

Índice

| | |
|--|----|
| Resumo/ <i>Abstract</i> | 3 |
| Agradecimentos..... | 4 |
| Introdução..... | 5 |
| Metodologia..... | 8 |
| O Carcinoma da Próstata..... | 9 |
| O Osso como Órgão Alvo de Metastização..... | 11 |
| O Processo de Metastização do Carcinoma da Próstata..... | 14 |
| • <i>Epithelial-to-Mesenchymal Transition</i> (EMT)..... | 14 |
| • Invasão Local e Extravasamento..... | 16 |
| • Disseminação..... | 17 |
| • Quimiotaxia..... | 17 |
| • Colonização do Osso..... | 18 |
| • Dormência..... | 21 |
| Linhas Celulares do Carcinoma da Próstata: Os modelos animais..... | 23 |
| A Doença Óssea Metastática do Carcinoma da Próstata..... | 24 |
| • <i>Osteomimicry</i> | 32 |
| • Nicho Hematopoiético..... | 33 |
| • <i>Vicious Cycle</i> | 34 |
| • Microambiente Ósseo e Tumoral..... | 35 |
| • Hipóxia e <i>Stress</i> Oxidativo..... | 37 |

| | |
|--|----|
| • <i>Stem Cells</i> Cancerígenas (CSCs)..... | 39 |
| • Outras Células do Microambiente Ósseo e Tumoral..... | 39 |
| • Genes, Fatores de Transcrição e microRNAs..... | 42 |
| • Moléculas Intervenientes mais relevantes..... | 46 |
| Tratamento das Metástases Ósseas do Carcinoma da Próstata..... | 51 |
| • Tratamento da Dor..... | 52 |
| • Cirurgia..... | 52 |
| • Radioterapia..... | 53 |
| • Bifosfonatos..... | 53 |
| • Denosumab..... | 55 |
| • Radiofármacos..... | 56 |
| • Outros fármacos..... | 58 |
| Conclusão..... | 60 |
| Lista de Acrónimos..... | 64 |
| Referências Bibliográficas..... | 65 |
| Anexo..... | 78 |

Resumo

A metastização óssea é um processo que atinge milhares de pessoas no Mundo, já que o osso apresenta características ótimas para a sobrevivência e proliferação das células. O Carcinoma da Próstata (PCa) é o tumor que mais contribui para esses números, devido à tendência que as suas células têm para atingir o osso. O PCa afeta milhões de homens e conduz a uma acentuada mortalidade e morbidade quando se encontra disseminado. A doença óssea metastática do PCa é, assim, um alvo de grande interesse por parte dos investigadores, pela pertinência em se conhecer os mecanismos que estão na base da sua génese e evolução. Desta forma, poder-se-ão desenvolver novas estratégias terapêuticas para tratar estes doentes que, até agora, apenas dispõem de terapias paliativas. Este artigo pretende fazer a revisão da informação existente nesta área e, com base na informação científica existente, esclarecer melhor os mecanismos fisiopatológicos que ocorrem desde o PCa localizado até à formação de metástases, essencialmente osteoblásticas, passando por todas as barreiras moleculares, celulares e microambientais que as células tumorais têm que ultrapassar até se instalarem no osso. Pretende, ainda, apresentar as opções terapêuticas atualmente aprovadas e ainda em investigação.

Palavras-chave: Carcinoma da Próstata; Metástases Ósseas; Osteoblástico; Fisiopatologia da Metastização; Tratamento das Metástases Ósseas do Carcinoma da Próstata.

Abstract

Bone metastasis is a process that affects thousands of people in the World, since the bone has optimal characteristics for cells' survival and proliferation. Prostate Cancer

(PCa) is the tumor that contributes the most for these numbers, mainly because its cells have a great tendency to reach the bone. PCa affects millions of men and leads to a great mortality and morbidity when disseminated. Therefore, PCa bone disease is a mark of great interest for many investigators and there is relevance in knowing the mechanisms related to the beginning and evolution of the disease. Thus, investigators will be able to develop new therapeutic strategies to treat these patients that, so far, only benefit from palliative therapies. This article intends to review the existing information about this subject and also, based on the existing scientific information, clarify the pathophysiology of PCa, showing all the molecular, cellular and microenvironment barriers that the tumor cells have to undergo before settling into the bone, starting with the localized disease and how it evolves to the formation of metastasis, predominantly osteoblastic. Also, this article presents the therapeutic options already approved and that are still under investigation.

Key-words: Prostate Cancer; Bone Metastasis; Osteoblastic; Pathophysiology of Metastasis; Treatment of Prostate Cancer Bone Metastasis.

Agradecimentos

À Professora Doutora Anabela Mota Pinto, agradeço a oportunidade que me deu em desenvolver este tema e, ainda, a sua incansável disponibilidade durante todos estes meses como orientadora.

Ao Dr. Carlos Rabaça, agradeço o papel que teve em sempre me manter orientada na correção científica do meu trabalho, como co-orientador.

À Dra. Leonor Salguinho, o meu obrigado pela ajuda que forneceu em todo o trabalho de secretariado.

Por último, mas não menos importante, agradeço aos meus amigos e família, em especial aos meus pais e irmã, que me têm apoiado em todo o meu percurso e têm sido o meu pilar nestes anos de curso.

Introdução

A próstata é uma glândula constituída por ductos prostáticos que estão assentes num estroma rico em fibroblastos, músculo liso e vasos sanguíneos (1). O Carcinoma da Próstata (PCa) é o cancro mais frequentemente diagnosticado no sexo masculino em países industrializados (2) e é a segunda causa de morte relacionada com cancro (3). Se a doença for detetada num estadio inicial, a sobrevida aos 5 anos atinge quase os 100% (4). No entanto, em 5% dos casos já se encontra disseminada na altura do diagnóstico e, aí, a sobrevida desce drasticamente (5). A prostatectomia, a radioterapia externa ou a braquiterapia são os tratamentos de eleição na doença localizada e apresentam grande impacto na sobrevivência dos doentes. Porém, mesmo nos casos em que o PCa se julga estar localizado, já podem existir micrometástases, sendo mais tarde necessário outros tratamentos (6). O PCa pode metastizar para vários órgãos, como fígado, pulmão e cérebro, embora preferencialmente o faça para o osso. Cerca de 70 a 80% dos homens com PCa avançado têm metástases ósseas. (6, 7).

O osso tem um microambiente muito favorável ao crescimento e proliferação celular, nomeadamente tumoral. Em primeiro lugar, porque é muito vascularizado e por apresentar também muitas moléculas de adesão, fatores de crescimento, fatores angiogénicos e outras moléculas que são favoráveis à migração, adesão e multiplicação

das células malignas (8). Outro aspeto importante é o facto das próprias células ósseas, osteoblastos e osteoclastos, permitirem um constante *turnover* ósseo, o que facilita a interação com as células neoplásicas, acabando por promover a libertação de moléculas favorecedoras de todo este processo. Esta interação promove a formação de um ciclo vicioso que perpetua o processo de metastização (6).

Apesar de todas estas evidências, a fisiopatologia da metastização óssea ainda é largamente desconhecida, nomeadamente no que diz respeito às várias moléculas identificadas como tendo um importante papel a desempenhar na metastização óssea do PCa. Uma questão interessante e intrigante é o facto das metástases ósseas do PCa serem preferencialmente osteoblásticas, o que não acontece com a maioria das restantes metástases ósseas de outras neoplasias (8).

Para além das moléculas, existem muitos outros fatores que fazem do osso um órgão preferencial de metastização, não só do PCa, mas também de outros, como o da mama. Aliás, as metástases ósseas são a maior causa de morbidade nestes carcinomas. A morbidade, e também a mortalidade, relacionam-se com as consequentes complicações ósseas, designadas *Skeletal Related Events* (SREs), como a hipercalcémia, fraturas patológicas, compressão medular e dor óssea (9).

Para além destas temáticas, serão também abordados os mecanismos que as células neoplásicas conseguem ultrapassar até surgir invasão e proliferação óssea, começando pela transformação das células de características epiteliais para mesenquimatosas, processo decisivo para a sua mobilidade e sobrevivência fora do microambiente local (6). Seguem-se vários processos que permitem a quimiotaxia das células em direção aos vasos sanguíneos e linfáticos, a angiogénese, a entrada e sobrevivência em circulação, o *homing* ósseo, o período de dormência (que pode durar

vários anos), o ciclo vicioso criado no microambiente metastático e as interações bidirecionais entre as células que compõem o osso normal e as células tumorais (6, 7).

É também pela complexidade em torno desta patologia que a procura por uma terapêutica eficaz se torna complexa e incessante. Para além dos Bifosfonatos, cuja principal função é reduzir as complicações esqueléticas nestes doentes, muito poucas alternativas existem. O Denosumab, anticorpo monoclonal que inibe o *Receptor activador of nuclear factor kappa-B ligand* (RANKL), é uma alternativa recente, aparentemente eficaz, e com vantagens em relação ao Ácido Zoledrónico. Existem, no entanto, muitos outros fármacos a ser investigados e alguns já aprovados para uso clínico (10).

Apesar de todas as dúvidas há, contudo, a teoria de *Seed and Soil*, descrita em 1889 por Paget, que permanece atual. Paget considerava que certos tumores tendencialmente metastizam para determinados órgãos porque existe uma afinidade entre eles. As células neoplásicas crescem em ambientes que lhes são favoráveis e onde existem interações específicas entre elas e as células residentes (8, 11).

Torna-se, assim, fundamental a procura de explicações para todas as questões que ainda se põem em relação a esta temática. É necessário perceber quais os fatores principais e os secundários que atuam na progressão do PCa para o osso, e como todos estes processos se conjugam, para poderem ser desenvolvidas novas e eficazes formas de tratar estes doentes. É com este objetivo que me proponho abordar este tema de grande interesse, não só porque é uma realidade extremamente frequente, como é uma esfera ainda não totalmente conhecida da Medicina.

Metodologia

A pesquisa bibliográfica para a elaboração deste trabalho foi realizada no dia 9 de Julho de 2014. A estratégia de pesquisa “PICO” não se adequou ao tema em questão pelo que não foi utilizada. De seguida recorreu-se ao Método “Pull”. A pesquisa na base de dados *Dynamed* teve como palavras-chave “*Prostate Cancer*” e após este passo seleccionei a opção “*Complications and Associated Conditions*”. Foram encontrados 2 artigos de relevo. De seguida, foi feita a pesquisa na base de dados *PubMed*, tendo em conta a seguinte *Clinical Query*: “*Prostatic Neoplasms*” AND “*Bone Neoplasms*”. Não foram utilizados quaisquer qualificadores. Foram encontrados 4372 artigos e usados os seguintes filtros: bibliografia dos últimos 5 anos, língua inglesa, língua portuguesa e espécie humana. No final, obtiveram-se 743 artigos. De modo a seleccionar os de maior interesse, foram escolhidos, com base no título e *abstract*, 106 artigos, ou seja, foram excluídos 637 artigos. Por fim, ainda no *PubMed*, com vista a obter os artigos mais recentes sobre este tema que ainda não estão indexados pelos termos *MeSH*, realizou-se a pesquisa com a seguinte *Clinical Query*: “*Prostate Cancer*” AND “*Bone Metastasis*”. Aplicaram-se os filtros: data (01/01/2014 a 09/07/2014), língua inglesa, língua portuguesa e espécie humana. Desta pesquisa obtiveram-se 15 artigos, dos quais 3 considerados relevantes tendo em conta o título e o *abstract*. A base de dados *The Cochrane Library* não revelou artigos diferentes dos já encontrados anteriormente. Por fim, realizou-se uma pesquisa na base de dados *Index Online* (Revistas Médicas Portuguesas) mas também não foram seleccionados artigos de relevo para o trabalho.

O Carcinoma da Próstata

O PCa é o cancro mais frequente em homens com mais de 50 anos (5) e é o segundo cancro com mais mortalidade, nomeadamente na Europa e Estados Unidos da América. Nos países asiáticos a sua incidência também tem vindo a aumentar (2). O prognóstico é bastante bom quando detetado precocemente, o que acontece na maioria dos casos (12), e têm-se verificado cada vez maiores taxas de sobrevida nos casos de doença localizada e também na doença avançada (13). Porém, verifica-se que muitos casos já estão metastizados quando são diagnosticados. Nestes, a sobrevida aos 5 anos é apenas de 33% (4). Uma das características do PCa é ter uma grande propensão para originar metástases ósseas, o que acontece em 70 a 80% dos casos em estado avançado (14). Além disso, as metástases ósseas são a principal causa de morbilidade e mortalidade nestes doentes. Verifica-se, mesmo, que 80 a 90% dos homens que morrem com PCa apresentam metástases ósseas (15, 16). Para além de metastizar para o osso, o PCa também o faz para outros órgãos como os gânglios linfáticos, fígado, pulmões e cérebro (4, 6, 17, 18).

Vários fatores já foram descritos como sendo importantes na iniciação e desenvolvimento do PCa, no entanto, nenhum ainda se mostrou determinante. Sabe-se que estão envolvidos tanto fatores genéticos como ambientais. A idade é o fator de risco melhor estudado. Sabe-se que a doença é muito rara antes dos 40-50 anos e grande parte dos doentes tem mais de 65 anos (3). Outros fatores promotores do PCa estudados são: desequilíbrio androgénico, desequilíbrio dos fatores oxidantes e antioxidantes, gorduras alimentares e lesões pré-malignas da próstata (19). Várias alterações genéticas e epigenéticas também já foram identificadas e estudadas, nomeadamente nos genes *PTEN*, *p27*, *c-myc* e *SMAD4* (20).

Com a generalização do uso do *Prostate Specific Antigen* (PSA) e toque rectal, o diagnóstico de novos casos de PCa tem vindo a ser cada vez mais frequente e a mortalidade tem vindo a diminuir devido à deteção mais precoce (21). O PSA é utilizado não só para diagnóstico, mas também para monitorização da resposta da doença ao tratamento. No entanto, nem sempre o valor do PSA se correlaciona da melhor maneira com a doença, pelo que novos marcadores têm vindo a ser investigados (7, 22).

Contudo, são os exames imagiológicos que mais contribuem para o estadiamento da doença. Hoje em dia, as modalidades disponíveis para o estudo da doença localizada são: Ecografia Transretal, Tomografia Computorizada (TC), Ressonância Magnética (RM) e Tomografia de Emissão de Positrões (PET) (21). A Ecografia Transretal é um exame acessível e barato, mas é limitado no que diz respeito ao estadiamento. É sobretudo muito utilizado para guiar a realização de biópsias transretais. A TC também pode ser utilizada, mas com algumas limitações, já que a sua resolução, por vezes, não permite distinguir com certeza o tecido tumoral das estruturas adjacentes. A PET permite avaliar a doença do ponto de vista funcional e metabólico e tem vindo a tornar-se mais importante ao longo dos anos. Porém, destes exames, a RM multiparamétrica é a que tem maior resolução espacial. Novas técnicas têm vindo a ser incorporadas na RM de modo a obter maior sensibilidade e especificidade no diagnóstico e estadiamento do PCa (21). É de referir a técnica de espectroscopia por RM, que tem sido utilizada recentemente para melhor caracterizar as alterações metabólicas que ocorrem durante a progressão da doença, aliando-se, assim, às restantes propriedades da RM. Apesar de todos estes exames complementares, ainda continua a investigação no sentido de encontrar novos e mais precisos métodos de diagnóstico e, também, novos marcadores prognósticos (23).

A doença localizada pode ser tratada com cirurgia e radioterapia e os resultados são muito satisfatórios (2). Porém, poucas são as alternativas eficazes para a doença avançada. A primeira linha é a terapia de privação androgénica (24). Apesar da grande eficácia inicial, a maioria dos tumores torna-se resistente ao tratamento (*Castration-resistant Prostate Cancer* (CRPC)) (13) e a doença progride rapidamente ao final de alguns meses de tratamento (18). Além disso, a falta dos androgénios leva à desmineralização óssea (12), o que pode ser crítico, já que a isto se alia a osteólise provocada pelas metástases, conduzindo a uma maior probabilidade de fratura (12, 25). Além da terapêutica anti-androgénica, deve-se ter em conta que a desmineralização pode ser mais acentuada pela idade que os doentes apresentam e por alterações do metabolismo do cálcio (26). Há que ter em conta que a osteólise provocada pela privação androgénica conduz também à libertação de moléculas que estimulam a proliferação das células tumorais a nível do osso (24).

O Osso como Órgão Alvo de Metastização

O osso é um órgão com características ótimas para a instalação de metástases, por ser uma fonte de muitos fatores de crescimento e de moléculas sinalizadoras. Os carcinomas que mais metastizam para o osso são os que têm origem na próstata, mama, pulmão, rim e tiróide (27, 28). A propensão que estes carcinomas têm em formar metástases ósseas tem sido alvo de investigação árdua (13). Estas metástases podem ser classificadas como osteolíticas, osteoblásticas ou mistas (29). Alguns tumores têm maior propensão para formar um determinado tipo de metástases ósseas, como é o caso do PCa que origina, na maior parte das vezes, metástases osteoblásticas. Porém, mesmo nestas situações, existe sempre um componente osteolítico que culmina na formação de

um novo osso extremamente frágil (30). Assim, verifica-se que a remodelação óssea é extremamente importante neste processo patológico.

