

**FATORES DE CRESCIMENTO E A SUA RELEVÂNCIA NA CASCATA  
METASTÁTICA ÓSSEA DO CARCINOMA DA PRÓSTATA**

**João Pedro de Sousa Mendes <sup>(1)</sup>**

**<sup>(1)</sup> Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal**

**E-mail: joapedrosousamendes@gmail.com**

## ÍNDICE

RESUMO .....	4
ABSTRACT .....	6
LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÓNIMOS .....	8
INTRODUÇÃO.....	13
MÉTODOS.....	15
MECANISMOS DE DISSEMINAÇÃO DO CANCRO DA PRÓSTATA PARA O OSSO.....	16
FASE EMBRIONÁRIA DA METÁSTASE – GANHO DE POTENCIAL METASTÁTICO NAS CÉLULAS DO TUMOR PRIMÁRIO .....	18
1) Interações célula-célula / célula-matriz e ganho de motilidade das células tumorais .....	18
2) Ação adjuvante do microambiente prostático .....	21
3) Neo-angiogénese .....	22
4) Seleção clonal.....	24
5) Influência à distância.....	27
INTRAVASAMENTO E EXTRAVASAMENTO – ENTRADA, PERMANÊNCIA E SAÍDA DA CÉLULA METASTÁTICA NO COMPARTIMENTO VASCULAR.....	28
TROPISMO DA METASTIZAÇÃO PARA O OSSO .....	34
1) Teorias que explicam metastização óssea .....	34
2) Integrinas e outras moléculas de adesão como promotoras da adesão ao endotélio vascular e medular .....	36
3) Homing das células tumorais – Eixo CXCL-CXCR .....	37
4) Papel dos níveis locais de cálcio no homing das células metastáticas .....	38
5) Fontes de lípidos.....	39
METÁSTASE DO CP NO OSSO.....	40
1) Turnover ósseo normal – o sistema RANK-RANKL-OPG e outras vias de sinalização associadas.....	40
2) O papel do microambiente ósseo.....	43
A TRÍADE OSTEOCLASTOS/OSTEOBLASTOS/CÉLULAS INVASORAS COMO FACILITADORES DA PROGRESSÃO DA METÁSTASE.....	68
1) Ativação da reabsorção óssea como <i>kickstarter</i> do ciclo vicioso de progressão tumoral.....	68
2) Papel das proteases e outras enzimas na degradação da MEC e progressão tumoral.....	71

3) O Ciclo Vicioso de retroalimentação da metástase óssea.....	79
4) O papel hormonal androgénico no crescimento da metástase.....	83
MORBILIDADE EM PACIENTES COM CP METASTÁTICO .....	84
TERAPIA DIRIGIDA AOS FATORES DE CRESCIMENTO PARA INTERRUPTÃO DO CICLO VICIOSO .....	86
TERAPIA DE PRIVAÇÃO ANDROGÉNICA .....	88
1) Osteoporose e outros sintomas relacionados com ADT – um mal que vem por bem.....	89
TERAPIA ANTI REABSORPTIVA.....	91
1) BIFOSFONATOS .....	91
TERAPIA DIRIGIDA À TRÍADE RANK/RANKL/OPG .....	95
1) DENOSUMAB.....	95
2) RANK-Fc .....	99
3) OPG-Fc.....	99
RADIOFÁRMACOS DIRIGIDOS AO OSSO .....	101
INIBIÇÃO DA BIOSÍNTESE DE ANDROGÉNIOS E O SEU PAPEL NO TRATAMENTO DE METÁSTASES ÓSSEAS.....	104
1) ABIRATERONA .....	104
2) ENZALUTAMIDA .....	105
CONCLUSÃO.....	107
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	112

## RESUMO

**Introdução:** O carcinoma prostático (CP) é um tumor de elevada prevalência. É o segundo tipo de tumor mais diagnosticado e a segunda maior causa de morte na população masculina, sendo inclusivamente o tipo de neoplasia mais frequente no homem em países ocidentais na faixa etária acima dos 50 anos. Apesar do diagnóstico se efetuar em idades cada vez mais precoces, a taxa de doença metastática constitui ainda um problema que marca um *shift* na intenção terapêutica do doente. Esta metastização possui uma marcada predileção óssea, associando-se a pior prognóstico e redução da esperança e qualidade de vida dos homens afetados.

**Objetivo:** Proceder à revisão do processo de cascata metastática óssea, incluindo as suas etapas principais e conjunto de fatores de crescimento envolvidos. Adicionalmente, realizar uma breve revisão de alguns dos fármacos aprovados dirigidos ao osso, no contexto de carcinoma prostático metastizante para esta localização.

**Resultados:** Foram identificados uma série de fatores envolvidos no desenrolar da capacidade metastática do CP, cujo papel permite ao tumor adquirir mobilidade através da modulação das interações célula-célula e célula-matriz, comportar-se de maneira invasiva, criar redes de neovasos, transpor a membrana basal e endotélio desses vasos para a circulação, sobreviver a mecanismos de morte celular e de *stress* circulatório, utilizar mecanismos quimiotáticos de *homing* medular, ligar-se ao endotélio dos vasos medulares e mais uma vez transpô-lo e à sua membrana basal, fixar-se em nichos medulares e aí tirar partido do rico microambiente ósseo e do constante estado de turnover ósseo. Adicionalmente, foi possível verificar que apesar de esta capacidade ser desenvolvida de maneira ativa pelo tumor, faz-se acompanhar de um conjunto de complexas interações com o meio que o envolve, sem o qual tal disseminação e comportamento invasivo não seriam possíveis.

**Conclusão:** o potencial metastático do CP é definido grandemente pelo conjunto de interações que estabelece com o microambiente envolvente, através de uma série de fatores de crescimento e vias de sinalização pró-tumorais. Muitas destas relações ocorrerem num contexto pré-metastático precoce, ainda durante a evolução do tumor no seu local primário, sendo que adicionalmente muitas destes fatores são transponíveis ao ambiente medular ósseo e possuem diferentes funções dependendo da etapa da cascata metastática – tal remete para a possibilidade de tratamentos dirigidos que venham a prevenir metastização à distância, apesar de tal heterogeneidade de funções poder condicionar dificuldades à investigação científica. A identificação destes fatores e respetivos mecanismos de ação abre portas ao desenvolvimento de terapias anti-fatores de sobrevivência.

**PALAVRAS-CHAVE:**

Neoplasias Prostáticas; Metástases Neoplásicas; Microambiente Tumoral; Osso e Ossos; Fatores de Crescimento; Osteoclasto; Osteoblasto; Reabsorção Óssea.

## **ABSTRACT**

**Introduction:** The prostatic carcinoma (PC) is a highly prevalent tumor. It is the second most diagnosed tumor and the second leading cause of death in the male population, being the most frequent type of cancer in men in Western countries in the age group above 50 years. Despite the diagnosis being performed at increasingly earlier ages, the rate of metastatic disease is still a problem that marks a shift in the patient's therapeutic intent. This metastastization has a marked predilection bone, associated with poor prognosis and reduction in life expectancy and quality of life of affected men.

**Objectives:** Review the bone metastatic cascade process, including its main stages and set of growth factors involved. Additionally, conduct a brief review of some of the approved drugs directed to the bone, in the context of prostate carcinoma metastasizing to this location.

**Results:** A number of factors involved in the unfolding of metastatic capacity of CP were identified, whose role allows the tumor to acquire mobility through modulation of cell-cell and cell-matrix interactions, behave invasively, create new blood vessel networks, cross the basement membrane and endothelium of these vessels into the circulation, surviving cell death mechanisms and circulatory stress, using chemotactic mechanisms of bone marrow homing, bind to the endothelium of medullary vessels and once again cross it and its basement membrane, settle in medullary niches and then take advantage of the rich bone microenvironment and the constant state of bone turnover . Additionally it was found that although this capability was developed actively by the tumor itself, it is accompanied by a set of complex interactions with the

environment that surrounds it, without which such dissemination and invasive behavior would not be possible.

**Conclusion:** PC's metastatic potential is greatly defined by the set of interactions established with the surrounding microenvironment, through a series of growth factors and pro-tumoral signaling pathways. Many of these interactions occur at an early pre-metastatic setting, even during the evolution of the tumor at its primary site – furthermore, many of these factors are transposable the bone marrow environment and have different functions depending on the metastatic cascade stage. This opens the door to the possibility of targeted treatments that may prevent distant metastastization, despite such heterogeneity of functions presenting an obstacle to scientific research. The identification of these factors and respective mechanisms of action might allow the development of anti-survival factors therapies.

#### **KEYWORDS:**

Prostate Neoplasms; Neoplasm Metastasis; Tumor Microenvironment; Bone and Bones; Growth Factors; Osteoclast; Osteoblast; Bone Resorption.

## LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÓNIMOS

- CP** – Carcinoma Prostático
- PSA** – *Prostate Specific Antigen*
- CRPC** – *Castration resistant prostate cancer*
- TGF- $\beta$**  – *Transforming Growth Factor  $\beta$*
- AR** – *Androgen Receptor*
- DHT** – Di-hidrotestosterona
- Cripto-1** – *Cryptic family protein 1*
- ZEB-1** – *Zinc finger E-box-binding homeobox 1*
- Smad** – *Small body size + Mothers against decapentaplegic homolog protein*
- DNA** – *Deoxyribonucleic Acid*
- Snail** – *Snail Family Zinc Finger 1*
- Slug** – *Snail Family Zinc Finger 2*
- Twist** – *Twist family bHLH transcription factor*
- FoxC2** – *Forkhead box C2*
- MMP** – *Matrix metalloproteinases*
- MEC** – Matriz extracelular
- GTP** – *Guanosine Triphosphate*
- Ras** – *Rat sarcoma*
- Rho** – *Ras homologue*
- Rac** – *Ras-related C3 botulinum toxin substrate*
- VEGF** – *Vascular endotelial growth factor*
- HIF** – *Hypoxia-inducible factor*
- bFGF** – *Basic fibroblast growth factor*
- VEGFR** – *Vascular endotelial growth factor receptor*
- u-PA** – *Urokinase-type plasminogen activator*
- BMDC** – *Bone marrow derived cell*
- MUC1** – *Mucin 1, cell surface associated*
- Ang 1/2** – Angiopoetina
- EMMPRIN** – *Extracellular matrix metalloproteinase inducer*



**RCI** – *Respiratory complex 1*

**ROS** – *Reactive Oxygen Species*

**CAF** – *Cancer associated fibroblast*

**CXCL** – *C-X-C motif ligand*

**TAM** – *Tumor associated macrophages*

**HSCs** – *Células estaminais hematopoiéticas*

**ESCs** – *Células estaminais endoteliais*

**PTHrP** – *PTH related protein*

**Bcl2** – *B-cell lymphoma 2*

**Bcl-XL** – *B-cell lymphoma extra-large*

**Mcl1** – *Myeloid cell leukemia 1*

**Bax** – *BCL2-associated X protein*

**Apaf1** – *Apoptotic protease activating factor 1*

**mTOR** – *Mechanistic target of rapamycin*

**MHC1** – *Major histocompatibility complex 1*

**NK** – *Natural Killer*

**sLe<sup>x</sup>** – *Tetrasacarídeo sialyl Lewis X*

**FT** – *Fucosiltransferase*

**EDTA** – *Ethylenediamine tetraacetic acid*

**VCAM-1** – *Vascular cell adhesion molecule 1*

**PECAM-1** – *Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule 1*

**ICAM** – *Intercellular Adhesion Molecule*

**RANKL** – *Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*

**BMP** – *Bone morphogenetic protein*

**PAR-1** – *Protease-activated receptor*

**CXCR** – *C-X-C chemokine receptor*

**CaSR** – *Calcium-sensing receptor*

**RANK** – *Receptor Activator of Nuclear Factor kappa-B*

**TNF** – *Tumor necrosis factor*

**TACE** – *Tumor necrosis factor- $\alpha$ -converting enzyme*

**OPG** – Osteoprotegerina  
**TNFR** – *Tumor necrosis factor receptor*  
**PTH** – *Parathyroid hormone*  
**EphA2** – *Ephrin type-A receptor 2*  
**EphB4** – *Ephrin type-B receptor 4*  
**Atp6v0d2** – *ATPase, H<sup>+</sup> Transporting, Lysosomal 38kDa, V0 Subunit D2*  
**HRE** – *Hypoxia-response element*  
**IGF** – *Insulin-like growth factor*  
**FGF** – *Fibroblast growth factor*  
**IL** – *Interleucina*  
**ET** – *Endotelina*  
**PDGF** – *Platelet-derived growth factor*  
**EGF** – *Epidermal growth factor*  
**Wnt** – *Wingless-type MMTV integration site*  
**PDGFR** – *Platelet-derived growth factor receptor*  
**NFAT-1** – *Nuclear factor of activated T-cells*  
**IGF-R** – *Insulin-like growth factor receptor*  
**IGFBPs** – *Insulin-like growth factor binding proteins*  
**GH** – *Growth hormone*  
**PI3K/AKT** – *Phosphoinositide 3-kinase/Protein kinase B*  
**IRS** – *Insulin-receptor substrate*  
**S6K** – *S6 kinase*  
**MAPK** – *Mitogen-activated protein-kinase*  
**M-CSF** – *Macrophage colony-stimulating factor*  
**BMPR** – *Bone morphogenetic protein receptor*  
**PIGF** – *Placental growth factor*  
**NRP** – *Neuropilina*  
**HSPG** – *Heparan sulfate proteoglycan*  
**FGFR** – *Fibroblast growth factor receptor*  
**ETAR** – *Endothelin receptor type A*

**ETBR** – *Endothelin receptor type B*

**NEP** – *Neutral endopeptidase*

**DKK-1** – *Dickkopf-related protein 1*

**JAK** – *Janus kinase*

**STAT** – *Signal Transducer and Activator of Transcription*

**TF** – *Transcription Factor*

**PPR** – *PTH/PTHrP receptor*

**CCL2** – *Chemokine C-C motif ligand 2*

**NLS** – *Nuclear localization sequence*

**FZD** – *Frizzled Protein*

**LRP** – *Lipo-protein related protein*

**sFRP** – *Secreted Frizzled-related proteins*

**WIF-1** – *Wnt inhibitory factor 1*

**Runx2** – *Runt-related transcription factor 2*

**BAP** – *Bone-specific alkaline phosphatase*

**u-NTX** – *Urinary N-telopeptide*

**TIMP** – *Tissue inhibitors of metalloproteinases*

**MT1-MMP** – *Membrane type 1-matrix metalloproteinase 1*

**u-PAR** – *Urokinase receptor*

**SFKs** – *Src family kinases*

**HER2** – *Human Epidermal growth factor Receptor 2*

**EGFR** – *Epidermal growth factor receptor*

**HGF** – *Hepatocyte growth factor*

**SRE** – *Skeletal Related Event*

**ADT** – *Androgen deprivation therapy*

**DMO** – *Densidade Mineral Óssea*

**ASF** – *Anti-survival factor*

**QT** – *Quimioterapia*

**RT** – *Radioterapia*

**GnRH** – *Gonadotropin-releasing hormone*

**CTIBL** – *Castration Treatment Induced Bone Loss*

**FPPS** – Farnesil pirofosfato sintetase

**GGPFS** – Geranil-geranil pirofosfato sintetase

**ATP** – Trifosfato de Adenosina

**ZEUS** – *Zometa European Study*

**FDA** – *Food and Drug Administration*

**IgG<sub>2</sub>** – *Imunoglobulina G2*

**HALT 38** – *Hormone Ablation Bone Loss Trial 38*

**TRAIL** – *Tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand*

**EDTMP** – Etilenediaminotetrametileno

**ALSYMPCA** – *Alpharadin in Symptomatic Prostate Cancer*

**FACT-P** – *Functional Assessment of Cancer Therapy-Prostate*

**FA** – Fosfatase alcalina

**CYP17** – Citocromo P450 17

**COU-AA-301** – *Cougar–Abiraterone Acetate–Study 301*

**COU-AA-302** – *Cougar–Abiraterone Acetate–Study 302*

## INTRODUÇÃO

A glândula prostática é um órgão pertencente ao sistema genito-urinário/reprodutor do homem, cuja função passa pela produção de fluido seminal, assim como funções de continência miccional. Tem sensivelmente o tamanho de uma noz, e situa-se em estreita proximidade com a bexiga, situando-se abaixo desta (1). O carcinoma prostático (CP) é um tumor de elevada prevalência. É o segundo tipo de tumor mais diagnosticado e a segunda maior causa de morte na população masculina, sendo inclusivamente o tipo de neoplasia mais frequente no homem em países ocidentais na faixa etária acima dos 50 anos. (2–4). A maioria dos diagnósticos é atualmente realizada precocemente devido à realização medições regulares do marcador tumoral PSA (*Prostate Specific Antigen*), acopladas ao exame objetivo com toque retal e exame imagiológico ecográfico, com frequente deteção de doença ainda limitada ao órgão – esta deteção precoce representa normalmente uma taxa de sobrevivência aos 5 anos de 100%, ao passo que a deteção em estadios avançados faz essa taxa cair para não mais que 33% de taxa de sobrevivência no mesmo período de tempo (5).

Por outro lado, uma parte considerável dos diagnósticos, cerca de 5 % (1,6), é feita quando já é possível visualizar imagiologicamente doença metastática – mesmo em pacientes aparentemente livres de disseminação à avaliação, 10 a 20% acabam por

desenvolve-las, fenómeno atribuível à presença de micrometástases até então indetetáveis (1,3) – dados mais pessimistas chegam mesmo a fazer esta percentagem ascender aos 40% (6). Já em pacientes com doença metastática avançada, resistente à castração (CRPC – *Castration resistant prostate cancer*) a existência de metástases ósseas verifica-se em 70-90 % dos casos (4).

Entre as localizações preferenciais de ocorrência destas, encontra-se o osso, cuja constituição é rica em medula vermelha, sendo responsável por cerca de 90% das metástases observadas em pacientes com doença metastática – em 85% dos pacientes, chega a ser o único local de metástase (3).

Tanto no seio do tumor primário como nas suas localizações extra-orgão (osso incluído), as células metastáticas exercem e recebem influência a partir do microambiente onde se inserem, sendo estas interações mediadas por moléculas definidas por fatores de crescimento – estas possuem um papel preponderante na evolução da metástase, no seu grau de agressividade e invasão assim como na sua resistência relativa a terapias anti-tumorais.

Qualquer tipo de metástases, em especial as associadas ao CP são sinónimo de um pesado fardo para o doente, traduzindo-se numa série de comorbilidades e encargos que requerem o auxílio de uma extensa rede de apoio interdisciplinar, que surge com o objetivo de minorar a morbidade associada a essa condição, e melhorar a qualidade de vida do doente (7).

Torna-se assim essencial evitar a ocorrência disseminação metastática ou, no caso de estas já se encontrarem presentes em localizações ósseas, utilizar estratégias válidas e eficazes para combater a sua progressão, com repercussão mínima nas atividades do doente. É com esse intuito que este artigo de revisão se debruça na

realização de um levantamento dos fatores de crescimento tumorais/metastáticos mais relevantes para o desenrolar da cascata metastática e as suas etapas mais importantes, com o intuito de explicar as suas funções e respetivos mecanismos de sinalização no contexto do CP. Deste modo, pode vir a ser possível a criação de estratégias e linhas de investigação pertinentes tendo-os como principal alvo. Adicionalmente, procura-se fazer um breve *state of the art* relativo aos estudos de fase III já realizados referentes a terapêuticas dirigidas ao osso no contexto de CP metastático ósseo, assim como às comorbilidades associadas.

## MÉTODOS

Este artigo de revisão visou artigos relevantes selecionados recorrendo à base de dados internacional “PubMed”.

O período de tempo alvo estabelecido inicialmente visou a recolha de artigos num período de até 10 anos em relação à data da proposta de tese, compreendendo as datas entre Janeiro de 2005 até Dezembro de 2015.

Como filtros adicionais, definiu-se a utilização de artigos na língua inglesa, portuguesa e espanhola.

Na recolha e seleção inicial de material bibliográfico foi utilizado um total de 2 equações de pesquisa baseadas nos termos MeSH, a partir das quais foram postumamente selecionados artigos relevantes:

- 1) (("Neoplasm Metastasis"[Mesh]) AND "Prostatic Neoplasms"[Mesh]) AND "Bone and Bones"[Mesh]), que produziu 71 resultados;
- 2) (("Neoplasm Metastasis/physiopathology"[Mesh]) AND "Prostatic Neoplasms"[Mesh]), que produziu 43 resultados.

Artigos relevantes foram então selecionados tendo em conta o seu título, leitura do resumo e/ou leitura integral da totalidade do artigo, excluindo os que se encontravam fora dos parâmetros da linha de pesquisa traçada.

Pesquisas adicionais advieram da identificação de outros artigos científicos relevantes através de citações ao longo do texto ou presentes nas referências bibliográficas, sendo possível que ocasionalmente alguns artigos utilizados apresentem desvios em relação ao intervalo de tempo estabelecido ou às equações de pesquisa utilizadas.

## **MECANISMOS DE DISSEMINAÇÃO DO CANCRO DA PRÓSTATA PARA O OSSO**

As células do CP primário estão munidas de um potencial intrínseco para a metastização – esta capacidade é definida pela autossuficiência na produção de fatores de crescimento, resistência a fatores inibidores do crescimento, evasão à morte celular, capacidade proliferativa exacerbada, estimulação pró-angiogénica e invasão tecidual (8). Este processo envolve *triggers* específicos, já que uma célula tumoral não tem por si só capacidade metastática – 85% das células que entram na circulação são rapidamente destruídas, inativadas ou simplesmente removidas da circulação (9).

Esta capacidade pode ser adquirida devido a interação/estimulação por parte do microambiente onde se insere, ou poderá ser ativada em células cujo *makeup* genético possua um grau intrínseco de suscetibilidade que, após uma série de eventos, leve ao início da expressão de produtos celulares que confirmam às células tumorais do CP uma capacidade agressiva e invasiva (10). Este conjunto de alterações permite-lhes adquirir não só mobilidade (destacando-se do epitélio envolvente) mas também estimular a neo-angiogénese, invasão vascular para a circulação, sobrevivência à jornada na circulação,



capacidade de adesão ao endotélio dos vasos medulares (*Dock & Lock*), extravasamento para a medula e por fim sobrevivência no microambiente ósseo, que permita à célula proliferar e aumentar o volume da massa tumoral. Portanto, a cascata metastática não é um processo linear, mas sim um conjunto de interações *multi-step* (9) que permitem às células metastizar – como tal, torna-se pertinente identificar os mecanismos em questão, de modo a focá-los como possíveis alvos terapêuticos no futuro.

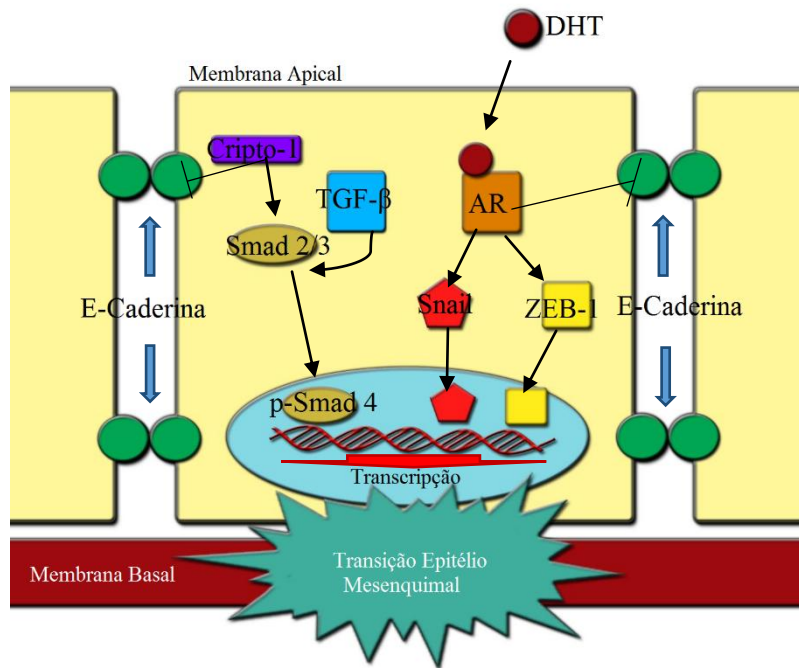
## **FASE EMBRIONÁRIA DA METÁSTASE – GANHO DE POTENCIAL METASTÁTICO NAS CÉLULAS DO TUMOR PRIMÁRIO**

A capacidade metastática de uma célula de CP começa a ser estabelecida logo desde o início do desenvolvimento do carcinoma – o surgimento desta capacidade pode ser dividida em duas categorias distintas: pode partir de uma base genética propensa ao seu desenvolvimento (relacionadas com o próprio potencial das células malignas) ou adquirir esse conjunto de alterações genético-fenotípicas ao longo dos anos (processo intimamente associado e com grande interdependência com alterações no tecido estromal envolvente) (11). As alterações que daí advêm permitem o estabelecimento de complexas e importantes interações com o meio onde se inserem, que amplia a capacidade invasora característica do CP. É um processo dinâmico com as várias etapas que se sobrepõem umas às outras e atuam em sinergia, correspondendo ao início da cascata metastática, permitindo que a célula neoplásica, mesmo depois de abandonar o tecido prostático base, continue a evoluir e a remodelar-se até à chegada ao ambiente ósseo.

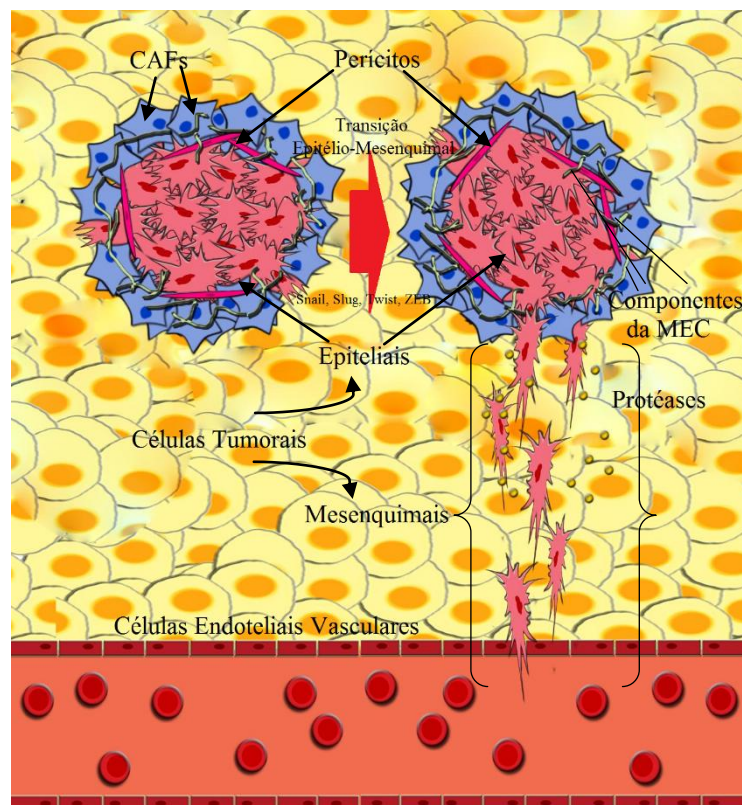
### **1) Interações célula-célula / célula-matriz e ganho de motilidade das células tumorais**

Um ponto-chave no início do processo metastático passa pela aquisição de motilidade e respetivo potencial invasivo, que lhes permite criar metástases à distância através de um acréscimo de mobilidade e resistência. Este ganho de função está intimamente relacionado com a sua capacidade de alcançar e destruir a membrana basal, ao se destacar das locas epiteliais onde se encontra, atingindo a ponte para a entrada na circulação – este processo é designado por transição epitélio-mesenquimal, fenómeno que imita a gastrulação embrionária, e que requer grande mobilidade, característica das células mesenquimais. No CP, esta transição é maioritariamente desencadeada pelo

estímulo do TGF- $\beta$  (*Transforming growth factor  $\beta$* ) e pela sinalização do recetor androgénico (AR – *androgen receptor*) (12). As figuras 1 e 2 resumizam o processo de transição epitélio mesenquimal e os seus intervenientes (12,13).



