



Università Campus Bio-Medico di Roma

Corso di Dottorato di Ricerca in
Patologia Osteo-Oncologica
XXVI ciclo anno 2011

**Analisi delle modificazioni del microambiente osseo
indotte dai trattamenti di “ultima generazione”
per il tumore della prostata metastatico.**

Michele Iuliani

Coordinatore
Chiar.mo Prof. Giuseppe Tonini

Tutore
Prof. Daniele Santini

25 Luglio 2014

INDICE

1. TUMORE DELLA PROSTATA	4
1.1 EPIDEMIOLOGIA E FATTORI DI RISCHIO	4
1.2 INSORGENZA E PROGRESSIONE DEL CARCINOMA PROSTATICO	5
2. TERAPIA DEL CARCINOMA PROSTATICO	9
2.1 ORMONOTERAPIA	9
2.2 TERAPIE "TRADIZIONALI" DELLE FORME "RESISTENTI ALLA CASTRAZIONE"	10
2.3 "NUOVE TERAPIE" NEL TRATTAMENTO DEL CARCINOMA PROSTATICO RESISTENTE ALLA CASTRAZIONE	11
2.3.1 ABIRATERONE NEL CARCINOMA DELLA PROSTATA	13
2.3.2 ENZALUTAMIDE NEL CARCINOMA PROSTATICO	14
2.3.3 CABOZANTINIB NEL CARCINOMA PROSTATICO	15
3. CARCINOMA PROSTATICO:METASTASI OSSEE	17
3.1 FISILOGIA DELLO SCHELETRO	17
3.2 FISIOPATOLOGIA DELLE METASTASI OSSEE	18
3.2.1 DIFFUSIONE DIRETTA DELLE CELLULE TUMORALI NEL TESSUTO SCHELETRICO	18
3.2.2 RILASCIO DI FATTORI CHE ALTERANO IL TURNOVER OSSEO DA PARTE DELLE CELLULE METASTATICHE	20
3.3 FATTORI ASSOCIATI AGLI OSTEOCLASTI	21
3.3.1 ASSE RANK/RANKL/OPG	21
3.3.2 ASSE RANK/RANKL/OPG NELLE NEOPLASIE	23
3.4 FATTORI ASSOCIATI AGLI OSTEOBLASTI	24
3.4.1 ENDOTELINA-1	24
3.4.2 WNT	25
3.4.3 PROTEINE MORFOGENETICHE DELL'OSSO	25
4. SCOPO DEL LAVORO	26
5. MATERIALI E METODI	27
5.1 MODELLI CELLULARI UTILIZZATI	27
5.2 COLTURE CELLULARI	27
5.2.1 LINEE CELLULARI TUMORALI	27
5.2.2 OSTEOCLASTI PRIMARI	28
5.2.3 OSTEOBLASTI PRIMARI	28
5.2.4 CO-COLTURE	30
5.3 TRATTAMENTI FARMACOLOGICI	30
5.4 COLORAZIONE CITOCHIMICA PER LA FOSFATASI ACIDA TARTRATO RESISTENTE (TRAP)	30
5.5 SAGGIO DI RIASSORBIMENTO OSSEO	31
5.6 COLORAZIONE CITOCHIMICA PER LA FOSFATASI ALCALINA (ALP)	31
5.7 COLORAZIONE CITOCHIMICA PER DEPOSITI DI CALCIO	

(ALIZARIN RED)	31
5.8 SAGGIO MTT	32
5.9 ESTRAZIONE DELL'RNA E RETROTRASCRIZIONE	32
5.10 REAL-TIME PCR	33
5.11 ESTRAZIONE DELLE PROTEINE	34
5.12 WESTERN BLOTTING	34
5.13 SAGGIO DI PROLIFERAZIONE (CURVE DI CRESCITA)	35
5.14 SAGGIO DI PROLIFERAZIONE (KI67)	35
5.15 SAGGIO DI APOPTOSI (TUNEL)	36
5.16 ANALISI STATISTICA	37
6. RISULTATI	38
6.1 ABIRATERONE ED ENZALUTAMIDE	38
6.1.1 EFFETTO SU LINEE CELLULARI DI CARCINOMA PROSTATICO	38
6.1.2 EFFETTO SUGLI OSTEOCLASTI UMANI PRIMARI	41
6.1.3 EFFETTO SUGLI OSTEOLASTI UMANI PRIMARI	45
7. DISCUSSIONE	49
8. RISULTATI	52
8.1 CABOZANTINIB	52
8.1.1 EFFETTO SU LINEE CELLULARI DI CARCINOMA PROSTATICO	52
8.1.2 EFFETTO DEL CABOZANTINIB SUGLI OSTEOCLASTI UMANI PRIMARI	53
8.1.3 EFFETTO DEL CABOZANTINIB SUGLI OSTEOLASTI UMANI PRIMARI	56
8.1.4 EFFETTO SULLE CO-COLTURE OSTEOLASTI-OSTEOCLASTI UMANI	59
9. DISCUSSIONE	60
10. CONCLUSIONI	62
11. BIBLIOGRAFIA	63

1. TUMORE DELLA PROSTATA

1.1 EPIDEMIOLOGIA E FATTORI DI RISCHIO

La maggior parte dei Registri Tumori rileva un aumento dell'incidenza del carcinoma prostatico, che attualmente, in molti Paesi occidentali, rappresenta il tumore più frequente di sesso maschile¹. In particolare nei paesi della Comunità Europea, il tasso d'incidenza del carcinoma prostatico è di 86,5 casi per 100.000 individui. Il rischio cumulativo di ammalarsi di tumore alla prostata, considerato fino all'età massima di 74 anni, è del 3,9%, e quello di morire per questa malattia è dell'1,2%². Anche in Italia il tumore della prostata è attualmente la neoplasia più frequente tra i maschi (20% di tutti i tumori diagnosticati) a partire dai 50 anni d'età³. Tale dato si spiega essenzialmente con l'aumentato uso, in forma di *screening*, della determinazione dell'antigene prostatico specifico (PSA); ciò suggerisce che buona parte dei carcinomi identificati in tal modo sia di fatto sovra diagnosticata e destinata, in assenza di *screening*, a non manifestarsi clinicamente nella vita (carcinoma "latente").

L'eziologia del carcinoma prostatico è multifattoriale ed è il risultato di una complessa interazione di fattori genetici (responsabili della familiarità e della diversa incidenza nelle razze umane) ed ambientali (fattori dietetici, cancerogeni presenti nell'ambiente). L'età avanzata e la presenza di ormoni androgeni biologicamente attivi nel sangue circolante e nel tessuto prostatico rappresentano ancora oggi le cause più rilevanti^{4,5}. I fattori meglio documentati sono:

- **l'età:** l'incidenza aumenta con l'età, generalmente insorge in soggetti con età superiore ai 50 anni e aumenta con l'invecchiamento;
- **la razza:** la razza nera è a più rischio per i più elevati livelli circolanti di androgeni, di diidrotestosterone (DHT) e di 5-reduccasi. Inoltre gli afro-americani sembrano sviluppare focolai di carcinoma più indifferenziati e a più rapida crescita con mortalità cancro-correlata superiore⁶;
- **fattori ormonali:** gli elevati livelli di testosterone e Insulin-like Growth Factor (IGF-1) esercitano un ruolo importante essendo il carcinoma prostatico androgeno dipendente⁴;
- **familiarità:** in circa il 25% dei pazienti vi è una storia familiare positiva di tumore alla prostata. Il rischio relativo (RR) di sviluppare malattia in un soggetto con parente di primo grado affetto da carcinoma prostatico è di circa 2 e sale a circa 5-11 se vi sono due o più parenti di primo grado affetti⁴;
- **fattori genetici:** il 9% circa dei tumori della prostata sono ereditari e il 43% si presenta in soggetti con età inferiore ai 55 anni. Diversi sono i geni individuati probabilmente responsabili di una maggiore suscettibilità al carcinoma prostatico nonché alterazioni cromosomiche come mutazioni puntiformi, "Loss of Heterozygosity" come quelle del braccio q del cromosoma 1,16,17,13, oltre che del cromosoma X e polimorfismi di geni (vitamina D e recettori degli androgeni)^{7,8}.

Recentemente è stato dimostrato che alcuni geni appartenenti alla famiglia dei fattori trascrizionali ETS (ERG,ETV,ETV4) risultavano iperespressi, in modo esclusivo, in campioni bioptici di

metastasi linfonodali di pazienti affetti da tumore prostatico. Si è pertanto ipotizzato che l'iperpressione potesse essere correlata ad un processo di traslocazione genica, essendo stato identificato un prodotto di fusione tra la regione 5' non tradotta del gene TMPRSS2, codificante per una serina proteasi di membrana specifica della prostata, e gli oncogeni ERG ed ETV1. Il promotore di TMPRSS2 contiene elementi responsivi agli androgeni e i geni ottenuti da questa fusione (TMPRSS2:ERG e TMPRSS2:ETV) sono stati identificati in modo specifico in tessuti tumorali prostatici ma non in campioni di iperplasia prostatica benigna⁹.

Altre alterazioni geniche sono quelle del gene oncosoppressore PTEN che risulta essere perso o mutato nel 70% delle neoplasie prostatiche coinvolto nella cascata di trasduzione dei segnali intracellulari che aumentano la sopravvivenza e la proliferazione cellulare¹⁰;

- **dieta:** è stata confermata da numerosi studi la notevole importanza dell'alimentazione: diete ricche di carni rosse e di grassi e povere di frutta, verdure e cereali con deficit di vitamina A ed E, oligoelementi e antiossidanti come licopene presente nei pomodori, sembrano responsabili di una più alta incidenza del tumore¹¹.

1.2 INSORGENZA E PROGRESSIONE DEL CARCINOMA PROSTATICO

La prostata è una ghiandola esocrina androgeno-dipendente organizzata in acini ghiandolari e suddivisa in una porzione basale e luminale. Il tessuto prostatico risulta costituito da uno strato epiteliale la cui funzione è quella di sintetizzare e secernere il liquido seminale, e da uno stromale in cui sono presenti fibroblasti, cellule muscolari lisce e vasi sanguigni.

Gli androgeni, ormoni sessuali maschili, sono responsabili sia della maturazione degli organi riproduttivi maschili che dello sviluppo dei caratteri sessuali secondari.