O *turnover* ósseo é um processo fisiológico que ocorre durante toda a vida. É um processo dinâmico e regulado de forma muito precisa (10, 13). Mas a remodelação óssea só pode funcionar se houver o chamado *coupling* entre a normal reabsorção e deposição óssea (10). As células protagonistas deste processo são os osteoclastos e os osteoblastos. Os osteoclastos derivam da linhagem mielóide, nomeadamente do sistema fagocitário mononuclear. Durante a sua formação originam, por fusão, células multinucleadas (10, 31). Os osteoclastos, através da acidificação do meio, conseguem dissolver os cristais de hidroxiapatite e, assim, destruir o osso pré-existente (25). Além disso, parecem ter um papel ativo na facilitação da invasão metastática (32) e permitem interações bidirecionais com as células malignas (6). A ação dos osteoclastos é considerada, por isso, o passo “chave” para uma metastização bem-sucedida (7). Os osteoblastos, por outro lado, são formados a partir de células estaminais mesenquimatosas e dão origem aos osteócitos (13). São os responsáveis pela deposição de novo osso. Os osteócitos também parecem ter algum papel na comunicação com as células cancerígenas e na regulação da osteoclastogénese (27).

Durante a osteólise são libertados muitos fatores como: *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β), *Insulin-like Growth Factor-2* (IGF-2), *Bone Morphogenic Proteins* (BMPs), *Parathyroid Hormone-related Protein* (PTHrP) e RANKL (6, 12). Estes mesmos fatores, associados a outros, como por exemplo as metaloproteinases (MMPs), regulam a osteoclastogénese e têm um papel essencial na iniciação e progressão das metástases ósseas (30). Os osteoblastos também são uma fonte de fatores de crescimento, libertando frequentemente BMPs, IGF-1 e 2, TGF- β , *Fibroblast Growth Factor* (FGF), *Platelet-derived Growth Factor* (PDGF), *Vascular Endothelial Growth*

Factor (VEGF) e *Wnt* (7), que ajudam à sobrevivência das células cancerígenas, nomeadamente do PCa (24). No entanto, muitos dos mecanismos cruciais que contribuem para este processo ainda estão por esclarecer (33).

Algumas células constituintes do estroma ósseo também interagem eficazmente com as células metastáticas como: células neuronais, plaquetas, células endoteliais, células mesenquimatosas e células inflamatórias (18, 34). Esta interação resulta em ativação simpática, agregação plaquetar, formação de neovasos e libertação de mais moléculas estromais estimuladoras (34, 35). O microambiente ósseo é, assim, uma ótima fonte de fatores de adesão, fatores de crescimento, fatores endócrinos e células auxiliares de todo este processo, que fazem do osso um local único para a proliferação celular (13).

Para avaliar a reabsorção óssea que ocorre durante a metastização, existem marcadores bioquímicos que podem ser doseados no soro dos pacientes. O mais conhecido é a fosfatase alcalina, embora também existam outros, dos quais se destaca o *N-telopeptide of type 1 collagen* (12). O primeiro diz respeito à atividade osteoblástica e o segundo à osteoclástica (36) e ambos costumam estar aumentados nestes pacientes devido ao alto *turnover* ósseo (37). No entanto, existem muitas dúvidas quanto à utilidade clínica destes marcadores séricos, assim como a sua correlação com a doença. Assim sendo, continuam a ser estudadas novas moléculas, com vista a encontrar marcadores com maior sensibilidade e especificidade, para deteção e acompanhamento das metástases ósseas (25).

O Processo de Metastização do Carcinoma da Próstata

Quando se verifica a presença de metástases ósseas, a doença já é considerada incurável (27). Porém, até atingir este estadio de doença, existem muitas etapas pelas quais as células têm que passar e sobreviver (4). Falando especificamente nas células do PCa, estas têm que começar por se destacar do seu microambiente tumoral e invadir localmente os vasos sanguíneos. Seguem-se várias etapas que passam pela migração da células por via linfática e hematogénea até atingirem a medula óssea e formarem micrometástases que, posteriormente, podem entrar em dormência ou proliferar ativamente (4, 6). Estes processos têm vindo a ser intensivamente estudados, na tentativa de encontrar novos alvos terapêuticos que visam atuar antes do estabelecimento das metástases. Além disso, outro alvo de interesse é conhecer o porquê de certos PCa permanecerem latentes por tempo indeterminado e outros evoluírem rapidamente para a metastização, na expectativa de poder identificar estes doentes e tratá-los de forma mais eficaz (5).

- ***Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT)***

As células do PCa apresentam características epiteliais, nomeadamente a adesividade, incapacidade de mobilização e polarização apicobasal (6, 7). As moléculas de adesão celular, nomeadamente selectinas e caderinas, ajudam na adesão célula-a-célula que caracteriza os epitélios normais, assim como na comunicação entre elas (6). A E-caderina é uma das moléculas mais bem estudadas. A perda desta proteína conduz à dissociação entre as células e, assim, à facilitação da disseminação (38). Além disso, a perda da E-caderina está relacionada com um PCa de pior prognóstico (39).

A *Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT)* é o primeiro acontecimento “chave” que conduz à invasibilidade do PCa (40). Por isso, encontrar alvos terapêuticos

que atuam a este nível é o objetivo de muitos investigadores. Esta EMT já foi demonstrada em muitos tipos de tumores e está relacionada com a progressão para metástases (6, 41). É um processo através do qual as células de características epiteliais adquirem características mesenquimatosas, nomeadamente adquirindo mobilidade e evitando a adesão célula-a-célula (1, 42, 43). As células passam também a ter maior resistência à apoptose (44). É importante salientar que este é um processo reversível. É facilitado por alterações genéticas e fatores de transcrição que também atuam na fase embrionária do ser humano, nomeadamente a superfamília do TGF- β e família *Wnt* (1, 7).

Uma das evidências de que houve EMT numa célula é a diminuição da expressão da E-caderina, enquanto a N-caderina, característica de células mesenquimatosas, se torna altamente expressa. Este *cadherin switch* já demonstrou relacionar-se com um fenótipo tumoral mais invasivo (6). Ye et al. demonstraram o papel de vários repressores da E-caderina, como *ZEB1* e *Src Family Kinases* (SFKs) e também demonstraram, mais uma vez, tal como outros grupos de estudo, que a concentração de E-caderina está diminuída na doença metastática em relação ao PCa localizado (38).

Morimoto e os seus colaboradores conseguiram provar que a proteína *NEDD9* regula a EMT, assim como outras etapas da metastização do PCa. *NEDD9* é uma proteína reguladora de citoesqueleto. O TGF- β , que está em altas concentrações no PCa, estimula esta proteína, o que condiciona maior capacidade invasiva pelas células. Verificou-se, neste estudo, que a concentração de *NEDD9* era muito mais elevada nos modelos animais com metástases ósseas do que naqueles com PCa localizado ou mesmo sem neoplasia, e que a inibição da sua expressão conduzia à reversão da EMT (2).

O fator de transcrição *Runx2* e o gene da *Osteoprotegerin* (OPG), que vão ser descritos mais à frente, também favorecem a transformação mesenquimatosa. Katapodis et al., porém, não conseguiram demonstrar quais os fatores que os regulavam, o que seria interessante do ponto de vista terapêutico (45). O fator de transcrição *Twist1* está igualmente associado à EMT e à inibição da transcrição da E-caderina, assim como à formação de *stem cells* a este nível (42).

Há evidência de que, através da EMT, as células malignas podem adquirir características de *stem cells*. Estas participam no restante processo de invasão pelo organismo, encontrando-se envolvidas, não só na fase de iniciação das metástases, mas também na sua proliferação e sobrevivência (41, 42, 46).

- **Invasão Local e Extravasamento**

Uma das etapas mais importantes deste processo implica que as células se destaquem do microambiente do seu tumor primitivo. É necessária a destruição da Matriz Extracelular (MEC) à sua volta, o que é conseguido por proteases (47). Esta etapa permite, desde logo, exercer uma pressão seletiva sobre as células. Muitas morrem e não chegam a metastizar, enquanto outras passam à fase seguinte (48).

Os fibroblastos do estroma do tumor primitivo podem adquirir, nesta fase, características de miofibroblastos, libertando elevadas quantidades de MMPs, assim como de outras moléculas como o *CXCL12*, *CCL2* e VEGF, que contribuem para a remodelação da MEC. Os macrófagos também têm um papel interessante no que respeita ao destacamento das células tumorais, pois produzem moléculas idênticas às anteriormente referidas (48).

As moléculas com atividade pró-angiogénica libertadas durante esta etapa permitem, por sua vez, originar neovasos no tumor inicial, vasos esses que apresentam

alta permeabilidade, contribuindo para o fácil extravasamento das células. Algumas evidências parecem apontar para mecanismos semelhantes no que respeita aos linfáticos, embora com muito menor expressão no PCa (48).

- **Disseminação**

Fala-se em células pré-metastáticas quando estas conseguem evitar a apoptose, proliferar incessantemente e atingir os vasos sanguíneos (13). A formação de metástases ósseas é favorecida pela utilização da via hematogénea, já que o osso, sobretudo a nível axial, é extremamente bem vascularizado (21).

Grande parte das células não chega a conseguir concluir a sua “viagem”, sobretudo devido ao ambiente hostil que encontra na corrente sanguínea (48). A migração pela corrente sanguínea implica, também, que as células consigam evitar o sistema imunitário (13).

- **Quimiotaxia**

A teoria de Stephen Paget, descrita em 1889, ainda se mantém atual, e é a teoria mais aceite no que respeita à tendência que certos tumores têm em metastizar para órgãos específicos. Esta teoria, denominada *Seed and Soil*, indica que esses mesmos órgãos secundários (*Soil*) têm que ter características que favorecem o crescimento e proliferação das células disseminadas (*Seed*), daí que elas se implantem nesses locais, estabelecendo uma espécie de simbiose com o microambiente do órgão que invadem (8, 11, 48). Esta teoria foi primeiro descrita para o cancro da mama, mas mais tarde estendeu-se a outros tumores (10). À luz desta teoria, sabe-se que as células do PCa são “conduzidas” preferencialmente para o osso por um processo biológico complexo, o que

começa por dever-se ao processo de quimiotaxia em direção a este órgão e mais tarde, ao seu rico microambiente (48).

As quimiocinas são proteínas destinadas a promover a quimiotaxia dos leucócitos perante a inflamação, embora também possam participar noutros processos de quimiotaxia, como é o caso da metastização (49). O *CXCR4*, assim como o seu ligando *CXCL12* demonstraram ter um papel na quimiotaxia de células endoteliais, assim como nas células metastáticas do PCa que vão para o osso. Estas células expressam *CXCR4* e *CXCR7*, outro recetor da mesma família, e são “atraídos” pelo gradiente de *CXCL12*. Isto porque, o *CXCL12*, também denominado *Stromal-Derived Factor-1*, é expresso em altas concentrações por osteoblastos, células endoteliais e outras células mesenquimatosas a nível do osso (9, 48, 50, 51). Certos polimorfismos do *CXCL12* parecem estar relacionados com maior probabilidade de desenvolvimento de estadios avançados do PCa, segundo Isman et al. (49). Um estudo demonstrou que anticorpos monoclonais com atividade neutralizadora do *CXCR4* reduziam a formação de metástases ósseas, não só no PCa mas também no carcinoma da mama (10). No entanto, o complexo *CXCR4/CXCL12* não é um fator suficiente para promover, sozinho, a quimiotaxia e posterior metastização do PCa, embora pouco se saiba sobre outras moléculas envolvidas (6). Outros fatores que podem auxiliar na quimiotaxia para o osso são o *Epidermal Growth Factor* (EGF), o IGF, o *Hepatocyte Growth Factor* (HGF) e o *Monocyte Chemotactic Protein-1* (6, 7).

- **Colonização do Osso**

Há células que são capazes de sobreviver durante todos os passos referidos anteriormente, mas acabam por não conseguir fazer o *homing* ao osso, ou seja, morrem

sem conseguir invadir este órgão (48). É necessário haver um reconhecimento específico pelo osso e capacidade invasora pelas células metastáticas (45).

A interação com o osso começa pela ligação das células metastáticas às células endoteliais dos vasos da medula óssea. Há maior afinidade por estas do que por quaisquer outras células endoteliais, segundo uma teoria denominada *Dock and Lock* (6). Neste procedimento, é extremamente importante a interação com integrinas, nomeadamente as integrinas $\alpha V\beta 3$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 2\beta 3$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ e $\alpha 5\beta 3$, entre outras menos estudadas (6, 7, 13, 52). As integrinas constituem uma família de proteínas recetoras intervenientes nos mais variados processos orgânicos e estão implicadas na fisiopatologia de muitas doenças (46). Por exemplo, a integrina $\alpha 4\beta 1$ auxilia a ligação das células malignas a elementos da MEC, como fibrinogénio, *ICAM* e *VCAM*. A $\alpha 5\beta 3$ tem uma atividade semelhante (48). As integrinas $\alpha V\beta 3$ e $\alpha 2\beta 3$, para além de expressas por células da linha PC3, uma linha celular do PCa utilizada em estudos com modelos animais, também são expressas por osteoclastos, o que facilita a interação com as células disseminadas. Estas integrinas ligam-se também à vitronectina e osteopontina, que fazem parte da MEC do osso. A integrina $\alpha 2\beta 1$ também é necessária para a colonização ao osso, na medida em que é expressa pelas células do PCa e serve de recetor ao colagénio tipo I no osso. O colagénio tipo I, sendo o maioritário constituinte da MEC, tem um papel muito importante no que respeita às metástases ósseas. Um estudo recente demonstrou que a presença desta interação referida permite maior invasibilidade pelas células do PCa (15).

A utilização de anticorpos contra a função da $\alpha V\beta 3$ demonstrou ser uma estratégia promissora contra a progressão do PCa e a formação de metástases ósseas. Isto é conseguido através de vários mecanismos diferentes, o que suporta a multifuncionalidade destas moléculas (46).

As P-selectinas, sendo moléculas de adesão, também constituem moléculas âncora às quais as células neoplásicas prostáticas se ligam, induzindo a sua passagem dos vasos para a medula, através do endotélio (6). As E-selectinas, da mesma família, são expressas pelas células endoteliais locais e também acabam por ter o mesmo efeito (4).

Podem ser referidas outras famílias de proteínas aqui implicadas. As MMPs são conhecidas pelo seu envolvimento no processo de metastização. São produzidas pelas células do estroma dos órgãos, neste caso concreto, do osso. Degradam a MEC, permitindo a migração das células disseminadas através deste órgão (26, 53). Porém, não são específicas do osso e estão presentes na grande maioria dos tecidos. Por outro lado, uma molécula da família das caderinas, a caderina-11, parece ter uma função específica no osso. Ela é largamente expressa pelas células malignas prostáticas que colonizam o osso mas não as que metastizam para outros órgãos nem mesmo no tecido prostático normal sugerindo, então, a sua função específica em facilitar o *homing* ao osso (6, 7).

As citocinas *CXCL16* e *CXCL1* contribuem para a adesão das células do PCa à MEC do osso, já depois de terem ultrapassado o endotélio vascular. Isto foi demonstrado num estudo que utilizou a linha celular C4-2B. Também se verificou que incentivam a proliferação das células disseminadas no osso, logo na fase inicial após a colonização (29). Associadamente, a citocina *CXCL5* também se verifica aumentada no PCa metastizado e induz maior invasibilidade às células (54).

As conexinas, proteínas existentes nas *gap junctions*, são responsáveis pela comunicação intercelular. A conexina 43 está especificamente envolvida na migração e adesão de células malignas, sendo altamente expressa no PCa, em diferentes etapas do

mesmo, e parece ter a função já descrita a nível do osso. A conexina 26 foi também identificada pelo mesmo grupo de estudo e parece estar relacionada com a adesão celular. Tem, também, a capacidade de promover a interação com osteoblastos e a mineralização óssea. As conexinas interagem com as caderinas durante todo este processo (55).

Devido à reabsorção óssea, é libertado cálcio ionizado (Ca^{2+}) para a circulação. Este parece ser estimulador das células metastáticas que chegam ao osso, nomeadamente porque as células têm recetores sensíveis ao cálcio (56). Além disso, o Ca^{2+} ajuda à sobrevivência das células e promove maior expressão da PTHrP (9), que será referida mais à frente.

As células que colonizam a medula óssea podem voltar a adquirir o fenótipo epitelial, através do processo inverso da EMT, ou seja, *Mesenchymal-to-Epithelial Transition*. Porém, nem todas passam por este processo, pelo que a população de células metastáticas fica bastante heterogénea (44).

Após a colonização da medula óssea e do seu estroma, as células metastáticas ocupam o espaço das células hematopoéticas (27). Mais tarde, conseguem migrar para a superfície do osso, onde vão começar a estimular os osteoclastos e osteoblastos (18) e continuar a degradar a MEC, sobretudo através da destruição do colagénio tipo I (57).