**Figura 1.** Mecanismos intracelulares envolvidos na transição epitélio mesenquimal – o TGF- $\beta$  e a sinalização pela via do AR constituem duas das vias mais preponderantes (adaptado de Campbell GM, Kyprianou N. Epithelial mesenchymal transition (EMT) in prostate growth and tumor progression. *Transl Androl Urol.* 2013;2(3):202–11 e de Ganguly SS, Li X, Miranti CK. The Host Microenvironment Influences Prostate Cancer Invasion, Systemic Spread, Bone Colonization, and Osteoblastic Metastasis. *Front Oncol* [Internet]. 2014;4:1–16.)(12,13). DHT (di-hidrotestosterona); Cripto-1 (*Cryptic family protein 1*); TGF- $\beta$  (*Transforming growth factor  $\beta$* ); AR (Androgen receptor); Snail (*Snail Family Zinc Finger 1*); ZEB-1 (*Zinc finger E-box-binding homeobox 1*); Smad (*Small body size + Mothers against decapentaplegic homolog protein*).



**Figura 2.** Fibroblastos associados ao tumor (CAFs), pericitos e componentes da MEC têm um papel ativo no processo de transição epitélio-mesênquimal. O tumor fica capacitado da produção de proteases, que lhe permitem ganhar motilidade e degradar a MEC envolvente, de modo a invadir a vasculatura (adaptado de Campbell GM, Kyprianou N. Epithelial mesenchymal transition (EMT) in prostate growth and tumor progression. *Transl Androl Urol.* 2013;2(3):202–11 e de Ganguly SS, Li X, Miranti CK. The Host Microenvironment Influences Prostate Cancer Invasion, Systemic Spread, Bone Colonization, and Osteoblastic Metastasis. *Front Oncol* [Internet]. 2014;4:1–16.). CAF (*cancer associated fibroblasts*); MEC (matriz extracelular).

Envolvidas neste processo estão por exemplo moléculas pertencentes ao complexo Caderina-Catenina, tendo já sido relacionadas com estadios tumorais mais avançados, metástases ósseas e mau prognóstico (14). As caderinas são glicoproteínas transmembranares que promovem a adesão célula-célula (sendo a E-caderina a mais proeminente), estando ancoradas ao citoesqueleto por intermédio da Catenina intracelular. Durante a transição epitélio-mesênquimal dá-se a ruptura da ligação entre ambas, com aumento da instabilidade e mobilidade associados, devido à produção de N-caderina mesênquimal no lugar da normal E-caderina (13). Ausência ou disfunção das  $\alpha$  e  $\beta$ -cateninas pode, para além de condicionar instabilidade do sistema de

ancoragem, envolver a própria modulação da transcrição do DNA (*Deoxyribonucleic Acid*) (14). Outros marcadores celulares como a Vimentina, Fibronectina, Snail (também chamado SNAI1 - *Snail Family Zinc Finger 1*), Slug (também chamado SNAI2 – *Snail Family Zinc Finger 2*), Twist (*Twist family bHLH transcription factor*), FoxC2 (*Forkhead box C2*), e as MMP's 2, 3 e 9 (*Matrix metalloproteinases*) também estão relacionados com este processo (12).

A motilidade celular também é dependente das interações que estabelece com a matriz extracelular (MEC), mediadas maioritariamente pelas integrinas, cuja disfunção atua em uníssono com enzimas que degradam tanto a matriz como a membrana basal, cujo papel será abordado mais à frente no subcapítulo *Integrinas e outras moléculas de adesão como promotoras da adesão ao endotélio vascular e medular*.

O movimento físico das membranas celulares, assim como uma porção da sinalização intracelular e da atividade do citoesqueleto é ainda propiciado por proteínas de ligação ao GTP (Trifosfato de Guanosina – *Guanosine Triphosphate*) como o eixo Ras-Rho (Ras – *Rat sarcoma* e Rho – *Ras homologue*, duas vias intimamente ligadas) e Rac (*Ras-related C3 botulinum toxin substrate*), cuja disfunção se pensa propiciar o desenvolvimento metastático. Estudos com Ácido Zoledrónico demonstraram que a motilidade de células através da barreira endotelial e estroma medular humano pode ser eficazmente inibida com este fármaco, dada a sua função inibidora da via de sinalização do Ras (por inibição da prenilação deste), assim como da via do mevalonato (e consequentemente da via do do RhoA, uma das proteínas da família Rho).

## **2) Ação adjuvante do microambiente prostático**

Antes mesmo de a célula ser capaz de produzir compostos que lhe permitam adquirir motilidade e invadir os tecidos de maneira agressiva, já possui algum grau de capacidade de alterar o seu meio envolvente, antevendo o processo de disseminação,

quer esta se dê por continuidade (vesículas seminais, bexiga, reto) ou por disseminação hematogénica/linfática – este ganho de função não seria possível, sem o auxílio de um compartimento estromal subjacente que estabelece *cross-talks* de maneira parácrina com o compartimento epitelial, favorecendo a ativação das vias de sinalização e expressão génica que estabelecem um ciclo vicioso de reforço e propagação contínua do sinal (13). As células do estroma são promotoras da progressão tumoral e como tal, devido à estreita relação que têm com estas células, acabam elas próprias por sofrer processos de alteração que, não sendo malignos, constituem desvios da normalidade – estes desvios promovem direta ou indiretamente a progressão tumoral, através de *remodeling* matricial aumentado, aumento da atividade de proteases, aumento da expressão de fatores de crescimento, angiogénese e influxo de células inflamatórias (15).

### **3) Neo-angiogénese**

Se no início a célula do tumor primário é nutrida por simples difusão, rapidamente inicia a produção de fatores de crescimento neo-angiogénicos (cujo estímulo principal é um grau crescente de hipoxia intratumoral) que criam uma intrincada rede de aporte nutritivo com múltiplos neovasos, vasos não endotelizados de elevada permeabilidade, baixa resistência vascular e shunts arterio-venosos (16), em seu redor. Este denominado *switch* angiogénico ocorre em fases precoces da cascata metastática e do desenvolvimento tumoral, propiciando em fases mais avançadas o surgimento de uma porta de entrada na circulação sanguínea ou linfática, (processo denominado de intravasamento (9,17)) – um processo mediado por fatores como o VEGF (*Vascular endothelial growth factor* - cuja produção é mediada pelo HIF – *Hypoxia-inducible factor* - em resposta a hipoxia (18)) ou o bFGF (*Basic fibroblast growth factor*). O *switch* angiogénico (transponível igualmente para o ambiente medular ósseo) engloba

assim duas fases intimamente relacionadas – primeiramente ocorre um “*switch* de iniciação”, com expressão aumentada de HIF-1 e VEGFR (*VEGF receptor*); de seguida, ocorre um “*switch* de progressão”, caracterizado por níveis crescentes de produção de VEGF (18).

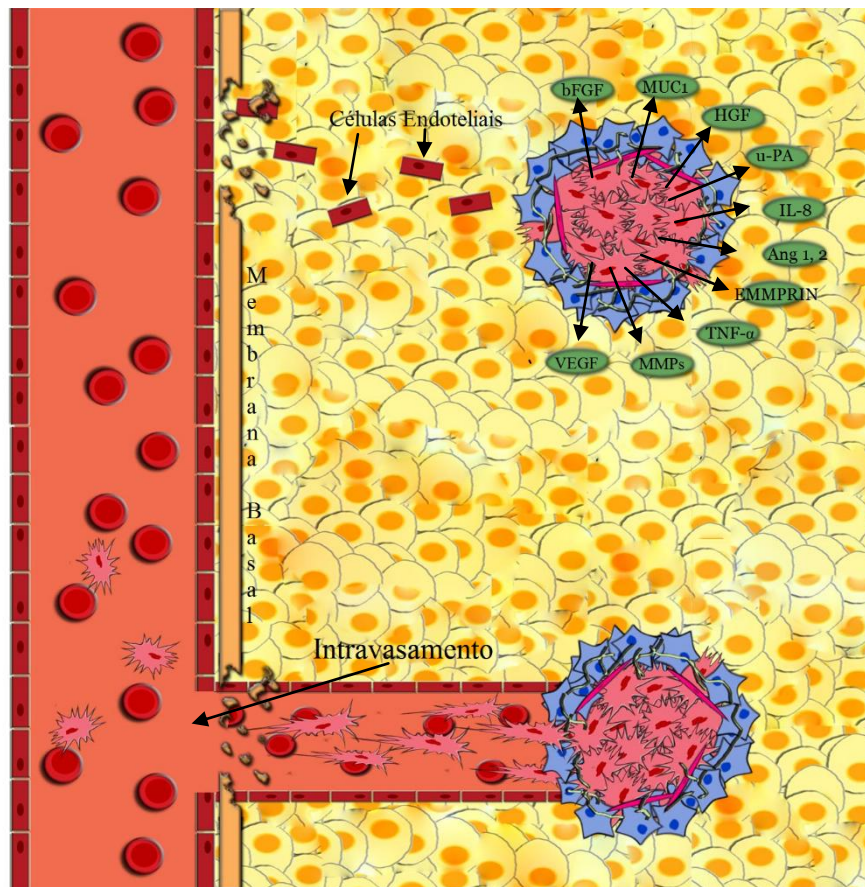
Como participantes ativos neste processo encontram-se não só as células metastáticas, implicando igualmente uma vasta rede de interações com as células endoteliais e a MEC – estas interações incluem a secreção de enzimas como as MMPs e a u-PA (*urokinase-type plasminogen activator*), que degradam a membrana basal e permitem a migração de células endoteliais, que se agregam e formam túbulos suportados por péricitos, denominados por “*capillary-sprouts*”, os quais postumamente progridem e criam anastomoses entre si que criam efetivamente uma rede de aporte sanguíneo aberrante (18). Estas interações chegam a ser tão importantes na sobrevivência do tumor, que ao serem desprovidos de capacidade angiogénica não ultrapassam tamanhos superiores a 2-3 cm, e sem que esta seja ativada não desenvolvem capacidade metastática (18,19).

Os neovasos surgem por ramificações de vasos pré-existentes, ou mediante a capacidade das células tumorais em secretar quimiocinas para recrutar células progenitoras endoteliais derivadas da medula (BMDCs – *Bone Marrow derived cells*), assim como monócitos (18).

O processo de neoangiogénese e os seus intervenientes encontram-se representados de maneira resumida na figura 3 (18).

Este estabelecimento deste “cordão-umbilical” por parte do tumor primário deve ser visto como uma rampa de lançamento para a disseminação metastática, com o grau de densidade vascular em redor das massas tumorais a relacionar-se com prognósticos

menos favoráveis, traduzindo-se em tumores de estádios mais avançados e consequente redução da sobrevida.



**Figura 3.** As células tumorais produzem substância pró-angiogênicas que causam o aumento da permeabilidade vascular e disrupção da membrana basal dos vasos. Percursos endoteliais são então recrutados em resposta a esses estímulos para a criação de neovasculatura aberrante, permitindo entrada das células metastáticas na circulação – intravasamento (adaptado de Li Y, Cozzi PJ. Angiogenesis as a Strategic Target for Prostate Cancer Therapy. *Med Res Rev.* 2009;30(1):23–66). bFGF (basic fibroblast growth factor); MUC1 (*mucin 1, cell surface associated*); HGF (*hepatocyte growth factor*); u-PA (*urokinase-type plasminogen activator*); IL-8 (interleucina 8); Ang 1/2 (angiopoetina); EMMPRIN (*extracellular matrix metalloproteinase inducer*); TNF- $\alpha$  (*Tumor necrosis factor  $\alpha$* ); MMP (*matrix metalloproteinases*); VEGF (*vascular endothelial growth factor*).

#### 4) Seleção clonal

Outro processo de grande importância no ganho de capacidade invasiva pelas células tumorais, e que ocorre de maneira contínua desde o aparecimento do primeiro clone tumoral é a seleção clonal. Este processo permite que a aquisição de características genéticas ou fenotípicas confira às células afetadas algum grau de



vantagem sobre células normais, permitindo-lhes estabelecer interações com o seu meio que lhes são proveitosas e auxiliam no seu desenvolvimento, crescimento e proliferação (10). Entre as características genéticas identificou-se recentemente a importância das mutações mitocondriais no ganho de potencial metastático do CP, com mutações do RCI (*Respiratory Complex I*) a causarem produção de ROS (*Reactive oxygen species*) que promovem a expressão de genes nucleares pró-atividade tumoral, sem no entanto proceder a aumento da instabilidade genética em si (20). Para além do mais, o mesmo estudo identificou uma maior prevalência destas mutações em localizações ósseas do que em quaisquer outras localizações.

A seleção clonal está dependente de fatores intrínsecos ao hospedeiro (sistema imunitário, pressões mecânicas dentro do tumor e na circulação, vascularização, acesso a nutrientes e sobretudo o microambiente) e a fatores extrínsecos, derivados frequentemente da própria pressão exercida pelas terapias anti-tumorais vigentes. Ocorre a dois tempos, sendo que o primeiro tempo corresponde à fase de desenvolvimento do tumor primário, e o segundo tempo inicia-se com a chegada das primeiras células colonizadoras à medula óssea – onde novas interações estabelecidas pelo microambiente ósseo condicionam um conjunto de novas alterações das linhas celulares viáveis. A pressão seletiva do microambiente onde a célula tumoral está inserida é estabelecida pela MEC, as células do compartimento estromal (fibroblastos, mioblastos, células endoteliais, imunes), assim como pelos compostos que expressam e que trocam entre si (quimiocinas, citocinas, proteases). Posto isto, células incapazes de sobreviver à estimulação exercida pelos fatores de stress ambiental aos quais são expostas (quer isto se dê no ambiente tumoral primário, compartimento vascular ou à chegada ao microambiente ósseo), definham e morrem, permanecendo somente as linhas celulares melhor adaptadas, mantendo-se assim linhas celulares capazes de

sobreviver às árduas etapas da fase metastática (9). Exemplo de como as células tumorais influenciam a sua adjacência e vice-versa, foram detetados recentemente envolvendo fibroblastos peri-tumorais, ou CAFs (*Cancer associated fibroblasts*) (11) – estes mostraram-se significativamente diferentes dos seus congêneres ditos normais, e experiências levadas a cabo que procederam à transferência destes para um local não metastático rapidamente iniciaram a tumorigênese. Este comportamento está relacionado com a ativação de um fenótipo miofibroblástico em resposta ao contacto físico com as células tumorais, elevados níveis de fatores de crescimento por elas produzidos ou mesmo mediado pela hipoxia intimamente associada à expansão da massa tumoral (11). Dado isto, os fibroblastos alterados passam a ser capazes de produzir MMPs, que em conjunto com a panóplia de enzimas e fatores de crescimento igualmente secretadas pelas células tumorais procedem à remodelação da MEC. Adicionalmente, adquirem a capacidade de produzir VEGF e quimiocinas da família CXCL (*C-X-C motif ligand*), que contribuem sinérgicamente para o mecanismo de remodelação ao criar um gradiente quimiotático que resulta no recrutamento de células endoteliais (estímulo angiogénico) e de infiltrados leucocíticos (os quais eles próprios também evoluem para um fenótipo responsivo às células tumorais, que procede à produção de fatores de crescimento pró-angiogénicos e metaloproteinases, os chamados TAM – *Tumor-associated macrophages*) (11).

Comportamento semelhante na remodelação do microambiente tumoral parece ser igualmente efetuado por células musculares lisas, dado que um estudo reportou que estas sofreram também uma transição miofibroblástica ao serem usadas como substrato de cultura de células malignas em vez de Matrigel (13).

## 5) Influência à distância

As interações das células tumorais não se limitam somente ao ambiente tumoral primário – chegam a abranger outras linhas celulares, podendo exercer influência no local ósseo à distância antes mesmo de ter abandonado o local tumoral primário. Exemplo disto é o efeito que exercem sobre células estaminais hematopoiéticas (HSCs) ou células estaminais endoteliais (ESCs). Estes grupos celulares (recrutados quimiotaxicamente através da produção de quimiocinas, fatores de crescimento e proteases por parte das células de CP) expressam VEGFRs e possuem a capacidade de migrar entre locais periféricos e o seu nicho medular ósseo, condicionando não só vias de sinalização que promovem a neovascularização e progressão tumoral, mas também a “preparação” do seu microambiente ósseo de origem para que este venha a acolher as células metastáticas assim que estas iniciarem o processo de disseminação – esta preparação traduz-se num aumento de fibronectina (à qual as células tumorais se liga por intermédio de integrinas) ou fatores quimiotáticos nos locais preferenciais de metástase (21). De facto, níveis elevados de HSCs são encontrados nesses locais metastáticos preferenciais, e precedem a chegada de ESCs e células tumorais – é por isso sugerido que as HSCs possam ter um papel chave na remodelação do nicho-pré-metastático (22).

Outros compostos produzidos pelo CP primário como a PTHrP (*PTH related protein*), heparanase e osteopontina também já foram identificados como tendo um possível papel no *priming* das localizações ósseas para colonização futura, atuando através do aumento à distância da reabsorção óssea e do grau de inflamação propício ao desenvolvimento tumoral (21).

## **INTRAVASAMENTO E EXTRAVASAMENTO – ENTRADA, PERMANÊNCIA E SAÍDA DA CÉLULA METASTÁTICA NO COMPARTIMENTO VASCULAR**

Já foi mencionado por diversas vezes o facto de as células metastáticas conseguirem adquirir a capacidade de se destacar das suas congéneres da massa tumoral, e de seguidamente procederem à invasão da MEC – este processo associa-se a ganho de motilidade, migração e concomitante destruição da mesma, à medida que se dá a progressão tumoral (10), acabando por atingir zonas limítrofes de circulação sanguínea, ou segundo algumas teorias, linfáticas. É nesta altura que a célula metastática, munida de todo o seu armamentário capaz de modular a sua motilidade e capacidade de adesão, dá o passo seguinte na cascata metastática, procedendo a um processo de adesão à membrana basal dos vasos, degradá-la e realizar a migração transendotelial com entrada na circulação sistémica – o intravasamento.

O intravasamento celular dá-se na maioria das vezes inexoravelmente devido à carga tumoral crescente e com características cada vez mais invasivas, intimamente dependente da capacidade angiogénica do tumor – no entanto, em especial no CP, esta disseminação de colonos metastáticos pode igualmente ocorrer igualmente de maneira iatrogénica, como por exemplo em consequência de uma ressecção transuretral da próstata (RTUP), prostatectomia radical, biópsias e braquiterapia (14). Posto isto, não seria de esperar que dada a entrada de células metastáticas na circulação, se traduzisse em rápida colonização à distância, especialmente tendo em conta que a sua clearance da circulação se dá de maneira relativamente rápida? Tal não é o caso – como previamente abordado, grande parte das células com a capacidade de abandonar o epitélio de origem e aventurar-se na circulação nunca chegam ao seu destino, acabando por ser agregadas e inativadas em *clumps* celulares no primeiro leito vascular que encontram, removidas da circulação ou destruídas, processo condicionado pelo *stress* mecânico vascular,

predação por parte de células imunitárias ou simplesmente porque a seleção clonal ocorrida numa primeira fase no local tumoral primário não muniu essas células de capacidade para sobreviver além desta etapa – portanto, a dita iatrogenia que condiciona episódios de disseminação, até hoje esta não se associou a um aumento significativo na ocorrência de metástases, muito menos em localizações cujos leitos vasculares teoreticamente seriam propícios à sua fixação em agregados, como os pulmões ou o fígado (10,14).

No entanto as células metastáticas possuem de facto algumas formas de contornar estes percalços circulatórios. Primeiramente, para que tal aconteça, a célula tumoral necessita mesmo antes de abandonar o tecido epitelial da próstata incorrer num processo de evasão da *anoikis*, processo fisiopatológico definido por morte celular programada aquando do destacamento das células da MEC circundante. Adicionalmente, qualquer célula que dissemine necessita de contornar o processo apoptótico normal, obtendo um equilíbrio entre a produção de moléculas pró e anti-apoptóticas – esta evasão da apoptose pode ser conseguida através da sobre-expressão de efetores mitocondriais antiapoptóticos como o Bcl2 (*B-cell lymphoma 2*), Bcl-XL (*B-cell lymphoma extra-large*) ou o Mcl1 (*Myeloid cell leukemia 1*), ao mesmo tempo que limita a expressão de fatores pró-apoptóticos como as caspases, o Bax (*BCL2-associated X protein*) ou Apaf1 (*Apoptotic protease activating factor 1*) (11).

Adicionalmente, também se teoriza que as células metastáticas em trânsito procedam a processos adaptativos de autofagia através da sinalização da via mTOR (*Mechanistic target of rapamycin*), de modo a lidar com a passagem em zonas com aporte nutritivo reduzido como a circulação venosa, que em casos normais implicaria a morte celular por privação metabólica. No entanto este processo também aumenta o risco de morte por autofagia, sendo que a célula metastática necessita de ativar ainda

outra via secundária de modo a prevenir esse acontecimento – esta via utiliza quimiocinas monocitárias para ativar mecanismos de sobrevivência associados à Survivina, prevenindo efetivamente a morte celular nestas condições autofágicas (11).

Outro exemplo de um mecanismo de sobrevivência celular realizado pelas células tumorais é o facto de as que circulam como parte de um coágulo de fibrina terem maior probabilidade de sobreviver à jornada circulatória, assim como de serem retidas na rede capilar no seu destino (9) – associação entre eventos tromboembólicos e metastização é conhecida há já bastante tempo, fazendo suspeitar de algum efeito protetor/potenciador da capacidade de adesão ao endotélio vascular conferido pelas plaquetas (23). Esta proteção surge não só sob a forma de proteção contra o sistema imunitário, mas também através de interações entre integrinas da superfície plaquetar e da célula metastática, que se pensam prevenir o processo de *anoikis* (24). Concomitantemente, é possível que as células disseminadas tenham a capacidade de limitar a sua produção de MHC 1 (*Major histocompatibility complex 1*) – esta hipótese pode ser corroborada pelo facto de 34% das células dos tumores primários e 80% das derivadas de metástases linfáticas têm diminuição da expressão do MHC 1, limitando a ação das células imunitárias NK (Natural Killer) (9).

Após esta série de fenómenos as células metastáticas ainda necessitam de transpor mais uma barreira, desta vez no sentido contrário - este processo de abandono dos vasos sanguíneos medulares é denominado por extravasamento, e traduz-se mais uma vez na capacidade das células metastáticas de não só aderirem ao endotélio vascular, mas também de proceder à produção de compostos que permitam, entre outras funções, degradar a membrana basal, concedendo assim entrada para o rico ambiente medular. Resta saber porque é que este processo parece ser em grande parte mais bem-sucedido em vasos sanguíneos com acesso à medula óssea, condicionando metástases

nesta localização – será que o processo de extravasamento ocorre em todos os vasos do organismo, e só neste microambiente propício é que as células têm capacidade de se desenvolver? Ou será que previamente ao fenômeno de aderência existe já algum grau de tropismo/quimiotaxia para essas localizações?

A capacidade de adesão das células tumorais é mediada por uma série de interações receptor-ligando sobre tensão de cisalhamento, um processo apelidado de “*rolling-and-adhesion cascade*” (5). Este fenômeno é possível graças à produção por parte das células metastáticas de compostos que se ligam a E-selectinas (esta últimas produzidas tanto por células endoteliais como da própria medula óssea), constituindo mais um exemplo de sinal quimiotático no *homing* das células tumorais para o ambiente medular – um ligando em particular, o tetrasacarídeo sialyl Lewis X (sLe<sup>x</sup>) mostrou-se de particular interesse, sendo que a produção deste ligando só é possível mediante a ação da  $\alpha$ -1,3 fucosiltransferase (FT) 3, 4, 5, 6 e/ou 7 (dependendo do tipo de célula). A expressão destas transferases, pode estar relacionada com o potencial ósseo metastático do CP para o osso. Exemplo desta afirmação, surge a partir dos resultados de um estudo laboratorial que comparou a capacidade de “*rolling*” de células tumorais que expressavam diferentes tipos desta transferase, sendo que linhas que expressavam FT6 induziram a velocidade de “*rolling*” mais baixa, ou seja, melhor capacidade de adesão ao endotélio. Níveis elevados de FT6 foram inclusive encontrados em células do tumor primário e metástases. Este processo é Ca<sup>2+</sup> mediado, visto que uma lavagem dos microtúbulos utilizados na experiência com EDTA (*Ethylenediamine tetraacetic acid*) removeu as células aderentes ao endotélio.

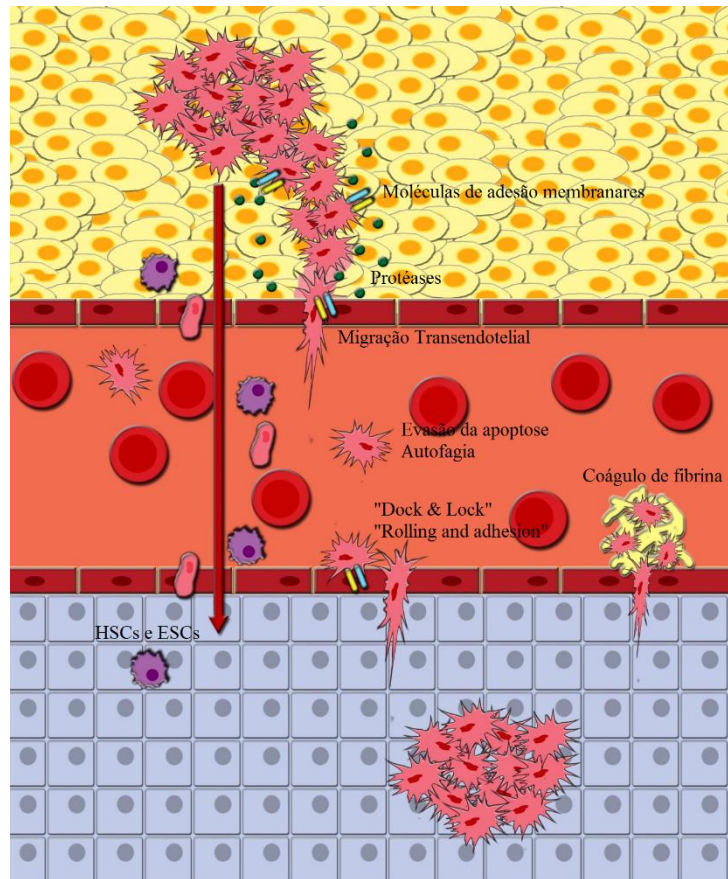
Através desta adesão primária, as selectinas iniciam um processo que vai dar lugar a uma estabilização mais duradoura mediada por integrinas. Estes fenômenos iniciais de adesão ocorrem mais avidamente no endotélio medular do que em outros

endotélios, e notavelmente tanto células epiteliais prostáticas benignas como malignas apresentam capacidade de ligação semelhante em meio laboratorial (14). Contudo, somente as células malignas possuem capacidade de sobreviver para completar o processo chave da gênese de uma metástase óssea – a migração transendotelial. O próprio endotélio e não só a atividade das células metastáticas está envolvido neste processo, onde a expressão de moléculas específicas como a VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule 1*) e PECAM-1 (*Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule 1*), facilitam a retração celular pouco depois da ligação das células tumorais ao endotélio (14).

Também o cálcio intracelular se apresenta como um mecanismo de retração endotelial permissivo que facilita a migração das células metastáticas – ligação de células metastáticas ao endotélio induz um aumento dos níveis intracelulares de cálcio, traduzindo-se numa capacidade de ligação endotelial aumentada assim como um maior grau de retração endotelial (14).

