectar especificamente a proteína de grande parte das AR-Vs. Para suprir essa limitação, alguns autores sugerem uma abordagem que se baseia no fato de que as AR-Vs não são reconhecidas pelo anticorpo direcionados à região C-terminal do AR-FL, enquanto que tanto as AR-Vs quanto o AR-FL são detectados pelo anticorpo que reconhece a região N-terminal. Isto permite que através da razão da marcação dos anticorpos que reconhecem as regiões N e C-terminal (AR-NTD/AR-CTD) se faça a identificação das AR-Vs (Zhang, Morrissey et al. 2011). Desta forma, utilizamos anticorpos para os domínios N e C-terminal da proteína do AR para verificar a prevalência das variantes do AR com o domínio C-terminal truncado. Este método já foi previamente utilizado por outros autores (Zhang, Morrissey et al. 2011) e o resultado corresponde à expressão total das AR-Vs, porém não fornece dados acerca de qual AR-Vs está sendo expressa em maior nível. Por isso, realizamos a identificação isolada de AR-V7 utilizando um anticorpo específico para esta isoforma, o qual é o único anticorpo, disponível no momento, capaz de detectar uma variante específica do AR.

### *Exame anatomopatológico e classificação dos tumores*

O exame anatomopatológico dos espécimes cirúrgicos e a confirmação da presença ou ausência de tecido tumoral nas amostras de tecido foram realizados por microscopia óptica pela técnica de hematoxilina-eosina (HE) pelo Serviço de Patologia do HCPA.

A classificação histológica da agressividade tumoral seguiu o escore desenvolvido por Gleason em 1974, que se baseia no grau da perda da arquitetura normal do tecido tumoral (forma, tamanho e diferenciação das glândulas). Esta classificação leva em conta o grau de Gleason e o escore de Gleason. O escore de Gleason é a soma do grau primário (representando a maior parte do tumor) e do grau secundário (relacionado à menor parte do tumor) e é um número que varia de 2 a 10. Quanto mais alto o escore de Gleason, mais agressivo é o tumor e pior é o prognóstico do paciente (O'Dowd 2001). A classificação segundo este escore foi feita pelo Serviço de Patologia do HCPA.

O estadiamento patológico, pTNM, foi avaliado de acordo com o resultado do exame anatomopatológico do espécime cirúrgico conforme a escala de classificação internacional de tumores (Sobin and Wittekind 2002), onde pT, pN e pM correspondem, respectivamente, à T (extensão do tumor primário), N (ausência ou presença e extensão de metástase em linfonodos regionais) e M (ausência ou presença de metástase à distância).

#### **4.5 Estudo dos níveis intrateciduals e circulantes de androgênios**

##### *Dosagem intraprostática de androgênios*

A dosagem de esteroides foi realizada em amostras de soro e tecido de CaP primário e HPB. A quantificação dos esteroides foi realizada pela técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (*liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry* - LC-MS/MS) de acordo com protocolo previamente publicado (Bertin, Dury et al. 2015; Dury, Ke et al. 2016). Em resumo, 0,05 a 0,34 g de tecido congelado foram utilizados para a preparação das amostras. Após a remoção de fosfolipídeos e extração líquido-líquido, as amostras foram injetadas utilizando um UPLC (LC-30AD system; Shimadzu; ON, Canada) acoplado a um AB Sciex Qtrap 6500™ utilizando modo MRM (Multiple Reaction Monitoring). Os resultados foram corrigidos por grama de tecido e apresentados como ng/g. Para as amostras de soro, os resultados foram corrigidos pelo volume e apresentados como ng/ml.

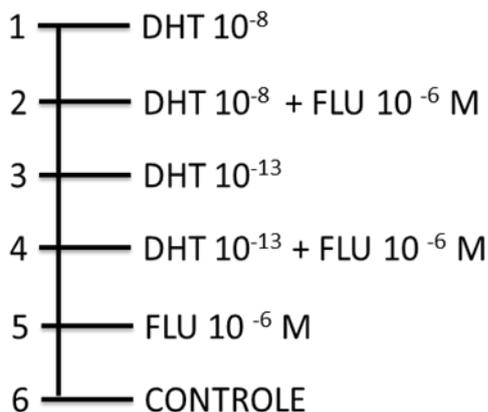
#### 4.6 Estudo *in vitro* da modulação androgênica das AR-Vs

##### *Cultura de linhagem celular*

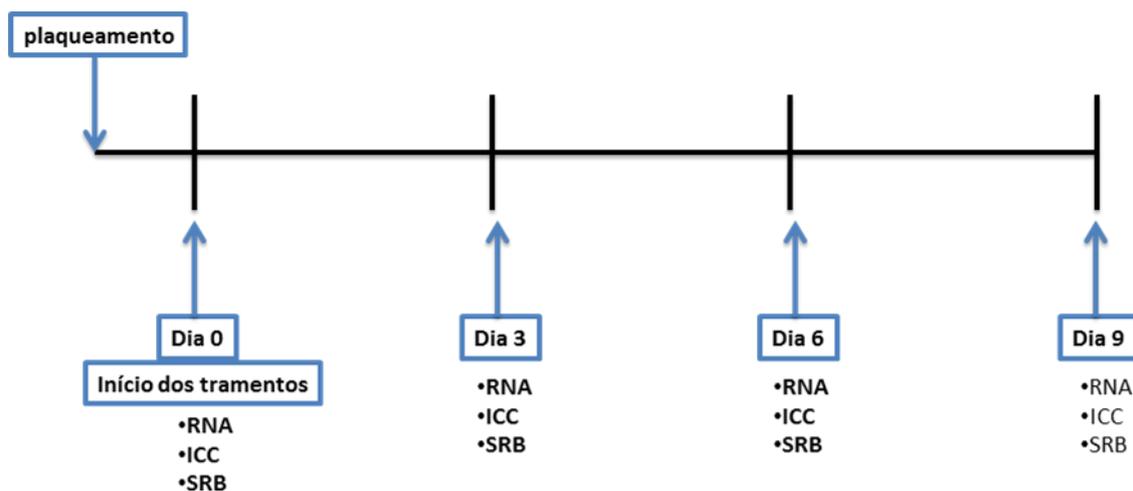
As linhagens celulares LNCaP e C4-2B foram obtidas da *American Type Culture Collection* (Manassas, VA, EUA) e do MD Anderson Cancer Center (Texas, USA), respectivamente. As células foram mantidas a 37° C com 5% de CO<sub>2</sub>, em meio RPMI 1640 (Gibco BRL, NY, EUA) suplementado com 1% de penicilina/estreptomicina (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e 10% de soro bovino fetal (SBF) (Gibco BRL, NY, EUA). As passagens foram realizadas com tripsina/EDTA (0,25% w/v e 0,53 mM, respectivamente) (Gibco BRL, NY, EUA). Quando atingiram a confluência de 80%, as células foram tripsinizadas e semeadas em placas específicas para as análises de modulação hormonal.

##### *Tratamento hormonal*

As células C4-2B foram semeadas na densidade de  $3 \times 10^3$  células em placas de 24 poços para as avaliações de proliferação e expressão gênica e na densidade de  $5 \times 10^3$  células em placas de 6 poços para a avaliação de localização celular, todas em resposta ao tratamento hormonal. As células foram cultivadas por 24 horas para que aderissem à placa de cultivo, e então foi iniciado o protocolo experimental. No dia do início do experimento, as placas foram divididas em seis grupos: grupo 1 (DHT $10^{-8}$  M), grupo 2 (DHT $10^{-8}$  M + FLU  $10^{-6}$  M), grupo 3 (DHT $10^{-13}$  M), grupo 4 (DHT $10^{-13}$  M + FLU  $10^{-6}$  M), grupo 5 (FLU  $10^{-6}$ ) e grupo 6 (controle de veículo, etanol), conforme apresentado na Figura 7. Todos os tratamentos foram preparados com 10% de SBF desteroideado e 1% antibiótico (penicilina/estreptomicina). O dia do início do tratamento foi considerado como dia 0. As células foram mantidas em cultura sob o tratamento por 3, 6 e 9 dias, conforme apresentado na Figura 8. Este mesmo protocolo foi utilizado para os experimentos com as células LNCaP.



**Figura 7** Algoritmo dos grupos experimentais. Grupo 1: tratamento com DHT $10^{-8}$  M. Grupo 2: tratamento com DHT $10^{-8}$  M associado à FLU  $10^{-6}$  M. Grupo 3: tratamento com DHT $10^{-13}$  M. Grupo 4: tratamento com DHT $10^{-13}$  M associado à FLU  $10^{-6}$  M. Grupo 5: tratamento com FLU  $10^{-6}$  M. Grupo 6: controle de veículo - foi acrescentado o veículo (etanol absoluto) no mesmo volume das drogas utilizadas nos demais grupos.



**Figura 8** Protocolo experimental do cultivo celular. Representação esquemática do protocolo experimental do cultivo celular.

Para testar a possível modulação androgênica do AR e suas isoformas pelo tratamento com androgênicos, foi realizada a análise da expressão gênica do *AR-FL* e de suas isoformas (*AR-V1*, *AR-V4* e *AR-V7*) por qPCR, expressão proteica do AR e de sua isoforma *AR-V7* por imunofluorescência e a avaliação do crescimento celular por sulforrodamina B (SRB).

### *Avaliação da expressão gênica do AR e de suas isoformas*

Para avaliação da expressão do mRNA do AR e das AR-Vs, foram utilizadas placas de 24 poços (1,9 cm<sup>2</sup>/poço) com 3x10<sup>3</sup> células semeadas por poço, divididas nos grupos de tratamento, sendo direcionados oito poços para cada grupo. Foram avaliados os níveis de expressão no dia 0 (sem tratamento), e nos dias 3, 6 e 9 (com tratamentos). As placas foram colocadas no gelo e o meio de cultura foi desprezado. Então, as células foram lisadas diretamente nas placas com 1 mL/10 cm<sup>2</sup> do reagente Trizol® (Invitrogen), seguindo uma adaptação do protocolo do fabricante, já padronizada em nosso laboratório. O homogeneizado de cada grupo foi coletado e transferido para um microtubo de 2 mL onde foi incubado a 15-30 °C por 5 minutos; a partir desta etapa, o procedimento de extração de RNA foi realizado conforme descrito na sessão “Extração de RNA total”, do subtítulo “4.4 Estudo da expressão tecidual das AR-Vs”.

Foi realizada a síntese do cDNA a partir de 1µg de RNA total utilizando o conjunto de reagentes específicos GoScript™ Reverse Transcription System (Promega). Após a desnaturação do RNA com Oligo(dT)<sub>15</sub> e Nuclease-Free Water a 70°C por 5 minutos, a amostra foi acondicionada em gelo por pelo menos 5 minutos. Então, foi centrifugada por 10 segundos e foi adicionada uma mistura contendo GoScript™ 5X Reaction Buffer, MgCl<sub>2</sub>, PCR Nucleotide Mix, Recombinant RNasin®, GoScript™ Reverse Transcriptase e Nuclease-Free Water em cada amostra, que foi incubada a 25°C por 5 minutos, 42°C por 60 minutos e 70°C por 15 minutos. A mistura foi então centrifugada e estocada a -20°C antes de ser utilizada para a reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR). Esta reação de síntese de cDNA teve um volume final de 10µL.

A avaliação da expressão do mRNA do AR e das AR-Vs em cultura celular foi realizada através da técnica da reação em cadeia da polimerase em tempo real a partir de transcrição reversa (qRT-PCR). Para avaliar os dados de expressão gênica, foi realizado o método do  $\Delta\Delta C_t$  (Livak and Schmittgen 2001). Todos os experimentos foram realizados em duplicata e a beta-2microglobulina ( $\beta 2m$ ) foi utilizada como gene normalizador.

#### *Avaliação da expressão proteica do AR e do AR-V7*

Para avaliação da expressão proteica do AR e das AR-Vs, foram utilizadas placas de 6 poços (9,03 cm<sup>2</sup>/poço) com 5x10<sup>3</sup> células semeadas por poço, divididas nos grupos de tratamento, sendo direcionado um poço para cada grupo. Para esta avaliação, foi utilizada a técnica de imunocitoquímica com fluorescência. Inicialmente, as células foram fixadas em lâmina com paraformaldeído a 4% por 30 minutos, permeabilizadas com 0,1% Triton X-100 em tampão fosfato por cinco minutos e bloqueadas com BSA 5% por duas horas à temperatura ambiente. Após o bloqueio, as células permaneceram incubadas durante 24 horas com os anticorpos primários: anti-AR C19 e anti-AR-V7. Em seguida, as lâminas foram incubadas em câmara escura e úmida com o anticorpo secundário correspondente conjugado com fluoróforo por duas horas. As células foram avaliadas em um microscópio óptico Confocal Olympus FV1000 através do programa Olympus Fluoview FV10-ASW 4.2 viewer e as imagens foram armazenadas em um computador IBM-PC compatível.

#### *Avaliação da proliferação celular*

Para avaliação da proliferação celular foram utilizadas placas de 24 poços, com uma densidade de 3x10<sup>3</sup> células por poço. O dia do plaqueamento foi considerado como dia 0. No dia seguinte, as células foram divididas nos grupos de estudo conforme as diferentes doses recebidas de DHT e associação ao antagonista do receptor (Figura 6). O dia inicial do recebimento dos tratamentos foi considerado como dia 1 e as culturas foram matadas até o dia 9, sendo avaliadas imediatamente antes de receberem os tratamentos e nos dias, 3, 6 e 9 com o ensaio da Sulforrodamina B (SRB) (Skehan, Storeng et al. 1990). Antes da realização do ensaio, o meio de cultivo das células foi substituído por um meio sem adição do SBF, seguindo uma adaptação do protocolo original, visto que as proteínas presentes no SBF podem ser fixadas juntamente com as células durante o processo, o que pode levar a um falso aumento dos valores de densidade celular (Papazisis, Geromichalos et al. 1997). Na sequência, as células foram fixadas com 100 µL de ácido tricloroacético 50% (TCA 50%) e incubadas por 1h a 4°C. Após, as células foram lavadas quatro vezes com água destilada corrente de forma a eliminar qualquer resquício de corante presente que poderia interferir na quantificação espectrofométrica. Após as placas serem secas em fluxo de ar, foram adicionados 200 µL de

solução de SRB (0,4% em ácido acético 1%) por poço seguido de incubação em temperatura ambiente por 25 min. Então, as células foram lavadas quatro vezes com 200 µL de ácido acético a 1% para eliminar o excesso de corante e, por fim, solubilizadas com 200 µL de Tris 10 mM e incubadas em agitação por 10 minutos à temperatura ambiente. A absorvância foi medida a 510 nm utilizando um espectrofotômetro de placas AnthosZenyth 200 rt.

A fim de se obter a proporção de crescimento celular conforme os grupos de tratamento hormonal, todos os valores finais de absorvância foram ajustados em relação à quantidade inicial de células semeadas (T0). Assim, para cada experimento de proliferação celular, no primeiro dia após a semeadura, foi realizado o ensaio de SRB para se obter o valor de absorvância basal celular do experimento em questão. A proporção de crescimento celular em cada um dos grupos de análise foi obtida através da subtração da absorvância final pela absorvância basal, dividido pela absorvância final do controle subtraída da absorvância basal do controle. Neste cálculo, o grupo controle (grupo 6 - controle de veículo, etanol) teve proliferação considerada como 100% (Vichai and Kirtikara 2006).

Fórmula utilizada:  $((\text{média amostra-T0})/\text{média controle-T0}) * 100$

#### **4.7 Deposição final de resíduos e biossegurança**

Após os experimentos, os restos de tecidos foram acondicionados em sacos brancos, lacrados e identificados com o rótulo de lixo biológico de tamanho adequado com todas as informações requeridas. Os meios de cultura celular e as células remanescentes presentes no interior das garrafas de poliestireno foram etiquetados como lixo biológico e entregues ao serviço de coleta competente, lícitado pela UFRGS. Resíduos de fenol foram tratados como lixo químico, que foi coletado pelo serviço de coleta sediado no Instituto de Química da UFRGS. Quaisquer outros resíduos gerados pela pesquisa em questão foram descartados conforme indicação do serviço de coleta sediado no Instituto de Química da UFRGS.

#### 4.8 Análise estatística

Os resultados de expressão gênica e proteica foram avaliados quantitativamente. Para avaliação da distribuição dos resultados obtidos pelas análises de expressão tecidual dos grupos HPB e CaP foi utilizado o teste de normalidade Shapiro-Wilk. Os resultados que apresentaram distribuição paramétrica foram apresentados como média e desvio padrão e analisados pelo teste *t* de Student. Os resultados que não apresentaram distribuição paramétrica foram apresentados como mediana e intervalo interquartil e analisados pelo teste U de Mann-Whitney. Para avaliar a associação entre os dados de expressão gênica das AR-Vs e outras variáveis contínuas foi realizada correlação de Spearman.

Para as análises da modulação androgênica em cultura celular foi empregado o teste de Equações de Estimativas Generalizadas (GEE). No caso do presente estudo, foram realizadas culturas celulares de um mesmo tipo de linhagem celular (C4-2B). No esquema experimental das culturas, as células C4-2B foram submetidas a seis diferentes tratamentos em quatro tempos de experimento, de forma que a combinação grupo de tratamento-tempo de experimento totalizou 24 grupos por caso. Desta forma, os grupos não puderam ser tratados de forma independente, uma vez que há correlação tanto entre os diferentes grupos (células provenientes de uma mesma linhagem celular) quanto entre os tempos de tratamento, caracterizando uma relação de dependência entre as variáveis, o que justifica a escolha do GEE para as análises dos resultados obtidos em cultura celular. O teste de GEE foi seguido pelo teste *post-hoc* Bonferroni.

Todas as análises foram realizadas no pacote estatístico SPSS versão 20 (*Statistical Packages for the Social Sciences*) e o nível de significância adotado foi de 5 %.

#### 4.9 Local de realização do projeto

Os experimentos de cultura celular, imunocitoquímica com fluorescência e expressão gênica foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral (LaBiMET), localizado no Departamento de Fisiologia, UFRGS, que dispõe da infraestrutura adequada para

a execução dos procedimentos utilizados neste estudo. As coletas de tecido prostático foram realizadas no Bloco Cirúrgico do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), com acompanhamento do Serviço de Urologia do HCPA. Os experimentos relacionados à expressão proteica (imunohistoquímica) foram realizados e as imagens analisadas no Serviço de Patologia Experimental do HCPA. A análise das imagens de imunocitoquímica com fluorescência foram capturadas no Centro de Microscopia Confocal da UFRGS. As dosagens intraprostáticas de esteroides foram realizadas na Endoceutics (Canadá), em parceria com o Dr. Fernand Labrie.

#### **4.10 Fontes de financiamento**

Este projeto foi financiado com recursos financeiros das seguintes agências de fomento: FIPE/HCPA (nº 14-0397), CNPq (nº 477148/2013-1), CAPES e FAPERGS.

## 5. RESULTADOS

O presente trabalho terá seus resultados divididos nos seguintes capítulos:

### I. Estudo dos níveis intrateciduals e circulantes de esteroides

### II. Estudo da expressão tecidual das AR-Vs

Apresentados no artigo “Androgen receptor isoforms expression in benign prostatic hyperplasia and primary prostate cancer” publicado na revista PlosOne, v. 13, n. 7, p. 1-17, 2018. DOI: 10.1371/journal.pone.0200613.

### III. Estudo *in vitro* da modulação androgênica das AR-Vs

Apresentados no artigo “Androgenic modulation of AR-Vs” publicado na revista Endocrine, p. 1-10, 2018. DOI 10.1007/s12020-018-1682-5.

**Capítulo I -**

**Estudo dos níveis intratecduais e circulantes de esteroides**

### *Introdução*

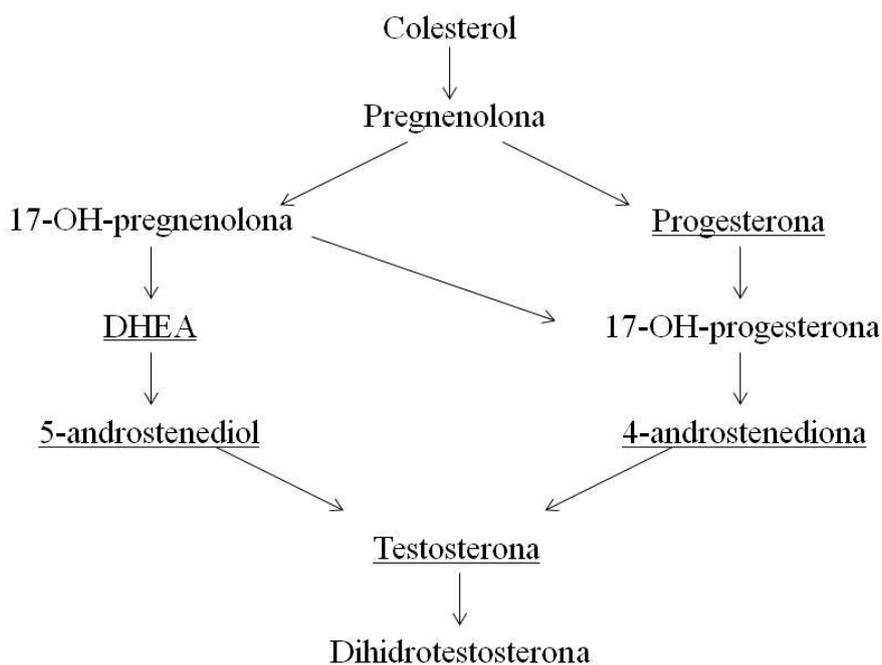
Os androgênios são uma classe de hormônios esteroides que exercem papel fundamental na biologia da próstata, eles regulam o desenvolvimento e a manutenção das características masculinas, incluindo o crescimento e a função prostática (Xu, Chen et al. 2015). A terapia de ablação hormonal é, junto com o tratamento cirúrgico e a terapia de radiação, a abordagem de escolha para o CaP localizado. As células tumorais da próstata são particularmente responsivas aos androgênios (testosterona e dihidrotestosterona), o que fundamenta o protocolo de redução dos níveis circulantes de testosterona em homens com CaP. Entretanto, a associação entre o desenvolvimento do CaP e os níveis circulantes de testosterona é bastante controversa; inclusive já foi demonstrada a relação oposta entre a variável e o desfecho em questão (Morgentaler 2006). Além disso, a associação entre a queda dos níveis circulantes de testosterona e o desenvolvimento do CaP tem estimulado novas ideias acerca da etiologia e prevenção primária do CaP primário (Xu, Chen et al. 2015).

A ablação androgênica promove redução nos níveis circulantes de testosterona. Entretanto, mesmo frente a esta regulação hormonal negativa, muitos pacientes acabam progredindo para um estágio de doença que não-responsivo a este bloqueio androgênico, conhecido como CRPC (do inglês *castration resistant prostate cancer*) (Uo and Sprenger 2018). Diversos são os mecanismos propostos para a recidiva desta doença, porém a manutenção do sinal do AR parece ser capital. As teorias mais aceitas incluem variações nos níveis do(s) ligante(s) intratecduais, aumento da expressão do receptor, mutações no receptor, presença de correguladores e fatores que possam levar à ativação do receptor independentemente dos níveis de ligante (Scher and Sawyers 2005).

Ainda que os níveis circulantes de androgênios possam estar reduzidos, os níveis intratecduais podem ser mantidos em determinado nível que seja suficiente para a manutenção do sinal do AR. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi analisar e comparar os níveis circulantes (séricos) e intratecduais de esteroides em amostras de HPB e CaP.

### Resultados

Foram mensurados esteroides participantes via esteroidogênica em amostras de tecido e de soro de pacientes com HPB e CaP (Figura 1, (Locke, Guns et al. 2008)). Os resultados estão demonstrados nas Tabelas 1 e 2.



**Figura 1.** Esquema da via de síntese de esteroides a partir do colesterol. Os hormônios que foram dosados estão sublinhados. Adaptado de (Locke, Guns et al. 2008).

O tecido hiperplásico benigno apresentou maiores níveis de T, 4-androstenediona (4-diona) e progesterona que o tecido de carcinoma hormônio-sensível ( $P=0.001$ ,  $P=0.001$ , e  $P<0.001$ , respectivamente).

**Tabela 1** Medida de esteroides intraprostáticos

	HPB	CaP	Valor <i>P</i>
<b>DHEA</b> , ng/g	n=103	n=34	
Mediana (IQR)	36,69 (84,34)	26,40 (95,81)	0,639
<b>T</b> , ng/g	n=97	n=32	
Mediana (IQR)	0,14 (0,32)	0,07 (0,11)	*0,001
<b>4-diona</b> , ng/g	n=99	n=32	
Mediana (IQR)	0,17 (0,26)	0,07 (0,12)	*0,001
<b>5-diol</b> , ng/g	n=101	n=33	
Mediana (IQR)	0,46 (0,56)	0,47 (0,63)	0,541
<b>DHT</b> , ng/g	n=102	n=33	
Mediana (IQR)	3,58 (4,18)	2,47 (3,14)	0,202
<b>Progesterona</b> , ng/g	n=99	n=30	
Mediana (IQR)	0.10 (0,12)	0,05 (0,07)	*<0,001

Valor *P* foi determinado pelo teste *U* de Mann–Whitney *U*.

Quanto aos níveis circulantes, somente 5-androstenediol (5-diol) foi diferente entre os grupos, apresentando níveis mais elevados nas amostras séricas do grupo CaP ( $P=0.025$ , Tabela 2).

**Tabela 2** Medida de esteroides séricos

	HPB n=13	CaP n=9	Valor <i>P</i>
<b>DHEA</b> , ng/g	1.23 (0.47)	0.98	0.794 <sup>b</sup>
Mediana (IQR)			
<b>T</b> , ng/g	3.35 (0.91)	4.29 (1.60)	0.096 <sup>a</sup>
Média (SD)			
<b>4-diona</b> , ng/g	0.44 (0.21)	0.35 (0.48)	0.695 <sup>b</sup>
Mediana (IQR)			
<b>5-diol</b> , ng/g	0.27 (0.19)	0.46 (0.49)	*0.025 <sup>b</sup>
Mediana (IQR)			
<b>DHT</b> , ng/g	0.33 (0.13)	0.39 (0.15)	0.338 <sup>a</sup>
Média (SD)			
<b>Progesterona</b> , ng/g	0.03 (0.02)	0.04 (0.04)	0.186 <sup>b</sup>
Mediana (IQR)			

<sup>a</sup> Valor *P* foi determinado pelo teste *t* de Student.

<sup>b</sup> Valor *P* foi determinado pelo teste *U* de Mann–Whitney *U*.

A análise de correlação de Spearman sugere que, nas amostras de HPB, a T parece ser sintetizada via progesterona/4-diona. Por outro lado, nas amostras de câncer, ambas as rotas da via de esteroidogênese (progesterona/4-diona e DHEA/5-diol) parecem estar envolvidas na síntese de T (Tabelas 3, 4 e 5).

**Tabela 3** Coeficiente de correlação entre esteroides intraprostáticos

	Progesterona		T		DHT	
	HPB	CaP	HPB	CaP	HPB	CaP
<b>4-diona</b>	0,467 ( $<0,001$ )* N=95	0,713 ( $<0,001$ )* N=30	0,649 ( $<0,001$ )* N=96	0,518 (0,003)* N=31	-0,257 (0,011)* N=98	0,062 (0,740) N=31
<b>Progesterona</b>	-	-	0,206 (0,047)* N=93	0,183 (0,341) N=29	-0,112 (0,272) N=98	-0,136 (0,482) N=29

Correlação de Spearman para associação entre variáveis. Os resultados estão apresentados como  $r_s(P)$ . Valores  $P < 0.05$  foram considerados estatisticamente significativos e estão indicados por asterisco (\*).

**Tabela 4** Coeficiente de correlação entre esteroides intraprostáticos

	DHEA		T		DHT	
	HPB	CaP	HPB	CaP	HPB	CaP
<b>5-diol</b>	0,877 ( $<0,001$ )* N=101	0,826 ( $<0,001$ )* N=33	0,071 (0,496) N=95	0,358 (0,048)* N=31	0,228 (0,023)* N=100	0,262 (0,147) N=32
<b>DHEA</b>	-	-	0,117 (0,253) N=97	0,565 (0,001)* N=32	0,186 (0,061) N=102	0,536 (0,001)* N=33

Correlação de Spearman para associação entre variáveis. Os resultados estão apresentados como  $r_s(P)$ . Valores  $P < 0.05$  foram considerados estatisticamente significativos e estão indicados por asterisco (\*).

**Tabela 5** Coeficiente de correlação entre esteroides intraprostáticos

	DHT	
	HPB	CaP
<b>T</b>	-0,332 (0,001)* N=96	0,357 (0,049)* N=31

Correlação de Spearman para associação entre variáveis. Os resultados estão apresentados como  $r_s(P)$ . Valores  $P < 0.05$  foram considerados estatisticamente significativos e estão indicados por asterisco (\*).