- **Dormência**

Após as células do PCa se encontrarem no osso, elas podem apresentar uma característica bastante peculiar: a dormência. Isto significa que estas células podem permanecer muitos anos num estado de nula ou quase nula proliferação. Sendo assim, não formam metástases detetáveis clinicamente. Uma corrente de pensamento admite que exista proliferação celular a um ritmo muito lento e idêntico ao ritmo de morte

celular, daí que persistam focos de micrometástases mas não sejam detetados durante tantos anos (48). Mais tarde, elas podem deixar de estar “adormecidas” e proliferar ativamente, embora, mais uma vez, os mecanismos aqui envolvidos não estejam esclarecidos (7, 58). Devido a este acontecimento, homens cuja doença era considerada curada acabam por ter recidivas anos mais tarde (58, 59). Três a cinco anos é o tempo médio esperado entre a deteção clínica destas metástases ósseas do PCa e a morte do paciente (30).

Parecem haver mecanismos genéticos e microambientais a nível ósseo a condicionar se as células se tornam ou não dormentes. A relação com as células estromais do osso, fatores de crescimento, fatores angiogénicos e mesmo com o sistema imunitário parece ser relevante (59). Uma das moléculas que parece estar implicada na dormência das células do PCa é o *Growth Arrest Specific 6* (GAS6). Porém, vários estudos indicam resultados contraditórios quanto a esta molécula (58, 60). O GAS6 parece induzir a paragem do ciclo celular nestas células (48). Taichman et al. verificaram que, quando as células do PCa interagem com osteoblastos, há um aumento da expressão de GAS6 e do seu recetor *AxL*. Este aumento provoca inibição da proliferação celular. Por outro lado, as células do PCa proliferam mais ativamente se o GAS6 estiver ausente do microambiente ósseo. Outra descoberta deste grupo foi que, quando o *AxL* é expresso em altas concentrações, as células tornam-se quiescentes. Todavia, à medida que a doença progride, isto é, quando as células passam a proliferar, o recetor *AxL* diminui em concentração, o que sugere o seu papel na dormência (58, 60). Jung et al. também obtiveram resultados idênticos num estudo utilizando a linha celular PC3 injetada por via intracardíaca em ratinhos, embora considerem que mais estudos devem esclarecer as informações contraditórias (60).

Parece existir uma relação da dormência com a aquisição de características de *stem cells* por parte das células metastáticas. As vias *Wnt*, *Notch* e *Hedgehog* parecem estar envolvidas. O fator de transcrição *Twist1* também pode ser identificado, já que demonstrou manter a sobrevivência das células em dormência (34). Também parece haver regulação pela via das *MAP* cinases e pela via *ERK*. A via das *MAP* cinases pode ser ativada por um membro da família do TGF- β , o BMP7, que induz senescência celular, tal como é demonstrado num estudo por Kobayashi et al. (59).

Linhas Celulares do Carcinoma da Próstata: Os modelos animais

Em parte, a dificuldade em perceber os mecanismos que envolvem a doença óssea metastática devem-se ao facto de ser muito difícil obter amostras de doentes, ou seja, amostras humanas. Por isso mesmo, têm-se usado cada vez mais modelos animais, sobretudo ratinhos, para os trabalhos científicos desta área (24, 60). Na maioria são ratinhos imunocomprometidos, geneticamente modificados (61). O modelo animal ideal deveria reproduzir todas as etapas da carcinogénese e disseminação existentes no Homem, embora hoje em dia isso ainda não tenha sido possível e, por isso, os resultados nem sempre são os mais corretos (13).

As células podem ser injetadas nestes animais por várias vias, nomeadamente intracardíaca, subcutânea, intratibial e intrafemoral (60-63). Na tabela seguinte estão identificadas as linhas celulares do PCa mais usadas hoje em dia nestes modelos animais. É importante conhecê-las e às suas características, de modo a compreender os diversos resultados obtidos por vários investigadores nesta área.

Tabela 1 – Descrição das linhas celulares do PCa que originam metástases ósseas em modelos animais.

| Linhas celulares do PCa | Metástases ósseas que originam | Outras características | Referências |
|--------------------------------|---------------------------------------|---|---------------------|
| PC3 | Osteolíticas | Altamente invasiva, mas existe uma variante do PC3 não invasiva | (11, 30, 54, 63-65) |
| LuCaP-35 | Osteolíticas | - | (61) |
| LuCAP-23 | Osteoblásticas | Origina tumores CRPC | (24) |
| MDA-PCa | Osteoblásticas | Apresenta dois subtipos: 2a e 2b | (24, 54, 62, 65) |
| PacMetUT1 | Osteoblásticas | - | (61) |
| VCaP | Osteoblásticas | - | (65) |
| C4-2B | Mistas | Deriva da linha LNCaP | (24, 26, 30, 63) |
| LNCaP | Mistas | Não apresenta bom crescimento no osso | (24, 30, 61, 64) |
| IGR-CaP1 | Mistas | - | (24) |
| PCSD1 | Mistas | - | (24) |

A Doença Óssea Metastática do Carcinoma da Próstata

Como referido anteriormente, vários são os fatores que contribuem para que o osso seja um órgão de eleição para a proliferação de células metastáticas. Importa particularizar e descrever as novas evidências científicas no que diz respeito

especificamente ao PCa, nomeadamente os mecanismos que conduzem à disseminação das células e qual o papel que tem o osso e os seus constituintes nesta doença (47).

Pensa-se que, muitos homens acima dos 50 anos desenvolvem PCa que nunca chega a ser diagnosticado, devido ao ritmo lento de desenvolvimento e incapacidade de disseminação nestes casos. Porém, a maior parte das mortes está relacionada com a existência de PCa com doença óssea metastática (58). Quando as metástases se desenvolvem, e sobretudo se são sintomáticas, a sobrevida dos pacientes, em geral, é pequena e o prognóstico muito mau (2). Há mesmo quem defenda que a presença de doença óssea metastática é o principal fator prognóstico para doentes com PCa, pela sua rápida progressão e mortalidade que condiciona (66).

As metástases ósseas do PCa são predominantemente osteoblásticas/osteoscleróticas, mas contendo sempre um componente osteolítico mais ou menos predominante (13, 26) que pode ser comprovado pela subida dos níveis serológicos dos biomarcadores de reabsorção óssea nestes doentes (8). Este mecanismo deve-se à disrupção do normal metabolismo e remodelação óssea, conseqüente à interação entre as células metastáticas e o osso. O facto da osteólise ser necessária para a inicial colonização das células malignas no osso foi apenas descoberto há pouco tempo (14, 30, 64). Não poderá existir deposição de novo osso sem reabsorção do que lá estava, como acontece no processo normal de *turnover* ósseo (26). De facto, apesar de haver grande deposição de novo osso, já foi demonstrado que é de extrema importância que haja osteólise inicialmente e ao longo de todo o processo (64).

Apesar da tendência osteoblástica, entre 20 e 60% dos doentes podem apresentar metástases de carácter misto ou mesmo apenas osteolítico (59), num processo que é multifactorial e mal conhecido (63). Neste último cenário, Secondini et al.

descobriram que as metástases osteolíticas do PCa não só necessitam de uma dominante ação dos osteoclastos, como também da inibição da deposição de novo osso através inativação dos osteoblastos (63, 67). Este caráter osteolítico pode estar associado a uma falta de emparelhamento de ambas as etapas (67).

Os osteoclastos constituem, então, um dos mais importantes intervenientes celulares. Um estudo realizado por Rafiei et al. em 2013 revelou que as células prostáticas são capazes de estimular a maturação de osteoclastos através de diferentes vias, nomeadamente através da estimulação do RANK. No entanto, também parece haver formação de novos osteoclastos de forma independente do RANKL (64). Patel et al. desenvolveram uma revisão tendo em conta este e outros aspetos e chegaram à mesma conclusão. Outras moléculas que podem intervir neste processo são, por exemplo, as citocinas IL-1, IL-6 e IL-8 (48). Verifica-se, assim, que as células metastáticas apresentam grande heterogeneidade e, por isso, é difícil desenvolver um tratamento eficaz que atue nesta etapa (68).

As células do PCa também produzem moléculas que estimulam os osteoblastos a formar novo osso. A ação destes está melhor estudada do que a dos osteoclastos. Está documentado que a deposição de osso se dá nas zonas que sofreram previamente osteólise (30). Nesta fase, a capacidade de osteoclastogénese diminui e a ação dos osteoblastos aumenta. Porém, o processo molecular exato não é totalmente conhecido (14). A interação entre as células tumorais e os osteoblastos está na base da compreensão do mecanismo que torna as metástases do PCa predominantemente osteoblásticas. Este processo está na dependência de fatores como IGF-1, IL-6 e TGF- β (45).

Verifica-se, por observação microscópica, que se depositam grandes quantidades de osteoblastos adjacentes às células metastáticas (62), o que não acontece noutros tumores que originam predominantemente metástases osteolíticas (7). Postula-se, ainda, que a formação de novo osso ajude a confinar as metástases que se encontram em desenvolvimento e atrase a sua progressão, embora nada tenha sido comprovado cientificamente (6).

O novo osso formado pelos osteoblastos não tem a estrutura laminar normal. É designado *woven bone*, pelo seu aspeto entrançado (24). Apesar de se traduzir numa imagem densa e esclerótica à radiografia simples, as fibras de colagénio do *woven bone* são desorganizadas e depositam-se entre as células tumorais, o que diminui a sua resistência e aumenta a probabilidade de fratura (13, 32, 69). Kirchenbaum e o seu grupo de estudo comprovaram que este fenótipo está, em parte, na dependência da estimulação pelos androgénios (70).

Logo que o esqueleto humano fica sujeito a uma proliferação metastática, um processo de intensa destruição óssea e crescimento tumoral inicia-se (30) e a doença é, teoricamente, incurável (10). Este dano ósseo é provocador de sintomas relacionados com o seu grande enfraquecimento. Estes sintomas não só são provocados pela baixa densidade óssea, como também pela grave desorganização do novo osso formado (71). As próprias metástases levam também à compressão das estruturas envolventes, nomeadamente estruturas nervosas, originando sintomas (64). A coluna vertebral, a pélvis e as zonas proximais dos ossos longos, sobretudo o fémur, são as zonas mais frequentemente afetadas, sobretudo pela sua abundância celular e vascular (72, 73).

Grande parte dos doentes, numa fase inicial, é assintomática, embora uma grande percentagem acabe, mais tarde ou mais cedo, por desenvolver sintomas (74). A

partir daqui, geralmente a doença tem uma evolução fulminante (66). Os denominados SREs surgem em quase 50% dos doentes, sendo que, estes doentes apresentam pior prognóstico que os assintomáticos (12). Dor óssea, fraturas patológicas, compressão medular e hipercalcemia constituem os quadros mais comuns (12, 28, 64) e geralmente necessitam de tratamento paliativo (75).

A dor óssea é tipicamente uma dor localizada à porção corporal afetada. Inicialmente intermitente, pode mais tarde tornar-se constante (28). A sua intensidade vai aumentando lentamente ao longo do tempo (76). É comum permanecer intensa durante a noite e em repouso (28). A dor parece resultar de vários mecanismos, entre os quais a ativação de vias nociceptivas, por meio da estimulação das fibras nervosas já invadidas (27).

Os corpos vertebrais constituem o local mais comum de fraturas patológicas (69). É comum, nestes casos, o doente sentir que a dor piorou de forma aguda (76). Mesmo na ausência de fratura, muitos doentes desenvolvem compressão medular, na ordem dos 5 a 10%. Vários autores defendem a necessidade de se conhecer concretamente os fatores de risco para estas duas situações de modo a atuar precocemente (77). Outro problema adicional é o aparecimento de hipercalcemia que pode ser grave, sobretudo pela sintomatologia cardíaca que pode originar (28), assim como problemas neurológicos, gastrointestinais, renais e, ainda, calcificação de tecidos moles (76). Não é raro, pelo contrário, surgir hipocalcemia, devido ao consumo exagerado de Ca^{2+} que a formação de metástases osteoblásticas implica. Porém, raramente origina sintomas (69). Alterações do metabolismo do fosfato podem também surgir (13), assim como falência medular (29). Este conjunto de SREs origina um estado grave de debilidade e impotência funcional, o que diminui significativamente a qualidade de vida dos doentes e acarreta custos adicionais muito elevados (5, 18, 26).

O exame imagiológico de eleição para estudar a doença óssea metastática do PCa é a Cintigrafia Óssea com Tecnésio-99m (99mTc) (21, 22, 25). Devido ao estado de intensa formação de novo osso, as células captam incessantemente o 99mTc (8). Assim, a Cintigrafia Óssea é utilizada numa primeira abordagem pois apresenta boa sensibilidade. No entanto, apresenta baixa especificidade e parece não ser a melhor opção em doentes com níveis de PSA menores que 20 ng/mL ou assintomáticos (21, 25). Mesmo no que respeita ao seguimento dos doentes após o tratamento, pode ser difícil a interpretação dos resultados. Falsos positivos podem surgir após traumatismos, doenças ósseas degenerativas, doença de Paget e inflamação (21, 22). Por isso, na maior parte das vezes, é necessário recorrer a outros exames complementares para retirar conclusões mais fidedignas (76).

A Ressonância Magnética (RM) é, provavelmente, o exame mais utilizado a seguir à Cintigrafia, e é sobretudo utilizado nos casos dúbios (22). A RM é capaz de detetar metástases intraósseas ainda numa fase inicial, quando estas têm pequenas dimensões e ainda não existe reação cortical considerável. É também o exame de escolha para estudo da compressão medular (76). A sensibilidade e especificidade deste exame é de quase 100% e a sua boa resolução espacial faz dele um exame complementar de escolha (21). Porém, é um exame caro e demorado (22). A espectroscopia por RM tem sido também utilizada, nomeadamente para auxiliar a diferenciação entre tumores benignos e malignos (22).

A radiografia simples apresenta algumas limitações por mostrar, na maior parte dos casos, apenas lesões osteoblásticas relativamente bem definidas, e apenas quando uma grande percentagem de osso já foi modificada. Por isso, acaba por ter utilidade somente em estadios avançados (75, 76). Pode dizer-se, também, que menospreza a incidência das metástases (22). Contudo, sempre que um doente com história clínica e

exame objetivo sugestivos de doença maligna presente dor óssea, deve obter-se uma radiografia simples de todas as porções dolorosas e, eventualmente, mais tarde, complementar a informação com outro exame (28, 76). Já a Tomografia Computorizada (TC) apresenta uma sensibilidade muito boa e pode mostrar a presença de atividade osteolítica e osteoblástica (21). Além disso, apresenta grande acuidade no estudo da destruição do córtex ósseo e do tumor inicial, mesmo que de pequenas dimensões, assim como na investigação da extensão aos tecidos moles circundantes (28, 76). Porém, a resolução anatômica não é tão boa quando comparada com a RM (76).

Devido às limitações da Cintigrafia, a PET com 18F-2-desoxiglucose (FDG-PET) tornou-se popular desde há alguns anos (22, 75). O FDG é um análogo da glucose captado pelas células (22). Assim, a FDG-PET não avalia diretamente a atividade tumoral, mas sim a atividade metabólica dos osteoblastos. Todavia, a relação entre ambos é fidedigna, pelo que este exame pode ser utilizado com segurança (36). Além disso, parece documentar a resposta ao tratamento muito precocemente (21). Apesar de uma ótima resolução funcional, a PET apresenta uma baixa resolução anatômica (76). Por isso, a combinação da PET com a TC é uma mais-valia nesse sentido (22, 76). É bastante eficaz na documentação do crescimento das lesões e remodelação óssea (71). Finalmente, a *Single Photon Emission Computed Tomography* (SPECT) parece ter uma precisão maior que a Cintigrafia no que respeita às metástases vertebrais e, quando combinada com a TC, também tem a vantagem de apresentar maior resolução anatômica. No entanto, ainda não é muito utilizada na prática clínica (21).

A utilização de um destes exames imagiológicos descritos não implica a exclusão dos outros. Pelo contrário, tenta-se cada vez mais utilizar uma estratégia *multistep*, já que não existe nenhum exame perfeito a todos os níveis (22).

O estudo imagiológico não deve ser repetido após pequenos intervalos de tempo porque as metástases ósseas modificam-se lentamente (36). Além disso, estes exames não mostram alterações agudas do metabolismo ósseo. Para tal, utilizam-se os biomarcadores séricos de remodelação óssea, como a fosfatase alcalina (25, 76). Outros testes laboratoriais podem ser importantes, por exemplo, na pesquisa de citopenias. Estas surgem devido à diminuição da hematopoiese que ocorre quando as células metastáticas se instalam na medula (28). O estudo iônico também é relevante, nomeadamente para verificar alterações do metabolismo fosfo-cálcico (76). Os níveis de PSA devem ser avaliados regularmente por permitirem a monitorização da evolução da doença (22). Por fim, a biópsia óssea pode ser um exame importante, na medida em que ajuda a fazer diagnóstico diferencial com outras patologias ósseas, assim como estuda lesões suspeitas em doentes assintomáticos (28). É importante confirmar a natureza da lesão antes de se partir para tratamentos agressivos. No entanto, é um método muito invasivo e dispendioso (76).

