

Conteúdo

Resumo.....	2
1. Introdução	4
2. Materiais e Métodos.....	7
3. O Osso como Tecido Alvo de Metastização.....	8
4. O Cancro da Próstata	12
4.1. Diagnóstico e Estadiamento	12
4.2. Tratamento.....	13
4.3. Prognóstico	16
5. A metastização do Cancro da Próstata.....	18
5.1. EMT (transição epitélio-mesênquima)	18
5.2. Invasão Local e Extravasamento	19
5.3. Disseminação.....	22
5.4. Quimiotaxia	24
5.5. Invasão e colonização do Osso	25
5.6. Dormência	27
6. A Doença Óssea Metastática do Cancro da Próstata	31
6.1. <i>Osteomimicry</i>	32
6.2. Nicho Metastático	33
6.3. O ciclo vicioso.....	35
6.4. Microambiente Ósseo e Tumoral	37
6.5. Hipóxia e Stress Oxidativo.....	44
7. CRPC (<i>Castrate Resistant Prostate Cancer</i>).....	45
8. Moléculas Intervenientes mais Relevantes	48
9. Perspetivas Futuras	54
9.1. Diagnóstico e Prognóstico	54
9.2. Tratamento.....	55
10. Conclusão	59
11. Lista de Acrónimos	60
12. Referências Bibliográficas	64

Resumo

A metastização óssea é um processo de elevada relevância clínica, dada a sua prevalência e contribuição significativa para a morbidade e mortalidade associadas às neoplasias que metastizam preferencialmente para o osso. Os carcinomas do pulmão, mama, rim e próstata partilham entre si o facto de se encontrarem entre os tumores primários mais frequentes com propensão para disseminar para o osso. O resultado deste facto é a elevada relevância do estudo do osso como um tecido alvo para a metastização e o surgimento subsequente de novas áreas científicas como a osteooncologia e osteoimunologia, que têm direcionado os investigadores para o estudo da interação entre as células tumorais e as células do osso. No caso concreto do Carcinoma da Próstata, abordado com mais detalhe neste artigo, a compreensão das bases moleculares e fisiopatológicas destes mecanismos tem ajudado a enfrentar os desafios clínicos da presença destas lesões, criando soluções que envolvem a produção e aplicação de novos agentes terapêuticos. Com efeito, este conhecimento poderá ajudar a melhorar o prognóstico e o tratamento desta doença, permitindo a melhoria das condições de vida de doentes cuja única opção se resumiu, nos últimos anos, à gestão paliativa do seu quadro clínico. Este trabalho pretende ser uma revisão sistemática da informação mais recente produzida neste âmbito, procurando clarificar os mecanismos fisiopatológicos subjacentes à disseminação, fixação e formação de metástases ósseas do Carcinoma da Próstata.

Palavras-chave: Neoplasia da Próstata; Metastização óssea; Lesões Osteoblásticas;

Tratamento do Cancro da Próstata;

Abstract

Bone metastasis is a process of high clinical relevance, given its prevalence and significant contribution to morbidity and mortality associated to cancers disseminated through this course. Lung, breast and prostate cancer share between them the fact that they are some of the most frequent primary tumors, as well as their tendency to spread and create metastatic lesions in bone. The result is the high relevance of studying bone as a metastatic tissue and the rising of subsequent new designations such as osteoncology and osteoimmunology, which have been leading investigators in the study of interactions between tumor and bone cells. In Prostate Cancer, detailed in this article, the comprehension of molecular and pathophysiological basis of these mechanisms has been helpful in facing the clinical challenges involved by the presence of these lesions, creating solutions that involve the production and application of new therapeutic agents. This knowledge may help to improve prognostic and treatment of this disease, allowing to ameliorate well-being and life expectancy of patients whose only option, in the last few years, was the palliative management of their clinical course. This work intends to be a systematic review of the most recent scientific information produced in this context, seeking to clarify the pathophysiological mechanisms underlying dissemination, homing and formation of bone metastases in Prostate Cancer.

Keywords: Prostate neoplasm; Bone metastasis; Osteoblastic lesions; Prostate Cancer
Treatment

1. Introdução

O Carcinoma da Próstata (PCa) é o carcinoma mais frequentemente detetado no sexo masculino nos países desenvolvidos, estimando-se que em 2016 surjam 180 890 novos casos de carcinoma da próstata só nos Estados Unidos, e que este seja responsável por 26 120 novas mortes este ano. A importância do seu estudo é reforçada pelo facto de que mais de 90% dos homens com idade acima dos 70 anos apresentam cancro da próstata histológico [1] (ou seja, nem sempre clinicamente significativo) e que, quando em estado avançado, apresenta metástases ósseas em 70% dos casos [2]. Espera-se assim que, com o envelhecimento da população, a sua incidência continue a aumentar no futuro [3], reforçando a necessidade de investigação nesta área. Nos países desenvolvidos, o diagnóstico do PCa é geralmente feito num estágio precoce da doença através de uma biópsia prostática ecoguiada realizada após elevação do PSA (*Prostate Specific Antigen*) e/ou um exame retal clinicamente suspeito. Nestas situações, as taxas de sobrevivência para a doença localizada atingem os 99,5% em 10 anos, mas reduzem drasticamente para 19% no mesmo período de tempo se a doença for diagnosticada já disseminada. Apesar das estatísticas, atualmente nos Estados Unidos a percentagem de doentes diagnosticados inicialmente com doença metastizada está a aumentar em virtude da renitência na avaliação dos valores do PSA por parte dos médicos de clínica geral. As alternativas disponíveis atualmente para tratamento do PCa localizado, têm grande impacto na sobrevivência dos doentes e incluem cirurgia, radioterapia externa ou braquiterapia. A escolha da melhor opção em cada caso depende de vários fatores que têm em conta características do tumor e do doente e sua situação clínica [4].

Para que o processo de metastização para o osso seja bem-sucedido, as células neoplásicas necessitam de se destacar do tecido de origem, sobreviver em circulação e invadir e fixar-se na medula óssea de forma eficaz. Uma vez que este mecanismo depende da intervenção de vários fatores (por exemplo moléculas de adesão, fatores de crescimento e

fatores angiogénicos), nem todas as células que se destacam do tumor primitivo formam metástases à distância [5].

No que diz respeito ao PCa, o conhecimento atual acerca dos mecanismos fisiopatológicos intervenientes na formação de metástases ósseas, ainda amplamente limitado, vai ao encontro da teoria proposta por Paget (*seed and soil*) no início do século XX, segundo a qual as células metastizam para um tecido específico porque têm uma tendência biológica para tal; esta tendência é controlada por uma variedade de fatores que determinam a capacidade das células circulantes para aderirem e comunicarem com as células residentes da medula óssea [5]. Uma hipótese atualmente aceite sugere que as células tumorais e as células progenitoras hematopoiéticas (HSC – *Hematopoietic Stem Cells*) expressam as mesmas moléculas de adesão, respondem aos mesmos sinais e conseqüentemente competem para os mesmos nichos [2].

O osso constitui um substrato muito favorável para o crescimento e proliferação das células tumorais, uma vez que a medula óssea é responsável pela hematopoiese, apresentando por esse motivo uma vasta rede vascular e uma matriz extracelular que contribuem para o crescimento do tumor [5]. Existem igualmente vários processos que regulam a maturação das células ósseas e que também promovem a formação de metástases do PCa [6]. A desregulação da estrutura óssea resulta na libertação de fatores pelas células do estroma e do microambiente, muitos dos quais regulam positivamente o crescimento do tumor, levando ao desenvolvimento de um ciclo vicioso. As metástases do PCa no osso são predominantemente osteoblásticas, e envolvem desequilíbrios na homeostase óssea que levam ao aumento da diferenciação e da atividade dos osteoclastos e por sua vez também dos osteoblastos, resultando na formação descontrolada de osso [7], mas mais frágil e patológico.

O conhecimento da fisiopatologia deste processo levou ao desenvolvimento de terapêuticas inovadoras que têm permitido melhorar a qualidade de vida destes doentes,

diminuir as complicações ósseas das metástases e até aumentar a sobrevida. Ao longo deste trabalho são exploradas diversas perspectivas dos diferentes mecanismos, que incluem o destacamento do tecido primitivo, a transição de células epiteliais para mesenquimatosas (processo decisivo para a mobilidade e sobrevivência fora do microambiente local [8]), a disseminação, os fatores que permitem a sobrevivência em circulação, a quimiotaxia e colonização do osso, e as características da doença óssea metastática.

2. Materiais e Métodos

Este trabalho foi elaborado com base numa pesquisa bibliográfica realizada segundo o método “Pull” em julho de 2016, iniciada na base de dados *DynaMed* com a palavra-chave “*prostate neoplasm*” de onde se selecionou um artigo relevante, sob a opção “*Management of localized or locally advanced prostate cancer*”. Esta base de dados foi atualizada a 19 de setembro de 2016, pelo que a informação foi novamente consultada e referenciada em outubro. A pesquisa realizada em seguida na *PubMed* incidiu sobre “*Prostate Neoplasms AND Bone AND Metastases*” com a *string* de pesquisa ((“prostatic neoplasms”[MeSH Terms] OR (“prostatic”[All Fields] AND “neoplasms”[All Fields]) OR “prostatic neoplasms”[All Fields] OR (“prostate”[All Fields] AND “neoplasm”[All Fields]) OR “prostate neoplasm”[All Fields]) AND (“bone and bones”[MeSH Terms] OR (“bone”[All Fields] AND “bones”[All Fields]) OR “bone and bones”[All Fields] OR “bone”[All Fields]) AND (“neoplasm metastasis”[MeSH Terms] OR (“neoplasm”[All Fields] AND “metastasis”[All Fields]) OR “neoplasm metastasis”[All Fields] OR “metastases”[All Fields])) AND (“2011/07/01”[PDat] : “2016/07/21”[PDat] AND “humans”[MeSH Terms] AND (English[lang] OR Portuguese[lang])). Obtiveram-se 4801 resultados aos quais foram aplicados os seguintes filtros: bibliografia dos últimos 5 anos, espécie humana, língua portuguesa e inglesa. Da aplicação destes critérios resultaram 961 artigos, dos quais se selecionaram 64 através da análise do título e *abstract*.

3. O Osso como Tecido Alvo de Metastização

Nos doentes com PCa, o osso representa o local de metastização mais comum e a doença metastática óssea representa a primeira causa de morbidade e mortalidade associadas a esta neoplasia. Anualmente, cerca de 350000 pessoas morrem anualmente com metástases ósseas, provenientes de diferentes tumores primários, maioritariamente a próstata, mama, pulmão, rim e tireoide [9].

Ao contrário do que se possa pensar, o osso é um tecido dinâmico, com a capacidade única de se renovar continuamente através de um processo fisiológico denominado remodelação óssea (*turnover* ósseo). Este mecanismo, consumidor de energia, permite a regulação da homeostase do cálcio, a reparação do osso microfraturado ou isquémico e a substituição do osso imaturo durante o crescimento. Na remodelação óssea intervêm os dois tipos principais de células do osso, os osteoblastos e os osteoclastos, cujas funções são sujeitas a uma regulação cuidadosa, de forma a preservar a massa de osso correta [10].

Os osteoblastos são células de origem mesenquimatosa (têm origem nas células estaminais pluripotentes mesenquimatosas (MSC – *Mesenchymal Stem Cells*)), que de acordo com a expressão seletiva de diferentes genes, podem originar osteoblastos, condrócitos, fibroblastos, miócitos e adipócitos [11]. O primeiro passo da diferenciação envolve o comprometimento da MSC num osteo/condroprogenitor, que é caracterizado pela expressão de dois fatores principais: RUNX2 (*runt-related transcription-factor 2*) e osterix, dependente da via de sinalização de RUNX2 [12]. Durante o processo, duas outras vias importantes são ativadas: Wnt (*wingless-type protein*) e várias BMPs (*bone morphogenetic proteins*), cuja desregulação está envolvida no processo de metastização do PCa [10], como mencionado posteriormente. A expressão de RUNX2 compromete o osteo/condroprogenitor para um fenótipo osteoblástico, dando origem a pré-osteoblastos com elevados níveis de atividade ALP (*alkaline phosphatase*) e secreção de proteínas da matriz óssea como a sialoproteína II (BSP –

bone sialoprotein), osteopontina (OPN - *osteopontin*), fibronectina e colagénio tipo I [13]. A última fase de diferenciação é caracterizada por elevados níveis de osteocalcina (OC – *osteocalcin*), que é um marcador de osteoblastos maduros e pela ativação de genes específicos envolvidos na mineralização de osso [10].

Os osteoclastos, as células multinucleadas responsáveis pela reabsorção de osso, têm origem na linhagem hematopoiética monocítica/macrofágica) [13]. Uma das primeiras moléculas envolvidas no seu processo de diferenciação é o fator de transcrição PU.1, cuja expressão aumenta quando os macrófagos da medula óssea se diferenciam em osteoclastos. Por sua vez, PU.1 aumenta a expressão do recetor de M-CSF (*macrophage-colony stimulating factor*, também denominado c-fms) bem como de RANK (*receptor activator of nuclear factor Kappa B* (também denominado NF-kB)) que, na sequência da ligação ao seu ligando RANKL, desencadeia a fusão e diferenciação de precursores de osteoclastos em osteoclastos maduros [10]. Nos osteoclastos, a ativação de NF-kB desencadeada pela ligação de RANK ao RANKL leva à ativação de genes que provocam a maturação, adesão ao osso e secreção de proteínas envolvidas no catabolismo ósseo [13]. Estas proteínas incluem a catepsina K (uma protease que cataboliza o colagénio e promove a adesão dos osteoclastos) e Src, uma tirosina cinase que é ativada após a ligação dos osteoclastos à matriz óssea por integrinas e aparentemente promove a sua sobrevivência e polarização necessária à reabsorção de osso [13].

Os osteócitos são as células mais abundantes do osso. Coordenam as respostas dos osteoblastos e osteoclastos, constituem a diferenciação terminal da linhagem osteoblástica e encontram-se incorporados na matriz osteoide. A sua função principal consiste em fazer a transdução de forças físicas em sinais bioquímicos, num processo denominado *mecanotransdução*. Através deste mecanismo, as alterações na mecânica do osso modulam a resposta bioquímica dos osteócitos. Assim, o crescimento tumoral no espaço ósseo restrito delimitado pela matriz extracelular mineralizada afeta a resposta destas células [14].

Durante o processo de remodelação óssea, este tecido passa por diversas fases, começando na *ativação*, onde diferentes estímulos (mecânicos, fatores parácrinos/sistêmicos ou microfraturas) ativam as células do estroma aumentando a sua expressão de RANKL, o que promove a diferenciação de pré-osteoclastos. Uma vez diferenciados, os osteoclastos iniciam a segunda fase de *reabsorção*, onde libertam protões (solubilizam a parte inorgânica da matriz – hidroxiapatite) e outras enzimas (MMP-9 e catepsina K, que degradam os componentes orgânicos da matriz). Esta fase é rápida e limitada, e culmina com a apoptose dos osteoclastos que já cumpriram a sua função. A fase seguinte, de *reversão*, marca a transição da atividade osteoclástica para osteoblástica, e caracteriza-se pela reabsorção dos detritos deixados durante a degradação da matriz. Por fim, a fase de *formação* é desencadeada por fatores libertados da matriz como o TGF- β , IGF I e II (*Insulin-like growth factors*), FGF (*fibroblast growth factors*), PDGF (*platelet-derived growth factor*) e BMPs. Estes fatores activam os osteoblastos na zona reabsorvida, levando à deposição de nova matriz, inicialmente não calcificada (osteóide), que sofre mineralização posteriormente [10].