### Discussão

O papel central dos androgênios na biologia da próstata é amplamente conhecido. De fato, o balanço entre a proliferação induzida por androgênios e a apoptose é um importante regulador do crescimento, tanto na próstata normal quanto na próstata tumoral.

A partir da análise dos níveis de esteroides intratecduais e séricos pela tecnologia LC-MS/MS, observamos que as amostras de CaP apresentam níveis intratecduais reduzidos de T,

4-diona e progesterona quando comparadas a amostras de HPB. A dosagem de DHEA e DHT intratecidual também apresentou valores menores no grupo CaP, entretanto, esses valores não foram significativamente diferentes entre os grupos.

Por outro lado, quando analisados os níveis séricos de esteroides, somente 5-diol foi diferente entre os grupos. As amostras de CaP apresentaram níveis mais elevados de 5-diol do que as amostras de HPB. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os níveis séricos de progesterona, DHEA, 4-diona, T ou DHT entre HPB e CaP. Em um estudo prévio de nosso grupo de pesquisa (Biolchi, Silva Neto et al. 2013) também não encontramos diferenças nos níveis circulantes de T entre os grupos HPB e CaP. Porém, quando HPB e CaP foram comparados ao grupo controle (homens saudáveis), ambos apresentaram níveis diminuídos de T.

Estes dados demonstram que os níveis séricos de esteroides não refletem o ambiente hormonal intraprostático, o que corrobora com dados da literatura (Heracek, Hampl et al. 2007; Goldenberg, Koupparis et al. 2011). A discordância entre os níveis intratecaduais e circulantes de esteroides pode refletir a variabilidade da maquinaria enzimática que interconverte e metaboliza os esteroides (Labrie, Dupont et al. 1993; Labrie, Luu-The et al. 1997; Gianfrilli, Pierotti et al. 2014). Dentre as teorias para este fenômeno, a síntese intrácrina de esteroides ocupa papel de destaque.

A relação entre os níveis totais de T e o desenvolvimento do CaP é bastante controversa. Por anos, se acreditou que a T seria uma causa direta para o CaP. Ainda que o desenvolvimento do CaP seja androgênio-dependente, intrigantemente a incidência do CaP aumenta conforme diminuem os níveis sistêmicos de androgênios, cujos níveis reduzem conforme o avançar da idade. Ainda que estudos prévios tenham demonstrado uma associação entre o aumento do crescimento do câncer e altos níveis circulantes de T livre (Parsons, Carter et al. 2005; Usoro, Obot et al. 2015), sugerindo que baixos níveis de T livre poderiam atuar com um fator protetor contra o CaP, vários grupos independentes encontraram uma associação oposta (Stattin, Lumme et al. 2004; Morgentaler 2006; Xu, Chen et al. 2015).

Estudos recentes demonstraram que baixos níveis de T total e livre estão associados a um risco aumentado de CaP de alto grau, estando relacionados a uma doença mais agressiva

e de pior prognóstico (sobrevida livre da doença) (Biolchi, Silva Neto et al. 2013; Bayar, Sirin et al. 2017; INCA 2017). Por outro lado, baixos níveis de T também foram relacionados a um risco reduzido de desenvolvimento de HPB (Kristal, Schenk et al. 2008; Biolchi, Silva Neto et al. 2013). Ainda que neste trabalho nós não tenhamos encontrado níveis séricos de T diferentes entre CaP e HPB, os níveis intratecduais de T foram menores no CaP. Desta forma, embora a regressão do CaP resultante da deprivação androgênica seja fato concreto e bem estabelecido, esses resultados não suportam a hipótese de que a T seja a causa direta do CaP (Morgentaler 2006).

De modo semelhante, observamos uma diminuição nos níveis intraprostáticos de DHT no grupo CaP quando comparado ao grupo HPB, ainda que esta diferença não tenha sido estatisticamente significativa. Estes dados estão de acordo com trabalhos prévios que demonstraram níveis teciduais de DHT aumentados na HPB quando comparada ao CRPC (Mohler, Gregory et al. 2004; Titus, Schell et al. 2005). Uma explicação para que os valores encontrados no presente trabalho não tenham alcançado significância estatística pode ser o fato de alguns pacientes do grupo HPB estarem sob o uso de finasterida. Como já demonstrado na literatura, a finasterida causa um aumento dos níveis intraprostáticos de T e uma diminuição recíproca dos níveis intraprostáticos de DHT (van der Sluis, Meuleman et al. 2012). Isto pode explicar porque os níveis de DHT encontrados no grupo CaP não tenham sido estatisticamente diferentes do grupo HPB, ainda que tenhamos observado valores menores no CaP que na HPB. Em resumo, a finasterida pode ter reduzido os níveis intraprostáticos de DHT, mascarando a diferença entre HBP e CaP.

Nossos resultados corroboram com resultados da década de 1970, que mostraram um discreto aumento nos níveis circulantes de progesterona nos pacientes com HPB. E ainda, nestes pacientes, a T permanece em níveis semelhantes àqueles encontrados em homens jovens saudáveis (Hammond, Kontturi et al. 1978), confirmado a relação entre altos níveis de T e o desenvolvimento da HPB. Além disto, conforme este mesmo trabalho, as concentrações de progesterona e T nos pacientes com CaP não foram diferentes da população referência (Hammond, Kontturi et al. 1978). Em relação ao tecido hiperplásico, os elevados níveis intraprostáticos sugerem que não somente os androgênios, mas também a progesterona, exercem papel na patogênese da HPB, favorecendo o crescimento celular. Até o momento,

ainda não está claro como exatamente os esteroides influenciam a HPB, de forma que mais estudos acerca dos processos fisiopatológicos envolvidos no desenvolvimento desta condição são necessários.

Ademais, também é importante salientar que, ainda que nossos resultados discordem de alguns estudos prévios, os métodos utilizados para mensurar os níveis de esteroides foram diferentes. De fato, os dados publicados acerca dos níveis intratecduais de esteroides variam consideravelmente. Essa variação pode ser explicada também pelos diferentes métodos utilizados na seleção de pacientes, métodos de obtenção e processamento das amostras e ainda, ensaios e equipamentos utilizados para a quantificação dos níveis de esteroides (van der Sluis, Vis et al. 2012). Uma limitação do nosso trabalho é a não-padronização da coleta sanguínea, que embora tenha sido realizada sempre no dia anterior da cirurgia, geralmente no fim do dia - quando os pacientes recebiam e assinavam o TCLE-, o horário exato da coleta era variável.

A partir dos resultados obtidos pela análise de correlação de Spearman, podemos sugerir que, na HPB, a T seja sintetizada via progesterona/4-diona. Já no CaP, a T parece ser sintetizada tanto via progesterona/4-diona quanto via DHEA/5-diol. Entretanto, ainda que os resultados deste trabalho suportem a ideia da via de síntese de T, eles não fornecem evidências específicas. Em vista disto, é necessária uma investigação padronizada para avaliar esta hipótese.

### *Conclusão*

Os níveis circulantes de 5-diol são maiores no CaP que na HPB. Os demais esteroides dosados não apresentaram diferença entre os grupos. O grupo CaP apresenta menores níveis intratecduais de T, 4-diona e progesterona em relação à HPB. Esses resultados contrariam a teoria de que a T seria causa direta para o CaP. Em suma, esses dados sugerem que a redução dos níveis intratecduais de T abaixo de determinado limiar possa desencadear uma adaptação celular que em última instância pode dar origem a eventos participantes do início do processo de carcinogênese, como por exemplo, geração de mutações nos receptores esteroidais que permitem a manutenção do sinal mesmo na ausência de ligante.

**Capítulo II -**

**Estudo da expressão tecidual das AR-Vs**

Artigo: *“Androgen receptor isoforms expression in benign prostatic hyperplasia and primary prostate cancer”*

Status: Artigo publicado na revista *PlosOne*, v. 13, n. 7, p. 1-17, 2018.

DOI: 10.1371/journal.pone.0200613

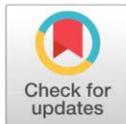
## RESEARCH ARTICLE

# Androgen receptor isoforms expression in benign prostatic hyperplasia and primary prostate cancer

Ana Caroline Hillebrand<sup>1</sup>, Lolita Schneider Pizzolato<sup>1</sup>, Brasil Silva Neto<sup>2</sup>, Gisele Branchini<sup>1,3</sup>, Ilma Simoni Brum<sup>1\*</sup>

**1** Laboratory of Endocrine and Molecular Biology, Department of Physiology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil, **2** Division of Urology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil, **3** Department of Basic Sciences of Health, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

\* [ilma@ufrgs.br](mailto:ilma@ufrgs.br)


 OPEN ACCESS

**Citation:** Hillebrand AC, Pizzolato LS, Neto BS, Branchini G, Brum IS (2018) Androgen receptor isoforms expression in benign prostatic hyperplasia and primary prostate cancer. *PLoS ONE* 13(7): e0200613. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200613>

**Editor:** Mohammad Saleem, University of Minnesota Hormel Institute, UNITED STATES

**Received:** November 1, 2017

**Accepted:** June 30, 2018

**Published:** July 20, 2018

**Copyright:** © 2018 Hillebrand et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** This study was supported by Brazilian Funding Agencies FIPE - HCPA (Grant number 14-0397); CNPq (Grant number 477148/2013-1); CAPES; and FAPERGS. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

## Abstract

The role of molecular changes in the androgen receptor (AR) as AR variants (AR-Vs) is not clear in the pathophysiology of benign prostatic hyperplasia (BPH) and hormone-naïve PCa. The aim of the current work was to identify the presence of AR isoforms in benign tissue and primary PCa, and to evaluate the possible association with tumor aggressiveness and biochemical recurrence in primary PCa. The mRNA levels of full length AR (AR-FL) and AR-Vs (AR-V1, AR-V4 and AR-V7) were measured using RT-qPCR. The protein expression of AR-FL (AR-CTD and AR-NTD) and AR-V7 were evaluated by the H-Score in immunohistochemistry (IHC). All investigated mRNA targets were expressed both in BPH and PCa. AR-FL mRNA levels were similar in both groups. AR-V4 mRNA expression showed higher levels in BPH, and AR-V1 and AR-V7 mRNA expression were higher in PCa. The AR-V7 protein showed a similar H-Score in both groups, while AR-CTD and AR-NTD were higher in nuclei of epithelial cells from BPH. These results support the assumption that these constitutively active isoforms of AR are involved in the pathophysiology of primary PCa and BPH. The role of AR-Vs and their possible modulation by steroid tissue levels in distinct types of prostate tumors needs to be elucidated to help guide the best clinical management of these diseases.

## Introduction

Prostate cancer (PCa) is the most common neoplasia among Brazilian men, with 68,220 new cases estimated for the year 2018, corresponding to an estimated risk of 66.12 new cases per 100 thousand men, only behind non-melanoma skin cancer [1]. As prostatic cell growth is androgen dependent, androgen ablation therapy has become the mainstay of treatment for patients with PCa [2]. However, following a period of initial response, prostate cancer cells can acquire the ability to proliferate despite very low circulating concentrations of androgen. This androgen-independent proliferation is clinically significant, because the majority of men who

develop resistance to hormonal therapy do not respond to currently available therapies. During this therapy resistance phase, the activation of androgen receptors (AR) may occur independently of hormone binding [3, 4]. It is speculated that prostate cells use different mechanisms to compensate for androgenic deprivation, and, recently, androgen receptor splice variants (AR-Vs) have been associated with that androgen-independent growth [5].

The *AR* gene is composed of eight exons encoding a 110 kD protein. The AR protein comprises different domains: an N-terminal domain (NTD), encoded by exon 1; a DNA-binding domain (DBD), encoded by exons 2 and 3; and the ligand-binding domain (LBD), encoded by exons 4 to 8, which is the region where hormone binding occurs [5, 6]. When the hormone binds to LBD, it allows the translocation of the receptor to the nucleus and the subsequent transcriptional regulation of androgen-responsive genes [7]. However, although AR-Vs lose LBD, they allow the AR signal to occur, even in the absence of androgen [5, 8–12]. Among the variants already identified, AR-V7 is the most thoroughly studied to date [5, 9, 10]. However, the role of AR-Vs in the pathophysiology of benign prostatic hyperplasia (BPH) and hormone-responsive PCa needs to be better clarified [5]. Some authors have reported the presence of isoforms in normal tissue [9–11, 13]; however, those samples were obtained from normal tissue of a prostate with cancer. It is noteworthy that samples of tissue adjacent to tumors, although morphologically confirmed as non-neoplastic tissue, can present molecular alterations like those found in malignant tissue (unpublished data). Some authors, when analyzing isoform gene expression, observed that AR-Vs are expressed at levels substantially lower than AR-FL [5, 9, 12]. In castration-resistant PCa (CRPC) samples, the AR-V expression levels are significantly higher than the samples of primary PCa, and their expression is associated with a worse clinical outcome [5, 9]. In addition, they have been associated with increased disease recurrence after radical prostatectomy compared with patients with low expression of AR-Vs [9]. The AR-Vs can have an important role in the complex regulatory mechanism of tumor cell proliferation and drive molecular changes in this tissue. AR-Vs present an interesting complex interaction between themselves. Heterodimerization between AR-Vs and with AR-FL could have important impact at cellular level [14]. As demonstrated by Zhan et al. [14], AR-V7 heterodimerizes with AR-V1, AR-V4 and AR-V6, which facilitates its nuclear localization. These isoforms could also dimerize with AR-FL, even in the absence of androgen. When dimerized to androgen-bound AR-FL, these isoforms are piggybacked into the nucleus. AR-V1 could heterodimerize with AR-V7 and as consequence the ability of AR-V7 to confer castration-resistant cell growth is inhibited, which suggest that AR-V1 could act as a negative regulator of AR-V7. Although this AR-Vs interplay were studied to investigate castration-resistant cell growth, the presence, interaction and possible consequences of AR-Vs expression should be taken in consideration even in benign tissue. The molecular mechanisms of AR-Vs interactions still unclear, especially involving cell cycle and apoptosis-related genes. To provide a better understanding of the molecular mechanisms of AR-Vs and pathophysiology of prostatic tumors, in the present work, we investigate the expression of AR-Vs, cell cycle and apoptosis-related genes in prostate tissue from patients with primary PCa or BPH, and their possible association with tumor aggressiveness and biochemical recurrence in primary PCa.

## Material and methods

### Patient selection

Tissue samples from patients with primary PCa (n = 61) or BPH (n = 128) were obtained from radical prostatectomy, prostatectomy or transurethral resection (TURP). For mRNA analysis, 25 samples of primary PCa and 30 of BPH were used. For the immunohistochemical analysis, 6 samples of each group were used. The pathological diagnosis of the tissues was confirmed by

the Pathology Service. This study was approved by the Research Ethics Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Informed consent was obtained from all individual participants included in the study. Clinical data for each patient were collected from the hospital electronic records and any of the authors had access to any information which could potentially identify any individual patients.

### Gene expression analysis

Molecular analysis was performed by quantitative PCR (qPCR) following reverse transcription (RT), with a TaqMan® probe detection system (Life Technologies™) using 10-fold diluted samples. The gene for beta-2-microglobulin (*B2M*) was used as a reference gene for the stabilization of gene expression levels among the different samples. For amplification of *B2M* and *AR*, inventoried assays from Life Technologies™ were used (Hs00171172\_m1 and Hs00984230\_m1, respectively). It is noteworthy that the assay used for *AR* amplified transcripts 1 and 2 of the receptor (*AR-FL*). For the design of primers and probes specific for isoforms, the mRNA sequences described by Guo *et al.* [5], and available in UniGene under the identifications FJ235917.1 (*AR-V1*), FJ235919.1 (*AR-V4*), and FJ235916.1 (*AR-V7*) [5] were used. We also analyzed the cell cycle-related genes *TP53*, *MDM2*, *CDKNA* and apoptosis-related genes *BAX* and *BCL2* to study their possible association with *AR-Vs* and to help towards a better understanding of the molecular mechanisms of *AR-Vs*. The sequences of primers and probes are shown in Table 1.

We designed a specific assay to amplify *AR-V1*, since a unique region was identified in this variant, which allowed isolated amplification of this isoform. Due to the close similarity between the cDNA sequences of isoforms *AR-V4* and *AR-V7*, after careful analysis, the design of specific assays for these isoforms was not possible; thus, we chose the concomitant amplification of the isoforms. Therefore, we designed assays for the joint amplification of transcripts *AR-V4* and *AR-V7*, and named this transcript *AR-V4V7*. The same was true for *AR-V4* and *AR-V3*. Even though both transcripts were amplified together, to simplify understanding, we refer here the transcript *AR-V3V4* as *AR-V4*. The ratio for *AR-V4V7/AR-V4* was calculated to represent *AR-V7* expression, termed here as *AR-V7rv* (representative value).

**Table 1. Sequences of primers and probes used for qRT-PCR.**

Target	Sequence
<i>B2M</i>	Hs00984230_m1
<i>AR-FL</i>	Hs00171172_m1
<i>AR-V1</i>	sense 5' -AGGGTGGTTGGAGTCTCAGA-3' antisense 5' -CCAGGAATGAATCATCTACAAA-3' probe 5' -TTCCTTAAGACTACCTTCAGACTC-3'
<i>AR-V4</i>	sense 5' -GACACTAACCCCAAGCCATAC-3' antisense 5' -ACTGTCTGATGTTGCTCTGTG-3' probe 5' -TTGTTTTCTGTCAGTCCCATTTGGTGC-3'
<i>AR-V4V7</i>	sense 5' -CTCTTGATTGCTGACTCCCTC-3' antisense 5' -ACAACTACATGAGTGGTAACCA-3' probe 5' -AGGTAGGAAAACACTATTGGTCCCGC-3'
<i>BAX</i>	Hs00180269_m1
<i>BCL2</i>	Hs00608023_m1
<i>CDKN1A</i>	Hs00355782_m1
<i>TP53</i>	Hs01034249_m1
<i>MDM2</i>	Hs00242813_m1

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200613.t001>

### Immunohistochemistry (IHC) of AR-Vs

We chose to use three different antibodies to investigate AR expression. The PG21 antibody recognizes the N-terminal domain (NTD), which is encoded by AR-FL and AR-Vs. Because of this, antibodies recognizing AR-NTD detect both AR-FL and AR-Vs. The C-19 antibody recognizes the C-terminal domain (CTD), and since LBD-truncated AR-Vs lacks the CTD region, they are consequently not recognized by the C-19 antibody. An alternative approach to detect the presence of AR-Vs is to combine data obtained using antibodies recognizing AR-NTD and AR-CTD, respectively.

IHC was performed on 4- $\mu$ m sections derived from FFPE blocks using the mouse AR-V7 monoclonal antibody (Precision Antibody), diluted 1:200; the rabbit polyclonal AR (C-19) (Santa Cruz), diluted 1:400; and the rabbit polyclonal AR (PG21) (Millipore), diluted 1:400. Antigen retrieval was achieved by heating in a water bath the slides in citrate buffer (pH 6.0) for 1 hour at 95°C. Endogenous peroxidase was blocked using 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solution in methanol for 30 minutes. The reaction was visualized using DAB chromogen (Liquid Dab, Dako) followed by counterstaining with Harris hematoxylin. Cases were scored blind by two evaluators as clinical data using the modified H-score (histological score) method, a semiquantitative assessment of staining intensity that reflects antigen concentration [15, 16]. Briefly, the H-score was determined according to the formula: [(% of weak staining) x 1] + [(% of moderate staining) x 2] + [(% of strong staining) x 3], yielding a range from 0 to 300 [15, 16].

### Statistical analysis

Data are reported as mean (standard deviation) when parametric, and as median values with interquartile range (IQR) when non-parametric, and analyzed by Student's *t*-test or Mann-Whitney U test, respectively. In order to verify the association between the results of isoform gene expression and the other continuous variables, a Spearman's rank correlation was performed. All *P* values were two-sided and *P* < 0.05 was considered significant. All statistical analyses were performed using SPSS 20.0 program. Graphs were constructed using SPSS or GraphPad.

## Results

### Sample characterization

Clinical characteristics of patients are described in Table 2. Among the 61 PCa samples, 40 (66.7%) showed a Gleason score  $\leq 7(3+4)$ , and 20 (33.3%) showed a Gleason score  $\geq 7(4+3)$ .

**Table 2. Sample characterization.**

	BPH	PCa	<i>P</i> value
Age at surgery, years	n = 128	n = 61	0.510 <sup>a</sup>
Mean (SD)	66.70 (8.29)	65.85 (8.23)	
PSA preoperative, ng/ml	n = 123	n = 61	* < 0.001 <sup>b</sup>
Median (IQR)	5.00 (6.54)	7.41 (6.76)	
Estimated prostate weight <sup>c</sup> , grams	n = 89	n = 42	* < 0.001 <sup>b</sup>
Median (IQR)	62.00 (56)	36.50 (25)	
Surgical specimen weight, grams	n = 57	n = 55	* 0.001 <sup>b</sup>
Median (IQR)	56.00 (35)	42.00 (22)	

<sup>a</sup> *P* value was determined T test. *P* values are corrected for ties

<sup>b</sup> *P* value was determined by the Mann-Whitney U test. *P* values are corrected for ties.

<sup>c</sup> Prostate weight estimated by ultrasound or digital rectal examination.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200613.t002>

One PCa case had Gleason data missing. Regarding the pathologic staging (pTNM), 4 (7.3%) were classified as T1, 44 (80.0%) were classified as T2, and 7 (12.7%) as T3. Six PCa cases had pTNM data missing. After surgery, 18 patients (32.7%) presented biochemical recurrence after a median of 53 months.

### AR-Vs are differentially expressed between BPH and PCa

We detected all analyzed AR transcripts in BPH and primary PCa samples. The mRNA expression of AR-FL showed no difference between the groups ( $P = 0.331$ ) (Fig 1A). PCa samples showed higher AR-V1 gene expression compared to the BPH group ( $P = 0.041$ ) (Fig 1B). Conversely, BPH showed higher AR-V4 gene expression compared to the PCa group ( $P = 0.001$ ) (Fig 1C). Using the ratio of AR-V4V7/AR-V4, it was possible to determine an indirect value of AR-V7, termed AR-V7rv. This was more highly expressed in PCa when compared to BPH ( $P < 0.001$ ) (Fig 1D). When PCa samples were dichotomized based on biochemical recurrence, a similar expression was observed for all mRNAs analyzed among patients who had biochemical recurrence and in those who did not present recurrence.

### The cell cycle-related and apoptosis-related genes are more expressed in PCa group

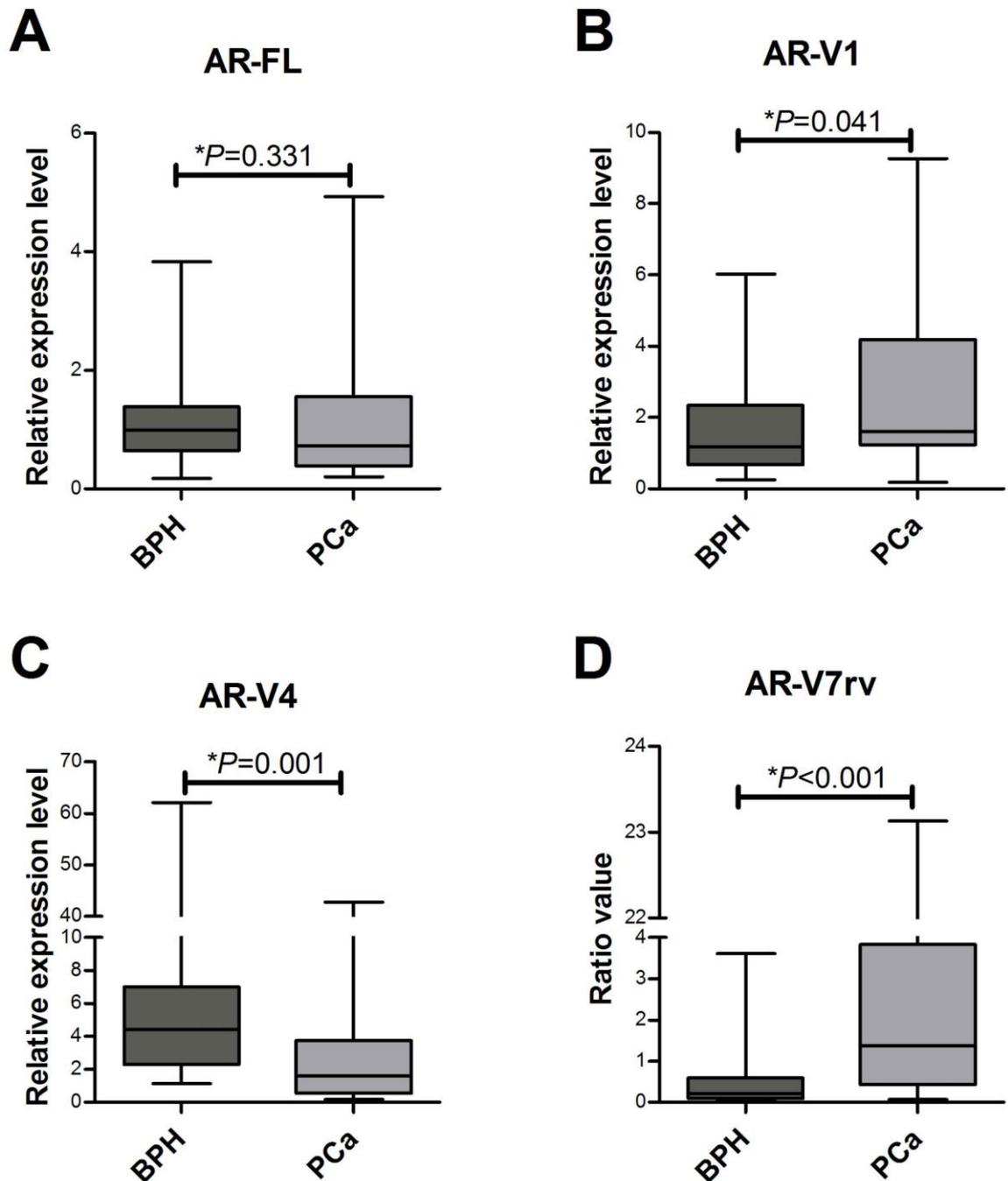
Regarding the expression of *BAX*, *BCL2*, *TP53*, *CDKN1A* and *MDM2*, all of these were more highly expressed in the PCa group ( $P \leq 0.001$ ,  $P = 0.029$ ,  $P = 0.011$ ,  $P = 0.001$ ,  $P = 0.001$ , and  $P = 0.025$ ) than in the BPH group (Table 3).

### AR-NTD and AR-CTD are expressed in higher levels in the nuclei of epithelial cells from BPH samples

We also analyzed the protein expression of AR-NTD, AR-CTD and AR-V7 by immunohistochemistry. For this analysis, the H-score (HS) was quantified separately in the nucleus and cytoplasm of epithelial and stromal compartments (Table 4, Fig 2A and 2B). AR-NTD and AR-CTD had a higher HS in epithelial nuclei of BPH group than in the PCa group ( $P = 0.034$  and  $P = 0.041$ , respectively; Fig 2A). AR-V7 seemed to be also more highly expressed in nuclei of epithelial cells in benign tissue, but failed to reach statistical significance ( $P = 0.093$ , Fig 2A). Indeed, AR-V7 was not differentially expressed in any compartment, but this variant was present in epithelial cells from BPH and PCa. AR-V7 was also expressed in the cytoplasm of stromal cells at the same intensity between the groups. On the other hand, stromal nuclei were positive for AR-NTD, although stromal cytoplasm was positive for AR-V7. Fig 3 shows representative images of immunohistochemical staining on epithelial cells. When the H-score yielded a value lower than 10, results were considered negative and were represented as not detectable (ND). Using the AR-NTD/AR-CTD ratio, we observed a wide distribution in epithelial nuclei of PCa samples, although it failed to reach statistical significance ( $P = 0.818$ ) (Figure in S1 Fig).

We observed positive staining for the three antibodies in all epithelial samples, which is remarkable since benign tumors (like BPH) and primary cancer are not expected to express AR-Vs, which are supposed to arise only after androgen deprivation therapy. Nuclear stromal staining was positive only for AR-NTD in both groups. Although AR-CTD was detectable in the BPH group, the score was so minimal that it was considered negative. AR-CTD in PCa samples and AR-V7 in both nuclear stromal groups were negative.