Il testosterone (T), l'androgeno sessuale maschile più rilevante, viene prodotto a livello del testicolo dalle cellule del Leydig e rappresenta circa il 90% degli androgeni totali circolanti mentre il rimanente 10% è sintetizzato dalla corteccia del surrene come diidroepiandrosterone (DHEA), androstenediolo e androstenedione, che vengono successivamente convertiti in testosterone nei tessuti periferici.

La produzione di testosterone è regolata dall'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi del sistema endocrino attraverso la produzione dell'ormone luteinizzante (LH) rilasciato dall'ipofisi anteriore a seguito della secrezione pulsatile dell'ormone ipotalamico Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH). Lo stesso testosterone controlla l'attività dell'asse attraverso un meccanismo di feedback negativo operato sia a livello dell'ipotalamo che dell'ipofisi.

Il testosterone è presente in circolo nella forma libera solo per il 2% circa, mentre il rimanente è veicolato nel circolo sistemico legato alle proteine plasmatiche come l'albumina ed a proteine carrier specifiche come la Sex Hormone Binding Globulin (SHBG)¹². Essendo una molecola lipofila, il testosterone è in grado di diffondere attraverso il doppio strato fosfolipidico della

membrana plasmatica della cellula target, dove viene rapidamente convertito attraverso l'azione catalitica della 5 α -reduttasi a DHT.

Sia il DHT che il testosterone possono legare il recettore degli androgeni (AR), normalmente mantenuto inattivo mediante il legame, alla regione Hormone Binding Domain (HBD), di Heat Shock Proteins (HSPs). Il legame con gli androgeni induce un cambio conformazionale nell'AR che porta alla dissociazione delle HSPs ed alla fosforilazione del recettore. Questo porta alla formazione di complessi omodimerici di AR, i quali possono migrare nel nucleo e legarsi agli elementi responsivi agli androgeni nella regione promotrice del gene bersaglio. Il complesso così formato recluta proteine coregolatrici, coattivatrici e corepressorie. I coatticatori permettono l'interazione del complesso di AR con l'apparato basale della trascrizione, per stimolare o inibire la trascrizione di geni bersaglio che modulano e promuovono la crescita cellulare¹³.

L'azione degli androgeni sulla prostata è, quindi, mediata dal testosterone plasmatico libero e dall'androgeno di maggior potenza, il DHT.

La conversione del T a DHT nel tessuto prostatico è catalizzata dall'enzima 5 α -reduttasi di Tipo II soprattutto a livello della componente stromale¹⁴, il quale viene, successivamente, trasportato a livello delle cellule epiteliali. Tra i due compartimenti esiste infatti una profonda relazione che porta ad avere uno sviluppo controllato della ghiandola prostatica. Questo "crosstalk" tra stroma ed epitelio è molto importante per la regolazione della crescita e dello sviluppo della prostata e per la risposta all'azione androgenica. Gli androgeni costituiscono quindi un fattore essenziale per la prostata, in quanto questo organo non può svilupparsi, differenziarsi, mantenere le dimensioni fisiologiche e funzionare in assenza di T e DHT.

Il recettore per gli androgeni è localizzato sia nella porzione epiteliale che in quella stromale e svolge diverse azioni: a livello del tessuto epiteliale l'AR controlla la proliferazione cellulare, induce differenziamento e regola le funzioni metaboliche e secretorie della prostata, mentre a livello stromale, AR regola la produzione di alcuni fattori di crescita come Epidermal Growth Factor (EGF), Fibroblast Growth Factor (FGF), Insuline-like Growth Factor (IGF), Neuropeptide Growth Factor (NGF), Keratinocyte Growth Factor (KGF), che vanno poi ad agire in modo paracrino sullo strato epiteliale regolandone positivamente la proliferazione delle cellule basali e proteggendo dall'apoptosi le cellule secretorie luminali¹⁵.

Molti studi suggeriscono l'esistenza di molti geni il cui livello di espressione subisce una variazione significativa in seguito all'esposizione delle cellule prostatiche agli androgeni^{16,17}. Uno di questi geni androgeno responsivi è quello che codifica per il Prostate Specific Antigen (PSA), una proteasi il cui dosaggio viene utilizzato come un importante marker clinico per lo studio dello sviluppo e dell'ipertrofia prostatica benigna (BPH) e della progressione del tumore prostatico (CaP). Oltre ad esso, sono stati identificati altri geni androgeno-regolati che comprendono: l'enzima regolatore del ciclo cellulare Cyclin-dependent kinase (Cdk-8), la subunità catalitica p85 della Phosphatidilinositol-3-Kinase (PI3K) e RAB4, membro della famiglia dell'oncogene Ras.

La crescita del tumore prostatico è, in fase iniziale, primariamente dipendente dagli androgeni; tali ormoni sono fondamentali per lo sviluppo e il mantenimento dell'epitelio prostatico normale non trasformato. Come precedentemente detto, essi circolano legati, in modo reversibile, alla proteina SHBG, ma la frazione considerata biologicamente attiva è rappresentata da una piccola percentuale di ormoni liberi. Essi agiscono attraverso la stimolazione della proliferazione e l'inibizione contemporanea dell'apoptosi. Pertanto il tumore della prostata dipende per la crescita e la sopravvivenza dal livello critico della stimolazione androgenica.

La modificazione genetica è un fattore cruciale per la progressione dei tumori e non fa eccezione a questa regola lo sviluppo del cancro della prostata androgeno-indipendente. Come altri tumori, i tumori della prostata si selezionano sulla base di variazioni genetiche che incrementano la probabilità di successive mutazioni. Un aumento generale nella quantità delle mutazioni potrebbe incrementare la probabilità di uno sviluppo di cellule con mutazioni tali da permettere la crescita indipendentemente dall'androgeno. Sono stati identificati alcuni potenziali pathway^{18,19}: (fig.1)

1) *Amplificazione*: l'espressione dell' AR è incrementata usualmente per amplificazione genica; l'AR presenta un aumento della sensibilità attraverso mutazioni che ne cambiano la configurazione tridimensionale per compensare i bassi livelli di androgeno; più testosterone è convertito nel più potente androgeno diidrotestosterone dall'azione della 5 α -reduttasi (la cui attività incrementa in seguito ad un aumento di espressione).

2) *Pathway "promiscui"*: la specificità dell'AR è ridotta così da poter essere attivato da molecole non androgeniche normalmente presenti nell'organismo (ormoni corticosteroidi o altre molecole simili).

3) *Pathway "fuorilegge"*: i Recettori Tirocin Chinasi (RTKs) sono attivati e AR è fosforilato sia dalla cascata AKT che da quella Mitogen Activated Protein Kinase-dipendente (MAPK), attivando così l'AR senza la presenza di ligandi naturali.

4) *Pathway "bypass"*: meccanismi di sopravvivenza alternativi, che coinvolgono ad esempio la proteina anti-apoptotica BCL2 fanno sì che non sia necessario AR o il suo ligando.

5) *Coattivatori*: alterazione del "balance" tra coattivatori e corepressori necessari per l'assemblaggio del macchinario trascrizionale dell'AR.

6) *Cellule staminali tumorali*: cellule cancerose androgeno-indipendenti che sono sempre presenti nella prostata, probabilmente cellule staminali tumorali presenti in maniera latente nel tumore e selezionate dalla terapia androgeno-soppressiva.

Inoltre, recentemente, sono state identificate diverse isoforme della proteina AR generate a causa di alterazioni nel processo di splicing che sono responsabili della progressione tumorale e della resistenza alle terapie. Infatti queste isoforme tronche sono costitutivamente attive e inducono l'espressione dei geni target in maniera indipendente dal ligando²⁰.

Il tumore prostatico, una volta progredito verso la fase di androgeno-indipendenza, manifesta resistenza alle terapie ormonali convenzionali.

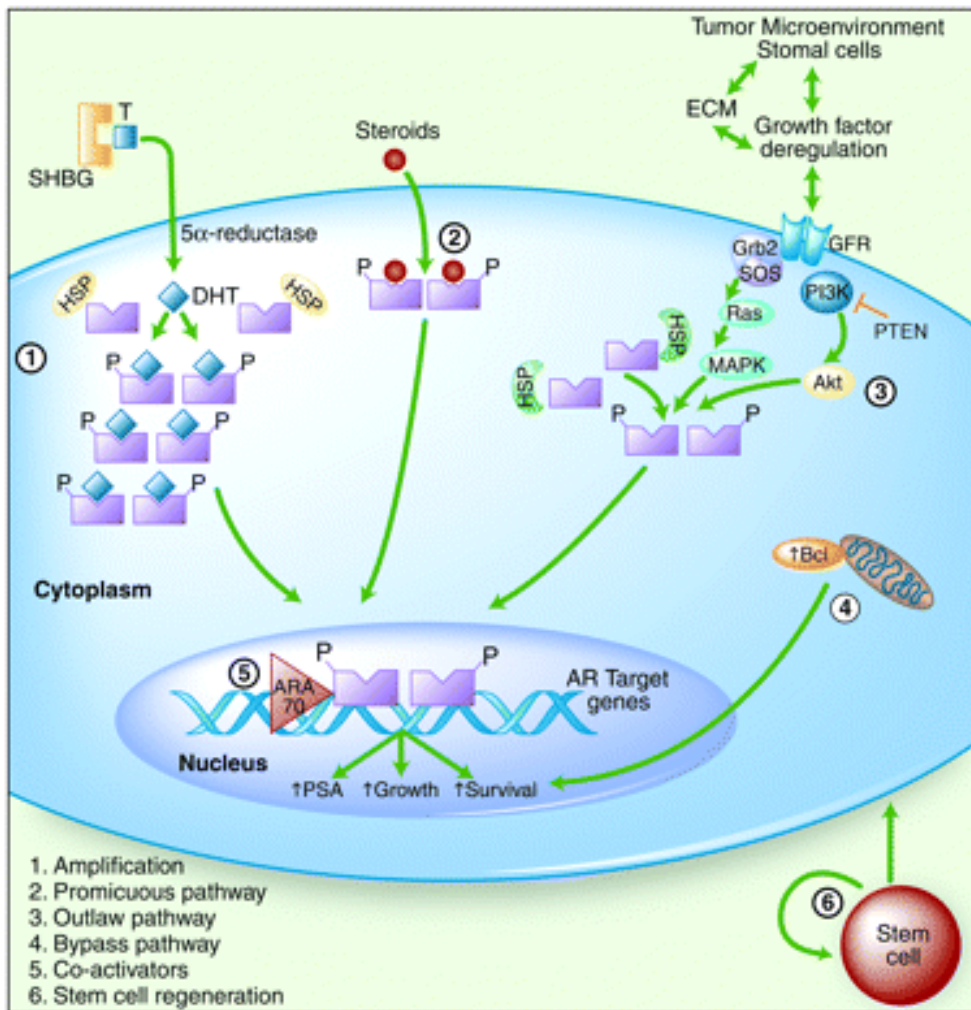


Fig 1. Meccanismi di androgeno-indipendenza. (Modificata da Mechanisms underlying the development of androgen-independent prostate cancer. Clin Cancer Res.2006)