O processo de intra e extravasamento está representado de maneira resumida na figura 4 (10).





**Figura 4.** Intravasamento e Extravasamento. As proteases produzidas pelas células tumorais são essenciais para a invasão através dos tecidos e até à vasculatura, assim como a degradação da membrana basal para procederem à migração transendotelial. Moléculas de adesão produzidas pelas células tumorais capacitam-nas de mobilidade e de evasão da *anoikis*. HSCs e ESCs são grupos celulares munidos de grande mobilidade que estabelecem linhas de sinalização com as células neoplásicas, procedendo ao *priming* do microambiente ósseo mesmo antes da chegada destas (adaptado de Ye L, Kynaston H, WG J. Bone metastasis in prostate cancer: molecular and cellular mechanisms. *Int J Mol Med.* 2007;20:103–11). HSCs (*hematopoietic stem cell*); ESCs (*endothelial stem cell*).

## TROPISMO DA METASTIZAÇÃO PARA O OSSO

### 1) Teorias que explicam metastização óssea

Decorrida a disseminação hematogénica bem-sucedida e caso a célula tumoral sobreviva tempo suficiente na circulação, estão reunidas condições propícias à formação de uma metástase à distância. As células metastáticas mostram predileção óssea, com metástases a ocorrerem mais frequentemente em zonas de osso trabecular do esqueleto axial, como por exemplo a coluna lombar, costelas, pélvis e fémur proximal (9,25).

Contudo, porque é que elas parecem ter mais tropismo para o osso do que para outras localizações? Existem duas correntes de pensamento possíveis: uma anatómica, e outra funcional.

A corrente anatómica defende que ao entrar na circulação, o trajeto percorrido pelas células, assim como as características do leito vascular onde acabam por se fixar possam ser condicionantes do local de metástase. Uma destas teorias foi avançada em 1940 pelo anatomista Oscar Vivian Batson, que identificou um plexo venoso que fazia um curto-circuito entre a drenagem venosa da próstata e da coluna lombar – o mais tarde chamado plexo de Batson, uma rede de veias desprovidas de válvulas que comportam um grande volume de sangue a baixa pressão (26). A teoria sugeria que esse curto-circuito aumentaria a probabilidade de fixação das metástases nessa localização, e era complementada pela teoria de James Ewing, que propôs décadas antes que as próprias características da vasculatura e circulação medular (com os seus capilares sinusoidais, fenestrados, de grande diâmetro relativo e baixo fluxo) eram os fatores que permitiriam uma fixação e penetração bem-sucedidas (9,25). A estas características anatómicas junta-se o grande volume circulatório presente nessas estruturas vasculares, que aliado às variações do fluxo decorrentes de alterações na pressão abdominal e intratorácica propiciariam oportunidades de adesão às células metastáticas (27). Tais

teorias podem em parte ser verdade, mas não explicam por completo este tropismo ósseo – como exemplo histológico, o baço possui igualmente capilares sinusoidais idênticos aos medulares, sem que no entanto a taxa de metástases esplênicas seja significativa (26).

Dado isto, as hipóteses funcionais parecer possuir melhor fundamentação. Como exemplo de hipótese funcional recentemente avançada, encontra-se a osteomímica, processo através do qual as células metastáticas têm a capacidade de adquirir propriedades de osteoblastos e osteoclastos que lhes permitem produzir alterações através da estimulação do *turnover* após chegada ao microambiente ósseo, permitindo-lhes aí proliferar de maneira preferencial (28). Esta hipótese está intimamente relacionada com a teoria “*Seed and Soil*”, a hipótese funcional mais geralmente aceite, que foi proposta há mais de 100 anos (1889) pelo brilhante cirurgião britânico Stephen Paget, sendo que ainda hoje se apresenta como o paradigma capaz de explicar as metástases ósseas – a analogia desta hipótese é fácil de compreender: as células metastáticas (“*Seeds*”) estão munidas de capacidade germinativa, que só ocorre e atinge o seu potencial no microambiente ósseo (“*Soil*”), que possui os nutrientes necessários a esse crescimento.

De facto, Fidler et al. demonstrou, em concordância com a proposta de Paget, que apesar de as células metastáticas atingirem a vasculatura de múltiplos órgãos, desenvolviam-se somente em localizações muito específicas (28), entre as quais uma das mais frequentes era a medula vermelha do esqueleto. Outro possível exemplo pode ser recolhido comparando a contagem de células em circulação em tumores ováricos e prostáticos, e a respetiva taxa de metastização óssea – ao passo que o número de células de tumor ovárico circulantes é 10 vezes maior do que as de CP, tal não explica porque é que as metástases ósseas ováricas são raras e as prostáticas tão comuns, sugerindo que

nem todas as células metastáticas, não obstante o seu grande número, são capazes de metastizar num contexto ósseo (11).

O ambiente medular constitui assim um local que reúne características essenciais ao *homing*, fixação, sobrevivência e proliferação dos clones metastáticos, que destabilizam a complexa e delicada rede de interações deste meio, tirando partido das suas características, ao mesmo tempo que desconstroem e remodelam a sua arquitetura de maneira aberrante (24).

## **2) Integrinas e outras moléculas de adesão como promotoras da adesão ao endotélio vascular e medular**

As integrinas são glicoproteínas transmembranares produzidas pelas células metastáticas que desempenham um papel relevante não só no ganho de motilidade mas igualmente na capacidade adesiva destas ao endotélio dos vasos e na sua resistência à *anoikis*, permitindo-lhes proceder ao intra e extravasamento que lhes dá entrada para o ambiente medular (18). Esta capacidade de adesão é igualmente transponível ao ambiente medular, onde as integrinas também medeiam interações celulares que permitem a fixação das micrometástases.

Exemplo disto é o papel da integrina  $\alpha_2\beta_1$ , capaz de interagir com o colagénio tipo 1, o componente orgânico mais comum da MEC (13,27), assim como a fibronectina (17). Outra integrina, a  $\alpha_v\beta_3$  medeia a adesão da célula MEC como à vitronectina, osteopontina, sialoproteína óssea, fibronectina e trombospondina, ao passo que a integrina  $\alpha_4\beta_1$  é capaz de proceder à adesão ao fibrinogénio, ICAM (*Intercellular Adhesion Molecule*) e VCAM expressados pelas células vasculares e estromais da medula óssea (11).

Outras funções desempenhadas pelas integrinas, ainda relativamente à integrina  $\alpha_v\beta_3$ , passam igualmente pela promoção da reabsorção óssea já no próprio ambiente medular, pois são produzidas tanto em osteoclastos como pelas células tumorais, induzindo expressão de RANKL (*Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*) nestas últimas (10,28).

Algumas integrinas, como a  $\alpha_6\beta_1$  possuem ainda um papel na promoção da sobrevivência celular e na facilitação da capacidade invasiva e metastizante. A produção desta integrina está intimamente ligada com a sinalização do AR, sendo co-expressa com este nas células tumorais – esta via encontra-se especialmente ativada em células metastizantes, em especial em tumores resistentes à castração (13).

Outras moléculas capazes de proceder a estas interações entre as células tumorais e o endotélio medular são as BMPs (*Bone morphogenetic proteins*), nomeadamente a BMP-4.

O PAR-1 (*Protease-activated receptor*), através da sua ativação, estimula não só a ligação das células tumorais ao endotélio dos vasos como também promove a secreção de MMPs por parte das células tumorais, que danificam a membrana basal e permitem que o processo de extravasamento se processe de maneira mais fácil (10,29).

### **3) Homing das células tumorais – Eixo CXCL-CXCR**

Favorecendo a hipótese “*Seed and Soil*” um dos mecanismos de tropismo ósseo pode passar por um conjunto de recetores de quimiocinas associadas a este meio, para os quais as células metastáticas mostram afinidade. A quimiocina CXCL12 (previamente conhecida como SDF-1 $\alpha$ ) encontra-se presente no osso, sendo produzida pelas células mesenquimais da medula, incluindo osteoblastos (24,30) – as células metastáticas, que por sua vez expressam os seus recetores CXCR4 e CXCR7 (*C-X-C*

*chemokine receptor*), incorrem num processo de *homing*, definido pela disseminação direta de células circulantes de acordo com gradientes de concentração locais de quimiocinas (11,31). Este processo é comum a células hematopoiéticas e imunes que são igualmente capazes de proceder à adesão ao endotélio vascular e ao extravasamento, de maneira a alcançar a fonte de quimiocinas. O eixo CXCL12-CXCR4 não só guia as células metastáticas para os locais à distância como, após chegada ao local e dada a ligação ligando-recetor, também promove a motilidade e mitogénese destas através da produção de integrinas e proteases (nomeadamente integrina  $\alpha_v\beta_3$  e MMP-9 respetivamente) que promovem adesão intercelular e modelam a matriz circundante, auxiliando a progressão da metástase (30). Esta ação constitui assim um exemplo de como os vários processos fisiopatológicos inerentes à metastização estão dinamicamente interligados, com os mesmos grupos de moléculas a exercerem diferentes funções em diferentes etapas da cascata metastática.

Outros componentes do eixo CXCL-CXCR como o CXCL16 e o CXCR6 também foram implicados com funções semelhantes (17).

#### **4) Papel dos níveis locais de cálcio no homing das células metastáticas**

Os níveis de cálcio são a base de todo o mecanismo de turnover ósseo, e é a flutuação dos mesmos que condiciona respostas osteoblásticas (deposição de cálcio para a formação de novo osso) ou osteoclásticas (aumento dos níveis locais e séricos de cálcio).

As células tumorais parecem expressar precisamente um recetor sensível ao cálcio composto por 2 proteínas G (CaSR) (23) que lhes permite aferir as concentrações locais deste ião, de maneira a regular a produção de PTHrP (23,30). Posto isto, antes mesmo de despoletarem a atividade osteoclástica que lhes permitirá o desenvolvimento inicial, os primeiros colonos tumorais poderão já estar a fazer uma seleção dos locais

onde o turnover ósseo é mais acelerado e a atividade osteoclástica mais propícia ao seu estabelecimento – mais uma razão para a predileção por parte das metástases por locais de alto turnover, as quais correspondem às localizações medulares do esqueleto axial, mais metabolicamente ativas. Este mecanismo torna-se ainda mais útil quando a atividade osteoclástica exacerbada pela presença e ação estimuladora das células metastáticas provoca libertação de cálcio que condiciona concentrações locais mais elevadas deste ião.

Estas concentrações anormais assim como os próprios níveis de cálcio intracelular permitem a adesão, migração, sobrevivência e expansão das células tumorais, assim como a produção por parte destas de maiores quantidades de PTHrP, indutor da atividade osteoclástica.

## **5) Fontes de lípidos**

O acelerado metabolismo das células tumorais leva-as a procurar fontes lipídicas das quais possam extrair metabolitos para usar durante a sua proliferação, sendo uma fonte essencial de energia e apresentando-se como mais um estímulo quimiotático. Estudos *in vitro* demonstraram graus variantes de tropismo celular associados ao menor ou maior grau de lípidos no estroma medular, rápido *intake* lipídico por parte destas células ao chegarem ao ambiente medular (rico nestes compostos) e uma maior taxa de crescimento de células sediadas na proximidade de células lipídicas medulares (14).

## **METÁSTASE DO CP NO OSSO**

As metástases ósseas classificam-se em osteoblásticas e osteolíticas, representando dois extremos dinâmicos de disfunção do turnover ósseo: as metástases do CP são maioritariamente osteoblásticas, mas possuem um considerável componente osteolítico, podendo portanto ser consideradas lesões mistas que causam elevação dos marcadores de atividade osteolítica, apesar do seu caráter radiológico aparentemente osteoblástico (21).

O osso é portanto um sistema dinâmico do nosso organismo. O tecido ósseo é constituído por uma porção densa, mineralizada e compacta, correspondente ao osso cortical (85%) e por uma porção esponjosa e metabolicamente ativa, correspondente ao osso trabecular (15%). A camada externa do osso trabecular contém a medula óssea vermelha multicelular (responsável pela produção de osteoblastos e osteoclastos, a partir de células estromais e hematopoiéticas respetivamente) - as metástases mais ativas ocorrem onde este tipo de osso é mais comum (9).

O metabolismo ósseo é mantido em homeostasia por osteoblastos e osteoclastos. Os osteoclastos podem ser considerados macrófagos específicos do osso (32), já que se diferenciam a partir de precursores macrofágicos/monocitários mono-nucleados que se agregam para formar uma célula madura (17) e ao aderirem à matriz óssea criam um vacúolo de reabsorção para o qual, após acidificado, libertam enzimas que promovem a reabsorção óssea. Já os osteoblastos originam-se a partir de precursores estromais e produzem matriz inorgânica (osteóide) que é mineralizada ao longo de várias semanas.

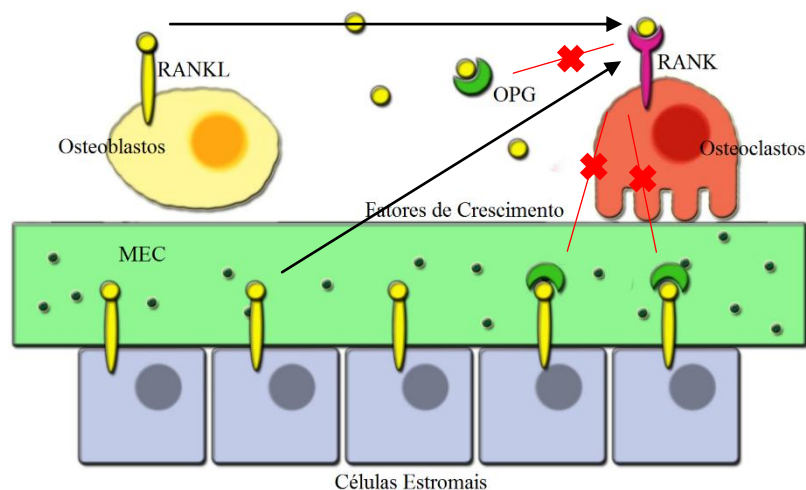
### **1) Turnover ósseo normal – o sistema RANK-RANKL-OPG e outras vias de sinalização associadas**

O turnover ósseo apresenta-se como um processo integrante na fisiologia e homeostasia óssea, mantendo a sua integridade estrutural. Na sua base está um processo



ativo e continuado de reabsorção óssea e formação de novo osso, mediado por osteoclastos e osteoblastos respetivamente (4). A sinalização entre estes dois grupos celulares que permite a harmonia deste mecanismo passa em grande parte pelo sistema RANKL-RANK-OPG, um dos mecanismos de sinalização mais bem estudados entre osteoblastos e osteoclastos. O RANK (*Receptor Activator of Nuclear Factor kappa-B*) encontra-se presente na superfície dos osteoclastos, regulando vários pontos do ciclo celular da célula como ativação, diferenciação e sobrevivência da célula madura (33) através do seu ligando, o RANKL, proteína transmembranar da família do TNF (*Tumor necrosis factor*) (34), expressada maioritariamente por osteócitos, osteoblastos e outras células estromais assim como linfócitos T. O RANKL possui 3 isoformas: duas isoformas com domínios transmembranares que requerem contato célula-célula, o RANKL 1 e 2, assim como uma isoforma solúvel livre, cuja produção depende da ação da enzima conversora do TNF (TACE – *Tumor necrosis factor- $\alpha$ -converting enzyme*) ou pela ação de MMPs que clivam o RANKL transmembranar – o RANKL 3 (35).

Tanto o RANK como o RANKL podem igualmente ser expressos pelas próprias células tumorais (34). A osteoprotegerina (OPG) é um recetor *decoy*, membro da família dos recetores do TNF (TNFR) produzido por osteoblastos e presente na sua membrana, que se liga competitivamente ao RANKL impedindo que este exerça o seu efeito sobre os osteoclastos (35). Logo, o rácio de RANKL-OPG apresenta-se como o balanço que regula a atividade osteoclástica – exemplo disto são estudos animais nos quais a sobre expressão ou a inibição da ação da OPG causam osteopetrose e osteopenia, respectivamente (33). Abaixo, na figura 5, encontra-se representado graficamente o mecanismo normal de turnover ósseo, com os seus intervenientes (17).



**Figura 5.** Tríade RANKL/RANK/OPG. Os osteoblastos e outras células estromais produzem RANKL na sua forma membranar e livre, que se liga ao RANK dos osteoclastos para ativar sua diferenciação e iniciar a reabsorção óssea. O OPG é um receptor decoy que se liga ao RANKL e impede a sua ligação ao RANK (adaptado de Chappard D, Bouvard B, Baslé MF, Legrand E, Audran M. Bone metastasis: Histological changes and pathophysiological mechanisms in osteolytic or osteosclerotic localizations. A review. Morphologie [Internet]. 2011;95(309):65–75). RANKL (*Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*); RANK (*Receptor Activator of Nuclear Factor kappa-B*); OPG (*osteoprotegerina*).

A PTH (*Parathyroid hormone*) produzida pelas glândulas paratiroides em resposta aos níveis de cálcio estimula precisamente a expressão de RANKL nas células estromais e osteoblastos, sendo esse o *drive* que move a ação osteoclástica mediada por esta hormona (4,33).

Ao exercerem a sua ação de reabsorção, os osteoclastos libertam no microambiente ósseo quantidades relativamente altas de fatores de crescimento, que se encontravam encarcerados na matriz óssea – estes têm como função estimular, entre outros, a proliferação de osteoblastos, de maneira a que a homeostasia óssea não fique comprometida e que através da sua função osteogénica consigam formar novo osso. Nessa altura, os fatores de crescimento são novamente sintetizados para a matriz, ficando encarcerados nesta, de maneira a que o ciclo se perpetue. É precisamente este ciclo de renovação e libertação de fatores de crescimento do qual as células tumorais

tiram proveito, aí se estabelecendo por lhes ser fornecido um suprimento contínuo de metabolitos essenciais à sua progressão.

Este sistema desempenha por isso um papel fulcral numa série de interações e vias de sinalização estabelecido entre as células tumorais e as de homeostasia óssea, pelo que se reveste de grande importância como alvo terapêutico.

Outro exemplo de sistemas de sinalização que desempenham igualmente um papel no equilíbrio do turnover ósseo é o sistema Efrina – este sistema estabelece-se entre osteoclastos e a forma inativa dos osteoblastos, as *lining cells*. A EfrinaA2 presente nos osteoclastos é reconhecida pela EphA2 (*Ephrin type-A receptor 2*) na superfície das *lining cells*, sendo que esta ligação inibe a diferenciação de novos osteoblastos e aumenta a atividade dos osteoclastos no início da reabsorção óssea. Inversamente, a EfrinaB2 presente nos osteoclastos quando ligada a EphB4 (*Ephrin type-B receptor 4*) pode interromper a ação dos osteoclastos, induzindo o final do período de reabsorção e estimulando a atividade promovendo o recrutamento de osteoblastos (17).

Outra molécula identificada na regulação da homeostasia óssea normal é a Atp6v0d2 (*ATPase, H<sup>+</sup> Transporting, Lysosomal 38kDa, V0 Subunit D2*), que é expressada em osteoclastos e permite a fusão dos seus precursores para formar células maduras, tendo por sua vez um efeito inibitório na diferenciação de precursores osteoblásticos (17).

## **2) O papel do microambiente ósseo**

Após a chegada ao osso, e depois de sobreviver às provações do processo de metástase, a célula tumoral metastática não possui ainda todo o conjunto de características que lhe permitam prosperar no microambiente ósseo. De facto, a chegada

à medula representa um ponto crítico da cascata metastática, no qual a célula inicia um período de latência caracterizado pela capacidade de sobrevivência sem proliferação, o qual pode durar vários anos e do qual necessita de ser resgatada para poder proceder à invasão propriamente dita – esta capacidade de dormência pode ser atribuída a regulação da vigilância imunitária, angiogênese reduzida, ou indução de quiescência provocada pelo microambiente circundante (11,36). O resgate da atividade celular pode por sua vez ser iniciado pelo *reboot* e promoção da proliferação celular ou através da atenuação dos mecanismos causadores desta dormência celular (11,20,30).

O termo osteo-oncologia foi recentemente criado para englobar a ação que estas células estranhas exercem no ambiente medular (30), ao perturbarem a delicada homeostasia da medula. O grau de perturbação aumenta à medida que se vai estabelecendo uma rede de intercomunicações celulares que beneficia o crescimento da massa tumoral (31), criando-se assim ciclos viciosos de potenciação de sinal, cujo *trigger* inicial ainda não está bem definido. É por isso um tema análogo à questão do “ovo ou a galinha”, pois ainda não foi bem esclarecido se são as metástases que despoletam a desequilíbrio inicial do microambiente/turnover ósseo que em resposta inicia o ciclo vicioso, ou se são estes últimos que exercem a primeira influência sobre as células tumorais, imediatamente após a sua chegada à medula – provavelmente uma simultaneidade de ambos os acontecimentos.

O ambiente medular trata-se de um local ricamente suprido de oxigénio e nutrientes provenientes da circulação (9) – no entanto, e notavelmente, esta riqueza do aporte de metabolitos não constitui um dos estímulos principais para o desenvolvimento tumoral, desempenhando a hipoxia um papel mais ativo, ao desencadear a ativação de diversas vias que propiciam a sobrevivência do tumor. O microambiente ósseo propriamente dito é um local de relativa hipoxia, sendo que esta possui um papel na

adaptação da célula metastática, cujo rápido padrão de crescimento por si só implica um elevado grau de hipoxia intratumoral que ultrapassa a capacidade dos neovasos malformados de nutrir o tumor (26,37). O mediador de sinalização de hipoxia HIF-1 $\alpha$  (cuja regulação exacerbada constitui um mecanismo preponderante de iniciação da angiogénese no tumor primário, tendo sido igualmente identificada em metástase ósseas) constitui uma dessas vias – em condições normóxicas, sofre modificação e inativação por intermédio de prolil-hidroxilases dependentes de oxigénio. Contudo, em condições de hipoxia, junta-se ao HIF-1 $\beta$  (expresso constitutivamente) para criar um heterodímero que se liga a elementos de resposta hipóxica (*hypoxia-response elements* - HREs), promovendo a sua transcrição. Esta promoção da transcrição promove a angiogénese e é partilhada por outros compostos como o VEGF, IGFs (*Insuline-like growth factors*) e CXCR4, enaltecendo o papel da hipoxia no desenvolvimento tumoral. Para além do mais, a sobre-expressão do HIF-1 correlacionou-se com expressão aumentada de vimentina, MMP-2 e Catepsina-D (moléculas com papel fulcral no potencial de migração e invasão metastático), e associou-se ainda ao decréscimo de produção de E-caderina, importante molécula de adesão que é responsável pela adesão célula-célula, e com implicações no processo de transição epitélio-mesenquimal (37).

Intimamente associado a esta hipoxia, o próprio pH do microambiente pode ser interpretado como um agente promotor do desenvolvimento metastático, já que o desenvolvimento neoplásico se encontra associado à criação de focos de acidose óssea (com elevada glicólise e formação de ácido láctico). O pH extracelular constitui um regulador fundamental da atividade osteoblástica e osteoclástica (35) – a atividade reabsortiva osteoclástica é máxima com níveis de pH < 6,9 e promove a desmineralização óssea, enquanto que a atividade osteoblástica na formação óssea sofre uma redução significativa em resposta a tais níveis de acidez. Adicionalmente, esta

acidose pode estar implicada no aumento da atividade enzimática proteolítica que auxilia a degradação da MEC (37).

O microambiente apresenta-se como um meio constituído por uma porção inorgânica e orgânica – a porção inorgânica é constituída principalmente por sais minerais cristalinos e cálcio, e constitui o reservatório que alberga a parte orgânica, esta última constituída maioritariamente por proteínas não colagénicas como o colagénio tipo I, as quais são emparelhadas com fatores de crescimento (10,17). Estes fatores permanecem em estado de dormência, enterrados profundamente na matriz até que durante a fase de reabsorção do ciclo de turnover ósseo eles são libertados. A matriz óssea é constituída por uma multiplicidade de células, dentre as quais se destacam, geralmente falando, osteócitos, osteoblastos, *lining cells*, osteoclastos, fibroblastos, células endoteliais e células imunes (31). Estas são fontes diretas ou indiretas de fatores de crescimento que atuam como fatores de sobrevivência, mitogénese e diferenciação não só para elas próprias como para células metastáticas - muitos desses fatores são igualmente produzidos pelas próprias células tumorais (9), constituindo exemplos de amplificação de sinal. Exemplos relevantes e focados em estudos recentes constam o IGF-1, TGF- $\beta$ , BMPs, FGF-2 (*Fibroblast growth factor 2*), IL-6 (*interleucina 6*), ET-1 (*endotelina 1*), PTHrP, PDGF (*Platelet-derived growth factor*), PAR, VEGF, EGF (*Epidermal growth factor*), Wnt (*Wingless-type MMTV integration site*), PSA entre uma extensa lista de moléculas. Dada a complexidade das interações que se processam no microambiente ósseo, estes fatores de crescimento são comuns a várias etapas da cascata metastática, exercendo diferentes funções mediante os diferentes locais onde atuam. Assim se percebe a complexidade das vias de sinalização que permitem ao desenvolvimento metastático, representando um obstáculo ao estudo destes mecanismos que leva à necessidade da utilização de modelos *in vivo* em detrimento de *in vitro*, estes

últimos menos complexos e a partir dos quais se torna mais difícil recapitular um sistema orgânico inteiro e assim retirar elações (31).

A rede de interações que potencia o crescimento tumoral pode então ser muito resumidamente definida como um triângulo cujos vértices são compostos pelas células metastáticas, osteoblastos/percursores osteoblásticos e osteoclastos/percursores osteoclásticos (abordados no próximo capítulo - *A Tríade Osteoclastos/Osteoblastos/Células Invasoras Como Facilitadores Da Progressão Da Metástase*), inserido num meio representado pelo microambiente ósseo, com as suas células e respetiva MEC, assim como todos os fatores de crescimento inerentes ao mesmo.

Seguidamente, abordam-se alguns dos fatores de crescimento que se revestem de maior importância. Ao tomar estes fatores como alvos terapêuticos, cria-se assim o potencial de intervir numa fase precoce do ciclo, marcada por elevada dependência destes fatores - o estudo das suas interações pode assim torná-los alvos terapêuticos importantes na prevenção, atraso na progressão e/ou gestão das metástases ósseas.

### **2.1.PDGF:**

Esta molécula é produzida por células epiteliais e endoteliais, e é constituída pelos homodímeros A, B, C e D, e pelo heterodímero PDGF-AB, cujos recetores são o PDGFR- $\alpha$  e  $\beta$  (*Platelet-derived growth factor receptor*). A sua produção aberrantemente elevada já foi detetada em contexto metastático neoplásico, possuindo efeito sobre as células tumorais – no entanto, a sua atuação parácrina sobre as células mesenquimais e de outras linhas celulares adjacentes é de igual modo relevante, exercendo efeito no seu recrutamento, proliferação, transformação, migração, sobrevivência e apoptose, estando a sua via de sinalização altamente ativa durante a

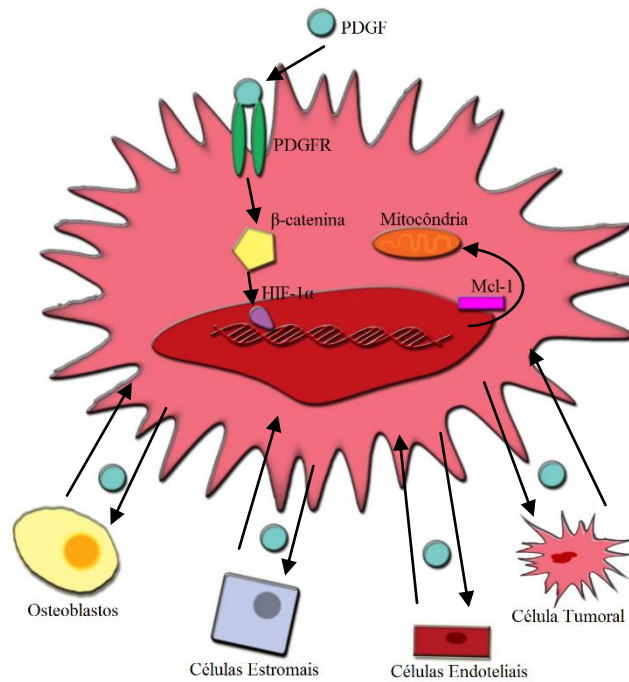
transição epitélio-mesenquimal. Constitui assim neste contexto um potente fator que indiretamente afeta o crescimento tumoral, capacidade de metastização e resistência ao tratamento (31,38,39). Apresenta-se ainda como fator potenciador da neo-angiogénese e linfangiogénese em conjunto com o VEGF, através do recrutamento de perícitos para formação de neovasos altamente permeáveis, ou mesmo capacidade de modular a permeabilidade vascular (40).