Sem dúvida, o PCa é a causa maioritária de metástases ósseas, quando comparado com os restantes carcinomas (12). Há alguns anos atrás, pensava-se que a existência do Plexo de Batson, um plexo venoso perivertebral, era o principal responsável pela tendência que as células do PCa têm em metastizar para o osso. Verifica-se que as lesões localizadas aos corpos vertebrais e costelas podem originar-se por células que sofreram disseminação hematogénea por esta via (22). Realmente há uma drenagem venosa preferencial a partir das veias pélvicas profundas para plexos venosos vertebrais e perivertebrais, por onde células malignas podem migrar da próstata até ao osso (78). Além disso, o Plexo de Batson apresenta um fluxo com características favoráveis à migração celular: baixa pressão e grande volume (76). Porém, não é um fator determinante nem fundamental quando comparado com a propensão molecular e

celular que existe (10, 78). Vários são os mecanismos que se podem enumerar, que contribuem para esta propensão:

- ***Osteomimicry***

Uma das características mais peculiares do PCa e que contribui para o anterior referido é o facto das células malignas demonstrarem uma propriedade denominada *osteomimicry* - aquisição de características idênticas aos osteoblastos e osteoclastos, após o *homing* ósseo (16). Há autores que consideram, porém, que algumas células disseminadas já apresentam esta característica antes de se instalarem no osso, o que lhes conferiria vantagem para se dirigirem a este órgão (24). Este *osteomimicry* implica que as células metastáticas sejam capazes de responder a estímulos originados pelo osso. Exemplo disso é a capacidade que têm de responder à sinalização por fatores de crescimento produzidos no próprio osso (48). Além disso, as células malignas prostáticas que chegam ao osso passam também a expressar moléculas que tipicamente são secretadas pelas células ósseas, como osteocalcina, osteopontina e osteonectina, o que, mais uma vez, aponta para esta hipótese. Vários estudos indicam a β 2-microglobulina (β 2M) como a molécula “chave” deste processo. Esta molécula contribui para ativação de vias que culminam na transcrição de moléculas próprias do osso (1). Para além disso, a β 2M apresenta um papel dominante em várias etapas do processo de metastização de vários outros tumores e do próprio PCa, como na EMT, angiogénese e remodelação óssea aumentada. Um dos mecanismos pelos quais esta molécula atua, demonstrado primariamente por Josson et al., é através da sua ligação à proteína da hemocromatose, que serve de recetor à β 2M, dando lugar à transcrição de fatores indicadores de hipóxia. Este autor refere, também, que a β 2M pode ser um dos elos de ligação entre as células tumorais e os osteoclastos e osteoblastos (79).

- **Nicho hematopoiético**

Pensa-se que as *stem cells* hematopoiéticas (HSCs), células multipotentes (58), estão localizadas num “nicho” em conjunto com células endoteliais e osteoblastos, na medula óssea (27). Mais especificamente, estão localizadas próximo dos vasos e dos endóstio (51) onde também coexistem células estromais. Este nicho hematopoiético regula a proliferação e diferenciação das HSCs (58). Na doença óssea metastática, o nicho hematopoiético é um alvo de atração às células metastáticas (48) e constitui um local da medula óssea com características propícias ao seu desenvolvimento (9). Numa fase inicial, as células metastáticas formam nichos perivasculares junto aos sinusoides da medula óssea (46). Quando invadem propriamente o osso, passa-se a formar um nicho metastático, que ajuda ao estabelecimento das metástases ósseas e ao seu posterior desenvolvimento (34). Este processo de instalação das células tumorais no nicho é semelhante ao processo que ocorre num transplante de medula óssea (9). Todavia, quando elas se instalam, competem para ocupar o lugar das células que anteriormente constituíam o nicho, sobretudo as HSCs. Um estudo desenvolveu a injeção de células do PCa juntamente com HSCs em ratinhos e concluiu que ambas as populações celulares predispunham-se a depositar-se no mesmo local, mas as HSCs não tinham tanta capacidade de se enxertar em relação ao controlo. Este facto pode explicar, também, algumas das citopenias que ocorrem ao longo da evolução da doença (51).

Este processo também serve de estímulo à libertação de mais moléculas sinalizadoras, como BMPs, sobretudo pelos osteoblastos, células que são também parcialmente responsáveis pela regulação das HSCs no osso (27). Outras moléculas como a PTHrP também atuam neste nicho metastático. Os fatores sinalizadores libertados no nicho ajudam à sobrevivência, à resistência ao tratamento e ao processo de dormência das células metastáticas (51).

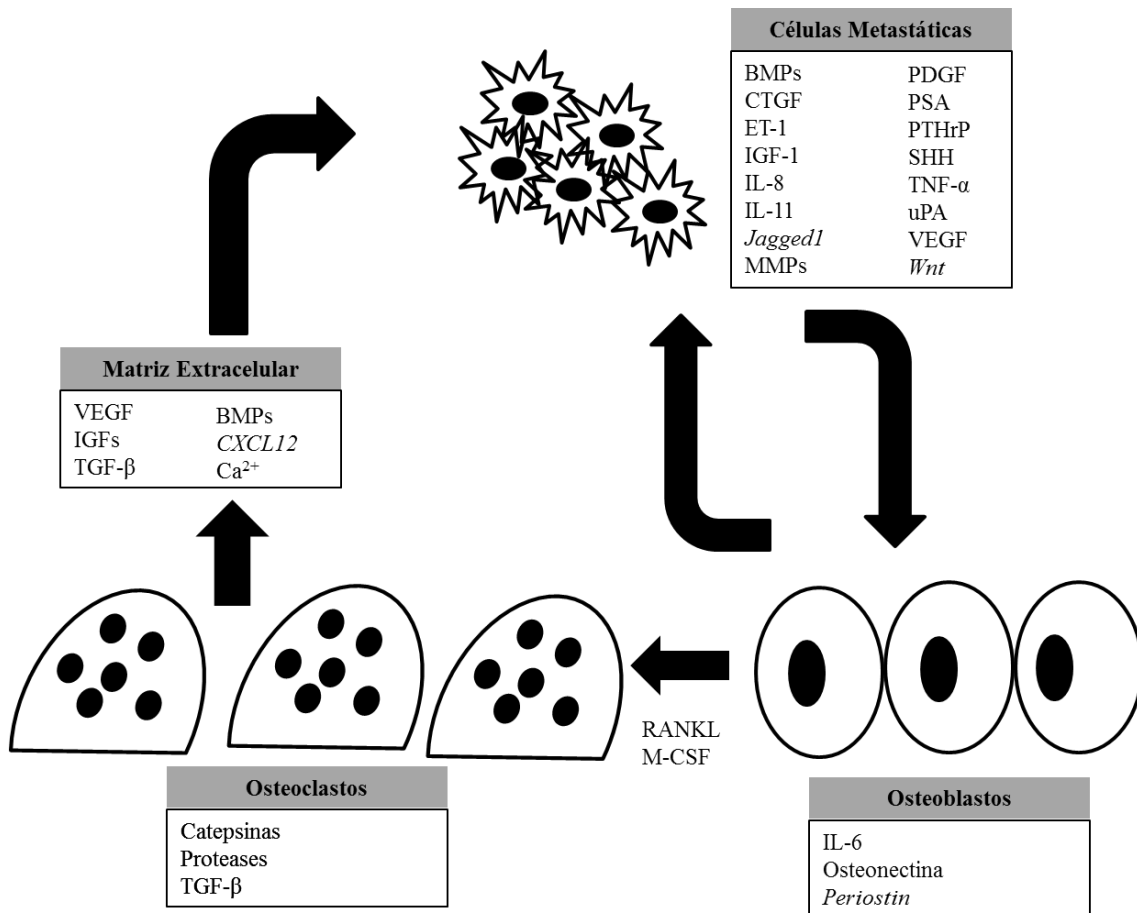
As *stem cells* mesenquimatosas (MSCs) do osso, que são também colonizadoras deste nicho, têm um papel importante a este nível, visto serem recrutadas para constituírem fibroblastos do próprio tumor, assim como para originar novas células de diferentes tecidos: osso, cartilagem, músculo e tecido adiposo (27, 80). No entanto, pouco se conhece acerca da relação das MSCs com as células do PCa e com a evolução da doença (80).

- ***Vicious Cycle***

Tal como já foi descrito, as células metastáticas do PCa são capazes de estimular, através de moléculas sinalizadoras, tanto os osteoclastos como os osteoblastos, e estes podem também comunicar entre si (35, 53). Há, então, uma comunicação bidirecional (54).

Como consequência da remodelação óssea anómala, são libertadas grandes quantidades de outras moléculas sinalizadoras, sobretudo fatores de crescimento, não só pelas células já enumeradas, como por células do estroma ósseo e pela MEC (34, 35, 67). Estas vão estimular ainda mais a sobrevivência e proliferação das células metastáticas. Assim, estas recomeçam o mesmo processo de secreção molecular, constituindo um ciclo vicioso, que promove, tanto o crescimento tumoral como o enfraquecimento ósseo (14, 53). Este é um processo complexo em que os intervenientes atuam de forma sinérgica e amplificada, por meio de interações parácrinas (78). Na Figura 1 são enumeradas as moléculas mais importantes que intervêm no *vicious cycle* e a relação entre os vários componentes deste processo.

Figura 1 - Moléculas produzidas e libertadas pelos vários intervenientes do *Vicious Cycle*; CTGF - *Conective Tissue Growth Factor*; M-CSF - *Macrophage colony-stimulating factor*; SHH - *Sonic Hedgehog*; TNF- α - *Tumor necrosis factor- α* ; uPA - *urokinase-type plasminogen activator*.



- **Microambiente Ósseo e Tumoral**

Vários estudos, nos últimos anos, demonstraram a importância da interação das células disseminadas com o microambiente ósseo para o desenvolvimento das metástases ósseas do PCa (50). A MEC é um importantíssimo componente regulador das metástases ósseas, como já foi referido (27). As moléculas que dela fazem parte, como os proteoglicanos, modulam a superfície das células tumorais e, assim, a sua

atividade. Outro processo importante consiste na liberação de MMPs pelas células metastáticas, que vão degradar a MEC ao longo do seu trajeto no osso, o que, por sua vez, condiciona a liberação de uma enorme quantidade de moléculas sinalizadoras que contribuem para um “solo fértil” (27). As serina proteases são outro grupo molecular que participa nesta degradação da MEC, sendo de destacar o *urokinase-type plasminogen activator* (uPA) que também consegue levar à ativação de MMPs em latência (6). O uPA não parece ter qualquer papel no *turnover* ósseo normal, mas está em concentrações elevadas na doença metastática e promove a capacidade de invasão metastática e a transcrição de genes nas células tumorais. A sua inibição já mostrou prevenir o aparecimento de metástases. No entanto, o uPA estabelece relações complexas com outras moléculas (PTHrP, TGF- β , PSA), pelo que, os mecanismos pelos quais atua ainda não estão completamente esclarecidos (10, 80).

As células que constituem este microambiente também são de extrema importância, como é o caso dos osteoblastos, osteoclastos, adipócitos, condrócitos e células endoteliais. Os fibroblastos e macrófagos associados ao tumor também contribuem para o microambiente que se forma (6, 50). É também no microambiente ósseo que se produzem e libertam a maioria dos fatores angiogénicos, nomeadamente o VEGF e o PDGF, o que conduz ao suporte nutricional das células malignas (18). Shiozawa denominou este microambiente de “*tumor ecosystem*”, que deverá ser um dos alvos terapêuticos a ter em conta nas investigações vindouras (50).

Li et al. realizaram um estudo onde constou a análise de tecidos humanos e também de ratinhos. Ficou demonstrado, neste trabalho, que o microambiente existente no tumor primitivo, isto é, na próstata, pode influenciar a capacidade metastática das células, a tendência para metastizar para o osso e o fenótipo osteoblástico. Esta

descoberta pode ter implicações em todo o processo de desenvolvimento das metástases do PCa e, conseqüentemente, no seu tratamento. (29).

A sinalização parácrina que existe no microambiente tumoral pode ainda originar a diferenciação neuroendócrina das metástases, o que as torna mais resistentes ao tratamento e, conseqüentemente, passíveis de originar doença mais agressiva. As células tumorais tornam-se mais parecidas com células nervosas, o que já foi demonstrado *in vitro* e *in vivo*. Verificou-se que, nestes casos, também são encontradas células com este fenótipo em pequenos agrupamentos no tumor primitivo da próstata (81).

- **Hipóxia e Stress Oxidativo**

A falta de oxigênio é uma característica do microambiente dos tumores em geral. A hipóxia é um dos fatores físicos do microambiente tumoral que mais influencia o desenvolvimento de metástases ósseas (10). Por um lado, parece que cria um microambiente mais favorável às HSCs do que às células tumorais (58). Porém, por outro, a falta de oxigênio acaba por conduzir à formação de novos vasos que levam mais oxigênio e alimentam o tumor. Esta angiogênese origina vasos desorganizados, diferentes dos fisiológicos, característicos das neoplasias (27).

Este processo é mediado por uma molécula da família dos *Hypoxia inducible factors* (HIF). Estas moléculas são os indicadores biológicos de hipóxia e influenciam tanto processos fisiológicos como patológicos (82). O HIF-1 α é a molécula libertada durante a hipóxia na doença óssea metastática do PCa e vai estimular a libertação de fatores angiogénicos, entre eles o VEGF (1, 27). Os fármacos recentemente desenvolvidos como anti-angiogénicos, atuam sobretudo contra o VEGF mas ainda carecem de estudo (82).

Para além da angiogénese, os HIF também têm o seu papel na migração e invasão do osso, assim como na resistência à terapêutica. O HIF-1 α inibe fortemente a diferenciação osteoblástica e aumenta a osteoclastogénese, pelo que seria de esperar apenas estar aumentado nas metástases osteolíticas, embora não seja isso que se verifica. O HIF-1 α também conduz à produção de *CXCR4* e IGF-2 (10, 34). Tal como referido anteriormente, o *CXCR4* está implicado na quimiotaxia. A molécula GAS6, já referida como interveniente no processo de dormência, é expressa juntamente com o HIF-1 α , o que também parece relacionar ambos os processos (58). Hoje em dia têm sido estudadas formas de atuar inibindo os HIF, nomeadamente o HIF-1 α , e, assim, criar uma nova forma terapêutica para as metástases ósseas (10, 82).

Para além da hipóxia, o *stress* oxidativo também influencia a iniciação e progressão do PCa (83). Está demonstrado que o *stress* oxidativo é um fator promotor do PCa, embora seja menos conhecida a sua habilidade em promover a metastização (19). O tabaco é um dos fatores ambientais que condiciona *stress* oxidativo e parece estar relacionado com o risco aumentado de PCa, sobretudo em doentes com polimorfismos genéticos de risco relacionados com a neutralização de carcinogéneos. Verifica-se também a relação do tabaco com a expressão de MMPs pelas células do PCa. Um estudo realizado em Portugal por Freitas et al., verificou esta relação entre o *stress* oxidativo, tabaco e PCa (83). Apesar desta relação com o PCa, o *stress* oxidativo não parece ser um fator determinante no processo de metastização do PCa para o osso. Um estudo de Battisti e o seu grupo de trabalho demonstrou que os níveis de radicais livres de oxigénio, apesar de estarem aumentados nos doentes com metástases ósseas, não diferiam significativamente dos pacientes com doença localizada. O mesmo se verificou com os níveis diminuídos das vitaminas C e E, que são antioxidantes (19).

- ***Stem Cells* Cancerígenas (CSCs)**

Há evidência de que as células que constituem o tumor primitivo e as suas metástases apresentam uma grande heterogeneidade (84). Mais recentemente, verificou-se que, para além das células tumorais já anteriormente conhecidas, também existe uma população de *stem cells* cancerígenas (CSCs), células que podem ser identificadas através de marcadores à superfície. As CSCs apresentam potencial de auto-renovação, multiplicação e diferenciação quase inesgotável. Este pode ser um dos elementos “chave” que distingue o padrão de metastização do PCa (8, 10, 41). Estas células estão presentes em grande parte dos PCa mas não em todos. Estudos *in vivo* também já demonstraram esta hipótese (84). Contudo, permanece a dúvida se todas as células tumorais se originaram a partir das CSCs ou se apenas algumas desenvolveram esta indiferenciação ao longo da sua vida, e quais os mecanismos moleculares implicados (8).

- **Outras Células do Microambiente Ósseo e Tumoral**

Alguns investigadores demonstraram que quanto maior a celularidade da medula óssea, maior a probabilidade das metástases ósseas crescerem e sobreviverem, pois o seu microambiente seria mais rico (85). Algumas células não são residentes do tumor, mas apenas passageiras, como é o caso de neutrófilos, linfócitos T, eritrócitos e plaquetas. Outras permanecem no estroma ósseo e tumoral durante todo o processo. Torna-se importante, por isso, conhecer um pouco dos mecanismos celulares implicados no microambiente ósseo e tumoral (8).