Vários fatores, sistêmicos e parácrinos, regulam a comunicação entre os osteoblastos e osteoclastos, e como, tal. o processo de remodelação óssea [10]. Neste contexto, como já mencionado, os osteoblastos e osteócitos produzem a citocina pro-osteoclastogénica RANKL que se liga ao seu recetor RANK expresso pelos precursores dos osteoclastos, ativando a sua diferenciação [13]. Do mesmo modo, os osteoblastos secretam também OPG, que se liga ao RANKL, bloqueando o RANK através do sequestro da sua porção extracelular. Assim, o equilíbrio da diferenciação osteoclástica depende de um rácio correto RANKL/OPG. Outros fatores parácrinos produzidos pelos osteoblastos que estimulam a formação de osteoclastos são a IL-6 (*interleukin-6*), IL-1 β e TNF- α (*tumor necrosis factor α*) [10].

Como vai ser demonstrado com maior detalhe ao longo deste trabalho, o crescimento das células tumorais no osso induz uma desregulação drástica deste processo de remodelação

óssea através da produção de vários fatores que interferem com a dinâmica fisiológica dos osteoblastos e osteoclastos.

4. O Cancro da Próstata

O Carcinoma da Próstata (PCa) é a neoplasia mais comum e a segunda causa de morte por cancro na população masculina americana [15]. No entanto, em muitos homens a neoplasia prostática mantém-se indolente e nunca progride para um fenótipo agressivo. Assim, 82% dos homens com PCa irão morrer de causas não relacionadas com o carcinoma [16].

Estima-se que 90% dos doentes com PCa avançado venham a desenvolver metástases, que resultam numa redução substancial da qualidade de vida e um agravamento drástico do prognóstico. Para além da diminuição da sobrevida, as metástases ósseas do PCa causam complicações debilitantes incluindo dor óssea, fraturas patológicas devidas a fragilidade do osso, síndromes de compressão medular e necessidade de cirurgia ou radioterapia ósseas, aquilo que é conhecido por SRE (*Skeletal related events*) [17].

4.1. Diagnóstico e Estadiamento

Nos países desenvolvidos, o diagnóstico do PCa é geralmente realizado num estágio precoce da doença através de uma biópsia prostática, após elevação do PSA (*Prostate Specific Antigen*) e/ou um exame retal clinicamente sugestivo de alterações. Os métodos atuais para classificar o tumor e determinar o prognóstico baseiam-se em fatores clínico-patológicos incluindo a escala de Gleason, o toque retal, a ressonância magnética multiparamétrica e o valor do PSA, que permitem estratificar o doente em diferentes graus de risco de acordo com diferentes escalas, como por exemplo a classificação D'Amico. Nos últimos anos, estes parâmetros têm revelado algumas limitações, o que motiva a investigação a nível genético e biológico da fisiopatologia do PCa com o objetivo de identificar bio marcadores de risco capazes de facilitar o seguimento destes doentes [15]. Muitos PCa identificados através do PSA, dependente da regulação por androgénios, são indolentes na sua apresentação e poderiam ser controlados apenas com vigilância ativa. No entanto, muitos deles são biologicamente

agressivos e são alvos apropriados para tratamento imediato [18]. A descoberta de novas moléculas que possam funcionar como biomarcadores moleculares poderá ser útil para discriminar de forma mais precisa os tumores agressivos no momento do diagnóstico, prever a sua evolução e otimizar a estratégia terapêutica [18]. No entanto, ainda não possuem o nível de acuidade necessário para serem usados com segurança na prática clínica [16].

4.2. Tratamento

As opções atualmente disponíveis para o tratamento do PCa disseminado podem ser divididas em cinco categorias: hormonoterapia (com anti-androgénios, análogos LH-RH ou antagonistas LH-RH), quimioterapia (baseada nos taxanos como o docetaxel e o cabazitaxel), as novas drogas anti-androgénicas (como a abiraterona e a enzalutamida) as drogas dirigidas especificamente ao osso (bifosfonatos como o ácido zoledrónico, anticorpos monoclonais como o denosomab e radiofármacos como o radio 223) [10] e a imunoterapia como a vacina Sipileucel (actualmente só disponível nos EUA). Adicionalmente, pode ser necessária intervenção ortopédica para as complicações estruturais das lesões ósseas [19] e terapêutica da dor para os casos mais sintomáticos.

A hormonoterapia é a primeira opção terapêutica e a mais comum nestes doentes. É baseada na supressão da produção de androgénios e na inibição dos seus recetores, o que requer uma combinação de agonistas da hormona libertadora de gonadotrofinas (leuprorelina ou goserelin) ou antagonistas LH-RH (degarelix) e antagonistas dos AR (flutamida, nilutamida, acetato de ciproterona ou bicalutamida). Uma vez que a 5α -redutase converte testosterona no ligando de AR 5α -dihidrotestosterona, inibidores específicos da 5α -redutase, como o finasteride e dutasteride, podem ser utilizados [19], embora não o sejam na prática clínica pela fraca eficácia. Embora aproximadamente 80% destes doentes responda inicialmente ao tratamento, a resistência é comum na doença metastática e está associada à progressão para CRPC (*castrate-*

resistant PCa) ao fim de, em média, 2-4 anos [18]. A terapia de privação de androgénios é só por si uma potencial causa de perda de densidade mineral óssea e pode favorecer um aumento da incidência de complicações.

Vários ensaios clínicos recentes em fase III mostraram que novos agentes são benéficos no tratamento da doença metastizada resistente à castração, com aumento da sobrevida, ao contrário do que acontece com a hormonoterapia clássica. Os primeiros a serem descritos foram os taxanos (docetaxel e mais recentemente cabazitaxel) e posteriormente a abiraterona, um inibidor seletivo oral do citocromo P450 (CYP17) (uma enzima-chave na produção de androgénios, estrogénios e glucocorticoides), que bloqueia o precursor para a produção local de androgénios e que foi aprovado inicialmente para o tratamento de doentes que fizeram quimioterapia prévia com docetaxel [19]. Dados recentes sugerem que a terapêutica com abiraterona antes da realização de quimioterapia está associada a um aumento da sobrevida (16.5 meses comparado com os 8.3 meses verificados no tratamento isolado com prednisona) e a uma maior palição da dor nestes casos. Com base nestes dados, este fármaco foi aprovado para o tratamento do CRPC numa fase pré-quimioterapia. A enzalutamida (novo antagonista dos receptores androgénicos), também introduzida recentemente, mostrou aumentar a sobrevivência média em doentes com CRPC [10] antes e pós quimioterapia. As novas opções da terapêutica de ablação hormonal representam um avanço significativo no controlo da doença. No entanto, no sentido de maximizar a prevenção do aparecimento de lesões ósseas e preservar a saúde óssea, o uso de terapêutica adjuvante dirigida ao osso é desejável [10].

Nas últimas duas décadas, os bifosfonatos revelaram-se uma opção segura e eficaz no tratamento de metástases ósseas provenientes de diferentes tumores. O seu uso teve um efeito benéfico profundo na frequência e severidade na morbilidade dos eventos esqueléticos, levando a um aumento da qualidade de vida. Os bifosfonatos ligam-se ao osso exposto e são depois internalizados pelos osteoclastos, afetando a sua homeostase e a sua atividade de reabsorção.

Os que contêm nitrogênio (N-BPs, como o ácido zoledrónico e pamidronato) atuam interferindo com a FPPS (*farnesyl pyrophosphate synthase*), uma enzima chave na via do mevalonato, levando ao bloqueio da ligação covalente de cadeias isoprenil a pequenas guanosinas trifosfatase, o que inibe a sua função e localização intracelular nos osteoclastos. A disrupção da via do mevalonato pelos N-BPs determina a acumulação de um análogo citotóxico do ATP denominado ApppI (*triphosphoric acid I adenosin-5'-yl ester 3*) que induz apoptose. O ácido zoledrónico, o bifosfonatos mais potente, é eficaz na prevenção de SRE (*skeletal related events*) em vários tumores sólidos, incluindo o CRPC, sendo o único aprovado para o cancro da próstata. Evidências pré-clínicas e clínicas em fase precoce sugerem que o ácido zoledrónico poderá ter outros benefícios, nomeadamente na prevenção de SRE em homens com risco elevado de doença metastática, mas a eficácia deste fármaco nestas situações ainda continua a ser debatida [10].

O Denosumab (AMG 162) é um anticorpo monoclonal humanizado que tem como alvo a via RANK/RANKL que atualmente se encontra aprovado para o PCa sensível e resistente a castração [11]. Tem uma semi-vida longa e provoca uma inibição da reabsorção óssea rápida e prolongada após uma dose subcutânea única. O Denosumab liga-se ao RANKL evitando a sua interação com RANK, o que eventualmente leva à inibição da formação, ativação e sobrevivência dos osteoclastos. É uma droga mais potente do que o ácido zoledrónico, quer quando à redução da dor, quer quanto à diminuição do risco de SREs. [10].

São drogas bastante seguras embora possam estar associados a alguns efeitos secundários graves e raros como a osteonecrose da mandíbula e a hipocalcemia. O ácido zoledrónico foi associado a deterioração da função renal e, portanto, não pode ser usado em doentes com insuficiência renal severa [10].

O uso terapêutico de radiofármacos é uma área em desenvolvimento. A radioterapia localizada tem vantagens teóricas em comparação com a radioterapia externa no sentido em

que a dose de radiação pode ser administrada diretamente no tumor e os tecidos saudáveis são poupados dos efeitos nefastos da radiação [19]. O único fármaco que se associa a um aumento da sobrevida é o Rádio-233. Este radiofármaco emite partículas α , tem uma estrutura semelhante ao cálcio e tem como alvo o tecido ósseo. O comprimento de onda curto destas radiações assegura um menor atingimento e lesão dos tecidos adjacentes (afecta essencialmente a cortical) quando comparado com fontes de radiação beta ou gama [11], caídas entretanto em desuso (como o Samário ou o Estrôncio). A sua elevada energia fornece uma dose considerável de radioterapia a células no espaço de $1\mu\text{m}$ na superfície do osso, com efeitos sistêmicos e medulares mínimos [19]. Em ensaios clínicos em doentes com CRPC, o Radio-233 demonstrou um aumento da sobrevivência global em 3-4 meses [11].

4.3. Prognóstico

Embora apenas 5% dos diagnósticos com PCa apresentem doença metastática, mais de 60% dos doentes que morrem com esta neoplasia têm doença disseminada. Se diagnosticado precocemente, as terapêuticas hormonais, radiação e cirurgia asseguram uma boa expectativa de vida. No entanto, o risco de desenvolver doença metastática aumenta significativamente apenas dois anos após o tratamento primário, com uma recorrência secundária de mais de 40% [10]. Esta recorrência acompanha frequentemente a resistência hormonal e a perda de opções terapêuticas e foi demonstrado que a persistência de uma lesão óssea à distância pode causar uma recorrência local e não o contrário. Neste contexto, é possível detetar a presença de clones de tumor primário e metastático no sangue até anos após a remoção total da próstata [20]. Sabe-se também, que as células metastáticas ósseas podem voltar à próstata, o que significa uma interação bidirecional entre o tumor e a metástase óssea.

As fraturas patológicas estão associadas a um aumento de 20% no risco de morte nos tumores que metastizam para o osso. Os resultados das autópsias destes doentes revelaram que

mais de 90% apresentam metástases ósseas. Este facto faz com que o PCa seja peculiar em comparação com outros tumores que metastizam para o osso, como neoplasias da mama e pulmão [10].

5. A metastização do Cancro da Próstata

A metástase é vista tradicionalmente como uma série linear de acontecimentos, coletivamente referidos como a cascata de invasão-metastização. O primeiro passo dá-se quando as células do tumor primário se dissociam umas das outras e das células adjacentes, induzindo uma degradação parcial da membrana basal subjacente e penetram na matriz intersticial (invasão). Subsequentemente, como parte de um programa que lhes permite construir um microambiente favorável, desenvolvem uma vasculatura tumoral (neoangiogénese), exploram as suas descontinuidades para aceder à corrente sanguínea (intravasão) e disseminam através dela (disseminação). Finalmente, pela permanência no sistema microcirculatório do órgão-alvo e da infiltração no seu estroma (extravasão), as células neoplásicas adotam estratégias para sobreviver e eventualmente para evoluir para lesões macroscópicas (colonização) [21]. Sinais sistémicos, que atuam direta ou indiretamente neste microambiente, influenciam todos os passos deste processo.

5.1. EMT (transição epitélio-mesênquima)

A transição epitélio-mesênquima (EMT) é um processo pelo qual as células epiteliais sofrem mudanças morfológicas e citosqueléticas para adquirir um fenótipo mesenquimatoso e é importante em fenómenos fisiológicos como a fibrose [22]. Devido aos seus efeitos na adesão e mobilidade celular, está criticamente envolvida na disseminação tumoral, sendo que múltiplos estudos indicam que as células neoplásicas aumentam o seu potencial invasivo e metastático, bem como a resistência ao tratamento e o risco de recorrência [23]. Neste contexto, a terapia de privação de androgénios e a ativação de AR podem induzir EMT. Os AR cooperam com os fatores associados à EMT como o TGF- β , Snail1 e Twist1, referidos mais à frente; da mesma forma, o processo de EMT em si desregula a sinalização dos AR [19].

Neste processo, há perda de marcadores epiteliais como a E-caderina e aumento da expressão de proteínas mesenquimais como a N-caderina e a vimentina. Os fatores de transcrição Snail, Slug e Twist reprimem a expressão de E-caderina e induzem a EMT, e estão envolvidas outras vias oncogénicas como Src, Ras, Wnt- β -catenina, PI3K/Akt, MAPK, RUNX2 [12] e TGF- β [8]. Snail inibe diretamente a transcrição de E-caderina. A via PI3K/Akt tem uma função chave na proliferação celular e induz EMT numa variedade de tumores incluindo o PCa. AP-1 está envolvida na EMT induzida por TGF- β [8]. A via MAPK (*Mitogen-activated protein* kinase) dirige vários passos da cascata metastática, incluindo a EMT, invasão celular e colonização metastática [24]. De igual forma, demonstrou-se que o PTHrP não só é um mediador crítico da progressão tumoral do PCa, como também é um promotor da EMT, através da ativação de diversas vias como Snail, AP-1, CREB, ERK1/2, VEGF, PI3K/Akt e Ciclina D1, reforçando o seu papel na invasão, angiogénese, mobilidade, adesão e desdiferenciação celular neste contexto [8]. CCL5, secretado por MSCs da medula óssea aumenta os marcadores da EMT como CD133, ZEB-1 e CXCR4 [25]. A expressão aumentada de miR-21 e a perda do complexo miR15/miR16 nas células do PCa estão associados com o desenvolvimento de uma EMT marcada [26] e a expressão de miR-154 e miR-379 facilita igualmente o crescimento tumoral e o processo de EMT [27]. A ativação constitutiva de um recetor de activina tipo IB nas células neoplásicas aumenta a expressão dos vários genes previamente mencionados envolvidos na EMT [19].

5.2. Invasão Local e Extravasamento

A variedade de fatores que contribui para o destacamento das células neoplásicas do microambiente primitivo pode ser enquadrada em duas categorias: alterações no estroma e alterações das próprias células tumorais [5].