Using Spearman's rank correlation analysis, we found a positive correlation among AR-Vs (Table 5). In the PCa group, AR-FL was positively correlated with *BCL2* (0.464,  $P = 0.030$ ;



**Fig 1. AR-Vs mRNA expression in BPH and PCa samples.** All mRNA data are normalized by beta-2-microglobulin (*B2M*). For AR-FL, AR-V1 and AR-V4, values of normalized quantity means (NQM) were used to create the graphs. AR-V7rv was obtained from the ratio between AR-V4V7 and AR-V4. The bars represent the minimum to maximum values. (A) The median AR-FL expression is not significantly different comparing BPH and PCa ( $P = 0.331$ ). (B) and (D) AR-V1 and AR-V7rv expression are higher in primary PCa than in BPH ( $P = 0.041$  and  $P < 0.001$ , respectively). (C) AR-V4 expression is

significantly different comparing BPH and PCa ( $P = 0.001$ ), showing higher levels in hyperplastic tissue.  $P$  value was determined by the Mann–Whitney U test.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200613.g001>

**Table 6.** In the BPH group, AR-V1 and AR-V4 were positively correlated with prostate weight (0.477,  $P = 0.025$ ; and 0.711,  $P < 0.001$ ; **Table 5**). The positive correlation between AR-V4 and prostate weight is not surprising given that BPH (which presented a higher prostate weight) has a higher mRNA level of this isoform when compared with PCa. Although AR-V1 was more highly expressed in PCa, this isoform showed a positive correlation with prostate weight in the BPH group. In addition, the ratio of *BCL2/BAX* showed a regular negative correlation ( $-0.413$ ,  $P = 0.036$ ; **Table 6**) with the surgical specimen weight. In PCa, we found a regular positive correlation between AR-V4 and Gleason score (0.493,  $P = 0.0012$ ), suggesting that with the increase of tumoral aggressivity, there was an increase of AR-V4 expression.

Age at surgery was negatively correlated with the ratios AR-FL/AR-V1 ( $-0.364$ ,  $P = 0.048$ ), AR-FL/AR-V4 ( $-0.405$ ,  $P = 0.027$ ) and AR-FL/AR-V4V7 ( $-0.377$ ,  $P = 0.040$ ) in the BPH group. These associations between ratios and age were not found in the PCa group, but in this group, the ratios AR-FL/AR-V4 and AR-V7rv were positively correlated with *BAX* (0.472,  $P = 0.017$ ; and 0.450,  $P = 0.024$ ).

Besides the correlation between cell cycle-related and apoptosis-related genes and AR-Vs and clinical features, these genes were correlated among themselves. The correlations of cell cycle-related genes (*TP53*, *MDM2*, *CDKN1A*) and apoptosis-related genes (*BAX*, *BCL2* and ratio *BCL2/BAX*) are presented in **Table 6**.

### High grade versus low grade PCa

When primary PCa samples were stratified for Gleason score ( $\leq 7(3+4)$  and  $\geq 7(4+3)$ ), high-grade patients were older ( $P = 0.047$ , **Fig 4A**) and had higher AR-V4 levels ( $P = 0.004$ , **Fig 4D**) and higher AR-V7rv ( $P = 0.014$ , **Fig 4E**) when compared with the low-grade group. Although AR-V1 levels did not show statistical significance ( $P = 0.060$ , **Fig 4C**), this variant had a wide distribution in the high-grade group ( $\geq 7(4+3)$ ), which is in concordance with our results from other isoforms. AR-FL levels ( $P = 0.836$ , **Fig 4B**) were similar between low and high grades. The ratio of AR-FL/AR-V4 was higher in the low-grade samples ( $P = 0.021$ , **Fig 4F**). Regarding the biochemical relapse, the mean time until relapse was 53 months. In high-grade PCa, this time was significantly lower (31 months) than low-grade PCa (65 months) ( $P = 0.004$ ), represented by the Kaplan-Meier curve (Figure in **S2 Fig**).

In a Cox regression univariable model (**Table in S1 Table**), the ratio of AR-V1/AR-FL was associated with a higher risk of biochemical recurrence (HR = 1.172,  $P = 0.045$ ) and *BLC2/*

**Table 3. Cell cycle-related and apoptosis-related genes mRNA expression.**

mRNA median (interquartile range)	BPH n = 27	PCa n = 26	P value
<i>BAX</i>	0.8660 (0.60)	2.1764 (2.64)	*0.000
<i>BCL2</i>	0.8114 (0.58)	1.2557 (2.21)	*0.029
<i>MDM2</i>	1.0992 (1.66)	3.5086 (6.50)	*0.001
<i>TP53</i>	0.9556 (1.12)	1.5580 (2.01)	*0.011
<i>CDKN1A</i>	0.6452 (0.62)	2.3317 (3.12)	*0.001

$P$  value was determined by the Mann–Whitney U test.  $P$  values are corrected for ties.

\*  $P < 0.05$  were considered statistically significant.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200613.t003>

**Table 4. Histological scores (H-Score) representing the histological staining patterns of AR-NTD, AR-CTD and AR-V7 protein in BPH and PCa samples.**

		AR-NTD			AR-CTD			AR-V7		
		BPH	PCa	P	BPH	PCa	P	BPH	PCa	P
Nuclei	Epithelial	261.8 (23.8)	125.8 (116.2)	*0.034 <sup>a</sup>	155.0 (125)	22.5 (91)	*0.041 <sup>b</sup>	121.5 (170)	30.0 (65)	0.093 <sup>b</sup>
	Stromal	145.0 (40)	19.5 (121)	0.065 <sup>b</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Cyto-plasm	Epithelial	156.7 (55.6)	215.0 (65.6)	0.128 <sup>a</sup>	222.5 (159)	280.0 (86)	0.093 <sup>b</sup>	200.0 (86.5)	209.2 (64.2)	0.839 <sup>a</sup>
	Stromal	ND	ND	ND	25.0 (55)	ND	ND	96.7 (54.3)	75.7 (48.4)	0.495 <sup>a</sup>

a Values presented as mean (SD). P value was determined by Student's t test. P values are corrected for ties.

b Values presented as median (interquartil range). P value was determined by Mann-Whitney U test. P values are corrected for ties.

ND = Not detectable

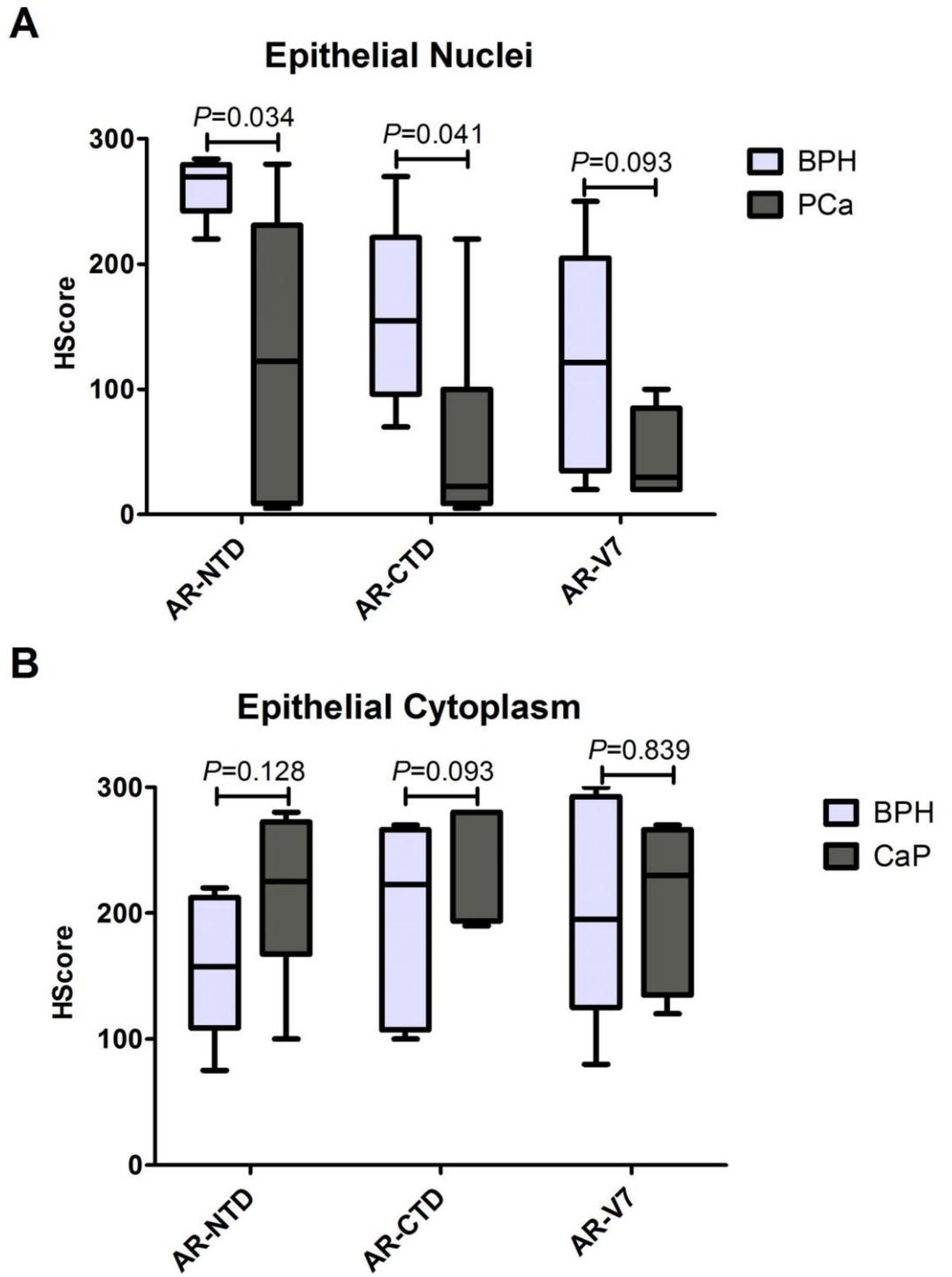
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200613.t004>

BAX was associated with protection of biochemical recurrence (HR = 0.123,  $P = 0.009$ ). These associations remained when these variables were tested together in a multivariable model, (HR = 1.219,  $P = 0.038$ ; and HR = 0.104,  $P = 0.014$ ; respectively).

## Discussion

We investigated the AR-FL expression using an assay specific for transcripts 1 and 2 (GI:349501065 and GI:349501066), which prevents untrue conclusions about differences in AR-FL and AR-V expression. We also analyzed AR-V mRNA, and importantly, we detected the expression of all isoforms in samples from hyperplastic tissue and primary PCa. Truncated AR-Vs were previously assumed to be expressed primarily in CRPC, where, at least for AR-V7, their presence was associated with resistance to therapy [17, 18]. This is a remarkable finding of this work, since we evaluated tissue from hormone-naïve PCa, while others have mostly evaluated advanced cancer, castration-resistant cancer, metastasis sites or even cell lines [5, 8, 9, 11, 12, 17–23]. Our detection of AR-Vs in BPH complements the data reported in the literature, which demonstrate the expression of these isoforms in benign tissue from radical prostatectomy for cancer removal, malignant tissue and metastatic sites [5, 8, 9, 11, 12, 18, 22]. This wide distribution was recently confirmed by a whole transcriptome analysis by The Cancer Genome Atlas (TCGA), which demonstrated that AR-V7 is the most abundant AR-V expressed in human cell lines, human xenografts and clinical samples [21]. Our finding that AR-Vs are expressed in hormone-naïve primary PCa is notable, and is in concordance with the TCGA study [21]. The data of gene expression showed a large range of variation in both groups, which was also observed in previous studies [19]. We also found a correlation among the AR-Vs, which was expected since all isoforms are derived from the same pre-mRNA. The formation of one or other isoform occurs by mechanisms not precisely described until now, but it is expected that the resulting molecules are correlated at least to some level.

Together, our findings suggest that these constitutively active isoforms participate in different proliferative events in different types of prostatic tumors, not only as the main driver of castration resistance. During tumor progression, selection for cells that express AR-Vs could occur, via selection of more malignant or castration-resistant subclones or even via the hormone-dependant regulation of AR isoforms [12]. It has been already demonstrated that AR isoforms show weak expression in androgen-dependent cell lines (LNCaP and LAPC4), while in androgen-independent lines, such as CWR22Rv1 and those derived from LNCaP (C81, C4-2 and C4-2B), the expression of the AR isoforms is significantly higher [5]. These data imply an inverse correlation between AR isoform expression and the dependence of androgens [5]. It has been demonstrated *in vitro* by Watson et al. [12] that AR-FL and AR-V (AR-V1 and



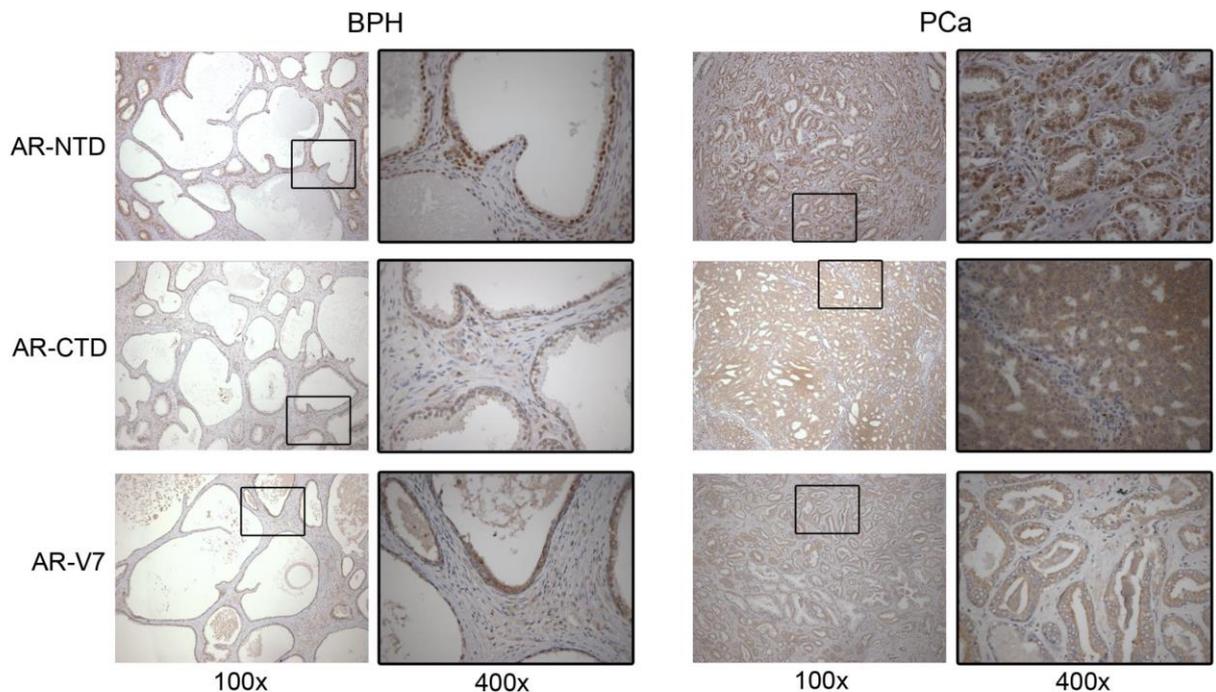
**Fig 2. Histological score for immunohistochemical staining of AR-NTD, AR-CTD, and AR-V7.** A variety of immunohistochemical staining patterns for AR-NTD, AR-CTD and AR-V7 are shown. Epithelial nuclear staining (A) for AR-NTD (PG21) and AR-CTD (C19) are higher in BPH samples than in PCa samples ( $P = 0.034$  and  $P = 0.041$ , respectively). Although BPH group seems to have a higher AR-V7 H-Score, it was not statistically different ( $P = 0.093$ ). Epithelial cytoplasmatic staining (B) was not different between the groups. The bars represent the minimum to maximum values.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200613.g002>

AR-V7) expressions are upregulated by castration, while re-administration of androgens suppressed their expression. In the present study, PCa showed high AR-V1 and AR-V7 expression, while steroid (testosterone, 4-androstenedione, progesterone) expression was decreased (unpublished data).

When the PCa group was stratified into Gleason  $\leq 7(3+4)$  and  $\geq 7(4+3)$ , age was higher in patients with Gleason  $\geq 7(4+3)$ . This indicates that older patients tend to present more aggressive PCa than younger patients. Despite the relatively small cohort number, a greater AR-V expression was seen in PCa samples with a high-grade Gleason score compared to a low-grade Gleason score. AR-V4 and AR-V7rv levels were higher in the high-grade ones. Even without statistical significance, AR-V1 showed a higher distribution in high-grade tumors. In line with these results, we found an inverse correlation between the AR-FL/AR-V4 ratio and the Gleason score, which indicate that AR-V expression increases with higher Gleason scores.

When we stratified PCa cases by whether biochemical relapse occurred or not, we observed a similar expression of all mRNAs analyzed between those patients who had biochemical recurrence and in those who did not present recurrence, which is in concordance with the results reported by Zhao *et al.* [19]. They showed that neither the AR-V7 nor its negative



**Fig 3. Representative images of IHC staining.** 100X and 400X. For H-Score calculation we analyzed all over the slides.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200613.g003>

**Table 5. Correlation coefficients between AR-Vs and clinical features.**

		BPH $r_s$ (P)	PCa $r_s$ (P)
Correlation between AR-Vs			
AR-V1	AR-V4	0.387 (0.035)	0.457 (0.022)
	AR-V7rv	0.394 (0.031)	-
Correlation between AR-Vs and clinical features			
AR-V1	Estimated prostate weight	0.477 (0.025)	-
AR-V4	Estimated prostate weight	0.711 (<0.001)	-
	Gleason	-	0.493 (0.012)
Correlation between ratios and clinical features			
AR-FL/AR-V1	Age at surgery	-0.364 (0.048)	-
AR-FL/AR-V4	Age at surgery	-0.405 (0.027)	-
	Estimated prostate weight	-0.495 (0.019)	-
	Gleason	-	-0.475 (0.016)

Spearman correlation for association between variables. The results are presented as  $r_s$  (P). Values of  $P < 0.05$  were considered statistically significant. Only statistically significant correlations are showed.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200613.t005>

regulator AR-V1 were associated with biochemical recurrence in a cohort of men at indeterminate risk of progression [19].

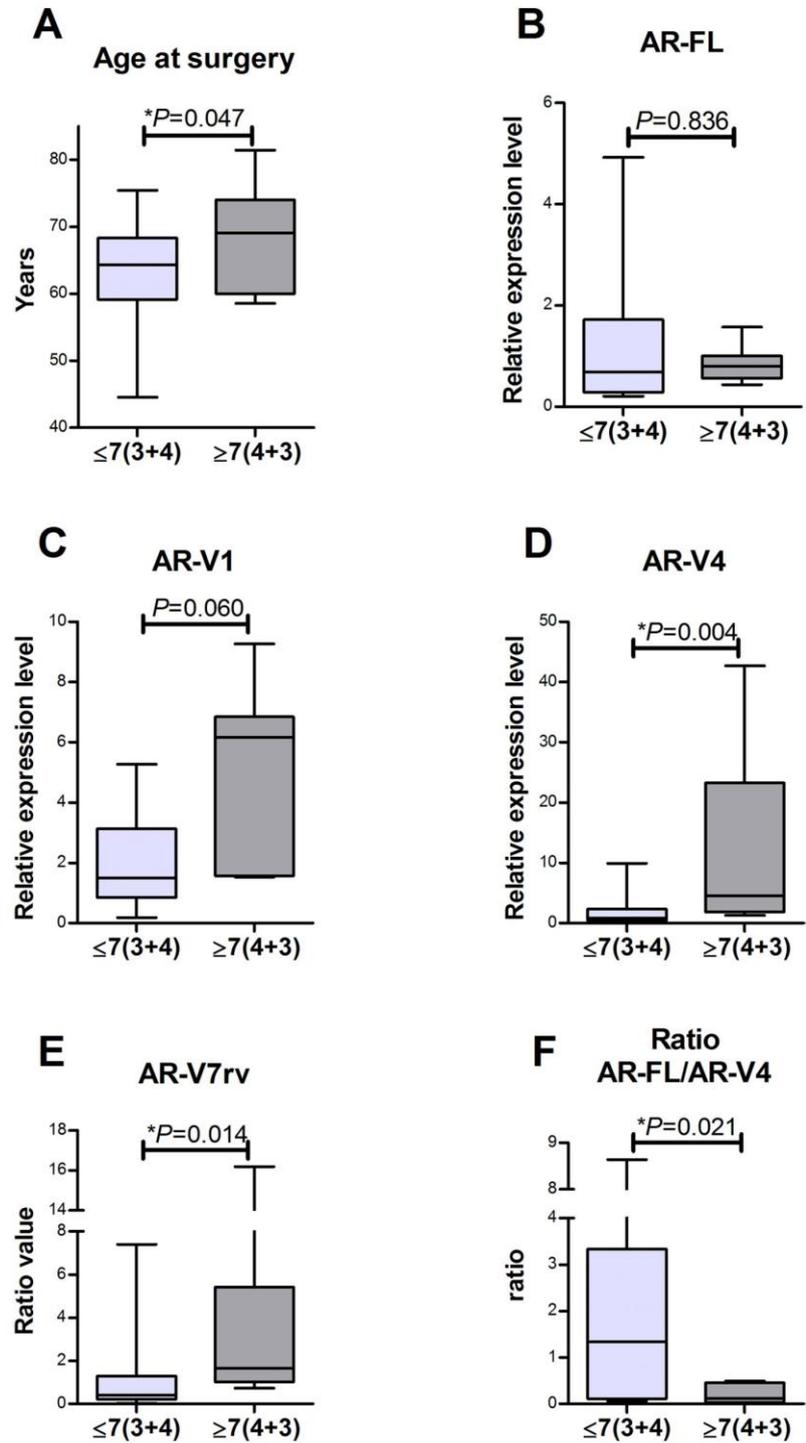
Some studies have reported a positive correlation between AR-V7 and AR-V1 in PCa samples [18, 19], in agreement with our data. Interestingly, Watson *et al.* [12] observed that AR-V1 and AR-V7 co-expression results in complete avoidance of the gain of function conferred by AR-V7, indicating that AR-V1 seems to play a negative role on AR-V7, which was recently confirmed and well discussed by Zhan [14]. The higher expression of AR-V1 in carcinoma samples compared with BPH samples seems to be very promising data, although it must be confirmed with a larger number of patients. AR-V1 blocks the ability of AR-V7 to confer castration-resistant cell growth, and when these isoforms are co-expressed, AR-V7 does not transactivate its targets [14]. AR-V1 has an ability to selectively activate a canonical AR-FL signal. Thus, if both isoforms are expressed in both tissues, with PCa presenting higher levels of

**Table 6. Correlation coefficients between cell cycle-related and apoptosis-related genes and other variables.**

		BPH $r_s$ (P)	PCa $r_s$ (P)
Correlation between cell cycle-related and apoptosis-related genes and AR-Vs			
<i>BCL2</i>	AR-FL	-	0.464 (0.020)
	AR-V7rv	-	0.450 (0.024)
<i>MDM2</i>	AR-FL	-	0.434 (0.030)
	AR-V1	0.422 (0.028)	0.549 (0.004)
Correlation between apoptosis-related genes and ratio			
<i>BCL2</i>	AR-FL/AR-V4	-	0.472 (0.017)
Correlation between cell cycle-related and apoptosis-related genes and clinical features			
<i>TP53</i>	PSA	-	-0.439 (0.025)
<i>BCL2/BAX</i>	Surgical specimen weight	-	-0.413 (0.036)

Spearman correlation for association between variables. The results are presented as  $r_s$  (P). Only statistically significant correlations are showed. Values of  $P < 0.05$  were considered statistically significant.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200613.t006>



**Fig 4. Stratification of PCa samples between Gleason grade ( $\leq 7(3+4)$  and  $\geq 7(4+3)$ ).** (A) Age at surgery. The group low grade ( $\leq 7(3+4)$ ) was younger than the high grade group ( $\geq 7(4+3)$ ) (63 and 68 years, respectively.  $P = 0.047$ ). (B) AR-FL levels were similar between groups ( $P = 0.836$ ). (C) AR-V1 levels failed to reach significance ( $P = 0.060$ ), but seems to be up-regulated in high grade group ( $\geq 7(4+3)$ ). (D) and (E) AR-V4 and AR-V7rv levels are higher in high grade group ( $\geq 7(4+3)$ ) ( $P = 0.004$  and  $P = 0.014$ ). (F) AR-FL/AR-V4 ratio was higher in low grade group ( $\leq 7(3+4)$ ,  $P = 0.021$ ). The bars represent the minimum to maximum values.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200613.g004>

AR-V1, it probably directs the canonical AR signal as the main pathway in primary and androgen-responsive PCa. On the other hand, AR-V4, which is more highly expressed in BPH, transactivates both canonical AR-targets and AR-V-specific targets. To our understanding, this is an interesting finding of our work, since in this benign tissue, both AR-V7 and AR-FL pathways could be activated, showing an absence of a trend to either route. As previously described, advanced and aggressive PCa samples have a higher AR-V7 expression [9, 18], which was confirmed by our work when samples were dichotomized based on their Gleason scores. In this case, it is possible that AR-V7 levels surpass AR-V1 levels, favoring the “AR-V7-pathway”, which was already reported in CRPC and metastasis [5, 8, 9, 11, 12, 18, 20, 23]. The presence, interaction and possible consequences of AR-Vs expression should be taken in consideration also in benign tissue. In summary, BPH have more AR-V4 (which could activate both AR-V7 and AR-FL pathways), primary PCa have more AR-V1 (to activate AR-FL canonical targets and inhibit AR-V7), and CRPC, according to the literature, have more AR-V7 (castration-resistant cell growth driver). Unfortunately, in this work we did not have access to CRPC biopsy samples. In addition, the strong positive correlation between AR-V4 and Gleason score emphasized the role of AR-V4 in PCa progression, which is also indicated by the positive correlation between prostate weight with AR-V1 and AR-V4 expression. In high-grade PCa, AR-V4, which could activate both AR-V canonical-targets and AR-FL canonical-targets, could enable the activation of both sides of the AR pathway, making it possible that the cell takes advantage of both pathways.

The correlation between *BCL2* with AR-FL and AR-V7rv in PCa suggests an association between the AR-mediated pathways and the antiapoptotic process involved in tumor development. Elevation in the level of the *BCL2* protein has been shown to provide protection from apoptosis, and the *BCL2* gene family is implicated in the development of CRPC and resistance to therapy since its expression increases during progression of prostate cancers [24, 25]. These findings corroborate the hypothesis that AR and AR-V7 have a role in the mechanisms of proliferation and apoptosis, and may contribute to cancer progression. *MDM2* was also positively correlated with AR-FL in PCa, and with AR-V1 in PCa and BPH. However, the interactions among AR, AR-Vs and *MDM2* are poorly described. One study suggests that *MDM2* induces AR ubiquitination, promoting its degradation [26]. Therefore, the association between cell cycle-related and apoptosis-related genes and AR-Vs suggests new ways to help understand the development of primary PCa.

We used IHC to investigate protein expression in FFPE samples from BPH and primary PCa. This technique is reliable and widely used in clinical diagnosis. Our approach to detect protein expression was based on three antibodies: AR-NTD (which recognizes AR-FL and AR-Vs), AR-CTD (which recognizes AR-FL) and AR-V7 (specific to this isoform). Using two antibodies against different regions of the AR protein (AR-NTD and AR-CTD), it is possible to successfully show the overall frequency of C-terminal truncated AR-Vs [27]. We observed a wide distribution of the AR-NTD/AR-CTD ratio in epithelial nuclei of PCa samples. This finding suggests the presence of AR-Vs transcripts that lack part or all of the C-terminus, which is in line with previous work [27]. To detect AR-V7, we used a specific antibody against this isoform, rather than the alternative approach to detect all truncated variants suggested by Zhang et al. [27].

We observed considerable heterogeneity in AR staining within samples. Epithelial cells showed positive staining for the three antibodies in both groups. AR-NTD and AR-CTD had a higher H-score (HS) in epithelial nuclei of BPH. AR-NTD was stained less intensively and more heterogeneously in epithelial nuclei and stromal cells of PCa than in BPH, and this is consistent with the report of Miyamoto [28]. AR-V7 showed the same trend, despite it failed to reach statistical significance. It is important to note that this isoform was detected in epithelial cells from BPH and PCa, and in stromal cytoplasm, but at lower levels. In addition, stromal nuclei were positive only for AR-NTD, while stromal cytoplasm was positive for AR-V7. This positive stromal staining is remarkable, due to the importance of stromal AR in the development of normal prostate and BPH, and also in the growth and progression of PCa [29]. Of note, positive staining observed with AR-NTD antibody may reflect the expression of other variants than AR-FL and AR-V7 (like AR-V1, AR-V4).

AR-V7 protein expression was similar between the analyzed groups. Our results differ from Guo [5], whose immunohistochemistry analysis on human prostate tissue revealed higher levels of AR-V7 (AR3) in malignant prostate tissues compared with their benign counterparts. An interesting finding of this author was a remarkable redistribution in AR-V7 cellular localization, showing high nuclear staining in hormone-resistant tumor samples compared with their hormone-naïve counterparts, showing that the nuclear translocation of AR-V7 is significantly increased in hormone-resistant tumors [5]. It is important to note that although our results are different, we demonstrate both AR-FL and AR-V7 expression in epithelial and stromal compartments. Although AR-V7 is truncated after exon 3 and lacks the complete nuclear localization sequence, it has been identified in the nucleus of epithelial cells [5, 16, 20, 23].