As plaquetas começam por ser importantes durante a disseminação das células tumorais. Elas aderem às células e ajudam-nas a evitar o sistema imune, de modo a sobreviverem em circulação. A nível ósseo, contribuem com moléculas para a

reabsorção óssea e inflamação (8). Os megacariócitos, células a partir das quais se originam as plaquetas, também parecem estar envolvidos na metastização óssea. Porém, o seu papel parece ser contrário ao das plaquetas, ou seja, parecem ter um papel impeditivo. Eles são inibidores do desenvolvimento e ação dos osteoclastos mas, pelo contrário, ajudam à proliferação dos osteoblastos, mecanismo este que ainda não se compreendeu. A diminuição da osteoclastogênese levaria à diminuição da osteólise e, assim, à ausência de libertação de moléculas sinalizadores, o que condicionaria um efeito inibitório no desenvolvimento das metástases. Além disso, a localização dos megacariócitos nos sinusóides da medula fazem deles uma barreira à passagem das células tumorais. Até agora, porém, este papel inibitório só foi demonstrado *in vitro* mas não *in vivo*. São necessários mais estudos para conhecer melhor esta relação dos megacariócitos com os osteoclastos, osteoblastos e células metastáticas e, também, o papel contraditório face à ação das plaquetas (72).

Outras células que se destacam neste âmbito são as células endoteliais. Elas compõem a camada mais interna da parede vascular e ajudam na sobrevivência das células em circulação através de moléculas libertadas (8). Além disso, as células endoteliais da medula óssea apresentam transcrição genética alterada culminando, sobretudo, no aumento da produção de citocinas auxiliadoras do processo de desenvolvimento tumoral (27). São também alvo de múltiplos fatores angiogénicos libertados pelas células tumorais, estimulando assim a sua proliferação e formação de neovasos (8).

A linhagem mielóide contribui igualmente para o desenvolvimento da doença óssea metastática do PCa. De facto, os monócitos e macrófagos residentes na medula óssea já demonstraram ter o seu papel nesta área, embora o processo ainda não esteja, como muitos outros, totalmente compreendido (85). Os macrófagos podem invadir o

nicho metastático através da atividade de catepsinas e proteases que libertam. Além destas, os macrófagos são responsáveis pela secreção de citocinas e fatores de crescimento, nomeadamente o TGF- β e o VEGF, que sinalizam vias nas células tumorais. Também secretam fatores estimuladores dos osteoclastos, o que promove a osteólise inicial necessária à invasão tumoral (37, 86). Pensa-se mesmo que estes macrófagos e osteoclastos possam originar-se a partir dos mesmos precursores (37).

Kim et al. verificaram a existência de secreção aumentada de TNF- α e IL-1 por parte dos macrófagos que podem, por sua vez, estimular as células tumorais a produzir outra citocina, a IL-6, que é um potente estimulador da proliferação celular, resistência ao tratamento e promotor das metástases ósseas. Serve também de fator quimiotático aos macrófagos circulantes, de modo a dirigirem-se para o estroma metastático, iniciando novamente este ciclo. Kim conseguiu demonstrar que a diminuição do número de macrófagos circulantes, em ratinhos, leva à redução da osteólise e do tamanho das metástases ósseas do PCa. Outra forma de conseguir este efeito será inibir a IL-6 (87).

Os fibroblastos estão entre as células mesenquimatosas mais estudadas no processo de metastização óssea. Têm um papel regulador no tumor primitivo e na evolução da doença. A estrutura, função e transcrição genética dos fibroblastos associados ao tumor são diferentes dos fisiológicos (1). Os fibroblastos que têm origem no tumor primitivo contribuem para o seu crescimento, mas também determinam o processo de metastização (27). Podem interagir com as células tumorais por contacto físico e sinalização parácrina (1). Quando se formam as metástases ósseas, os fibroblastos que compõem o estroma não apresentam o recetor tipo II do TGF- β . O TGF- β apresenta um papel central em praticamente todas as etapas da formação das metástases ósseas. A ausência do seu recetor promove o desenvolvimento das metástases, segundo a revisão feita por Olechnowicks e Edwards. (27).

Está largamente descrito o papel fisiológico das células ósseas, assim como a generalidade das moléculas que elas produzem durante a remodelação óssea anormal. Porém, pouco se sabe acerca de um outro tipo de células ósseas, os osteócitos. Os osteócitos são capazes de regular a atividade dos osteoclastos devido à intensa produção de RANKL e OPG, que fica aumentada relativamente ao normal. À semelhança das células endoteliais, a sua transcrição genética está excessivamente aumentada. Também participam na invasão ao osso e na manutenção da rigidez do mesmo (27).

- **Genes, Fatores de Transcrição e microRNAs**

O conhecimento da expressão genética associada aos tumores tem aumentado nos últimos anos. No futuro, este conhecimento será extremamente importante pois poder-se-ão desenvolver tratamentos mais apropriados a cada doente e prever a sua resposta (88). Sabe-se que cada tumor apresenta expressão genética característica. Todavia, como ocorre no PCa, as células podem apresentar diferentes perfis genéticos podendo, assim, responder a diferentes estímulos, o que se relaciona com a heterogeneidade celular (89). Além disso, é a expressão genética mais tardia que define a progressão ou não para a metastização. Assim, parece haver uma *gene-expression signature* que predetermina que células irão sofrer metastização óssea. De salientar que muitos genes, cuja expressão genética está alterada, estão ligados funcionalmente em *clusters* (88).

O gene supressor tumoral *PTEN* é o gene mais frequentemente mutado no PCa, podendo mesmo sofrer deleção (68, 90). Esta deleção é muito mais frequente nos PCa metastizados do que na doença localizada. A diminuição na transcrição do *PTEN* ocorre simultaneamente ao aumento da expressão do *Runx2*, um fator de transcrição muito

estudado nesta área. Isto significa que o *PTEN* não é o único fator genético necessário e que a sua regulação está na dependência de outros (90).

O gene *SMAD4* é outro dos mais importantes neste âmbito. À semelhança do *PTEN*, a deleção ou inativação do *SMAD4* está relacionada com o desenvolvimento de metástases ósseas do PCa. Um estudo publicado por Ding et al., em 2012, verificou que uma grande percentagem de ratinhos com esta doença apresentava uma inativação tripla do *p53*, *PTEN* e *SMAD4*. No entanto, este não constitui o único fator genético necessário à metastização, pelo que é certo que existem reguladores pós-traducionais que devem ser investigados (20). De salientar que o TGF- β atua na fosforilação da proteína *SMAD* em vários tumores, o que se associa a mau prognóstico (91).

A via do *Wnt* é uma das principais reguladoras do osso fisiológico, nomeadamente no período embrionário. Alterações nesta via contribuem para o processo de metastização do PCa. O gene associado ao *Wnt*, o *PITX2*, está hipermetilado no PCa localizado e, por isso, nestes casos, é escassamente expresso. Um estudo levado a cabo por Vela e os seus colaboradores, publicado em 2014, verificou que, à medida que o tumor se torna mais agressivo, diminui a metilação do *PITX2* e há um conseqüente aumento da expressão deste gene, o que parece relacionar-se com a motilidade celular, quimiotaxia, *homing* ósseo e formação do nicho metastático. O *PITX2* relaciona-se também com genes da superfamília do TGF- β . Porém, resultados contraditórios foram publicados, o que pode corresponder a uma dualidade na ação deste gene (92).

O gene *p62* é altamente expresso em vários tumores. Chang et al. estudaram-no no âmbito do PCa. A regulação da sua expressão está na dependência da sinalização parácrina existente no microambiente ósseo. Este gene relaciona-se com a progressão

para a metastização e é um dos genes em estudo com o intuito de desenvolver terapêuticas génicas (65).

Também existem genes supressores tumorais que são inativados epigeneticamente durante a progressão do PCa. Vários estudos demonstraram que a superexpressão destes genes diminui a capacidade invasiva das células e impede a constituição de metástases ósseas. São exemplo os genes *Nm23*, *CD44*, *MAPK4* e *KAI1*. Os mecanismos através dos quais a sua ação é suprimida ainda estão por conhecer (7).

Disfunções da telomerase e instabilidade cromossómica ocorrem na fase inicial do PCa mas continuam a surgir alterações ao longo da progressão da doença, nomeadamente em associação a mutações do *p53*. Ding et al. demonstraram que as alterações teloméricas promovem a rápida progressão da doença, designadamente ajudando nas etapas cruciais que levam ao estabelecimento das metástases ósseas, embora não sejam por si só um fator suficiente para tal, e por isso, necessitando de outros fatores disfuncionais (20). Também são necessárias mutações em genes que regulam o citoesqueleto e a quimiotaxia (48).

Falando um pouco sobre os fatores de transcrição, o *Runx2* é o mais estudado. Faz parte de uma família de fatores de transcrição, os *Runx*, implicados na organogénese (40). O *Runx2* atua na formação do osso e regula a expressão de genes associados ao desenvolvimento e maturação dos osteoblastos (10, 40, 89), como a osteocalcina, osteopontina e sialoproteína (90, 93). Estudos demonstraram que inativar este fator de transcrição origina um esqueleto constituído apenas por cartilagem (7). O *Runx2* atua de forma patológica e aberrante no PCa metastizado. Mutações no gene do *Runx2* são frequentemente encontradas nos doentes com metástases ósseas. É altamente expresso em PCa agressivos, com *Gleason scores* altos e em estadios avançados (40,

90). A sua expressão aumenta a motilidade e capacidade invasiva das células do PCa (89), assim como condiciona a imortalização das células (93). Pelo contrário, verificou-se que o *Runx2* está praticamente ausente no tecido epitelial normal da próstata. A expressão deste fator de transcrição começa a aumentar nas *Prostate Intraepithelial Neoplasias* (89). Nos PCa localizados a sua expressão também é escassa, nomeadamente da linha celular LNCaP (40, 43). Já as células da linha PC3, apesar de originarem lesões osteolíticas, como são altamente invasivas, expressam o *Runx2* em grandes quantidades (93). Para que haja esta transformação neoplásica, é preciso que outros fatores genéticos também sofram disrupção, como é o caso dos genes *Trp53* e *c-myc* (93).

O *Runx2* está relacionado com a expressão de genes como os da *Survivin* e do BMP7. O primeiro está relacionado com a sobrevivência das células tumorais e resistência à terapêutica. O segundo é inibidor da apoptose (40). Também auxilia a transcrição de genes que codificam proteínas como TGF- β , *Wnt* e PTHrP e promove a transcrição do proto-oncogene *Src* (40, 89, 90). Defende-se que o *Runx2* pode também ser um dos fatores leva as células do PCa a adquirirem características osteomiméticas (43). Este fator de transcrição promove, ainda, o enfraquecimento ósseo através da acentuação da osteólise que ocorre durante a metastização (89). Outras funções do *Runx2* prendem-se com a expressão genética relacionada com a EMT, remodelação citosquelética, angiogénese e degradação da MEC (93).

Em geral, alterações da normal regulação dos microRNAs estão implicadas numa grande variedade de tumores, promovendo tanto a proliferação celular como a apoptose e podendo funcionar como promotores ou supressores tumorais. Os microRNAs são pequenos RNAs não codificantes, mas antes reguladores pós-transcricionais da expressão genética (39, 41, 43). No que respeita ao PCa, vários

microRNAs foram identificados, estando associados a várias etapas da evolução das metástases, como EMT, angiogénese, migração e invasão celular. O *miR-221* e o *miR-222* são dois destes microRNAs e a sua presença está relacionada com mau prognóstico (39). O *miR-203* também demonstrou impacto na sobrevida e regula fatores de transcrição como o *Runx2* (43). Alguns microRNAs parecem influenciar o potencial metastático através da regulação das *stem cells* cancerígenas. É o caso dos *miR-143* e *miR-145*, como demonstrado por Huang et al. num estudo que utilizou células da linha PC-3, *in vitro* e *in vivo*. A sua concentração está inversamente relacionada com o aparecimento de metástases ósseas (41). *miR-21*, *miR-101*, *miR-146* e *miR-200* são outros reguladores, atuando a diferentes níveis na metastização óssea (39). Alguns destes estão reprimidos e outros superexpressos, dependendo da sua ação. Também há diferenças de concentração entre a doença localizada e metastizada. Há expectativas quanto ao uso dos microRNAs como biomarcadores para avaliar a evolução do PCa (39).

- **Moléculas intervenientes mais relevantes**

Muitos estudos foram realizados em moléculas envolvidas desde o início da EMT até ao *vicious cycle*, passando por todas as etapas que constituem o processo de metastização óssea do PCa. Importa, agora, descrever melhor algumas das moléculas que mais se destacam.

- **TGF- β**

O TGF- β é um importante supressor tumoral nas células epiteliais normais (6). É, todavia, uma das moléculas identificadas em praticamente todas as etapas do processo de metastização, não só no PCa mas na grande maioria dos carcinomas (13). É também um importante regulador no microambiente do tumor primitivo (29). Li et al.

concluíram, após um estudo, que a falta de envolvimento do TGF- β no tumor inicial era um dos fatores que permitia a iniciação do processo de metastização, na linha celular C4-2B. (29).

O TGF- β já demonstrou favorecer as metástases osteoblásticas *in vivo* (61, 94). Porém, esta molécula parece ter algumas funções supressoras tumorais, nomeadamente quando estudada *in vitro*, onde a isoforma TGF- β 1 já revelou inibir a diferenciação osteoblástica (94). O TGF- β tem um papel logo ao início do processo de metastização, podendo induzir a EMT e a angiogénese local (2, 13, 32). As concentrações desta molécula na circulação, durante a disseminação de células tumorais, são altas (91). Está também implicado na proliferação, quimiotaxia e resposta imunitária (94). O TGF- β pode, ainda, interagir com várias integrinas, aumentando a capacidade de invasão celular (46). É, portanto, um fator “chave” na progressão para a metastização e crescimento tumoral, atuando de forma parácrina e autócrina (42, 46).

No osso, o TGF- β é a molécula em maiores quantidades armazenada na MEC, pelo que, durante a remodelação óssea é intensamente libertado (2, 13). Como se verifica na Figura 1, esta molécula é um componente importantíssimo do *vicious cycle* (29) e também do próprio *turnover* ósseo, já que estimula a OPG, molécula que regula este processo (61). Também tem ação sobre a PTHrP e IL-8, ambos estimuladores da reabsorção óssea (8). Pode, ainda, ser secretado por osteoclastos ativados (2), assim como induzir a diferenciação e ação dos mesmos, de forma independente do RANKL (64). Porém, também se verifica que o TGF- β pode estimular a expressão do RANKL em modelos animais e, através dele, ativar também os osteoclastos (32, 91). Modelos animais já demonstraram que inibir o TGF- β diminui a ação osteoclástica e diminui a incidência tumoral (64). Contraditoriamente, tal como se verifica com os osteoblastos, a

ativação do TGF- β também demonstrou, em alguns estudos, ser inibidor da osteoclastogénese, mesmo na presença do RANKL (31).

O TGF- β é uma das moléculas cuja expressão tem impacto prognóstico. De facto, quanto maior a sua expressão, pior é o prognóstico dos doentes (2). O TGF- β tem sido alvo de investigação como potencial alvo terapêutico. Hoje em dia são estudados inibidores seletivos do TGF- β (16, 61, 94). A utilização de adenovírus oncolíticos que têm como alvo o TGF- β também já demonstrou progressos e continua em investigação (91).

○ **RANKL**

O RANKL, *Receptor activador of nuclear factor kappa-B ligand*, faz parte da superfamília do TNF (26, 53) e é produzido pelas células da linha osteoblástica. A ligação ao seu recetor RANK origina uma cascata de reações que culmina na transcrição de genes reguladores da osteoclastogénese, contribuindo para a sua diferenciação, maturação, adesão e sobrevivência (12, 26, 53, 64). Foi descrito que o RANKL pode ser igualmente secretado pelas células do PCa (6, 57). Associado ao RANKL é necessária a presença do M-CSF, considerado o *osteoclast survival factor*, também produzido pelos osteoblastos. Estas células também libertam uma proteína, a OPG, que serve de recetor “armadilha” ao RANKL, inibindo a sua ação (7, 64). Demonstrou-se que, quando o rácio OPG/RANKL é alto, há um incremento na massa óssea (26). Esta tríade, RANK-RANKL-OPG, é a principal reguladora do metabolismo ósseo (30) e está alterada em muitos tumores, nomeadamente aqueles que originam metástases ósseas (53).

O RANKL também interage com outras moléculas. Estimula MMPs de modo a facilitar a migração das células tumorais pela matriz óssea, tal como descrito pelo grupo de estudo de Casimiro (53). As MMPs conseguem igualmente ativar o RANKL (57). O

RANKL também parece promover a expressão de certos microRNAs que estão implicados na promoção da proliferação celular e progressão tumoral (32).

- **Wnt**

A família *Wnt* consiste em várias glicoproteínas que atuam no desenvolvimento ósseo e na tumorigênese (73, 95, 96). A ligação aos seus recetores ativa as vias canónica e não canónica, ambas com genes-alvo associados ao osso (95, 96). No PCa verifica-se que há superexpressão de alguns destes ligandos (13) e subexpressão de inibidores do *Wnt*, o que não acontece nas células epiteliais normais. Também há relação com a resistência do PCa ao tratamento androgénico (CRPC) e com a metastização óssea (95).

A sinalização pelo *Wnt* conduz à diferenciação e atividade osteoblástica (13, 95, 96). Estas moléculas também estimulam a atividade das BMPs (13) e conduzem à expressão do *Runx2* (34).