A remodelação da matriz extracelular contribui para o desenvolvimento da vascularização do tumor e para a dissociação das células do tecido primitivo [5]. Durante este processo, no PCa primário, CXCL16 facilita o recrutamento de MSCs através do recetor CXCR6 para o microambiente tumoral e a sua posterior diferenciação em CAFs (*Cancer Associated Fibroblasts*) [9,11,26]. Estes adquirem frequentemente um fenótipo miofibroblástico em resposta ao contacto físico com as células tumorais, hipoxia e níveis elevados de fatores de crescimento como EGF, FGF e IGF resultantes do metabolismo tumoral aberrante [5] e têm um papel importante na promoção do crescimento do tumor, da EMT e da metastização para o osso através de um aumento da expressão de TWIST (mediada por CD44), um fator-alvo do TGF- β [11]. Tal como os CAFs, infiltrados leucocíticos (recrutados para o ambiente tumoral por concentrações elevadas de VEGF, quimiocinas da família CXCL (CXCL12 e CCL2) e integrinas ($\alpha 4\beta 1$ e $\alpha 5\beta 3$)) diferenciam-se frequentemente em macrófagos associados ao tumor (TAM – *Tumor Associated Macrophages*), polarizados para o tipo M2 (pró-tumoral) e ativados alternativamente por IL-4 ou IL-10, que produzem fatores angiogénicos (quimiocinas que recrutam progenitores vasculares e metaloproteinasas) contribuindo assim para a remodelação da matriz [29]. Metástases com uma infiltração elevada de TAMs estão associadas a um pior prognóstico em vários tipos de tumores, incluindo o PCa [11].

No que diz respeito às alterações atribuídas às células tumorais, através de uma combinação de alterações genéticas e epigenéticas, estas adquirem fenótipos que permitem o destacamento do tecido primitivo, a mobilidade do citoesqueleto e a quimiotaxia, necessários à metastização. Estas alterações são promovidas por TAMs, que produzem fatores estimuladores da migração celular como CXCL12, IL-6 e TNF [5] e modulam a via CCL2/CCR2-STAT3 que promove a metastização [25]. Adicionalmente, CAFs produzem níveis elevados de TGF- $\beta 1$, um indutor potente da transição epitélio-mesênquima (EMT), abordada anteriormente, que

confere um potencial invasivo significativo às células neoplásicas [5]. Neste contexto, a OPN expressa pelas células tumorais regula a secreção de MMP-9 e a interação subsequente entre MMP9/CD44, importante para o potencial metastático das células do PCa [29]. A expressão de MMP9 e MMP2 é também aumentada pela ativação transcricional dos seus genes promotores pelo PBK (*PDZ domain-binding kinase*) através do aumento de atividade da via β -catenina-TCF/LEF. A expressão de PBK no PCa está relacionada com um fenótipo agressivo e com a metastização para o osso, gânglios linfáticos e estruturas abdominais [16]. Foi demonstrado recentemente que o aumento de p23 está relacionado com a migração e capacidade invasiva das células do PCa através da modulação seletiva da expressão de genes envolvidos nos mecanismos de metastização [30]. De forma semelhante, a perda da função do BRCA2, que mantém a estabilidade genómica em condições normais, estimula a capacidade invasiva do PCa e está associado com tumores mais agressivos e metastáticos. O RTK (*Receptor Tyrosine Kinase*) c-kit é altamente expresso nas metástases esqueléticas e promove a migração e invasão das células do PCa através da ativação da via PI3K/Akt. Mainetti et al. demonstraram que a sua atividade está relacionada com a diminuição da função do BRCA2 [31].

O processo de neovascularização tumoral é essencial ao seu crescimento e disseminação, garantindo-lhe o acesso a nutrientes essenciais e à corrente sanguínea, o que facilita a sua disseminação [29]. Sem novos vasos, a expansão normal de um tumor está limitada a 2-3 mm e a densidade microvascular é considerada um marcador de prognóstico negativo nos doentes com PCa [32]. A angiogénese começa com a destabilização e desdiferenciação dos vasos locais, seguida da ativação, migração e proliferação de células endoteliais para a matriz extracelular (MEC) até à formação de novos vasos funcionais [29]. Isto implica um mecanismo de “switch angiogénico” em que as células do estroma ou do tumor induzem mudanças no balanço relativo de indutores (VEGF, TGF- β , PDGF, TNF- α , bFGF) e inibidores (trombospondina-1 (TSP-1)) da angiogénese [29]. Ao mesmo tempo, a vascularização

aberrante do tumor apresenta vasos com elevada permeabilidade e baixa resistência vascular que exprimem moléculas de adesão celular (CAMs), incluindo níveis elevados de $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$, integrinas da família $\beta 1$ ($\alpha 1\beta 1$ (um recetor de colagénio), $\alpha 2\beta 1$ (um recetor de laminina) e $\alpha 5\beta 1$ (um recetor de fibronectina) que demonstraram ser importantes na adesão de células endoteliais estimulada por VEGF). $\alpha 4\beta 1$, em conjunto com o seu ligando VCAM-1, expresso nas células da parede vascular, têm um papel importante na adesão de células endoteliais e de células de músculo liso vascular durante a formação de vasos sanguíneos [29]. A expressão de E-seletinas e integrinas pelos êmbolos plaquetares do tumor são cruciais para o extravasamento das células do PCa [11]. A MMP11 (*matrix metalloproteinase 11*) tem um papel importante na angiogénese e alterações nos seus níveis estão associadas à progressão tumoral e a maus resultados clínicos, sendo que a sua expressão altera o microambiente do estroma do PCa e contribui para a angiogénese neste contexto [33]. Foi demonstrado recentemente que a expressão e atividade de FRS2 α (*FGF receptor substrate 2 α*), bem como cJUN e HIF1 α estão positivamente relacionadas com densidade vascular e progressão maligna do PCa. Da mesma forma, níveis elevados de FGF aumentam a produção de VEGF-A, promovendo o recrutamento de células endoteliais e a formação de neovasos [32]. Um outro estudo sugere que miR-15 e miR-16 (microRNAs) controlam a expressão de FGF-2, FGFR1, VEGF e Wnt, promovendo a angiogénese [26]. A via RUNX2 induz diretamente genes associados com a angiogénese, incluindo VEGF, SPP1, MMP9 e MMP13 [12].

5.3. Disseminação

O tumor primário liberta “células tumorais disseminadas” (*DTCs – disseminated tumor cells*), que podem entrar em circulação e atingir todos os tecidos, incluindo o osso [2]. De um ponto de vista seletivo, estas representam um subgrupo único de células tumorais que foram capazes de se disseminar, sobreviver em circulação e fixar-se e proliferar no tecido ósseo com

sucesso. Foi demonstrado que estas células existem na medula óssea de doentes com cancro da mama e PCa mesmo em estádios precoces e são consideradas um fator de mau prognóstico [34].

O primeiro passo para a formação de metástases é o destacamento do tumor primário. Este processo requer o extravasamento e a sobrevivência em circulação das células tumorais, mecanismos complexos que lhes impõem uma pressão seletiva significativa [5]. Estima-se que apenas 0.02% a 0.1% das células neoplásicas disseminadas seja capaz de atingir e colonizar um local secundário [9]. O ambiente mecânico e bioquímico da circulação difere amplamente dos tecidos em que o carcinoma se origina, e representa por isso um desafio à sobrevivência das células metastáticas [5]. Neste sentido, um estudo recente sugeriu que as condições da circulação sanguínea, nomeadamente a sua elevada concentração em oxigénio, induz um estado de dormência nas DTCs, contribuindo para o seu insucesso no processo de metastização [35]. Adicionalmente, os tecidos epiteliais onde o tumor primário se desenvolve possuem anoiquia, uma forma de indução de morte celular programa em células que se destacam com sucesso do tecido nativo. Como tal, a ativação de mecanismos de sobrevivência neste contexto é crítica para a formação bem-sucedida de metástases ósseas [5].

As células tumorais sobreexpressam os fatores mitocondriais anti-apoptóticos Bcl2, Bcl-XL e Mcl1 e subexpressam ou desenvolvem mutações inativadoras dos fatores proapoptóticos Bax, Apaf1 e caspases. Alteram também a degradação proteossómica de Mcl-1, levando à acumulação desta proteína anti-apoptótica. Este conjunto de fatores diminui a sua sensibilidade à anoiquia [5].

Nesta fase, a crescer à resistência à apoptose e à anoiquia, as DTCs usam a autofagia como um mecanismo de sobrevivência. Esta via é ativada através da diminuição da atividade de sinalização do mTOR e de outras vias de sinalização de aminoácidos, e constitui uma forma pela qual as células detetam e respondem positivamente a condições deficitárias, extraíndo

nutrientes cruciais de conteúdos endocíticos quando os recursos extracelulares não são suficientes [5].

A expressão de Catepsina L (CTSL), uma cisteína protease pertencente à família das catepsinas libertada pelo tumor, está aumentada em vários tumores sólidos, incluindo o PCa, e tem um papel central na promoção da disseminação de células tumorais e no processo de reabsorção patológica de osso [17].

Estudos sugerem que os tumores desenvolvem vasos linfáticos atípicos, mediados, em parte, pelo VEGF-C produzido pelas células tumorais, CAFs e TAMs. Embora controversa, esta hipótese sugere a existência de um mecanismo de metastização através do sistema linfático, adicional à circulação sistêmica [5].

5.4. Quimiotaxia

Em 1889, Paget e Ewing propuseram duas teorias contraditórias acerca da forma como as células tumorais se fixam em locais secundários para formar metástases. Ewing propôs que o processo seria essencialmente físico, na medida em que tecidos com elevada vascularização e tendência para a embolização seriam mais propícios à fixação de células metastáticas [5]. No caso do PCa, a elevada incidência de metástases na coluna vertebral pode ser justificada parcialmente pela disseminação de células cancerígenas através do plexo venoso de Batson: a drenagem venosa da pélvis faz-se não só através da veia cava como também através de um plexo venoso que se estende desde a pélvis pelas veias epidural e perivertebral. No entanto, outros tumores localizados na pélvis e que utilizam o mesmo plexo venoso (por exemplo o carcinoma colorretal) não apresenta tropismo semelhante para o osso [10]. Assim, Paget sugeriu que determinadas características das células cancerígenas e do próprio tecido secundário contribuem para a tendência para um tumor metastizar para um tecido específico[5]. Uma vez que a medula óssea é responsável pela hematopoiese, e como tal, um local de grande perfusão sanguínea, constitui

um substrato biológico ideal para a fixação seletiva de células metastáticas que tenham uma propensão biológica adequada, o que em conjunto com a existência de uma série de fatores parácrinos específicos, vai ao encontro de ambas as teorias [5].

No caso da metastização para o osso, um fator central de regulação da comunicação entre as células tumorais e a medula óssea é o eixo de quimiocinas CXCL12-CXCR4. CXCL12 (o mesmo que SDF-1 – *stromal cell-derived factor – 1*), fortemente expresso pelas células mesenquimatosas residentes incluindo os osteoblastos, é responsável por criar um gradiente quimiotático para as células positivas para CXCR4 [2] e por regular a fixação e comunicação fisiológica entre a medula óssea e os progenitores hematopoiéticos (HSC – *hematopoietic stem-cells*) em circulação. As células que metastizam para o osso imitam este processo expressando CXCR4 e CXCR7, o que lhes permite responder à quimiotaxia criada por CXCL12 e mimetizar a estratégia de extravasamento vascular usado pelas HSC que se alojam na medula óssea [5].

5.5. Invasão e colonização do Osso

Para invadirem e colonizarem o osso, as células metastáticas em circulação necessitam de desenvolver processos celulares e moleculares que lhes permitam aderir e atravessar o endotélio da vasculatura da medula óssea. Em seguida, procuram um nicho onde possam sobreviver neste novo ambiente [2].

As células tumorais que aderem preferencialmente à medula óssea expressam fatores que as ajudam no processo de fixação [7]. A libertação de citocinas e fatores de crescimento, incluindo o PTHrP, Wnt, VEGF, integrinas e BMPs estão envolvidas neste mecanismo [13]. Especificamente, a ligação da integrina $\alpha V\beta 3$ à vitronectina e osteopontina, e de $\alpha 4\beta 1$ a VCAM e à fibronectina são essenciais na colonização do osso. A expressão de $\alpha 5\beta 1$ facilita a interação das células neoplásicas com o estroma. Outra integrina da família $\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, um recetor de colagénio tipo I, ativa a via RhoC GTPase que inicia uma cascata de sinalização responsável

pela reorganização do citoesqueleto, migração e invasão preferencial óssea mediada por colagénio, promovendo a invasão e adesão ao colagénio tipo I do tecido ósseo [29]. As talinas são proteínas adaptadoras que regulam a adesão celular focal, fazendo a ligação de integrinas com o citoesqueleto. Ligam-se diretamente às integrinas, causando a sua ativação. Neste domínio, Jin et al. demonstraram que talin1 é importante para a ativação das integrinas da família $\beta 1$. A expressão de p35 contribui para o aumento de Cdk5, cuja atividade provoca a fosforilação (no resíduo S435) de talin 1 e a ativação de integrinas $\beta 1$, justificando o seu papel na metastização do Pca [36].

MAP2K4 aumenta também a capacidade invasiva das células do PCa [24]. A expressão de E6-AP, uma proteína-ubiquitina ligase, foi reportada como sendo ativadora da via PI3K/Akt/mTOR, contribuindo para a migração e adesão das células metastáticas do PCa [37]. A proteína derivada dos osteoblastos WISP-1 (*Wnt-induced secreted protein-1*) promove a migração das células do PCa e a expressão de VCAM-1 através da inibição de miR-126 pela integrina $\alpha \beta 1$, FAK e p38. VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*) é uma glicoproteína que medeia a adesão de linfócitos e monócitos ao endotélio vascular. A sua expressão aberrante num ambiente tumoral está envolvida com a adesão e fixação das células metastáticas ao novo tecido em vários tipos de tumores, incluindo o PCa [38]. As DTCs aderem preferencialmente às células endoteliais do ambiente vascular da medula óssea através da expressão de E-seletina e do seu ligando (ESL-1 – *E-selectin ligand*) e SDF-1 (CXCL12), que subsequentemente ativam uma cascata de eventos que facilita o processo de metastização. A E-seletina é reconhecida como a principal molécula expressa pelo endotélio, responsável por iniciar a adesão das células do PCa, mas o seu mecanismo ainda é amplamente desconhecido [39]. Neste contexto, foi demonstrado recentemente que o aumento da expressão de várias FTs (*Human Fucosyltransferase*) 3, 6 e 7 nas células do PCa permite a sua ligação a E-seletinas da vasculatura da medula óssea, contribuindo desta forma para a sua adesão [40].

Foi demonstrado que as células que metastizam para o osso expressam um recetor (CXCL12) para a anexina II (ANXA2), uma proteína expressa na superfície dos osteoblastos e usada por estes para aderir às HSC [41]. Está igualmente envolvida no processo de dormência, explicado posteriormente, e na resistência a diversos fármacos [13]. O envolvimento da PKC ϵ (*protein kinase C epsilon*), uma proteína oncogénica, é um fator determinante na migração transendotelial das células do PCa, bem como no crescimento das células metastáticas no microambiente ósseo. A sua depleção inibe a expressão de IL-1 β , uma citocina implicada na metastização para o osso através das via NF- κ B e ERK [42].

No PCa o número de oncosomas (vesículas maiores que os exossomas, que têm a função de envolver e reciclar a membrana e algumas proteínas citosólicas) está relacionado com scores de Gleason 7 e superiores e a presença de exossomas motiva a diferenciação de osteoblastos e de MSCs em miofibroblastos, o que promove o crescimento tumoral. Coletivamente, estes dados sugerem que os oncosomas têm um papel no potencial maligno do PCa e na criação de nichos pré-metastáticos no microambiente ósseo [11].