No CP, esta ação pode traduzir-se numa ativação não só de uma reação osteoblástica, mas também a possível existência de um loop de feedback positivo, no qual a produção de u-PA e outras serina proteases pelas células tumorais clivam e ativam PDGF-D, que ao atuar sobre os recetores PDGFR- $\beta$  presentes na superfície das mesmas induzem ainda mais expressão de proteases (13,38).

A ação do PDGF-D produzido pelas células tumorais pode ainda condicionar efeito sobre a osteoclastogénese, quer por efeito direto ou ativação do NFAT-1 (*Nuclear factor of activated T-cells 1*) presente nas células T ativadas, outro estimulador do processo de diferenciação osteoclástica (38).

Mais recentemente, os efeitos do PDGF foram ainda associados ao estímulo da produção tumoral de Mcl-1, conferindo a estas células uma vantagem de sobrevivência – este sistema de sinalização é responsável pela ativação da translocação nuclear da  $\beta$ -catenina, que por sua vez ativa a transcrição nuclear de Mcl-1, um agente antagonizador de sinais apoptóticos (39) (mecanismo representado na figura 6 (39,40)).





**Figura 6.** As células tumorais utilizam a sinalização pelo PDGF para ativar a transcrição de Mcl-1, fator antiapoptótico. Por sua vez, o PDGF possui também uma função parácrina extremamente relevante, mediando interações entre o tumor e o seu microambiente, incluindo outras células tumorais, as quais reencaminham as respostas através de *loops de feedback* positivo (adaptado de Iqbal S, Zhang S, Driss A, Liu ZR, Kim HRC, Wang Y, et al. PDGF upregulates Mcl-1 through activation of  $\beta$ -catenin and HIF-1 $\alpha$ -dependent signaling in human prostate cancer cells. PLoS One. 2012;7(1) e de Ostman A, Heldin CH. PDGF Receptors as Targets in Tumor Treatment. Adv Cancer Res. 2007;97(6):247–74). PDGF (*Platelet derived growth factor*); PDGFR (*Platelet derived growth factor receptor*); HIF-1 $\alpha$  (*Hypoxia-inducible factor  $\alpha$* ); Mcl-1 (*Myeloid cell leukemia 1*).

## 2.2.IGFs:

A família das IGFs compreende dois ligandos (IGF-1 e 2), dois recetores (IGF-IR e IGF-IIR - *Insulin-like growth factor receptors*) assim como um conjunto de proteínas ligadoras com alta afinidade para o IGF, as IGFBPs 1 a 6 (IGF Binding Proteins) (18).

A IGF-1 é uma molécula cuja importância no processo de metastização e resistência à terapia de privação androgénica têm vindo a ser postos a descoberto recentemente, com níveis altos desta a associarem-se a risco acrescido de CP, estadios avançados de doença e fenótipos mais agressivos (41). É produzida no fígado sob

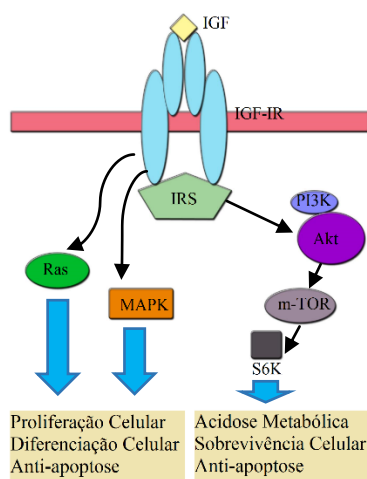
estímulo da GH (*Growth hormone*), possuindo efeitos sobre o ciclo celular (desenvolvimento, proliferação e sobrevivência) e respiração anaeróbia (42).

No osso, é localmente produzida por osteoblastos, sendo que em casos de metástase óssea, também pelas células cancerígenas – estas produzem igualmente proteases como a u-PA e o PSA (9), que desempenham um papel fundamental na desregulação do sistema constituído pela IGF-1, seu recetor IGF-IR (cujos ligandos preferenciais depois do IGF-1 são o IGF-2 e a insulina) e as respetivas proteínas ligadas à IGF, as IGFbps. As IGFbps regulam negativamente a ligação da IGF com seu recetor, sendo que a clivagem destas provocada pelas proteases permite essa mesma ligação, promovendo a função mitogénica da IGF-1. As próprias IGFbps, para além de reduzirem a disponibilidade de IGF-1 que se liga aos recetores, possuem um, efeito anti-proliferativo intrínseco, associado a inibição do crescimento celular e promoção da apoptose – este efeito é debelado com a ligação da IGF ao seu recetor, ligação esta que permite a ativação de vias de sinalização anti-apoptóticas e ativação do VEGF (18,37,41).

Por outro lado, a via de sinalização do IGF e seu recetor parece ter influência na progressão para a resistência à castração, por intermédio de ação reguladora sob a via PI3K/AKT (*Phosphoinositide 3-kinase/Protein kinase B*) que ativam o AR na ausência de androgénios (42).

Na doença metastática, tal como o PDGF e o VEGF, possui efeito angio e linfângiogénico, e a ativação do IGF-IR induz um estado pró-inflamatório favorável ao desenvolvimento metastático (42).

A figura 7 resume a sinalização do seu recetor assim como algumas das suas funções no desenrolar da cascata metastática (41,42).



**Figura 7.** Sinalização intracelular da via do IGF, e respectiva repercussão na capacidade metastática das células do CP (adaptado de Lima G a B, Corrêa LL, Gabrich R, Miranda LCD De, Gadelha MR. IGF-I, insulin and prostate cancer. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2009;53(8):969–75 e de Wu J, Yu E. Insulin-like growth factor receptor-1 (IGF-IR) as a target for prostate cancer therapy. *Cancer Metastasis Rev* [Internet]. 2014;33(2-3):607–17). IGF (*Insulin-like growth factor*); IGF-IR (*Insulin-like growth factor receptor 1*); IRS (*Insulin-receptor substrate*); PI3K/AKT (*Phosphoinositide 3-kinase/Protein kinase B*); mTOR (*Mechanistic target of rapamycin*); S6K (*S6 kinase*); Ras (*Rat sarcoma*); MAPK (*Mitogen-activated protein-kinase*).

### 2.3.TGF-β:

É um fator libertado a partir da matriz óssea ou produzido por células T que estimula as células tumorais a produzir fatores osteolíticos que exacerbam a reabsorção óssea adjacente mediada pelos osteoclastos – esta atividade osteolítica liberta, por sua vez, cada vez mais fatores de crescimento encarcerados na matriz (mais TGF-β incluído), sendo um agente que se reveste de fundamental importância na manutenção do ciclo vicioso da metástase óssea (28). Este fator é igualmente produzido pelas próprias células tumorais e osteoblastos.

Uma característica fulcral associada a este fator de crescimento é a sua relação com os níveis de PTHrP – de entre os fatores libertados por intermédio da atividade osteoclástica, o TGF-β é um potente ampliador do *loop* do ciclo vicioso, ao estimular a produção de PTHrP, que por sua vez vai aumentar o rácio de RANKL em detrimento da OPG, constituindo assim o dínamo para a osteoclastogénese e ainda mais reabsorção

óssea (37). Estimula ainda a produção de outros fatores de crescimento, entre os quais IL-1, 6, 8 e 11, assim como o M-CSF (*Macrophage colony-stimulating factor*), este último um potente estimulador dos precursores osteoclásticos (24).

Para além do mais, o TGF- $\beta$  é um dos principais compostos implicados na indução da transição epitélio-mesenquimal (12), invasão, angiogénese tumoral (*cross-talk* com a via do HIF, ao diminuir a sua degradação e ao inibir a prolil-hidroxilase 2), assim como um certo grau de capacidade evasiva ao sistema imunitário (12,28,37). Como exemplo do estímulo invasivo, o TGF- $\beta$  estimula a produção de integrina  $\alpha_2\beta_1$ , facilitando a ação de ancoragem ao colagénio tipo 1 (27).

#### **2.4.BMPs:**

A família das BMPs é a subfamília mais extensa dentro da superfamília do TGF- $\beta$  (43), atuando por ligação aos seus recetores membranares (BMPR-IA, IB e II - *Bone morphogenetic protein receptor*) e englobando uma série de moléculas que possuem múltiplos e variados efeitos.

A capacidade de células tumorais de secretar BMPs (2, 3, 4, 5, 6 e 7) já foi abordada em diversos estudos, mas só algumas BMPs possuem efeito direto sobre as células tumorais, com papel na regulação, crescimento celular e capacidade invasiva (44,45), que se associa a um papel indireto devido ao efeito destas no microambiente ósseo. Contudo, uma abordagem holística de todos esses estudos chegou a um largo espectro de efeitos opostos que dificulta o discernimento da verdadeira função e cinética celular destas moléculas.

Exemplo desta heterogeneidade é encontrada no contexto do CP e suas metástases, com algumas BMPs (2 e 4) a induzirem a formação óssea e o crescimento e diferenciação celulares, os quais se traduzem no aumento da capacidade invasiva,

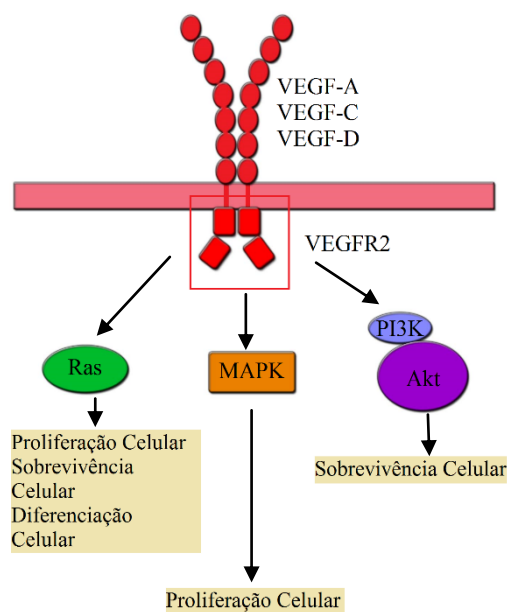
proliferativa e de resistência a apoptose induzida por stress hipóxico (13,45). Outras BMPs como a BMP-6 promovem migração e invasão das células metastáticas através da transcrição de moléculas como a MMP-1 e 9 (13), ao passo que BMPs como a BMP-7 possuem diferentes níveis de produção tumoral e efeitos dependendo do estadió tumoral e grau de responsividade androgénica (44,45) – enquanto que a sua expressão está diminuída em tumores primários comparativamente com epitélio prostático normal (43,45), os níveis desta BMP atingem o seu pico no CRPC comparativamente com tumores sensíveis a terapia androgénica, levando a crer que para além de um efeito inibitório inicial sobre a proliferação das células do CP, esta possa ter um efeito mais tardio na modulação de vias acessórias do AR que condicionem resistência a terapia de privação androgénica por parte de CP metastático. Para além disso, esta BMP pode ainda estar associada a estados de dormência e recorrência reversíveis das células tumorais, através do efeito senescente exercido sobre células tumorais estaminais (36).

Já no osso, uma das principais funções é o recrutamento de percursoros osteoblásticos, e exercem igualmente um papel mais precoce, no aumento da adesão das células tumorais ao endotélio da medula óssea, nomeadamente a BMP-4 (29).

## **2.5.VEGF:**

A família do VEGF possui um papel de extrema relevância na obtenção de potencial metastático pelas células tumorais, atuando em conjunto com o PDGF através de mecanismos neo-angiogénicos e de alteração da permeabilidade vascular, sendo ativamente produzido por elas. Níveis de VEGF aumentados foram inclusive detetados em estados pró-inflamatórios não diretamente relacionados com patologia tumoral, como prostatite, fazendo suspeitar do seu papel na criação de um ambiente pró-inflamatório que se sabe ser propício ao surgimento e desenvolvimento de tumores e suas metástases (46). Existem 5 tipos de ligandos (VEGF-A, B, C, D, e PlGF -

*Placental growth factor*) a ligarem-se a um conjunto de 3 recetores tirosina cinase (VEGFR1, 2 e 3), sendo que existem igualmente recetores de neuropilina (NRP1 e 2) e proteoglicanos de sulfato de heparina (HSPGs - *heparan sulfate proteoglycans*) que funcionam como cofatores para ativação dos VEGFRs (47). Esta via de sinalização é modulada por vários fatores como a hipoxia local (via do HIF), hormonas, fatores de crescimento e citocinas – exemplo de moléculas deste tipo são as Semaforinas, que regulam de maneira competitiva a ligação do VEGF aos seus cofatores NRPs e HSPGs, assim como os fatores de crescimento típicos envolvidos em outras etapas da cascata metastática, como o PDGF, IGFs, TGF- $\beta$ , entre outros (47). Os recetores VEGFR2 e VEGFR1 têm papéis sequenciais no processo angiogénico, com o VEGFR2 a atuar inicialmente na proliferação e migração de células endoteliais assim como na promoção de permeabilidade capilar, e com o VEGFR1 a atuar seguidamente na organização de novos tubos capilares (18) – as funções dos principais tipos de VEGF implicados no processo de metastização do CP cuja sinalização é mediada pelo VEGFR2 encontram-se representados esquematicamente na figura 8 (47).



**Figura 8.** Função dos principais tipos de VEGF implicados na cascata metastática, e respetiva via de sinalização do VEGFR2 (adaptado de Roberts E, Cossigny D a F, Quan GMY. The Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Metastatic Prostate Cancer to the Skeleton. Prostate Cancer [Internet]. 2013;2013). VEGF (*Vascular endothelial growth factor*); VEGFR (*Vascular endothelial growth factor receptor*); PI3K/AKT (*Phosphoinositide 3-kinase/Protein kinase B*); Ras (*Rat sarcoma*); MAPK (*Mitogen-activated protein-kinase*).

Uma das moléculas dessa família, o VEGF-A constitui um dos fatores angiogénicos mais proeminentes e cuja elevação plasmática é detetada no contexto do CP metastático, ao contrário do observado em tumores primários, onde a sua expressão é normal ou mesmo reduzida. Paralelamente, as Semaforinas associadas encontram-se em níveis baixos, possivelmente condicionando falência do tratamento anti-angiogénico em diversos estudos através da ausência de atividade inibitória da ligação do VEGF com o seu recetor – contudo, dado o grau de heterogeneidade associado a estes tumores, este equilíbrio ainda não foi bem definido, com algumas amostras a não evidenciarem esta relação (48). Ainda outra possível função relacionada com esta tríade prende-se com o efeito da atividade proteolítica associada ao processo metastático, que parece exercer uma alteração da atividade dos recetores, e conseqüentemente da atividade do VEGF/semaforinas. O próprio VEGF por seu lado promove a produção de proteases para degradar a membrana basal, ao mesmo tempo que promove a proliferação, migração e sobrevivência de células endoteliais para a génese da neovascularização.

Mais recentemente, julga-se que outras moléculas pertencentes à família do VEGF, nomeadamente o VEGF-C e D produzidos pelo tumor possam estar implicados no processo de linfangiogénese tumoral, com auxílio de CAFs e TAMs (11). Este fenómeno ocorre ao ligarem-se ao VEGFR-3, expresso maioritariamente no endotélio de vasos linfáticos, permitindo assim a proliferação dos mesmos (18).

No contexto metastático, o VEGF possui também um papel de sinalização autócrina na produção da integrina  $\alpha_v\beta_3$ , implicada no aumento da capacidade de adesão

da célula tumoral (47). Para além dessa função, estimula autocrinamente a migração e diferenciação dos osteoblastos (17,23,27), com estudos recentes a detetarem a produção deste composto pelos osteoblastos em resposta a hipoxia, constituindo mais uma via através do qual a ação destas células promove a progressão tumoral (49).

Não só os osteoblastos estão envolvidos na sinalização do VEGF – também os osteoclastos foram recentemente implicados como sendo promotores da angiogénese através de um mecanismo dependente de MMP-9, adicionando mais uma função ao seu papel já de si chave na promoção do desenvolvimento metastático (35,49).

## **2.6.FGFs:**

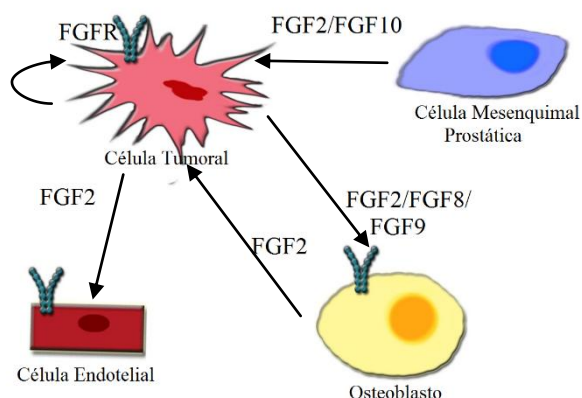
Pertencem a uma família de polipéptidos composta por 23 elementos divididos em 7 famílias, podendo ser produzidos quer por células epiteliais ou fibroblastos estromais. Exercem funções na embriogénese, reparação celular e crescimento tumoral, com influência no processo de transição epitélio mesenquimal. Estas funções traduzem-se num estímulo mitótico, diferenciação, angiogénese (*cross-talk* com vias do VEGF e PDGF), sobrevivência, motilidade e capacidade invasiva (50).

No CP, para além de níveis elevados de FGF-1, 2, 6, 7, 8, 9 e 18 que possuem funções estimulantes tumorais diretas (alguns deles com efeito redundante, como o FGF-7 e o 10), também se verificam elevadas taxas de expressão aberrante dos seus 4 recetores, FGFR (*Fibroblast growth factor receptor*) 1-4 (13,50,51) – são ainda moléculas indutoras da osteoblastogénese (17), e estudos em co-culturas de medula óssea murina revelaram igualmente um efeito de indução da diferenciação osteoclástica, provavelmente consequência da modulação da produção do RANKL osteoblástico (51). Outra função atribuída ao FGF, nomeadamente ao FGF-1 passa pelo estímulo da



produção de proteases como as MMPs, essenciais para o processo metastático (50). Algumas das funções dos vários tipos de FGF estão representadas na figura 9 (50).

A produção de FGFs por parte das células cancerígenas exerce um efeito que não só parácrino mas também autócrino, tendo como exemplo estudos recentes que implicam a ação promotora da FGF-8 na produção de FGF-17, esta última associada a fenótipos metastáticos (51), assim como a produção de FGFs que condicionam independência da estimulação estromal, resultando em crescimento epitelial displásico. A desregulação de FGFRs também pode desempenhar um papel importante no processo tumorigênico (50).

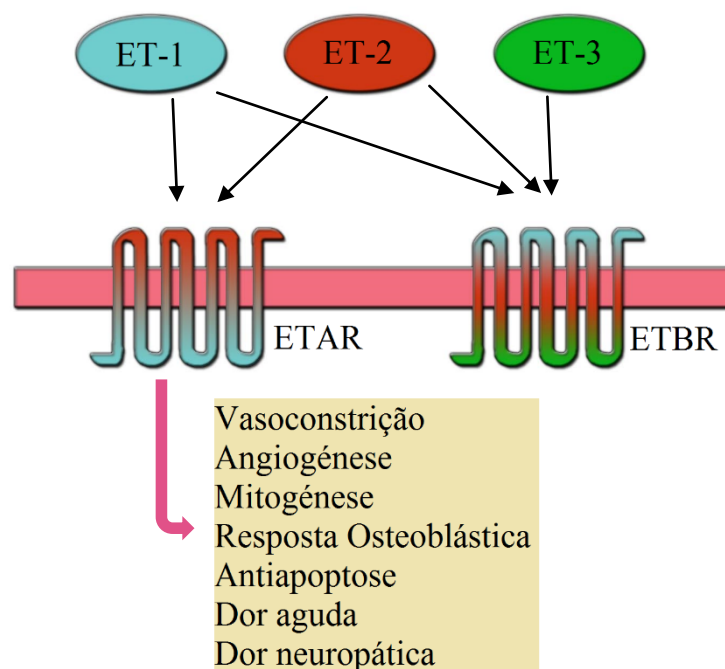


**Figura 9.** Papel do FGF na sinalização entre a célula tumoral e as outras células do seu microambiente (adaptado de Corn PG, Wang F, McKeehan WL, Navone N. Targeting fibroblast growth factor pathways in prostate cancer. Clin Cancer Res. 2013;19(21):5856–66). FGF (*Fibroblast growth factor*); FGFR (*Fibroblast growth factor receptor*).

## 2.7. Endotelinas e seus recetores:

Existem 3 tipos de endotelinas, a ET-1, ET-2 e ET-3, com os seus recetores ETAR (*Endothelin receptor type A* - que se liga preferencialmente à ET-1) e ETBR (*Endothelin receptor type B*). São um grupo de péptidos endógenos, que para além da sua função vasoconstritora (17) promovem a angiogénese por intermédio da libertação

de VEGF (18), a proliferação e diferenciação osteoblástica através da promoção da síntese de DNA osteoblástico (27), assim como a diminuição da mobilidade e função osteoclásticas (1,26). Têm vindo igualmente a ser implicadas no ciclo de amplificação dos sinais intercelulares que promovem o crescimento metastático, entre os quais a sinalização mediada por BMPs, IGF-1 e 2, PDGF, EGF e FGF, que se adicionam e atuam em sinergia com o estímulo promovido pelas endotelinas na proliferação, invasão, disseminação e resistência à apoptose por parte das células tumorais (52). Por último, possuem igualmente um papel na modulação imunitária e nos estímulos nociceptivos (18,52). A figura 10 resume algumas destas funções (52,53).



**Figura 10.** A ligação das endotelinas ao seu recetor ETAR estão implicadas em alguns processos chave da cascata metastática (adaptado de Carducci MA, Jimeno A. Targeting bone metastasis in prostate cancer with endothelin receptor antagonists. Clin Cancer Res [Internet]. 2006;12(20):6296–300 e de Albany C, Hahn NM. Novel bone-targeting agents in prostate cancer. Prostate Cancer Prostatic Dis [Internet]. 2014;17:112–8). ET (endotelina); ETAR (*Endothelin receptor type A*); ETBR (*Endothelin receptor type B*).

Estudos detetaram sobre expressão de ET-1 quer em células do tumor primário como dos locais metastáticos, assim como concentrações anormais de ET-1 plasmáticas

em pacientes com doença metastática, exacerbando assim o seu efeito estimulador. A produção excessiva de ET-1 e seu recetor ETAR na célula tumoral associa-se e tumores de grau mais elevado e dá-se em parte devido ao estímulo exercido pelas BMPs, IL-1, TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$  secretados pelo endotélio e osteoblastos do microambiente ósseo – dado que a ET-1 é marcadamente pró-osteoblastogénica, verifica-se mais uma vez um exemplo de ciclo vicioso característico da progressão metastática (26,52).

Para além desta produção exacerbada de ET-1, os seus mecanismos endógenos de clearance também se encontram alterados – na ausência dos recetores ETBR, cujos níveis reduzidos foram associados a CP, a ET-1 liga-se em grandes quantidades ao recetor ETAR, promotor da sua atividade pró-tumoral. Adicionalmente, a diminuição da atividade de degradação da endopeptidase neutra (NEP – *neutral endopeptidase*) associada ao ambiente tumoral também constitui outro mecanismo de redução da clearance da ET-1 (52).

A ligação da ET-1 aos recetores ETAR, presentes entre outros locais em células osteoblásticas, permite para além do aumento da atividade osteoblástica, a redução da motilidade osteoclástica, atividade antiapoptótica e mitogénese (tanto das linhas osteoblásticas como outras linhas celulares), assim como dor somática e neuropática (53).

Ainda um papel minor da ET-1 recentemente identificado é um *cross-talk* estabelecido com a via do Wnt, no qual esta diminui a produção de DKK-1 (*Dickkopf-related protein 1*) por parte das células estromais, aumentando assim efetivamente a atividade osteoblástica (23,24,26).

## **2.8. Interleucinas:**

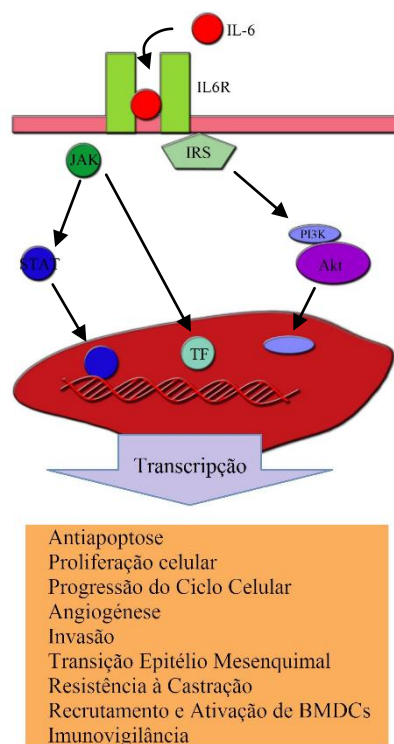
São um grupo de citocinas produzidas em resposta a lesão, estados inflamatórios e infecciosos. Julga-se que têm um papel preponderante na cascata metastática devido ao efeito que exercem não só na sinalização osteoclástica, mas também no estado pró-inflamatório que condicionam, propício ao desenvolvimento do CP e suas metástases devido à desregulação de citocinas, quimiocinas, fatores de transcrição e espécies reativas de oxigénio (8). Outra das suas diversas vias de sinalização é ainda responsável por promover a expressão de fatores de sobrevivência, proliferativos e pró-angiogénicos (54). Também já foi implicada no processo de transição epitélio-mesenquimal, com a estimulação fibroblástica exercida por elas a condicionar produção de MMPs, igualmente responsáveis pela progressão metastática – de facto, este grupo de moléculas parece interagir com um elevado número de vias de sinalização associadas ao CP e às suas metástases. (55).

Entre as interleucinas envolvidas na disrupção do turnover ósseo, destacam-se a IL-1, 6, 8 e 11. A IL-6, uma das mais extensamente estudadas, foi detetada em níveis elevados em pacientes com CP metastático, encontrando-se normalmente em níveis baixos ou indetetáveis no plasma (27,55). Esta citocina pleiotrópica e os seus recetores são produzidos pelas células metastáticas e células estromais adjacentes, condicionando complexos efeitos autócrinos assim como parácrinos no microambiente circundante, com diferentes efeitos dependendo do grau de desenvolvimento e responsividade androgénica do tumor (8).

Em relação ao seu efeito estimulatório, parecem ser preponderantes na mediação da reabsorção óssea através da promoção da expressão de RANKL pelos osteoblastos e de moléculas reabsortivas pelas células tumorais – por sua vez, visto que ambos estes tipos de células produzem eles próprios e respondem positivamente à IL-6, estabelece-

se assim um ciclo vicioso que culmina com estimulação osteoclástica e reabsorção óssea (8). Adicionalmente interfere na via do Wnt através do estímulo da expressão de DKK-1, e no aumento da atividade da estradiol 17  $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (inibidora do efeito anti-osteoclástico dos estrogénios) ambos constituindo mecanismos promotores de um estado reabsortivo (55). Ainda ligado com o efeito potenciador das hormonas estrogénicas, a IL-6 parece modular positivamente a sinalização do recetor androgénico, chegando mesmo a aumentar a sua expressão na membrana celular (8,54). A via de sinalização intracelular da IL-6 é apresentada resumidamente na figura 11 (8).