2. TERAPIA DEL CARCINOMA PROSTATICO

2.1 ORMONOTERAPIA

La terapia ormonale si fonda sul razionale che il carcinoma della prostata è ormono-dipendente: lo scopo principale è pertanto quello di contrastare la produzione di testosterone e di androgeni e di bloccare l'azione degli ormoni sessuali maschili prodotti dai testicoli (testosterone) e dai surreni²¹ determinando un rallentamento della proliferazione cellulare neoplastica e riducendo le dimensioni del tumore. Questo tipo di "blocco androgenico" può essere ottenuto con diverse modalità: l'ablazione degli organi produttori degli androgeni (castrazione chirurgica) con l'orchietomia bilaterale o castrazione chimica, con la soppressione dell'ipofisi di gonadotropine, (utilizzando gli analoghi dell'LHRH), o con il blocco periferico dell'azione degli androgeni con farmaci antiandrogeni, steroidei o non steroidei da soli o in associazione.

- *Ablazione degli organi produttori degli androgeni*: questa metodica è stata la prima ad essere adottata e basa il proprio principio di azione sulla brusca caduta del testosterone sierico, pari al 90%-95% dei livelli preesistenti, seguita frequentemente e rapidamente da un miglioramento clinico. Tuttavia questo è di durata più o meno breve, principalmente in relazione alla produzione extratesticolare di androgeni. Un altro effetto estremamente negativo della castrazione è costituito dall'impatto traumatico sulla psiche del paziente: sotto questo aspetto l'orchietomia sottocapsulare è più facilmente accettata. La castrazione chirurgica trova oggi scarso impiego pratico²¹.

- *Soppressione dell'ipofisi di gonadotropine* (utilizzo di analoghi dell'LHRH): Gli analoghi dell'LHRH sono una classe di composti che ha sicuramente rappresentato un passo in avanti nel trattamento del carcinoma prostatico, sostituendo l'orchietomia ed entrando a far parte di terapie combinate con altri farmaci che offrono dei risultati nettamente migliori. Il meccanismo d'azione è la stimolazione centrale dell'ipofisi che produce FSH, LH, gonadotropine. Questi farmaci causano un'azione continua a livello dell'ipofisi, la quale andrà incontro ad un esaurimento funzionale delle proprie cellule, che cessano di secernere tali ormoni. All'iniziale somministrazione degli analoghi dell'LHRH segue un fenomeno definito "flare", che consiste in un aumento del rilascio di testosterone nelle fasi iniziali della terapia dovuto alla stimolazione centrale dell'ipofisi, con un peggioramento della sintomatologia; tale inconveniente è facilmente circoscrivibile con l'associazione di un antiandrogeno.

- *Blocco periferico dell'azione degli androgeni*: si ottiene con farmaci che agiscono in modo differente rispetto a quelli trattati in precedenza, in quanto il loro sito di azione è a livello della cellula prostatica: essi, infatti, agiscono come inibitori competitivi degli androgeni sul loro recettore nucleare sulle cellule prostatiche. Gli antiandrogeni utilizzati possono essere steroidei e non steroidei. Il ciproterone acetato è un composto farmacologico steroideo, derivato

dall'idrossiprogestosterone, è stato il primo ad essere utilizzato clinicamente. Il suo meccanismo d'azione è complesso dal momento che non essendo un antiandrogeno puro e possedendo anche una notevole attività progestinica, non agisce solo a livello dei recettori bersaglio delle cellule della prostata, ma anche a livello del sistema nervoso centrale (ipotalamo). Tra gli antiandrogeni puri non steroidei ritroviamo:

- la Flutamide, agisce impedendo il legame degli ormoni androgeni a livello dei recettori nucleari delle cellule della prostata, ma la sua azione non è selettiva, esplicando conseguentemente la propria azione anche a livello centrale, cioè nell'ipotalamo e nell'ipofisi. Conseguentemente blocca il meccanismo di feed-back negativo che dovrebbe svolgere il testosterone circolante, provocando così un fenomeno simile a quello di "flare".
- la Bicalutamide, costituisce uno tra i più recenti farmaci antiandrogeni puri non steroidei. Questo farmaco offre un vantaggio non trascurabile, cioè la selettività per i recettori periferici, conseguenza del fatto che non è in grado di oltrepassare la barriera emato-encefalica. In base a questa proprietà, il farmaco non può provocare l'innalzamento delle concentrazioni sieriche dell'LH e pertanto i livelli di testosterone circolante non subiscono un incremento.

2.2 TERAPIE "TRADIZIONALI" DELLE FORME "RESISTENTI ALLA CASTRAZIONE"

L'efficacia dell'androgeno-deprivazione nel trattamento del carcinoma prostatico è notoriamente limitata nel tempo. La durata della risposta varia infatti a seconda dello stadio clinico all'inizio della terapia. Indicativamente la non responsività al trattamento ormonale si ha dopo 2 o 3 anni mentre nel caso di malattia metastatica essa è di circa 18 mesi. La stragrande maggioranza dei pazienti sottoposti a ormonoterapia, quindi, è destinata ad andare incontro a progressione di malattia passando ad una condizione definita di "resistenza alla castrazione".

La definizione di carcinoma della prostata resistente alla castrazione è stata recentemente standardizzata: richiede livelli di testosterone inferiori a 50 ng/dl (1,7 nm/L) ed evidenza di una progressione del PSA e/o radiologica²².

Fino al 2004 l'unico trattamento disponibile era il Mitoxantrone, un antracenedione derivato dalle antracicline sviluppato come alternativa alla doxorubicina rispetto alla quale dimostrava minor cardiotossicità, il quale aveva ottenuto l'approvazione dato il beneficio i termini di palliazione. Infatti uno studio randomizzato canadese della metà degli anni novanta aveva evidenziato come l'associazione tra mitoxantrone e prednisone comparata al solo uso del corticosteroide ottenesse un miglior controllo della sintomatologia dolorosa (29% vs 12% p = 0.01) portando ad un minor uso di farmaci analgesici ed un tempo di palliazione medio più duraturo (43 vs 18 settimane, p < 0.0001), pur non portando ad un vantaggio in sopravvivenza globale²³. La prima dimostrazione di un vantaggio in termini di sopravvivenza globale deriva dalla pubblicazione nel 2004 dei risultati di due grandi studi randomizzati di fase III che confrontano l'uso del docetaxel (un antiblastico ad

azione antimicrotubulare) rispetto allo standard con mitoxantrone e prednisone. Il primo studio effettuato da Tannok e collaboratori (studio TAX 327) a tre bracci comparava lo standard rappresentato da mitoxantrone 12 mg/mq ev ogni tre settimane e prednisone 5 mg per os x 2/die con docetaxel alla dose di 75 mg/mq con schedula trisettimanale insieme a prednisone 5 mg per os x 2/die o somministrato alla dose di 30 mg/mq settimanale per 5 settimane ogni 6 insieme a prednisone 5 mg per os x 2/die. Un aumento significativo della sopravvivenza (18,9 mesi vs 16,5 mesi $p = 0.009$), delle risposte sul PSA (45% vs 32% $p < 0.001$) ed un miglioramento della sintomatologia dolorosa (35% vs 22% $p = 0.01$) veniva osservato nel braccio comprendente docetaxel somministrato ogni 3 settimane rispetto al trattamento con mitoxantrone. Per quanto dimostrato l'associazione di docetaxel 75 mg/mq ev ogni 3 settimane e prednisone 5 mg per os x 2/die è da ritenersi il trattamento standard di prima linea in pazienti con carcinoma prostatico ormonorefrattario^{24,25}.

Discorso a parte merita, invece, un nuovo taxano semi-sintetico di recente introduzione, il cabazitaxel, che da studi preclinici si era dimostrato attivo anche in linee cellulari resistenti al docetaxel²⁶. Sono stati infatti pubblicati nel 2010 i risultati di uno studio prospettico, randomizzato, di fase III, volto a confrontare l'efficienza terapeutica di cabazitaxel in associazione a prednisone rispetto al mitoxantrone, anch'esso in associazione al prednisone, in pazienti affetti da carcinoma della prostata metastatico, ormonorefrattario, in progressione durante o dopo trattamento con docetaxel²⁷. Lo studio che ha arruolato 755 pazienti in tutto il mondo, ha evidenziato un vantaggio significativo in termini OS, (mediana 15.1 vs 12.7 mesi $p < 0.0001$) e PFS (2.8 vs 1.4 mesi, $p = 0.0002$) a favore del braccio di trattamento con cabazitaxel. Sempre a favore di quest'ultimo sono risultati anche il tasso di risposte obiettive secondo i criteri RECIST (14,4% vs 4,4%, $p < 0.005$) e il tasso di risposta del PSA (39,2% vs 17,8%, $p < 0.0002$), a fronte di un beneficio in senso antalgico sostanzialmente equiparabile nei due bracci di trattamento. Sulla scorta dei risultati sopra riportati, cabazitaxel è stato autorizzato negli USA dall'FDA e dal gennaio 2012 è disponibile anche in Italia, rappresentando dunque una delle opzioni terapeutiche disponibili dopo fallimento di un regime chemioterapico contenente docetaxel nel paziente metastatico resistente alla castrazione.