A especificidade deste processo reflete-se no tropismo das células metastáticas para ocuparem mais frequentemente o osso trabecular epifisial do que a diáfise. Embora o mecanismo ainda não seja totalmente conhecido, duas vias, anexina II (mencionada anteriormente) e GAS 6 (*growth arrest specific-6*) parecem estar envolvidas. A ligação de GAS6 ao seu recetor, Axl, altera as funções celulares de migração, invasão, proliferação e sobrevivência e a sua presença está associada a um pior prognóstico [13].

5.6.Dormência

Muitos doentes oncológicos sofrem uma recorrência metastáticas vários anos após uma cirurgia radical, o que induz um mau prognóstico. No PCa, o tempo médio de recorrência para metástases ósseas (e morte) após prostatectomia radical ronda os 16 anos. A disseminação

precoce de células neoplásicas seguida um período facultativo e alargado de dormência pode explicar este comportamento clínico prevalente [21]. Assim, as DTCs podem persistir durante anos nos seus nichos até que estímulos, ainda amplamente desconhecidos, iniciem o seu crescimento e expansão [2]. Este facto sugere que o processo de formação do tumor secundário inclui duas fases cinéticas distintas, a primeira – fase de dormência latente, seguida de uma segunda fase - de crescimento agressivo, que representa o que acontece com os doentes terminais [5].

Durante a primeira fase considera-se que as DTCs suprimiram ou saíram do ciclo celular e são metabolicamente ativas no tecido (sobrevivem e persistem) mas não proliferam (“*proliferative dormancy*”). Neste contexto, foi demonstrado que GAS6 é secretado pelos osteoblastos primários humanos e funciona como um indutor da paragem do ciclo celular, levando a uma diminuição da proliferação de células do PCa que expressem na sua superfície o recetor Axl [5]. Outra possível teoria sobre este processo (denominada “*mass dormancy*”) considera que há vários focos de micrometástases, formados por DTCs que sofrem morte celular a uma taxa semelhante à sua taxa de proliferação [21]. O resultado é uma doença residual mínima que em determinado momento sofre um aumento das taxas de proliferação em relação à apoptose formando metástases clinicamente significativas [5]. Este processo poderá ser o resultado de uma adaptação retardada aos microambientes estranhos em que as DTCs se encontram. Para tal poderá contribuir a intervenção de mecanismos de vigilância imune que limitam a expansão das micrometástases, o atraso na criação de uma resposta angiogénica eficaz e a falta de interações de adesão e sinalização. Neoplasias hormono-dependentes, como o PCa, poderão entrar em dormência em resposta à terapia hormonal. Embora potencialmente importantes, os mecanismos endócrinos de indução de dormência permanecem em grande parte desconhecidos [21].

○ CXCL12 não só tem um papel quimiotático como também intervém na invasão tumoral através da regulação de proteases e moléculas de adesão, como a MMP-9 (metaloproteinase-9 da matriz) e as integrinas $\alpha 5\beta 3$, respetivamente [2]. Neste contexto, a expressão aumentada de Twist1, bem como a via Src aumentam a resposta do tumor ao CXCL12 e diminuem a apoptose mediada pelo TRAIL [7]. Estas moléculas contribuem para manter as células tumorais num estado de dormência [2,7]. Num estudo realizado recentemente foi demonstrado que a sinalização por TGF/BMPs, TP53 e o desequilíbrio redução/oxidação no microambiente tumoral contribuem para a indução e manutenção do estado de dormência das células do PCa [35].

No que diz respeito à forma como as células saem do período de dormência e entram na segunda fase, pensa-se que as células metastáticas que sofrem reativação são apoiadas por nichos especializados da matriz extracelular, que expressam sinais positivos, como o Wnt e Notch, e atenuam sinais negativos, como as BMPs [21]. Um estudo recente sugere que a ativação constitutiva de MLCK (*myosin light chain cynase*), um efetor de integrinas $\beta 1$ e de TGF $\beta 2$ em células não-proliferativas promove a proliferação celular [43]. Esta proliferação está associada ao aumento de CDK6 (que se associa a ciclina D1 na fase G1 do ciclo celular e é regulada por AR) e a uma diminuição de E2F4 (que age em conjunto com SMAD3 como cofator da transcrição de TGF e induz a apoptose das células do PCa), constituído um mecanismo de saída do período de dormência [43]. Níveis elevados de uPA (*urokinase-like plaminogen activator*) e do seu recetor associado (uPAR) podem induzir escape da fase de dormência através do aumento da razão ERK/p38 nas células cancerígenas [44]. Esta expressão aumentada de uPAR está associada com a ativação a integrina $\alpha \nu \beta 1$, levando ao crescimento tumoral. Num outro estudo, a migração de células neoplásicas mediada por uPA foi ativada pela MLCK cuja fosforilação é mediada por ERK. MLCK é um conhecido regulador da contratilidade,

motilidade e adesão celular, no entanto o seu papel na saída do processo de dormência das células do PCa mantém-se largamente desconhecido [43].

6. A Doença Óssea Metastática do Cancro da Próstata

As células que metastizam para o osso formam dois tipos de lesões distintas: tumores osteolíticos (com predomínio de reabsorção óssea) e osteoblásticos (com predomínio de formação de osso). No fundo, em ambos os tipos existe uma mistura dos dois fenótipos, embora um predomine. A atividade relativa de cada mecanismo coexistente na lesão define o fenótipo global que esta adquire em última instância [5]. Clinicamente, as metástases osteoblásticas são menos frágeis do que as metástases osteolíticas, embora o seu risco de fratura seja francamente superior ao do osso normal [19].

No PCa são observadas tipicamente metástases osteoblásticas, com lesões osteoescleróticas em mais de 90% dos casos. Assim, neste processo, as células tumorais estão envolvidas na formação patológica de osso, ainda que o crescimento inicial do tumor esteja associado a um aumento da reabsorção óssea [2]. Neste contexto, nas lesões osteoescleróticas, apesar do aumento da atividade osteoblástica, a atividade osteoclástica também se encontra aumentada, como mostrado pelos níveis elevados de N-telopeptídeo (NTx, um produto da degradação do colagénio) e C-telopeptídeo do colagénio tipo I (CTx) (ambos marcadores de reabsorção óssea), em conjunto com marcadores de formação de osso como PINP (*pro-collagen propetides*), osteocalcina e BALP (*bone-specific alkaline phosphatase*) [10,13]. Estes marcadores relacionam-se entre si e com o PSA. A avaliação imagiológica destas lesões revela uma atividade osteoblástica extensa e a sua observação histológica confirma o aumento da matriz mineralizada e a presença de vários osteoblastos maduros adjacentes ao tecido tumoral [10].

Anatomicamente, as áreas do osso mais frequentemente colonizadas por DTCs são o esqueleto axial, incluindo a coluna vertebral, costelas crânio e bacia [9].

Há evidências fortemente sugestivas da criação de um microambiente parácrino pelas células do PCa que favorece a diferenciação osteogénica e conseqüentemente a formação de

um tecido ósseo com baixa resistência mecânica, uma superfície osteoide elevada e integridade estrutural enfraquecida [2,13]. Neste contexto as metástases osteoblásticas são induzidas por interações entre as células cancerígenas e os osteoblastos e os seus progenitores através da produção de TGF- β , proteína morfogénica do osso, IGF, FGF, WNTs, BMPs e Endotelina-1. Os osteoblastos respondem a fatores morfogénicos ativando a via de sinalização SMAD, a fatores de crescimento através das vias MAPK e PKC e a WNTs a partir de vias reguladas por β -catenina [5]. Estas vias convergem e interagem com a rede transcricional RUNX2, que é responsável pela orientação da diferenciação e proliferação osteoblástica, como mencionado previamente. DKK1 (*Dickkopf-1*), um inibidor do WNT, é altamente expresso nas lesões osteolíticas, mas é suprimido pelo PTHrP no PCa avançado, potenciando o fenótipo osteoblástico observado nestes casos [7]. Neste contexto, a PAP (*prostatic acid phosphatase*) é secretada pelas células prostáticas normais, tem expressão elevada nas metástases osteoblásticas do PCa e promove a mineralização dos osteoblastos [10].

6.1. Osteomimicry

No seguimento da investigação que tem sido feita acerca do comportamento das células metastáticas no tecido ósseo, Koeneman et al. sugeriu que estas adquirem um fenótipo semelhante ao osso, num processo denominado *osteomimicry*. Neste estudo admite-se que as células do PCa adquirem propriedades *bone-like* para se adaptarem e crescerem no microambiente ósseo. Neste sentido, expressam proteínas associadas à maturação e diferenciação de osteoblastos incluindo BMPs, PTHrP, RUNX2, ALP e endotelina-1 [10], e respondem à estimulação por fatores de crescimento através da ativação de Cbfa, MSX e outros fatores de transcrição osteoblásticos [5]. Vários estudos indicam que a ativação da via Wnt contribui para este processo [19]. Da mesma forma, as células do PCa expressam várias proteínas não-colagénicas da matriz óssea, incluindo SIBLINGs (*small integrin-binding ligand*

N-linked glycoproteins), OC (também chamada BGLAP – *bone gamma-carboxyglutamic acid containing protein*) e ON (*osteonectin*). SIBLINGs é um grupo funcionalmente heterogêneo de cinco glicofosfoproteínas (OPN, BSP, DMP1 (*dentin matrix protein 1*), DSPP (*dentin sialophosphoprotein*) e MEPE (*matrix extracellular phosphoglycoprotein*)) que são altamente expressas no osso onde funcionam como transdutores de sinal e promovem a adesão celular, mobilidade e sobrevivência. Deste grupo, OPN e BSP são as únicas SIBLING para as quais há evidência da participação na progressão neoplásica e de metástases ósseas e foram propostas como marcadores séricos preditivos específicos de carcinomas osteotrópicos como o PCa, mama e pulmão [10].

Os fatores libertados pelas células neoplásicas neste contexto conferem-lhes uma vantagem adaptativa [10].

6.2. Nicho Metastático

Considerando o número de fatores envolvidos na fixação e desenvolvimento das metástases ósseas, a noção de distribuição espacial deste processo deve ser considerada. Especificamente, a medula óssea é um tecido heterogêneo em toda a sua distribuição, o que significa que tem na sua constituição espaços únicos, nichos, com uma pluralidade de características que lhes conferem suscetibilidade à fixação de determinadas células tumorais [5]. Uma visão emergente desta hipótese descreve a existência de dois nichos primários na medula óssea: o nicho osteoblástico e o perivascular; dependentes do tipo de células progenitoras que contêm: HSCs e MSCs, respetivamente [9]. Este conceito de nicho pré-metastático demonstra que as células do PCa invadem nichos, constituídos antes ou durante a fixação das DTCs [7], que de outra forma seriam ocupados por HSCs ou MSCs, competindo com elas [5]. A resposta à carga mecânica e a consequente natureza do processo de remodelação óssea, no qual a formação osteoblástica ocorre preferencialmente na superfície endocortical

lateral do osso e a reabsorção osteoclástica é realizada predominantemente nas zonas médias centrais das zonas endocorticais, condicionam os locais que as células metastáticas colonizam. Neste contexto, uma vez que a distribuição da linhagem osteoblástica não é uniforme ao longo do tecido ósseo, os nichos metastáticos têm uma distribuição heterogênea na medula óssea. Foi demonstrado recentemente que, nos estádios mais precoces da metastização do PCa para o osso, as células neoplásicas colonizam primeiro as áreas com elevado número de osteoblastos, num processo dependente da sinalização CXCR4/CXCL12 [45].

O nicho osteoblástico encontra-se mais bem descrito em termos da sua função e composição. Como tal, mecanismos usados pelas células do PCa para subverter e competir diretamente com as HSCs, embora ainda não totalmente compreendidos, podem contribuir para a formação de metástases ósseas. As HSCs aderem a osteoblastos que delimitam a superfície do endóstio através de interações com VCAM-1, seletinas (P e E), angiopoietina (via interações com Tie2) ou o *Kit-ligand* [45]. O papel dos osteoblastos é crítico na manutenção da quiescência das HSCs nos nichos, mas podem ativar a sua expansão através do CXCL12 e a interação com CXCL4 na superfície das HSCs. Os osteoclastos também podem mobilizar estas células através da expressão de MMP-9 que leva ao processamento de *Kit-ligand*, um mecanismo que facilita a libertação de das HSCs do nicho e aumenta os níveis de CXCL12 e VEGF na medula óssea. As células metastáticas do PCa podem utilizar os fatores envolvidos na manutenção do nicho hematopoiético, através da expressão de CXCL4, já mencionada, e da proteína SENP-1 (*SUMO-specific protease 1*) que foi identificada como um regulador da expressão de MMP-9 no PCa e promove a sua metastização para o osso [11].

As células tumorais condicionam o nicho metastático através da secreção de vários fatores solúveis tal como PTHrP, HPSE, anexina II e OPN [7,11]. O PTHrP circulante induz a produção de CCL2 (também conhecido por MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*)) pelos osteoblastos e outras células do estroma, que por sua vez estimula a produção de VEGF

pelas células tumorais e a angiogénese [7] e promove o recrutamento de TAMs e precursores de osteoblastos para o microambiente tumoral [11]. HPSE aumenta a atividade dos osteoclastos e a reabsorção óssea. OPN facilita a adesão e migração mediada por $\alpha V\beta 3$ e recruta células da medula óssea, promovendo o crescimento de tumores indolentes. Da mesma forma, CXCR4 expresso pelo tumor liga-se a CXCL12 produzido pelos osteoblastos, contribuindo para a ocupação do nicho hematopoiético pelas células tumorais [7].

Mantém-se em investigação se a invasão do nicho metastático das HSCs é uma característica única do PCa ou um atributo comum a diferentes células que metastizam para o osso, independentemente da sua origem [5].

6.3. O ciclo vicioso

O osso constitui o substrato ideal para as células disseminadas por ser um reservatório de fatores de crescimento. No entanto, estes não estão imediatamente disponíveis porque se encontram armazenados na matriz mineralizada ou no seu estado inativo. Para estimular a reabsorção óssea e libertar os fatores que necessitam, as células secretam moléculas que atuam nos osteoblastos e osteoclastos [10]. Esta desregulação do metabolismo do osso durante a metastização resulta na libertação de fatores das células do estroma e do microambiente ósseo [7]. Muitas destas moléculas regulam positivamente o crescimento do tumor, levando à formação de um *ciclo vicioso*, que representa a existência de uma estimulação recíproca autossustentada entre as células tumorais e as células residentes [7,10].

Assim, durante a lise da matriz óssea são libertados fatores como TGF- β , IGF, Ca^{2+} e múltiplas interleucinas (IL6,-8,-11,-15 e -17), aumentando a proliferação e o crescimento do tumor [19]. Os osteoblastos secretam também uma variedade de proteínas que regulam a proliferação tumoral, incluindo IL-6, SPARC e Periostina. SPARC induz a migração e a fixação do tumor através da integrina $\alpha V\beta 3$, enquanto IL-6 e a Periostina promovem a sua

sobrevivência [7]. IL-6 é importante para o crescimento do PCa no osso bem como para a progressão do tumor primário através da ativação cruzada de IGF (*insuline-like growth factor*) um dos fatores abundantemente libertados na osteólise da matriz [11]. Os seus níveis são significativamente mais elevados nos doentes com CRPC e metástases ósseas quando comparado com doentes com prostatite, HBP e tumores localizados e foram correlacionados com a evidência clínica e a extensão da doença metastática [46].