Já a IL-8 partilha uma função semelhante à do MCS-F no estímulo direto à osteoclastogénese, sendo igualmente uma citocina tipicamente promotora da angiogénese (18).



**Figura 11.** A IL-6 é uma das interleucinas cujas vias de sinalização e interações no contexto metastático estão melhor estudadas (adaptado de Nguyen DP, Li J, Tewari AK. Inflammation and prostate cancer: The role of interleukin 6 (IL-6). *BJU Int.* 2014;113(6):986–92). IL-6 (Interleucina 6); IL6R (*Interleukin 6 receptor*); IRS (*Insulin receptor substrate*); JAK (*Janus kinase*); STAT (*Signal Transducer and Activator of Transcription*); TF (*Transcription Factor*); PI3K/AKT (*Phosphoinositide 3-kinase/Protein kinase B*).

## 2.9.PTHrP:

A PTHrP é uma proteína da família da PTH, e como o nome indica a sua semelhança com esta molécula na ligação ao recetor PPR (*PTH/PTHrP receptor*) condiciona um leque de ações semelhantes, nomeadamente uma marcada hipercalcémia, quer esta seja provocada pelo aumento da reabsorção óssea de cálcio ou pela diminuição da sua excreção renal (26,56). Estes recetores estão ausentes em osteoclastos mas foram identificados em osteoblastos, osteócitos e células estromais, assim como em certos tipos de tumor, incluindo as metástases do CP. A ligação da PTHrP a este recetor desencadeia um conjunto de funções de extrema importância que se estendem a todas as etapas da cascata metastática, desde a próstata até ao ambiente ósseo. Esta importância surge no seu expoente máximo ao despoletar o ciclo vicioso da metástase óssea, ao fazer a balança pender para atividade osteoclástica por intermédio da sua atuação parácrina nos osteoblastos com rebote no rácio RANKL/OPG, e ao mesmo tempo regulando diversos processos celulares de maneira autócrina, que permitem a progressão tumoral.

A PTHrP é produzida em grandes quantidades pelas células tumorais e em menor quantidade pelos osteoblastos (indução pela IL-6 (55)), e a sua ação traduz-se num poderoso estímulo à atividade dos osteoclastos capaz de desencadear o ciclo vicioso metastático (através da promoção da produção estromal, osteoblástica e osteocítica de RANKL e do decréscimo da produção de OPG) (26,34). Para além da produção de RANKL, a PTHrP elícita nos osteoblastos a secreção de CCL2 (*chemokine C-C motif ligand 2*), fator capaz de estimular diretamente a migração, proliferação, e sobrevivência tumoral, contribuindo igualmente para esses fenómenos de maneira indireta através do aumento da quantidade e atividade dos osteoclastos.

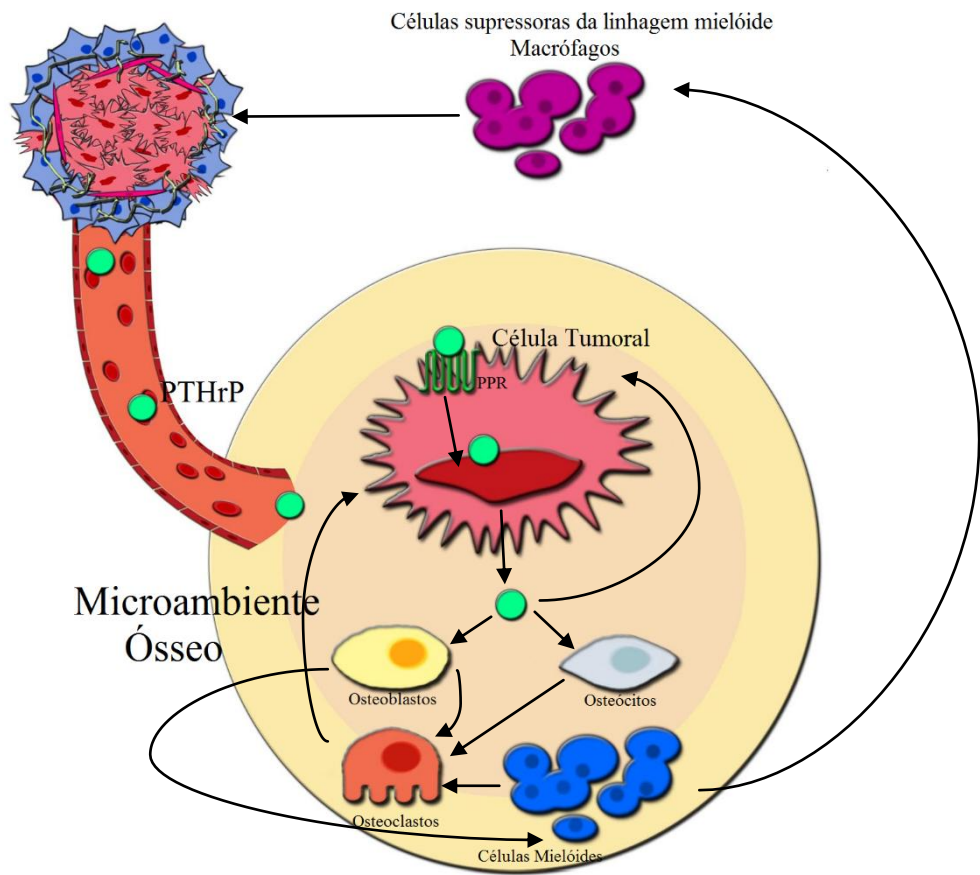
Concomitantemente ao efeito direto da molécula completa no estímulo da osteoclástogénese, algumas proteases produzidas pelas células tumorais exercem o seu efeito sobre a PTHrP (entre as quais se inclui o PSA) clivando-a em várias localizações possíveis dando origem a várias porções metabolicamente ativas (14,56) – um exemplo desta clivagem ocorre nos terminais NH<sub>2</sub> da PTHrP, que se mostram análogos com a ET-1, sendo que esta representa um fator mitogénico para os osteoblastos (17).

Por sua vez, a sobre-expressão de PTHrP por parte das células metastáticas associa-se igualmente a um vasto número de funções, cujo efeito pró-tumoral se estende desde a sua localização prostática primária até aos locais de metástase óssea. Uma delas prende-se com o aumento da capacidade proliferativa e angiogénica das células neoplásicas – por exemplo, foi detetada produção excessiva de IL-8 (fator pró-angiogénico e promotor do crescimento tumoral) em células cuja expressão de PTHrP era anormal. Julga-se que possui também um papel na própria capacidade invasiva tumoral, com altos níveis da sua expressão a estarem associados à produção de diversas integrinas implicadas na capacidade de adesão, migração e invasão tumoral.

Outra função ainda parcamente estudada e mal definida da PTHrP é a ação reguladora da apoptose e proliferação da célula metastática, que se julga ser efetuado por intermédio de mecanismos de internalização da molécula (ou de parte dela, nomeadamente um conjunto de aminoácidos que definem a sua NLS – *nuclear localization sequence*), seguidos de sinalização nucleares e regulação do ciclo celular (56) – ao prevenir a apoptose celular e ao regular o ciclo celular das células neoplásicas, a PTHrP pode ainda estar a contribuir para a capacidade de dormência e aquisição de quiescência por parte do tumor na sua localização óssea.

Por último, foi detetada influência da PTHrP na expressão de CXCL4, molécula implicada no *homing* medular por parte da célula metastática. Adicionalmente, a

produção de CCL2 à distância, com o seu estímulo osteoclastogénico associado, também pode contribuir para a modulação do microambiente ósseo (56) – sendo assim, a PTHrP pode exercer um efeito à distância mesmo antes de os primeiros colonos metastáticos invadirem a medula, na criação de um nicho pré-metastático favorável à implantação de células neoplásicas (representado na figura 12, assim como as interações do PTHrP no microambiente ósseo (56)).



**Figura 12.** As diversas ações do PTHrP no contexto tumoral ósseo. A sua ação pode iniciar-se à distância, estando implicada no *homing* da célula tumoral ou da modulação do microambiente antes da sua chegada. Adicionalmente, medeia a expansão de células da linhagem mielóide cuja mobilidade permite um *cross-talk* entre a localização primária do tumor e o seu local de metástase. À chegada da célula tumoral à medula, esta estabelece um conjunto de interações - provoca desregulação do rácio RANKL/ORP produzido pelos osteoblastos/osteócitos, estimulando a osteoclastogénese. O estado reabsortivo de rápido turnover liberta fatores de crescimento como o TGF- $\beta$  e cálcio, que estimulam não só o crescimento da célula tumoral como a própria atividade das restantes células nas suas proximidades (adaptado de Soki FN, Park SI, McCauley LK. The multifaceted actions of PTHrP in skeletal metastasis. *Future Oncol* [Internet]. 2012;8(7):803–17). PTHrP (*PTH related protein*).



## 2.10. Via do Wnt:

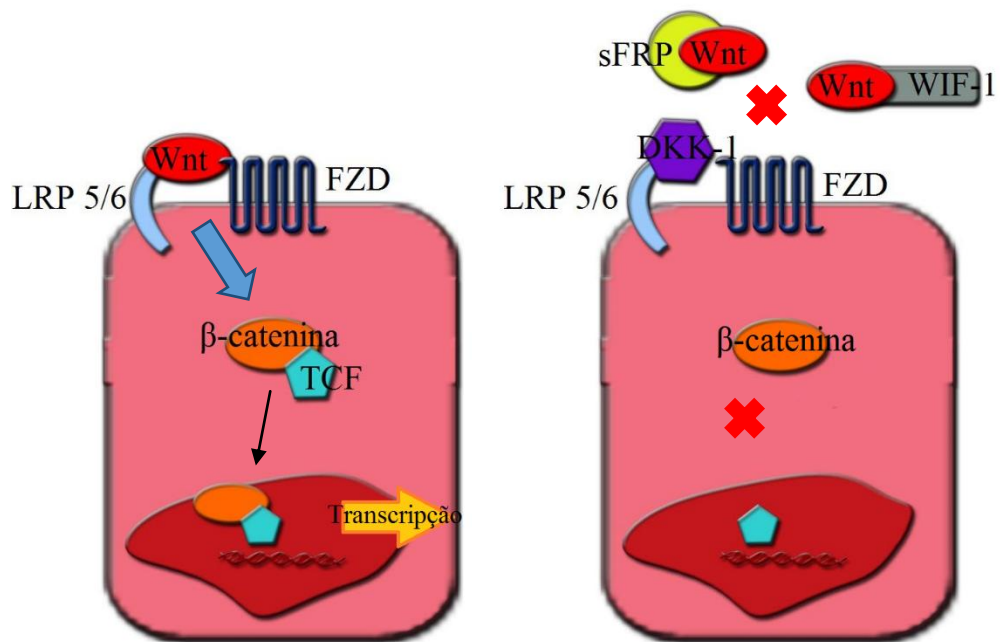
A via de sinalização do Wnt está envolvida em várias etapas da embriogénese e desenvolvimento celular, incluindo a proliferação, diferenciação, migração, polaridade, comunicação e sobrevivência (1). Wnts são produzidos pelas células metastáticas, auxiliando a sua fixação no osso e estímulo para a formação óssea. A sua atuação é mediada por dois tipos de recetores, as FZDs (*Frizzled Proteins*) e as LRP6 (*Lipoprotein related proteins*), e a sinalização pode ser efetuada por duas vias, a canónica (dependente de  $\beta$ -catenina) e a não-canónica. É precisamente na via canónica que ocorre a alteração nas células metastáticas, com níveis aberrantes de  $\beta$ -catenina nuclear a condicionarem ativação desta via. Adicionalmente, elevação de outras moléculas envolvidas na regulação do Wnt foram encontradas em amostras tumorais, assim como expressão de níveis anormais de várias Wnts (1).

Esta via está diferentemente regulada dependendo da etapa do ciclo de metástase focada, com diferentes concentrações dos seus inibidores em cada uma delas. Exemplos destes inibidores que sequestram as Wnts e impedem a sua ligação às FZDs são as sFRPs (*Secreted Frizzled-related proteins*), WIF-1 (*Wnt inhibitory factor 1*) e o Cerberus (representados na figura 13 (1)). Entre os vários inibidores encontra-se ainda a DKK-1, antagonista do Wnt que se liga aos recetores LRP 5/6 (1), com consequente inibição da formação óssea decorrente da atividade osteoblástica mediada por esta via (1). A ação deste antagonista é mais marcada no início do processo metastático (26), caracterizado por alta atividade reabsortiva, sendo que a sua expressão diminui progressivamente à medida que a doença progride – esta diminuição gradual é potenciada pela ET-1 produzida em quantidades cada vez maiores pela massa tumoral em desenvolvimento, cujas funções sobre o DKK-1 passam pela redução da sua função, tornando os precursores osteoblásticos ainda mais sensíveis à sinalização por parte dos ligandos Wnt

(30). Acabam-se assim por atingir níveis de DKK-1 que deixam de inibir a diferenciação osteogénica – altura na qual se dá o *shift* da reabsorção para formação óssea.

Este *shift* é igualmente potenciado pela ativação do fator de transcrição Runx2 (*Runt-related transcription factor 2*) por parte da via Wnt (convergente com a ativação do Runx2 mediada pela sinalização da via BMP). Esta via de transcrição está envolvida na regulação do RANKL e da OPG, assim como na modulação da atividade de vários genes relacionados com a atividade osteoblástica; por outro lado, a via do Wnt também se encontra diretamente envolvida na regulação autócrina da expressão de OPG e ET-1 em células metastáticas (1).

Uma outra particularidade desta via de sinalização é a aparente existência de um cross-talk competitivo entre a via Wnt e a via dos recetores androgénicos pela  $\beta$ -catenina – esta última ativa uma via secundária dos recetores androgénicos que contribuindo para a modulação da transcrição de compostos que resultam num fenótipo tumoral altamente invasivo, tendo níveis elevados de  $\beta$ -catenina em associação com recetores androgénicos sido encontrados em pacientes com CRPC (1,12).



**Figura. 13.** Sinalização por parte do Wnt e respetivos antagonistas da molécula e seus recetores (adaptado de Emami KH, Corey E. When prostate cancer meets bone: Control by wnts. *Cancer Lett.* 2007;253(2):170–9). Wnt (*Wingless-type MMTV integration site*); LRP (*Lipo-protein related protein*); FZD (*Frizzled Protein*); TCF (*Transcription factor*); sFRP (*Secreted Frizzled-related proteins*); WIF-1 (*Wnt inhibitory factor 1*); DKK-1 (*Dickkopf-related protein 1*).

## **A TRIÁDE OSTEOCLASTOS/OSTEOBLASTOS/CÉLULAS INVASORAS COMO FACILITADORES DA PROGRESSÃO DA METÁSTASE**

### **1) Ativação da reabsorção óssea como *kickstarter* do ciclo vicioso de progressão tumoral**

O tumor inicia a jornada no osso com um intuito bem claro – estabelecer-se na medula, invadi-la e proliferar. Contudo à chegada, a arquitetura medular não possui ainda as características necessárias para que o tumor cumpra esses objetivos. Para isso, este fará uso da modulação das vias de sinalização e funções dos fatores de crescimento e outras moléculas presentes em abundância no rico ambiente medular, os mais importantes já previamente mencionados. Inicialmente, e de modo a amplificar essa sinalização, será necessário orquestrar uma resposta reabsortiva concomitante mediada por osteoclastos, (9) (Figura 14 (10,34)) que lhe permita criar espaços e nichos onde possa proliferar – será nesses nichos, cuja vantagem é serem ricos em fatores de crescimento libertados pela matriz recém-degradada, que os tumores estabelecem a primeira etapa no ciclo vicioso de reabsorção-formação óssea que alimenta a progressão metastática – este conceito foi primeiramente descrito por Mundy e seus colaboradores, e sumariza o papel fulcral do microambiente ósseo no desenvolvimento metastático (21).

Apesar de esta reabsorção inicial ser a hipótese melhor aceite para explicar o início do ciclo vicioso, existem ainda dúvidas se este será o primeiro passo essencial que despoleta a cascata metastática. Por outras palavras, será que esta fase reabsortiva inicial precede o desenvolvimento metastático osteoblástico (que se verifica em fases mais tardias), ou será que é uma consequência direta dessa atividade de formação óssea (33) decorrente de uma resposta osteoblástica mediada pela presença das células tumorais? Apesar de ser possível uma junção de ambos os mecanismos (dada a rede

complexa de interações estabelecidas pelas células tumorais), a influência exercida pelas células metastáticas sobre os osteoclastos parece ser o mecanismo mais preponderante. Pesquisas em modelos animais confirmam esta hipótese, com estados de elevado turnover ósseo a provocarem o aumento da carga tumoral – em resposta a este alto estado de turnover, foram conduzidos estudos nos quais foi induzida geneticamente deficiência osteoclástica, assim como estudos que focaram terapias antireabsortivas com bifosfonatos e anticorpos monoclonais inibidores do RANKL (Denosumab), ambos com efeito na redução do turnover ósseo e consequente eficiência da capacidade metastática (30).

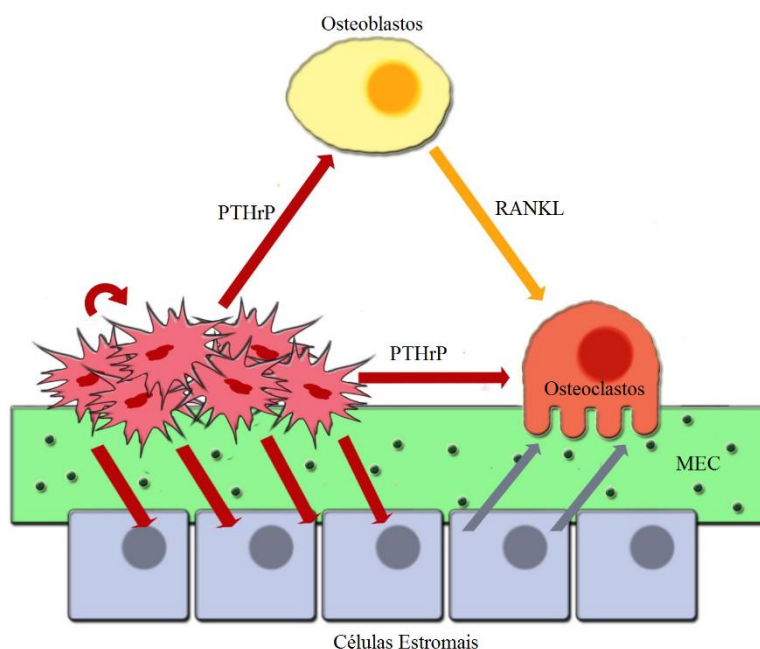
Um dos mecanismos utilizados pelas células tumorais passa pela atração quimiotática de precursores osteoclásticos, promovendo a sua fusão em osteoclastos maduros. Este fenómeno é favorecido em grande parte pela capacidade das células tumorais de produzir elas próprias fatores de crescimento, ou de aumentar a sua concentração no meio envolvente. Entre estes fatores de crescimento e outros compostos que permitem ativação osteoclástica encontram-se por exemplo o M-CSF, TGF- $\beta$ , PTHrP, u-PA, IL-1, IL-6 e MMPs (MMP-2 e MMP-9).

Uma das moléculas mais implicada nesta resposta osteoclástica inicial é o PTHrP - a produção de PTHrP é responsável pelo desequilíbrio inicial no rácio RANKL-OPG através do estímulo da produção de RANKL (57) que favorece a formação, atividade e sobrevivência de osteoclastos (30), levando à libertação provenientes da matriz dos fatores de crescimento supracitados.

Esta exacerbação da atividade osteoclástica vai acabar por sofrer um *shift* despoletado por intermédio do eixo RANK-RANKL-OPG, levando a que uma fase inicialmente osteolítica se torne predominantemente osteoblástica. No entanto, mesmo após esse *shift*, subsiste um forte componente lítico associado, o que explica os índices

sistêmicos aumentados de tanto indicadores de atividade osteoblástica (osteocalcina, BAP - *bone-specific alkaline phosphatase*), como osteoclástica (u-NTX - *Urinary N-telopeptide* - e deoxipiridolina, entre outros) (9).

Este elevado nível de reabsorção óssea cedo no desenvolvimento da metástase significa que os compostos indiciados na sua sinalização podem vir a constituir alvos terapêuticos muito importantes, constituem os primeiros passos para o estabelecimento da metástase no osso – procedendo-se à sua inibição, pode vir a ser possível prevenir ou atrasar a metastização óssea, traduzindo-se numa maior sobrevida dos doentes.



**Figura 14.** As células metastáticas promovem a reabsorção inicial mediando a ativação da osteoclastogênese, sendo a PTHrP a principal molécula envolvida nesta sinalização. Adicionalmente, estabelece outras relações parácrinas e autócrinas que exacerbam este fenómeno (adaptado de Ye L, Kynaston H, WG J. Bone metastasis in prostate cancer: molecular and cellular mechanisms. *Int J Mol Med*. 2007;20:103–11 e de Gartrell B, Saad F. Managing bone metastases and reducing skeletal related events in prostate cancer. *Nat Rev Clin Oncol* [Internet]. 2014;11(6):335–45). PTHrP (*PTH related protein*); RANKL (*Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*); MEC (matriz extracelular).

## **2) Papel das proteases e outras enzimas na degradação da MEC e progressão tumoral**

Como já mencionado anteriormente, as células metastáticas estão munidas de capacidade de produção de proteases – é difícil limitar a ação das proteases a etapas específicas do ciclo vicioso, pois a sua ação é ubiqüitária e acompanha a atividade metastática ao longo de todas as suas etapas. Estas estabelecem um conjunto de intrincadas linhas proteolíticas que desempenham um papel fundamental nas primeiras fases da evolução e progressão do tumor ainda como tumor localizado à próstata, ação transponível às localizações ósseas, pois é graças a elas que o tumor cria espaços e nichos onde se fixar – dada o alto teor mineral da matriz do tecido ósseo, esta ação é realizada com íntimo auxílio da atividade reabsortiva por parte dos osteoclastos (49).

### **2.1.Sistema MMP-TIMP**

Uma classe de proteases fulcral neste processo é a família das MMPs, constituída por pelo menos 28 enzimas proteolíticas, as quais são dependentes de zinco e sobre expressas por células tumorais, estromais e imunes, assim como por osteoclastos (23). Correlacionam-se com aumento da capacidade do tumor de destruição da membrana basal (27,35), proceder a transição epitélio mesenquimal, da sua atividade angiogénica e invasiva e associam-se a pior prognóstico global (58), estando igualmente implicadas no próprio processo de reabsorção óssea – tudo isto através do efeito direto que exercem na solubilização da MEC (28), ou por efeitos indiretos como a ativação de outras moléculas pró-tumorais (incluindo outras MMPs) e da sua interferência na via de sinalização angiogénica do VEGF . Níveis elevados de MMPs são detetados não só em tecidos tumorais mas também em qualquer tecido onde esteja a ocorrer um processo de inflamação ou de reparação (27).

As MMPs são expressas em níveis reduzidos nos tecidos normais, e sofrem efeito inibidor dos TIMPs (*tissue inhibitors of metalloproteinases*), os inibidores endógenos mais potentes da sua ação. Modelos animais de melanoma nos quais se estimulou a sobreprodução de TIMPs pelos tecidos afetados revelaram um atraso no desenvolvimento ou até supressão do crescimento metastático, levando assim a que estes inibidores possam também ser tidos em conta como alvos terapêuticos (27).

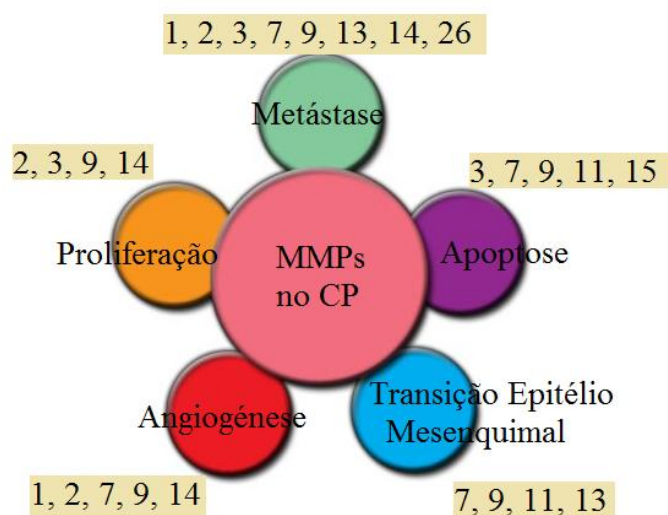
Como exemplo da ação típica das MMPs temos a produção de MMP-9, que é em parte desencadeada no momento da chegada dos primeiros colonos metastáticos à medula, por intermédio da ação do eixo CXCL12-CXCR4, que leva à expressão e secreção destas moléculas nas células metastáticas. A sua função proteolítica tem como alvo o colagénio tipo IV (59) - no entanto, parece não só ter um papel na degradação do meio envolvente como aparentemente auxilia igualmente a própria capacidade invasora das células metastáticas por outras vias, por intermédio de sinalização intracelular que permite uma invasão celular protease-guiada (31). Esta associa-se igualmente a ação que exerce sobre a transcrição de genes pró-angiogénicos e na atividade de outras proteases como a u-PA (58). Por último, esta MMP preponderante está implicada na atividade osteoclástica, ao ativar a polarização desta célula e permitir a sua fixação à superfície óssea, processo essencial para o início da reabsorção óssea (35).

Outra protease, a MT1-MMP (*membrane type 1-matrix metalloproteinase 1*, também conhecida por MMP-14), foi detetada em grandes quantidades em células metastáticas, e é um mediador major na degradação do colagénio tipo 1, o componente orgânico mais comum da matriz óssea. Para além do mais, pode ter outro efeito indireto no processo destrutivo inerente à lesão metastática, pois a habilidade da MT1-MMP de clivar RANKL e assim produzir RANKL 3, a sua isoforma solúvel, parece promover a atividade osteoclástica – este processo é inibido pela inclusão de OPG, inibindo assim

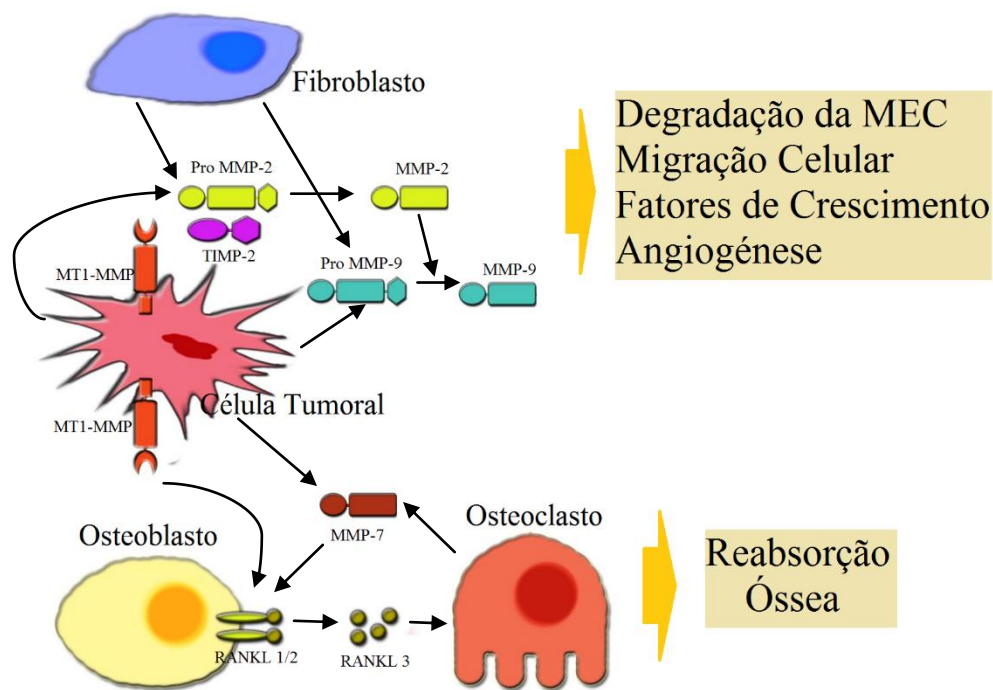


esta interação (31). Níveis alterados desta protease são inclusive encontrados já no tumor primário, sendo um exemplo da transposição de funções entre a ação da célula cancerígena no epitélio da lesão primária e no local metastático.