2.3 "NUOVE TERAPIE" NEL TRATTAMENTO DEL CARCINOMA PROSTATICO RESISTENTE ALLA CASTRAZIONE

Negli ultimi anni, lo studio della biologia molecolare del carcinoma resistente alla castrazione ha portato a rivalutare il ruolo del recettore degli androgeni anche in questa fase della malattia. Il recettore degli androgeni è un membro della famiglia dei recettori nucleari che agisce come fattore di trascrizione e regola la crescita delle cellule del carcinoma prostatico. Sebbene il meccanismo biologico responsabile dello sviluppo della resistenza alla castrazione non sia stato completamente chiarito, sono stati descritti alcuni meccanismi: l'attivazione di AR in maniera indipendente dal

ligando, l'amplificazione del gene AR, le mutazioni del gene AR che portano alla sua attivazione da parte di ligandi diversi dal testosterone, alterazioni nel processo di splicing e generazione di isoforme tronche di AR e l'iperattivazione degli enzimi di sintesi degli androgeni, per esempio dell'enzima 17-alpha idrossilasi (CYP17), con il conseguente aumento delle concentrazioni intratumorali di testosterone²⁸.

Poiché la progressione della malattia rimane largamente dipendente dal pathway di AR, esso è stato identificato come un target terapeutico importante anche nella malattia resistente alla castrazione. Due nuovi farmaci orali, inibitori del pathway di AR, hanno recentemente dimostrato un'efficacia significativa nel trattamento dei pazienti con carcinoma della prostata resistente alla castrazione: abiraterone ed enzalutamide.

Inoltre recenti evidenze hanno dimostrato che le vie di segnalazione di MET e VEGFR giocano un ruolo importante sia nella progressione del cancro alla prostata che nello sviluppo di metastasi ossee²⁹. MET è, infatti, espresso nelle cellule luminali basali e atrofiche dell'epitelio del tessuto prostatico normale ed è presente a bassi livelli in cellule tumorali prostatiche³⁰. Studi *in vitro* hanno dimostrato che l'espressione di MET è repressa dall'AR, in modo ligando-dipendente³¹. La deprivazione androgenica incrementa sia l'espressione di MET che quella del suo ligando, l'Hepatocyte Growth Factor (HGF) nelle cellule tumorali di prostata³¹. L'aumentata espressione di MET e/o HGF correlano con l'insorgenza di metastasi, soprattutto a livello osseo e con la recidiva di malattia³².

Inoltre la via di segnalazione del recettore del fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGFR), fondamentale per l'angiogenesi, risulta essere cruciale per la crescita tumorale. Infatti a differenza della prostata normale e della neoplasia prostatica intraepiteliale (PIN), i tumori della prostata mostrano una più alta densità microvascolare ed esprimono livelli più elevati di VEGFR-2 che correlano con un alto grado e con uno stadio avanzato di malattia³³. Infine i livelli circolanti di VEGF in plasma o urine sono predittori indipendenti di sopravvivenza globale (OS) in pazienti affetti da carcinoma metastatico resistente alla castrazione (CRPC)^{34,35}.

Cabozantinib (XL184) è un inibitore tirosin-chinasico biodisponibile per via orale con attività contro MET e VEGFR-2, approvato per il trattamento del carcinoma midollare della tiroide, è in fase di sperimentazione con l'obiettivo di testare la sua efficacia in diversi tipi di neoplasie tra cui il carcinoma prostatico, mammario, renale, il melanoma ed il microcitoma.

2.3.1 ABIRATERONE NEL CARCINOMA DELLA PROSTATA

Abiraterone acetato è un inibitore selettivo ed irreversibile del CYP17, l'enzima essenziale per la sintesi del testosterone, ed è pertanto in grado di bloccare la biosintesi degli androgeni sia nelle ghiandole surrenali che nei testicoli e nel tumore della prostata. In particolare il CYP17 agisce a livello surrenalico, testicolare e del tessuto tumorale prostatico catalizzando due reazioni nel pathway steroidogenico: (fig.2)

- la conversione del pregnenolone e del progesterone nelle forme 17 alfa idrossilate;
- la successiva conversione dei due precedenti composti in DHEA e androstenedione.

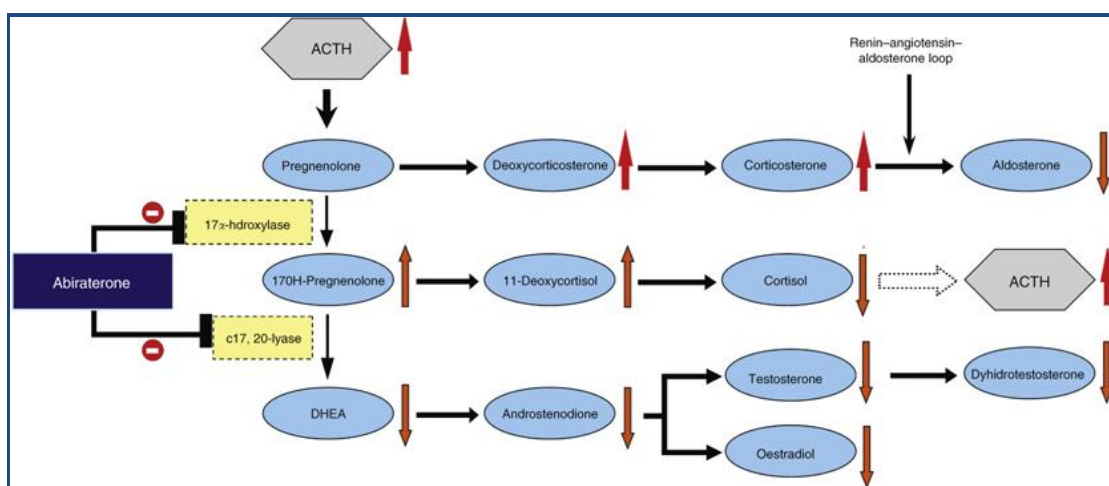


Fig 2. Meccanismo di azione di abiraterone. (Modificata da CYP17 blockade by abiraterone: further evidence for frequent continued hormone-dependence in castration-resistant prostate cancer. Br J Cancer. 2009)

Negli studi iniziali di fase I e II, abiraterone ha mostrato una significativa attività antitumorale tra i pazienti con carcinoma della prostata resistente alla castrazione. Nel 2011 sono stati pubblicati i risultati dello studio COU-AA301³⁶ che hanno portato all'approvazione negli Stati Uniti e in Europa di abiraterone insieme a prednisone per il trattamento del carcinoma della prostata resistente alla castrazione in uomini con malattia metastatica in progressione durante o dopo un regime di chemioterapia con docetaxel. In questo studio randomizzato di fase III, in doppio cieco, placebo controllato, i pazienti con malattia metastatica ed in progressione dovevano avere un livello di testosterone ≤ 50 ng/dl, un performance status secondo ECOG ≤ 2 e valori adeguati di funzionalità epatica, renale e midollare. 1195 pazienti sono stati randomizzati in un rapporto 2:1 a ricevere abiraterone acetato alla dose giornaliera di 1000 mg o placebo con il prednisone 5 mg due volte al giorno. Il trattamento veniva proseguito fino a progressione di malattia o a tossicità inaccettabile. L'obiettivo primario dello studio era la sopravvivenza globale. All'analisi finale dei dati con un follow-up mediano di 20,2 mesi, la sopravvivenza globale è stata di 15,8 mesi nel gruppo

abiraterone 11,2 mesi nel gruppo placebo (HR 0,74; $p < 0,0001$). Tutti gli obiettivi secondari dello studio, inclusi il tempo alla progressione del PSA (8,5 vs 6,6 mesi, $p < 0,0001$), la sopravvivenza libera da progressione radiologica (5,6 vs 3,6 mesi, $p < 0,0001$) e il tasso di risposta del PSA (29,5% vs 5,5%, $p < 0,0001$), sono risultati a favore dell'abiraterone³⁷. Più recentemente sono stati pubblicati i risultati dello studio COU-AA-302³⁸, uno studio randomizzato di fase III, in doppio cieco, placebo-controllato, che aveva l'obiettivo di valutare l'efficacia di abiraterone acetato più prednisone rispetto al placebo più prednisone in una popolazione di pazienti affetti da carcinoma della prostata resistente alla castrazione, metastatici, in progressione, che non hanno mai ricevuto chemioterapia, asintomatici o lievemente sintomatici e con un performance status secondo ECOG 0 o 1. Sono stati randomizzati 1088 pazienti in un rapporto 1:1; gli obiettivi primari dello studio erano la sopravvivenza libera da progressione radiologica e la sopravvivenza globale. A un follow-up mediano di 22,2 mesi, la sopravvivenza libera da progressione radiologica mediana è stata di 16,5 mesi con abiraterone verso 8,3 mesi con prednisone (HR 0,53; $p < 0,001$); la sopravvivenza globale mediana nel gruppo dell'abiraterone non è stata ancora raggiunta mentre nel gruppo del prednisone è stata di 27,2 mesi. Abiraterone ha mostrato un trend a prolungare la sopravvivenza con una riduzione del rischio di morte del 25% (HR 0,75; $p = 0,01$).

2.3.2 ENZALUTAMIDE NEL CARCINOMA PROSTATICO

Enzalutamide è un antiandrogeno non steroideo di seconda generazione che inibisce il pathway di AR attraverso vari meccanismi: ha un'alta affinità per il recettore ed è un inibitore competitivo dei ligandi di AR; inibisce la traslocazione nucleare di AR, il legame del complesso recettore-ligando al DNA e pertanto previene l'attivazione di alcuni geni necessari per la crescita e proliferazione delle cellule di carcinoma della prostata (fig.3).