O inibidor do *Wnt*, *Dickkopf-1* (DKK1), é fundamental para evitar um desenvolvimento ósseo exagerado no embrião (73) e inibe a formação de metástases osteoblásticas (95). Este inibidor apresenta maior expressão no tumor primitivo em relação ao tecido normal (96). Porém, à medida que se dá a metastização óssea, a expressão de DKK1 pelas células tumorais vai diminuindo (73, 97). Outros estudos verificaram que o DKK1 participa na EMT, angiogénese e aumenta a proliferação do tumor primitivo (13, 92, 96). Ainda não se chegou à conclusão de como se podem utilizar estas evidências para originar novas modalidades terapêuticas (13).

- **PTHrP**

A PTHrP também está presente na vida embrionária (13). Além disso, teoricamente, é produzida por todos os tumores que originam metástases ósseas (30). A

sua expressão correlaciona-se com a progressão do PCa (13). Esta molécula está implicada na diferenciação dos osteoclastos porque estimula a expressão do RANKL nos osteoblastos (8, 30). Também aumenta a invasibilidade e migração das células (13) e está implicada na angiogénese (34). Parece relacionar-se, ainda, com a hipercalcémia (8) pois é homóloga da Hormona da Paratiróide (6).

○ **Outras moléculas**

A Tabela 2 resume a informação mais importante relativamente a outras moléculas que participam na doença óssea metastática do PCa.

Tabela 2 - Moléculas implicadas na doença óssea metastática do Carcinoma da Próstata e as etapas em que atuam na mesma.

| Molécula(s) | Etapa(s) em que atua | Referências |
|--------------------|--|------------------------------------|
| MMPs | - Reconhecimento, migração e invasibilidade celular - Angiogénese - <i>Vicious Cycle</i> | (6, 12, 16, 26, 27, 53, 57) |
| BMPs | - Adesão, migração e invasibilidade celular - Angiogénese - Dormência - Estimulação osteoblástica | (7, 8, 12, 35, 47, 59, 62, 67, 71) |
| IGF-1 e 2 | - Quimiotaxia - Estimulação osteoblástica | (7, 12) |
| FGF | - Estimulação osteoblástica | (7, 8, 80) |
| Endotelina-1 | - Angiogénese - Estimulação osteoblástica | (7, 10, 16, 18, 98) |

| | | |
|--------------|--|-----------------|
| VEGF | - Angiogénese - Estimulação osteoblástica e osteoclástica | (7, 18, 36, 89) |
| <i>c-met</i> | - Invasibilidade celular - Estimulação osteoblástica e osteoclástica | (36, 84) |
| SFKs | - Adesão, migração e invasibilidade celular - Estimulação osteoclástica | (6, 16, 18, 99) |
| <i>CCN3</i> | - Migração celular - Estimulação osteoclástica | (14) |
| <i>CCL2</i> | - Migração celular - Estimulação osteoclástica - Estimulação macrofágica | (37, 86) |

Tratamento das Metástases Ósseas do Carcinoma da Próstata

Visto que a doença óssea metastática apresenta uma fisiopatologia bastante complexa, as medidas terapêuticas a aplicar nos doentes devem sempre envolver uma equipa multidisciplinar (28). No que diz respeito às metástases do PCa, não existe um tratamento curativo e as opções de tratamento são muito limitadas (100). As que existem trazem alguns benefícios durante um tempo limitado aos pacientes, mas continuam a carecer de eficácia e segurança a longo prazo (101). A investigação de novos fármacos tem vindo a desenvolver-se a um ritmo alucinante, embora sem resultados muito animadores. Os grandes objetivos do tratamento das metástases ósseas, hoje em dia, segundo a *Food and Drug Administration* (FDA), são atrasar o aparecimento de sintomas e SREs e melhorar a qualidade de vida dos doentes. No futuro, aquilo que se pretende, é atrasar o aparecimento destas metástases ou mesmo fazê-las entrar em remissão (74).

- **Tratamento da dor**

A dor é um dos sintomas dominantes nestes doentes. O alívio da dor não é, de todo, fácil de atingir. Os analgésicos opióides são os fármacos que, em estádios avançados e seguindo a escala de tratamento da dor, se revelam mais eficazes e são, por isso, os mais utilizados. Em casos menos severos, os anti-inflamatórios não esteróides podem ser a escolha inicial (28).

- **Cirurgia**

A cirurgia pode ser uma opção terapêutica em casos selecionados. Serve, essencialmente, para prevenir o aparecimento de fraturas patológicas quando estas estão na iminência de se desenvolverem, ou mesmo nas fraturas já estabelecidas (13, 28). No entanto, apesar de já terem sido desenvolvidos critérios de risco para o desenvolvimento de fraturas patológicas, estes ainda não parecem ser muito eficazes em distinguir os pacientes que necessitam ou não de cirurgia (28). A técnica selecionada é a estabilização óssea, embora a colocação de próteses e a realização de artroplastias também sejam frequentes (13). A compressão da espinhal medula pelas metástases vertebrais também pode ser tratada cirurgicamente através da sua descompressão, ou mesmo através de radioterapia (102). Contudo, estas intervenções devem ser precoces, antes de se desenvolverem alterações neurológicas que acabam por ser irreversíveis (76). A cirurgia também tem algum efeito na diminuição da dor e na melhoria funcional da porção esquelética afetada (13, 28).

Apesar de todas estas aplicações, alguns doentes não reúnem condições para serem operados. Não devem ser sujeitos a cirurgia os pacientes com sobrevida expectável baixa nem se o estado geral é mau. Alguns autores defendem 4 semanas como o limite (28), enquanto outros defendem um espaço de tempo maior, de cerca de 2 meses. Esta

temática ainda é controversa. Isto acontece porque não há benefício funcional em tratar doentes que tenham uma deterioração rápida do seu estado geral e também devido à dificuldade em combater as complicações associadas a este procedimento. Um estudo realizado por Weiss et al., que envolveu 306 pacientes entre 1989 e 2010, teve como objetivo conhecer a sobrevivência e complicações em doentes sujeitos a cirurgia para doença óssea metastática do PCa. Os doentes sobreviveram, em média, apenas mais 6 meses após a cirurgia, embora mais de metade tenha melhorado a qualidade de vida significativamente durante este tempo, pelo que, o autor considera ser benéfico realizar a cirurgia (102).

- **Radioterapia**

A radioterapia é outra modalidade terapêutica e pode ser utilizada como terapia única ou adjuvante à cirurgia. Ajuda a aliviar a dor, melhora a função e reduz a massa tumoral. É utilizada a radioterapia externa, embora estejam a ser investigadas formas mais dirigidas e localizadas de o fazer (13, 28). A terapêutica anti-androgénica é muitas vezes utilizada em associação à radioterapia em fases iniciais do tratamento da doença metastática do PCa, embora em pouco tempo os doentes acabem por desenvolver CRPC (69). Outra consequência nestes doentes com doença avançada é a desmineralização óssea causada pela terapêutica hormonal a que estes doentes estão permanentemente sujeitos (24-26), com análogos LH-RH e com anti-androgénios (28, 69), um processo conhecido como *Cancer Treatment Induced Bone Loss* e que expõe ainda mais o osso às referidas complicações (13, 26).

- **Bifosfonatos**

Quanto aos fármacos utilizados, os Bifosfonatos surgiram como a primeira classe de fármacos a ser utilizada para evitar a extrema reabsorção óssea existente

durante a metastização óssea, tendo sido aprovados pela FDA em 2002 (26, 69). Estes inibem a reabsorção óssea através da inativação dos osteoclastos. Os Bifosfonatos ligam-se aos cristais de hidroxiapatite em zonas de osso com elevado *turnover* ósseo (12, 56). Assim, não só evitam a fragilidade óssea, como impedem que sejam libertados fatores estimuladores do crescimento tumoral (12, 18). Alguns estudos *in vitro* apontam mesmo para o facto dos Bifosfonatos poderem também inibir diretamente as células metastáticas, embora clinicamente os resultados não apontem nesse sentido (100). Antes de ser usada no âmbito da malignidade, esta classe de fármacos já era utilizada noutras doenças ósseas onde a osteólise também é um problema: a osteoporose e a doença de Paget (13).

O Ácido Zoledrónico demonstrou ser o mais potente dos Bifosfonatos (12, 13) e destes, é o único aprovado para utilização nas metástases ósseas do PCa (56, 74). Foi definido como a primeira linha nos CRPC e metástases ósseas do PCa após um grande estudo designado Zometa 039. É administrado na dose de 4 mg a cada 3-4 semanas (18, 69). O seu uso demonstrou atrasar o aparecimento de SREs em cerca de 6 meses (16) e diminuir o número dos mesmos, mas não demonstrou em nenhum estudo um aumento da sobrevida em relação ao placebo (18). Um outro efeito benéfico é que o Ácido Zoledrónico também reduz de forma importante a dor óssea (12). Por todos os benefícios que este fármaco traz, a sua administração deve ser iniciada logo que sejam diagnosticadas as metástases (28). Também se têm estudado associações dos Bifosfonatos com agentes citotóxicos usados em quimioterapia como o Docetaxel que, para já, parecem ter eficácia em estudos animais (18). Foi também proposta uma associação dos Bifosfonatos com agentes que promovem a supressão androgénica aliando, assim, a inibição dos osteoclastos à inibição hormonal. Porém, não demonstrou qualquer benefício em comparação com os anteriores referidos (103).

Novas evidências apontam para o facto do efeito dos Bifosfonatos ser apenas temporário, daí a falta de eficácia a longo prazo (56). Outro facto interessante é que os Bifosfonatos sempre foram usados como terapêutica após as metástases estarem estabelecidas, mas nunca como terapêutica preventiva, pois nunca demonstraram eficácia a este nível. Atualmente, vários estudos estão a ser desenvolvidos neste sentido. O estudo ZEUS é um dos mais importantes mas os seus resultados apresentados recentemente não mostraram qualquer benefício (103).

Os efeitos secundários dos Bifosfonatos são relativamente simples. É frequente surgir um quadro tipo síndrome gripal auto-limitado logo após a sua administração, mas podem surgir mais raramente reações graves como: insuficiência renal aguda, hipocalcémia e osteonecrose da mandíbula (12, 13, 18). Este último pode ser catastrófico. No entanto, sabe-se que uma boa higiene dentária e tratamento oral prévio ao tratamento com Bifosfonatos reduzem drasticamente a sua incidência, que por si já é muito baixa (13, 69).

- **Denosumab**

Outro fármaco já aprovado pela FDA e pela *European Medicines Agency* (EMA) para prevenir SREs na doença óssea metastática do PCa é o Denosumab. Este anticorpo monoclonal humano IgG2 foi desenvolvido pela AMGEN e atua contra o RANKL, impedindo-o de se ligar ao seu recetor, o RANK. Isto impede a ativação dos osteoclastos e, por sua vez, o referido ciclo vicioso da metastização óssea. Assim sendo, tem uma ação idêntica à OPG, evitando a reabsorção óssea (26).

O Denosumab é administrado por via subcutânea (56). Nos estudos clínicos foi determinado que a dose mais eficaz deste fármaco é de 120 mg a cada 4 semanas (26, 103). O Denosumab demonstrou ser mais eficaz que o Ácido Zoledrónico no que

respeita ao atraso no aparecimento de SREs, à diminuição do número de SREs e à diminuição da dor óssea (7, 18). A grande desilusão com este fármaco foi a verificação de que também não tem impacto na sobrevida dos doentes (13).

A segurança farmacológica do Denosumab é idêntica à encontrada em doentes que tomam Bifosfonatos. Podem surgir reações adversas como: tonturas, hipocalcémia, dores músculo-esqueléticas, artralguas e osteonecrose da mandíbula (12, 18, 26). Contudo, pode ser dado com segurança em doentes insuficientes renais (74).

Existe também outra forma de inibir a via do RANKL, através do antagonista RANK-Fc. Consiste na fusão do componente extracelular do RANK com uma imunoglobulina. Já foi estudado em associação com o Docetaxel e também em conjunto com um retrovírus inibidor das BMPs (16). É menos estudado que o Denosumab, mas tal como ele também inibe a osteólise (71). Um outro fármaco, um antagonista da OPG também foi desenvolvido e está atualmente em estudo (16). Outra forma criada para inibir a OPG consiste na utilização de adenovírus transformados laboratorialmente de modo a replicarem esta molécula. Cody et al. desenvolveram esta modalidade terapêutica na esperança de inibir eficazmente a osteoclastogénese e destruir as células malignas especificamente no PCa. A sua hipótese demonstrou-se verdadeira, para já, num estudo *in vitro* (101).

- **Radiofármacos**

Como já vimos, a radiação tem efeitos benéficos na doença óssea metastática. Assim sendo, alguns radioisótopos têm vindo a ser investigados na expectativa de melhores resultados, sobretudo como terapêutica paliativa (26). A radiação é emitida preferencialmente para áreas de grande remodelação óssea (103). Podem mesmo ser ligados a Bifosfonatos, na medida em que estes “guiam” o radiofármaco em direção dos

cristais de hidroxiapatite (78). São também agentes ionizantes (18). São administrados por via intravenosa e o seu grande efeito é a nível da dor óssea, contribuindo para o alívio da mesma (74).

O Estrôncio-89 é um dos β -emissores mais utilizados desde o início. Ele permanece em grandes concentrações no osso após a sua administração (26). A sua eficácia em reduzir a dor está bem documentada, mas infelizmente o benefício na sobrevida não (56). Existe também o Samário-153, com atividade idêntica, e que tem sido estudado em combinação com os Bifosfonatos (26) e com o Docetaxel. Alguns estudos demonstraram que esta última combinação prolonga a sobrevida dos pacientes com CRPC, pelo que é uma hipótese terapêutica promissora (56, 103). Os β -emissores libertam radiação a uma distância considerável (alguns centímetros) afetando, não só as metástases, mas o osso normal à sua volta, daí os seus efeitos secundários, nomeadamente mielosupressão. Devido às citopenias que causam, ainda não são largamente utilizados na prática clínica (74).

Os emissores α parecem ter menos efeitos secundários, pois a radiação emitida é menos penetrante do que a β , sendo apenas na ordem dos micrómetros. Apesar disso, é mais intensa, pelo que também parece ser mais eficaz. Um exemplo destes α -emissores é o Rádio-223. Trata-se da primeira terapêutica dirigida ao osso que tem impacto na sobrevida dos doentes, para além de reduzir as complicações ósseas (13, 74), como demonstrou o estudo ALSYMPCA (103). É a terapêutica mais promissora a este nível nos dias que correm (56).

A Tabela 3, em anexo, resume a informação mais relevante sobre os fármacos descritos até aqui.

- **Outros fármacos**

Já foi referido que o Docetaxel é utilizado em quimioterapia, nomeadamente em combinação com as restantes formas de tratamento. O Docetaxel é um fármaco usado em esquemas de quimioterapia paliativa em doentes com CRPC. Ao contrário da maior parte das modalidades terapêuticas já referidas, não tem efeito sobre a dor óssea. Porém, verificou-se em dois estudos importantes (TAX 327 e SWOG 99-16) a sua eficácia em termos de sobrevida, assim como uma segurança razoável (74).

Outros fármacos estão a ser alvo de estudos pré-clínicos e clínicos e o Cabozantinib é um deles. É um inibidor da tirosina cinase usado por via oral. O Cabozantinib inibe vários recetores com atividade tirosina cinase, entre as quais um recetor do VEGF e o recetor do *c-met*, ambos importantes no metabolismo normal e patológico do osso. Já se verificou que esta dupla inibição é eficaz no CRPC e no PCa metastizado, nomeadamente no alívio da dor e desaparecimento total ou parcial das lesões, em estudos de fase II. No entanto, apenas foi concluído um estudo de fase III para o seu uso no carcinoma medular da tiróide, enquanto para o PCa os estudos clínicos ainda estão a ser desenvolvidos (36, 56, 74). Para já, os doentes com metástases ósseas parecem ter uma redução dos marcadores séricos de remodelação óssea (18).

O Dasatinib é outro fármaco inibidor da atividade tirosina cinase também em estudo, mas desta vez inibe o *Src*. O Dasatinib demonstrou reduzir a adesão e disseminação das células do PCa *in vitro*, assim como a inibição das células ósseas (18). Apesar disso, não demonstrou grande eficácia em estudos clínicos quando usado em monoterapia. Um estudo que associou o Dasatinib ao Docetaxel mostrou diminuição ou, pelo menos, estabilização das lesões ósseas na maioria dos doentes (74). Outros fármacos idênticos são o Saracatinib e o Bosutinib, com resultados *in vitro* promissores

(18). O Bosutinib demonstrou reduzir o volume tumoral num modelo animal de PCa e inibir uma série de genes promotores de metástases (99).

A Endotelina-1 está envolvida no processo de metastização do PCa para o osso. O Atrasentan é um antagonista da Endotelina-1 desenvolvido para bloquear a sua ação. Em modelos animais demonstrou eficácia, mais uma vez em combinação com o Docetaxel, embora nos estudos pré-clínicos e clínicos se tenha tornado uma decepção no que toca à progressão da doença. O efeito mais proeminente foi na redução dos níveis do PSA e nos marcadores séricos de remodelação óssea. Assim, este antagonista parece ter efeito nas fases finais do processo de metastização mas não nas iniciais (98). Em termos de reações adversas, pode provocar reações graves a nível cardiovascular (16).