Outros exemplos são a MMP-2, a MMP-7. A MMP-7 possui atividade na clivagem do RANKL permitindo a sua função na ativação da atividade osteoclástica, enquanto que a MMP-2 possui funções semelhantes à MMP-9 na promoção da angiogénese (58). As funções das principais MMPs encontram-se representadas nas figuras 15 e 16 (58).



**Figura 15.** MMPs e suas funções no contexto do CP (adaptado de Gong Y, Chippada-Venkata UD, Oh WK. Roles of matrix metalloproteinases and their natural inhibitors in prostate cancer progression. *Cancers (Basel)*. 2014;6(3):1298–327). MMPs (*Matrix metalloproteinases*); CP (carcinoma prostático).



**Figura 16.** Vias de sinalização de algumas das MMPs com preponderância no CP metastático – clivagem de moléculas de outras MMPs para alcançar as suas formas ativas, assim como de moléculas essenciais ao desenrolar do ciclo vicioso, como o RANKL (adaptado de Gong Y, Chippada-Venkata UD, Oh WK. Roles of matrix metalloproteinases and their natural inhibitors in prostate cancer progression. *Cancers (Basel)*. 2014;6(3):1298–327). MMPs (*Matrix metalloproteinases*); RANKL (*Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*); MT1-MMP (*membrane type 1-matrix metalloproteinase 1*); TIMP (*Tissue inhibitor of metalloproteinases*).

## 2.2.u-PA

Entre outros exemplos de proteases intimamente relacionadas com a atividade das MMPs encontra-se a u-PA, uma serina protease produzida pelas células tumorais e intrinsecamente envolvida em processos de inflamação, adesão, migração e transformação maligna, com níveis mais elevados desta e do seu recetor (u-PAR - *Urokinase receptor*) a estarem relacionados com uma maior potencial metastático e grau de agressividade tumoral (26) – este recetor está não só associado à função da u-PA como também parece estar associado a outras moléculas da superfície celular como as integrinas, podendo ser mais um mediador da sua ação (59).

A u-PA, para além do seu efeito direto sobre a matriz, liga-se ao respetivo recetor u-PAR e promove processos de proteólise peri-celular e sinalização intracelular, sendo que recetores deste tipo são encontrados, entre outros locais, na superfície de osteoblastos – verifica-se assim que inerentes à atividade osteoblástica encontram-se não só fenómenos de génese, mas também ocorre alguma atividade destrutiva. A proteólise subsequente advém não só desta sinalização mediada diretamente pela u-PA, mas também indiretamente pelo efeito que esta exerce na geração de plasmina e subsequente ativação de MMPs (14).

A u-PA tem igualmente funções na ativação de IGF-1, conseguida pela proteólise de IGFBPs (9) das quais a IGFBP-3 a mais preponderante (17) – característica que partilha com o PSA. O aumento da biodisponibilidade da IGF-1 ao se ligar ao seu recetor (livre da ligação com as IGFBPs) promove atividade osteoblástica, e juntamente com o efeito que exerce sobre as próprias células tumorais estimula a proliferação das mesmas. A u-PA, igualmente em conjugação com o PSA, regula ainda a ativação do TGF- $\beta$  que é produzido no seu estado inativado pelas células tumorais e osteoblastos, adicionando mais um importante fator de crescimento à equação.

Por último, procede à clivagem e ativação de PDGF-D, provocando um loop de feedback tumoral positivo que aumenta ainda mais a produção de proteases por parte das células tumorais.

### **2.3.PSA**

O PSA é uma serina protease da família da calicreína produzida normalmente no tecido prostático com o intuito de degradar as proteínas semenoglia I e II, permitindo assim a liquefação do esperma que auxilia a motilidade dos espermatozoides no seu trajeto no sistema reprodutivo feminino. Num contexto de CP, a sua expressão está

aumentada, e a elevação dos seus níveis séricos é devida igualmente à disrupção da arquitetura dos ductos prostáticos que provoca o extravasamento de PSA para o espaço extracelular. (60)

Possui maior projeção e reconhecimento devido ao seu papel como biomarcador no *screening* e seguimento de pacientes com esta neoplasia, cujos valores se elevam de maneira proporcional com o estadio tumoral clínico e citológico (61). Esta característica inerente ao PSA é especialmente importante e relaciona-se com o facto de o recetor androgénico ser o principal regulador da expressão do PSA, conferindo assim a esta molécula a capacidade de medir com relativa precisão o relapso da doença ou o seu *status* no que toca ao sucesso da terapia vigente o ao grau de resistência à terapia anti-androgénica – adicionalmente, o próprio PSA pode incorrer numa via de transativação do recetor androgénico, responsável por mediar o crescimento celular e facilitar a resistência do tumor à terapia de privação androgénica.

Adicionalmente a esta função na via do AR, possui ainda um papel na proliferação osteoblástica através ativação da forma latente de TGF- $\beta$ 2, promoção da expressão de genes e vias de sinalização pró-osteoblásticas (Runx2 e osteocalcina) (62), clivagem da PTHrP e efeito proteolítico na hidrolisação de certas proteínas (função análoga à da u-PA na clivagem de IGFBP-3, que leva à ativação de IGF que estimula proliferação osteoblástica (29,61)) e galectina-3 (envolvida em processos de adesão, proliferação, apoptose e angiogénese (60)). Pode igualmente desempenhar outros papéis na hidrolisação de outros componentes da MEC como a laminina, fibronectina.

Outras das suas funções relativamente pouco estudada é o seu papel na angiogénese - contrário aos seus outros efeitos pró-tumorais, estudos levam a crer que o PSA possa ter uma faceta anti-angiogénica, associada a inibição da resposta celular endotelial a FGF e VEGF (62).

## 2.4.Família Src

Outra família de enzimas encontram-se as cinases da família Src (SFKs – *Src family kinases*), um grupo de 9 tirosina cinases (Src, Fyn, Lyn, Yes, Blk, Lck, Hck, Fgr, e Yrk) envolvido na regulação de vários recetores (EGFR, HER2 - *Human Epidermal growth factor Receptor 2* - VEGF, IGFs entre outros) e são ativadas por uma série fatores de crescimento (HGF - *hepatocyte growth factor* - IL-6, 8 e 12, IGF, BMPs, RANKL, TGF- $\beta$ , entre outros). A seu grau de ativação sofre o pico na fase metastática do CP, e promove mecanismos celulares como proliferação, adesão, diferenciação, mobilidade, angiogénese e sobrevivência, (4,28,53,63). A ação das 9 moléculas é marcado por grande heterogeneidade, cada uma podendo ter diferentes ações nas várias etapas da cascata metastática.

Estudos efetuados em modelos murinos revelaram que certas SFKs podem ter um papel na transformação do epitélio prostático através de atuação parácrina (induzida pelo FGF e com sobre-expressão do AR) ou através de mecanismos autócrinos (63).

No que toca ao aumento da mobilidade celular, SKFs como a Src possuem efeito em vários pontos regulatórios. É responsável pela criação de adesões focais dependentes de integrinas, formadas no bordo frontal da membrana celular e essenciais ao ganho de movimento da célula – este efeito é obtido através da capacidade de fosforilação das subunidades das integrinas exercido pela Src. Associadamente a Src procede à inativação do RhoA (envolvido na estabilização de adesões focais), promovendo igualmente o aumento de motilidade. Está ainda associada ao processo de transição epitélio-mesenquimal (através da disrupção da ligação entre a  $\beta$ -catenina e a E-caderina) e à formação de protusões da membrana da célula tumoral denominadas invadopódios (cujo mecanismo de ação é mediado pela rápida formação do citoesqueleto de actina e

pela secreção de enzimas como metaloproteinases – ambos os processos nos quais a Src está envolvida) (63).

O envolvimento da Src e outras SFKs na angiogénese é outra das variadas funções destas tirosina cinases – a Src está implicada na via de ativação do HIF-1 $\alpha$  ao aumentar a sua atividade transcricional, e o aumento de atividade das SFKs nas células endoteliais expostas a VEGF é responsável pelo aumento da permeabilidade vascular, ao rearranjarem o citoesqueleto e junções aderentes destas células de maneira a que se formem poros intercelulares (18,63).

Há ainda indícios de um possível *cross-talk* com a via do AR, com a sinalização deste a promover atividade por parte da Src com repercussões na modulação e progressão do ciclo celular da célula metastática (63). A fosforilação desta cinase está igualmente relacionada com a própria fosforilação do AR, que provoca translocação, transativação e transcrição de genes alvo deste recetor. Este efeito é partilhado por um conjunto de outros fatores de crescimento (IGF, EGF, IL-6 e 8, entre outros), cujas vias têm em comum implicarem ativação da Src.

Níveis elevados de enzimas desta família são encontrados em osteoclastos maduros, possuindo efeito regulatório positivo sobre a atividade destes – a Src é mais uma vez essencial, desta vez na formação de podossomas, que consistem em adesões entre os osteoclastos e a MEC envolvente. Em oposição, exercem um efeito inibitório sobre a atividade e diferenciação osteoblástica, mantendo-os sob uma forma menos diferenciada (53,63). A atividade reabsortiva assim conseguida desempenha um papel importante no crescimento, invasão e progressão da metástase.

## **2.5.Catepsinas**

São um grupo de 15 cistina proteases pertencentes à família das papeínas, altamente expressas em osteoclastos, implicadas no processo de angiogénese, apoptose e resposta inflamatória tumoral (59), com algumas funções na modulação da MEC análogas às MMP – por exemplo, a sua ação é responsável pela clivagem de colagénio tipo I matricial, osteopontina e osteonectina (35). Tal como as MMPs, cada uma possui ligandos específicos, e tal associa-se a uma panóplia de diferentes funções. Encontram-se nos lisossomas e podem atuar tanto como endo como exopeptidases (59).

As catepsinas mais comuns encontradas no microambiente ósseo são a D, K e L. A catepsina K está especialmente implicada no CP tendo aumento da sua atividade sido detetado em pacientes com metástases ósseas (28). Elevação dos seus níveis está associada a aumento do turnover ósseo, sendo libertada pelos osteoclastos – o seu efeito direto surge no contexto da degradação do colagénio tipo 1 surge após a degradação da matriz inorgânica mineralizada realizada pelos osteoclastos sob influência do RANKL (35), produzindo um marcador de turnover ósseo detetável na urina, o u-NTx. Está também associada a degradação/mobilização de outras proteínas relacionadas com o processo metastático, como o caso do colagénio tipo IV, fibronectina, laminina, osteonectina (implicada como fator quimiotático na capacidade migratória e invasiva do CP (24)), VEGF, osteopontina e CXCL12 (59). Já o seu efeito indireto relaciona-se com a ativação de outras proteases como as MMPs ou a u-PA.

### **3) O Ciclo Vicioso de retroalimentação da metástase óssea**

A ativação inicial exacerbada da via osteolítica, abordada anteriormente, é a rampa de lançamento para o começo do ciclo vicioso que tão bem sumariza a evolução

de metástases no osso – é graças a ela e à ação conjunta do eixo RANK-RANKL-OPG e fatores de crescimento que atuam de maneira autócrina e parácrina (libertados pela matriz degradada, produzidos pelas células estromais ou mesmo pelas próprias células cancerígenas) que se atinge a etapa do ciclo correspondente à formação de novo osso, o substrato essencial para a continuidade do ciclo vicioso. Esta nova matéria óssea é contudo caracterizada por não possuir, devido à elevada rapidez a que se dá o *turnover*, a qualidade que teria osso normal – em vez disso, é produzido osso rendilhado, frágil e quebradiço (constituído por fibras de colagénio orientadas aleatoriamente, esparsamente compactadas (9)), que apesar do seu aspeto denso à radiografia simples não apresenta a integridade estrutural necessária a comportar *stress* mecânico. Esta fragilidade deste tecido ósseo formado de maneira aberrante resulta num aumento do risco de complicações esqueléticas conhecidas como SREs (*Skeletal Related Events*).

Nesta altura do desenvolvimento metastático, dá-se assim uma série de interações que desequilibram a balança a favor da atividade osteoblástica, diminuindo a atividade osteoclástica a níveis suficientes para manter um aporte de fatores de crescimento suficiente para manter o crescimento maligno.

Para além do mais, as próprias células parecem incorrer num processo de “osteomímica” (9), no qual adotam características comuns às células osteoblásticas e utilizam as mesmas vias de sinalização, o que lhes permite participar ativamente na formação de novo osso.

Durante muito tempo se julgou existir um *cross-talk* entre as células tumorais e as da linhagem osteoblástica – recentemente foi identificada uma via de sinalização na qual se confirma que os osteoblastos respondem de facto ao estímulo mediado pelas células tumorais. RANKL/RANK e IL-6 estabelecem duas vias de sinalização interdependentes e auto-amplificadoras presentes no microambiente ósseo (57). Os



osteoclastos encontram-se altamente estimulados nesta fase do ciclo devido aos eventos supracitados, e como tal produzem maior quantidade de RANKL – este RANKL vai não só constituir um despoletador de nova atividade osteoclástica (abordada no próximo sub-tema) como também vai exercer função estimulatória sobre as células tumorais. Este mecanismo vai provocar libertação de IL-6 por parte da célula tumoral, que não só atua nos osteoblastos para produzir RANKL adicional, como também de maneira autócrina, na ativação de RANK tumoral (sensibilizando ainda mais as células tumorais ao RANKL osteoblástico produzindo estímulo metabólico na célula tumoral) – IL-6 parece funcionar como ampliador de sinal nesta interação osteoblasto-célula tumoral, função que junta à sua funcionalidade estimuladora da diferenciação osteoclástica, essencial para a manutenção da próxima fase do ciclo vicioso. Esta nova via de sinalização reveste-se de grande interesse devido ao facto de parecer ser específica ao osso, com interrupção das interações entre os efectores implicados a resultar na inibição do crescimento tumoral no osso mas não em tecidos moles (57). Constitui-se assim uma importante ponte para futuros estudos que abordem esta via de sinalização.

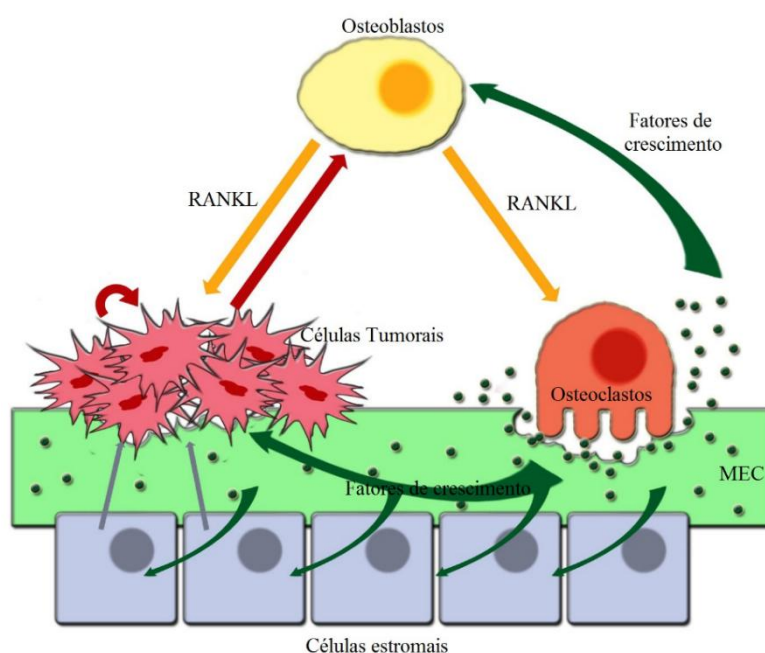
A formação óssea exacerbada por parte dos osteoblastos, vai fornecer um substrato a partir do qual vai ser possível a ocorrência de fenómenos líticos, que levam à libertação de fatores de crescimento, os quais estimulam o crescimento metastático num fenómeno de ação-reação que se perpetua.

O desencadeador major desta nova ativação da osteoclastogénese e da reabsorção óssea é o RANKL produzido pelos osteoblastos cuja atividade foi promovida em etapas anteriores do ciclo – este liga-se ao RANK osteoclástico e fecha o ciclo vicioso por intermédio do aumento de génese, função, e aumento da capacidade de sobrevivência das células da linhagem osteoclástica (3). O estímulo exacerbado por parte da PTH em resposta a hipocalcémia (devido ao turnover ósseo aumentado com

diminuição dos níveis de cálcio livre) é igualmente um dos fatores que exerce um efeito fundamental na expressão de RANKL para estimular a atividade osteoclástica (33).

Adicionalmente, a produção de RANKL por parte dos osteoblastos sofre um estímulo por parte das próprias células tumorais, contribuindo assim para o reforço da sinalização do *reboot* atividade osteoclástica (28) – todo este mecanismo se encontra explicitado de maneira resumida na figura 17 (10,34).

Torna-se por isso importante focar pontos-chave deste ciclo de modo a que se interrompa o efeito bola de neve que vai levar a metástases clínicas e radiologicamente evidentes.



**Figura 17.** A atividade osteoclástica liberta fatores de crescimento que atuam de como dínamo do ciclo vicioso. Esta reabsorção é mantida pelo contínuo estímulo de produção de RANKL promovido e mantido através da atividade disruptiva das células metastáticas, que por sua vez recebem estímulos autócrinos e parácrinos provenientes das restantes células do seu microambiente – é nestes nichos ricos em fatores de crescimento e estímulos proliferativos que se vai dar o desenvolvimento da metástase (adaptado de Ye L, Kynaston H, WG J. Bone metastasis in prostate cancer: molecular and cellular mechanisms. *Int J Mol Med.* 2007;20:103–11 e de Gartrell B, Saad F. Managing bone metastases and reducing skeletal related events in prostate cancer. *Nat Rev Clin Oncol* [Internet]. 2014;11(6):335–45). RANKL (*Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*); MEC (matriz extracelular).

#### 4) O papel hormonal androgénico no crescimento da metástase

As hormonas revestem-se de extrema importância no que toca ao metabolismo normal do osso, papel transponível à modulação e progressão da metástase.

A sua influência no ciclo celular de células prostáticas, quer elas sejam benignas ou malignas, inicia-se no próprio órgão, onde o estímulo androgénico estimula a sua germinação, proliferação e diferenciação (12).

Exercem um efeito proliferativo direto sobre as células metastáticas, assim como estímulo indireto das mesmas por estimulação do microambiente no qual estas se inserem (28) – este efeito local induzido pela testosterona passa pelo estímulo direto da proliferação osteoblástica e inibição da apoptose dos osteoblastos e osteoclastos. Adicionalmente, o seu papel como precursor do estrogénio representa um estímulo indireto à formação óssea, com recetores estrogénicos presentes tanto em osteoblastos como osteoclastos (6,34). Por outro lado, estados de hipogonadismo como os induzidos pela terapia da privação androgénica, também conhecida por ADT (*Androgen Deprivation Therapy*), reduzem drasticamente os níveis de testosterona e estrogénios, alterando o paradigma do *turnover* ósseo para um comportamento reabsortivo, com os níveis hormonais reduzidos a inibir a produção de RANKL e a promoverem síntese de OPG (64). São precisamente estas funções que fazem dos androgénios um fator major para o crescimento metastático, sendo talvez os mais importantes dínamos para que este se dê – na prática, a sinalização mediada pelos androgénios pela via do AR constitui uma via de fator de crescimento, que se adiciona sinergicamente às restantes já abordadas nesta revisão (9).

## **MORBILIDADE EM PACIENTES COM CP METASTÁTICO**

Não obstante o aumento da sobrevida dos pacientes com CP metastático que se tem vindo a verificar nas últimas décadas, esta condição associa-se muitas vezes a características de morbilidade relevantes.

Sintomas de dor óssea são frequentemente um exemplo disto, correspondendo ao sintoma mais comum (4) cujas características debilitantes condicionam não só grande angústia emocional/funcional no paciente (com conseqüente diminuição da qualidade de vida e sobrevida) como também encargos adicionais referentes a tratamento e gestão da patologia dolorosa (34). Estes surgem não só pela estimulação mecânica e química dos recetores da dor do periósteo e do endósteo (9), mas também inseridos num fenómeno mais abrangente e que afeta grande parte dos pacientes com CP metastático, os chamados SREs – estes incluem dor óssea intratável a necessitar de radioterapia paliativa, fratura patológica, compressão espinal, cirurgia óssea e hipercalcémia, sendo o perfeito exemplo disso as fraturas com compressão dos corpos vertebrais, que causam grande grau de disfunção (dor com estímulo e afeção nervosa nociceptivos, com possível impacto em funções biológicas como o controlo esfíncteriano) e representam o tipo mais frequente de fratura patológica (27,32). A compressão espinal decorrente deste tipo de fraturas ou da própria expansão maligna, associa-se a prognóstico pobre e redução drástica da qualidade de vida, podendo ser o primeiro sinal de patologia tumoral em cerca de 37% dos doentes. Já em relação à fraturas do colo do fémur, outro local de fragilidade propenso a fraturas patológicas, apenas 41% dos homens afetados recuperam níveis prévios de vitalidade, e em 79% chegam a ser necessários algum tipo de cuidados até um ano mais tarde. A taxa de mortalidade decorrente deste fenómeno é 4 vezes superior às que acontecem em mulheres osteoporóticas pós-menopausa, e um

em cada 3 indivíduos morre durante o primeiro ano (7). Outros locais comuns de ocorrência de fratura são a cintura pélvica, costelas e outros ossos longos.

Os SREs estão assim associados a uma diminuição drástica da esperança de vida dos doentes, e juntando ao facto de estarem intrinsecamente associados à progressão da doença, a sua ocorrência também está fortemente relacionada com as próprias terapêuticas levadas a cabo - a terapia de privação androgénica é o perfeito exemplo disso, com a osteopenia/osteoporose (e fraturas de fragilidade decorrentes) associadas à mesma a condicionarem os ditos fenómenos esqueléticos por redução da DMO (*Densidade Mineral Óssea*) (4).

Hipocalcémia é outro sintoma detetado em doentes com CP metastático, ainda que em muitos dos casos seja assintomático (4).

Associados a este quadro metastático, pode encontrar-se igualmente um rebote na homeostasia hematopoiética, devido a mieloptise (28) causada pelas metástases devido à sua sede em localizações ósseas/medulares de grande atividade – manifesta-se por intermédio de anemia e graus variáveis de imunodeficiência, que podem condicionar maior suscetibilidade a infeções (9).

## **TERAPIA DIRIGIDA AOS FATORES DE CRESCIMENTO PARA INTERRUPÇÃO DO CICLO VICIOSO**

A maioria dos compostos dirigidos aos fatores de crescimento encontram-se ainda em fase pré-clínica para uso em contexto de CP e suas metástases, mas mostram resultados promissores (49).

O desenvolvimento destas novas opções terapêuticas está diretamente relacionado com a terapia anti-fator de sobrevivência (ASF – *Anti-survival factor*), um termo recentemente cunhado que pretende numa fase prévia de investigação identificar alvos terapêuticos major, assim como moléculas anti-apoptóticas secundárias da cascata de sobrevivência tumoral, para seguidamente proceder a terapia dirigida contra esses mesmos fatores – espera-se assim que represente uma alternativa viável à promoção direta da apoptose das células tumorais, utilizando-se em conjunto com regimes terapêuticos já vigentes (ADT, QT - *Quimioterapia*, RT - *Radioterapia*, entre outros) de maneira a aumentar a sensibilidade das células aos mesmos, ou inclusivamente reverter algum grau de resistência associado (9).

Posto isto, a totalidade dos estudos em andamento até à data presente constituiria uma lista muito extensa, e englobaria uma multiplicidade de compostos, sendo que para que pudesse ser convenientemente explicitada neste artigo de revisão constituiria um desvio ao tema chave do mesmo, que passa pela revisão dos mecanismos fisiopatológicos da cascata metastática do CP para o osso. Devido a isso, a Tabela 1 serve para, a título de exemplo, mostrar o potencial e a dinâmica do estudo destas vias de sinalização e respetivos fatores de crescimento, cujos estudos se encontravam em andamento até Abril de 2014 – apesar de esta tabela constituir a revisão mais recente encontrada nos artigos utilizados como referências bibliográficas, salvaguarda-se no

entanto que alguma da informação nela contida possa estar desatualizada (adaptada de Deng et. al (28)).

**Tabela 1.** Agentes dirigidos ao osso com estudos em curso (informação até Abril de 2014 – adaptada de 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* [Internet]. 2014;40(6):730–8).

Agente	Mecanismo de Ação	Propriedade Bioquímica	Alvo molecular	Fase do estudo
<b>Dasatinib</b>	Inibição da Reabsorção	Inibidor da Tirosina Cinase	Src, Abl	III
<b>Saracatinib</b>	Inibição da Reabsorção	Inibidor da Tirosina Cinase	Src, Abl	II
<b>KX2-391</b>	Inibição da Reabsorção	Inibidor da Tirosina Cinase	Src	II
<b>Bosutinib</b>	Inibição da Reabsorção	Inibidor da Tirosina Cinase	Src, Abl	Pré-clínico
<b>Abegri</b>	Inibição da Reabsorção	Anticorpo monoclonal humanizado	Integrina $\alpha_v\beta_3$	II
<b>MK-0429</b>	Inibição da Reabsorção	Inibidor de Pequenas Moléculas	Integrina $\alpha_v\beta_3$	I
<b>EMD 525797</b>	Inibição da Reabsorção	Anticorpo monoclonal humanizado	Integrina $\alpha_v$	I
<b>GLPG0187</b>	Inibição da Reabsorção	Antagonista integrinas não-peptídicas	Integrina $\alpha_v$	Pré-clínico
<b>Odanacatib</b>	Dirigido à matriz óssea	Inibidor de Pequenas Moléculas	Catepsina K	III
<b>PCK3145</b>	Dirigido à matriz óssea	Péptido sintético	MMPs	Pré-clínico
<b>Silibinina</b>	Dirigido à matriz óssea	Inibidor de Pequenas Moléculas	MMPs	Pré-clínico
<b>AdTIMP-2</b>	Dirigido à matriz óssea	Adenovirus recombinante expressador de TIMP-2	MMPs	Pré-clínico
<b>MSD-hATF</b>	Dirigido à matriz óssea	Células mesenquimais estaminais programadas para expressar hATF – antagonista da u-PA	uPA–uPAR	Pré-clínico
<b>TGF-<math>\beta</math>1 shRNA</b>	Dirigido à matriz óssea	shRNA	TGF- $\beta$	Pré-clínico
<b>T<math>\beta</math>RI-KI</b>	Dirigido à matriz óssea	Inibidor do recetor de cinases	TGF- $\beta$ recetor tipo 1	Pré-clínico
<b>BG<sub>E</sub>RII</b>	Dirigido à matriz óssea	Proteína de ligação pan TGF- $\beta$	TGF- $\beta$	Pré-clínico
<b>Ad.sT<math>\beta</math>R-Fc</b>	Dirigido à matriz óssea	Vírus oncolítico que expressa recetor TGF- $\beta$ tipo 2 ligado com Fc	TGF- $\beta$	Pré-clínico
<b>TAd.sT<math>\beta</math>R-Fc</b>	Dirigido à matriz óssea	Variante Ad.sT $\beta$ R-Fc	TGF- $\beta$	Pré-clínico
<b>LY2109761</b>	Dirigido à matriz óssea	Inibidor de Pequenas Moléculas	TGF- $\beta$ recetor tipo 1	Pré-clínico

## TERAPIA DE PRIVAÇÃO ANDROGÉNICA

Apesar de não constituir uma terapia dirigida especificamente ao osso, os efeitos secundários esqueléticos resultantes da mesma podem associar-se a aumento da morbidade e mortalidade dos doentes, o que justifica a sua menção neste artigo de revisão.