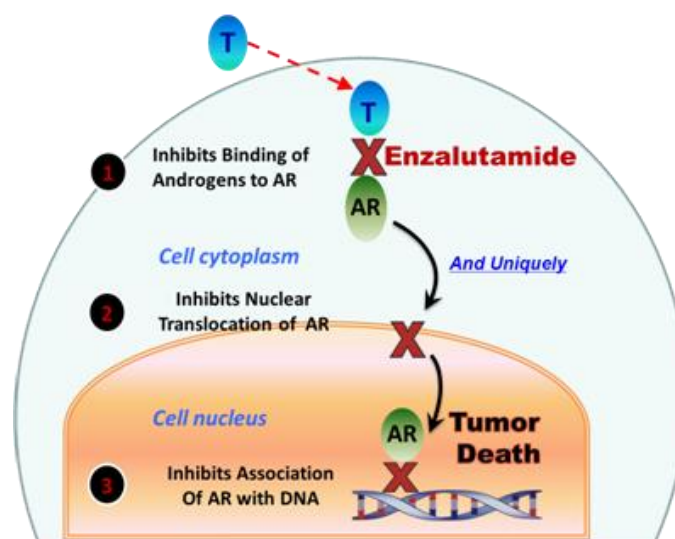


Fig 3. Meccanismo di azione di enzalutamide (Modificata da *Development of a second-generation antiandrogen for treatment of advanced prostate cancer. Science. 2009*)

In uno studio di fase I/II enzalutamide ha dimostrato una significativa attività antitumorale in pazienti affetti da carcinoma della prostata resistente alla castrazione³⁹. La terapia con enzalutamide non richiede l'associazione con il prednisone e la dose scelta per essere testata nel successivo studio di fase III è stata 160 mg da assumere una volta al giorno. Nel 2012 sono stati pubblicati i risultati dello studio AFFIRM⁴⁰, uno studio randomizzato di fase III, in doppio cieco, placebo-controllato, che aveva l'obiettivo di valutare l'efficacia di enzalutamide rispetto al placebo in una popolazione di 1199 uomini affetti da carcinoma della prostata metastatico resistente alla castrazione, in progressione dopo uno o due regimi di chemioterapia, di cui almeno uno contenente docetaxel, con un performance status secondo ECOG ≤ 2 . I pazienti sono stati randomizzati in un rapporto 2:1; l'obiettivo primario dello studio era la sopravvivenza globale. A un follow-up mediano di 14,4 mesi, la sopravvivenza globale mediana è stata 18,4 mesi nel gruppo dell'enzalutamide e 13,6 mesi nel gruppo del placebo (HR 0,63; $p < 0,001$). Tutti gli obiettivi secondari dello studio, incluso il tempo alla progressione del PSA (8,3 vs 3,0 mesi, $p < 0,001$), la sopravvivenza libera da progressione radiologica (8,3 vs 2,9 mesi, $p < 0,001$), il tempo al primo evento scheletrico (16,7 mesi vs 13,3 mesi, $p < 0,001$) e il tasso di risposta del PSA (54% vs 2%, $p < 0,001$), sono risultati a favore dell'enzalutamide.

2.3.3 CABOZANTINIB NEL CARCINOMA PROSTATICO

L'inibitore delle tirosin-chinasi, cabozantinib (XL184), biodisponibile per via orale, ha attività anti-MET e anti-VEGFR2 (recettore 2 del fattore di crescita endoteliale vascolare) (fig.4). L'agente target ha mostrato attività clinica nei pazienti con carcinoma prostatico resistente alla castrazione, attraverso riduzione delle lesioni ai tessuti molli, miglioramento della sopravvivenza libera da progressione (PFS), risoluzione alle scansioni ossee e diminuzione dei marcatori del 'turnover' dell'osso, del dolore e dell'uso di narcotici.

L'attività di cabozantinib è stata valutata in pazienti con carcinoma prostatico resistente alla castrazione in uno studio randomizzato di fase II, di discontinuazione, in una coorte di espansione⁴¹. I pazienti hanno ricevuto 100 mg di cabozantinib al giorno. Dopo 12 settimane, quelli che presentavano stabilizzazione della malattia, secondo i criteri RECIST, sono stati randomizzati allo stesso agente target o a placebo (discontinuazione). Endpoint primari erano il tasso di risposta obiettiva a 12 settimane e la PFS dopo randomizzazione alla continuazione o meno del trattamento. In totale, sono stati arruolati 171 pazienti con tumore prostatico resistente alla castrazione; la randomizzazione è stata interrotta precocemente per l'osservazione dell'attività di cabozantinib: il 72% dei pazienti ha mostrato regressione delle lesioni ai tessuti molli, il 68% dei pazienti valutabili ha manifestato miglioramento alla scansione ossea, con risoluzione completa nel 12% dei casi. Il tasso di risposta obiettiva a 12 settimane è stato del 5%, con stabilizzazione della malattia nel 75% dei pazienti e sono stati randomizzati 31 pazienti con malattia stabile dopo 12

settimane. Lo studio ha indicato una PFS mediana di 23.9 settimane (IC 95%: 10.7 - 62.4) nei pazienti trattati con cabozantinib e di 5.9 settimane (IC 95%: 5.4 - 6.6) in quelli randomizzati a placebo (hazard ratio 0.12; $p < 0.001$)⁴¹. La fosfatasi alcalina sierica totale e il telopeptide C-terminale 'cross-linked' plasmatico del collagene di tipo I sono diminuiti di $\geq 50\%$ nel 57% dei pazienti valutabili ed una revisione retrospettiva ha evidenziato un miglioramento del dolore osseo nel 67% dei pazienti valutabili, con una riduzione dell'uso di narcotici nel 56% dei casi.

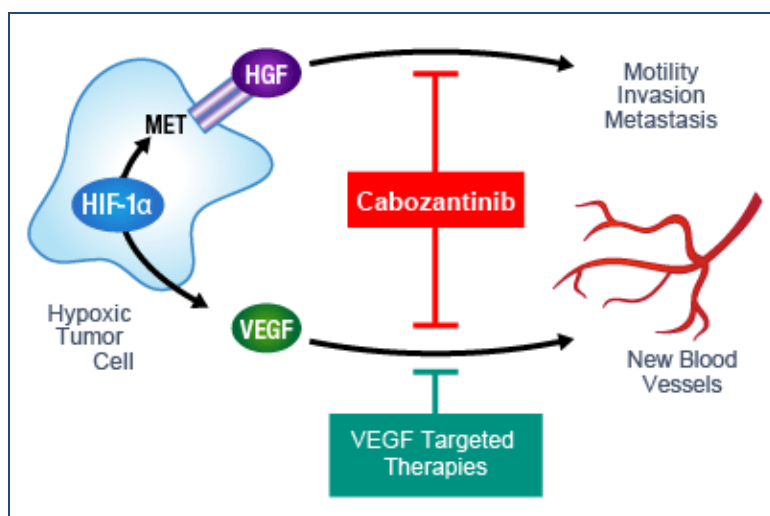


Fig 4. Meccanismo di azione di cabozantinib (Modificata da ASCO 2011: *Exelixis Reports Expanded Cabozantinib (XL184) Phase II Data For Advanced Ovarian Cancer*)

In conclusione, cabozantinib ha mostrato attività clinica nei pazienti con CRPC, con una riduzione delle lesioni ai tessuti molli, miglioramento della sopravvivenza libera da progressione, risoluzione delle lesioni alla scansione ossea e riduzione dei marcatori del 'turnover' dell'osso, del dolore e dell'uso di narcotici.

3. CARCINOMA PROSTATICO:METASTASI OSSEE

Il tessuto osseo è sede predominante di localizzazione secondaria da neoplasia prostatica⁴². Poiché la maggioranza dei pazienti con carcinoma prostatico avanzato presenta lesioni ossee come unica sede di disseminazione sistemica di malattia, il trattamento specifico delle metastasi ossee, avente come scopo il controllo del dolore e la prevenzione delle complicanze scheletriche, riveste in questa patologia una particolare importanza. Studi biochimici e istomorfometrici hanno chiaramente evidenziato come le metastasi ossee da carcinoma prostatico, apparentemente osteoblastiche, siano in realtà miste, coesistendo nel contesto di una esuberante attività osteoblastica una componente litica rilevante⁴³. Da ciò ne consegue che le modificazioni del microambiente osseo indotte dal carcinoma prostatico aumentano la fragilità del tessuto osseo colpito e le lesioni ossee che ne derivano, a dispetto della loro densità ossea aumentata, sono a rischio di complicanze scheletriche come fratture, compressione midollare, cedimenti vertebrali. Recentemente è stato altresì evidenziato come la stimolazione dell'attività osteoclastica, in pazienti con carcinoma prostatico ormono-refrattario, non sia solo focale ma anche generalizzata⁴⁴, coinvolgendo cioè tutto lo scheletro ad opera di due meccanismi:

- 1) iperparatiroidismo secondario in risposta all'abnorme fissazione di calcio nel tessuto osseo indotta dalla incrementata stimolazione osteoblastica,
- 2) osteoporosi indotta dall'androgeno deprivazione.

3.1 FISILOGIA DELLO SCHELETRO

L'osso è un tessuto dinamico grazie alla continua rimozione di porzioni di matrice seguita dall'apposizione di matrice neosintetizzata.

Questo processo è dovuto all'azione catabolica degli osteoclasti che degradano la matrice esistente e all'azione anabolica degli osteoblasti che sintetizzano nuova matrice.

Durante la crescita l'attività degli osteoclasti e quella degli osteoblasti non sono strettamente accoppiate; il nuovo osso viene, infatti, depositato in sedi diverse rispetto all'osso degradato. Questo meccanismo, chiamato modellamento, permette alle ossa di crescere e cambiare forma in risposta ai cambiamenti fisiologici e ai carichi meccanici cui sono sottoposte. Nell'adulto, invece, avviene il rimodellamento, processo in cui l'attività degli osteoblasti e degli osteoclasti è accoppiata nello spazio e nel tempo, perciò l'osso neosintetizzato prodotto dagli osteoblasti viene depositato nella sede in cui l'osso è stato degradato. Queste attività anaboliche e cataboliche avvengono all'interno di unità discrete di tessuto osseo chiamate Basic Multicellular Unit (BMU)⁴⁵.

Il rimodellamento consente di rinnovare l'osso, prevenendo l'accumulo di microdanni. Nella prima fase del processo di rimodellamento i monociti, ovvero i precursori degli osteoclasti, vengono attratti nel sito di riassorbimento da diverse chemochine.

La Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) è una chemochina prodotta dagli osteoblasti che si pensa attragga i monociti^{46,47}. Fondamentale per il differenziamento dei monociti in osteoclasti è l'interazione tra il recettore Receptor Activator of Nuclear Factor kappa-B (RANK) presente sulla superficie dei monociti ed il suo ligando RANKL esposto sulla membrana cellulare degli osteoblasti. Dall'interazione si scatena l'attivazione a cascata di diversi fattori di trascrizione tra cui NF- κ B, AP-1 e NFATc1, i quali stimolano l'espressione dei geni del differenziamento osteoclastico. Gli osteoblasti esprimono anche un recettore chiamato osteoprotegerina (OPG) che inibisce RANK mascherando l'azione di RANKL⁴⁸. Gli osteoclasti degradando l'osso provocano il rilascio dalla matrice ossea di fattori di crescita come Transforming Growth Factor β (TGF- β), Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) e IGF-II. Questi fattori attirano le cellule mesenchimali staminali (MSCs) nel sito di riassorbimento stimolandole a differenziare in osteoblasti che sintetizzano nuova matrice ossea. Mentre l'attività di sintesi di nuovo osso sta iniziando, gli osteoclasti subiscono apoptosi⁴⁹. Anche gli elevati livelli di calcio extracellulare rilasciati durante il riassorbimento inducono l'apoptosi degli osteoclasti⁵⁰. Terminata la fase di neosintesi gli osteoblasti entrano in quiescenza.