O EGFR (*epidermal growth factor receptor*) pode também contribuir para o ciclo vicioso. A sua expressão foi encontrada em 18% dos PCa e associada com estádios avançados e com a elevação recorrente dos níveis de PSA [47]. Ligandos do EGFR libertados da matriz após reabsorção ou secretados pelas células tumorais influenciam a proliferação e atividade das células ósseas [48]. Entre estes, EGF (*epidermal growth factor*), Twist1, TGF α e AREG (*amphiregulin*) estão associados com a estimulação da osteoclastogénese através do aumento da produção de RANKL pelas células do estroma [44,45]. Um estudo recente sugeriu que o EGFR está ligado à ativação de TWIST1 através da diminuição da atividade de miR-1, que atua como supressor tumoral [48]. A ativação das vias Ras, Akt e MAPK está relacionada com o aumento dos níveis dos vários ligandos do EGFR, promovendo a sua função, e, conseqüentemente, o crescimento tumoral [47].

De acordo com esta hipótese, as células tumorais produzem PTHrP, que pode causar um deslocamento na razão RANKL-OPN favorecendo a formação, atividade e sobrevivência de osteoclastos responsáveis pela reabsorção de osso e produção de TGF- β (*transforming growth factor – β*), o que constitui um estímulo para as células tumorais crescerem e produzirem ainda mais PTHrP, Jagged1, CTGF, IL-11 e MMPs [2]. Níveis aumentados de PTHrP encontram-se também em células que expressam a integrina $\alpha\beta6$, que promove a osteólise através da expressão de MMP2 [49].

Presumivelmente, o ciclo vicioso será mais complexo, uma vez que moléculas como o PTHrP e TGF- β podem afetar células imunes que por sua vez têm influência no turnover ósseo [2].

A figura seguinte (Figura 1) representa resumidamente as moléculas e os processos envolvidos no ciclo vicioso.

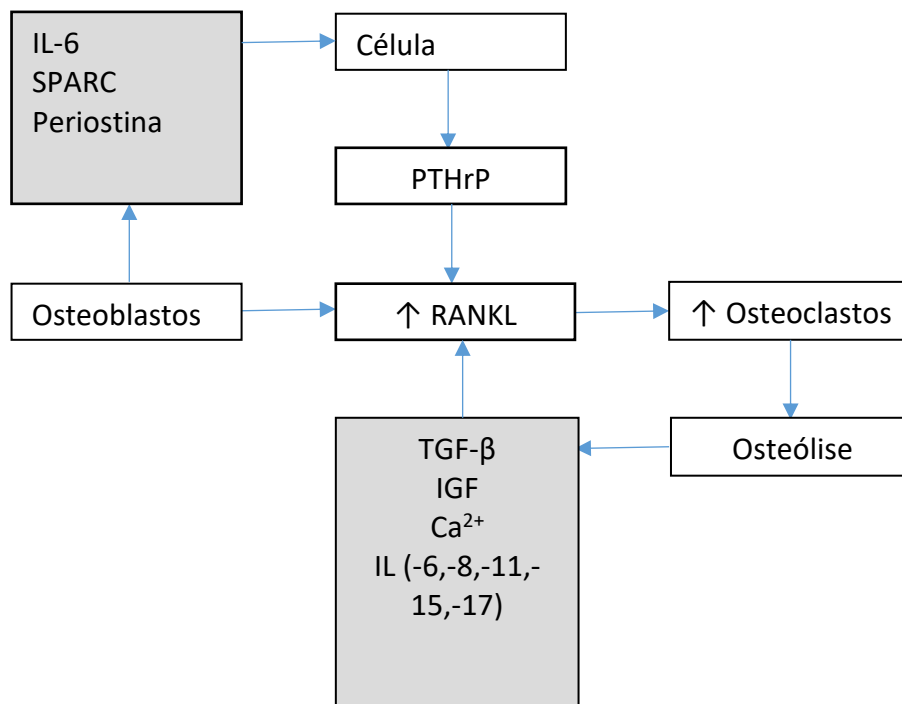


FIGURA 1 - PRINCIPAIS MOLÉCULAS E PROCESSOS ENVOLVIDOS NO CICLO VICIOSO

6.4. Microambiente Ósseo e Tumoral

As células e substâncias residentes no microambiente ósseo interagem com as células metastáticas do PCa e geram um “terreno fértil” para a sua fixação. Neste sentido, criam um “onco-nicho” que inclui osteócitos, osteoblastos, osteoclastos, células mesenquimais, endoteliais, adipócitos e células reticulares ricas em CXCL12. Uma vez estabelecidas, as células metastáticas estimulam os osteoblastos e outras células residentes a libertarem vários fatores de crescimento, aumentando de forma patológica os níveis de RANKL. O aumento subsequente da estimulação dos osteoclastos induz a libertação de fatores da matriz óssea,

incluindo endotelina-1, TGF- β e TNF- α que promovem, por sua vez, o crescimento e a proliferação das células tumorais [13].

Yu et al. demonstraram que RSK (*Ribosomal S6 protein kinase*) regula o crescimento do PCa no osso independentemente da sua ancoragem através da regulação de fatores que modulam a sobrevivência celular (genes relacionados com a apoptose), como ING3, CKAP2 e PTK6 [50].

Outras células do estroma interagem com as células metastáticas, incluindo os neurónios, plaquetas e células endoteliais da medula óssea.

No que diz respeito ao envolvimento do sistema nervoso, a ativação simpática resulta em dor incapacitante, bem como na colonização e proliferação tumoral [7]. O Sistema Nervoso Simpático (SNS) está envolvido em estádios precoces do desenvolvimento tumoral, e o Sistema Nervoso Parassimpático (SNPs) revelou ter um papel importante na metastização para o osso. A densidade de fibras nervosas simpáticas e parassimpáticas que rodeiam a próstata humana está associada com a agressividade do tumor e com um mau resultado clínico. A Leptina estimula o SNS a libertar noradrenalina que por sua vez atua nos recetores β -androgénicos (β ARs) na superfície dos osteoblastos diminuindo a sua atividade através da produção de espécies reativas de oxigénio. Os β ARs são expressos em várias células envolvidas no ciclo vicioso incluindo as células tumorais, osteoblastos, osteoclastos e macrófagos. A ativação de β ARs inibe a apoptose e promove a migração de células do PCa *in vitro* [11].

A maioria das metástases ósseas causa alterações catabólicas no turnover ósseo através do seu impacto no sistema imune e hematopoiético [2]. Algumas vias de sinalização mediadas por integrinas têm um papel central nestes mecanismos, incluindo a agregação plaquetar (α IIb β 3), mobilização celular imune/hematopoiética (VLA-4/osteopontina), neoangiogénese (α v β 3, α v β 5, α 6 β 4, integrina- β 1) e função do estroma (osteopontina/VLA-4) [29].

As células neoplásicas aderem às células endoteliais residentes e ativam a agregação plaquetar, induzindo a angiogénese, e influenciam a diferenciação de células mesenquimatosas em osteoblastos e outras linhagens mesenquimais [7]. Neste contexto, induzem a adesão e agregação plaquetar através de mecanismos envolvendo integrinas $\alpha_{IIb}\beta_3$, ADP, trombina, fator de von Willebrand e seletinas. As plaquetas representam uma fonte significativa de fatores pró-angiogénicos (VEGF) e anti-angiogénicos (TSP-1), bem como várias MMPs (incluindo MMP-1, -3 e -13), e são recrutadas para locais onde a sua agregação pode afetar o crescimento tumoral [29]. Plaquetas derivadas de doentes com PCa metastizado são mais reativas do que as presentes nos tumores primários e uma depleção plaquetar em modelos de PCa diminuíram a metastização e a osteogénese induzida pelo tumor [11].

Os megacariócitos (células precursoras das plaquetas) inibem a diferenciação osteoclástica através da libertação de fatores solúveis como a OPG, um inibidor endógeno de RANKL. Adicionalmente, influenciam a formação de osso através da estimulação da proliferação e diferenciação de osteoblastos, sugerindo que podem ter um papel importante no ciclo vicioso das metástases do PCa. Vários estudos neste sentido sugerem que os megacariócitos podem ser um fator protetor no PCa disseminado, mas é possível que possam, de igual forma, promover a metastização através do envolvimento plaquetar no processo [11].

A secreção de CCL5 pelas MSCs (induzida pelas células tumorais) e a sua estimulação por TGF α exógeno leva a um aumento significativo da libertação de fatores angiogénicos como a angiopoietina-2, G-CSF (*granulocyte-colony stimulating factor*), HGF (*hepatocyte growth factor*), IL-6, IL-8, PDGF-BB (*platelet-derived growth factor-BB*) e de HIF2 α , que altera sinais nos recetores de androgénios e aumenta a população de células progenitoras do PCa e a sua capacidade metastática [25].

As células da linhagem mieloide da medula óssea (macrófagos, monócitos, células dendríticas mieloides) migram para os tumores e contribuem para o seu crescimento, invasão e

angiogénese [29]. A diminuição da expressão de IFR7 nas células neoplásicas ajuda a acelerar a fixação e o crescimento do tumor através da supressão das respostas imunes mediadas por células T e NK. Células dendríticas plasmacitóides (pDCs) infiltram frequentemente tumores primários da próstata, e a sua ativação leva a níveis elevados de citocinas circulantes como IL-15, CCL5 e CCL2 que estimulam a atividade osteoclástica no osso. Estes dados sugerem que as pDCs têm um papel relevante na criação de nichos pré-metastáticos no osso e a depleção de pDCs in vivo diminuiu o número de metástases formadas. As células T $\gamma\delta$ estão envolvidas na vigilância tumoral e quando estimuladas podem expressar citocinas pró-inflamatórias que promovem a eliminação das células neoplásicas. Inibem também a formação dos osteoclastos através da produção de IFN- γ [11]. Yin et al. propuseram que a expressão de Fn14, um recetor da família TNF, sugere uma ligação entre as metástases ósseas do PCa e a inflamação, uma vez que a ativação do eixo TWEAK-Fn14 promove a inflamação local. A produção autócrina de TWEAK pelas células tumorais, em conjunto com os níveis de TWEAK provenientes das células inflamatórias residentes eleva significativamente os efeitos da promoção do eixo TWEAK-Fn14, que autonomamente regula a sobrevivência, proliferação, migração e expansão de progenitores do PCa. Um microambiente inflamatório promove o ciclo vicioso mediado pela interação entre as células do estroma, imunes, e elementos do tumor resultando na sobrevivência e proliferação das células neoplásicas [51].

As interações entre as células neoplásicas e o osso que envolvem a presença de hormonas esteroides ainda estão pouco estudadas. Sabe-se que as concentrações séricas de androgénios e outras hormonas sexuais não estão associadas a um aumento do risco de desenvolver PCa [19]. No entanto, dada a tendência acentuada do cancro da mama e do PCa – ambos sensíveis a esteroides – para formar metástases ósseas, a compreensão mais aprofundada destas interações poderá ser de grande valor [5].

Estudos em fase pré-clínica sugerem que a expressão de enzimas envolvidas no metabolismo da vitamina D são relevantes para o desenvolvimento e progressão do PCa. O hiperparatiroidismo secundário induzido pelo déficit severo de vitamina D promove a metastização das células do PCa [19].

Outra hipótese largamente inexplorada sugere que as células progenitoras mesenquimatosas (MSCs), que constituem 0.001% a 0.01% do compartimento medular e poderão sustentar o crescimento das metástases do PCa através da sua diferenciação em adipócitos. Células do PCa que se localizem em regiões da medula óssea ricas em lípidos aumentam a sua proliferação. Fisiologicamente, o número de adipócitos na medula óssea aumenta com a idade; neste contexto a doença óssea metastática desenvolve um ambiente ósseo rico em lípidos [10]. Desta forma, substâncias lipídicas específicas são fatores-chave para a progressão das células do PCa, funcionando como fatores pleiotrópicos capazes de estimular a proliferação, expressão genética, quimiotaxia e metabolismo energético. O ácido araquidônico (AA) e o seu precursor, ácido linoleico, podem estimular diretamente o crescimento in-vitro do PCa metastático. Foi demonstrado que um ambiente rico em AA pode contribuir para o desequilíbrio da homeostase óssea: metabolitos desta molécula estimulam a libertação de citocinas pelas células neoplásicas que favorecem a diferenciação de osteoblastos. Para além dos ácidos gordos, outros fatores libertados pelos adipócitos da medula óssea podem influenciar o fenótipo do PCa, incluindo citocinas pró-inflamatórias e adipocinas; no entanto, os dados disponíveis ainda são pouco consistentes [10].

As consequências das forças físicas geradas pelo crescimento tumoral no espaço restrito do microambiente ósseo são largamente desconhecidas e é necessária mais investigação nesta área. No entanto, Sottnik et al. sugerem que a pressão induzida pelo tumor poderá criar uma resposta pró-proliferativa e pró-invasiva nos osteócitos através do aumento da produção de CCL5 e MMPs (MMP2 e MMP9). Neste contexto, a expressão aumentada de CCL5 promove

a migração e invasão das células do PCa. As MMPs derivadas dos osteócitos proporcionam um mecanismo de libertação de nutrientes e contribuem para o desenvolvimento do ciclo vicioso associado à metastização do PCa [14].

A Tabela 1 resume as informações mais importantes relativamente ao papel dos diferentes tipos de células intervenientes na metastização do PCa.

TABELA 1 - TIPOS DE CÉLULAS E AS SUAS FUNÇÕES EM MECANISMOS DE METASTIZAÇÃO DO PCA

Tipo de Célula	Função	Referências
Exossomas	Orienta as células da MO para a criação do nicho pré-metastático; Induz a diferenciação de MSCs em fibroblastos;	[11]
HSCs	Comunicam com as células neoplásicas no osso; Podem ser estimuladas pelas células do PCa para se diferenciarem em osteoclastos; Promovem a diferenciação de MSCs em osteoblastos através da sinalização pelo PCa;	[5,9,11,45]
MSCs	Regulam o nicho de HSCs; Produzem DKK-1; Inibem a angiogénese e diminuem o crescimento pela inibição da ativação de Akt;	[9,11,25,26,28,56]
CAFs	Promovem o crescimento das células do PCa no osso;	[5,9,11,26,28]
Adipócitos	Aumentam a diferenciação, proliferação e mineralização osteoblástica;	[10,11,13]

	Promovem a migração e proliferação do PCa;	
Megacariócitos	Inibem a diferenciação osteoclástica; Estimulam a proliferação e diferenciação osteoblástica; Diminuem a proliferação de células tumorais e induzem apoptose;	[11]
Plaquetas	Aumentam a adesão tumoral ao endotélio; Libertam VEGF e TGF β Modulam a diferenciação osteoblástica e a formação de osso;	[7,11,29]
Células Dendríticas	Secretam citocinas que estimulam a atividade osteoclástica; Podem ser induzidas a estimular células T para inibir as células tumorais;	[11,29,64]
Linfócitos T	Expressam RANKL, estimulando a formação osteoclástica; Expressam INF- γ , que inibe a formação osteoclástica; Ativam células T $\gamma\delta$, que produzem citocinas pró-inflamatórias;	[62,64]
Sistema Nervoso	Aumenta a dor devido à estimulação osteoclástica de nociceptores; Reduz a atividade osteoblástica; Aumenta a expressão de RANKL nos osteoblastos, estimulando a formação de osteoclastos;	[11]

6.5. Hipóxia e Stress Oxidativo

Os membros da família HIF (*hypoxia inducible factor*) são fatores-chave na resposta às condições de hipóxia criadas no microambiente tumoral e podem promover o crescimento, angiogénese e metastização das células do PCa. O sistema tumoral de resposta à hipóxia pode ser desencadeado não só pelos baixos níveis de oxigénio mas também pela ativação de diferentes citocinas. Existem duas isoformas de HIF (HIF1 α e HIF2 α) mas a maioria dos estudos relacionados com o seu papel no carcinoma da próstata focam-se no HIF1 α . No entanto, um estudo sobre o papel de HIF2 α no PCa sugeriu que a indução da sua expressão pode levar ao aumento da interação entre HSP90 e AR (*androgen receptor*). Esta interação inibe a translocação nuclear e a ativação de AR que resulta na promoção da metastização [25].