For AR action, nuclear import is an essential step. Different AR-Vs have different abilities to translocate to the nucleus. For example, AR-V7 is expressed predominantly in the nucleus when alone, but other isoforms, like AR-V1 and AR-V4, mainly localize in the cytoplasm [14]. As is already known, nuclear import of AR requires the dimerization of the receptor, which is also essential for AR-Vs. AR-V1, V4 and V6 heterodimerize with AR-V7, which facilitates their nuclear localization. These AR-Vs can also heterodimerize with AR-FL (in presence or absence of androgens), but their subcellular localization is not affected in androgen-deprived conditions. When AR-FL is bound to an androgen, the isoforms are piggybacked into the nucleus. This AR-V-AR-FL interaction can mitigate the ability of enzalutamide to inhibit androgen-induced AR-FL nuclear localization [14]. AR-V7 is the most abundant AR-V in clinical specimens, and its role in mediating castration resistance is sustained by clinical evidence. The data presented by Zhan [14] indicates that besides its transcriptional activity, AR-V7 could activate both AR-FL and other AR-Vs, which could be an important mechanism of action. Although many AR-Vs localize mainly in the cytoplasm when expressed alone, their clinical relevance should not be ignored. Since these AR-Vs are expressed together with AR-V7, they could contribute to the development of resistance, possibly adding their functions to the canonical transcriptional program of AR-FL. Nonetheless, this does not mean all AR-Vs have a synergistic action; indeed, AR-V1 could block the capability of AR-V7 to induce castration-resistant proliferation [12, 14].

The use of AR-V7 expression has been proposed as a biomarker for PCa relapse [16, 20] and even as a survival marker [20]. One of the proposed mechanisms of AR-V7 activity is that it could activate AR-FL in the absence of hormones, explaining how cancer cells could use AR-V7 as an escape from therapy [20]. Previous data has suggested that AR-V expression increases as patients progress to malignant prostate adenocarcinoma, being a consequence of therapy and a driver of therapy resistance [5]. In line with this theory, we believe that during the evolution to hormone-independent, metastatic disease, prostate adenocarcinomas may therefore express progressively more AR-Vs. Additionally, these results corroborate evidence

shown in multiple studies from independent laboratories, which demonstrates that AR-V expression correlates with the development of ADT resistance in numerous model systems and clinical samples [5, 8, 11, 14, 17, 18].

However, it is noteworthy that AR-Vs are also expressed in benign tissue from BPH and in primary PCa. All samples used in our research were obtained from patients who had never undergone ADT, so our data do not support the suggestion of variants arising only after therapy, as a response to the treatment. The current idea is that the presence of AR-Vs is also biologically relevant in BPH and primary PCa. In addition, studies to help elucidate the role of AR-Vs in benign tissue and hormone-naïve PCa are needed to better clarify the involvement of these isoforms in the pathophysiology of prostatic tumors.

## Conclusions

These results support the assumption that the constitutively active AR-Vs are involved in the pathophysiology of prostatic tumors. Our data shows that the AR-Vs participate in different proliferative events in prostate cells, yet the exact role of these isoforms in benign tissue and primary cancer needs to be elucidated. The identification and functional characterization of differentially expressed molecules between normal and tumoral tissues are fundamental steps to achieving a better understanding not only of the carcinogenic process and the development of new anti-tumoral strategies, but also a better understanding of the processes that govern proliferation in benign tissues such as BPH. Additional studies aiming to elucidate in vitro hormonal modulation of AR-Vs may contribute to the understanding of their role in prostate physiology and tumor development and progress.

## Supporting information

**S1 Fig. Ratio AR-NTD/AR-CTD in nuclei of epithelial cells.** Distribution of the ratio AR-NTD/AR-CTD in epithelial nuclei of samples from BPH and PCa ( $P = 0.818$ ). (TIF)

**S2 Fig. Kaplan-Meier curve for biochemical recurrence in PCa.** PCa samples were stratified for Gleason score  $\leq 7(3+4)$  and  $\geq 7(4+3)$ . Samples with Gleason  $\geq 7(4+3)$ , time to recurrence was significantly lower (31 months) than samples with Gleason  $\leq 7(3+4)$  (65 months) ( $P = 0.004$ ). (PDF)

**S1 Table. Cox regression between variables.** Ratio AR-V1/AR-FL was associated with a higher risk of biochemical recurrence (HR = 1.172,  $P = 0.045$ ) and *BLC2/BAX* was associated with protection of biochemical recurrence (HR = 0.123,  $P = 0.009$ ). In the multivariable model these associations remained when these variables were tested together (HR = 1.219,  $P = 0.038$ ; and HR = 0.104,  $P = 0.014$ ; respectively). (PDF)

## Acknowledgments

The authors thank to the Urology Service and Experimental Pathology—HCPA for the technical assistance.

## Author Contributions

**Conceptualization:** Ana Caroline Hillebrand, Lolita Schneider Pizzolato, Gisele Branchini, Ilma Simoni Brum.

**Formal analysis:** Ana Caroline Hillebrand, Ilma Simoni Brum.

**Funding acquisition:** Ilma Simoni Brum.

**Investigation:** Ana Caroline Hillebrand, Lolita Schneider Pizzolato.

**Methodology:** Ana Caroline Hillebrand, Lolita Schneider Pizzolato, Gisele Branchini, Ilma Simoni Brum.

**Project administration:** Brasil Silva Neto, Ilma Simoni Brum.

**Resources:** Brasil Silva Neto, Ilma Simoni Brum.

**Supervision:** Gisele Branchini, Ilma Simoni Brum.

**Visualization:** Ana Caroline Hillebrand.

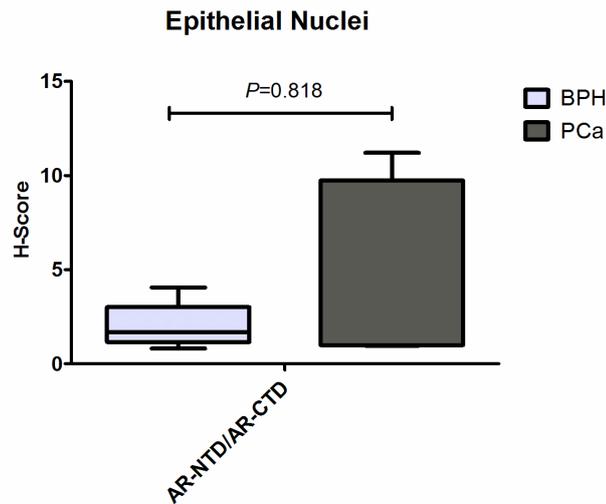
**Writing – original draft:** Ana Caroline Hillebrand.

**Writing – review & editing:** Ana Caroline Hillebrand, Gisele Branchini, Ilma Simoni Brum.

## References

1. INCA. Estimate/2018—Cancer Incidence in Brazil. 2017.
2. Dutt SS, Gao AC. Molecular mechanisms of castration-resistant prostate cancer progression. *Future Oncol.* 2009; 5(9):1403–13. Epub 2009/11/12. <https://doi.org/10.2217/fon.09.117> PMID: 19903068; PubMed Central PMCID: PMC3041149.
3. Grossmann ME, Huang H, Tindall DJ. Androgen receptor signaling in androgen-refractory prostate cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2001; 93(22):1687–97. Epub 2001/11/22. PMID: 11717329.
4. Nacusi LP, Tindall DJ. Androgen receptor abnormalities in castration-recurrent prostate cancer. *Expert Rev Endocrinol Metab.* 2009; 4(5):417–22. Epub 2010/03/17. <https://doi.org/10.1586/eem.09.34> PMID: 20228873; PubMed Central PMCID: PMC2835169.
5. Guo Z, Yang X, Sun F, Jiang R, Linn DE, Chen H, et al. A novel androgen receptor splice variant is up-regulated during prostate cancer progression and promotes androgen depletion-resistant growth. *Cancer Res.* 2009; 69(6):2305–13. Epub 2009/02/27. doi: 0008-5472.CAN-08-3795 [pii] <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-3795> PMID: 19244107; PubMed Central PMCID: PMC2672822.
6. Gelmann EP. Molecular biology of the androgen receptor. *J Clin Oncol.* 2002; 20(13):3001–15. Epub 2002/06/29. <https://doi.org/10.1200/JCO.2002.10.018> PMID: 12089231.
7. Shang Y, Myers M, Brown M. Formation of the androgen receptor transcription complex. *Mol Cell.* 2002; 9(3):601–10. Epub 2002/04/05. doi: S1097276502004719 [pii]. PMID: 11931767.
8. Dehm SM, Schmidt LJ, Heemers HV, Vessella RL, Tindall DJ. Splicing of a novel androgen receptor exon generates a constitutively active androgen receptor that mediates prostate cancer therapy resistance. *Cancer Res.* 2008; 68(13):5469–77. Epub 2008/07/03. doi: 68/13/5469 [pii] <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-0594> PMID: 18593950; PubMed Central PMCID: PMC2663383.
9. Hu R, Dunn TA, Wei S, Isharwal S, Veltri RW, Humphreys E, et al. Ligand-independent androgen receptor variants derived from splicing of cryptic exons signify hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res.* 2009; 69(1):16–22. Epub 2009/01/02. doi: 69/1/16 [pii] <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2764> PMID: 19117982; PubMed Central PMCID: PMC2614301.
10. Hu R, Isaacs WB, Luo J. A snapshot of the expression signature of androgen receptor splicing variants and their distinctive transcriptional activities. *Prostate.* 2011; 71(15):1656–67. Epub 2011/03/30. <https://doi.org/10.1002/pros.21382> PMID: 21446008; PubMed Central PMCID: PMC3360954.
11. Sun S, Sprenger CC, Vessella RL, Haugk K, Soriano K, Mostaghel EA, et al. Castration resistance in human prostate cancer is conferred by a frequently occurring androgen receptor splice variant. *J Clin Invest.* 2010; 120(8):2715–30. Epub 2010/07/21. doi: 41824 [pii] <https://doi.org/10.1172/JCI41824> PMID: 20644256; PubMed Central PMCID: PMC2912187.
12. Watson PA, Chen YF, Balbas MD, Wongvipat J, Succi ND, Viale A, et al. Constitutively active androgen receptor splice variants expressed in castration-resistant prostate cancer require full-length androgen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 107(39):16759–65. Epub 2010/09/09. doi: 1012443107 [pii] <https://doi.org/10.1073/pnas.1012443107> PMID: 20823238; PubMed Central PMCID: PMC2947883.
13. Yamashita S, Lai KP, Chuang KL, Xu D, Miyamoto H, Tochigi T, et al. ASC-J9 suppresses castration-resistant prostate cancer growth through degradation of full-length and splice variant androgen

- receptors. *Neoplasia*. 2012; 14(1):74–83. Epub 2012/02/23. PMID: [22355276](#); PubMed Central PMCID: [PMC3281944](#).
14. Zhan Y, Zhang G, Wang X, Qi Y, Bai S, Li D, et al. Interplay between Cytoplasmic and Nuclear Androgen Receptor Splice Variants Mediates Castration Resistance. *Mol Cancer Res*. 2017; 15(1):59–68. Epub 2016/09/28. doi: [1541-7786.MCR-16-0236](#) [pii] <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-16-0236> PMID: [27671337](#); PubMed Central PMCID: [PMC5215946](#).
  15. Detre S, Saclani Jotti G, Dowsett M. A "quickscore" method for immunohistochemical semiquantitation: validation for oestrogen receptor in breast carcinomas. *J Clin Pathol*. 1995; 48(9):876–8. Epub 1995/09/01. PMID: [7490328](#); PubMed Central PMCID: [PMC502883](#).
  16. Welti J, Rodrigues DN, Sharp A, Sun S, Lorente D, Riisnaes R, et al. Analytical Validation and Clinical Qualification of a New Immunohistochemical Assay for Androgen Receptor Splice Variant-7 Protein Expression in Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer. *Eur Urol*. 2016; 70(4):599–608. Epub 2016/04/28. doi: [S0302-2838\(16\)30027-6](#) [pii] <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2016.03.049> PMID: [27117751](#); PubMed Central PMCID: [PMC5015575](#).
  17. Antonarakis ES, Lu C, Wang H, Lubner B, Nakazawa M, Roeser JC, et al. AR-V7 and resistance to enzalutamide and abiraterone in prostate cancer. *N Engl J Med*. 2014; 371(11):1028–38. Epub 2014/09/04. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1315815> PMID: [25184630](#); PubMed Central PMCID: [PMC4201502](#).
  18. Hornberg E, Ylitalo EB, Crnalic S, Antti H, Stattin P, Widmark A, et al. Expression of androgen receptor splice variants in prostate cancer bone metastases is associated with castration-resistance and short survival. *PLoS One*. 2011; 6(4):e19059. Epub 2011/05/10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019059> PMID: [21552559](#); PubMed Central PMCID: [PMC3084247](#).
  19. Zhao H, Coram MA, Nolley R, Reese SW, Young SR, Peehl DM. Transcript levels of androgen receptor variant AR-V1 or AR-V7 do not predict recurrence in patients with prostate cancer at indeterminate risk for progression. *J Urol*. 2012; 188(6):2158–64. Epub 2012/10/24. doi: [S0022-5347\(12\)04451-5](#) [pii] <https://doi.org/10.1016/j.juro.2012.08.014> PMID: [23088973](#).
  20. Qu Y, Dai B, Ye D, Kong Y, Chang K, Jia Z, et al. Constitutively active AR-V7 plays an essential role in the development and progression of castration-resistant prostate cancer. *Sci Rep*. 2015; 5:7654. Epub 2015/01/08. doi: [srep07654](#) [pii] <https://doi.org/10.1038/srep07654> PMID: [25563505](#); PubMed Central PMCID: [PMC4288210](#).
  21. The Molecular Taxonomy of Primary Prostate Cancer. *Cell*. 2015; 163(4):1011–25. Epub 2015/11/07. doi: [S0092-8674\(15\)01339-2](#) [pii] <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.025> PMID: [26544944](#); PubMed Central PMCID: [PMC4695400](#).
  22. Marcias G, Erdmann E, Lapouge G, Siebert C, Barthelemy P, Duclos B, et al. Identification of novel truncated androgen receptor (AR) mutants including unreported pre-mRNA splicing variants in the 22Rv1 hormone-refractory prostate cancer (PCA) cell line. *Hum Mutat*. 2010; 31(1):74–80. Epub 2009/10/16. <https://doi.org/10.1002/humu.21138> PMID: [19830810](#).
  23. Scher HI, Graf RP, Schreiber NA, McLaughlin B, Lu D, Louw J, et al. Nuclear-specific AR-V7 Protein Localization is Necessary to Guide Treatment Selection in Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer. *Eur Urol*. 2016. Epub 2016/12/17. doi: [S0302-2838\(16\)30857-0](#) [pii] <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2016.11.024> PMID: [27979426](#).
  24. Amirghofran Z, Monabati A, Gholijani N. Androgen receptor expression in relation to apoptosis and the expression of cell cycle related proteins in prostate cancer. *Pathol Oncol Res*. 2004; 10(1):37–41. Epub 2004/03/19. doi: [PAOR.2004.10.1.0037](#). PMID: [15029260](#).
  25. Krajewska M, Krajewski S, Epstein JI, Shabaik A, Sauvageot J, Song K, et al. Immunohistochemical analysis of bcl-2, bax, bcl-X, and mcl-1 expression in prostate cancers. *Am J Pathol*. 1996; 148(5):1567–76. Epub 1996/05/01. PMID: [8623925](#); PubMed Central PMCID: [PMC1861561](#).
  26. Lin HK, Wang L, Hu YC, Altuwajiri S, Chang C. Phosphorylation-dependent ubiquitylation and degradation of androgen receptor by Akt require Mdm2 E3 ligase. *EMBO J*. 2002; 21(15):4037–48. Epub 2002/07/30. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf406> PMID: [12145204](#); PubMed Central PMCID: [PMC126152](#).
  27. Zhang X, Morrissey C, Sun S, Ketchandji M, Nelson PS, True LD, et al. Androgen receptor variants occur frequently in castration resistant prostate cancer metastases. *PLoS One*. 2011; 6(11):e27970. Epub 2011/11/25. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027970> PONE-D-11-11283 [pii]. PMID: [22114732](#); PubMed Central PMCID: [PMC3219707](#).
  28. Miyamoto KK, McSherry SA, Dent GA, Sar M, Wilson EM, French FS, et al. Immunohistochemistry of the androgen receptor in human benign and malignant prostate tissue. *J Urol*. 1993; 149(5):1015–9. Epub 1993/05/01. PMID: [7683339](#).
  29. Kruslin B, Ulamec M, Tomas D. Prostate cancer stroma: an important factor in cancer growth and progression. *Bosn J Basic Med Sci*. 2015; 15(2):1–8. Epub 2015/06/05. <https://doi.org/10.17305/bjbm.2015.449> PMID: [26042506](#); PubMed Central PMCID: [PMC4469930](#).



**S1 Fig. Ratio AR-NTD/AR-CTD in nuclei of epithelial cells.** Distribution of the ratio AR-NTD/AR-CTD in epithelial nuclei of samples from BPH and PCa (P=0.818).

S1Table. Cox regression between variables.												
COX Regression - Modelling												
	Univariable				Multivariable1			Multivariable2				
	HR	CI 95%		P	HR	CI 95%		P	HR	CI 95%		P
AR-FL	0,838	0,406	1,728	0.632								
AR-V1	1,205	0,943	1,539	0.137	1,359	1,056	1,748	0.017				
AR-V4	1,008	0,942	1,078	0.827								
AR-V7rv	0,907	0,703	1,169	0.450								
AR-V4V7	1,045	0,837	1,305	0.699								
AR-FL/AR-V1	0,403	0,095	1,699	0.216								
AR-FL/AR-V4	0,833	0,573	1,211	0.339								
AR-FL/AR-V7	0,417	0,082	2,125	0.293								
AR-V7/AR-FL	1,006	0,91	1,113	0.901								
AR-V7/AR-V1	0,461	0,185	1,147	0.096								
AR-V4/AR-FL	1,006	0,946	1,07	0.846								
AR-V4/AR-V1	0,968	0,799	1,174	0.742								
AR-V4/AR-V7	1,015	0,858	1,202	0.861								
AR-V1/AR-FL	1,172	1,003	1,369	0.045					1,219	1,011	1,469	0.038
AR-V1/AR-V4	0,949	0,718	1,255	0.714								
AR-V1/AR-V7	0,996	0,509	1,948	0.991								
BAX	1,114	0,892	1,391	0.341								
BCL2	0,629	0,329	1,2	0.159	0,632	0,329	1,216	0.169				
BCL2/BAX	0,123	0,025	0,591	0.009					0,104	0,017	0,629	0.014
TP53	1,119	0,912	1,374	0.282								
CDKN1A	0,842	0,596	1,19	0.329								
MDM2	1,003	0,912	1,104	0.945								

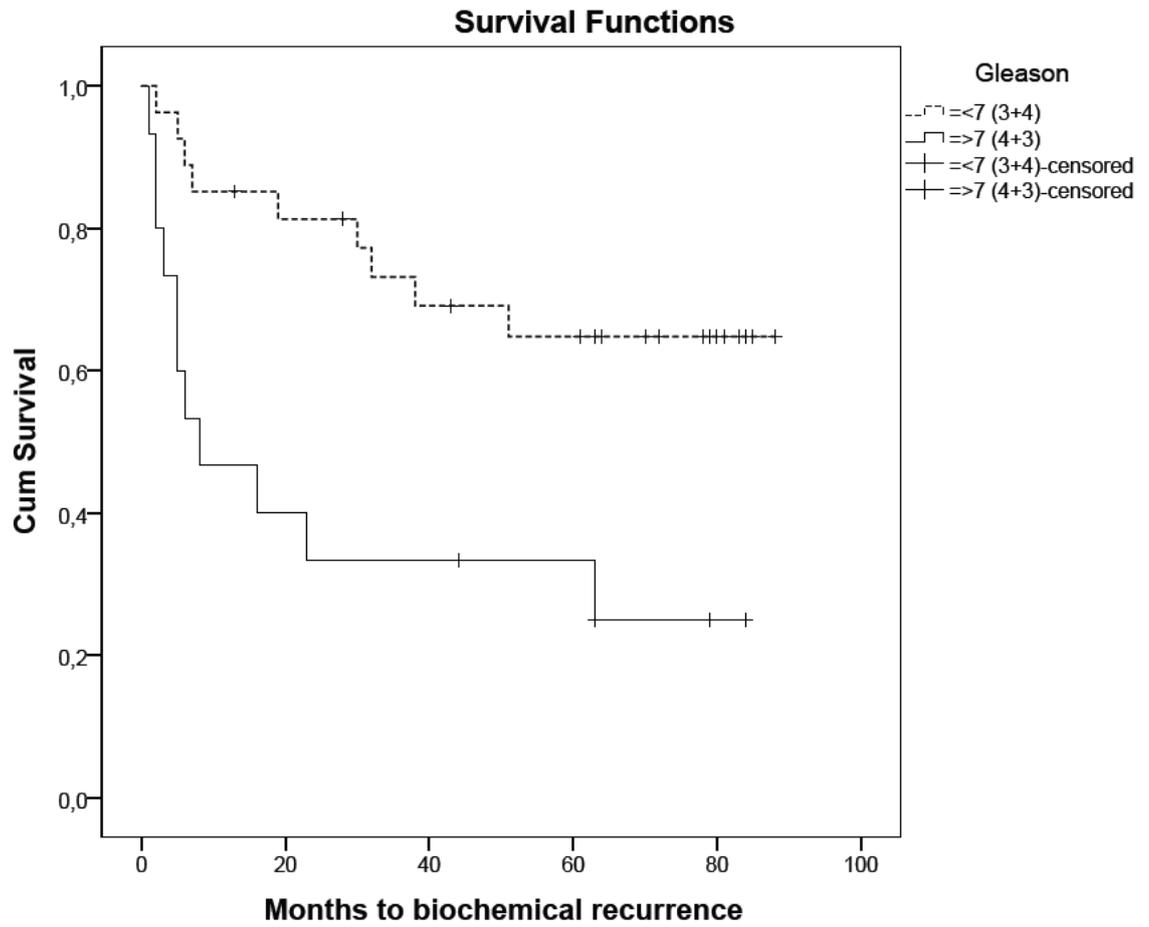
Outcome: Time to relapse

Adjusted by age.

Multivariable 1: variables AR-V1 and BCL2 adjusted by age.

Multivariable 2: ratios AR-V1/AR-FL and BCL2/BAX adjusted by age.

**S1 Table. Cox regression between variables.** Ratio AR-V1/AR-FL was associated with a higher risk of biochemical recurrence (HR=1.172, P=0.045) and BCL2/BAX was associated with protection of biochemical recurrence (HR=0.123, P=0.009). In the multivariable model these associations remained when these variables were tested together (HR=1.219, P=0.038; and HR=0.104, P=0.014; respectively).



**S2 Fig. Kaplan-Meier curve for biochemical recurrence in PCa.** PCa samples were stratified for Gleason score  $\le 7$ (3+4) and  $\ge 7$ (4+3). Samples with Gleason  $\ge 7$ (4+3), time to recurrence was significantly lower (31 months) than samples with Gleason  $\le 7$ (3+4) (65 months) ( $P=0.004$ ).

**Capítulo III -**

**Estudo *in vitro* da modulação androgênica das AR-Vs**

Artigo: “*Androgenic modulation of AR-Vs*”

Status: Artigo publicado na revista *Endocrine*, p. 1-10, 2018.

DOI 10.1007/s12020-018-1682-5



## Androgenic modulation of AR-Vs

Ana Caroline Hillebrand<sup>1</sup> · Lolita Schneider Pizzolato<sup>1</sup> · Gisele Branchini<sup>2</sup> · Ilma Simoni Brum<sup>1,3</sup>Received: 13 March 2018 / Accepted: 9 July 2018  
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2018

### Abstract

**Purpose** The importance of androgen receptor variants (AR-Vs) is recognized in prostate cancer. AR-Vs have been the focus of many studies. Expression of AR-Vs has been proposed as a biomarker for resistance to androgen deprivation therapy for metastatic disease. Herein, we show dynamic changes in AR-Vs expression in response to androgen modulation. **Methods** The C4-2B cell line was exposed to low ( $10^{-13}$  M) and high ( $10^{-8}$  M) androgen (dihydrotestosterone, DHT) levels, with or without flutamide. mRNA and protein expression levels were assessed by qPCR and immunohistochemistry, respectively.

**Results** We demonstrated that high levels of DHT downregulate AR-FL and AR-Vs. Even though AR-Vs did not present ligand-binding domain, thus were not capable of binding to DHT, they present dynamic changes under androgen treatment. Treatment with flutamide alone or in association with low levels of DHT stimulates growth of prostatic cells.

**Conclusions** Importantly, we provide evidence that AR-Vs respond differently to androgenic modulation. These findings have implications for a better understanding of the role of AR-Vs in prostate carcinogenesis.

**Keywords** Androgen receptor · Androgen receptor variants · Androgen receptor isoforms · Prostate cancer · Androgenic modulation · Steroids

### Introduction

Androgens are a class of sex steroid hormones that stimulate and control development and maintenance of many male characteristics, including growth and function of the

prostate gland and exert their role through the androgen receptor (AR) [1]. Dihydrotestosterone (DHT) is the primary effector and is converted from testosterone (T) by the enzyme 5- $\alpha$  reductase [1]. The hormone-receptor complex is biologically active, being translocated to the nucleus, where it can bind to DNA and modulate gene expression [2].

After Huggings and Hodges' demonstration of the benefit of androgen deprivation therapy (ADT) in men with advanced prostate cancer (PCa) [3], the main therapy for those patients was to reduce androgens, either by surgical or chemical castration. After a period of initial remission, accompanied with undetectable levels of androgens, tumors eventually relapse and progress to a stage named castration-resistant prostate cancer (CRPC), which is accompanied by poor outcome and high lethality. Many mechanisms have been suggested to drive this proliferation, including intracrine synthesis of androgens, molecular changes in AR and expression of constitutively active AR variants (AR-Vs) [4–9]. These findings suggest that cancer cells escape ADT in order to maintain proliferation and survive in this “non-favorable” environment.

During this transition from a hormone-sensitive to a castration-resistant state, the upregulation of AR expression

**Electronic supplementary material** The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s12020-018-1682-5>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Ilma Simoni Brum  
ilma@ufrgs.br

- <sup>1</sup> Laboratory of Molecular Endocrine and Tumoral Biology, Department of Physiology, Institute of Basic Sciences of Health, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul 90050-170, Brazil
- <sup>2</sup> Department of Basic Sciences of Health, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul 90050-170, Brazil
- <sup>3</sup> Laboratory of Molecular Obstetrics and Gynecology, Experimental Research Center, Department of Obstetrics and Gynecology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul 90035-903, Brazil

Published online: 19 July 2018

Springer

**Table 1** Primers and probes sequences for AR-Vs amplification

mRNA	Sense	Antisense	Probe
AR-V1	5'-AGGGTGTGGAGTCTCAGA-3'	5'-CCAGGAATGAATCATCTACAAA-3'	5'-TTCCTTAAAGACTACCTTCAGACTC-3'
AR-V4	5'-GACACTAACCCCAAGCCATAC-3'	5'-ACTGTCTGATGTTGCTCTGTG-3'	5'-TTGTTTTCTGTCAGTCCCATGGTGC-3'
AR-V4V7	5'-CTCTTGATTGCTGACTCCCTC-3'	5'-ACAACTACATGAGTGGAACCA-3'	5'-AGGTAGGAAAACACTATTGGTCCCGC-3'

and production of ligand-independent AR-Vs in response to low-serum androgens are notable events [6]. As already demonstrated by Guo [7], there is an inverse correlation between expression of AR-Vs and androgen dependency of androgen-dependent cell lines (LAPC4 and LNCaP). This inverse correlation between AR-Vs expression and the dependence on androgens has already been demonstrated in vitro [9, 10], where expression of AR-full length (AR-FL) and AR-Vs (AR-V1 and AR-V7) are upregulated by castration, while re-administration of androgens suppressed their expression. The paradoxical ability of supraphysiologic androgen levels to inhibit prostate cancer growth encouraged the development of a series of prospective studies on this topic. The upregulation of AR expression together with the inhibition of cell growth by high levels of androgens suggests a therapeutic liability. A recently suggested therapeutic strategy for CRPC is the exposure to supraphysiologic T levels to promote CRPC cell death, cycling from supraphysiologic to near-castrate serum T levels, an approach termed bipolar androgen therapy (BAT) [11, 12]. In a Phase II study published by Deanmeade et al. [13], all AR-V7 positive patients who received BAT became AR-V7 negative.

In the present work, we investigated the androgenic modulation of AR-Vs expression to provide a better understanding of the molecular regulation of those variants.