A ADT constitui uma das primeiras linhas terapêuticas selecionadas para abordar pacientes com doença metastática – contudo, se no início da terapêutica esta mostra boa resposta com taxas de 80 a 90 % em termos de cessação da progressão tumoral (associada a rápido controlo da dor óssea com alívio notado em até 24h), esta ação favorável acaba por sofrer um *shift* inexorável para um fenótipo androgénio-independente, o chamado CRPC (28). O principal responsável por esta resistência é a reconstituição da sinalização mediada pelo AR – este está presente nas células tumorais, com heterogeneidade crescente, especialmente à medida que se vai desenvolvendo a resistência à castração, altura a partir da qual se julga ocorrerem fenómenos de redução da atividade transcricional destes recetores, um *shift* na especificidade transcricional dependente dos mesmos, produção androgénica pelas próprias células metastáticas ou vias aberrantes de sinalização associadas a outras fontes endócrinas de androgénios (12,15,65).

Esta mudança marca uma alteração do prognóstico do doente, associando-se a maior morbidade e a redução da sobrevida, devido à progressão da evolução do tumor, assim como as suas manifestações clínicas. É precisamente em relação a essas manifestações de carcinoma prostático avançado em doentes com tumores androgénio-independentes que atualmente têm vindo a ser desenvolvidas terapias cujo principal



objetivo é não só reduzir a progressão da doença mas também proceder ao controlo de sintomas que advenham dessa progressão, traduzindo-se num aumento da qualidade de vida e sobrevida global – alguns destes tratamentos mostram-se inclusive promissores na própria prevenção da doença metastática, sendo que estes efeitos se encontram em aceso foco de investigação.

### **1) Osteoporose e outros sintomas relacionados com ADT – um mal que vem por bem**

A ADT é obtida com uso de agonistas da GnRH (*Gonadotropin-releasing hormone* - com ou sem administração conjunta de antiandrogénicos), antagonistas da GnRH, administração oral de dietilestilbesterol ou através de orquidectomia bilateral (9). Constitui uma opção de tratamento para pacientes com doença localmente avançada com risco metastático intermédio a alto, carcinomas de baixo estadió em regime de radioterapia ou ainda em casos em que se dá o relapso da doença mesmo após radioterapia/cirurgia, medido pelos níveis séricos de PSA (6,33).

O principal objetivo desta terapia é a redução dos níveis de hormonas sexuais circulantes, com os níveis de testosterona alcançados a chegarem a ser <20 mg/ml, tendo outro estudo relativo aos níveis de estradiol (o principal tipo de estrogénio no sexo masculino, obtido através da ação da aromatase sobre a testosterona) constatado que estes passaram de 26 pg/ml para 7 pg/ml após 48 semanas de tratamento - sendo a testosterona e os estrogénios responsáveis major pela regulação do *remodeling* ósseo (34), transcrição de fatores de crescimento osteobástico (7) e pela manutenção da DMO, não é de estranhar que a sua redução, apesar de benéfica no atraso da progressão tumoral, aumente de igual maneira o risco de fratura de SREs (4), em consequência do estado de hipogonadismo severo obtido com ADT. Outro mecanismo paralelo e sinérgico é o aumento do *remodeling* ósseo causado pela IL-6 e 7, que em consequência

de orquidectomia bilateral estimulando o sistema RANK-RANKL com benefício na atividade osteoclástica (7,17). A este conjunto de efeito deletérios, com intenso rebate ósseo, atribui-se a denominação de CTIBL (*Castration Treatment Induced Bone Loss*) (64).

O aumento deste risco de fraturas é especialmente grave em indivíduos de idade avançada, onde o cancro prostático é prevalente. Esta população encontra-se além do mais desde já fragilizada, dada a incidência de osteoporose se relacionar diretamente com a idade do paciente (35) - fraturas osteoporóticas (em especial da anca) apesar de mais comuns em mulheres, a ocorrem em até ¼ dos homens, com uma incidência durante a vida de 20% (4). Resta ainda salientar que a taxa de osteoporose verificada em indivíduos antes de iniciar ADT é desde já largamente superior ao normal, com um estudo transversal ao longo de 10 anos de tratamento a concluir que a taxa de osteoporose antes de este se iniciar era de 35%, e ao fim dos 10 anos ascendeu para os 80% (6).

Num contexto de regime de ADT, estima-se que 1 em cada 4 homens com mais de 50 anos venha a ter um SRE, com taxas de fratura atribuíveis a este tratamento a situarem-se entre os 5 e os 40% (dependendo do tempo de tratamento e seguimento dos doentes) (7) – surpreendentemente, essa taxa de fratura representa, em indivíduos com CP não metastático, uma duplicação do risco de morte comparado com pacientes semelhantes que não apresentaram episódios de fratura (34).

A redução na DMO é mais marcada no primeiro ano de tratamento, com estudos prospetivos a detetarem uma diminuição de aproximadamente 3% na coluna lombar e 2% na anca (4), correspondendo a uma perda de 5% da DMO total, um valor elevadíssimo comparada com a normal perda anual de um homem saudável (0,5%) – após esta fase, observa-se uma estabilização da perda de DMO, mas os seus valores

nunca regressam aos níveis pré-mórbidos. Portanto, a intervenção deverá ser mais ativa nesta fase de elevada perda da DMO, de modo a criar um plateau mais elevado a partir do qual as perdas anuais subsequentes após o primeiro ano sejam menos significativas (7).

Outros sintomas associados ao hipogonadismo por ADT passam pela redução da massa muscular e pelo aumento da gordura corporal (34).

## **TERAPIA ANTI REABSORTIVA**

### **1) BIFOSFONATOS**

São a classe de agentes anti-osteoclásticos mais antigos (propostos pela primeira vez nos anos 70), sendo igualmente a mais utilizada. São administrados por via oral ou intravenosa, possuindo uma baixa biodisponibilidade.

Uma particularidade destes fármacos é a sua prolongada semivida óssea, que ultrapassa largamente a sérica, já que são rapidamente removidos da circulação (< 1% de fármaco sérico às 24h) (33) – bifosfonatos como o Alendronato chegam a ter uma semivida óssea de perto de 10 anos (34).

O facto de serem análogos sintéticos, não hidrolisáveis, do pirofosfato (28) permite a sua ação óssea, sendo que a ligação a cristais de hidroxiapatite expostos impede não só a reabsorção dos mesmos por parte de osteoclastos e seus precursores, como possui um efeito inibitório direto na sua atividade e recrutamento, através da interferência no metabolismo do mevalonato – este efeito de interferência no metabolismo osteoclástico é definido pela constituição da cadeia lateral R2 da molécula no que toca à presença de nitrogénio, sendo a presença ou não deste composto assim como a sua quantidade a definir a potência relativa desta classe de fármacos (33) - dentre os bifosfonatos disponíveis hoje em dia, a potência por ordem crescente

organiza-se da seguinte forma: etidronato, clodronato (sem grupo amino lateral), pamidronato (um grupo amino primário), alendronato, ibandronato, risedronato e ácido zoledrónico (com 3 grupos amino) (32). A atividade deste último é cerca de 100 vezes mais potente do que a do clodronato/pamidronato, e 1000 mais potente que o bifosfonato mais fraco, o etidronato (33).

Ao bloquear enzimas específicas da biossíntese de colesterol nos osteoclastos (farnesil pirofosfato sintetase e geranyl-geranyl pirofosfato sintetase – FPPS e GGPPS respetivamente) (17,22,49), promovem alterações na função do citoesqueleto destes, o que leva à sua apoptose (2,4). Por outro lado, os bifosfonatos não-nitrogenados como o Clodronato possuem um efeito maioritariamente citotóxico após serem metabolizados pelos osteoclastos, com a produção de metabolitos análogos ao ATP (*Trifosfato de Adenosina*) produzindo disfunção mitocondrial (6,26,27).

Para além do mais, os bifosfonatos possuem um efeito na atividade osteoblástica que se repercute indiretamente na atividade osteoblástica, efeito transponível e sinérgico com a inibição da expressão de RANKL e a promoção da apoptose em células metastáticas, este último mecanismo ainda pouco estudado, mas que se pense ser citotóxico (33,66). Este efeito é no entanto atenuado pelo facto de os bifosfonatos se ligarem rapidamente aos cristais de hidroxiapatite, algo que limita a sua função de contacto direto com as células metastáticas (17).

Os efeitos secundários gastrointestinais representam um obstáculo na adesão à terapêutica, assim como a nefrotoxicidade associada a estes fármacos – para minorar este último fenómeno, preconiza-se a administração lenta de bifosfonatos ao longo de 15 minutos, com monitorização concomitante da função renal, procedendo-se a ajustes da dose conforme a clearance do paciente. (6)

Entre outros efeitos secundários comuns contam-se reações de fase aguda, hipocalcémia e osteonecrose mandibular.

### **1.1) Ácido Zoledrónico:**

Contém nitrogénio e possui a habilidade de inibir a síntese de farnesil e a geranyl-geranyl pirofosfato sintetase osteoclasticas. É um dos mais potentes bifosfonatos devido à presença de dois grupos nitrogenados, sendo até 40 a 850 vezes mais forte que o Pamidronato.

O seu uso foi aprovado para o tratamento de metástases ósseas de qualquer tumor sólido, entre eles o CP, assim como na prevenção de hipercalcémia e SREs em pacientes com CRPC metastático assintomático ou minimamente sintomático (28,32,53).

Diversos ensaios de fase III foram realizados para estudar os efeitos do Ácido Zoledrónico, focando a sua ação de prevenção metastática, prevenção dos SREs, aumento da DMO e palição da dor.

#### **a) Prevenção de metástases:**

Na área da prevenção do aparecimento de metástases, apesar de estudos de fase I e II promissores (interferência da adesão celular à matriz), não se verificou a mesma correspondência em estudos de fase III, tendo estes resultado num fracasso relativo tendo em conta o fraco atingimento dos *endpoints* primários propostos. Exemplos destes estudos são o estudo Zometa 704 e o ZEUS (*Zometa European Study*) (33). O primeiro, um estudo randomizado controlado por placebo (67) possuía como *endpoint* primário o tempo até primeira metástase envolveu 398 homens com CP não metastático em regime de ADT com níveis de PSA em crescendo, mas sem apresentarem progressão da doença, aos quais foram administrados 4 mg de Ácido Zoledrónico a cada 4 semanas

durante 4 anos – o estudo foi interrompido por uma taxa de eventos inferior ao esperado, com dados preliminares a apontarem para a ausência de diferença significativa entre o Ácido Zoledrónico e o placebo na prevenção de metástases. Acabou por ser convertido num estudo acerca da cinética do PSA, devido aos dados informativos que daí advieram.

Mais recentemente, resultados semelhantemente desapontantes foram obtidos com o estudo ZEUS (68), um estudo randomizado, multinacional que envolveu 1433 homens com CP sem metástases ósseas mas com alto risco definido por  $PSA \geq 20$  ng/ml, gânglios positivos ou score de Gleason  $\geq 8$  no tumor primário, aos quais foram administrados 4 mg de Ácido Zoledrónico intravenoso a cada 3 meses durante 48 meses, com tempo médio de follow-up de 5 anos. O principal *endpoint* era o aparecimento da primeira metástase, não tendo este sido atingido, com ausência de diferença significativa entre o Ácido Zoledrónico e placebo (14,7% vs. 13,2%).

#### **b) Prevenção de SREs e aumento da DMO:**

Ao contrário dos estudos de prevenção metastática, estudos com foque na prevenção de SREs mostraram-se promissores, tendo sido inclusive aprovado pela FDA (*Food and Drug Administration*) na prevenção de SREs em pacientes com CRPC metastático assintomático ou minimamente sintomático. O estudo Zometa 039, um estudo randomizado controlado por placebo (69), é um exemplo disso, tendo envolvido 643 pacientes com CRPC metastático assintomático ou minimamente sintomático aos quais foram administrados 4 ou 8 mg de Ácido Zoledrónico a cada 3 semanas durante 15 meses. O tempo verificado até primeiro SRE foi de 423 vs. 321 numa avaliação aos 15 meses, a 488 vs. 321 aos 48 meses, com as taxas de SREs a serem mais baixas para o grupo de tratamento (2,33,34). Este estudo mostrou ainda um grau significativo de palição da dor, assim como aumento da sobrevida global (546 vs. 464 dias). É no

entanto de salientar que durante o decorrer do estudo a dose de Ácido Zoledrónico no grupo ao qual estavam a ser administrados 8 mg foi alterada devido à nefrotoxicidade observada – o tempo de infusão foi alterado de 5 para 15 minutos, e a dose reduzida para 4 mg. Após a realização destas alterações, a incidência desta condição não foi significativamente maior do que a do grupo placebo (4).

Já em relação ao aumento da DMO, vários estudos distintos detetaram efeito benéfico do Ácido Zoledrónico no aumento desta em várias localizações (64).

## **TERAPIA DIRIGIDA À TRÍADE RANK/RANKL/OPG**

### **1) DENOSUMAB**

Anticorpo IgG<sub>2</sub> (*Imunoglobulina G2*) monoclonal totalmente humano administrado por via subcutânea. Usado na terapia relativa à perda de massa óssea causada pela ADT e para prevenção de eventos ósseos em pacientes com metástases ósseas.

Possui um efeito semelhante ao da OPG dada a sua alta afinidade para o RANKL. É capaz de neutralizar e inibir a ativação osteoclástica, com as doses mais elevadas a possuírem uma semivida de mais de 30 dias, o que permite em certas condições uma inibição continuada dos marcadores de turnover ósseo por mais de 6 meses (33). Não é excretado pelo rim (2).

Os efeitos do Denosumab, tal como dos bifosfonatos têm vindo a ser extensamente estudados nas áreas prevenção metastática, prevenção dos SREs, aumento da DMO e palição da dor, existindo inclusive estudos que comparam ambos os grupos de fármacos, abordados mais adiante, tendo inclusivamente sido aprovado para o tratamento de tumores metastáticos ao osso e para o aumento da DMO em pacientes em regime de ADT (4).

### **a) Prevenção de metástases:**

Através do estudo Denosumab 147 (70), pode-se verificar que o Denosumab poderá vir a ser utilizado no aumento da sobrevida livre de metástase, ao contrário de bifosfonatos como o Ácido Zoledrónico, o qual até à data não mostra essa capacidade. Este estudo de fase III, randomizado, controlado por placebo, envolveu 1432 homens com CRPC não metastático em regime de ADT (2–4), com alto risco de metástase associado, definido por  $PSA \geq 8$  e tempo de duplicação do mesmo  $\leq 10$  meses, aos quais foram administrados 120 mg de Denosumab por via subcutânea, a cada 4 semanas. O *endpoint* primário de sobrevivência livre de metástase foi atingido com uma melhoria de 4,2 meses na sobrevida livre de metástase (29,5 vs. 25,2 meses) (28). Adicionalmente, o Denosumab mostrou um efeito de palição dos sintomas significativamente superior ao placebo (9,6 % vs. 13,4 %).

Contudo, e apesar destes resultados extremamente otimistas, o Denosumab não foi ainda aprovado para a prevenção de metástases nesta população por não ter demonstrado impacto na sobrevida global, associado à alta incidência de osteonecrose mandibular verificada (4).

### **b) Prevenção de SREs e aumento da DMO:**

Os efeitos de aumento da DMO identificados por uma série de estudos relativamente ao Denosumab representam uma base para a prevenção da osteopenia e aumento dos SREs associados à ADT.

Um destes estudos, o HALT 38 (*Hormone Ablation Bone Loss Trial 38*) (71), foi um ensaio randomizado, duplamente cego e controlado por placebo que envolveu 1468 homens com CP não metastático em regime de ADT, com risco elevado associado de sofrer um SRE (2,4,34) – definido por idade  $\geq 70$  anos, antecedentes de fratura



osteoporótica ou baixa DMO – aos quais foi administrada uma dose de 60 mg subcutâneos a cada 6 meses durante 3 anos. Como principal *endpoint* apresentava-se o aumento da DMO da coluna lombar, tendo sido atingido aos 24 meses (em todos os subgrupos) com um aumento de 6,7 % nesta localização, 4,8 % na anca e 5,5 % no terço distal do rádio. Adicionalmente verificou-se redução da incidência de novas fraturas vertebrais comparado com o placebo, avaliados aos 36 meses de follow-up (1,5 vs. 3,9%), sem no entanto ser identificada diferença significativa no tempo até primeira fratura (53).

Os efeitos secundários entre o grupo de tratamento e o controlo foram idênticos, à exceção da maior incidência de cataratas no grupo tratado com Denosumab (4,7 % vs. 1,2 %) (34). Não obstante este facto, este estudo permitiu a aprovação do Denosumab no aumento da DMO em pacientes com CP não metastático em regime de ADT e com alto risco de fratura associado.

### **c) DENOSUMAB VS. ÁCIDO ZOLEDRÓNICO**

Postas a descoberto as particularidades de cada um destes compostos, algumas das quais partilhadas por ambos, tornou-se pertinente realizar ensaios de comparação dos dois com o intuito de especificar qual seria mais eficaz em determinadas condições ou populações alvo (2).

O estudo Denosumab 103 (72) teve precisamente esse objetivo em mente, ao comparar o Denosumab ao *standard* do tratamento de CRPC metastático, o Ácido Zoledrónico. Este estudo multicentro, randomizado e duplamente cego obteve a participação de 1904 homens com CRPC metastático, aos quais foram dados 120 mg de Denosumab subcutâneo a cada 4 semanas ou 4 mg de Ácido Zoledrónico intravenoso a

cada 4 semanas. Os principais *endpoints* eram tempo até primeiro SRE e sobrevida global, com os *endpoint* secundários de progressão da doença e severidade da dor.

Comparativamente ao Ácido Zoledrónico, constatou-se que o Denosumab apresentava melhores resultados no tempo até primeiro SRE, com uma média de 20,7 meses comparativamente aos 17,1 do Ácido Zoledrónico. A capacidade de palição da dor a partir da linha de base também pareceu ser maior para o Denosumab (4).

Já em relação à sobrevida global e à taxa de progressão da doença ambos os fármacos se mostraram equivalentes. No que toca à taxa de efeitos secundários, resumido na Tabela 2 (2), os compostos também se mostraram relativamente equivalentes, com a hipocalcémia a surgir mais comumente para o Denosumab (12,8 % vs. 5,8 %), assim como uma tendência não significativa para a maior taxa de osteonecrose da mandíbula (2,3 % vs. 1,3 %).

**Tabela 2.** Comparação dos efeitos secundários entre Denosumab e Ácido Zoledrónico, obtidos pelo estudo Denosumab 103 (adaptada de Cathomas R, Bajory Z, Bouzid M, El Ghoneimy A, Gillissen S, Goncalves F, et al. Management of bone metastases in patients with castration-resistant prostate cancer. Urol Int. 2014;92(4):377–86).

<b>Eventos Adversos</b>	<b>Ácido Zoledrónico 4 mg i.v.</b>	<b>Denosumab 120 mg sc.</b>
<b>Toxicidade renal</b>	+++	+
<b>Náuseas</b>	+	+
<b>Fadiga</b>	+	+
<b>Dor óssea</b>	+	+
<b>Astenia</b>	+	+
<b>Artralgia</b>	+	+
<b>Reações de fase aguda</b>	+++	+
<b>Hipocalcémia</b>	+	++
<b>Osteonecrose da mandíbula</b>	+	++

## **2) RANK-Fc**

O uso desta combinação entre o domínio extracelular recombinante do RANK e o domínio Fc da imunoglobulina tem vindo a ser testado sob a forma de modelos pré-clínicos. Em modelos murinos, a combinação de RANK-Fc com outros fármacos mostrou resultados promissores – a combinação com Docetaxel, surtiu efeito na redução da carga tumoral, mostrando maior eficiência do que o tratamento somente com um ou outro composto. Este efeito na redução da carga tumoral foi igualmente verificado noutro estudo em que o RANK-Fc foi combinado com noguina (inibidor da BMP4), associando-se ainda a atraso da formação de lesões osteolíticas e na diminuição da perda óssea (28).

## **3) OPG-Fc**

Combinação de OPG com o domínio Fc da imunoglobulina.

A administração exclusiva de OPG-Fc em modelos murinos foi capaz de inibir a progressão de lesões osteolíticas com redução da reabsorção óssea e da área tumoral associada. A estes efeitos associam-se os achados de outro estudo de combinação com Docetaxel, no qual não só foi verificada a diminuição da carga tumoral óssea mas também um aumento do tempo médio de sobrevivência em 16,7% quando comparado com o tratamento apenas com Docetaxel (28).

No entanto existem algumas questões que se levantam acerca da utilização da OPG-Fc que podem representar obstáculos à inclusão desta opção no armamentário terapêutico para o CP metastizante, nomeadamente em relação a outras terapias (ex. Denosumab) – estas questões relacionam-se com a possibilidade da génese de anticorpos que provoquem uma reação cruzada anti-OPG-Fc e por conseguinte um rebote na OPG endógena, assim como a possível interferência na ligação da OPG ao

TRAIL (*Tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand*), a qual constitui um importante mecanismo de defesa antitumoral (33).

## **RADIOFÁRMACOS DIRIGIDOS AO OSSO**

Os radiofármacos administrados sistemicamente representam uma boa opção terapêutica no contexto de doença metastática generalizada, não passível de ser tratada eficazmente por radioterapia com feixe externo (27). Estes compostos concentram-se nos locais de metástase osteoblástica, caracterizados pelo elevado turnover e uptake de cálcio, a partir dos quais irradiam a zona envolvente. O modo como atingem estas zonas processa-se por duas vias – se por um lado alguns possuem uma capacidade mímica do cálcio (estrôncio-89 e rádio), outros exercem a sua ação por intermédio da associação com moléculas carregadoras (como o etilenediaminotetramileno - EDTMP), as quais têm tropismo para a hidroxiapatite, quelando-a e permitindo a ação dos radiofármacos junto do osso (rénio-186 e samário-153) (73).

Uma das premissas essenciais no uso destes compostos é a necessidade que o radionucleótido usado possua uma semivida curta o suficiente para não ser nocivo para o ser humano.

Se no passado apenas se encontrava disponível radiação  $\beta$ , nos dias de hoje existe igualmente como opção a radiação  $\alpha$ . A radiação  $\beta$  (dos quais são exemplos o samário-153, rénio-186 e estrôncio-89) foi durante largos anos usada na palição de metástases sintomáticas sendo que no entanto, apresentava uma série de desvantagens – se por um lado a baixa transferência linear de energia reduzia a capacidade de danificar o DNA tumoral, por outro a maior capacidade de penetração (3-11 mm) condicionava muitas das vezes mielossupressão que acabava por limitar a dose terapêutica. Adicionalmente, eram relatados surtos de dor, e tal tratamento nunca se refletiu num aumento da sobrevida – tais efeitos adversos poderiam mesmo condicionar a utilização de outras terapias subsequentes (2,53).

Nos últimos anos a radiação  $\beta$  tem vindo a ser substituída gradualmente e de maneira bem sucedida pela radiação  $\alpha$ , cujas características fazem dela uma escolha superior na grande maioria dos casos – a sua alta energia linear promove quebras eficientes no DNA tumoral, e ao contrário das radiações  $\beta$  possui uma penetração mais limitada, permitindo doses mais altas com menos atingimento medular, diminuindo assim o risco crítico de mielossupressão ou outros efeitos adversos. Um agente  $\alpha$  emissor promissor recentemente focado neste contexto é o Rádio-223. O seu mecanismo de ação é semelhante ao de outros radiofármacos, com o seu carácter mimético do cálcio a condicionar a formação de complexos com a hidroxiapatite óssea exposta em locais de elevado turnover (53).

O estudo ALSYMPCA (*Alpharadin in Symptomatic Prostate Cancer*), um estudo multicentro, randomizado, duplamente cego e controlado por placebo (74) avaliou a eficácia do Rádio-223, envolvendo 921 homens com CRPC metastático (alguns dos quais com tratamento prévio com Docetaxel associado) – outras características dos doentes passavam pela existência de pelo menos 2 metástases ósseas, dor óssea que necessitasse de analgesia recorrente ou palição radioterapêutica da dor e ainda a ausência de metástases viscerais (73).

Este radiofármaco mostrou uma série de efeitos benéficos, cumprindo os *endpoints* estabelecido pelo estudo, mostrando ser o único que refletiu aumento da sobrevida global, obtendo melhoria de cerca de 3,6 meses (14,9 % vs. 11,3 %). Verificou-se ainda a redução em cerca de 30% do risco de morte (efeito observado em todos os subgrupos), melhoria da qualidade de vida dos pacientes medida com o questionário FACT-P (*Functional Assessment of Cancer Therapy-Prostate* - 25% vs. 16 %), prolongamento do tempo até SREs (15,6 vs. 9,8 meses) (73) e na redução dos níveis séricos de PSA e FA (*Fosfatase alcalina*).

Evidenciou-se ainda uma baixa taxa de complicações decorrentes e diretamente atribuíveis a mielossupressão, com outros efeitos adversos a serem inclusivamente mais comuns no grupo placebo (à exceção de diarreia, náuseas, vômitos e edemas periféricos, mais comuns no grupo de tratamento).

Os resultados positivos deste estudo permitiram a sua aprovação em 2013 para o tratamento de pacientes com CRPC metastático para o osso após tratamento com Docetaxel, ou pacientes sem condições para quimioterapia (28), abrindo igualmente novas linhas de investigação no sentido de discernir se a eficácia pode ser aumentada mantendo o perfil de efeitos secundários, através da duplicação ou triplicação da dose ou do aumento do número de ciclos.

## INIBIÇÃO DA BIOSÍNTESE DE ANDROGÉNIOS E O SEU PAPEL NO TRATAMENTO DE METÁSTASES ÓSSEAS

### 1) ABIRATERONA

O seu mecanismo de ação baseia-se na inibição da CYP17 (*Citocromo P450 17*), que por sua vez resulta na inibição da produção de androgénios (53). O seu uso está aprovado em pacientes com CRPC metastático, num contexto de pré e/ou pós Docetaxel. A sua aprovação surgiu com base nos estudos COU-AA-301 e COU-AA-302 (*Cougar–Abiraterone Acetate–Study 301 e 302*) (34,53,73).

O estudo COU-AA-301 (75) foi um estudo multinacional, randomizado, duplamente cego controlado por placebo que envolveu pacientes 1195 com CRPC metastático após quimioterapia, ao administrar uma dose de Abiraterona juntamente com prednisona, ou uma dose de placebo com prednisona (73). Este cumpriu o *endpoint* primário associando-se a aumento da sobrevida global (14,8 vs. 10,9 meses), tendo ainda sido constatado um aumento do tempo até SREs (25 vs. 23,3 meses), sendo que no entanto não houve alterações da proporção de pacientes a sofrer SREs.