La sclerostina è una proteina secreta dagli osteociti che si pensa abbia un ruolo nell'induzione della quiescenza degli osteoblasti⁵¹.

3.2 FISIOPATOLOGIA DELLE METASTASI OSSEE

Il tessuto osseo viene interessato dalla patologia metastatica attraverso due diverse modalità:

- Modalità diretta: diffusione diretta delle cellule tumorali nel tessuto scheletrico;
- Modalità indiretta: rilascio di fattori che alterano il turnover osseo da parte delle cellule metastatiche.

3.2.1 DIFFUSIONE DIRETTA DELLE CELLULE TUMORALI NEL TESSUTO SCHELETRICO

Dopo il distacco dal tumore primitivo, la cellula neoplastica accede, attraverso la neovascolarizzazione tumorale, tramite molecole di adesione come E-caderina o laminina, alla circolazione sistemica; si arresta a livello dei capillari ossei e fuoriesce dal letto capillare cominciando ad invadere la matrice tissutale⁵². Affinchè questa "cascata metastatica" si realizzi la cellula deve disporre di enzimi proteolitici che le permettano di distaccarsi dalla massa tumorale primitiva, deve sopravvivere al sistema immunitario ed agli attriti meccanici nel circolo ematico e deve sviluppare un profilo recettoriale di membrana che le consenta di aderire al sito metastatico⁵³. Per la formazione delle metastasi all'interno del tessuto osseo sono necessarie interazioni reciproche tra le cellule tumorali, le cellule ospiti ed il microambiente. Questo percorso della cellula

tumorale, è noto già nell'ambito dell'ipotesi del "seed and soil" ("seme e terreno fertile") formulata da Stephen Paget alla fine del 1800⁵⁴. Sono molti gli studi in letteratura che descrivono una vasta gamma di fattori "soil" prodotti dalle cellule residenti nell'osso o immagazzinati nella matrice ossea, che una volta rilasciati e attivati, possono influenzare la crescita della metastasi; così come sono noti i fattori "seed" espressi dalle cellule tumorali che favoriscono le interazioni con il microambiente osseo e quindi con la matrice extracellulare (ECM) e le cellule residenti (osteoblasti, osteoclasti e cellule endoteliali del midollo osseo)⁵⁵.

Tra principali fattori "seed" ricordiamo:

- L'integrina $\alpha\text{V}\beta\text{3}$, nota anche con il nome di recettore per la vitronectina, è un eterodimero che lega le componenti proteiche della ECM come la vitronectina e l'osteopontina (OPN) e facilita pertanto l'adesione tra cellule ed ECM. Esperimenti *in vitro* ed *in vivo* hanno dimostrato che l'overespressione dell'integrina $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ in cellule tumorali prostatiche induce la loro migrazione e l'homing a livello osseo⁵⁶. Inoltre l'integrina $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ è espressa anche sulla membrana degli osteoclasti giocando così un ruolo essenziale nel mediare l'adesione di essi all'osso⁵⁷. In base alle evidenze disponibili in letteratura il ruolo di $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ consiste nel promuovere la migrazione, l'invasione e l'adesione delle cellule metastatiche all'osso favorendo i primi step della cascata metastatica.

- CXCR4 è una proteina-G accoppiata al recettore appartenente alla famiglia dei recettori per le chemochine. Espressa sulla superficie delle cellule staminali ematopoietiche, gioca un ruolo essenziale nel mediare l'homing di tali cellule al midollo osseo tramite il legame con il suo ligando SDF1/CXCL12⁵⁸. Alcuni studi hanno dimostrato che l'asse CXCR4/SDF1 promuove la migrazione e l'adesione di cellule prostatiche a livello osseo *in vitro*⁵⁹. Nel tessuto scheletrico SDF1 è espresso da due principali tipi cellulari: le cellule endoteliali del midollo osseo e gli osteoblasti⁶⁰. Un punto chiave della cascata metastatica consiste nell'arresto nei vasi e la diapedesi nel midollo osseo a livello di punti endoteliali dotati di domini come la E-selectina e l'SDF1, siti "preferiti" dalle cellule neoplastiche per l'extravasazione nello spazio midollare⁶¹.

-Un elevato livello d'espressione di CD44 correla con aumentata aggressività della malattia neoplastica. CD44 è inoltre conosciuto come recettore per lo "ialuronano" (HA), un glicosamminoglicano costituente ubiquitario della ECM. Le cellule tumorali prostatiche e mammarie che esprimono alti livelli di CD44 sono in grado di legare un'elevata quantità di HA che permette l'adesione alla matrice pericellulare e la crescita all'interno di essa⁶². Come per CXCR4, CD44 ha un ruolo importante nel promuovere l'invasione e l'adesione alle cellule endoteliali del midollo osseo⁶².

3.2.2 RILASCIO DI FATTORI CHE ALTERANO IL TURNOVER

Le cellule tumorali che raggiungono il tessuto osseo rilasciano una serie di mediatori e di citochine in grado di interferire con il normale turnover osseo. La maggior parte delle metastasi ossee è mista, cioè caratterizzata sia da una componente erosiva che da una ricostruttiva, ma, in base ai mediatori secreti localmente dalle cellule neoplastiche, una delle due componenti prevale nettamente sull'altra conferendo alla lesione aspetto osteolitico o osteoaddensante⁴².

Numerosi sono gli studi sui fattori tramite i quali le cellule maligne inducono riassorbimento osseo, evidenze su cui si basa la teoria del "circolo vizioso". Da una parte le cellule neoplastiche rilasciano fattori denominati Osteoclast Activating Factors (OAF), tra cui i più importanti sono il peptide analogo al Parathyroid hormone (PTH), PTHrP, che stimola il riassorbimento osseo RANK/RANKL-mediato; dall'altra la degradazione della matrice ossea determina rilascio di molecole come BMPs e diversi fattori di crescita come Platelet-Derived Growth Factor (PDGF), Fibroblast Growth Factor (FGF), TGF β che promuovono la proliferazione delle cellule tumorali. Si instaura così un vero e proprio circolo vizioso in cui alla progressione dell'osteolisi corrisponde l'aumento del numero delle cellule che la determinano⁶³. L'espressione del PTHrP è aumentata nelle cellule di metastasi ossea rispetto a quelle del tumore primitivo o delle metastasi extrascheletriche. Tale dato ha portato a considerare il PTHrP come mediatore principale del riassorbimento osseo metastatico. Infatti, la differenza tra metastasi e tumore primitivo lascia supporre che le cellule neoplastiche con up-regolazione del PTHrP abbiano un particolare tropismo per l'osso o che sia il microambiente osseo stesso ad indurre un incremento dell'espressione del PTHrP nelle cellule che vi si sono stabilite⁶⁴. La teoria del "circolo vizioso" viene avvalorata dalle osservazioni che suggeriscono che l'iperespressione di RANKL a livello dei focolai osteolitici tumorali promuova ulteriormente l'invasività ossea della neoplasia favorendo lo sviluppo di nuove metastasi⁶⁵. (fig.5)

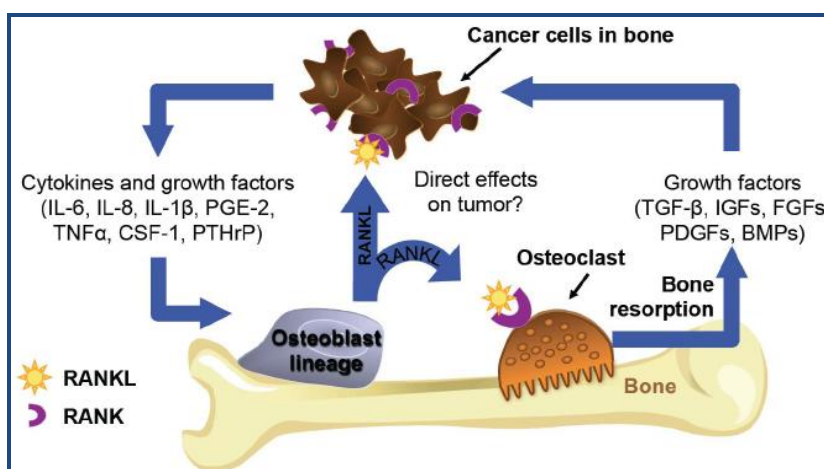


Fig 5. RANKL: il mediatore chiave del "circolo vizioso" dell'osteolisi maligna (Mechanism of metastasis. N Engl J Med. 2004)

Le metastasi osteoblastiche sono, invece, originate dall'attivazione, proliferazione e differenziazione degli osteoblasti, che derivano dalla cellula staminale mesenchimale la quale dà origine anche alle cellule di supporto dello stroma midollare (adipociti, cellule muscolari e cartilaginee, fibroblasti). Diverse citochine stimolano la formazione e l'attivazione degli osteoblasti come l'endotelina-1, il TGF- β -2 e l'Urokinase Type Plasminogen Activator (uPA)⁶⁶.

Come già precedentemente detto, le metastasi ossee da carcinoma prostatico, apparentemente osteoblastiche, siano in realtà miste, coesistendo nel contesto di una esuberante attività osteoblastica una componente litica rilevante.