## Material and methods

### Cell culture

C4-2B human prostatic adenocarcinoma cell line (MD Anderson Cancer Center, Texas, USA) was grown in RPMI 1640 medium (Gibco by Life Technologies™, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco by Life Technologies™, USA) and 1% Penicillin-Streptomycin (Gibco by Life Technologies™, USA), and was maintained at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. The experimental conditions included: (a) DHT 10<sup>-8</sup> M group; (b) DHT 10<sup>-8</sup> M + flutamide (FLU) 10<sup>-6</sup> M group; (c) DHT 10<sup>-13</sup> M group; (d) DHT 10<sup>-13</sup> M + FLU 10<sup>-6</sup> M group; (e) FLU 10<sup>-6</sup> M group; and (f) control group (medium plus vehicle, ethanol- ETOH). All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (Millipore Sigma, Germany). Charcoal-stripped FBS was used to supplement the

medium for the treatments and medium change was performed every 2 days.

### Cell growth assay

To assess the relative cell growth ability of C4-2B in the different conditions, we performed the sulforhodamine B (SRB) assay [14]. The cells were seeded into 24-well plates at a density of 1000 cells/well in 500 μL drug-free medium overnight. Twenty-four hours later, the cells were treated with the previously described treatments for 3, 6, and 9 days. Then, the medium was switched to 500 μL drug-free medium plus 100 μL of 50% trichloroacetic acid and incubated at 4 °C for 1 h. After being washed and dried, cells were incubated with 200 μL of SRB (0.4% in 1% acetic acid) solution at room temperature for 25 min. Wells were washed with 1% acetic acid to remove unbound dye. Two-hundred microliters of 10 mM Tris were added in each well before mixing on an orbital shaker for 10 min at room temperature. The optical density (OD) was measured at 510 nm by a microplate reader (AnthosZenyth 200rt; Biochrom, UK). Each experiment was performed in quadruplicate.

### RNA extraction and real-time quantitative reverse transcription-PCR

RNA was isolated using TRIzol reagent (Invitrogen, USA), according to the manufacturer's manual. RNA concentrations were quantified using a spectrophotometer (NanoDrop 2000, ThermoFisher). Five-hundred nanograms of RNA were reversed transcribed with GoScript Reverse Transcription System (Promega, USA) in a total volume of 20 μL. Molecular analysis was performed by quantitative PCR (qPCR), with a TaqMan® probe detection system (Applied Biosystems by Life Technologies™, UK) using samples diluted 1:5. qPCR reactions were done in StepOnePlus (Life Technologies™, USA). For amplification of *B2m* and *AR*, inventoried assays from Applied Biosystems™ (USA) were used (Hs00171172\_m1 and Hs00984230\_m1, respectively). Primers and probes sequence for AR-Vs amplification are shown in Table 1. Most of the published methods for AR-V7 detection by qPCR use primers that anneals non-specifically to AR-V7. Recent methods targeted the CE3 sequence, which is also compromised by the presence of this target in AR-V9,

another AR-V that shares the same CE3 sequence [15, 16]. Therefore, this lack of specificity stimulated us to search for a different method. *AR-V7* expression was assessed using the ratio *AR-V4V7/AR-V4*, being represented as *AR-V7rv* (representative value). To assess changes in gene expression,  $\Delta\Delta\text{Ct}$  method was performed [17]. All qPCR experiments were performed in duplicate, and the housekeeping gene *B2m* was used as an endogenous control.

### Immunofluorescence and confocal microscopy

AR subcellular localization was detected by confocal fluorescence microscopy. Cells were grown on glass coverslips coated with laminin (L2020, Sigma-Aldrich, Germany) with the previously described treatments. C4-2B cells were fixed with 4% paraformaldehyde, permeabilized with 0.5% Triton X-100 in Phosphate-buffered saline (PBS) for 30 min at room temperature and blocked with 1 × PBS containing 1% bovine serum albumin (BSA) and 2% Tween-20 for 30 min at room temperature. Cells were incubated overnight at 4 °C with AR C-19 diluted 1:100 or *AR-V7* diluted 1:200 in PBS. Unbound primary antibody was removed by PBS washes, and incubated with fluorescently conjugated secondary antibodies, AlexaFluor™ anti-mouse 488 (A11029, Life Technologies, USA) and AlexaFluor™ anti-rabbit 555 (A21429, Life Technologies, USA) diluted 1:500. Slides were washed with PBS and mounted with Fluoroshield with DAPI (Abcam, USA). Confocal images were obtained by using a confocal laser scanning microscope (Olympus Fluoview FV1000, USA) system with a 60 × oil-immersion objective on a Z-stage. Images of control and experimental cells were acquired under identical exposure conditions for comparative analysis.

In order to analyze nuclei or cytoplasm localization of AR-FL or *AR-V7*, confocal images of cells stained for nuclei (DAPI), AR-FL and *AR-V7* were processed using the function “Image Calculator” of the software ImageJ [18]. A region of interest was selected for each image: for cytoplasm localization, the nuclei channel was subtracted of the channels for AR-FL or *AR-V7* staining using the operation “subtract”; for nuclei localization, it was used in the operation “AND” for the channels for nuclei and AR-FL or *AR-V7* channels. Then, the resulting images were processed using the command “Threshold” in order to automatically select the resulting fluorescence signal, followed by the command “Analyze Particles” in order to select and measure the area of all stained elements.

### Statistical analysis

Quantitative data are represented as the mean ± standard error. For multiple group comparisons, SPSS version 20

(IBM SPSS, Armonk, NY, USA) was used to perform a generalized estimating equation (GEE) followed by Bonferroni post-hoc test. Treatments effects with a *P*-value of < 0.05 were considered significant.

## Results

### Androgenic modulation of AR-Vs mRNA

To assess the possible effects of DHT on mRNA expression of *AR-Vs* in C4-2B cells, time course experiments were performed (Fig. 1). The C4-2B cell line was chosen as the model for further investigations based on the finding that it expresses detectable levels of *AR-Vs* [7, 19].

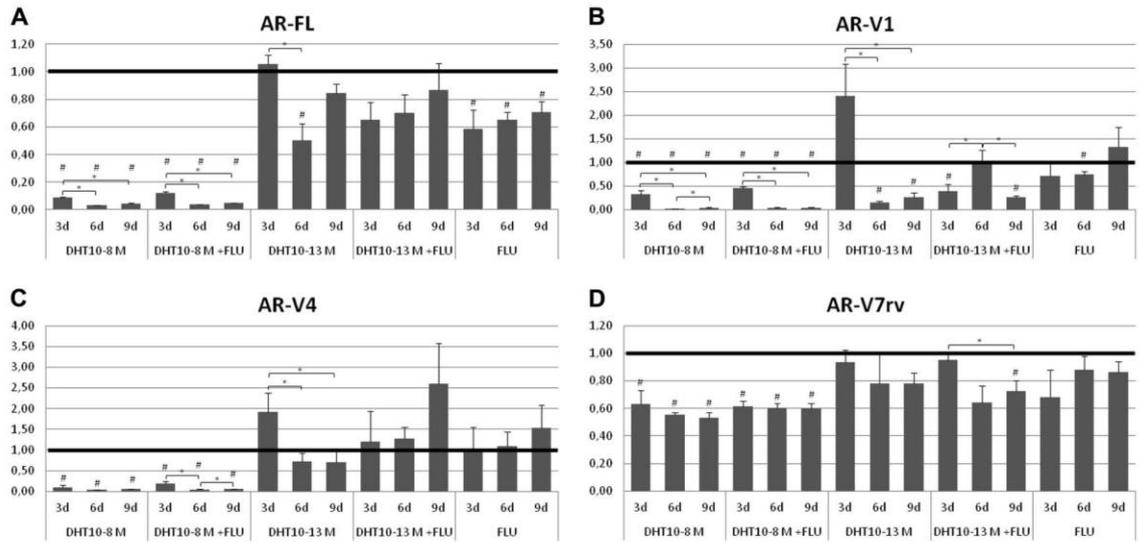
High-dose DHT ( $10^{-8}$  M) suppressed expression of *AR-FL*, *AR-V1*, *AR-V4*, and *AR-V7rv* mRNA during treatment, which was not reversed by addition of flutamide.

Low-dose DHT ( $10^{-13}$  M) did not significantly modify *AR-FL* mRNA when compared to control, but it presented an interesting biphasic behavior—decreased from day 3 to 6, and then increased from day 6 to 9, which did not occur when the AR antagonist (flutamide) was co-administered. This dose induced a decrease of *AR-V1* mRNA expression over time being significantly lower than control. When co-administered with flutamide, we observed a biphasic response of *AR-V1* mRNA. This association induced an increase of *AR-V1* mRNA on the 6th day, which did not persist until day 9. *AR-V4* mRNA expression under DHT  $10^{-13}$  M treatment has increased at 3rd day and then decreased significantly at 6th and 9th days, but the overall expression was not different from control. Addition of flutamide to low-dose DHT seems to increase *AR-V4* mRNA expression. *AR-V7rv* levels were downregulated by association of DHT  $10^{-13}$  M and flutamide only at the 9th day of treatment.

The treatment with flutamide alone was just able to decrease the mRNA levels of *AR-FL*, presenting no effect on *AR-Vs* mRNA expression over time.

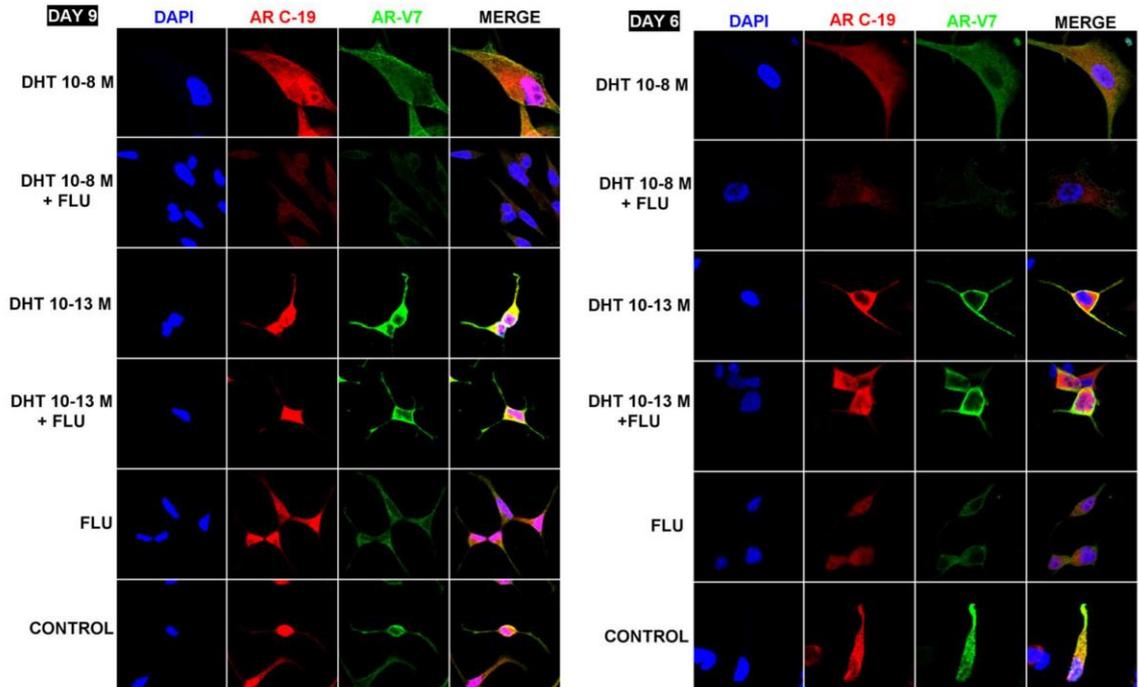
### Androgenic modulation of AR-Vs protein

To assess the effect of DHT on cellular localization of AR and *AR-V7*, the only isoform with a specific antibody commercially available, we performed immunofluorescent staining of C4-2B cells. For AR staining, the antibody used (C-19) recognizes the C-terminal domain of the receptor, in order to detect AR-FL but not *AR-Vs*, which lose the ligand-binding domain (LBD) [20]. As shown in Fig. 2, we were able to detect both *AR-V7* and AR-FL in C4-2B cell line. In sequence, we describe the effect of two different concentrations of DHT, with or without the AR antagonist flutamide, on modulation of the cytoplasm-nucleus transition of the receptor and its isoforms over time.



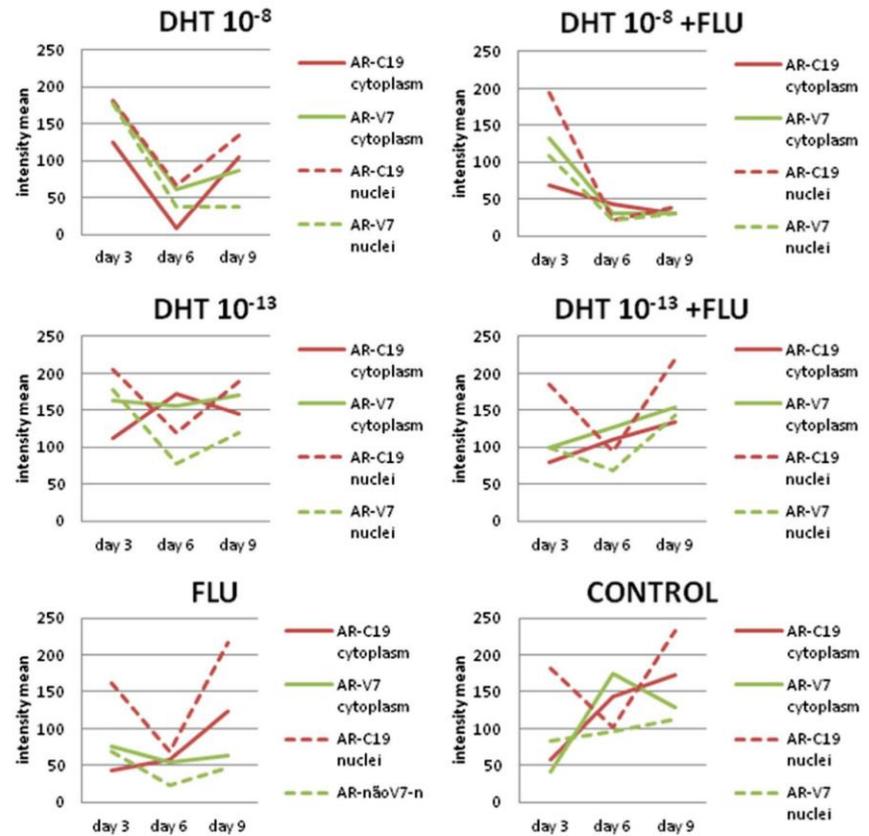
**Fig. 1** mRNA expression of *AR-FL* (a), *AR-V1* (b), *AR-V4* (c), and *AR-V7rv* (d) in response to treatment. Significant differences between days of treatment are indicated by asterisk (\* $P < 0.05$ ) and significant differences between treatments and control are indicated by hashtag (#,  $P$

$< 0.05$ ).  $P$ -values were obtained using GEE followed by Bonferroni. Control group results were considered as 1 and are represented as a bold line in the graphs. Statistically significant variations between treatments were as follows



**Fig. 2** Androgenic modulation of AR-Vs protein expression in C4-2B cells. Immunofluorescent images showing dynamic changes in the presence of DHT ( $10^{-8}$  M and  $10^{-13}$  M) alone or with flutamide. DAPI, 40,6-diamidino-2-phenylindole

**Fig. 3** Schematic representation of dynamic changes in cellular localization of AR-FL and AR-V7 under androgenic treatment (DHT  $10^{-8}$  M and  $10^{-13}$  M, alone or with flutamide). Nuclei and cytoplasm localization were analyzed using the function "Image Calculator" of the ImageJ software (see Materials and Methods). Stained elements were measured by the command "Analyze Particles"



As shown in Figs. 2 and 3, DHT  $10^{-8}$  M downregulated AR-FL and AR-V7 protein expression over time. This effect was intensified when flutamide was associated to DHT  $10^{-8}$  M. Initially, AR-V7 and AR-FL proteins were detected both in nuclei and cytoplasm of C4-2B cells. At the 6th day of treatment, we observed a negative modulation of DHT  $10^{-8}$  M on nuclear and cytoplasmic expression of AR-FL and AR-V7. This effect is maintained with the presence of flutamide. DHT  $10^{-8}$  M alone was able to maintain its negative modulation on AR-V7 expression until the 9th day of treatment, but was not able to retain AR-FL in the cytoplasm until this time, when we detected AR-FL in the nuclei of C4-2B cells. When administered with flutamide, DHT  $10^{-8}$  M was able to retain both AR-FL and AR-V7 to the cytoplasm after the 6th day of treatment, downregulating the overall protein expression of AR-FL and AR-V7, and prevented all dynamic changes on its cellular localization over time.

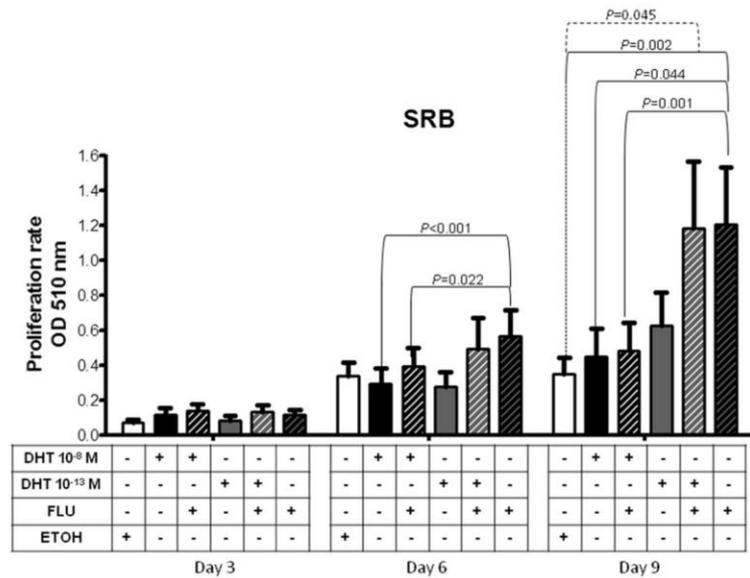
Under DHT  $10^{-13}$  M, at the 3rd day of treatment, AR-FL and AR-V7 were present in cytoplasm and in nuclei, which was similar in the presence of flutamide. On the 6th day of

treatment, both treatments retained AR-V7 and AR-FL in the cytoplasm. On the 9th day of treatment, AR-V7 was detected with higher intensity in the cytoplasm, although AR-FL was faintly detected in the nuclei of C4-2B cells. Interestingly, we observed a curious AR-V7 staining at the border of the nucleus.

When we analyzed cells treated only with flutamide, on the 3rd day of treatment we observed a strong AR-FL staining in the nucleus, which was downregulated on the 6th day, but reversed on the 9th day of treatment. In this condition, AR-V7 levels were minimal over time and showed no major modification.

To test if our results were cell line-dependent, we evaluated also LNCaP cells, which gave rise to C4-2B cells but presented an androgen-dependent behavior and expressed AR-Vs [21]. In LNCaP cells, DHT  $10^{-8}$  M negatively modulated the nuclear expression of AR-FL and AR-V7 (Online Resource). When administered with flutamide, cytoplasmic levels of AR-FL and AR-V7, and nuclear levels of AR-FL were upregulated. This association seems to inhibit only AR-V7 nuclear expression.

**Fig. 4** Cell growth of C4-2B cells after treatment of DHT associated or not with flutamide. Cell proliferation was measured according to SRB assay (see materials and methods). The bar graphs show mean values  $\pm$  SD averaged from four experiments. *P*-values were obtained using GEE followed by Bonferroni



### Hormone effects on cellular growth

We also analyzed cell growth of C4-2B cells under different treatments (Fig. 4). The dose of DHT  $10^{-8}$  M did not modify cellular growth of C4-2B during the time course of the experiment. As expected, the lower DHT dose ( $10^{-13}$  M) presented a proliferative effect enhancing proliferation in almost 80% when compared to control in the 9th day, although did not reach statistical significance ( $P > 0.05$ ). The association of DHT  $10^{-13}$  M to flutamide improved this proliferative effect (239.3%,  $P = 0.045$ ). This effect was also observed in administration of flutamide alone (245.2%,  $P = 0.002$ ).

### Discussion

It is widely accepted that androgens play a central role in the biology of the prostate. Indeed, the balance between androgen-induced cell proliferation and apoptosis is thought to be a major regulator of growth in both normal and cancerous prostate. However, the relationship between total T levels and PCa is controversial. For years, it was believed that T was a direct cause of PCa. Although the development of PCa is androgen-dependent, the incidence of PCa actually increases as systemic androgen levels decline with age. Even though some studies have found a correlation between increased cancer growth and higher levels of circulating free T [22, 23], suggesting that clinically low levels of free T may be protective against PCa, other independent groups have found an opposite

association [24, 25]. Recent studies demonstrated that low levels of free and total serum T are associated with an increased risk of high-grade PCa, being associated with aggressive PCa and predicting poor PCa-specific survival [26–28]. Early data from previous works demonstrated decreased tissue levels of DHT in castration-resistant PCa when compared to benign prostatic hyperplasia (BPH) [4, 29], and lower levels of T were also associated with reduced risk of BPH [28, 30]. Nevertheless, taken together, these results do not support the hypothesis that androgens are a direct cause of PCa development and growth. While it is well established that castration causes PCa regression, the assumption that high T levels cause PCa is not supported [24].

Xu et al. [31] proposed a model supposing that as T levels fall below a threshold, prostatic cells reach the limit of their compensatory capabilities, thus impairing adaption to lower levels of T and, finally, triggering the prostatic carcinogenesis process. By this process, prostate cells adjust themselves to progressively declining androgen levels. In such way, one interpretation is that rising AR-Vs expression could be, at least in part, a compensatory mechanism to lower levels of androgens conferring an advantage to this “non-favorable” milieu in PCa cells. The relationship between DHT levels and disease-free survival was already demonstrated by Geller et al. [32]. AR-Vs expression is related to PCa relapse and, consequently, to shorter disease-free survival. As demonstrated by Chan et al. [33], truncated AR-Vs display a constitutive, basal level of nuclear localization that is sufficient for ligand-independent transcriptional activity. They also demonstrated that signals that are

critical for the regulatory cycle of the AR-FL appear to be dispensable for AR-Vs.

AR-Vs show weak expression in androgen-dependent cell lines, while in androgen-independent lines, such as CWR22Rv1 and C4-2B, expression of AR-Vs is significantly higher, which implies an inverse correlation between AR-V expression and the dependence of androgens [7]. As demonstrated in vitro by Watson et al. [9], AR-FL and AR-Vs (AR-V1 and AR-V7) expressions are upregulated by castration, while re-administration of androgens suppressed their expression, which is in agreement with our observation of an inverse relationship between androgens and AR-Vs. Our recent results demonstrated that PCa showed high AR-V1 and AR-V7 expression, while androgens levels are decreased, as presented by previous works [4, 29]. We supposed that when androgen levels decrease, all processes involved with hormone-receptor pathways may be altered. We observed interesting dynamic changes in AR-Vs expression in response to androgens levels in cell culture. We, therefore, focus the discussion below on the course of each target (AR-FL and their variants) in response to treatment over the time.

We observed an inverse relationship between high DHT dose ( $10^{-8}$  M) and mRNA expression of *AR-FL*, *AR-V1*, *AR-V4*, and *AR-V7rv*, which was not reversed by association to flutamide. This could suggest the existence of mechanisms that repress *AR* mRNA expression in response to high DHT levels as proposed previously [9, 10, 15, 34], which results in decreased *AR-Vs* expression. Administration of high levels of DHT was also able to retain AR-V7 protein in the cytoplasm (Fig. 2). Initially, AR-FL protein expression was also downregulated by DHT  $10^{-8}$  M, and although from the 6th to the 9th day AR-FL protein levels showed an increase, the overall effect was negative. This data confirms the negative modulation of DHT  $10^{-8}$  M on AR-FL and AR-Vs and on its translocation to nucleus. The association to flutamide maintained this inhibitory effect and, additionally, prevented all dynamic changes on cellular localization of AR-FL and AR-V7 (Figs. 2 and 3). Interestingly, this high dose of androgen did not impair C4-2B cell growth, which remained as the control group. This finding highlights the role of mechanisms other than the AR-related pathway to maintain cell proliferation of C4-2B cells under high levels of androgen.

*AR-FL* mRNA presented a biphasic pattern under DHT  $10^{-13}$  M, initially decreasing and then increasing its levels, which is in agreement with the nuclear AR-FL protein response, suggesting an adaptation of the cells under low levels of androgen. This biphasic response of *AR-FL* mRNA was not observed when DHT  $10^{-13}$  M was co-administrated with flutamide. DHT  $10^{-13}$  M plus flutamide promoted dynamic changes on *AR-V1* and *AR-V7* mRNA expression in the time course experiment, which draws attention to the

effect of this treatment over AR-Vs expression and also to the adaptation of those variants to treatment over time. Noteworthy, this association stimulated *AR-V4* mRNA expression. As presented here, administration of DHT  $10^{-13}$  M with flutamide positively affected AR-FL and AR-V7 protein levels.

As discussed above, administration of DHT  $10^{-8}$  M did not significantly affect the cellular growth of C4-2B cells. However, DHT  $10^{-13}$  M enhanced cellular growth, which was improved by the association to flutamide. This proliferative effect was also observed in administration of flutamide alone. Of note, at the 9th day of treatment, DHT  $10^{-13}$  M associated to flutamide and flutamide alone expressed higher levels of AR-V4 in comparison to the 6th day and also when compared to control. This increase of *AR-V4* mRNA, which was already reported to dimerize with AR-FL, could activate AR-canonical targets and increase AR-FL nuclear localization, as recently suggested by Zhan et al. [35]. The proliferative effect of flutamide (and its association to low levels of DHT) on C4-2B cells could be explained by a mutation in AR, which turns flutamide into an agonist of AR. In the 1990s, Veldscholte et al. [8] reported the mutation T877A in the LBD of AR in LNCaP cells, which is retained by C4-2B cells. Because of its location, this mutation is not present in AR-Vs, which do not present the LBD, so flutamide cannot act as an antagonist in these receptors. This AR mutation is located in the AF-2 domain that spans codons 874 to 910 of AR and binds AR coactivators, being central to AR signaling. It allows AR activation by steroids, such as estrogens and progesterone; however, it also allows that antagonists, such as flutamide, act as agonists, activating the receptor instead of blocking it [36]. Moreover, it is already known that this mutation promotes PCa cell growth and cell survival [37]. The activation played by antagonists implies that even after androgen blockade, androgen signaling remains intact and that a selection of cells harboring altered AR with broadened ligand specificity could occur to maintain cell proliferation [38]. Promiscuous binding mediates higher transactivation through mutant AR. Previous works showed that, in patients with PCa expressing T877A, PCa progressed to androgen independence after antiandrogen treatment [38]. AR mutations that alter ligand specificity may influence tumor progression subsequent to androgen withdrawal by making the AR more responsive to adrenal androgens or antiandrogens [39].

In our work, we observed a decrease of AR-FL and AR-Vs under high levels of androgen by qPCR and immunofluorescence. In addition, it is believed that low levels of androgens could favor AR-Vs expression, which is in concordance with previous works [7, 9, 10]. In the control condition (supplemented with charcoal-stripped FBS—without steroids), we observed an increasing expression of AR-FL and

AR-V7 over time in C4-2B cells. We could yet expect that AR-FL will remain in cytoplasm, since there is no androgen to initiate its nuclear translocation. In LNCaP cells, in spite of the presence of AR-FL at nucleus at day 3, we observed that its nuclear intensity was negatively regulated over time, confirming the prior idea. As suggested by Cao et al. [40], AR-Vs facilitate AR-FL nuclear localization in the absence of androgen. This could explain the increased expression of AR-FL in nuclei even in an androgen-depleted milieu. AR-V7, which is constitutively expressed by C4-2B and is positively regulated in the absence of androgens, facilitates AR-FL nuclear localization [40]. In the LNCaP cell line, the high dose of androgens also promoted dynamic changes in the cellular localization of AR-V7 protein, with a decrease of its nuclear levels and an increase of cytoplasmic levels, demonstrating a response of this LBD-lacking variant to elevated levels of androgen (Online Resource). This response was opposite to the observed by Mediwala and colleagues, whose showed that AR-V7 did not respond to saturating concentrations of DHT (2 to 10 nM) in LNCaP cells [42]. Even in the presence of flutamide, we observed that DHT  $10^{-8}$  M is able to retain the AR-V7 in the cytoplasm. However, the co-administration of DHT  $10^{-8}$  M and flutamide promoted increased AR-FL protein levels in cytoplasm and nuclei of LNCaP cells. The lower dose of DHT seemed not to exert any effect neither on AR-V7 protein levels nor on its cellular localization. Nuclear localization of AR-FL was also not changed, even though cytoplasmic levels of AR-FL seem to be downregulated by DHT  $10^{-13}$  M (this effect was sustained under flutamide co-administration). These findings suggest that, in LNCaP cells, AR-V7 protein expression is modulated only by saturating concentrations of DHT.

The effect of flutamide alone was remarkable, since it downregulated *AR-FL* mRNA expression, but positively regulated AR-FL protein levels in C4-2B cells, which could suggest a post-transcription regulation mechanism. The AR-Vs did not show significant changes in their mRNA levels, which could be explained by the lack of LBD in AR-Vs, namely, flutamide has no place to bind.