HIF-1 α encontra-se aumentado nas células tumorais devido às condições de hipóxia no ambiente ósseo, o que resulta no aumento de CXCR4, VEGF e TWIST1. A atividade da CTSL tem um papel central na hipóxia e acidose criadas pelas células metastáticas na medula óssea [17].

Foi demonstrado que as condições de hipóxia são capazes de induzir EMT em células do PCa, através do aumento da expressão de biomarcadores mesenquimatosos neste contexto. Uma das vias importantes neste contexto é a Axl/GAS6, previamente mencionada, cuja ligação é estabilizada pela hipóxia, contribuindo para o processo de EMT. Adicionalmente, células neoplásicas estudadas em ambientes pobres em oxigénio adquirem mais facilmente um fenótipo migratório e invasivo, através da indução de fatores associados à desdiferenciação celular, como Nanog e EZH2 [22].

7. CRPC (*Castrate Resistant Prostate Cancer*)

O PCa é uma neoplasia dependente de AR no seu início e progressão, razão pela qual a terapêutica hormonal ocupa um lugar de destaque na sua abordagem [30]. Embora a maioria dos casos detetados precocemente através do rastreio antigénico sejam controláveis com terapêuticas locais, a doença metastática mantém-se incurável. Apesar da regressão inicial da doença com a hormonoterapia, estes tumores recorrem e progridem para CRPC, numa média de 18 a 24 meses [52], definido como a presença de doença que evolui apesar de níveis séricos de testosterona inferiores a 50 ng/dL, com o aparecimento de metástases ósseas que não cedem ao tratamento inicial [30]. Doentes com CRPC têm um prognóstico sombrio, com uma sobrevivência média de aproximadamente 14 meses [53].

Vários mecanismos moleculares são apontados como possíveis responsáveis pelo desenvolvimento deste tipo de PCa, entre os quais várias mutações dos AR, o aumento de diversos fatores de crescimento e a ativação de várias vias envolvidas na apoptose e na expressão de genes específicos. Alguns destes processos são apresentados com maior detalhe de seguida.

Como mencionado previamente, o aumento da expressão de cofatores e chaperones dos AR para compensar os baixos níveis de androgénios tem sido apontado como um dos principais mecanismos responsáveis por esta transformação [55]. Um componente essencial do complexo apo-AR, p23, modula os níveis citosólicos de AR na ausência de estimulação hormonal, aumentando a sua sinalização em múltiplos contextos e encontra-se aumentado em células do PCa [30]. A conversão de androgénios adrenais em testosterona e 5 α -dihidrotestosterona pelas células tumorais poderá estar envolvida neste processo. A activina A, uma proteína da família do TGF- β que é ubiquamente expressa no osso e modula o desenvolvimento da glândula prostática, encontra-se aumentada em doentes com PCa

metastizado e estimula a síntese intracelular de androgénios pelas células tumorais, contribuindo para o desenvolvimento de CRPC [19].

Várias evidências sugerem que a aquisição de independência aos androgénios pode ser devida ao aumento dos níveis de vários fatores de crescimento, nomeadamente EGFR [48] e Il-6 [46], e à desregulação de vias envolvidas na apoptose (Ras e Wnt) [56]. 100% dos CRPC metastáticos mostraram expressão elevada de EGFR, sugerindo que este fator tem um papel importante na progressão do PCa [47]. A atividade membranosa de SFK (*Src Family Kinases*) aumenta durante a transição para CRPC [57]. Da mesma forma, existem evidências de que as metástases ósseas adquirem resistência aos androgénios através da indução de BMP-6 pela expressão de Wnt5-A pelas células tumorais, através da via PKC/p52. Neste contexto, BMP-6 permite a proliferação das células do PCa na ausência de androgénios através da interação com a β -catenina [52].

A expressão aberrante de alguns genes como AR, ETS, TP53 e PTEN foi verificada em 40 a 60% dos doentes testados num estudo de cohort realizado em 150 indivíduos afetados por CRPC. Neste contexto, foram identificadas novas alterações genómicas em PIK3CA/B, R-espondina, BRAF/RAF1, APC, β -catenina e ZBTB16/PLZF. Aberrações dos genes BRCA2, BRCA1 e ATM também foram identificadas com maior frequência (aproximadamente 20%) nestes doentes do que nos tumores primários da próstata [58].

As células envolvidas nesta forma de PCa (CRPC) têm capacidade osteogénica e sofrem um processo de *osteomimicry*. De igual forma, foi demonstrado recentemente que diversos fatores estimuladores derivados de osteoblastos (nomeadamente a OPG e MMP2), promovem o fenótipo metastático e osteogénico destas células, bem como a comunicação cruzada entre o tumor e o substrato ósseo [54].

Embora a quimioterapia com docetaxel permaneça a abordagem standard para o tratamento destes doentes, vários agentes têm sido aprovados recentemente. Sipuleucel-T, uma

vacina tumoral, tem sido indicada para o CRPC assintomático ou minimamente sintomático. Como mencionado previamente, o acetato de abiraterona e a enzalutamide inibem a sinalização androgénica associada à resistência à castração. Ambos estão indicados após a terapia com docetaxel, e a abiraterona encontra-se agora disponível para doentes que ainda não realizaram quimioterapia. Cabazitaxel encontra-se aprovado como alternativa em caso de falência do tratamento com docetaxel. Embora estes agentes influenciem positivamente o curso da doença, o CRPC mantém-se incurável e são necessárias novas terapêuticas [53].

8. Moléculas Intervenientes mais Relevantes

O Cálcio intervém na migração, sobrevivência e expansão das células tumorais e aumenta a expressão de PTHrP (*parathyroid hormone-related protein*) [2]. Além do seu aumento proveniente da reabsorção óssea envolvida no ciclo vicioso causar hipercalcemia associada ao tumor, níveis elevados de cálcio localmente estimulam a proliferação das células neoplásicas e o crescimento do tumor [19].

O PTHrP possui uma variedade de funções, entre as quais facilitar a progressão de muitos carcinomas que metastizam para o osso incluindo o PCa. Freemont et al reportaram um aumento na sua expressão nas lesões secundárias do PCa em relação ao tumor primário, sugerindo um papel potencial desta molécula na formação de metástases ósseas [8]. Neste contexto, ativa uma variedade de vias mitogénicas incluindo MAPK e PI3K/Akt e induz a produção de CCL2 pelos osteoblastos e outras células do estroma, que por sua vez estimula a produção de VEGF nas células tumorais e a angiogénese [7].

O TGF- β (*transforming growth factor- β*) controla muitos processos biológicos, entre os quais a embriogénese, respostas imunes e a remodelação óssea [59]. Pertence à superfamília TGF- β em conjunto com as BMPs, que têm um papel crucial na formação de osso e é libertado durante a reabsorção osteoclástica [59]. Vários estudos demonstraram um aumento da expressão de BMP-2/4,-6 e 7 em metástases do PCa. Os níveis de BMP-6 são elevados no PCa metastizado, mas normais na doença confinada ao órgão, e a sua elevada expressão em tumores primários da próstata está relacionada com um aumento das taxas de recorrência e diminuição da sobrevivência. Mais recentemente, foi demonstrado que as linhas celulares do PCa que desenvolvem metástases osteoscleróticas expressam maioritariamente BMP-6 [10]. No que diz respeito aos carcinomas, o papel do TGF- β pode ser complexo ou mesmo paradoxal: nos estádios iniciais inibe o crescimento celular e funciona como um supressor tumoral, enquanto tardiamente promove a invasão e metastização, em particular para o osso [60]. Estudos recentes

demonstraram que o aumento de TGF- β nas células do PCa aumenta a expressão de genes envolvidos no desenvolvimento de metástases ósseas como RANKL, RUNX2, CXCR4, CTGF e IL11 [26], bem como PTHrP, COX2 (*cyclooxygenase-2*) e VEGF [60]. O mesmo estudo revela que a proteína ligada à membrana PMEPA1a recruta R-SMADs e ligases de ubiquitina E3 (incluindo NEDD4, AIP4 e SMURF2), que inibem a sinalização de TGF- β por um mecanismo independente do proteassoma. O bloqueio de PMEPA1a (também referida como TMEPAI, STAG1 e N4wwBP4) aumenta a expressão de TGF- β e consequentemente a metastização óssea em modelos animais [60]. Uma cascata com expressão aberrante do TGF- β pode ter um efeito sinérgico com RAS, Wnt, Hedgehog, AR, o eixo FGF-2/FGFR-1, Akt e EGFR, num contexto de um fenótipo de PCa extremamente agressivo que promove a formação de lesões ósseas [26]. Um estudo de 2012 demonstrou que a inibição do TGF- β no PCa inibe o desenvolvimento de metástases [60].

A PMEPA1 (*prostate transmembrane protein androgen induced-1*) é uma proteína transcrita através do gene *PMEPA1*, com expressão aumentada pelo aumento de TGF- β . Em doentes com PCa, os níveis de PMEPA1 estão diminuídos na presença de doença metastática e valores reduzidos de PMEPA1 estão relacionados com uma diminuição da sobrevivência livre de metástases. Esta redução poderá ser devida a um mecanismo epigenético de silenciamento, nomeadamente a uma alteração no perfil de metilação da proteína. No entanto, é necessária mais investigação neste contexto. Vários estudos demonstraram que a PMEPA1 é um regulador negativo do TGF- β . Uma vez que o TGF- β atua como supressor tumoral em estádios precoces do PCa, é possível que a indução de PMEPA1 por fatores ambientais nessa fase (por exemplo TGF- β , androgénios) diminua a sinalização do TGF- β , impedindo o acesso do tumor às suas propriedades anticancerígenas [60].

Embora a via do Wnt esteja envolvida na embriogénese e na homeostase de vários tecidos, várias evidências mostram o seu envolvimento em processos tumorais. A ligação do

Wnt a um complexo de recetores transmembranares ativa uma cascata de acontecimentos que leva ao bloqueio da fosforilação da β -catenina. Na sua forma hipofosforilada, esta molécula é mais estável, acumulando-se no citoplasma e no núcleo, onde regula a expressão transcricional de genes-alvo. Durante o estudo desta via no contexto de várias doenças ligadas ao osso, foi demonstrado que tem um papel central na diferenciação de osteoblastos a partir de células progenitoras, e, portanto, na formação de metástases osteoblásticas [61]. Assim, as células do PCa expressam várias moléculas pertencentes à superfamília Wnt, como Wnt3a, Wnt7b e Wnt10b, que estão fortemente envolvidas em fases precoces da diferenciação osteoblástica [11]. Através da ativação de CRIM1, a via Wnt propicia o tropismo do PCa para o osso facilitando a interação entre as células metastáticas e os osteoblastos [61]. O DKK1 (um inibidor do Wnt), como referido anteriormente, é altamente expresso nas lesões osteolíticas e nos tumores primários, mas é suprimido pelo PTHrP no PCa avançado, potenciando o fenótipo osteoblástico observado nestes casos [7]. Foi demonstrado que o envolvimento das MSCs em metástases osteoblásticas pode estar dependente da sinalização Wnt, nomeadamente da Wnt7b expressa nas células do PCa. No entanto, como as MSCs são uma potencial fonte de DKK1, são necessários mais estudos que permitam compreender este mecanismo. A ativação sinérgica das vias Wnt e Ras tem vindo a ser considerada um evento chave no PCa invasivo através do aumento da expressão de COX-2 e c-Myc. Um dos fatores intervenientes, o TCF-7 (*transcription factor-7*) promove a atividade oncogénica da via Wnt [56].

A Endotelina-1 (ET-1), uma proteína pertencente à superfamília das endotelinas, está frequentemente aumentada em casos de PCa avançado, onde estimula a proliferação e função dos osteoblastos e reduz a atividade osteoclástica. Em conjunto com o TGF β 1 e a diminuição da expressão de DKK-1 promove a diferenciação das células do estroma e osteoblastos [10].

A OPN é uma proteína expressa e libertada pelas células do PCa e a sua expressão está relacionada com o tropismo ósseo. Intervém em diferentes mecanismos fisiológicos, incluindo

a resposta imune, reparação de lesões, homeostase vascular, remodelação óssea e funções renais. Nos tecidos mineralizados, a OPN é secretada pelos osteoblastos e osteoclastos, particularmente nos locais de deposição de osso recentemente formado onde promove a reabsorção, inibição da deposição mineral, estimulação da osteoclastogénese e facilitação da migração e adesão de osteoclastos. No entanto, esta atividade osteoclastogénica verifica-se apenas em condições particulares, nomeadamente na osteoporose pós-menopausa e na falta de stress mecânico (atrofia). O papel da OPN na metastização implica uma ação direta nas células do PCa, de uma forma autócrina, conferindo uma melhor performance adesiva e invasiva às células neoplásicas. A maioria destas funções são estimuladas pela ligação a integrinas ($\alpha\beta3$, $\alpha\beta1$, $\alpha\beta5$, $\alpha4\beta1$, $\alpha9\beta1$, $\alpha8\beta1$) e pela interação com CD44 expresso pelas células tumorais [10].

A BSP é produzida pelos osteoblastos, osteoclastos e osteócitos durante a morfogénese e homeostase do osso. Facilita a mineralização e estimula a diferenciação osteoblástica e a reparação óssea. É expressa de forma aberrante numa variedade de tumores osteotrópicos e nas células do PCa uma expressão elevada de BSP está relacionada com o aumento do potencial invasivo. A ligação de integrinas a esta proteína estimula a adesão à matriz óssea extracelular e à proliferação das células metastáticas [10].

A Osteonectina (ON), também conhecida como SPARC (*secreted protein acidic cysteine-rich*) é uma proteína de ligação ao colagénio dependente de cálcio particularmente abundante no osso. As células epiteliais prostáticas expressam baixos níveis de ON, mas os seus níveis aumentam consideravelmente nos locais metastáticos. A sua expressão está associada à ativação de $\alpha\beta3$ e $\alpha\beta5$, libertação de MMPs e aumento do potencial migratório e invasivo. No entanto, a função da ON na metastização ainda é pouco compreendida e paradoxal, uma vez que há evidências de que a sua expressão no ambiente ósseo limite o crescimento tumoral através da modificação do colagénio tipo I, que é fundamental na promoção da

proliferação das células metastáticas. Da mesma forma, um ambiente rico em ON pode influenciar negativamente a osteoclastogênese, bloqueando o desenvolvimento do ciclo vicioso. Por esta razão, a proliferação das células do PCa pode estar dependente do processamento enzimático da ON. Neste sentido, provou-se que a catepsina K libertada pelas células neoplásicas é capaz de clivar a Osteonectina [10].

O potencial envolvimento da via *Notch/Jagged* na formação de metástases ósseas pelo PCa advém de evidências recentes que mostram que as células metastáticas expressam níveis elevados de *Jagged-1* e do seu recetor *notch-1* quando comparadas com as células benignas dos tecidos prostáticos ou dos tumores primários [10].