Também tem surgido interesse no estudo de agentes naturais como formas de tratamento, como é o caso da Genisteína, um composto da família das Isoflavonas encontrada na soja, e o *3,3'-diindolylmethane* (DIM), encontrado nos brócolos. Segundo Li et al., a Genisteína não apresenta toxicidade e consegue inibir eficazmente o crescimento de metástases ósseas do PCa em ratinhos e ativar a apoptose das células através da inibição da via do *NF- κ B*. O DIM tem uma ação semelhante (32). Ao inibir esta via, modula a expressão de vários genes, nomeadamente codificadores do VEGF, IL-8 e uPA (7). Este mesmo grupo de estudo também evidenciou a capacidade que estes agentes naturais têm em inibir a diferenciação dos osteoblastos e osteoclastos em cultura juntamente com células do PCa, evitando o *turnover* ósseo acelerado. Também parecem ter um papel na regulação da EMT (32).

Outras opções terapêuticas em desenvolvimento na atualidade incluem: inibição do TGF- β através de anticorpos monoclonais ou utilização de adenovírus (16, 26, 91);

inibição das BMPs através do seu antagonista denominado *Noggin* (71); novas formas de inibir os recetores da Endotelina-1 e do VEGF (74); utilização da Talidomida e dos seus derivados; imunoterapia (18); anticorpos contra o PDGFR α , IGFs, integrinas e MMPs (7, 16, 57, 100).

Apesar de todos os esforços, o Ácido Zoledrónico, o Denosumab e o Rádio-223 são os únicos fármacos atualmente aprovados pela FDA para o tratamento dos SREs resultantes da disseminação do PCa para o osso (74). Para já, apesar da grande variedade de fármacos em estudo, poucas são as alternativas realmente eficazes no que toca à sobrevida dos doentes. A estratégia para o desenvolvimento de novos fármacos passa por inibir as interações que existem no microambiente ósseo a nível autócrino e parácrino, pois estas servem de “combustível” à proliferação celular. A melhor maneira de o fazer é desenvolver anticorpos que atuem contra as moléculas já faladas e continuar a estudar os fatores envolvidos em todo este processo para, assim, desenvolver uma terapêutica que atue em múltiplos alvos (1, 71).

Conclusão

O PCa é o cancro com maior incidência no sexo masculino, mas nem todos os doentes apresentam evolução agressiva. Pensa-se que existam muitos homens com PCa nos quais este nunca chega a ser diagnosticado e outros em que a doença evolui tão lentamente que nunca chega a manifestar-se. Outros, pelo contrário, apresentam doença progressiva, associada a morbilidade e mortalidade importantes. O tratamento da doença localizada passa sobretudo pela cirurgia e radioterapia. Todavia, uma parte dos doentes apresenta uma doença avançada e disseminada, sem possibilidade de cura e com prognóstico muito reservado. As metástases mais frequentemente originadas pelo PCa

são metástases ósseas osteoblásticas, embora outros órgãos também possam ser invadidos. O novo osso formado neste processo não tem a estrutura laminar normal e designa-se *woven bone*.

O osso é um órgão com características peculiares. A sua matriz é fonte de uma enorme variedade de moléculas sinalizadoras, sobretudo fatores de crescimento, e a medula óssea apresenta uma rica vascularização e celularidade. Isto contribui para que vários tumores facilmente se instalem no osso, como é o caso do PCa, que é o seu mais frequente invasor.

Verifica-se que são múltiplos os mecanismos que contribuem para a disseminação das células do PCa e posterior *homing* ósseo. O processo de *Epithelial-to-Mesenchymal transition* (EMT) é primordial, apresenta grande complexidade e muitos mecanismos ainda por conhecer. Além disso, não só na EMT, mas em todas as etapas seguintes, existem moléculas e vias que interagem de forma ainda não totalmente percebida e com funções contraditórias. A migração e a capacidade invasiva das células é igualmente regulada por muitas vias, de onde se destaca a sinalização pelo TGF- β , que está implicado em praticamente todo o processo de metastização.

Durante a disseminação linfática e hematogénea apenas algumas células conseguem sobreviver à longa “viagem” entre o tumor primitivo e o osso. Um fator estudado nesta área é o processo de quimiotaxia, onde quimiocinas, sobretudo o *CXCL12*, contribuem para que as células não percam o seu rumo. Estas evidências vieram consolidar a teoria *Seed and Soil* que Paget desenvolveu empiricamente. A angiogénese no tumor primitivo e na localização secundária é igualmente importante, sendo a hipóxia um dos principais estimuladores da neovascularização. No *homing* ao osso, as células necessitam igualmente de interagir com múltiplas moléculas, como

integrinas, P e E-selectinas, caderinas e MMPs, para se poderem instalar e começar a proliferar. Pensa-se que seja nesta altura que as células metastáticas adquirem aquilo a que se chama de *osteomimicry*, pois passam a responder a estímulos e a produzir moléculas próprias do osso. Porém, durante um processo que pode durar décadas, as células metastáticas podem ficar quiescentes e não desenvolver doença clinicamente evidente. Ainda não se conseguiu perceber como se processa este mecanismo de dormência, embora algumas moléculas, nomeadamente o GAS6, já tenham sido largamente estudadas. O nicho hematopoiético também parece ter influência na dormência e posterior ativação das células.

Para que as células do PCa possam proliferar e formar metástases osteoblásticas, um processo de reabsorção óssea prévia é indispensável. Aqui, os osteoclastos apresentam um papel fundamental. A sua diferenciação e maturação são estimuladas por fatores libertados pelas células do PCa, de forma RANKL dependente ou independente, o que constitui um problema no que respeita ao desenvolvimento de terapêuticas dirigidas. Esta ativação conduz à osteólise inicial que vai, por sua vez, condicionar a libertação de moléculas da MEC. Estas e outras moléculas produzidas pelas células metastáticas estimulam os osteoblastos. Estes libertam ainda mais moléculas sinalizadoras que estimulam as células do PCa a proliferar e ativam os osteoclastos induzindo ainda maior desmineralização óssea, constituindo assim, um ciclo vicioso incessável que contribui para a grande proliferação metastática.

Estes mecanismos fisiopatológicos podem ou não traduzir-se em doença sintomática. Porém, a maior parte dos doentes, em alguma fase da doença, desenvolve os designados SREs: dor óssea, hipercalcémia, compressão medular e fratura patológica. Sempre que o doente apresenta sintomas ou se a doença for descoberta de outra forma, o doente deve ser alvo de um estudo aprofundado. O estudo imagiológico

das lesões osteoblásticas não é fácil e apresenta algumas limitações, pelo que se tenta conjugar a informação proveniente de vários exames, sendo a cintigrafia óssea o mais utilizado, seguido da RM que tem muito boa resolução anatómica.

A todos estes mecanismos referidos juntam-se outras células, moléculas, genes e vias sinalizadoras cada vez mais complexas e de difícil demonstração científica. Os modelos animais têm sido a forma mais eficaz de estudar a fisiopatologia da doença óssea metastática do PCa, nomeadamente com a utilização de ratinhos imunodeprimidos. Além deste propósito, os modelos animais têm sido indispensáveis no estudo de potenciais novas terapias, embora com limitações.

Hoje em dia, os doentes dispõem de várias opções terapêuticas que visam a diminuição das SREs, como a cirurgia, radioterapia, terapia anti-androgénica, Bifosfonatos, Denosumab e Rádio-223, embora nenhum deles seja uma opção de cura e, à exceção de Rádio-223, nenhum apresenta impacto na sobrevida. As novas opções em estudo também não têm demonstrado resultados muito animadores

Em conclusão, apesar do grande esforço por parte da comunidade científica, o que se sabe sobre este tema tão importante, em termos médicos, fica aquém do expectável. A complexidade dos mecanismos fisiopatológicos e as dificuldades técnicas são os principais problemas. No futuro, para se chegar a uma estratégia terapêutica completamente eficaz, será indispensável investigar a complexidade molecular e, também, perceber a expressão genética implicada nesta doença, numa tentativa de desenvolver terapias mais dirigidas a cada doente.

Lista de Acrónimos

| | |
|------------------------|--|
| 99mTc | Tecnésio99m |
| BMPs | <i>Bone Morphogenic Proteins</i> |
| Ca²⁺ | Cálcio ionizado |
| CRPC | <i>Castration- resistant Prostate Cancer</i> |
| CSCs | <i>Stem Cells</i> Cancerígenas |
| DIM | <i>3,3'-diindolylmethane</i> |
| CTGF | <i>Conective Tissue Growth Factor</i> |
| DKK1 | <i>Dickkopf-1</i> |
| EGF | <i>Epidermal Growth Factor</i> |
| EMA | <i>European Medicines Agency</i> |
| EMT | <i>Epithelial-to-Mesenchymal Transition</i> |
| FDG-PET | PET com 18F-2- desoxiglucose |
| FDA | <i>Food and Drug Administration</i> |
| FGF | <i>Fibroblast Growth Factor</i> |
| GAS6 | <i>Growth Arrest Specific 6</i> |
| HGF | <i>Hepatocyte Growth Factor</i> |
| HIF | <i>Hypoxia inducible factors</i> |
| HSCs | <i>Stem Cells</i> Hematopoiéticas |
| IGF | <i>Insulin Growth Factor</i> |
| IRA | Insuficiência Renal Aguda |
| IV | Intravenosa |
| M-CSF | <i>Macrophage colony-stimulating factor</i> |
| MEC | Matriz Extracelular |
| MMPs | Metaloproteinases |
| MSCs | <i>Stem Cells</i> Mesenquimatosas |
| OPG | <i>Osteoprotegerin</i> |
| PCa | Carcinoma da Próstata |

| | |
|---------------------------------|--|
| PDGF | <i>Platelet-derived Growth Factor</i> |
| PET | Tomografia de Emissão de Positrões |
| PSA | <i>Prostate Specific Antigen</i> |
| PTHrP | <i>Parathyroid Hormone-related Protein</i> |
| RANKL | <i>Receptor activador of nuclear factor kappa-B ligand</i> |
| RM | Ressonância Magnética |
| SC | Subcutânea |
| SFKs | <i>Src Family Kinases</i> |
| SHH | <i>Sonic Hedgehog</i> |
| SPECT | <i>Single Photon Emission Computed Tomography</i> |
| SREs | <i>Skeletal Related Events</i> |
| TC | Tomografia Computorizada |
| TGF- β | <i>Transforming Growth Factor-β</i> |
| TNF- α | <i>Tumor necrosis factor-α</i> |
| uPA | <i>Urokinase-type plasminogen activator</i> |
| VEGF | <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> |
| β2M | β 2-microglobulina |

Referências Bibliográficas

1. Jossion S, Matsuoka Y, Chung LW, Zhau HE, Wang R. Tumor-stroma co-evolution in prostate cancer progression and metastasis. *Semin Cell Dev Biol.* 2010;21(1):26-32.
2. Morimoto K, Tanaka T, Nitta Y, Ohnishi K, Kawashima H, Nakatani T. NEDD9 crucially regulates TGF-beta-triggered epithelial-mesenchymal transition and cell invasion in prostate cancer cells: involvement in cancer progressiveness. *Prostate.* 2014;74(8):901-10.

3. Battisti V, Maders LD, Bagatini MD, Battisti IE, Belle LP, Santos KF, et al. Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (E-NPP) and adenosine deaminase (ADA) activities in prostate cancer patients: influence of Gleason score, treatment and bone metastasis. *Biomed Pharmacother.* 2013;67(3):203-8.
4. Li J, Guillebon AD, Hsu JW, Barthel SR, Dimitroff CJ, Lee YF, et al. Human fucosyltransferase 6 enables prostate cancer metastasis to bone. *Br J Cancer.* 2013;109(12):3014-22.
5. Mao L, Yang C, Wang J, Li W, Wen R, Chen J, et al. SATB1 is overexpressed in metastatic prostate cancer and promotes prostate cancer cell growth and invasion. *J Transl Med.* 2013;11:111.
6. Jin JK, Dayyani F, Gallick GE. Steps in prostate cancer progression that lead to bone metastasis. *Int J Cancer.* 2011;128(11):2545-61.
7. Ibrahim T, Flamini E, Mercatali L, Sacanna E, Serra P, Amadori D. Pathogenesis of osteoblastic bone metastases from prostate cancer. *Cancer.* 2010;116(6):1406-18.
8. Suva LJ, Washam C, Nicholas RW, Griffin RJ. Bone metastasis: mechanisms and therapeutic opportunities. *Nat Rev Endocrinol.* 2011;7(4):208-18.
9. Gruber R. Reader's digest of the pathophysiology of bone metastases. *Wien Med Wochenschr.* 2012;162(17-18):370-3.
10. Papachristou DJ, Basdra EK, Papavassiliou AG. Bone metastases: molecular mechanisms and novel therapeutic interventions. *Med Res Rev.* 2012;32(3):611-36.
11. Liu Q, Jernigan D, Zhang Y, Fatatis A. Implication of platelet-derived growth factor receptor alpha in prostate cancer skeletal metastasis. *Chin J Cancer.* 2011;30(9):612-9.

12. Safriadi F. Bone metastases and bone loss medical treatment in prostate cancer patients. *Acta Med Indones.* 2013;45(1):76-80.
13. Valkenburg KC, Steensma MR, Williams BO, Zhong Z. Skeletal metastasis: treatments, mouse models, and the Wnt signaling. *Chin J Cancer.* 2013;32(7):380-96.
14. Chen PC, Cheng HC, Tang CH. CCN3 promotes prostate cancer bone metastasis by modulating the tumor-bone microenvironment through RANKL-dependent pathway. *Carcinogenesis.* 2013;34(7):1669-79.
15. Sottnik JL, Daignault-Newton S, Zhang X, Morrissey C, Hussain MH, Keller ET, et al. Integrin alpha2beta 1 (alpha2beta1) promotes prostate cancer skeletal metastasis. *Clin Exp Metastasis.* 2013;30(5):569-78.
16. Deng X, He G, Liu J, Luo F, Peng X, Tang S, et al. Recent advances in bone-targeted therapies of metastatic prostate cancer. *Cancer Treat Rev.* 2014;40(6):730-8.
17. Krishnan B, Smith TL, Dubey P, Zapadka ME, Torti FM, Willingham MC, et al. Angiotensin-(1-7) attenuates metastatic prostate cancer and reduces osteoclastogenesis. *Prostate.* 2013;73(1):71-82.
18. Loriot Y, Massard C, Fizazi K. Recent developments in treatments targeting castration-resistant prostate cancer bone metastases. *Ann Oncol.* 2012;23(5):1085-94.
19. Battisti V, Maders LD, Bagatini MD, Reetz LG, Chiesa J, Battisti IE, et al. Oxidative stress and antioxidant status in prostate cancer patients: relation to Gleason score, treatment and bone metastasis. *Biomed Pharmacother.* 2011;65(7):516-24.
20. Ding Z, Wu CJ, Jaskelioff M, Ivanova E, Kost-Alimova M, Protopopov A, et al. Telomerase reactivation following telomere dysfunction yields murine prostate tumors with bone metastases. *Cell.* 2012;148(5):896-907.

21. Pinto F, Totaro A, Palermo G, Calarco A, Sacco E, D'Addressi A, et al. Imaging in prostate cancer staging: present role and future perspectives. *Urol Int*. 2012;88(2):125-36.
22. Messiou C, Cook G, deSouza NM. Imaging metastatic bone disease from carcinoma of the prostate. *Br J Cancer*. 2009;101(8):1225-32.
23. Thysell E, Surowiec I, Hornberg E, Crnalic S, Widmark A, Johansson AI, et al. Metabolomic characterization of human prostate cancer bone metastases reveals increased levels of cholesterol. *PLoS One*. 2010;5(12):e14175.
24. Hagberg Thulin M, Jennbacken K, Damber JE, Welen K. Osteoblasts stimulate the osteogenic and metastatic progression of castration-resistant prostate cancer in a novel model for in vitro and in vivo studies. *Clin Exp Metastasis*. 2014;31(3):269-83.
25. Kamiya N, Suzuki H, Endo T, Yano M, Naoi M, Nishimi D, et al. Clinical usefulness of bone markers in prostate cancer with bone metastasis. *Int J Urol*. 2012;19(11):968-79.
26. Sottnik JL, Keller ET. Understanding and targeting osteoclastic activity in prostate cancer bone metastases. *Curr Mol Med*. 2013;13(4):626-39.
27. Olechnowicz SW, Edwards CM. Contributions of the host microenvironment to cancer-induced bone disease. *Cancer Res*. 2014;74(6):1625-31.
28. Riccio AI, Wodajo FM, Malawer M. Metastatic carcinoma of the long bones. *Am Fam Physician*. 2007;76(10):1489-94.
29. Li X, Sterling JA, Fan KH, Vessella RL, Shyr Y, Hayward SW, et al. Loss of TGF-beta responsiveness in prostate stromal cells alters chemokine levels and facilitates the development of mixed osteoblastic/osteolytic bone lesions. *Mol Cancer Res*. 2012;10(4):494-503.