In this work, we demonstrated dynamic changes on AR-FL and AR-Vs under androgen modulation. We observed a negative modulation of AR-FL and AR-Vs by high concentration androgen (DHT  $10^{-8}$  M). The administration of DHT  $10^{-8}$  M with flutamide showed an even greater downregulation effect. Although low levels of androgen did not change the overall expression of the evaluated receptors, they demonstrated fascinating dynamical changes on cellular localization over time. Treatment with DHT  $10^{-13}$  M induced C4-2B proliferation, which was intensified by the association to flutamide, as well as by flutamide alone. We believe that the mutation T877A in the AR could confer a growth advantage for PCa cells harboring this mutation. The results presented here support the assumption that

aberrant mRNA processing may underlie prostate proliferation. Our results highlight the contribution of AR-Vs in the dance of androgenic modulation. Although the growth of the prostate cannot be explained solely by a mere increase or decrease in the response of AR-Vs to androgens, these findings support the importance of androgenic modulation of AR-Vs.

Once the adaptations of tumor cells to milieu changes are complex and involves genetic alterations, polymorphisms, abnormal growth response, decreased or diminished apoptosis and even the combined effects of all of these factors, under some form of androgenic control [41], more works are needed to clarify the role of AR-Vs in the establishment and progression of PCa. Collectively, the present work represents a preliminary characterization that can be extended in the future to significantly enhance our understanding of androgen modulation of AR-Vs in prostate tumors and, perhaps, indicate new treatments for PCa.

**Acknowledgements** We thanks to Urology Service and the Experimental Pathology Lab—HCPA for technical assistance.

**Funding** This study was supported by National Council for Scientific and Technological Development (CNPq; grant no. 477148/2013-1), Incentive Fund for Research and Events of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA; grant no. 14-0397), Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) and Foundation for Research of the State of Rio Grande do Sul (FAPERGS).

### Compliance with ethical standards

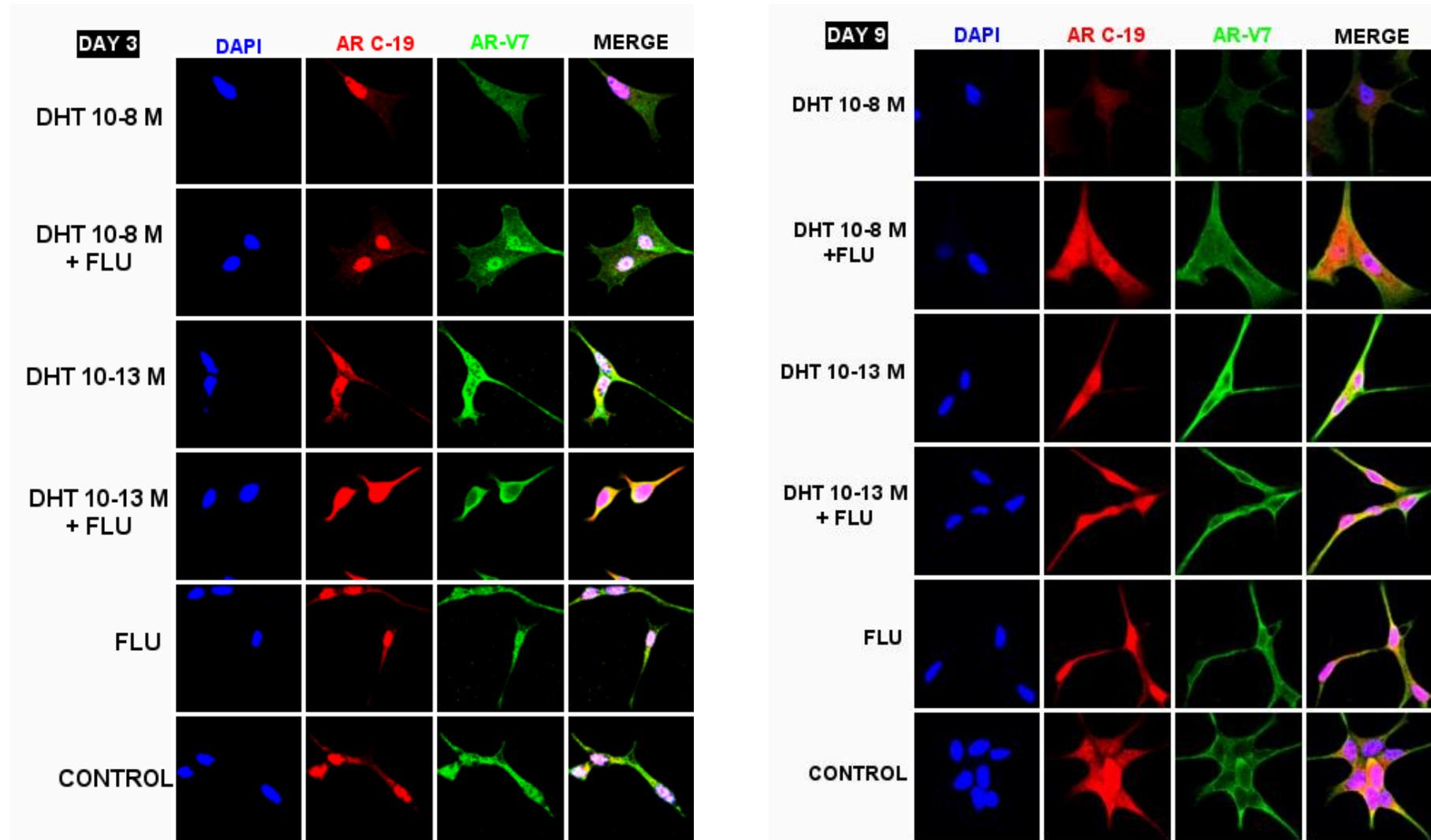
**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

### References

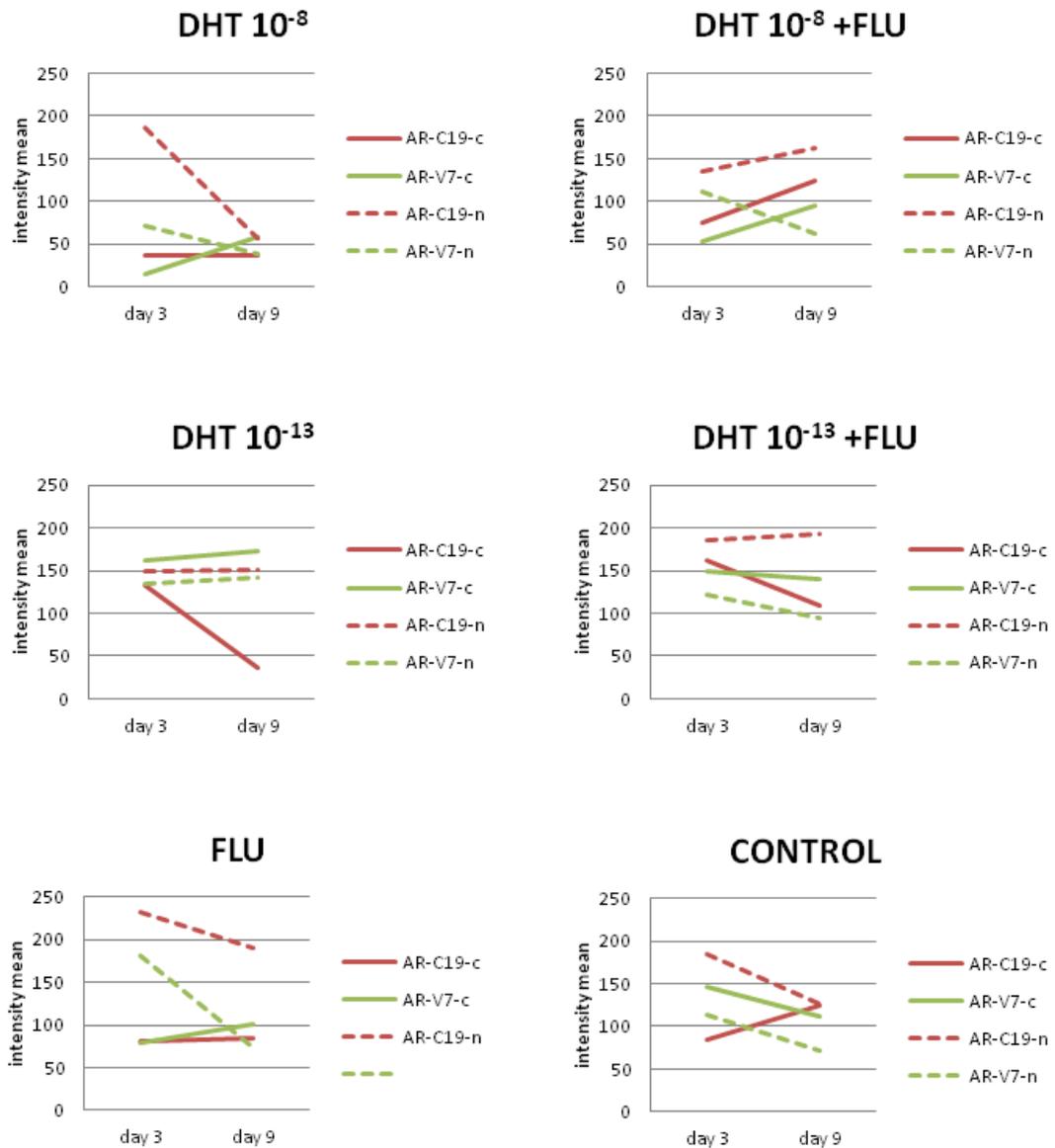
1. C. Carson 3rd, R. Rittmaster, The role of dihydrotestosterone in benign prostatic hyperplasia. *Urology* **61**(4 Suppl 1), 2–7 (2003)
2. M. Marcelli, G.R. Cunningham, Hormonal signaling in prostatic hyperplasia and neoplasia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **84**(10), 3463–3468 (1999). <https://doi.org/10.1210/jcem.84.10.6083>
3. C. Huggins, C.V. Hodges, Studies on prostatic cancer: I. The effect of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. 1941. *J. Urol.* **168**(1), 9–12 (2002). [https://doi.org/S0022-5347\(05\)64820-3](https://doi.org/S0022-5347(05)64820-3)
4. J.L. Mohler, C.W. Gregory, O.H. Ford 3rd, D. Kim, C.M. Weaver, P. Petrusz, E.M. Wilson, F.S. French, The androgen axis in recurrent prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* **10**(2), 440–448 (2004)
5. J.A. Locke, E.S. Guns, A.A. Lubik, H.H. Adomat, S.C. Hendy, C. A. Wood, S.L. Ettinger, M.E. Gleave, C.C. Nelson, Androgen levels increase by intratumoral de novo steroidogenesis during progression of castration-resistant prostate cancer. *Cancer Res.* **68** (15), 6407–6415 (2008). <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-5997>
6. C.D. Chen, D.S. Welsbie, C. Tran, S.H. Baek, R. Chen, R. Vessella, M.G. Rosenfeld, C.L. Sawyers, Molecular determinants of resistance to antiandrogen therapy. *Nat. Med.* **10**(1), 33–39 (2004). <https://doi.org/10.1038/nm972nm972> [pii]

7. Z. Guo, X. Yang, F. Sun, R. Jiang, D.E. Linn, H. Chen, X. Kong, J. Melamed, C.G. Tepper, H.J. Kung, A.M. Brodie, J. Edwards, Y. Qiu, A novel androgen receptor splice variant is up-regulated during prostate cancer progression and promotes androgen depletion-resistant growth. *Cancer Res.* **69**(6), 2305–2313 (2009). <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-3795>
8. J. Veldscholte, C.A. Berrevoets, C. Ris-Stalpers, G.G. Kuiper, G. Jenster, J. Trapman, A.O. Brinkmann, E. Mulder, The androgen receptor in LNCaP cells contains a mutation in the ligand binding domain which affects steroid binding characteristics and response to antiandrogens. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **41**(3-8), 665–669 (1992)
9. P.A. Watson, Y.F. Chen, M.D. Balbas, J. Wongvipat, N.D. Socci, A. Viale, K. Kim, C.L. Sawyers, Constitutively active androgen receptor splice variants expressed in castration-resistant prostate cancer require full-length androgen receptor. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **107**(39), 16759–16765 (2010). <https://doi.org/10.1073/pnas.1012443107>
10. Z. Yu, S. Chen, A.G. Sowalsky, O.S. Voznesensky, E.A. Mostaghel, P.S. Nelson, C. Cai, S.P. Balk, Rapid induction of androgen receptor splice variants by androgen deprivation in prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* **20**(6), 1590–1600 (2014). <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-1863>
11. M.T. Schweizer, E.S. Antonarakis, H. Wang, A.S. Ajiboye, A. Spitz, H. Cao, J. Luo, M.C. Haffner, S. Yegnasubramanian, M.A. Carducci, M.A. Eisenberger, J.T. Isaacs, S.R. Denmeade, Effect of bipolar androgen therapy for asymptomatic men with castration-resistant prostate cancer: results from a pilot clinical study. *Sci. Transl. Med.* **7**(269), 269ra262 (2015). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3010563>
12. M.T. Schweizer, E.S. Antonarakis, S.R. Denmeade, Bipolar androgen therapy: A paradoxical approach for the treatment of castration-resistant prostate cancer. *Eur. Urol.* **72**(3), 323–325 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2017.03.022>
13. M.T. Schweizer, H. Wang, B. Lubner, R. Nadal, A. Spitz, D.M. Rosen, H. Cao, E.S. Antonarakis, M.A. Eisenberger, M.A. Carducci, C. Paller, S.R. Denmeade, Bipolar androgen therapy for men with androgen ablation naïve. *Prostate Cancer: Results Phase II BATMAN Study Prostate* **76**(13), 1218–1226 (2016). <https://doi.org/10.1002/pros.23209>
14. V. Vichai, K. Kirtikara, Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat. Protoc.* **1**(3), 1112–1116 (2006). <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.179>
15. M. Kohli, Y. Ho, D.W. Hillman, J.L. Van Etten, C. Henzler, R. Yang, J.M. Sperger, Y. Li, E. Tseng, T. Hon, T. Clark, W. Tan, R. E. Carlson, L. Wang, H. Sicotte, H. Thai, R. Jimenez, H. Huang, P.T. Vedell, B.W. Eckloff, J.F. Quevedo, H.C. Pitot, B.A. Costello, J. Jen, E.D. Wieben, K.A.T. Silverstein, J.M. Lang, S.M. Dehm, Androgen receptor variant AR-V9 is coexpressed with AR-V7 in prostate cancer metastases and predicts abiraterone resistance. *Clin. Cancer Res.* **23**(16), 4704–4715 (2017). <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-0017>
16. Y. Zhu, A. Sharp, C.M. Anderson, J.L. Silberstein, M. Taylor, C. Lu, P. Zhao, A.M. De Marzo, E.S. Antonarakis, M. Wang, X. Wu, Y. Luo, N. Su, D. Nava Rodrigues, I. Figueiredo, J. Welte, E. Park, X.J. Ma, I. Coleman, C. Morrissey, S.R. Plymate, P.S. Nelson, J.S. de Bono, J. Luo, Novel junction-specific and quantifiable in situ detection of AR-V7 and its clinical correlates in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Eur. Urol.* **73**(5), 727–735 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2017.08.009>
17. K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**(4), 402–408 (2001). <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
18. C.A. Schneider, W.S. Rasband, K.W. Eliceiri, NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* **9**(7), 671–675 (2012)
19. C. Liu, W. Lou, Y. Zhu, N. Nadiminty, C.T. Schwartz, C.P. Evans, A.C. Gao, Niclosamide inhibits androgen receptor variants expression and overcomes enzalutamide resistance in castration-resistant prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* **20**(12), 3198–3210 (2014). <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-3296>
20. X. Zhang, C. Morrissey, S. Sun, M. Ketchandji, P.S. Nelson, L.D. True, F. Vakar-Lopez, R.L. Vessella, S.R. Plymate, Androgen receptor variants occur frequently in castration resistant prostate cancer metastases. *PLoS ONE* **6**(11), e27970 (2011). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027970>
21. K.M. Wadosky, S. Koochekpour, Androgen receptor splice variants and prostate cancer: From bench to bedside. *Oncotarget* **8**(11), 18550–18576 (2017). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14537>
22. J.K. Parsons, H.B. Carter, E.A. Platz, E.J. Wright, P. Landis, E.J. Metter, Serum testosterone and the risk of prostate cancer: potential implications for testosterone therapy. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* **14**(9), 2257–2260 (2005). <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-04-0715>
23. A.J. Usoro, A.S. Obot, I.S. Ekaidem, O.E. Akaiso, A.E. Udoh, O. Akinloye, Serum testosterone, 17beta-estradiol and PSA levels in subjects with prostate disorders. *Indian J. Clin. Biochem.* **30**(1), 59–65 (2015). <https://doi.org/10.1007/s12291-013-0411-3411>
24. A. Morgentaler, Testosterone and prostate cancer: an historical perspective on a modern myth. *Eur. Urol.* **50**(5), 935–939 (2006). <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2006.06.034>
25. P. Stattin, S. Lumme, L. Tenkanen, H. Alftan, E. Jellum, G. Hallmans, S. Thoresen, T. Hakulinen, T. Luostarinen, M. Lehtinen, J. Dillner, U.H. Stenman, M. Hakama, High levels of circulating testosterone are not associated with increased prostate cancer risk: a pooled prospective study. *Int. J. Cancer* **108**(3), 418–424 (2004). <https://doi.org/10.1002/ijc.11572>
26. G. Bayar, H. Sirin, M. Aydin, A. Ozagari, O. Tanriverdi, M. Kadihasanoglu, M. Kendirci, Low free and bioavailable testosterone levels may predict pathologically-proven high-risk prostate cancer: a prospective, clinical trial. *Turk. J. Urol.* **43**(3), 289–296 (2017). <https://doi.org/10.5152/tud.2017.35467>
27. H. Tu, J. Gu, Q.H. Meng, J. Kim, S. Strom, J.W. Davis, Y. He, E. A. Wagar, T.C. Thompson, C.J. Logothetis, X. Wu, Low serum testosterone is associated with tumor aggressiveness and poor prognosis in prostate cancer. *Oncol. Lett.* **13**(3), 1949–1957 (2017). <https://doi.org/10.3892/ol.2017.5616>
28. V. Biolchi, B. Silva Neto, D.B. Pianta, W.J. Koff, M. Berger, I.S. Brum, Androgen receptor GGC polymorphism and testosterone levels associated with high risk of prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Mol. Biol. Rep.* **40**(3), 2749–2756 (2013). <https://doi.org/10.1007/s11033-012-2293-5>
29. M.A. Titus, M.J. Schell, F.B. Lih, K.B. Tomer, J.L. Mohler, Testosterone and dihydrotestosterone tissue levels in recurrent prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* **11**(13), 4653–4657 (2005). <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-0525>
30. A.R. Kristal, J.M. Schenk, Y. Song, K.B. Arnold, M.L. Neuhouser, P.J. Goodman, D.W. Lin, F.Z. Stanczyk, I.M. Thompson, Serum steroid and sex hormone-binding globulin concentrations and the risk of incident benign prostatic hyperplasia: results from the prostate cancer prevention trial. *Am. J. Epidemiol.* **168**(12), 1416–1424 (2008). <https://doi.org/10.1093/aje/kwn272>
31. X. Xu, X. Chen, H. Hu, A.B. Dailey, B.D. Taylor, Current opinion on the role of testosterone in the development of prostate cancer: a dynamic model. *BMC Cancer* **15**, 806 (2015). <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1833-5>
32. J. Geller, D.J. de la Vega, J.D. Albert, D.A. Nachtsheim, Tissue dihydrotestosterone levels and clinical response to hormonal

- therapy in patients with advanced prostate cancer. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **58**(1), 36–40 (1984). <https://doi.org/10.1210/jcem-58-1-36>
33. S.C. Chan, Y. Li, S.M. Dehm, Androgen receptor splice variants activate androgen receptor target genes and support aberrant prostate cancer cell growth independent of canonical androgen receptor nuclear localization signal. *J. Biol. Chem.* **287**(23), 19736–19749 (2012). <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.352930>
  34. B.B. Yeap, R.G. Krueger, P.J. Leedman, Differential post-transcriptional regulation of androgen receptor gene expression by androgen in prostate and breast cancer cells. *Endocrinology* **140**(7), 3282–3291 (1999). <https://doi.org/10.1210/endo.140.7.6769>
  35. Y. Zhan, G. Zhang, X. Wang, Y. Qi, S. Bai, D. Li, T. Ma, O. Sartor, E.K. Flemington, H. Zhang, P. Lee, Y. Dong, Interplay between cytoplasmic and nuclear androgen receptor splice variants mediates castration resistance. *Mol. Cancer Res.* **15**(1), 59–68 (2017). <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-16-0236>
  36. X.B. Shi, A.H. Ma, L. Xia, H.J. Kung, R.W. de Vere White, Functional analysis of 44 mutant androgen receptors from human prostate cancer. *Cancer Res.* **62**(5), 1496–1502 (2002)
  37. C. Sun, Y. Shi, L.L. Xu, C. Nageswararao, L.D. Davis, T. Segawa, A. Dobi, D.G. McLeod, S. Srivastava, Androgen receptor mutation (T877A) promotes prostate cancer cell growth and cell survival. *Oncogene* **25**(28), 3905–3913 (2006). <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209424>
  38. M.E. Taplin, B. Rajeshkumar, S. Halabi, C.P. Werner, B.A. Woda, J. Picus, W. Stadler, D.F. Hayes, P.W. Kantoff, N.J. Vogelzang, E.J. Small, Androgen receptor mutations in androgen-independent prostate cancer: Cancer and Leukemia Group B Study 9663. *J. Clin. Oncol.* **21**(14), 2673–2678 (2003). <https://doi.org/10.1200/JCO.2003.11.102>
  39. J. Tan, Y. Sharief, K.G. Hamil, C.W. Gregory, D.Y. Zang, M. Sar, P.H. Gumerlock, R.W. deVere White, T.G. Pretlow, S.E. Harris, E.M. Wilson, J.L. Mohler, F.S. French, Dehydroepiandrosterone activates mutant androgen receptors expressed in the androgen-dependent human prostate cancer xenograft CWR22 and LNCaP cells. *Mol. Endocrinol.* **11**(4), 450–459 (1997). <https://doi.org/10.1210/mend.11.4.9906>
  40. B. Cao, Y. Qi, G. Zhang, D. Xu, Y. Zhan, X. Alvarez, Z. Guo, X. Fu, S.R. Plymate, O. Sartor, H. Zhang, Y. Dong, Androgen receptor splice variants activating the full-length receptor in mediating resistance to androgen-directed therapy. *Oncotarget* **5**(6), 1646–1656 (2014). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1802>
  41. S.L. Goldenberg, A. Koupparis, M.E. Robinson, Differing levels of testosterone and the prostate: a physiological interplay. *Nat. Rev. Urol.* **8**(7), 365–377 (2011). <https://doi.org/10.1038/nrurol.2011.79>
  42. S.N. Mediwala, H. Sun, A.T. Szafran, S.M. Hartig, G. Sonpavde, T.G. Hayes, P. Thiagarajan, M.A. Mancini, M. Marcell, The activity of the androgen receptor variant AR-V7 is regulated by FOXO1 in a PTEN-PI3K-AKT-dependent way. *The Prostate* **73**(3), 267–277 (2013)



**Online Resource 1** Androgenic modulation of AR-Vs protein expression in LNCaP cells. Immunofluorescent images showing dynamic changes in the presence of DHT ( $10^{-8}$  M and  $10^{-13}$  M) associated or not to flutamide. DAPI, 40,6-diamidino-2-phenylindole.



**Online Resource 2** Schematic representation of dynamic changes in cellular localization of AR-FL and AR-V7 under androgenic treatment (DHT 10<sup>-8</sup> M and 10<sup>-13</sup> M, associated or not to flutamide) in LNCaP Cells. Nuclei and cytoplasm localization were analyzed using the function "Image Calculator" of the ImageJ software (see Materials and Methods). Stained elements were measured by the command "Analyze Particles".

## 6. DISCUSSÃO GERAL

Os resultados presentes nessa Tese permitem a ampliação do conhecimento científico no papel do AR e das AR-Vs na fisiopatologia das alterações proliferativas da próstata, HPB e CaP. Até o momento, o papel exato das AR-Vs no desenvolvimento destas alterações prostáticas ainda não foi esclarecido e permanece sob discussão. As AR-Vs são constitutivamente ativas, de forma que não necessitam da presença de androgênios para serem ativadas e exercerem seu papel na transcrição gênica. Entretanto, sua expressão pode ser modulada pela presença de androgênios.

No Artigo 1 (*Androgen receptor isoforms expression in benign prostatic hyperplasia and primary prostate cancer*), estudamos a expressão das AR-Vs na HPB e no CaP hormônio-sensível. A primeira observação a ser feita é que todos os alvos estudados (mRNA e proteína) foram expressos em todas as amostras analisadas. Este dado confronta a afirmação de que as AR-Vs seriam expressas somente no CPRC (Hornberg, Ylitalo et al. 2011; Antonarakis, Lu et al. 2014). Enquanto que outros autores estudaram a expressão das AR-Vs em amostras de câncer avançado, resistente à terapia de ablação androgênica e em metástases (Dehm, Schmidt et al. 2008; Guo, Yang et al. 2009; Hu, Dunn et al. 2009; Sun, Sprenger et al. 2010; Hornberg, Ylitalo et al. 2011), nós detectamos que estas variantes são expressas não só no tecido tumoral, mas também no tecido hiperplásico. Nossos dados expandem o papel das AR-Vs para além da resistência à terapia, trazendo novas possibilidades para o entendimento da fisiopatologia dos tumores da próstata. A partir dos dados apresentados neste trabalho e na literatura, pode-se especular que, no caso do carcinoma prostático, durante a progressão tumoral para um estágio mais agressivo pode ocorrer a seleção de subclones capazes de resistir a terapia de ablação androgênica e de manterem a proliferação celular (Watson, Chen et al. 2010). A teoria de expressão progressiva das AR-Vs é fundamentada por achados da literatura que demonstram a relação inversa entre a dependência androgênica e a expressão das isoformas, que se apresentam em níveis menores em linhagens celulares androgênio-dependentes mas em níveis significativamente maiores em linhagens androgênio-independentes (Guo, Yang et al. 2009). Essa relação inversa remete ao trabalho de Watson e

cols. (2010), que demonstrou que o AR-FL e as AR-Vs são regulados positivamente pela castração, enquanto que a readministração de androgênio é capaz de suprimir a expressão destes receptores. Em concordância com esta teoria, conforme os dados apresentados na sessão de Resultados, Capítulo I - Estudo dos níveis intratecduais e circulantes de esteroides, a expressão gênica das isoformas *AR-V1* e *AR-V7rv* encontra-se aumentada no CaP, enquanto que os níveis intratecduais de esteroides encontram-se diminuídos. Reduzidos níveis intratecduais de androgênios são relacionados à recidiva tumoral e à menor sobrevida livre da doença (Geller, de la Vega et al. 1984). No CaP, estes desfechos desfavoráveis podem ser consequência do favorecimento à formação das AR-Vs, que ocorre em resposta aos baixos níveis intratecduais de androgênios.

Com o objetivo de estudar a associação entre a expressão gênica do AR-FL e das AR-Vs e o estadiamento tumoral do CaP, as amostras deste grupo foram estratificadas de acordo com o escore de Gleason, classificando as amostras em dois grupos de acordo com o grau ( $\leq 7$  (3+4) e  $\geq 7$  (4+3)). Encontramos uma maior expressão das AR-Vs nas amostras com Gleason de alto grau ( $\geq 7$  (4+3)). O que demonstra a associação entre a expressão gênica das isoformas e a agressividade tumoral. Por outro lado, não observamos diferença de expressão quando as amostras foram classificadas de acordo com a recidiva bioquímica, o que corrobora com dados da literatura que demonstram que *AR-V7* e *AR-V1* não apresentam associação com a recidiva bioquímica (Zhao, Coram et al. 2012).

As diferentes isoformas estudadas neste trabalho apresentam não somente correlação em nível de expressão gênica, refletindo sua origem partir de um mesmo pré-mRNA, mas apresentam também relação a nível funcional. A coexpressão das AR-Vs resulta em uma fascinante interação entre esses receptores. Haja vista, a coexpressão de *AR-V7* e *AR-V1* resulta em anulação do ganho de função pelo *AR-V7*, indicando que o *AR-V1* possa atuar como um regulador negativo do *AR-V1* (Watson, Chen et al. 2010; Zhan, Zhang et al. 2017). Desta maneira, quando coexpresso com o *AR-V1*, o *AR-V7* não é capaz de ativar seus alvos genômicos. No entanto, o *AR-V1* é capaz de ativar seletivamente o sinal canônico, ou clássico, do AR-FL (Zhan, Zhang et al. 2017). Por conseguinte, se todas isoformas (*AR-V1*, *AR-V4*, *AR-V7* e *AR-FL*) são expressas em ambos tecidos (CaP e HPB), mas no CaP há maior expressão

de AR-V1, pode haver uma priorização da via canônica do AR-FL. Enquanto isso, na HPB, há maior expressão de AR-V4, que atua promovendo a ativação de alvos canônicos do AR-FL mas também de alvos AR-Vs-específicos. A nosso ver, este é um achado importante deste trabalho, visto que no tecido hiperplásico pode haver a ativação de ambas as vias, AR-FL e AR-V7, não havendo favorecimento de nenhuma destas vias.