3.3 FATTORI ASSOCIATI AGLI OSTEOCLASTI

3.3.1 ASSE RANK/RANKL/OPG

Recentemente è stata identificata una triade di citochine (RANKL, il suo recettore RANK ed il recettore endogeno osteoprotegerina (OPG) e ampiamente caratterizzata per il suo ruolo nel rimodellamento osseo. È ben noto il ruolo centrale dell'asse RANK/RANKL/OPG nell'osteoclastogenesi e nel riassorbimento osseo⁶⁷, come illustrato in fig.5. L'osso è un tessuto dinamico la cui morfologia è assicurata dal sottile equilibrio tra erosione mediata dagli osteoclasti e deposizione di nuova matrice ad opera degli osteoblasti. La maggior parte delle patologie ossee dell'adulto è dovuta ad un'eccessiva attività osteoclastica che porta ad un'alterazione di questo equilibrio a favore del riassorbimento osseo e quindi ai fenomeni di ridotta mineralizzazione e osteolisi. Di seguito sono descritte le caratteristiche principali delle molecole dell'asse RANK/RANKL/OPG, che rientrano nella super-famiglia delle proteine correlate al Tumour Necrosis Factor (TNF):

- RANK: è stato inizialmente clonato dal DNA di una cellula mieloide di tipo dendritico, a seguito della scoperta di RANKL e dell'osservazione che l'attivazione del recettore incrementava la sopravvivenza delle cellule dendritiche⁶⁸. In seguito è emerso il suo coinvolgimento nella differenziazione osteoclastica⁶⁹. È una glicoproteina transmembrana di tipo I di 616 amminoacidi, di cui 383 costituiscono la porzione intracitoplasmatica, 21 quella transmembrana, 183 quella extracellulare e 29 il dominio deputato alla trasduzione del segnale. L'RNA messaggero (mRNA) di RANK è stato individuato in cellule dendritiche, osso, muscolo striato, timo, fegato, colon, intestino tenue e ghiandole surrenaliche⁷⁰.
- RANKL: il ligando di RANK è stato clonato contemporaneamente da due gruppi di ricerca. Il primo ha osservato la sua elevata espressione nei linfociti T in seguito a stimolazione da parte delle cellule APC e la sua funzione induttiva della capacità delle cellule dendritiche di stimolare le cellule T; il secondo ha studiato la sua azione promuovente l'osteoclastogenesi^{71,72}. RANKL è espresso sulla superficie degli osteoblasti ed è

fondamentale per le funzioni di formazione e sopravvivenza degli osteoclasti^{73,74}. RANKL esercita le sue funzioni legandosi ed attivando il suo recettore RANK^{75,76}, che è espresso sulla superficie dei precursori degli osteoclasti e osteoclasti maturi⁷⁷, induce l'osteoclastogenesi *in vitro* e *in vivo* ed ha azione antagonista rispetto all'OPG. Il gene RANKL codifica per una proteina transmembrana di tipo II costituita da un dominio di ancoraggio alla membrana, un segmento di connessione e una porzione extracellulare deputata al legame con RANK⁷⁸. Il RANKL umano è molto simile a quello murino, entrambi vengono sintetizzati come glicoproteine, rispettivamente di 317 e 316 amminoacidi. Oltre alla proteina ancorata alla membrana cellulare (45 kDa) esiste anche un'isoforma solubile (30 kDa), che può formarsi sia per clivaggio proteolitico sia per splicing alternativo. Infatti, dal gene RANKL derivano due diversi trascritti: uno corrispondente ad una proteina di membrana di 287 amminoacidi con un breve dominio intracitoplasmatico, l'altro alla proteina solubile di 199 amminoacidi priva sia del dominio transmembrana che di quello intracellulare⁷⁹. L'isoforma legata alla membrana cellulare può essere convertita nell'isoforma solubile per azione di metalloproteasi della matrice (MMP) o appartenenti al gruppo delle ADAM^{80,81}.

- OPG: l'osteoprotegerina è stata la prima delle tre molecole ad essere scoperta e descritta come fattore in grado di inibire l'attività degli osteoclasti sia *in vitro* sia *in vivo*^{82,83}. A differenza degli altri membri della superfamiglia del recettore del TNF è priva di dominio transmembrana ed è secreta come proteina solubile dagli osteoblasti e, per competere con RANK per il legame a RANKL, agisce come un recettore decoy, inibendo così l'osteoclastogenesi⁶⁵. L'OPG umana è identica a quella murina per l'85%, derivata dal clivaggio di una sequenza di 21 amminoacidi in un precursore di 401. La forma monomerica (55 kDa) viene convertita, per formazione di un ponte disolfuro, in un omodimero (110 kDa), che è la principale forma extracellulare dell'OPG. L'OPG agisce come antagonista di RANK, legandosi a RANKL e impedendogli di attivare il recettore ed è stata individuata in encefalo, fegato, polmoni, cuore, rene, muscolo scheletrico, cute, intestino e stomaco⁸³.

Alterazioni dell'equilibrio RANKL/OPG sono state riportate in uno spettro di malattie dello scheletro caratterizzate da un'eccessiva attività osteoclastica, tra cui l'osteoporosi, l'artrite reumatoide e le metastasi ossee⁸³.

3.3.2 ASSE RANK/RANKL/OPG NELLE NEOPLASIE

Recentemente, l'espressione funzionale di RANK è stata riportata in linee cellulari tumorali di origine umana (osteosarcoma, carcinomi prostatici e mammari) e in cellule di melanoma murino^{65,85}.

Chen e colleghi hanno studiato l'espressione di RANK, RANKL e OPG in campioni di tumori prostatici primari e metastatici ed hanno osservato che l'espressione di queste molecole è significativamente più elevata nel carcinoma della prostata metastatico che nel carcinoma primario⁸⁴. Analogamente, Brown et al. hanno analizzato campioni primari e metastatici di tumore prostatico e hanno dimostrato che la proporzione di cellule tumorali che esprimono RANKL è notevolmente aumentata nelle metastasi ossee rispetto a metastasi in altri siti o nel tumore primario⁸⁵.

Nella mammella, RANK e RANKL sono espressi nel tessuto normale e, inversamente a RANK, nel tessuto neoplastico si osserva un'apparente perdita di espressione di RANKL⁸⁵.

Sasaki e colleghi hanno esaminato casi di carcinoma epatocellulare primario (HCC), mostrando che l'espressione di RANKL in cellule HCC è correlata con lo sviluppo di metastasi ossee dopo resezione epatica⁸⁶.

Osservazioni *in vitro* ed *in vivo* suggeriscono che l'elevata espressione di RANK nelle cellule tumorali determini la loro tendenza a metastatizzare alle ossa, dove RANKL è abbondantemente espresso⁸⁷. Questa ipotesi è supportata dall'osservazione che RANKL induce la migrazione di linee di cellule tumorali e tale fenomeno è bloccato da inibitori di RANKL (OPG o sRANK/RANK-Fc). Inoltre, il trattamento con OPG *in vivo* previene il fenomeno di homing di cellule di melanoma B16F10 esprimenti RANK nel tessuto osseo⁸⁸. L'asse RANK/RANKL/OPG rappresenta il regolatore chiave del metabolismo osseo sia in condizioni normali e patologiche, tra cui le metastasi ossee (Fig.6).

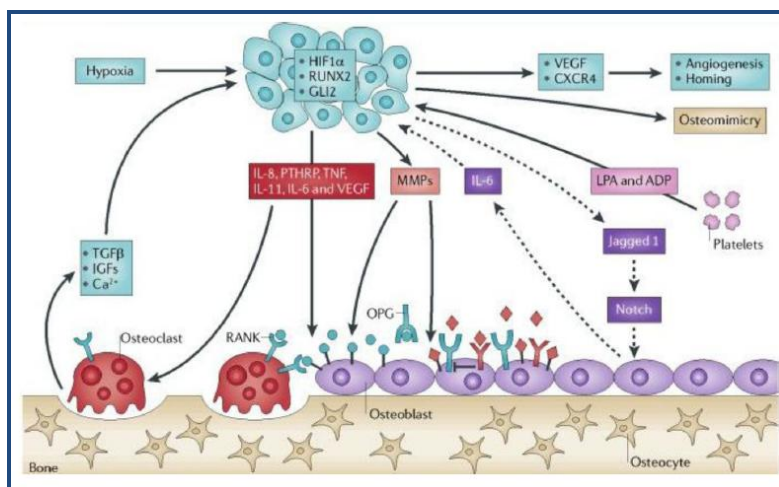


Fig 6. Ruolo dell'asse RANK/RANKL/OPG nel meccanismo di osteolisi tumorale indotta (Adattata da Nat Rev Cancer 2001)

Il ruolo chiave dell'asse RANK\RANKL\OPG nel riassorbimento osseo, sia di natura benigna (osteoporosi) sia di natura maligna (metastasi ossee), costituisce lo scenario in cui agisce denosumab, il primo farmaco costruito sulla base delle conoscenze sui meccanismi molecolari che controllano il processo di rimodellamento osseo⁸⁹. Denosumab (AMG 162) è un anticorpo monoclonale completamente umano di isotipo IgG2 con elevata specificità ed affinità per il RANKL, e nessuna tendenza a legare gli altri membri della superfamiglia del TNF (es. TNF α , TNF β o TRAIL). Legandosi a RANKL, denosumab mima l'azione dell'OPG impedendo al ligando di raggiungere il proprio recettore RANK sulla superficie degli osteoclasti, inibendo di conseguenza l'osteoclastogenesi e la funzione degli osteoclasti maturi, con effetto pro-apoptotico. Attraverso queste molteplici azioni denosumab presenta una rapida, marcata, sostenuta e tale farmaco trova quindi potenziale applicazione terapeutica in tutte le condizioni caratterizzate da aumentato riassorbimento osseo, come l'osteoporosi postmenopausale o le metastasi ossee⁹⁰.

3.4 FATTORI ASSOCIATI AGLI OSTEOLASTI

3.4.1 ENDOTELINA-1

L'endotelina-1 (ET-1) ET-1 è un piccolo peptide vasocostrittore prodotto dall'endotelio vascolare, che ha un ruolo chiave nella omeostasi vascolare. ET-1 promuove la formazione ossea legandosi al recettore ET sottotipo A (ETA), che è accoppiato a proteine G eterotrimeriche e attiva secondi messaggeri che portano alla mobilizzazione del calcio ed alla stimolazione della proteina chinasi C. Questo processo stimola il trasporto di fosfato, ed induce la calcificazione della matrice ossea⁹¹. ET-1 aumenta anche la proliferazione degli osteoblasti e inibisce la formazione degli osteoclasti⁹²⁻⁹⁴.

Alcuni studi hanno dimostrato che ET-1 è associato all'insorgenza di metastasi osteoblastiche nel carcinoma della prostata⁹⁵; inoltre i livelli di ET-1 plasmatici risultano elevati in pazienti affetti da tumore alla prostata con metastasi osteoblastiche⁹⁶.