30. Jin R, Sterling JA, Edwards JR, DeGraff DJ, Lee C, Park SI, et al. Activation of NF-kappa B signaling promotes growth of prostate cancer cells in bone. *PLoS One*. 2013;8(4):e60983.
31. Araujo A, Cook LM, Lynch CC, Basanta D. An integrated computational model of the bone microenvironment in bone-metastatic prostate cancer. *Cancer Res*. 2014;74(9):2391-401.
32. Li Y, Kong D, Ahmad A, Bao B, Sarkar FH. Targeting bone remodeling by isoflavone and 3,3'-diindolylmethane in the context of prostate cancer bone metastasis. *PLoS One*. 2012;7(3):e33011.
33. Liu Q, Russell MR, Shahriari K, Jernigan DL, Lioni MI, Garcia FU, et al. Interleukin-1beta promotes skeletal colonization and progression of metastatic prostate cancer cells with neuroendocrine features. *Cancer Res*. 2013;73(11):3297-305.
34. Ell B, Kang Y. SnapShot: Bone Metastasis. *Cell*. 2012;151(3):690-e1.
35. Nishimori H, Ehata S, Suzuki HI, Katsuno Y, Miyazono K. Prostate cancer cells and bone stromal cells mutually interact with each other through bone morphogenetic protein-mediated signals. *J Biol Chem*. 2012;287(24):20037-46.
36. Lee RJ, Smith MR. Targeting MET and vascular endothelial growth factor receptor signaling in castration-resistant prostate cancer. *Cancer J*. 2013;19(1):90-8.
37. Herroon MK, Rajagurubandara E, Rudy DL, Chalasani A, Hardaway AL, Podgorski I. Macrophage cathepsin K promotes prostate tumor progression in bone. *Oncogene*. 2013;32(12):1580-93.
38. Ye X, Lee YC, Choueiri M, Chu K, Huang CF, Tsai WW, et al. Aberrant expression of katanin p60 in prostate cancer bone metastasis. *Prostate*. 2012;72(3):291-300.

39. Peng X, Guo W, Liu T, Wang X, Tu X, Xiong D, et al. Identification of miRs-143 and -145 that is associated with bone metastasis of prostate cancer and involved in the regulation of EMT. *PLoS One*. 2011;6(5):e20341.
40. Pratap J, Lian JB, Stein GS. Metastatic bone disease: role of transcription factors and future targets. *Bone*. 2011;48(1):30-6.
41. Huang S, Guo W, Tang Y, Ren D, Zou X, Peng X. miR-143 and miR-145 inhibit stem cell characteristics of PC-3 prostate cancer cells. *Oncol Rep*. 2012;28(5):1831-7.
42. van den Hoogen C, van der Horst G, Cheung H, Buijs JT, Pelger RC, van der Pluijm G. The aldehyde dehydrogenase enzyme 7A1 is functionally involved in prostate cancer bone metastasis. *Clin Exp Metastasis*. 2011;28(7):615-25.
43. Saini S, Majid S, Yamamura S, Tabatabai L, Suh SO, Shahryari V, et al. Regulatory Role of mir-203 in Prostate Cancer Progression and Metastasis. *Clin Cancer Res*. 2011;17(16):5287-98.
44. van der Pluijm G. Epithelial plasticity, cancer stem cells and bone metastasis formation. *Bone*. 2011;48(1):37-43.
45. Katopodis H, Philippou A, Tenta R, Doillon C, Papachroni KK, Papavassiliou AG, et al. MG-63 osteoblast-like cells enhance the osteoprotegerin expression of PC-3 prostate cancer cells. *Anticancer Res*. 2009;29(10):4013-8.
46. van der Horst G, van den Hoogen C, Buijs JT, Cheung H, Bloys H, Pelger RC, et al. Targeting of alpha(v)-integrins in stem/progenitor cells and supportive microenvironment impairs bone metastasis in human prostate cancer. *Neoplasia*. 2011;13(6):516-25.
47. Ono M, Inkson CA, Sonn R, Kilts TM, de Castro LF, Maeda A, et al. WISP1/CCN4: a potential target for inhibiting prostate cancer growth and spread to bone. *PLoS One*. 2013;8(8):e71709.

48. Patel LR, Camacho DF, Shiozawa Y, Pienta KJ, Taichman RS. Mechanisms of cancer cell metastasis to the bone: a multistep process. *Future Oncol.* 2011;7(11):1285-97.
49. Isman FK, Kucukgergin C, Dasdemir S, Cakmakoglu B, Sanli O, Seckin S. Association between SDF1-3'A or CXCR4 gene polymorphisms with predisposition to and clinicopathological characteristics of prostate cancer with or without metastases. *Mol Biol Rep.* 2012;39(12):11073-9.
50. Shiozawa Y, Pienta KJ, Taichman RS. Hematopoietic stem cell niche is a potential therapeutic target for bone metastatic tumors. *Clin Cancer Res.* 2011;17(17):5553-8.
51. Schuettpelz LG, Link DC. Niche competition and cancer metastasis to bone. *J Clin Invest.* 2011;121(4):1253-5.
52. Barthel SR, Hays DL, Yazawa EM, Opperman M, Walley KC, Nimrichter L, et al. Definition of molecular determinants of prostate cancer cell bone extravasation. *Cancer Res.* 2013;73(2):942-52.
53. Casimiro S, Mohammad KS, Pires R, Tato-Costa J, Alho I, Teixeira R, et al. RANKL/RANK/MMP-1 molecular triad contributes to the metastatic phenotype of breast and prostate cancer cells in vitro. *PLoS One.* 2013;8(5):e63153.
54. Schulze J, Weber K, Baranowsky A, Streichert T, Lange T, Spiro AS, et al. p65-Dependent production of interleukin-1beta by osteolytic prostate cancer cells causes an induction of chemokine expression in osteoblasts. *Cancer Lett.* 2012;317(1):106-13.
55. Lamiche C, Clarhaut J, Strale PO, Crespin S, Pedretti N, Bernard FX, et al. The gap junction protein Cx43 is involved in the bone-targeted metastatic behaviour of human prostate cancer cells. *Clin Exp Metastasis.* 2012;29(2):111-22.

56. Autio KA, Morris MJ. Targeting bone physiology for the treatment of metastatic prostate cancer. *Clin Adv Hematol Oncol*. 2013;11(3):134-43.
57. Sabbota AL, Kim HR, Zhe X, Fridman R, Bonfil RD, Cher ML. Shedding of RANKL by tumor-associated MT1-MMP activates Src-dependent prostate cancer cell migration. *Cancer Res*. 2010;70(13):5558-66.
58. Taichman RS, Patel LR, Bedenis R, Wang J, Weidner S, Schumann T, et al. GAS6 receptor status is associated with dormancy and bone metastatic tumor formation. *PLoS One*. 2013;8(4):e61873.
59. Kobayashi A, Okuda H, Xing F, Pandey PR, Watabe M, Hirota S, et al. Bone morphogenetic protein 7 in dormancy and metastasis of prostate cancer stem-like cells in bone. *J Exp Med*. 2011;208(13):2641-55.
60. Jung Y, Shiozawa Y, Wang J, McGregor N, Dai J, Park SI, et al. Prevalence of prostate cancer metastases after intravenous inoculation provides clues into the molecular basis of dormancy in the bone marrow microenvironment. *Neoplasia*. 2012;14(5):429-39.
61. Mishra S, Tang Y, Wang L, deGraffenried L, Yeh IT, Werner S, et al. Blockade of transforming growth factor-beta (TGFbeta) signaling inhibits osteoblastic tumorigenesis by a novel human prostate cancer cell line. *Prostate*. 2011;71(13):1441-54.
62. Lee YC, Cheng CJ, Bilen MA, Lu JF, Satcher RL, Yu-Lee LY, et al. BMP4 promotes prostate tumor growth in bone through osteogenesis. *Cancer Res*. 2011;71(15):5194-203.
63. Morrissey C, Lai JS, Brown LG, Wang YC, Roudier MP, Coleman IM, et al. The expression of osteoclastogenesis-associated factors and osteoblast response to osteolytic prostate cancer cells. *Prostate*. 2010;70(4):412-24.

64. Rafiei S, Komarova SV. Molecular signaling pathways mediating osteoclastogenesis induced by prostate cancer cells. *BMC Cancer*. 2013;13:605.
65. Chang MA, Morgado M, Warren CR, Hinton CV, Farach-Carson MC, Delk NA. p62/SQSTM1 is required for cell survival of apoptosis-resistant bone metastatic prostate cancer cell lines. *Prostate*. 2014;74(2):149-63.
66. Tu SM, Som A, Tu B, Logothetis CJ, Lee MH, Yeung SC. Effect of Paget's disease of bone (osteitis deformans) on the progression of prostate cancer bone metastasis. *Br J Cancer*. 2012;107(4):646-51.
67. Secondini C, Wetterwald A, Schwaninger R, Thalmann GN, Cecchini MG. The role of the BMP signaling antagonist noggin in the development of prostate cancer osteolytic bone metastasis. *PLoS One*. 2011;6(1):e16078.
68. Akfirat C, Zhang X, Ventura A, Berel D, Colangelo ME, Miranti CK, et al. Tumour cell survival mechanisms in lethal metastatic prostate cancer differ between bone and soft tissue metastases. *J Pathol*. 2013;230(3):291-7.
69. Saylor PJ, Smith MR. Bone health and prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2010;13(1):20-7.
70. Kirschenbaum A, Liu XH, Yao S, Leiter A, Levine AC. Prostatic acid phosphatase is expressed in human prostate cancer bone metastases and promotes osteoblast differentiation. *Ann N Y Acad Sci*. 2011;1237:64-70.
71. Virk MS, Alaei F, Petrigliano FA, Sugiyama O, Chatziioannou AF, Stout D, et al. Combined inhibition of the BMP pathway and the RANK-RANKL axis in a mixed lytic/blastic prostate cancer lesion. *Bone*. 2011;48(3):578-87.
72. Li X, Koh AJ, Wang Z, Soki FN, Park SI, Pienta KJ, et al. Inhibitory effects of megakaryocytic cells in prostate cancer skeletal metastasis. *J Bone Miner Res*. 2011;26(1):125-34.

73. Hall CL, Zhang H, Baile S, Ljungman M, Kuhstoss S, Keller ET. p21CIP-1/WAF-1 induction is required to inhibit prostate cancer growth elicited by deficient expression of the Wnt inhibitor Dickkopf-1. *Cancer Res.* 2010;70(23):9916-26.
74. Autio KA, Scher HI, Morris MJ. Therapeutic strategies for bone metastases and their clinical sequelae in prostate cancer. *Curr Treat Options Oncol.* 2012;13(2):174-88.
75. Liao WH, Lin SH, Wu TT. A 70-year-old male having advanced prostate cancer presenting with hypercalcemia and diffuse osteoblastic bone metastases: a case report. *Cases J.* 2009;2(1):54.
76. Rajarubendra N, Bolton D, Lawrentschuk N. Diagnosis of bone metastases in urological malignancies--an update. *Urology.* 2010;76(4):782-90.
77. Nieder C, Haukland E, Pawinski A, Dalhaug A. Pathologic fracture and metastatic spinal cord compression in patients with prostate cancer and bone metastases. *BMC Urol.* 2010;10:23.
78. Aljumaily R, Mathew P. Optimal management of bone metastases in prostate cancer. *Curr Oncol Rep.* 2011;13(3):222-30.
79. Jossen S, Nomura T, Lin JT, Huang WC, Wu D, Zhau HE, et al. beta2-microglobulin induces epithelial to mesenchymal transition and confers cancer lethality and bone metastasis in human cancer cells. *Cancer Res.* 2011;71(7):2600-10.
80. Fritz V, Brondello JM, Gordeladze JO, Reseland JE, Bony C, Yssel H, et al. Bone-metastatic prostate carcinoma favors mesenchymal stem cell differentiation toward osteoblasts and reduces their osteoclastogenic potential. *J Cell Biochem.* 2011;112(11):3234-45.
81. Delk NA, Farach-Carson MC. Interleukin-6: a bone marrow stromal cell paracrine signal that induces neuroendocrine differentiation and modulates autophagy in bone metastatic PCa cells. *Autophagy.* 2012;8(4):650-63.

82. Zeng W, Wan R, Zheng Y, Singh SR, Wei Y. Hypoxia, stem cells and bone tumor. *Cancer Lett.* 2011;313(2):129-36.
83. Freitas M, Baldeiras I, Proença T, Pascoal R, Rabaça C, Valido F, et al. Cigarette Smoking Increases Oxidative Stress in Prostate Cancer Patients - A Preliminary Study. MEDIMOND, S.r.l.2007. p. 4.
84. Ricci E, Mattei E, Dumontet C, Eaton CL, Hamdy F, van der Pluije G, et al. Increased expression of putative cancer stem cell markers in the bone marrow of prostate cancer patients is associated with bone metastasis progression. *Prostate.* 2013;73(16):1738-46.
85. Park SI, Liao J, Berry JE, Li X, Koh AJ, Michalski ME, et al. Cyclophosphamide creates a receptive microenvironment for prostate cancer skeletal metastasis. *Cancer Res.* 2012;72(10):2522-32.
86. Mizutani K, Sud S, McGregor NA, Martinovski G, Rice BT, Craig MJ, et al. The chemokine CCL2 increases prostate tumor growth and bone metastasis through macrophage and osteoclast recruitment. *Neoplasia.* 2009;11(11):1235-42.
87. Kim SW, Kim JS, Papadopoulos J, Choi HJ, He J, Maya M, et al. Consistent interactions between tumor cell IL-6 and macrophage TNF-alpha enhance the growth of human prostate cancer cells in the bone of nude mouse. *Int Immunopharmacol.* 2011;11(7):862-72.
88. Gorlov IP, Sircar K, Zhao H, Maity SN, Navone NM, Gorlova OY, et al. Prioritizing genes associated with prostate cancer development. *BMC Cancer.* 2010;10:599.
89. Akech J, Wixted JJ, Bedard K, van der Deen M, Hussain S, Guise TA, et al. Runx2 association with progression of prostate cancer in patients: mechanisms

mediating bone osteolysis and osteoblastic metastatic lesions. *Oncogene*. 2010;29(6):811-21.

90. Zhang H, Pan Y, Zheng L, Choe C, Lindgren B, Jensen ED, et al. FOXO1 inhibits Runx2 transcriptional activity and prostate cancer cell migration and invasion. *Cancer Res*. 2011;71(9):3257-67.

91. Hu Z, Gupta J, Zhang Z, Gerseny H, Berg A, Chen YJ, et al. Systemic delivery of oncolytic adenoviruses targeting transforming growth factor-beta inhibits established bone metastasis in a prostate cancer mouse model. *Hum Gene Ther*. 2012;23(8):871-82.

92. Vela I, Morrissey C, Zhang X, Chen S, Corey E, Strutton GM, et al. PITX2 and non-canonical Wnt pathway interaction in metastatic prostate cancer. *Clin Exp Metastasis*. 2014;31(2):199-211.

93. Baniwal SK, Khalid O, Gabet Y, Shah RR, Purcell DJ, Mav D, et al. Runx2 transcriptome of prostate cancer cells: insights into invasiveness and bone metastasis. *Mol Cancer*. 2010;9:258.

94. Wan X, Li ZG, Yingling JM, Yang J, Starbuck MW, Ravoori MK, et al. Effect of transforming growth factor beta (TGF-beta) receptor I kinase inhibitor on prostate cancer bone growth. *Bone*. 2012;50(3):695-703.

95. Zheng D, Decker KF, Zhou T, Chen J, Qi Z, Jacobs K, et al. Role of WNT7B-induced noncanonical pathway in advanced prostate cancer. *Mol Cancer Res*. 2013;11(5):482-93.

96. Rachner TD, Gobel A, Benad-Mehner P, Hofbauer LC, Rauner M. Dickkopf-1 as a mediator and novel target in malignant bone disease. *Cancer Lett*. 2014;346(2):172-7.

97. Liu XH, Kirschenbaum A, Weinstein BM, Zaidi M, Yao S, Levine AC. Prostaglandin E2 modulates components of the Wnt signaling system in bone and prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;394(3):715-20.
98. Roh M, Abdulkadir SA. Targeting the endothelin receptor in prostate cancer bone metastasis: Back to the mouse? *Cancer Biol Ther.* 2010;9(8):615-7.
99. Rabbani SA, Valentino ML, Arakelian A, Ali S, Boschelli F. SKI-606 (Bosutinib) blocks prostate cancer invasion, growth, and metastasis in vitro and in vivo through regulation of genes involved in cancer growth and skeletal metastasis. *Mol Cancer Ther.* 2010;9(5):1147-57.
100. Russell MR, Liu Q, Fatatis A. Targeting the α receptor for platelet-derived growth factor as a primary or combination therapy in a preclinical model of prostate cancer skeletal metastasis. *Clin Cancer Res.* 2010;16(20):5002-10.
101. Cody JJ, Rivera AA, Lyons GR, Yang SW, Wang M, Ashley JW, et al. Expression of osteoprotegerin from a replicating adenovirus inhibits the progression of prostate cancer bone metastases in a murine model. *Lab Invest.* 2013;93(3):268-78.
102. Weiss RJ, Forsberg JA, Wedin R. Surgery of skeletal metastases in 306 patients with prostate cancer. *Acta Orthop.* 2012;83(1):74-9.
103. Saylor PJ, Armstrong AJ, Fizazi K, Freedland S, Saad F, Smith MR, et al. New and emerging therapies for bone metastases in genitourinary cancers. *Eur Urol.* 2013;63(2):309-20.