Como discutido anteriormente, neoplasias mais agressivas e de estágio mais avançado expressam maiores níveis de AR-V7 (Hu, Dunn et al. 2009; Hornberg, Ylitalo et al. 2011). Acreditamos que nessa situação, os níveis de AR-V7 superem os níveis de AR-V1, favorecendo assim a via do AR-V7. Esta teoria é fundamentada por trabalhos prévios da literatura que já demonstram a relação entre o AR-V7, o CRPC e o desenvolvimento de metástases (Scher and Sawyers 2005; Dehm, Schmidt et al. 2008; Guo, Yang et al. 2009; Hu, Dunn et al. 2009; Sun, Sprenger et al. 2010; Watson, Chen et al. 2010; Hornberg, Ylitalo et al. 2011; Qu, Dai et al. 2015).

Em suma, na HPB há maior expressão de AR-V4, que ativa a via canônica do AR-FL e também a via do AR-V7. No câncer hormônio-sensível, há maior expressão de AR-V1, que atua como regulador negativo do AR-V7, mas ativa a via do AR-FL. E, no CRPC, a via do AR-V7 é favorecida. A correlação encontrada entre a expressão de AR-V4 e o escore de Gleason ressalta a participação desta isoforma na progressão do câncer para estágio mais avançados de agressividade. Ainda que nos graus mais avançados de câncer nós tenhamos observado e destacado a importante participação do AR-V7, a isoforma AR-V4 também está presente. E a presença dessa isoforma permite que a célula tumoral tome vantagem de ambos os lados da via do AR (AR-FL e AR-V7), ainda que se sugira um favorecimento via AR-V7.

A relação entre a expressão da AR-Vs e marcadores do ciclo celular e da apoptose também foi avaliada. A ideia principal foi verificar se estes marcadores estariam alterados, uma vez que as AR-Vs são autoativadas e não dependem de controle transcricional para exercer suas ações intracelulares. Em outras palavras, em uma situação onde as AR-Vs são expressas, qual seria o efeito nos genes relacionados ao ciclo celular e à apoptose? No CaP, a correlação entre BCL2 com AR-FL e AR-V7 sugere a associação entre as vias relacionadas ao AR-FL e ao AR-V7 com o processo antiapoptótico. Estes resultados fortalecem a teoria de que

estes receptores (AR-FL e AR-V7) também tem papel na regulação da apoptose, podendo contribuir para a progressão do CaP. Ainda há muito a ser desvendado acerca dessas interações, mas nossos achados, ainda que iniciais, instigam futuros estudos que auxiliem a desvendar os complexos mecanismos intracelulares envolvidos na progressão do CaP para estágios não-responsivos à terapia de bloqueio androgênico.

A técnica de imunohistoquímica, escolhida para avaliar a expressão proteica em tecido, é amplamente utilizada tanto para a pesquisa quanto para o diagnóstico clínico. A detecção proteica foi realizada utilizando os anticorpos AR-NTD, AR-CTD e AR-V7. O anticorpo anti-AR-V7 é específico para a isoforma em questão e o anticorpo anti-AR-CTD é específico para o AR-FL. Enquanto isso, o anticorpo anti-AR-NTD liga-se no domínio N-terminal, que é expresso pelas AR-Vs e pelo AR-FL, detectando assim tanto o AR-FL quanto as AR-Vs. Desta forma, uma amostra positiva para AR-NTD pode refletir a expressão de quaisquer proteínas do AR estudadas neste trabalho. Por outro lado, uma amostra positiva para AR-CTD, mas negativa para AR-NTD e AR-V7 reflete a expressão de AR-FL, porém a ausência de AR-Vs. Dada a ausência de anticorpos específicos para cada uma das AR-Vs, Zhang e cols. (2011), sugerem a utilização da razão entre os anticorpos AR-NTD e AR-CTD para o estudo da frequência geral das isoformas truncadas no domínio C-terminal (Zhang, Morrissey et al. 2011). Esta abordagem utiliza a razão da marcação dos anticorpos que reconhecem as regiões N e C-terminal do AR (AR-NTD/AR-CTD) e permite assim a identificação das AR-Vs. Deste modo, foram utilizados anticorpos contra os domínios N e C-terminal da proteína do AR para verificar a prevalência geral das variantes do AR, onde o valor resultante corresponde à expressão total das AR-Vs. Entretanto, este método não fornece dados específicos acerca de qual AR-Vs apresenta maior expressão. Assim, escolhemos utilizar também um anticorpo específico para detectar o AR-V7.

O conhecimento da localização celular dos receptores nucleares é fundamental para discutir a ação destes receptores na fisiologia celular. Para obter dados quanto à localização celular dos alvos deste estudo, núcleo e citoplasma de células epiteliais e das células estromais foram avaliados separadamente. Cabe ressaltar que ainda que se aceite como padrão a ação nuclear clássica dos receptores nucleares, onde a presença nuclear destes receptores é requisito para sua ação sobre a transcrição gênica, devemos observar que a ação não-clássica destes receptores tem recebido cada vez mais atenção. Compreende-se como

não-clássica a ação citoplasmática (não-genômica) destes receptores, sendo capazes de ativar moléculas de sinalização intracelular, como por exemplo via ativação de proteínas quinase e fosforilação (Foradori, Weiser et al. 2008).

Como apresentado no Artigo 1 (*Androgen receptor isoforms expression in benign prostatic hyperplasia and primary prostate cancer*), as células epiteliais de ambos os grupos foram positivas para os três anticorpos utilizados. Este dado representa mais um achado bastante interessante do nosso trabalho, visto que foi possível a detecção tanto do AR quanto de suas isoformas no tecido de CaP hormônio-sensível e também no tecido de HPB. Complementando nossos dados de expressão gênica, esses dados de expressão proteica contradizem a teoria inicial de que a expressão das AR-Vs aconteceria somente como consequência da terapia de ablação androgênica, de forma que essas isoformas não seriam expressas, ao menos em nível substancial, no tecido benigno e no tecido neoplásico hormônio-sensível (Guo, Yang et al. 2009; Sun, Sprenger et al. 2010). A marcação estromal positiva é bastante interessante dada importância da sinalização androgênica estromal para o desenvolvimento do tecido prostático normal e hiperplásico, e também para o crescimento e progressão do CaP (Zhang, Morrissey et al. 2011).

Não observamos diferença nos níveis de expressão proteica de AR-V7 quando comparadas as amostras de HPB e CaP. Entretanto, devemos ressaltar a detecção de AR-V7 nos compartimentos epitelial e estromal das amostras analisadas, somada à detecção desta isoforma no citoplasma e também no núcleo destas células. A ausência da sequência de localização nuclear (NLS, do inglês *nuclear localization sequence*) na proteína do AR-V7 chama atenção para sua detecção nuclear. Isto é, ainda que a NLS esteja ausente, o AR-V7 é capaz de alcançar o núcleo celular.

Sabe-se que a localização nuclear é passo fundamental para a ação genômica dos receptores nucleares. Diferentes AR-Vs apresentam diferentes habilidades de translocação nuclear. Enquanto que o AR-V7 é capaz de translocar-se para o núcleo, outras isoformas, como AR-V1 e AR-V4, localizam-se primariamente no citoplasma (Zhan, Zhang et al. 2017). Como já descrito, a translocação nuclear do AR requer a dimerização do receptor, o que também é verdade para as AR-Vs. As isoformas AR-V1 e AR-V4 localizam-se principalmente

no citoplasma e a formação de heterodímero com AR-V7 ou AR-FL facilita sua translocação nuclear. Contudo, ainda que a translocação dos heterodímeros AR-V1/AR-FL e AR-V4/AR-FL aconteça somente quando o AR-FL está ligado ao androgênio, a associação AR-V1/AR-FL é capaz de ativar seletivamente a sinalização canônica do AR-FL (Zhan, Zhang et al. 2017). Por outro lado, quando o AR-V1 está associado ao AR-V7, ele bloqueia a capacidade do AR-V7 em conferir crescimento celular resistente à castração. Portanto, o AR-V1 é capaz de atuar como ativador transcricional para o AR-FL, mas como supressor transcricional para o AR-V7 (Zhan, Zhang et al. 2017). Deste modo, ainda quando expressas somente no citoplasma, as AR-Vs apresentam relevância clínica que deve ser levada em consideração. O entendimento atual é que a presença das AR-Vs é biologicamente relevante na HPB e no CaP hormônio-sensível; todavia, o exato papel das AR-Vs na fisiopatologia destes tumores ainda não está claro.

No Artigo 2 (*Androgenic modulation of AR-Vs*), nós investigamos a modulação androgênica das AR-Vs de modo a ampliar a compreensão da regulação molecular destas variantes. No CaP, baixos níveis de androgênios são associados à agressividade e à recidiva tumoral, e também à menor sobrevida livre da doença (Geller, de la Vega et al. 1984; Biolchi, Silva Neto et al. 2013; Bayar, Sirin et al. 2017; Tu, Gu et al. 2017), o que é reforçado pela evidências que apresentadas na sessão de Resultados, Capítulo I - Estudo dos níveis intratecduais e circulantes de esteroides, que demonstram níveis menores de esteroides intratecduais no CaP quando em comparação à HPB. Ainda que a castração resulte em regressão do CaP, os resultados aqui apresentados não suportam a ideia de que a T seja uma causa direta do CaP, e nem de que altos níveis de T possam causar o CaP (Morgentaler 2006). Uma teoria bastante coerente proposta por Xu e cols. (2015) é que conforme os níveis de T caem abaixo de determinado limiar, as células prostáticas atingem o limite de suas capacidades compensatórias, o que implica na adaptação a estes baixos níveis de T e, em última instância, no estímulo ao início do processo carcinogênico (Xu, Chen et al. 2015). Deste modo, as células prostáticas adaptam-se ao declínio progressivo dos níveis de androgênios. Acreditamos que a expressão das AR-Vs possa fazer parte desta adaptação, conferindo certa vantagem às células que as expressam. Como já discutido anteriormente, estas isoformas constitutivamente ativas apresentam expressão nuclear, podendo dirigir a proliferação celular num ambiente onde estímulo androgênico encontra-se diminuído ou até ausente.

Existe uma relação inversa entre a expressão das AR-Vs e os níveis de androgênios (Guo, Yang et al. 2009; Watson, Chen et al. 2010). De fato, observamos que, enquanto o CaP apresenta menores níveis de androgênios, há maior expressão de AR-V1 e AR-V7, o que nos permite assumir que quando os níveis de androgênios diminuem, a célula adapta-se a este novo ambiente, de modo que a maquinaria hormônio-receptor-resposta celular seja modificada. Assim, numa situação onde a ativação do receptor selvagem acontece como consequência da ligação do hormônio, mas os níveis hormonais encontram-se reduzidos, e a célula precisa manter sua proliferação, dá-se início à expressão de receptores auto-ativados, que independem da presença de hormônio para manter a proliferação celular.

Os resultados obtidos em cultura celular de linhagem androgênio-independente (C4-2B) confirmam esta relação inversa entre as AR-Vs e os androgênios. Nós observamos que altas doses de DHT ( $10^{-8}$  M) reprimem a expressão gênica do AR-FL, AR-V1, AR-V4 e AR-V7. Esses dados sugerem a existência de mecanismos intracelulares capazes de regular negativamente a expressão do mRNA do AR em resposta à DHT, como já proposto por outros autores (Yeap, Krueger et al. 1999; Watson, Chen et al. 2010; Yu, Chen et al. 2014; Kohli, Ho et al. 2017). A modulação androgênica também acontece a nível proteico, onde altos níveis de DHT foram capazes de reter o AR-V7 no citoplasma celular, sugerindo um mecanismo de bloqueio à translocação nuclear desta isoforma. Observamos também um efeito negativo de altos níveis de DHT sobre a translocação nuclear do AR-FL. Juntos, esses dados confirmam a modulação negativa exercida por altas doses de DHT sobre a expressão gênica de AR-FL e AR-Vs e também sobre a translocação nuclear destes receptores. A este experimento adicionamos o antagonista do AR, flutamida, que não foi capaz de reverter a ação da DHT. Ainda que a DHT tenha regulado negativamente o AR, não houve impacto sobre a proliferação celular. Este dado sugere que outros mecanismos além do AR estejam envolvidos na manutenção da proliferação celular sob altos níveis de androgênios.

Também estudamos a resposta desta linhagem androgênio-independente a níveis reduzidos de DHT ( $10^{-13}$  M). A resposta do AR-FL frente à baixa dose de DHT foi bastante interessante. Inicialmente, observamos uma regulação negativa sobre o mRNA, que foi seguida por uma tendência a recuperação da expressão, sugerindo um mecanismo de adaptação frente aos níveis reduzidos de androgênios. Essa resposta bifásica do AR-FL não foi observada

quando associamos flutamida à baixa dose de DHT, mas essa associação exerceu efeito sobre as AR-Vs. A presença de resposta das AR-Vs a esta associação por si só é bastante interessante, visto que tanto DHT quanto flutamida exercem, classicamente, sua ação via ligação ao LBD - domínio este ausente nas AR-Vs. O curioso aqui é como essas moléculas que ligam em uma região ausente nas isoformas poderia exercer ação sobre estas?

Ainda quanto ao tratamento com baixas doses de DHT em linhagem androgênio-independente, observamos um aumento na proliferação celular em resposta ao tratamento. DHT  $10^{-13}$  estimulou a proliferação celular das células C4-2B, efeito este que foi favorecido na associação com flutamida. Ademais, este efeito positivo sobre a proliferação celular também foi observado quando as células foram tratadas com flutamida isolada. Com base nos dados de expressão gênica, o aumento do AR-V4, que pode formar heterodímero com o AR-FL e ativar seus alvos canônicos pode ser uma explicação para este feito. De fato, a associação entre AR-V4 com AR-FL não-ligado (em uma situação de ausência de androgênios, como no caso do tratamento com flutamida isolada) é capaz de ativar os alvos canônicos do AR (por exemplo, PSA) ainda que a localização celular não seja afetada (Zhan, Zhang et al. 2017). Por outro lado, a associação entre AR-V4 com AR-FL ligado a androgênio (como no caso da associação DHT + flutamida) é capaz de favorecer a translocação nuclear do AR-FL (Zhan, Zhang et al. 2017).

No caso do aumento da proliferação em resposta ao tratamento com flutamida (associada ou não à DHT  $10^{-13}$  M), a resposta pode ser consequência de uma mutação (T877A) no gene do AR que faz com que a flutamida atue como agonista do receptor, ao invés de atuar como antagonista. Descrita nas células LNCaP na década de 1990, esta mutação ocorre no LBD e é retida pela linhagem C4-2B, que é derivada das células LNCaP (Veldscholte, Berrevoets et al. 1992). Devido a sua localização no LBD, esta mutação não está presente nas AR-Vs. A presença desta mutação possibilita a ativação do AR de modo inespecífico, ou seja, este receptor passa a ser ativado pela ligação de outros esteroides como estrogênio e progesterona, e ainda, permite que antagonistas como a flutamida, atuem como agonistas, ativando o receptor em vez de bloqueá-lo (Shi, Ma et al. 2002). A presença dessa mutação já foi relacionada à proliferação e à sobrevivência das células do CaP e também à independência androgênica, uma vez que permite que a sinalização via AR possa ser mantida mesmo sob

bloqueio androgênico (Tan, Sharief et al. 1997; Taplin, Rajeshkumar et al. 2003; Sun, Shi et al. 2006). Para tanto, acredita-se em um tipo de seleção de células que apresentam essa mutação para manter a proliferação do CaP (Taplin, Rajeshkumar et al. 2003). Além de estimular a proliferação, o tratamento com flutamida isolada foi capaz de regular negativamente a expressão gênica do AR-FL; contudo, regulou positivamente sua expressão proteica, sugerindo mecanismos de regulação pós-transcricional que permitem a manutenção dos níveis proteicos do receptor, por exemplo, via redução de sua degradação. E como relatado, a ausência de efeito sobre as AR-Vs pode ser devido à ausência do LBD para a ligação da flutamida.

Enquanto que níveis aumentados de DHT regulam negativamente a expressão do AR-FL e das AR-Vs, níveis reduzidos ou ausentes de DHT podem favorecer a expressão das AR-Vs. Nos nossos experimentos, a ausência de DHT foi representada pelo grupo controle, que continha somente meio de cultura desteroideado acrescido do veículo etanol, onde observamos um aumento da expressão do AR-FL e das AR-Vs no decorrer do tratamento. Uma vez que não há androgênio para ligar ao AR-FL, se espera que não aconteça a translocação para o núcleo. Entretanto, foi observada marcação nuclear para este receptor. Este achado corrobora com os dados abordados anteriormente que mostram que as AR-Vs podem formar heterodímero com o AR-FL e favorecerem assim a translocação do receptor para o núcleo mesmo na ausência de ligante (Cao, Qi et al. 2014; Zhan, Zhang et al. 2017). Isto pode explicar a expressão nuclear do AR-FL mesmo em um ambiente sem androgênios.

## 7. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados nesta tese suportam a teoria de que as AR-Vs estão envolvidas na fisiopatologia dos tumores prostáticos. Nossos dados demonstram que as AR-Vs participam dos diferentes eventos proliferativos das células prostáticas, embora seu mecanismo de ação exato ainda não esteja claro. A identificação e a caracterização funcional de moléculas diferencialmente expressas entre os tecidos normal e tumoral são fundamentais para a compreensão do processo carcinogênico e para o desenvolvimento de terapias antitumorais. E, também, para a compreensão dos processos que governam a proliferação no tecido hiperplásico.

Os níveis reduzidos de esteroides intrateciduals associados à expressão elevada de AR-Vs no CaP sugerem uma modulação hormonal das isoformas, o que foi confirmado *in vitro*. Enquanto que níveis elevados de DHT regulam negativamente a expressão do AR-FL e das AR-Vs, níveis reduzidos de DHT regulam positivamente a expressão das AR-Vs, confirmando a relação inversão entre AR-Vs e androgênios. No CaP, os níveis diminuídos de androgênios favorecem a expressão das AR-Vs. Todas as AR-Vs estudadas são expressas nos tecidos de HPB e de CaP. A partir dos dados apresentados, sugere-se que na HPB os elevados níveis de AR-V4 ativem a via canônica do AR-FL e também a via do AR-V7, não havendo priorização de uma das vias. Já no CaP hormônio-sensível, ocorra maior expressão de AR-V1, que atua como regulador negativo do AR-V7, favorecendo a via do AR-FL. E, no decorrer da progressão do CaP para estágios mais avançados, a expressão de AR-V7 é favorecida, a ponto de reverter a regulação negativa exercida por AR-V1 sobre o AR-V7. Isso permite que nessa fase do CaP avançado, o AR-V7 atue como principal fator transcricional.

Os resultados apresentados nesta Tese demonstram que o AR-FL e as AR-Vs respondem à modulação androgênica, onde altos níveis de DHT atuam como reguladores negativos da expressão destes receptores, efeito este aumentado quando na presença de flutamida. Ainda que a DHT baixa não altere os níveis de expressão destes receptores, eles apresentam uma interessante resposta na sua dinâmica de localização celular. O tratamento

com DHT baixa foi capaz de estimular a proliferação celular, o que foi intensificado pela associação à flutamida. A partir dos resultados aqui apresentados, sugerimos que a mutação T877A atribui vantagem proliferativa às células que a expressam. Assim, o processamento aberrante do mRNA pode favorecer a proliferação das células prostáticas.

A adaptação das células tumorais às mudanças do meio pode ocorrer via diferentes mecanismos, os quais podem envolver respostas bastante complexas. Estas adaptações envolvem desde alterações genéticas, polimorfismos, alteração de crescimento e apoptose, até alteração a nível hormonal. Esse complexo mecanismo justifica a necessidade de mais pesquisas que visem esclarecer o papel das AR-Vs no estabelecimento e progressão do CaP hormônio-sensível. Ainda que o presente trabalho represente uma caracterização preliminar, ele deve ser estendido no futuro de forma a melhorar significativamente a compreensão da modulação androgênica de AR-Vs em tumores de próstata e, talvez, indicar novas abordagens terapêuticas para o CaP em estágio inicial. Demonstramos que as AR-Vs são expressas já no tecido benigno e CaP hormônio-sensível e que a expressão dessas variantes sofre modulação androgênica.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aaron, L., O. E. Franco, et al. (2016). "Review of Prostate Anatomy and Embryology and the Etiology of Benign Prostatic Hyperplasia." Urol Clin North Am **43**(3): 279-288.
- Anderson, K. M. and S. Liao (1968). "Selective retention of dihydrotestosterone by prostatic nuclei." Nature **219**(5151): 277-279.
- Antonarakis, E. S., A. J. Armstrong, et al. (2016). "Androgen receptor variant-driven prostate cancer: clinical implications and therapeutic targeting." Prostate Cancer Prostatic Dis **19**(3): 231-241.
- Antonarakis, E. S., C. Lu, et al. (2014). "AR-V7 and resistance to enzalutamide and abiraterone in prostate cancer." N Engl J Med **371**(11): 1028-1038.
- Ast, G. (2004). "How did alternative splicing evolve?" Nat Rev Genet **5**(10): 773-782.
- Balk, S. P. and K. E. Knudsen (2008). "AR, the cell cycle, and prostate cancer." Nucl Recept Signal **6**: e001.
- Bayar, G., H. Sirin, et al. (2017). "Low free and bioavailable testosterone levels may predict pathologically-proven high-risk prostate cancer: a prospective, clinical trial." Turk J Urol **43**(3): 289-296.
- Berrevoets, C. A., P. Doesburg, et al. (1998). "Functional interactions of the AF-2 activation domain core region of the human androgen receptor with the amino-terminal domain and with the transcriptional coactivator TIF2 (transcriptional intermediary factor2)." Mol Endocrinol **12**(8): 1172-1183.
- Berry, S. J., D. S. Coffey, et al. (1984). "The development of human benign prostatic hyperplasia with age." J Urol **132**(3): 474-479.
- Bertin, J., A. Y. Dury, et al. (2015). "Accurate and sensitive liquid chromatography/tandem mass spectrometry simultaneous assay of seven steroids in monkey brain." Steroids **98**: 37-48.
- Biolchi, V., B. Silva Neto, et al. (2013). "Androgen receptor GGC polymorphism and testosterone levels associated with high risk of prostate cancer and benign prostatic hyperplasia." Mol Biol Rep **40**(3): 2749-2756.
- Bruchofsky, N. and J. D. Wilson (1968). "The intranuclear binding of testosterone and 5-alpha-androstan-17-beta-ol-3-one by rat prostate." J Biol Chem **243**(22): 5953-5960.
- Buchanan, G., R. A. Irvine, et al. (2001). "Contribution of the androgen receptor to prostate cancer predisposition and progression." Cancer Metastasis Rev **20**(3-4): 207-223.
- Bushman, W. (2009). "Etiology, epidemiology, and natural history of benign prostatic hyperplasia." Urol Clin North Am **36**(4): 403-415, v.
- CancerResearchUK (2011). Prostate Cancer (C61), World Age-Standardised Incidence and Mortality Rates, Regions of the World, 2008 Estimates. **2012**.
- Cao, B., Y. Qi, et al. (2014). "Androgen receptor splice variants activating the full-length receptor in mediating resistance to androgen-directed therapy." Oncotarget **5**(6): 1646-1656.
- Carson, C., 3rd and R. Rittmaster (2003). "The role of dihydrotestosterone in benign prostatic hyperplasia." Urology **61**(4 Suppl 1): 2-7.
- Castrignano, T., R. Rizzi, et al. (2006). "ASPIC: a web resource for alternative splicing prediction and transcript isoforms characterization." Nucleic Acids Res **34**(Web Server issue): W440-443.

- Chatterjee, B. (2003). "The role of the androgen receptor in the development of prostatic hyperplasia and prostate cancer." Mol Cell Biochem **253**(1-2): 89-101.
- Cheng, J., Y. Wu, et al. (2010). "The transcriptomics of de novo androgen biosynthesis in prostate cancer cells following androgen reduction." Cancer Biol Ther **9**(12): 1033-1042.
- Damber, J. E. and G. Aus (2008). "Prostate cancer." Lancet **371**(9625): 1710-1721.
- DATASUS. (2018). "TABNET: Sistema de Informações em Saúde.", from <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=02>.
- Dehm, S. M., L. J. Schmidt, et al. (2008). "Splicing of a novel androgen receptor exon generates a constitutively active androgen receptor that mediates prostate cancer therapy resistance." Cancer Res **68**(13): 5469-5477.
- Denmeade, S. R. and J. T. Isaacs (2002). "A history of prostate cancer treatment." Nat Rev Cancer **2**(5): 389-396.
- Detre, S., G. Saclani Jotti, et al. (1995). "A "quickscore" method for immunohistochemical semiquantitation: validation for oestrogen receptor in breast carcinomas." Journal of Clinical Pathology **48**(9): 876-878.
- Dury, A. Y., Y. Ke, et al. (2016). "Precise and accurate assay of pregnenolone and five other neurosteroids in monkey brain tissue by LC-MS/MS." Steroids **113**: 64-70.
- Dutt, S. S. and A. C. Gao (2009). "Molecular mechanisms of castration-resistant prostate cancer progression." Future Oncol **5**(9): 1403-1413.
- Edwards, J., N. S. Krishna, et al. (2001). "Amplification of the androgen receptor may not explain the development of androgen-independent prostate cancer." BJU Int **88**(6): 633-637.
- Egan, K. B. (2016). "The Epidemiology of Benign Prostatic Hyperplasia Associated with Lower Urinary Tract Symptoms: Prevalence and Incident Rates." Urol Clin North Am **43**(3): 289-297.
- Feldman, B. J. and D. Feldman (2001). "The development of androgen-independent prostate cancer." Nat Rev Cancer **1**(1): 34-45.
- Ferlay, J., I. Soerjomataram, et al. (2015). "Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012." Int J Cancer **136**(5): E359-386.
- Foradori, C. D., M. J. Weiser, et al. (2008). "Non-genomic actions of androgens." Front Neuroendocrinol **29**(2): 169-181.
- Geller, J., D. J. de la Vega, et al. (1984). "Tissue dihydrotestosterone levels and clinical response to hormonal therapy in patients with advanced prostate cancer." J Clin Endocrinol Metab **58**(1): 36-40.
- Gianfrilli, D., S. Pierotti, et al. (2014). "Sex steroid metabolism in benign and malignant intact prostate biopsies: individual profiling of prostate intracrinology." Biomed Res Int **2014**: 464869.
- Gobinet, J., N. Poujol, et al. (2002). "Molecular action of androgens." Mol Cell Endocrinol **198**(1-2): 15-24.
- Goldenberg, S. L., A. Koupparis, et al. (2011). "Differing levels of testosterone and the prostate: a physiological interplay." Nat Rev Urol **8**(7): 365-377.
- Gottlieb, B., L. K. Beitel, et al. (2012). "The androgen receptor gene mutations database: 2012 update." Hum Mutat **33**(5): 887-894.
- Grossmann, M. E., H. Huang, et al. (2001). "Androgen receptor signaling in androgen-refractory prostate cancer." J Natl Cancer Inst **93**(22): 1687-1697.
- Guo, Z. and Y. Qiu (2011). "A new trick of an old molecule: androgen receptor splice variants taking the stage?!" Int J Biol Sci **7**(6): 815-822.