Os microRNAs têm vários papéis importantes nos processos biológicos das células tumorais no que diz respeito à regulação pós-transcricional de genes-alvo. Alterações na sua expressão causam perda de funções supressoras de tumor ou aumento de atividades oncogénicas que afetam a progressão tumoral. miR-1 é o miR menos expresso nos tecidos do PCa em comparação com tecidos prostáticos não cancerígenos e é proposto como um elemento supressor de tumor e como marcador de prognóstico do PCa [48]. O aumento da expressão de miR-21 e a perda do aglomerado miR15/miR16 promove a colonização do osso através da potenciação da sinalização pelo TGF- β . As principais características das células de PCa em que ocorre este fenómeno são o aumento do potencial agressivo, a desdiferenciação e a aquisição de uma EMT marcada, indicando que estas alterações colaboram de forma sinérgica para maximizar a malignidade destas células. A expressão aumentada de miR-21 promove o crescimento hormono-dependente e hormono-independente do PCa [26]. A família miR-34 mostrou ter um papel apoptótico e anti proliferativo, funcionando como supressor de tumor, e a sua inativação foi reportada nas células malignas do PCa [56]. A ativação de miR-203 inibe a formação de metástases ósseas e induz a apoptose das células neoplásicas do PCa [47].

O TWIST1 é um fator de transcrição com expressão aumentada em muitos tumores sólidos agressivos, incluindo um grupo de PCa avançados, nos quais está associado a graus de Gleason superiores. Em contraste, a sua subexpressão em CRPCs aumentou a sensibilidade aos fármacos anti-cancerígenos e reduziu o potencial migratório e invasivo das células neoplásicas [48].

O RUNX2 (*Runt-related transcription factor 2*), fator de transcrição envolvido na fisiologia normal do osso, encontra-se anormalmente elevado nas células do PCa. A sua presença, nestes casos, está positivamente relacionada com um score de Gleason superior e com um aumento do potencial metastático. Desta forma estimula o crescimento, migração e atividade osteolítica de tumores da mama e da próstata. Os seus efeitos nas células neoplásicas são similares aos descritos previamente para os osteoblastos. Como demonstrado por Ge et al., a sua fosforilação no mesmo local que ativa a diferenciação dos osteoblastos é crucial para a estimulação de genes associados à metastização [12].

9. Perspetivas Futuras

9.1. Diagnóstico e Prognóstico

A metastização do PCa é responsável pela vasta maioria das mortes relacionadas com este tumor. Por este motivo, identificar a população em risco de desenvolver PCa avançado e prevenir a formação de metástases é um dos maiores desafios da oncologia atual [39].

O CXCR4 tem sido apontado como biomarcador diagnóstico de PCa, e está significativamente associado ao tamanho do tumor. A sua expressão está associada com a metastização para gânglios linfáticos e para o osso e é um marcador de mau prognóstico para estes doentes [18]. Pelos mesmos motivos, o gene PBK e a via p38 [44] são apontados como potencial biomarcador num estudo recente [16]. De forma semelhante, a dinâmica dos miRNAs não se correlaciona diretamente com os scores de Gleason ou com os níveis de PSA, sugerindo que o seu estudo poderá adicionar alguma informação às análises convencionais. O papel funcional dos miRNA na biologia tumoral tem sido investigado e existem muitas evidências de que estes possam ser usados como biomarcadores para a previsão do comportamento clínico e/ou monitorização da resposta terapêutica do PCa [26]. Entre estes, o miR-34 poderá ter importância em doentes com PCa dependente de Ras [56]. Gururajan et al. identificaram miRs no aglomerado DLK1-DIO3 (*delta-like 1 homolog-deiodinase, iodothyronine 3*), nomeadamente o miR-154 e o miR-379, aumentados nas células do PCa, com potencial para funcionarem como marcadores de prognóstico [27].

Um estudo recente sugeriu que a expressão de RANK, RANKL e OPG pode ser usada como marcador de diagnóstico para identificar doentes com elevado risco de PCa agressivo [62].

Estudos realizados com células de PCa biopsadas mostraram uma associação entre o eventual desenvolvimento de lesões metastáticas e a elevada expressão nuclear de p23 em tumores com graus de Gleason ≤ 7 . Estes dados sugerem que esta molécula poderá vir a ser

usada como um indicador de prognóstico no futuro em doentes com graus de Gleason reduzidos [30].

Hansen et al. sugeriram recentemente que a proteína ALCAM (*Activated Leucocyte Cell Adhesion Molecule*), que se encontra elevada através da sinalização por TGF- β (mediada pela ADAM17), está aumentada e é um dos mecanismos responsáveis pelo aumento do potencial metastático das células do PCa, podendo vir a funcionar no futuro como um fator prognóstico [63].

PCa e resultados adversos têm sido associados ao défice de vitamina D e ao hiperparatiroidismo secundário. Embora concentrações elevadas de vitamina D pré-diagnóstico possam ser relacionadas com um melhor prognóstico, aumentos nos níveis de PTH (*Parathyroid Hormone*) correspondem a um aumento de 43% no risco de desenvolver a doença [19].

9.2. Tratamento

No futuro, uma compressão mais abrangente do nicho metastático e das moléculas envolvidas em todo o processo de metastização irá facilitar o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para prevenir ou mesmo curar lesões ósseas metastáticas, que de outra forma seriam fatais [9].

Estes avanços fornecem meios para a prevenção terapêutica da formação de metástases ósseas tendo como alvo mecanismos moleculares que envolvam CXCL12 ou VCAM-1 [17]. Nos últimos anos, houve um aumento significativo de ensaios clínicos com antagonistas CXCL12/CXCR4 e o seu papel anticancerígeno. O Nox-A12, um antagonista CXCL12, encontra-se atualmente em fase III, em testes clínicos aplicados a doentes com melanoma, um tipo de tumor conhecido por provocar osteólise. A ativação do PPAR- α (*peroxisome proliferator-activated receptor α*) com Wy14643 inibiu VCAM-1, impedindo as interações

com HSCs no nicho hematopoiético e promovendo a sua mobilização. A inibição de VCAM-1 em doentes com PCa pode prevenir a extravasão e adesão de DTCs aos nichos hematopoiéticos e deve ser investigada no futuro. Terapêuticas contra as vias do VCAM-1 ou do CXCL12/CXCL4, combinadas com terapia dirigida a citocinas (Tocilizumab, um anticorpo monoclonal anti-IL-6) podem ser úteis para atenuar a progressão do PCa [11]. O uso de agente mobilizadores de HSCs no nicho hematopoiético (como o AMD3100) em conjunto com a quimioterapia convencional tem sido testado numa tentativa de eliminar as células neoplásicas em estado de dormência resistente à quimioterapia e diminuir o crescimento de metástases já estabelecidas. Uma vez que as células metastáticas colonizam em primeiro lugar as zonas ricas em osteoblastos, usar estas regiões como um alvo terapêutico poderá ser uma estratégia útil na prevenção da formação de metástases ósseas [45].

Estudos pré-clínicos de terapêuticas anti-VEGF, como o bevasuzimab, inibiram com sucesso o crescimento das células do PCa no osso. Adicionalmente, a expressão de MET pode ser aumentada através da inibição do VEGF, razão pela qual o bloqueio das duas vias com carbozantemib, por exemplo, poderá superar estes efeitos [11].

Uma das vias que poderá servir como alvo é a via dos fatores de crescimento dos fibroblastos (FGFs – *Fibroblasts growth factors*). A expressão aberrante de ligandos e recetores FGF leva à ativação constitutiva de múltiplas cascatas moleculares envolvidas na progressão do PCa, nomeadamente as já mencionadas MAPK/ERK, PI3K/AKT. A investigação neste âmbito levou ao desenvolvimento de novas terapêuticas que bloqueiam estas vias, com dois fármacos inibidores de tirosina cinase (TKIs) em fase II de ensaios clínicos – dovitinib e nintedanib. Uma potencial vantagem destes fármacos é a sua capacidade para inibir simultaneamente outros recetores de tirosina cinase com propriedades angiogénicas, como o VEGFR e o PDGFR. Os resultados preliminares destes estudos apontam-nos como uma estratégia promissora para o tratamento do CRPC [53].

Vários estudos em fase pré-clínica estão a investigar a reprogramação da polarização dos macrófagos com fenótipo M2 para M1, marcando NF- κ B e COX-2 como possíveis alvos terapêuticos. Estudos animais indicaram que bifosfonatos contendo nitrogénio (por exemplo o ácido zoledrónico) reduzem MMP-9, provocam uma expansão das células T $\gamma\delta$ e dirigem TAMs para um fenótipo M1, através de um mecanismo ainda desconhecido. A supressão efetiva da migração celular das células do PCa pela OPG através do bloqueio da atividade de RANKL representa uma estratégia terapêutica potencial [62].

Atuar no SNS, em particular em β ARs com agentes beta-bloqueantes poderá contribuir para a nossa capacidade em tratar metástases do PCa. Em vários estudos retrospectivos, o uso de beta-bloqueantes aumentou a sobrevivência numa variedade de tumores sólidos, incluindo o PCa em doentes a receber terapia de privação de androgénios [11]. Um estudo recente demonstrou a existência de reações cruzadas entre ARs e o SRF (*serum response factor*), um co-modulador destes recetores, poderá estar relacionada com o surgimento de CRPC e o seu uso como alvo terapêutico poderá ter utilidade no futuro [64]. Os transplantes autólogos de células dendríticas “modeladas” provaram ser uma estratégia eficaz para estimular o reconhecimento imuno-mediado pelas células T e atacar as células agressivas do PCa, aumentando a sobrevivência global destes doentes [64].

Foi demonstrado que KGP94, uma molécula inibidora do CTSL, tem o potencial de diminuir a progressão da doença metastática do PCa e os SREs associados e poderá ter utilidade no tratamento do PCa avançado [17]. Da mesma forma, nos últimos anos foi demonstrado que a inibição preferencial de RSK bloqueia a proliferação de PCa sensível a androgénios e de CRPC, sugerindo a sua possível aplicabilidade terapêutica. Foram identificadas 3 classes diferentes de inibidores desta molécula, nomeadamente SL0101, FMK e BI-D1870, que se mantêm em estudos em fase pré-clínica [50]. Uma série de estudos realizados por Pavese et al. identificaram a sequência TGF- β , MAP2K4, p38 MAPK, HSP27 (*heat shock protein 27*) e

MMP2 como estando envolvida na invasão promovida pelo PCa. Esta via pode ser inibida pela genisteína, revelando assim um possível interesse terapêutico [24]. Estudos realizados recentemente demonstraram que o inibidor de múltiplos RTKs (incluindo c-kit) e VEGF, Cabozantinib (XL184), pode prolongar a sobrevivência e melhorar os resultados imagiológicos de doentes com CRPC [31].

A interrupção da interação entre MSCs da medula óssea e as células neoplásicas e a consequente interrupção da sua conversão para CAFs através da inibição do sinal produzido por TGF β 1 poderá resultar na supressão da progressão do PCa [28].

Induzir ou manter as células disseminadas num estado indolente de dormência é uma perspectiva clinicamente atrativa. No entanto, o desenvolvimento de uma abordagem terapêutica neste sentido requer um conhecimento profundo dos mecanismos que regulam o fenómeno de dormência [43].

Park et al. demonstraram que o dasatinib e saracatinib, ambos inibidores de SFKs, induzem uma redução de 50% no crescimento de várias linhagens de células de PCa in vitro. Apesar do seu efeito anti-proliferativo, os inibidores da atividade de SFKs têm um efeito citotóxico minor nas células tumorais [57].

A identificação de vários mecanismos intervenientes na aquisição de insensibilidade aos androgénios pelas células do PCa (CRPC) torna-os num alvo atrativo para abordagens terapêuticas [48]. O papel da terapia de privação hormonal na promoção da EMT necessita de ser esclarecido no sentido de justificar a aplicabilidade destes regimes terapêuticos, combinados ou em monoterapia [19].

10. Conclusão

A elevada prevalência do carcinoma da próstata tem justificado a insistência da comunidade científica na pesquisa de novas abordagens terapêuticas para esta doença. No entanto, a complexidade dos mecanismos fisiopatológicos que a constituem, bem como a limitação do conhecimento teórico e tecnológico atual representam os principais entraves à inovação farmacológica e/ou interventiva neste domínio. Neste contexto, nos anos mais recentes, os modelos animais têm constituído a forma mais eficaz de estudar a fisiopatologia da doença metastática do PCa, nomeadamente através da utilização de ratinhos imunodeprimidos. Para além disso, são ainda utilizados no estudo de potenciais novas terapêuticas, embora com algumas limitações.

No futuro, o objetivo passará cada vez mais pelo desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes, que nos permitam melhorar a qualidade e a esperança de vida destes doentes. Para tal, será necessário manter o esforço para aprofundar o conhecimento acerca de todas as moléculas e mecanismos envolvidos no desenvolvimento da doença inicialmente e posteriormente de CRPC, cujos processos ainda não são completamente conhecidos, no sentido de individualizar progressivamente a terapêutica, dirigindo-a às características e condições específicas de cada doente.

11. Lista de Acrónimos

ALCAM – Activated Leucocyte Cell Adhesion Molecule

ALP – Alkaline Phosphatase

APPPI – Triphosphoric Acid I Adenosin-5'-yl-ester-3

AR – Androgen Receptor

BALP – Bone-specific Alkaline Phosphatase

BGLAP – Bone Gamma-carboxyglutamic Acid-containing Protein

BMP – Bone Morphogenetic Protein

BSP – Bone Sialoprotein

CAF – Cancer Associated Fibroblasts~

COX2 – Cyclooxygenase 2

CRPC – Castrate-Resistant Prostate Cancer

CTSL – Catepsine L

DKK – Dickkopf-1

DLK 1 DIO 3 – Delta-like 1 Homolog-deiodinase iodothyronine 3

DMP – Dentin Matrix Protein

DSPP – Dentin Sialoprotein

DTC – Disseminated Tumor Cells

EGFR – Epidermal Growth Factor Receptor

EMT – Epithelial Mesenchymal Transition

ESL1 – E-selectin Ligand

FGF – Fibroblast Growth Factors

FPPS – Farnesyl Pyrophosphate Synthase

FRS2- α – FGF receptor Substrate 2- α

FT – Human Fucosyltransferase

GAS6 – Growth Arrest Specific

HGF – Hepatocyte Growth Factor

HIF – Hypoxia Inducible Factor

HSC – Hematopoietic Stem Cells

IGF – Insuline-like Growth Factors

IL – Interleukin

MAPK – Mitogen-activated Protein Kinase

MCP – Monocyte Chemoattractant Protein

M-CSF – Macrofage-colony stimulating factor

MLCK – Myosin Light Chain Kinase

MMP – Matrix Metalloproteinase

MSC – Mesenchymal Stem Cells

OC – Osteocalcin

ON - Osteonectin

OPN – Osteopontin

PAP – Prostatic Acid Phosphatase

PBK – PDZ domain-binding Kinase

PCa – Prostate Cancer

PDC – Plasmocitoid Dendritic Cells

PDGF – Platelet-derived growth factor

PINP – Pro-collagen Propeptides

PKC – Protein Kinase C

PMEPA – Prostate Transmembrane Protein Androgen Induced

PPAR – Peroxisome Proliferator-activated Receptor

PSA – Prostate-Specific Antigen

PTHrP – Parathyroid Hormone Related Protein

RANK – Receptor Activator of Nuclear factor Kappa B

RSK – Ribosomal S6 Protein Kinase

RTK – Receptor Tyrosine Kinase

RUNX2 – Runt-related Transcription Factor-2

SDF – Stromal Cell-derived Factor

SENP – SUMO-Specific Protease

SFK – Src Family Kinase

SIBLING – Small Integrin-binding Ligand N-linked Glycoprotein

SPARC – Secreted Protein Acidic Cysteine-rich

SRE – Skeletal Related Events

SRF – Serum Response Factor

TAMs – Tumor Associated Macrophages

TGF – Transforming growth factor

TNF – Tumor Necrosis Factor

TSP-1 – Trombospondin-1

UPA – Urokinase-like Plasminogen Activator

VCAM – Vascular Cell Adhesion Molecule

WISP – Wnt-induced secreted Protein-1

WNT – Wingless-type Protein

12. Agradecimentos

Ao Dr. Carlos Rabaça e à Professora Doutora Anabela Mota Pinto, agradeço a oportunidade que me deram de desenvolver este tema, a orientação técnica e científica, e todo o apoio e disponibilidade que demonstraram ao longo dos últimos meses.