Já o estudo COU-AA-302 (76) foi igualmente um estudo multinacional, randomizado, duplamente cego controlado por placebo que envolveu 1088 homens com CRPC sem terem ainda sido sujeitos a quimioterapia, tendo como *endpoints* primários a sobrevida livre de doença e o tempo até progressão radiográfica (73). Apesar deste último ponto ter sido cumprido (16,5 vs. 8,3 meses), o impacto na sobrevida só foi evidente ao comparar o tipo de tratamento concomitante associado – comparando os doentes tratados com um agente dirigido ao osso e os tratados com Ácido Zoldedronico, constatou-se que houve uma melhoria estatisticamente significativa na sobrevida global no grupo tratado com agentes dirigidos ao osso (34).



## 2) ENZALUTAMIDA

O alvo terapêutico deste composto é a via de sinalização do recetor androgénico, interferindo em vários pontos da sua regulação (53).

O seu uso está aprovado em pacientes com CRPC metastático, após terapia com Docetaxel, no rescaldo dos estudos de fase III AFFIRM e PREVAIL (34,53,73).

O estudo AFFIRM (77), um estudo duplamente cego controlado por placebo envolveu 1199 homens com CRPC metastático (incluindo localizações extra-ósseas) num contexto de pós-quimioterapia, aos quais foram administrados 160mg de Enzalutamide diários. O *endpoint* primário do estudo era o aumento da sobrevida global, tendo este sido cumprido (18,4 vs. 13,6 meses). Outros dos *endpoint* relacionava-se com o tempo até primeiro SRE, sendo quer mais uma vez o Enzalutamide se mostrou superior ao placebo (16,7 vs. 13,3 meses). Adicionalmente mostrou superioridade em relação ao placebo na redução da dor e da analgesia, assim como no tempo de progressão da dor.

Já o estudo PREVAIL (78), um estudo randomizado, duplamente cego, controlado por placebo envolveu 1717 homens com CRPC metastático (incluindo metástases extra-óssea) previamente a quimioterapia, aos quais foram administrados 160 mg de Enzalutamide diários, com os *endpoints* de sobrevivência livre de progressão e sobrevida global. A sobrevivência livre de progressão foi largamente superior a favor do Enzalutamide (65 % vs. 14 % aos 12 meses), sendo que foi igualmente obtido um aumento na sobrevida global (32,4 vs. 30,2 meses). O estudo cumpriu igualmente os *endpoints* secundários de tempo até início da quimioterapia e tempo até primeiro SRE.

Atualmente encontra-se em andamento um estudo de fase III que irá avaliar a capacidade preventiva de metástases do Enzalutamide em pacientes com CRPC não metastático (34).

## CONCLUSÃO

A melhor abordagem da metastização neoplásica será sempre foco de grande debate, quer se trate num contexto de cancro da próstata ou fora dele – apesar de atualmente consistir na grande maioria das vezes de um conjunto de tratamentos *end-of-line* de carácter paliativo, assentes na sua maioria na ação citotóxica que possuem na célula tumoral, foram já identificados passos e intervenientes no processo metastático e pré-metastático passíveis de serem tidos como alvo quer na prevenção quer na gestão da patologia metastática.

A metastização de qualquer neoplasia, neste caso da próstata na sua localização óssea, é análoga à de uma bola de neve a rolar através de uma encosta que aumenta de tamanho quer no seu sentido literário, com aumento da massa neoplásica, como no sentido lato, por intermédio do conjunto de processos sinérgicos e aditivos que provocam alterações não só no comportamento das células neoplásicas como nas células e microambiente geral na sua proximidade.

Este processo inicia-se na própria próstata – se por um lado a base celular em si pode já possuir um grau de suscetibilidade genética ao desenvolvimento de neoplasia, por outro a maioria destas alterações genético-fenotípicas surgem por intermédio de alterações cumulativas e aditivas inerentes ao ciclo celular, e que acontecem ao longo da vida útil destas e dos seus clones. É a partir desta base de potencial metastático que as células adquirem um conjunto de características que lhes são favoráveis e permitem a sua sobrevivência aberrante, com auxílio de pressões exercidas não só pelo microambiente mas também por fatores extrínsecos (como por exemplo, terapias anti-neoplásicas).

É nesta primeira fase de pré-metástase que se deve abordar agressivamente o tumor, interrompendo os seus mecanismos de auto-alimentação e cortando o suprimento

de fatores de crescimento provenientes do estroma. Um destes pontos fulcrais é a capacidade de neo-angiogénese e linfangiogénese tumoral – ao estimular estes eventos, o tumor está não só a criar uma rede de rico aporte nutritivo, como a providenciar uma porta de entrada fácil na circulação. O problema em focar terapêuticamente estes fenómenos surge precisamente devido à importância que desempenha no desenvolvimento tumoral, sendo talvez das etapas mais importantes no desenvolvimento tumoral – como tal, possui um maior número de vias de sinalização paralelas e com maior número de sub-vias redundantes que estabelecem *cross-talks* entre elas, com um grande número de compostos associados a atuar em uníssono. A via do VEGF é sem dúvida o exemplo mais importante nesse contexto, mas como se pôde constatar, outras moléculas como o PDGF, IGF e FGF parecem ter igualmente um papel neste fenómeno, algumas com maior preponderância que outras, mas cuja soma das partes contribui grandemente para a eficácia da via do VEGF na criação de neovasculatura.

Em estreita colaboração com esta capacidade, encontra-se a capacidade tumoral de adquirir mobilidade e concomitantemente progredir através do compartimento estromal até ao endotélio dos vasos – de modo a interromper esta movimentação aberrante, torna-se essencial prevenir um dos processos chave identificados, a transição epitélio mesenquimal, que dota as células do CP de capacidade móvel através de uma modulação das ligações célula-célula e célula-matriz, favorável ao ganho de mobilidade características de células da linha mesenquimal – também esta etapa parece ter como adjuvantes vários intervenientes, incluindo moléculas de adesão membranares e um grande número e classes de proteases (MMPs, u-PA, catepsinas, entre outras), estas últimas a propiciarem a progressão do tumor exercendo não uma influência direta na modulação das ligações intermembranares que estabelece com a sua vizinhança, mas

sim através da “desobstrução” física de obstáculos sob a forma de componentes matriciais que surjam durante a travessia do tumor desde o seu local de origem até à rampa de lançamento para a disseminação à distância – para além do mais, algumas destas como a u-PA e o PSA possuem ainda funções na clivagem e ativação de certos fatores de crescimento, permitindo a sua função pró-tumoral.

É nesta altura de disseminação à distância eminente que a verdadeira capacidade metastática das células neoplásicas é posta à prova, com grande parte dos clones metastáticos a serem suprimidos por não possuírem mecanismos de sobrevivência necessários para resistirem ao stress circulatório. Contrariamente, outros possuem uma série de características que lhes permitem perdurar e proceder ao processo de intra e extravasamento, auxiliado por processos quimiotáticos (eixo CXCR-CXCL, recetores de cálcio, fontes lipídicas) que só recentemente têm vindo a ser identificados. Aquando da chegada aos vasos medulares, estão envolvidos ainda processos de “*Dock & Lock*” e de “*rolling-and-adhesion cascade*”, que por intermédio de moléculas de adesão permitem a adesão da célula metastática seguindo-se um processo de migração transendotelial.

Adicionalmente, sabe-se hoje que mesmo antes de abandonar a próstata, as células tumorais podem exercer um efeito de *priming* à distância no ambiente medular – alguns dos intervenientes deste processo como as HSCs e as ESCs (e mesmo moléculas como a própria PTHrP) já foram identificados, e torna-se essencial realizar mais estudos neste campo de modo a identificar e bloquear compostos adicionais que modulem o ambiente medular mesmo antes da chegada dos primeiros colonos metastáticos.

Por sua vez, dada a chegada à medula, muitos dos fatores de crescimento e proteases que determinaram a progressão tumoral na sua localização primária são transponíveis ao ambiente ósseo, com adição de um dínamo fundamental – o ciclo

vicioso de metástase óssea. Este constitui o principal *drive* tumoral, com as células tumorais e estabelecerem interações com osteoclastos, osteoblastos e células estromais que permitem a libertação de fatores de crescimento encarcerados na matriz - têm sido propostas variadas soluções a nível da interrupção deste ciclo, com especial foco na limitação da atividade osteoclástica e na modulação do equilíbrio RANKL/OPG.

Ainda outra via promotora de crescimento é a do AR, a qual não obstante o sucesso inicial da sua inibição na redução da progressão tumoral, evolui inexoravelmente para um tumor resistente ao tratamento. Alguns destes mecanismos de resistência conseguidos através de estimulação aberrante desse recetor na ausência de androgénios têm vindo a ser identificados – notavelmente, as vias de muitos dos fatores de crescimento associados à evolução tumoral parecem estabelecer relações de *cross-talk* com estas vias alternativas, sendo que futuramente se abrem portas à perspetiva da criação de compostos com efeito duplo, privando simultaneamente o tumor da ação pró-tumoral dos seus fatores de crescimento e do efeito exercido pela ativação anormal dos ARs – atualmente, existem já opções com efeito sobre o AR (ao invés de privação androgénica exclusiva) que mostraram efeitos promissores.

Apesar de a complexidade das interações tumor-microambiente envolverem uma série de diferentes fatores de crescimento com funções heterogéneas e dependentes da etapa da cascata metastática na qual o tumor se encontra, existe a perspetiva de no futuro novos fármacos anti-fatores de crescimento serem utilizados, em conjunto com as opções terapêuticas já vigentes, de maneira a que sinergicamente seja possível aumentar a sobrevida dos doentes com doença metastática.

No entanto, até ao advento e aprovação desses fármacos, é necessário debelar os sintomas decorrentes não só da evolução tumoral mas também decorrentes das próprias terapias utilizadas, nomeadamente da ADT, pois o seu sucesso acarreta um conjunto de

sintomatologias secundárias deletéria que pode ter tanto impacto como a sintomatologia proveniente da patologia tumoral em si. Com esse intuito foram até hoje desenvolvidos e aprovados fármacos a utilizar em tais casos, sendo exemplos disso o Denosumab e o Ácido Zoledrónico, ambos com efeito no aumento da DMO e diminuição dos SREs, os quais constituem consequências secundárias à ADT. Existe já um estudo de fase III comparativo acerca dos papéis destes dois fármacos, e o futuro abre portas à realização de mais ensaios que permitam aferir as indicações clínicas específicas de cada um dos fármacos, gizando diretrizes que favoreçam o uso de um em favor do outro (ou até uma junção de ambos) em contextos específicos.

Em suma, no tratamento de doença metastática torna-se essencial não só a terapia citotóxica dirigida às células metastáticas já presentes nas localizações ósseas – reveste-se de igual importância atingir os mecanismos de auto-alimentação já identificados, os quais muitas vezes são partilhados entre a célula e o seu meio envolvente. A morbidade inerente ao CP advém assim não só da atividade disruptiva das células metastáticas – é igualmente fruto das interações que estas estabelecem com as células vizinhas e respetiva matriz onde estão inseridas, que não sendo necessariamente fenotipicamente anormais são coagidas e influenciadas à produção de compostos pró-tumorais.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Emami KH, Corey E. When prostate cancer meets bone: Control by wnts. *Cancer Lett.* 2007;253(2):170–9.
2. Cathomas R, Bajory Z, Bouzid M, El Ghoneimy A, Gillessen S, Goncalves F, et al. Management of bone metastases in patients with castration-resistant prostate cancer. *Urol Int.* 2014;92(4):377–86.
3. Briganti A, Suardi N, Gallina A, Abdollah F, Novara G, Ficarra V, et al. Predicting the risk of bone metastasis in prostate cancer. *Cancer Treat Rev* [Internet]. 2014;40(1):3–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ctrv.2013.07.001>
4. Saylor PJ, Lee RJ, Smith MR. Emerging therapies to prevent skeletal morbidity in men with prostate cancer. *J Clin Oncol.* 2011;29(27):3705–14.
5. Li J, Guillebon a D, Hsu J, Barthel SR, Dimitroff CJ, Lee Y-F, et al. Human fucosyltransferase 6 enables prostate cancer metastasis to bone. *Br J Cancer* [Internet]. 2013;109(12):3014–22. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3859952&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
6. Bishr M, Saad F. Preventing bone complications in prostate cancer. *Curr Opin Support Palliat Care* [Internet]. 2012;6(3):299–303. Available from: <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed11&NEWS=N&AN=22871982>
7. Miñana B, Cózar JM, Alcaraz A, Morote J, Gómez-Veiga FJ, Solsona E, et al. Salud ósea en pacientes con cáncer de próstata. *Actas Urológicas Españolas* [Internet]. 2014;38(10):685–93. Available from:



<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0210480614001715>

8. Nguyen DP, Li J, Tewari AK. Inflammation and prostate cancer: The role of interleukin 6 (IL-6). *BJU Int*. 2014;113(6):986–92.
9. Msaouel P, Pissimissis N, Halapas A, Koutsilieris M. Mechanisms of bone metastasis in prostate cancer: clinical implications. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2008;22(2):341–55. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1521690X08000122>
10. Ye L, Kynaston H, WG J. Bone metastasis in prostate cancer: molecular and cellular mechanisms. *Int J Mol Med*. 2007;20:103–11.
11. Patel LR, Camacho DF, Shiozawa Y, Pienta KJ, Taichman RS. Mechanisms of cancer cell metastasis to the bone: a multistep process. *Futur Oncol*. 2011;7(11):1285–97.
12. Campbell GM, Kyprianou N. Epithelial mesenchymal transition (EMT) in prostate growth and tumor progression. *Transl Androl Urol*. 2013;2(3):202–11.
13. Ganguly SS, Li X, Miranti CK. The Host Microenvironment Influences Prostate Cancer Invasion, Systemic Spread, Bone Colonization, and Osteoblastic Metastasis. *Front Oncol* [Internet]. 2014;4:1–16. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4266028&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
14. Clarke NW, Hart C a, Brown MD. Molecular mechanisms of metastasis in prostate cancer. *Asian J Androl*. 2009;11(1):57–67.
15. Corn PG. The tumor microenvironment in prostate cancer: Elucidating molecular pathways for therapy development. *Cancer Manag Res*. 2012;4(1):183–93.

16. Elżbieta Ł, Anioł J. Neoangiogenesis in prostate cancer. *Wspolczesna Onkol.* 2013;17(3):229–33.
17. Chappard D, Bouvard B, Baslé MF, Legrand E, Audran M. Bone metastasis: Histological changes and pathophysiological mechanisms in osteolytic or osteosclerotic localizations. A review. *Morphologie [Internet]*. 2011;95(309):65–75. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.morpho.2011.02.004>
18. Li Y, Cozzi PJ. Angiogenesis as a Strategic Target for Prostate Cancer Therapy. *Med Res Rev.* 2009;30(1):23–66.
19. Kluetz PG, Figg WD, Dahut WL. Angiogenesis Inhibitors in the treatment of Prostate Cancer. *Expert Opin Pharmacother.* 2010;11(2):233–47.
20. Arnold RS, Fedewa SA, Goodman M, Osunkoya AO, Kissick HT, Morrissey C, et al. Bone metastasis in prostate cancer: Recurring mitochondrial DNA mutation reveals selective pressure exerted by the bone microenvironment. *Bone [Internet]*. 2015;78:81–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2015.04.046>
21. Zheng Y, Zhou H, Dunstan CR, Sutherland RL, Seibel MJ. The role of the bone microenvironment in skeletal metastasis. *J Bone Oncol [Internet]*. 2013;2(1):47–57. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbo.2012.11.002>
22. Coleman RE. Adjuvant bone-targeted therapy to prevent metastasis: lessons from the AZURE study. *Curr Opin Support Palliat Care.* 2012;6(3):322–9.
23. Nayir E. Pathogenesis of bone metastasis. *J Oncol Sci.* 2015;1–4.
24. Rahim F, Hajizamani S, Mortaz E, Ahmadzadeh A, Shahjahni M, Shahrabi S, et al. Molecular Regulation of Bone Marrow Metastasis in Prostate and Breast

- Cancer. Bone Marrow Res. 2014;2014.
25. Kakhki VRD, Anvari K, Sadeghi R, Mahmoudian AS, Torabian-Kakhki M. Pattern and distribution of bone metastases in common malignant tumors. *Nucl Med Rev.* 2013;16(2):66–9.
  26. Papachristou DJ, Basdra EK, Papavassiliou AG. Bone Metastases: Molecular Mechanisms and Novel Therapeutic interventions. *Med Res Rev.* 2010;32(3):611–36.
  27. Pinski J, Dorff TB. Prostate cancer metastases to bone: Pathophysiology, pain management, and the promise of targeted therapy. *Eur J Cancer.* 2005;41(6):932–40.
  28. 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 [Internet].* 2014;40(6):730–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ctrv.2014.04.003>
  29. Safriadi F. Bone metastases and bone loss medical treatment in prostate cancer patients. *Acta Med Indones.* 2013;45(1):76–80.
  30. Gruber R. Reader's digest of the pathophysiology of bone metastases. *Wiener Medizinische Wochenschrift.* 2012;162(17-18):370–3.
  31. Bonfil RD, Chinni S, Fridman R, Kim HR, Cher ML. Proteases, growth factors, chemokines, and the microenvironment in prostate cancer bone metastasis. *Urol Oncol Semin Orig Investig.* 2007;25(5):407–11.
  32. Saylor PJ, Smith MR. Bone Health and Prostate Cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2010;13(1):20–7.
  33. Lee RJ, Saylor PJ, Smith MR. Treatment and prevention of bone complications

- from prostate cancer. *Bone* [Internet]. 2011;48(1):88–95. Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2010.05.038>
34. Gartrell B, Saad F. Managing bone metastases and reducing skeletal related events in prostate cancer. *Nat Rev Clin Oncol* [Internet]. 2014;11(6):335–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24821212>
  35. Sottnik JL, Keller ET. Understanding and targeting osteoclastic activity in prostate cancer bone metastases. *Curr Mol Med*. 2013;13(4):626–39.
  36. 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* [Internet]. 2011;208(13):2641–55. Available from: <http://jem.rupress.org/content/208/13/2641.long>
  37. Kingsley L a, Fournier PGJ, Chirgwin JM, Guise TA. Molecular biology of bone metastasis. *Mol Cancer Ther* [Internet]. 2007;6(10):2609–17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17938257>
  38. Heldin C-H. Targeting the PDGF signaling pathway in tumor treatment. *Cell Commun Signal* [Internet]. 2013;11(97). Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3878225&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
  39. Iqbal S, Zhang S, Driss A, Liu ZR, Kim HRC, Wang Y, et al. PDGF upregulates Mcl-1 through activation of  $\beta$ -catenin and HIF-1 $\alpha$ -dependent signaling in human prostate cancer cells. *PLoS One*. 2012;7(1).
  40. Ostman A, Heldin CH. PDGF Receptors as Targets in Tumor Treatment. *Adv Cancer Res*. 2007;97(6):247–74.

41. Lima G a B, Corrêa LL, Gabrich R, Miranda LCD De, Gadelha MR. IGF-I, insulin and prostate cancer. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2009;53(8):969–75.
42. Wu J, Yu E. Insulin-like growth factor receptor-1 (IGF-IR) as a target for prostate cancer therapy. *Cancer Metastasis Rev* [Internet]. 2014;33(2-3):607–17. Available from:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4096322&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
43. Lee GT, Kang DI, Ha Y-S, Jung YS, Chung J, Min K, et al. Prostate cancer bone metastases acquire resistance to androgen deprivation via WNT5A-mediated BMP-6 induction. *Br J Cancer* [Internet]. 2014;110(6):1634–44. Available from:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3960605&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
44. Spanjol J, Djordjevic G, Markic D, Klaric M, Fuckar D, Bobinac D. Role of bone morphogenetic proteins in human prostate cancer pathogenesis and development of bone metastases: immunohistochemical study. *Coll Antropol.* 2010;34(2):119–25.
45. Morrissey C, Brown LG, Pitts TEM, Vessella RL, Corey E. Bone morphogenetic protein 7 is expressed in prostate cancer metastases and its effects on prostate tumor cells depend on cell phenotype and the tumor microenvironment. *Neoplasia* [Internet]. 2010;12(2):192–205. Available from:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2814357&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
46. Botelho F, Pina F, Silva P, Figueiredo G, Cruz F, Lunet N. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and prostate pathology. *Int Braz J Urol.* 2010;36(4):430–8.

47. Roberts E, Cossigny D a F, Quan GMY. The Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Metastatic Prostate Cancer to the Skeleton. *Prostate Cancer* [Internet]. 2013;2013. Available from:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3874956&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
48. Bender RJ, Mac Gabhann F. Dysregulation of the vascular endothelial growth factor and semaphorin ligand-receptor families in prostate cancer metastasis. *BMC Syst Biol* [Internet]. 2015;9(1):55. Available from:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4559909&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
49. Coleman RE, Lipton A, Roodman GD, Guise TA, Boyce BF, Brufsky AM, et al. Metastasis and bone loss: Advancing treatment and prevention. *Cancer Treat Rev*. 2011;36(8):615–20.
50. Corn PG, Wang F, McKeehan WL, Navone N. Targeting fibroblast growth factor pathways in prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2013;19(21):5856–66.
51. Valta MP, Tuomela J, Bjartell A, Valve E, Väänänen HK, Härkönen P. FGF-8 is involved in bone metastasis of prostate cancer. *Int J Cancer*. 2008;123(1):22–31.
52. Carducci MA, Jimeno A. Targeting bone metastasis in prostate cancer with endothelin receptor antagonists. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2006;12(20):6296–300. Available from:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17062717](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17062717)
53. Albany C, Hahn NM. Novel bone-targeting agents in prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis* [Internet]. 2014;17:112–8. Available from:

- <http://dx.doi.org/10.1038/pcan.2014.12>
54. Culig Z, Puhf M. Interleukin-6: A multifunctional targetable cytokine in human prostate cancer. *Mol Cell Endocrinol* [Internet]. 2012;360(1-2):52–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2011.05.033>
  55. Ara T, DeClerck YA. Interleukin-6 in Bone Metastasis and Cancer Progression. *Eur J Cancer*. 2010;46(7):1223–31.
  56. Soki FN, Park SI, McCauley LK. The multifaceted actions of PTHrP in skeletal metastasis. *Future Oncol* [Internet]. 2012;8(7):803–17. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3566558&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
  57. Zheng Y, Basel D, Chow SO, Fong-Yee C, Kim S, Buttgerit F, et al. Targeting IL-6 and RANKL signaling inhibits prostate cancer growth in bone. *Clin Exp Metastasis*. 2014;31(8):921–33.
  58. Gong Y, Chippada-Venkata UD, Oh WK. Roles of matrix metalloproteinases and their natural inhibitors in prostate cancer progression. *Cancers (Basel)*. 2014;6(3):1298–327.
  59. Nalla AK, Gorantla B, Gondi CS, Lakka SS, Rao JS. Targeting MMP-9, uPAR, and cathepsin B inhibits invasion, migration and activates apoptosis in prostate cancer cells. *Cancer Gene Ther* [Internet]. Nature Publishing Group; 2010;17(9):599–613. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/cgt.2010.16>
  60. Mattsson JM, Ravela S, Hekim C, Jonsson M, Malm J, N??rv??nen A, et al. Proteolytic activity of prostate-specific antigen (PSA) towards protein substrates and effect of peptides stimulating PSA activity. *PLoS One*. 2014;9(9).

61. Niu Y, Yeh S, Miyamoto H, Li G, Altuwaiji S, Yuan J, et al. Tissue prostate specific antigen (PSA) facilitates refractory prostate tumor progression via enhancing ARA70-regulated androgen receptor transactivation. *Cancer Res.* 2008;68(17):7110–9.
62. Lebeau AM, Kostova M, Craik CS, Denmeade SR. Prostate-specific antigen: An overlooked candidate for the targeted treatment and selective imaging of prostate cancer. *Biol Chem.* 2010;391(4):333–43.
63. Varkaris A, Katsiampoura AD, Araujo JC, Gallick GE, Corn PG. Src signaling pathways in prostate cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2014;33(2-3):595–606.
64. Egerdie B, Saad F. Bone health in the prostate cancer patient receiving androgen deprivation therapy: a review of present and future management options. *Can Urol Assoc J [Internet].* 2010;4(2):129–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20368898>
65. Yin J, Liu Y-N, Tillman H, Barrett B, Hewitt S, Ylaya K, et al. AR-Regulated TWEAK-FN14 Pathway Promotes Prostate Cancer Bone Metastasis. *Cancer Res [Internet].* 2014;74(16):4306–17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24970477>
66. Daubine F, LE Bot R, Marquez M, Nilsson S, Schroder T, Holmberg AR. Treatment of bone metastasis in prostate cancer: efficacy of a novel polybisphosphonate. *Anticancer Res.* 2011;31(12):4141–6.
67. Smith MR, Kabbinavar F, Saad F, Hussain A, Gittelman MC, Bilhartz DL, et al. Natural history of rising serum prostate-specific antigen in men with castrate nonmetastatic prostate cancer. *J Clin Oncol.* 2005;23(13):2918–25.



68. Wirth M, Tammela T, Cicalese V, Gomez Veiga F, Delaere K, Miller K, et al. Prevention of bone metastases in patients with high-risk nonmetastatic prostate cancer treated with zoledronic acid: Efficacy and safety results of the zometa european study (ZEUS). *Eur Urol* [Internet]. 2015;67(3):482–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eururo.2014.02.014>
69. Saad F, Gleason DM, Murray R, Tchekmedyian S, Venner P, Lacombe L, et al. A Randomized, Placebo-Controlled Trial of Zoledronic Acid in Patients With Hormone-Refractory Metastatic Prostate Carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 2002;94(19):1458–68.
70. Smith MR, Saad F, Coleman R, Shore N, Fizazi K, Miller K, et al. Denosumab and Bone Metastasis-Free Survival in Men With Castration-Resistant Prostate Cancer: Results of a Global Phase 3, Randomised, Placebo-Controlled Trial. *Lancet*. 2012;379(9810):39–46.
71. Smith MR, Egerdie B, Toriz NH, Feldman R, Tammela TL, Saad F, et al. Denosumab in Men Receiving Androgen-Deprivation Therapy for Prostate Cancer. *N Engl J Med*. 2009;361(8):745–55.
72. Fizazi K, Carducci M, Smith M, Damião R, Brown J, Karsh L, et al. Denosumab versus zoledronic acid for treatment of bone metastases in men with castration-resistant prostate cancer: a randomised, double-blind study. *Lancet* [Internet]. 2011;377(9768):813–22. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3090685&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
73. Ito T, Bilusic M, Chen D. Targeted radionuclides for prostate cancer bone metastases. *Urol Oncol Semin Orig Investig* [Internet]. 2015;33(1):2–6.

Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1078143914002919>

74. Parker C, Nilsson S, Heinrich D, Helle SII, O'Sullivan JMM, Fosså SDD, et al. Alpha emitter radium-223 and survival in metastatic prostate cancer. *N Engl J Med* [Internet]. 2013;369(3):213–23. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa1213755> \n <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23863050>
75. Bono JS De, Logothetis CJ, Molina A, Fizazi K, North S, Chu L, et al. Abiraterone and Increased Survival in Metastatic Prostate Cancer. *N Engl J Med*. 2011;364(21):1995–2005.
76. Ryan CJ, Smith MR, de Bono JS, Molina A, Logothetis CJ, de Souza P, et al. Abiraterone in metastatic prostate cancer without previous chemotherapy. *N Engl J Med* [Internet]. 2013;368(2):138–48. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3683570&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
77. Scher HI, Fizazi K, Saad F, Taplin M-E, Sternberg CN, Miller K, et al. Increased Survival with Enzalutamide in Prostate Cancer after Chemotherapy. *N Engl J Med* [Internet]. 2012;367(13):1187–97. Available from: <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1207506> \n <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa1207506> \n <http://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJMoa1207506>
78. Beer TM, Armstrong AJ, Rathkopf DE, Loriot Y, Sternberg CN, Higano CS, et al. Enzalutamide in metastatic prostate cancer before chemotherapy. *N Engl J Med* [Internet]. 2014;371(5):424–33. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4418931&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