- Guo, Z., X. Yang, et al. (2009). "A novel androgen receptor splice variant is up-regulated during prostate cancer progression and promotes androgen depletion-resistant growth." *Cancer Res* **69**(6): 2305-2313.
- Hammond, G. L., M. Kontturi, et al. (1978). "Serum steroids in normal males and patients with prostatic diseases." *Clin Endocrinol (Oxf)* **9**(2): 113-121.
- Heracek, J., R. Hampl, et al. (2007). "Tissue and serum levels of principal androgens in benign prostatic hyperplasia and prostate cancer." *Steroids* **72**(4): 375-380.
- Hoke, G. P. and G. W. McWilliams (2008). "Epidemiology of benign prostatic hyperplasia and comorbidities in racial and ethnic minority populations." *Am J Med* **121**(8 Suppl 2): S3-10.
- Hornberg, E., E. B. Ylitalo, et al. (2011). "Expression of androgen receptor splice variants in prostate cancer bone metastases is associated with castration-resistance and short survival." *PLoS One* **6**(4): e19059.
- Hu, R., T. A. Dunn, et al. (2009). "Ligand-independent androgen receptor variants derived from splicing of cryptic exons signify hormone-refractory prostate cancer." *Cancer Res* **69**(1): 16-22.
- Hu, R., C. Lu, et al. (2012). "Distinct transcriptional programs mediated by the ligand-dependent full-length androgen receptor and its splice variants in castration-resistant prostate cancer." *Cancer Res* **72**(14): 3457-3462.
- Huggins, C. and C. V. Hodges (1941). "Studies on Prostatic Cancer. I. The Effect of Castration, of Estrogen and of Androgen Injection on Serum Phosphatases in Metastatic Carcinoma of the Prostate." *Cancer Res* **1**: 293-297.
- Huggins, C. and C. V. Hodges (2002). "Studies on prostatic cancer: I. The effect of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. 1941." *J Urol* **168**(1): 9-12.
- INCA, I. N. d. C. (2017). Estimativa 2018: Incidência de Câncer no Brasil. I. N. d. C. J. A. G. d. S. C. d. P. e. Vigilância. Rio de Janeiro.
- Kohli, M., Y. Ho, et al. (2017). "Androgen Receptor Variant AR-V9 Is Coexpressed with AR-V7 in Prostate Cancer Metastases and Predicts Abiraterone Resistance." *Clin Cancer Res* **23**(16): 4704-4715.
- Kristal, A. R., J. M. Schenk, et al. (2008). "Serum steroid and sex hormone-binding globulin concentrations and the risk of incident benign prostatic hyperplasia: results from the prostate cancer prevention trial." *Am J Epidemiol* **168**(12): 1416-1424.
- Labrie, F., A. Dupont, et al. (1993). "Intracrinology: the basis for the rational design of endocrine therapy at all stages of prostate cancer." *Eur Urol* **24 Suppl 2**: 94-105.
- Labrie, F., V. Luu-The, et al. (1997). "The key role of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases in sex steroid biology." *Steroids* **62**(1): 148-158.
- Lander, E. S., L. M. Linton, et al. (2001). "Initial sequencing and analysis of the human genome." *Nature* **409**(6822): 860-921.
- Li, Y., S. C. Chan, et al. (2013). "Androgen receptor splice variants mediate enzalutamide resistance in castration-resistant prostate cancer cell lines." *Cancer Res* **73**(2): 483-489.
- Lim, K. B. (2017). "Epidemiology of clinical benign prostatic hyperplasia." *Asian J Urol* **4**(3): 148-151.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." *Methods* **25**(4): 402-408.
- Locke, J. A., E. S. Guns, et al. (2008). "Androgen levels increase by intratumoral de novo steroidogenesis during progression of castration-resistant prostate cancer." *Cancer Res* **68**(15): 6407-6415.

- Lu, S., S. Y. Tsai, et al. (1997). "Regulation of androgen-dependent prostatic cancer cell growth: androgen regulation of CDK2, CDK4, and CKI p16 genes." Cancer Res **57**(20): 4511-4516.
- Luo, J. (2016). "Non-invasive actionable biomarkers for metastatic prostate cancer." Asian J Urol **3**(4): 170-176.
- Marcias, G., E. Erdmann, et al. (2010). "Identification of novel truncated androgen receptor (AR) mutants including unreported pre-mRNA splicing variants in the 22Rv1 hormone-refractory prostate cancer (PCa) cell line." Hum Mutat **31**(1): 74-80.
- Matlin, A. J., F. Clark, et al. (2005). "Understanding alternative splicing: towards a cellular code." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(5): 386-398.
- Mazhar, D. and J. Waxman (2002). "Prostate cancer." Postgrad Med J **78**(924): 590-595.
- McNeal, J. (1990). "Pathology of benign prostatic hyperplasia. Insight into etiology." Urol Clin North Am **17**(3): 477-486.
- Mobley, D., A. Feibus, et al. (2015). "Benign prostatic hyperplasia and urinary symptoms: Evaluation and treatment." Postgrad Med **127**(3): 301-307.
- Mohler, J. L., C. W. Gregory, et al. (2004). "The androgen axis in recurrent prostate cancer." Clin Cancer Res **10**(2): 440-448.
- Mongiu, A. K. and K. T. McVary (2009). "Lower urinary tract symptoms, benign prostatic hyperplasia, and obesity." Curr Urol Rep **10**(4): 247-253.
- Morgentaler, A. (2006). "Testosterone and prostate cancer: an historical perspective on a modern myth." Eur Urol **50**(5): 935-939.
- Nacusi, L. P. and D. J. Tindall (2009). "Androgen receptor abnormalities in castration-recurrent prostate cancer." Expert Rev Endocrinol Metab **4**(5): 417-422.
- Ntais, C., A. Polycarpou, et al. (2003). "Molecular epidemiology of prostate cancer: androgens and polymorphisms in androgen-related genes." Eur J Endocrinol **149**(6): 469-477.
- O'Dowd, G. J. V., R.W.; Miller, M.C (2001). "The Gleason Score: A Significant Biologic Manifestation of Prostate Cancer Aggressiveness On Biopsy." PCRI Insights **4**.
- O'Leary, M. P., J. T. Wei, et al. (2008). "Correlation of the International Prostate Symptom Score bother question with the Benign Prostatic Hyperplasia Impact Index in a clinical practice setting." BJU Int **101**(12): 1531-1535.
- Papazisis, K. T., G. D. Geromichalos, et al. (1997). "Optimization of the sulforhodamine B colorimetric assay." J Immunol Methods **208**(2): 151-158.
- Parsons, J. K., H. B. Carter, et al. (2005). "Serum testosterone and the risk of prostate cancer: potential implications for testosterone therapy." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **14**(9): 2257-2260.
- Penning, T. M., Y. Jin, et al. (2008). "Pre-receptor regulation of the androgen receptor." Mol Cell Endocrinol **281**(1-2): 1-8.
- Qu, Y., B. Dai, et al. (2015). "Constitutively active AR-V7 plays an essential role in the development and progression of castration-resistant prostate cancer." Sci Rep **5**: 7654.
- Roehrborn, C. G. and R. C. Rosen (2008). "Medical therapy options for aging men with benign prostatic hyperplasia: focus on alfuzosin 10 mg once daily." Clin Interv Aging **3**(3): 511-524.
- Scher, H. I. and C. L. Sawyers (2005). "Biology of progressive, castration-resistant prostate cancer: directed therapies targeting the androgen-receptor signaling axis." J Clin Oncol **23**(32): 8253-8261.
- Shi, X. B., A. H. Ma, et al. (2002). "Functional analysis of 44 mutant androgen receptors from human prostate cancer." Cancer Res **62**(5): 1496-1502.

- Silva Neto, B., W. J. Koff, et al. (2008). "Polymorphic CAG and GGC repeat lengths in the androgen receptor gene and prostate cancer risk: analysis of a Brazilian population." *Cancer Invest* **26**(1): 74-80.
- Skehan, P., R. Storeng, et al. (1990). "New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening." *J Natl Cancer Inst* **82**(13): 1107-1112.
- Smittenaar, C. R., K. A. Petersen, et al. (2016). "Cancer incidence and mortality projections in the UK until 2035." *Br J Cancer* **115**(9): 1147-1155.
- Sobin, L. H. and C. Wittekind, Eds. (2002). *TNM Classification of Malignant Tumours*. Cancer Society, A. C. (2018, January 4, 2018). "Key Statistics for Prostate Cancer." Retrieved 08/16/2018, from <https://www.cancer.org/cancer/prostate-cancer/about/key-statistics.html#references>.
- Stattin, P., S. Lumme, et al. (2004). "High levels of circulating testosterone are not associated with increased prostate cancer risk: a pooled prospective study." *Int J Cancer* **108**(3): 418-424.
- Sun, C., Y. Shi, et al. (2006). "Androgen receptor mutation (T877A) promotes prostate cancer cell growth and cell survival." *Oncogene* **25**(28): 3905-3913.
- Sun, S., C. C. Sprenger, et al. (2010). "Castration resistance in human prostate cancer is conferred by a frequently occurring androgen receptor splice variant." *J Clin Invest* **120**(8): 2715-2730.
- Tan, J., Y. Sharief, et al. (1997). "Dehydroepiandrosterone activates mutant androgen receptors expressed in the androgen-dependent human prostate cancer xenograft CWR22 and LNCaP cells." *Mol Endocrinol* **11**(4): 450-459.
- Taplin, M. E., B. Rajeshkumar, et al. (2003). "Androgen receptor mutations in androgen-independent prostate cancer: Cancer and Leukemia Group B Study 9663." *J Clin Oncol* **21**(14): 2673-2678.
- Titus, M. A., M. J. Schell, et al. (2005). "Testosterone and dihydrotestosterone tissue levels in recurrent prostate cancer." *Clin Cancer Res* **11**(13): 4653-4657.
- Tu, H., J. Gu, et al. (2017). "Low serum testosterone is associated with tumor aggressiveness and poor prognosis in prostate cancer." *Oncol Lett* **13**(3): 1949-1957.
- Uo, T. and C. Sprenger (2018). "Androgen Receptor Variants and Castration-resistant Prostate Cancer: Looking Back and Looking Forward." *Eur Urol* **73**(5): 724-726.
- Usoro, A. J., A. S. Obot, et al. (2015). "Serum Testosterone, 17beta-Estradiol and PSA Levels in Subjects with Prostate Disorders." *Indian J Clin Biochem* **30**(1): 59-65.
- van der Sluis, T. M., E. J. Meuleman, et al. (2012). "Intraprostatic testosterone and dihydrotestosterone. Part II: concentrations after androgen hormonal manipulation in men with benign prostatic hyperplasia and prostate cancer." *BJU Int* **109**(2): 183-188.
- van der Sluis, T. M., A. N. Vis, et al. (2012). "Intraprostatic testosterone and dihydrotestosterone. Part I: concentrations and methods of determination in men with benign prostatic hyperplasia and prostate cancer." *BJU Int* **109**(2): 176-182.
- Vasanwala, F. F., M. Y. C. Wong, et al. (2017). "Benign prostatic hyperplasia and male lower urinary symptoms: A guide for family physicians." *Asian J Urol* **4**(3): 181-184.
- Veldscholte, J., C. A. Berrevoets, et al. (1992). "The androgen receptor in LNCaP cells contains a mutation in the ligand binding domain which affects steroid binding characteristics and response to antiandrogens." *J Steroid Biochem Mol Biol* **41**(3-8): 665-669.
- Vichai, V. and K. Kirtikara (2006). "Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening." *Nat Protoc* **1**(3): 1112-1116.
- Watson, P. A., Y. F. Chen, et al. (2010). "Constitutively active androgen receptor splice variants expressed in castration-resistant prostate cancer require full-length androgen receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(39): 16759-16765.

- Weiner, A. B., R. S. Matulewicz, et al. (2016). "Increasing incidence of metastatic prostate cancer in the United States (2004-2013)." Prostate Cancer Prostatic Dis **19**(4): 395-397.
- Welen, K. and J. E. Damber (2011). "Prostate diseases--role of sex steroids and their inhibitors." Best Pract Res Clin Endocrinol Metab **25**(2): 355-367.
- Welti, J., D. N. Rodrigues, et al. (2016). "Analytical Validation and Clinical Qualification of a New Immunohistochemical Assay for Androgen Receptor Splice Variant-7 Protein Expression in Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer." European Urology.
- Xu, X., X. Chen, et al. (2015). "Current opinion on the role of testosterone in the development of prostate cancer: a dynamic model." BMC Cancer **15**: 806.
- Yeap, B. B., R. G. Krueger, et al. (1999). "Differential posttranscriptional regulation of androgen receptor gene expression by androgen in prostate and breast cancer cells." Endocrinology **140**(7): 3282-3291.
- Yu, Z., S. Chen, et al. (2014). "Rapid induction of androgen receptor splice variants by androgen deprivation in prostate cancer." Clin Cancer Res **20**(6): 1590-1600.
- Zegarra-Moro, O. L., L. J. Schmidt, et al. (2002). "Disruption of androgen receptor function inhibits proliferation of androgen-refractory prostate cancer cells." Cancer Res **62**(4): 1008-1013.
- Zhan, Y., G. Zhang, et al. (2017). "Interplay between Cytoplasmic and Nuclear Androgen Receptor Splice Variants Mediates Castration Resistance." Mol Cancer Res **15**(1): 59-68.
- Zhang, X., C. Morrissey, et al. (2011). "Androgen receptor variants occur frequently in castration resistant prostate cancer metastases." PLoS One **6**(11): e27970.
- Zhao, H., M. A. Coram, et al. (2012). "Transcript levels of androgen receptor variant AR-V1 or AR-V7 do not predict recurrence in patients with prostate cancer at indeterminate risk for progression." J Urol **188**(6): 2158-2164.

## 9. ANEXO I

### Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)

#### **Expressão gênica e proteica de isoformas do Receptor de Androgênios (AR) e sua modulação androgênica em hiperplasia prostática benigna e câncer de próstata**

Prezado Senhor

Estamos conduzindo um estudo para identificar características genéticas (expressão de genes) que podem se associar a um risco aumentado de desenvolver câncer de próstata ou hiperplasia prostática benigna.

A expressão modificada do receptor de androgênios pode estar envolvida com alterações no tecido normal da próstata que podem levar à formação da hiperplasia prostática benigna e do câncer de próstata.

Como o senhor tem o diagnóstico de \_\_\_\_\_ (hiperplasia prostática benigna ou câncer de próstata) e lhe foi recomendada cirurgia para a retirada da glândula, gostaríamos de convidá-lo para participar deste estudo. Caso aceite, sua participação no estudo consistirá em: uma coleta de amostra de sangue, a permitir que após a retirada da peça cirúrgica, três pequenos fragmentos da mesma (10 mm x 5 mm) sejam encaminhados para estudo genético (análise da expressão de genes e proteínas) e consulta a dados do seu prontuário, como idade, peso, altura, uso de medicamentos e dosagens hormonais anteriores. O restante da peça cirúrgica será destinado normalmente à biópsia (exame histopatológico). Portanto, não haverá modificação da técnica cirúrgica. O material será coletado após o término da cirurgia, e este procedimento não apresenta risco adicional conhecido para sua saúde, limitando-se aos procedimentos que já serão usados em sua cirurgia. Devemos salientar que os desconfortos que ocorrem após a cirurgia são devidos ao

procedimento cirúrgico em si e não têm relação com o procedimento de coleta dos pequenos fragmentos.

Quanto à coleta sanguínea, o Sr. será submetido à coleta de até 10 mL de sangue venoso, hoje, após lhe explicarmos este termo de compromisso e o senhor assiná-lo, com o objetivo de realizar dosagens de hormônios. Os riscos envolvidos com essa coleta são os inerentes ao procedimento, sendo a ocorrência de pequenos hematomas (manchas roxas) a alteração mais comum.

Se o Sr. concordar, armazenaremos as amostras de sangue e de tecido, por um período de 5 anos, para que outras características possam ser analisadas em outros trabalhos de nosso grupo relacionadas a linha de pesquisa “mecanismo de ação de hormônios esteróides em tecido prostático”. Novos projetos com a utilização deste material serão também apresentados ao Comitê de Ética em Pesquisa e um novo termo de consentimento será apresentado ao senhor. No futuro, essas características poderão auxiliar na identificação de fatores de risco de desenvolver tumores de próstata e também na compreensão do mecanismo de desenvolvimento destas alterações prostáticas. No entanto, os resultados deste estudo não trarão benefícios diretos para o senhor.

(     ) Aceito que minhas amostras restantes sejam armazenadas para investigações futuras.

(     ) Não aceito que minhas amostras restantes sejam armazenadas para investigações futuras.

O senhor é livre para decidir por participar ou não do estudo, e sua recusa não implicará em prejuízo a seu atendimento neste Hospital. Não haverá despesa para sua participação neste projeto. O senhor receberá uma via deste termo de consentimento, sendo que a qualquer momento o seu consentimento em participar deste estudo poderá ser retirado. Todas as informações obtidas estarão à sua disposição se assim desejar. Todos os resultados referentes à pesquisa serão utilizados para fins exclusivos de pesquisa, sendo resguardada sua total confidencialidade.

A pesquisadora responsável por este projeto é a Prof<sup>a</sup>. Dra. Ilma Simoni Brum da Silva (laboratório LAGOM, nº 12106, Centro de Pesquisa Experimental, HCPA, telefone 51 33597625 ou Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral, UFRGS, 51 33083559). Caso o senhor tenha qualquer dúvida sobre o projeto poderá nos contatar nos telefones indicados acima. Outras dúvidas podem também ser esclarecidas junto ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), de segunda à sexta-feira, das 8h às 17h no HCPA, telefone 51 33598304.

Eu, \_\_\_\_\_, fui informado dos objetivos e da justificativa da pesquisa de forma clara e detalhada, bem como do procedimento de coleta de sangue a que serei submetido e das determinações de características genéticas e sorológicas que serão realizadas. Recebi uma via deste termo de consentimento e também a garantia de resposta a dúvidas ou esclarecimentos relacionados à pesquisa e da segurança da confidencialidade dos dados obtidos.

Local e data: \_\_\_\_\_

Paciente ou responsável (nome legível): \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Pesquisador: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

## 10. ANEXO II

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE  
PORTO ALEGRE - HCPA /  
UFRGS



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Expressão gênica e proteica de isoformas do Receptor de Androgênios (AR) e sua modulação androgênica em hiperplasia prostática benigna e câncer de próstata.

**Pesquisador:** Ilma Simoni Brum da Silva

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 33432114.2.0000.5327

**Instituição Proponente:** Hospital de Clínicas de Porto Alegre

**Patrocinador Principal:** Hospital de Clínicas de Porto Alegre

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 834.783

**Data da Relatoria:** 15/10/2014

**Apresentação do Projeto:**

O câncer de próstata (CaP) e a hiperplasia prostática benigna (HPB) são as doenças da próstata mais comuns, e ambas são alterações do controle do crescimento prostático, compartilhando uma prevalência aumentada com o avanço da idade. A deprivação androgênica é uma das opções de tratamento mais comuns para o CaP e, embora resulte em um período de regressão clínica, muitos pacientes acabam progredindo para uma condição refratária à terapia hormonal, conhecida como CaP independente de androgênios (resistente à castração). Alterações moleculares no receptor de androgênios (AR) têm sido associadas à progressão do CaP.

**Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo Primário:

Analisar a expressão do RNAm e da proteína das isoformas do AR (AR3, AR4, AR5 e AR6) no tecido prostático proveniente de pacientes com HPB ou CaP, e avaliar a possível associação da expressão gênica e proteica dessas variantes do AR com a agressividade tumoral e a recidiva bioquímica.

Objetivo Secundário:

Quantificar e comparar a expressão proteica do AR e de suas isoformas AR3, AR4, AR5 e AR6 em tecido de CaP e HPB e em linhagem celular (CWR22Rv1); comparar a localização celular das

**Endereço:** Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2227 F  
**Bairro:** Bom Fim **CEP:** 90.035-903  
**UF:** RS **Município:** PORTO ALEGRE  
**Telefone:** (51)359--7640 **Fax:** (51)359--7640 **E-mail:** cephcpa@hcpa.ufrgs.br

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE  
PORTO ALEGRE - HCPA /  
UFRGS



Continuação do Parecer: 834.783

diferentes isoformas entre tecido tumoral e adjacente de CaP e tecido benigno de HPB; verificar a possível correlação entre a localização celular de cada isoforma com a agressividade tumoral e recidiva bioquímica do CaP; analisar a possível associação entre a expressão das isoformas do AR com a idade de desenvolvimento da HPB ou do CaP, com o estadiamento tumoral do CaP e níveis séricos de PSA; confirmar por sequenciamento a expressão das isoformas em tecido benigno e neoplásico; estudar a modulação hormonal das isoformas em cultura primária de HPB e de linhagem celular (LNCaP) via análises moleculares e proteicas; realizar a quantificação a quantificação sérica de testosterona total, SHBG e testosterona livre; quantificar os níveis de testosterona e diidrotestosterona intraprostáticos nos 3 tecidos analisados; realizar o acompanhamento dos pacientes que compõem o biorrepositório de tecido prostático do laboratório para avaliar o desfecho clínico; recidiva ou óbito.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Não há riscos conhecidos para o paciente. Os benefícios não serão diretos. Não será oferecido nenhum aconselhamento genético baseado nos dados do paciente mesmo que seja extensivo aos familiares.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

COMENTÁRIO DO CEP:

1) Um dos critérios de exclusão é uso de bloqueadores da alfa-redutase. Qual o período sem a utilização tendo em vista que este é um dos tratamentos indicados para HPB e haverá um bloqueio enzimático residual?

RESPOSTA PESQUISADORES:

Há pelo menos 3 meses, tempo necessário para que não haja ação residual. Esta informação foi acrescentada ao projeto.

PENDÊNCIA ATENDIDA

COMENTÁRIO DO CEP:

2) O que é caracterizado como material de descarte dos vários procedimentos cirúrgicos citados na página 19.

RESPOSTA PESQUISADORES:

O material de descarte se refere ao tecido que não é necessário para exame anatomopatológico de rotina e será descartado.

**Endereço:** Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2227 F  
**Bairro:** Bom Fim **CEP:** 90.035-903  
**UF:** RS **Município:** PORTO ALEGRE  
**Telefone:** (513)359--7640 **Fax:** (513)359--7640 **E-mail:** cephcpa@hcpa.ufrgs.br

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE  
PORTO ALEGRE - HCPA /  
UFRGS



Continuação do Parecer: 834.783

PENDÊNCIA ATENDIDA

COMENTÁRIO DO CEP:

3) As amostras serão coletadas pelos próprios participantes do estudo sem a presença de um patologista que garanta que a violação do espécime cirúrgico não acarretará dano ao uso da mesma para o diagnóstico e estadiamento oncológico.

RESPOSTA PESQUISADORES:

As coletas no bloco cirúrgico são realizadas pelo médico urologista responsável pela cirurgia que tem experiência na separação do tecido tumoral. Os participantes da pesquisa acompanham a coleta, recebem o material já separado, acondicionam e transportam para o laboratório.

PENDÊNCIA ATENDIDA

COMENTÁRIO DO CEP:

4) Qual será o momento exato de coleta de sangue do paciente e em que sitio de punção. Poderá ser durante a cirurgia?

RESPOSTA PESQUISADORES:

A coleta de sangue será realizada imediatamente após a aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Como são feitas dosagens hormonais a partir deste material coletado, não é possível realizar a coleta no momento da cirurgia uma vez que o paciente encontra-se hemodiluído (normalmente está sob soroterapia). Já realizamos algumas dosagens de amostras hemodiluídas, e observamos que os dados encontrados não se correlacionaram com as dosagens esperadas, mesmo após correção pela dosagem de albumina. A coleta será realizada por punção venosa periférica em membro superior.

PENDÊNCIA ATENDIDA

COMENTÁRIO DO CEP:

5) Só será coletado material de tumor? Não haverá coleta de áreas adjacentes ou de tecido normal?

RESPOSTA PESQUISADORES:

Coletamos sempre material de tumor, área adjacente (macroscopicamente normal) e tecido normal. O parágrafo foi modificado para ficar mais específico.

"Durante as cirurgias de Prostatovesiculectomia e Prostatectomia Radical para a retirada do tumor maligno, a próstata será fatiada pelo urologista para detectar o nódulo tumoral. Depois de localizado, o nódulo tumoral será retirado e dividido em duas partes, assim como o tecido

**Endereço:** Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2227 F  
**Bairro:** Bom Fim **CEP:** 90.035-903  
**UF:** RS **Município:** PORTO ALEGRE  
**Telefone:** (51)359--7640 **Fax:** (51)359--7640 **E-mail:** cephcpa@hcpa.ufrgs.br

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE  
PORTO ALEGRE - HCPA /  
UFRGS



Continuação do Parecer: 834.783

adjacente e tecido normal (distante do tumor). Um fragmento de cada amostra será enviado para o Serviço de Patologia a fim de confirmar o diagnóstico histológico, e o outro fragmento será armazenado em um criotubo plástico de 2,0 mL, imediatamente armazenado em RNAlater para transporte ao laboratório, sendo após armazenado em freezer -80°C.”

PENDÊNCIA ATENDIDA

COMENTÁRIO DO CEP:

6) Qual o local de armazenamento das amostras?

RESPOSTA PESQUISADORES:

As amostras são armazenadas em freezer - 80 °C no Departamento de Fisiologia - Instituto de Ciências Básicas da Saúde - UFRGS.

PENDÊNCIA ATENDIDA

COMENTÁRIO DO CEP:

7) Atualizar as referências que embasam o projeto. Há informações anacrônicas, como por exemplo, o TNM. Há citação de somente 3 artigos dos últimos três anos.

As questões comentadas deverão ser esclarecidas de acordo com as considerações apontadas na lista de pendências deste parecer.

RESPOSTA PESQUISADORES:

O TNM está descrito no parágrafo “O estadiamento patológico, pTNM, será avaliado de acordo com o resultado...”, página 24.

Foram incluídas novas referências mais atuais, e todas informações acrescentadas estão grifadas em amarelo.

PENDÊNCIA ATENDIDA

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

COMENTÁRIOS DO CEP:

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) necessita das seguintes adequações:

- a) A utilização das amostras para novos estudos é muito ampla. Deve ser especificada que tipo de estudos e em que linha de investigação estas amostras poderão ser utilizadas e por quanto tempo.
- b) Há termos contidos no TCLE que podem ser melhor explicados: peça cirúrgica, estudo genético (análise da expressão de genes), exame histopatológico...A linguagem deve ser a mais acessível possível.

**Endereço:** Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2227 F  
**Bairro:** Bom Fim **CEP:** 90.035-903  
**UF:** RS **Município:** PORTO ALEGRE  
**Telefone:** (51)359--7640 **Fax:** (51)359--7640 **E-mail:** cephcpa@hcpa.ufrgs.br

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE  
PORTO ALEGRE - HCPA /  
UFRGS



Continuação do Parecer: 834.783

- c) Não está mencionada a autorização para o acesso aos dados do prontuário do pacientes.
- d) Corrigir no segundo parágrafo a menção de não haver riscos. É necessário mencionar que não são conhecidos riscos e descrever os possíveis desconfortos.
- e) Mencionar que os participantes serão chamados para reconsentir no caso de uso das amostras armazenadas pelos pesquisadores.
- d) Informar que todas as dúvidas poderão ser esclarecidas antes e durante o curso da pesquisa, através de contato com o pesquisador responsável, incluindo seu nome e local de origem na instituição, com o respectivo telefone comercial. Se desejado, incluir o nome de outro pesquisador, além do pesquisador responsável. Não há a necessidade de celular dos pesquisadores no caso deste projeto. Responsável pelo projeto é somente um dos pesquisadores, o qual é o cadastrado como responsável na Plataforma Brasil. Rever a maneira como está descrito este parágrafo no TCLE.

**RESPOSTA DOS PESQUISADORES:**

Quanto às adequações propostas ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), todas as sugestões foram realizadas, e um novo TCLE foi anexado à Plataforma Brasil e ao WebGppg.

**PENDÊNCIAS ATENDIDAS**

O TCLE está redigido em linguagem clara e acessível, contendo todos os itens recomendados pelo CEP e diretrizes vigentes.

**Recomendações:**

Nada a recomendar.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

As pendências anteriormente apontadas foram atendidas e estão descritas nos campos Comentários e Considerações sobre a Pesquisa e Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória.

O projeto não apresenta pendências e está em condições de aprovação.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Endereço:** Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2227 F  
**Bairro:** Bom Fim **CEP:** 90.035-903  
**UF:** RS **Município:** PORTO ALEGRE  
**Telefone:** (513)359--7640 **Fax:** (513)359--7640 **E-mail:** cephcpa@hcpa.ufrgs.br

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE  
PORTO ALEGRE - HCPA /  
UFRGS



Continuação do Parecer: 834.783

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Lembramos que a presente aprovação (versão do projeto de 07/10/2014, TCLE de 07/10/2014 e demais documentos submetidos até a presente data, que atendem às solicitações do CEP) refere-se apenas aos aspectos éticos e metodológicos do projeto. Para que possa ser realizado o mesmo deverá estar cadastrado no sistema WebGPPG em razão das questões logísticas e financeiras.

O projeto somente poderá ser iniciado após aprovação final da Comissão Científica, através do Sistema WebGPPG.

Qualquer alteração nestes documentos deverá ser encaminhada para avaliação do CEP. Informamos que obrigatoriamente a versão do TCLE a ser utilizada deverá corresponder na íntegra à versão vigente aprovada. A comunicação de eventos adversos classificados como sérios e inesperados, ocorridos com pacientes incluídos no centro HCPA, assim como os desvios de protocolo quando envolver diretamente estes pacientes, deverá ser realizada através do Sistema GEO (Gestão Estratégica Operacional) disponível na intranet do HCPA.

PORTO ALEGRE, 16 de Outubro de 2014

---

**Assinado por:**  
**José Roberto Goldim**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2227 F  
**Bairro:** Bom Fim **CEP:** 90.035-903  
**UF:** RS **Município:** PORTO ALEGRE  
**Telefone:** (51)359--7640 **Fax:** (51)359--7640 **E-mail:** cephcpa@hcpa.ufrgs.br