À Dra. Leonor Salguinho, agradeço toda a ajuda no trabalho de secretariado.

Agradeço também aos meus amigos e família, que têm sido o meu apoio ao longo destes anos de curso, sem os quais nada disto seria possível.

13. Referências Bibliográficas

- [1] R. L. Siegel, K. D. Miller, and A. Jemal, “Cancer statistics,” *CA Cancer J Clin*, vol. 66, no. 1, pp. 7–30, 2016.
- [2] R. Gruber, “Reader’s digest of the pathophysiology of bone metastases,” *Wiener Medizinische Wochenschrift*, vol. 162, no. 17–18, pp. 370–373, 2012.
- [3] J. El-amm and J. B. Aragon-ching, “Targeting Bone Metastases in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer,” vol. 10, pp. 11–19, 2016.
- [4] “Prostate Cancer,” *DynaMed Plus*, 2016. [Online]. Available: <http://www.dynamed.com/login.aspx?direct=true&site=DynaMed&id=114483>. [Accessed: 24-Oct-2016].
- [5] L. R. Patel, D. F. Camacho, Y. Shiozawa, K. J. Pienta, and R. S. Taichman, “Mechanisms of cancer cell metastasis to the bone: a multistep process.”
- [6] G. G. Lin and J. G. Scott, “Steps in Prostate Cancer Progression that lead to Bone Metastasis,” vol. 100, no. 2, pp. 130–134, 2012.
- [7] B. Ell and Y. Kang, “SnapShot: Bone metastasis,” *Cell*, vol. 151, no. 3, p. 690–690.e1, 2012.
- [8] W. M. Ongkeko *et al.*, “Parathyroid hormone related-protein promotes epithelial-to-mesenchymal transition in prostate cancer,” *PLoS One*, vol. 9, no. 1, 2014.
- [9] G. Ren, M. Esposito, and Y. Kang, “Bone metastasis and the metastatic niche,” vol. 33, no. 4, pp. 395–401, 2015.
- [10] N. Rucci and A. Angelucci, “Prostate cancer and bone: The elective affinities,” *Biomed Res. Int.*, vol. 2014, 2014.
- [11] L. M. Cook, G. Shay, A. Aruajo, and C. C. Lynch, “Integrating new discoveries into the ‘vicious cycle’ paradigm of prostate to bone metastases,” *Cancer Metastasis Rev.*, vol. 33, no. 2–3, pp. 511–525, 2014.

- [12] C. Ge *et al.*, “Role of Runx2 Phosphorylation in Prostate Cancer and Association with Metastatic Disease,” vol. 35, no. 3, pp. 366–376, 2016.
- [13] D. L. Suzman, S. A. Boikos, and M. A. Carducci, “Bone-targeting agents in prostate cancer,” *Cancer Metastasis Rev.*, vol. 33, no. 2–3, pp. 619–628, 2014.
- [14] Q. He, J. Johnston, J. Zeitlinger, K. City, and K. City, “Tumor-induced pressure in the bone microenvironment causes osteocytes to promote the growth of prostate cancer bone metastases,” vol. 33, no. 4, pp. 395–401, 2015.
- [15] G. G. Lin and J. G. Scott, “SMAD4–dependent barrier constrains prostate cancer growth and metastatic progression,” vol. 100, no. 2, pp. 130–134, 2012.
- [16] J. D. Brown-Clay, D. N. Shenoy, O. Timofeeva, B. V Kallakury, A. K. Nandi, and P. P. Banerjee, “PBK/TOPK enhances aggressive phenotype in prostate cancer via β -catenin-TCF/LEF-mediated matrix metalloproteinases production and invasion,” *Oncotarget*, vol. 6, no. 17, pp. 15594–609, 2015.
- [17] Q. He, J. Johnston, J. Zeitlinger, K. City, and K. City, “Cathepsin L inactivation leads to multimodal inhibition of prostate cancer cell dissemination in a preclinical bone metastasis model,” vol. 33, no. 4, pp. 395–401, 2015.
- [18] Q. Chen and T. Zhong, “The association of CXCR4 expression with clinicopathological significance and potential drug target in prostate cancer: A meta-analysis and literature review,” *Drug Des. Devel. Ther.*, vol. 9, pp. 5115–5122, 2015.
- [19] L. C. Hofbauer, T. D. Rachner, R. E. Coleman, and F. Jakob, “Endocrine aspects of bone metastases,” *Lancet Diabetes Endocrinol.*, vol. 2, no. 6, pp. 500–512, 2014.
- [20] M. K. H. Hong *et al.*, “Tracking the origins and drivers of subclonal metastatic expansion in prostate cancer,” *Nat. Commun.*, vol. 6, p. 6605, 2015.
- [21] F. G. Giancotti, “Mechanisms governing metastatic dormancy and reactivation,” *Cell*, vol. 155, no. 4, pp. 750–764, 2013.

- [22] R. L. Bitting and A. J. Armstrong, “The role of epithelial plasticity in prostate cancer dissemination and treatment resistance,” vol. 33, no. 0, pp. 441–468, 2014.
- [23] Y. Luo, X. Cui, J. Zhao, Y. Han, and M. Li, “Cells susceptible to epithelial-mesenchymal transition are enriched in stem-like side population cells from prostate cancer,” pp. 874–884, 2014.
- [24] J. M. Pavese *et al.*, “Mitogen-activated protein kinase kinase 4 (MAP2K4) promotes human prostate cancer metastasis,” *PLoS One*, vol. 9, no. 7, pp. 1–12, 2014.
- [25] J. Luo, S. O. Lee, Y. Cui, R. Yang, and L. Li, “Infiltrating bone marrow mesenchymal stem cells (BM-MSCs) increase prostate cancer cell invasion via altering the CCL5 / HIF2 α / androgen receptor signals,” vol. 6, no. 29, 2015.
- [26] D. Bonci *et al.*, “A microRNA code for prostate cancer metastasis.,” *Oncogene*, vol. 35, no. February, pp. 1–13, 2015.
- [27] M. Gururajan *et al.*, “MiR-154 and miR-379 in the DLK1-DIO3 MicroRNA mega-cluster regulate epithelial to mesenchymal transition and bone metastasis of prostate cancer,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 20, no. 24, pp. 6559–6569, 2014.
- [28] S. Wen, Y. Niu, S. Yeh, and C. Chang, “BM-MSCs promote prostate cancer progression via the conversion of normal fibroblasts to cancer-associated fibroblasts,” *Int. J. Oncol.*, vol. 47, no. 2, pp. 719–727, 2015.
- [29] J. Schneider, S. Amend, and K. Weilbaecher, “Integrins and bone metastasis: Integrating tumor cell and stromal cell interactions,” *Bone*, vol. 48, no. 1, pp. 54–65, 2012.
- [30] L. Querol Cano *et al.*, “The co-chaperone p23 promotes prostate cancer motility and metastasis,” *Mol. Oncol.*, vol. 9, no. 1, pp. 295–308, 2015.
- [31] M. B. Malterer, S. J. Glass, and J. P. Newman, “Bone-induced c-kit expression in prostate cancer: a driver of intraosseous tumor growth,” vol. 44, no. 3, pp. 735–745, 2008.

- [32] J. Liu *et al.*, “Hyperactivated FRS2 α -mediated signaling in prostate cancer cells promotes tumor angiogenesis and predicts poor clinical outcome of patients,” vol. 35, no. 14, pp. 1750–1759, 2016.
- [33] N. Kanharat and P. Tuamsuk, “Correlation between Microvascular Density and Matrix Metalloproteinase 11 Expression in Prostate Cancer Tissues : a Preliminary Study in Thailand,” vol. 16, no. January 2003, pp. 6639–6643, 2015.
- [34] W. Janni *et al.*, “Persistence of disseminated tumor cells in the bone marrow of breast cancer patients predicts increased risk for relapse--a European pooled analysis.,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 17, no. 9, pp. 2967–76, 2011.
- [35] A. T. Bui, F. Laurent, M. Havard, F. Dautry, and T. Tchénio, “Smad signaling and redox imbalance cooperate to induce prostate cancer cell dormancy,” *Cell Cycle*, vol. 14, no. 8, pp. 1218–1231, 2015.
- [36] J.-K. Jin *et al.*, “Talin1 phosphorylation activates β 1 integrins: a novel mechanism to promote prostate cancer bone metastasis.,” *Oncogene*, vol. 34, no. 14, pp. 1811–21, 2015.
- [37] L. Zhang, X. Hu, J. Chen, and G. Fu, “Impact of E6-associated protein on the proliferation and invasion of prostate cancer cells in bone metastasis,” vol. 8, no. 6, pp. 6571–6575, 2015.
- [38] H.-C. Tai *et al.*, “Osteoblast-derived WNT-induced secreted protein 1 increases VCAM-1 expression and enhances prostate cancer metastasis by down-regulating miR-126.,” *Oncotarget*, vol. 5, no. 17, pp. 7589–98, 2014.
- [39] S. Yasmin-Karim, M. R. King, E. M. Messing, and Y.-F. Lee, “E-selectin ligand-1 controls circulating prostate cancer cell rolling/adhesion and metastasis.,” *Oncotarget*, vol. 5, no. 23, pp. 12097–110, 2014.
- [40] J. Li *et al.*, “Human fucosyltransferase 6 enables prostate cancer metastasis to bone,” pp.

- 3014–3022, 2013.
- [41] S. P. David *et al.*, “Annexin 2-CXCL12 Interactions Regulate Metastatic Cell Targeting and Growth in the Bone Marrow,” *Cancer Res.*, vol. 25, no. 10, pp. 2586–2590, 2007.
- [42] Q. He, J. Johnston, J. Zeitlinger, K. City, and K. City, “PKC ϵ IS AN ESSENTIAL MEDIATOR OF PROSTATE CANCER BONE METASTASIS,” vol. 33, no. 4, pp. 395–401, 2015.
- [43] N. Ruppender *et al.*, “Cellular adhesion promotes prostate cancer cells escape from dormancy,” *PLoS One*, vol. 10, no. 6, pp. 1–16, 2015.
- [44] L. Chéry *et al.*, “Characterization of single disseminated prostate cancer cells reveals tumor cell heterogeneity and identifies dormancy associated pathways,” *Oncotarget*, vol. 5, no. 20, pp. 9939–51, 2014.
- [45] N. Wang *et al.*, “Prostate cancer cells preferentially home to osteoblast-rich areas in the early stages of bone metastasis: Evidence from in vivo models,” *J. Bone Miner. Res.*, vol. 29, no. 12, pp. 2688–2696, 2014.
- [46] S. Yu *et al.*, “A Paracrine Role for IL6 in Prostate Cancer Patients: Lack of Production by Primary or Metastatic Tumor Cells,” vol. 3, no. 10, pp. 1175–1184, 2016.
- [47] M. K. Siu *et al.*, “Loss of EGFR signaling regulated miR-203 promotes prostate cancer bone metastasis and tyrosine kinase inhibitors resistance,” *Oncotarget*, vol. 5, no. 11, pp. 3770–84, 2014.
- [48] A. N. V Nguyen *et al.*, “EGF Receptor Promotes Prostate Cancer Bone Metastasis by Downregulating miR-1 and Activating TWIST1,” vol. 77, no. 9, pp. 1571–1578, 2015.
- [49] A. Dutta *et al.*, “Integrin α v β 6 Promotes an Osteolytic Program in Cancer Cells by Upregulating MMP2,” vol. 74, no. 8, pp. 1598–1608, 2014.
- [50] G. Yu *et al.*, “RSK Promotes Prostate Cancer Progression in Bone through ING3, CKAP2 and PTK6-mediated Cell Survival,” *Mol Cancer*, vol. 13, pp. 348–357, 2015.

- [51] J.-J. Yin *et al.*, “AR-regulated TWEAK-FN14 Pathway Promotes Prostate Cancer Bone Metastasis,” *Cancer Res.*, vol. 74, pp. 4306–4317, 2014.
- [52] G. T. Lee *et al.*, “Prostate cancer bone metastases acquire resistance to androgen deprivation via WNT5A-mediated BMP-6 induction,” *Br. J. Cancer*, vol. 110, no. 6, pp. 1634–44, 2014.
- [53] P. G. Corn, F. Wang, W. L. Mckeehan, and N. Navone, “Targeting Fibroblast Growth Factor Pathways in Prostate Cancer,” vol. 19, no. 21, pp. 5856–5866, 2013.
- [54] M. Hagberg and T. Karin, “Osteoblasts stimulate the osteogenic and metastatic progression of castration-resistant prostate cancer in a novel model for in vitro and in vivo studies,” pp. 269–283, 2014.
- [55] A. Fradet *et al.*, “A New Murine Model of Osteoblastic / Osteolytic Lesions from Human Androgen-Resistant Prostate Cancer,” vol. 8, no. 9, pp. 1–11, 2013.
- [56] W. Chen *et al.*, “MicroRNA-34a regulates WNT / TCF7 signaling and inhibits bone metastasis in Ras-activated prostate cancer,” *Oncotarget*, vol. 6, no. 1, pp. 441–457, 2014.
- [57] A. Varkaris, A. D. Katsiampoura, J. C. Araujo, G. E. Gallick, and P. G. Corn, “Src signaling pathways in prostate cancer,” *Cancer Metastasis Rev.*, vol. 33, no. 2–3, pp. 595–606, 2014.
- [58] T. Saito and J. Sadoshima, “Integrative clinical genomics of advanced prostate cancer,” vol. 116, no. 8, pp. 1477–1490, 2016.
- [59] P. G. J. Fournier *et al.*, “The TGF β Signaling Regulator PMEPA1 Suppresses Prostate Cancer Metastases to Bone,” vol. 27, no. 6, pp. 809–821, 2016.
- [60] P. G. J. Fournier *et al.*, “The TGF-?? Signaling Regulator PMEPA1 Suppresses Prostate Cancer Metastases to Bone,” *Cancer Cell*, vol. 27, no. 6, pp. 809–821, 2015.
- [61] B. D. Hudson *et al.*, “SOST inhibits prostate cancer invasion,” *PLoS One*, vol. 10, no.

11, pp. 1–17, 2015.

- [62] X. Li *et al.*, “Potential role of the OPG/RANK/RANKL axis in prostate cancer invasion and bone metastasis,” *Oncol. Rep.*, vol. 32, no. 6, pp. 2605–2611, 2014.
- [63] A. Merkel, M. Pickup, S. Samaras, Y. Shyr, and H. L. Moses, “ALCAM/CD166 is a TGF-Beta responsive marker and functional regulator of prostate cancer metastasis to bone,” vol. 74, no. 5, pp. 1404–1415, 2015.
- [64] M. Prencipe *et al.*, “Relationship between Serum Response Factor and Androgen Receptor in prostate cancer,” vol. 75, no. 15, pp. 1704–1717, 2016.