Inoltre ET-1 induce la proliferazione degli osteoblasti e stimola la formazione ossea attraverso un cross-talk con la via di segnalazione di Wnt⁹⁷. Atrasentan è un antagonista del recettore ET altamente selettivo e potente che inibisce significativamente l'attivazione della risposta osteoblastica; diversi studi clinici di fase II e III hanno valutato il suo ruolo nel setting del tumore prostatico resistente alla castrazione⁹⁸.

3.4.2 WNT

Wnt è una proteina solubile che si lega ai recettori di superficie della famiglia Frizzled , che a loro volta attivano proteine della famiglia Dishevelled, che stabilizzano la β -catenina, che traslocando nel nucleo, induce diversi effetti tra cui eosintesi di matrice ossea. Diverse evidenze hanno mostrato che l'attivazione della via di segnalazione canonica di Wnt stimola la differenziazione degli osteoblasti attraverso la trascrizione del gene β -catenina⁹⁹. In modelli di metastasi ossea da tumore della prostata è stato dimostrato che Wnt, prodotto dalle cellule di carcinoma della prostata, agisce sia stimolando la differenziazione degli osteoblasti e sia, in modo autocrino sulla proliferazione tumorale¹⁰⁰.

Wnt è regolata dal proprio antagonista, DKK1, molto espresso nelle fasi precoci del tumore della prostata e meno a livello delle metastasi ossee¹⁰¹.

L'inibizione di DKK1 in PC3, linee cellulari tumorali prostatiche con proprietà osteolitiche, stimola l'attività osteoblastica; al contrario l'iperespressione di DKK1 in C4-2B, una linea tumorale prostatica con un fenotipo misto osteolitico-osteoblastico, induce l'attività osteolitica¹⁰².

Questi risultati suggeriscono che DKK1 può essere uno degli interruttori molecolari che regola lo "switch" da metastasi osteolitiche nelle fasi precoci a osteoblastiche nelle fasi tardive della crescita metastatica.

3.4.3 PROTEINE MORFOGENETICHE DELL'OSSO

Le proteine morfogenetiche dell'osso (BMPs) sono membri della superfamiglia delle proteine TGF- β e sono coinvolte nella migrazione delle cellule tumorali¹⁰³. In particolare BMP-2 derivata dagli osteoblasti è in grado di attivare le vie di trasduzione del segnale di AKT e ERK, che a loro volta inducono la fosforilazione IKK α/β , l'attivazione di NF- κ B e delle integrine β 1 e β 3 contribuendo alla migrazione delle cellule tumorali prostatiche¹⁰⁴. Le BMPs attivano anche il recettore chinasi di tipo I intracellulare che induce la fosforilazione della proteina SMAD, la quale trasloca nel nucleo regolando l'espressione di geni chiave implicati nella formazione di matrice ossea¹⁰⁵.

Studi *in vitro* ed *in vivo* hanno dimostrato che le BMPs sono fattori cruciali per la differenziazione degli osteoblasti^{106,107}. Infatti in modelli murini immunocompromessi in cui sono state inoculate cellule tumorali prostatiche (LuCap 23.1), il trattamento con un anticorpo anti- BMP-6 riduceva sia il numero degli osteoblasti che la crescita tumorale¹⁰⁸. Inoltre altre evidenze mostrano che l'espressione ectopica di Noggin, un antagonista di BMPs, mediante vettori retrovirali ritardava lo sviluppo di lesioni indotte da PC3¹⁰⁹. Tutti questi dati suggeriscono che le BMPs svolgono un ruolo chiave nel conferire un fenotipo osteoblastico alle metastasi ossee da tumore della prostata.

4. SCOPO DEL LAVORO

Attualmente sono in diverse fasi di sperimentazione clinica numerose molecole con effetti diretti ed indiretti sull'evoluzione delle metastasi ossee da tumori solidi. Alcune di queste molecole sono capaci di agire direttamente sul riassorbimento osseo avendo come target cellule specifiche dell'osso come osteoclasti, osteoblasti, osteociti o pathways molecolari che regolano la funzione di queste cellule. In questo gruppo di farmaci possiamo comprendere lo stesso denosumab, ma anche gli inibitori del recettore A dell'endotelina 1 (espresso anche dagli osteoblasti), gli inibitori della catepsina K (prodotta dagli osteoclasti, ma anche dalle cellule tumorali metastatiche all'osso), i farmaci che interferiscono con il pathway WNT/DKK1 (che regola tra l'altro la funzione degli osteoblasti), gli inibitori di SRC (tirosin-chinasi non recettoriale che sta a valle del recettore RANK e che contribuisce a regolare la funzione riassorbitiva degli osteoclasti, ma anche la funzione di distruzione della matrice ossea da parte delle cellule tumorali¹¹⁰).

Altre molecole in sperimentazione avanzata sull'uomo, pur avendo, apparentemente, come target la cellula tumorale e non il microambiente osseo, hanno dimostrato oltre che un miglioramento della sopravvivenza, di essere anche capaci di modificare la storia naturale delle metastasi ossee, determinando un ritardo della comparsa delle SRE, una riduzione del dolore osseo e il miglioramento della qualità di vita.

In questo gruppo di farmaci possiamo annoverare come maggior esempio l'abiraterone, inibitore selettivo di CYP17- α idrossilasi, capace di inibire la produzione degli androgeni a livello della stessa cellula tumorale e che ha dimostrato, dopo trattamento con docetaxel, di aumentare la sopravvivenza dei pazienti affetti da tumore della prostata in fase di resistenza alla castrazione, ma anche di ridurre l'incidenza e ritardare la comparsa delle complicanze scheletriche correlate alle metastasi ossee, ed, infine, di migliorare la qualità di vita "scheletrica"³⁷. In particolare l'abiraterone + prednisone ha dimostrato rispetto al solo prednisone di ritardare la comparsa degli SRE di 4.7 mesi (HR:0.615) nei pazienti trattati con docetaxel³⁷ e di ritardare la progressione scheletrica e il tempo all'uso degli analgesici oppioidi nei pazienti non pretrattati con docetaxel³⁸.

Altri due nuovi altri farmaci, enzalutamide e cabozantinib sono in sperimentazione nel tumore della prostata metastatico con potenziale effetto terapeutico anche sulle metastasi ossee.

L'enzalutamide (MVD3100) è un farmaco di ultima generazione capace di legare il recettore per gli androgeni, di impedirne il trasporto a livello nucleare e la sua funzione de-regolatrice sul DNA. Tale farmaco ha recentemente dimostrato di incrementare la sopravvivenza e di ritardare la comparsa di eventi scheletrici (di 3.4 mesi rispetto al placebo: HR 0,621) nel paziente affetto da neoplasia prostatica metastatica in fase di resistenza alla castrazione dopo trattamento con docetaxel⁴⁰.

Infine il cabozantinib rappresenta il primo esempio di un farmaco a target molecolare attivo nel tumore della prostata, è un inibitore di c-MET e del pathway di VEGF che ha dimostrato indurre un

elevato tasso di risposte obiettive a livello delle metastasi ossee di pazienti affetti da neoplasia prostatica in fase di resistenza alla castrazione⁴¹.

Alla luce di tutte queste recenti evidenze. il presente lavoro di tesi ha l'obiettivo di valutare *in vitro* l'effetto diretto di questi tre farmaci, di ultima generazione, abiraterone, enzalutamide e cabozantinib in:

- modelli cellulari di tumore alla prostata androgeno dipendente/indipendente in condizioni sperimentali di presenza/assenza di androgeni valutando l'impatto del trattamento su parametri biologici importanti come proliferazione e apoptosi cellulare
- colture primarie di osteoclasti ed osteoblasti umani in condizioni sperimentali di presenza/assenza di androgeni valutando un potenziale ruolo di questi farmaci come modulatori diretti del metabolismo e del rimodellamento osseo mediante saggi funzionali di attività osteoclastica/osteoblastica
- sistemi più complessi di co-colture di osteoclasti ed osteoblasti per indagare il potenziale effetto di tali farmaci sulla regolazione del "cross-talk" tra i due principali componenti del microambiente osseo.

5. MATERIALI E METODI

5.1 MODELLI CELLULARI UTILIZZATI

Nello studio sono state utilizzate due linee cellulari “classiche” di carcinoma prostatico usate come modelli sperimentali *in vitro* per lo studio dei tumori della prostata androgeno-dipendenti ed androgeno indipendente: LNCaP e PC-3, derivate da metastasi linfonodali e da metastasi ossee rispettivamente. Solo le LNCaP mostrano l'espressione del recettore androgenico sia a livelli di mRNA che di proteine. Le cellule LNCaP hanno caratteristiche biologiche molto vicine a quelle dei carcinomi della prostata ormono-sensibili in quanto esse non crescono in modelli *in vivo* che hanno subito castrazione chimica. Inoltre in queste cellule sono state riportate mutazioni per il gene dell'AR che interessano il dominio di legame con il ligando, creando un AR promiscuo che può legare anche altri steroidi. Le cellule PC-3, invece, non esprimono AR¹¹¹.

Nello studio sono state utilizzate anche colture cellulari primarie di osteoclasti ed osteoblasti umani.

Gli osteoclasti primari sono stati ottenuti da sangue periferico di donatori sani in cui è stata isolata la componente monocitaria CD14+ e differenziata *in vitro* in osteoclasta maturo, con capacità di riassorbire matrice ossea, dopo 12-14 giorni di coltura, mediante l'aggiunta di fattori e citochine specifiche.

Gli osteoblasti primari sono stati ottenuti a partire da cellule staminali mesenchimali umane (hMSC) isolate da midollo osseo di donatori sani e coltivate in mezzo osteogenico che ne induce il differenziamento in osteoblasti maturi in grado di deporre matrice ossea dopo 21/28 giorni di coltura.

5.2 COLTURE CELLULARI

5.2.1 LINEE CELLULARI TUMORALI

Le linee cellulari tumorali LNCaP e PC-3 sono state fornite dall'American Type Culture Collection (ATCC). Le cellule LNCaP sono state cresciute in terreno RPMI 1640 (Euroclone), le cellule PC-3 in un terreno costituito da una miscela 1:1 DMEM :F-12. Ai terreni di coltura sono stati aggiunti siero fetale bovino FBS (Hyclone Thermo Scientific) al 10%, L-glutamina 2mM e penicillina/streptomomicina 100 U/ml (Euroclone).

Parallelamente sia LNCaP che PC-3 sono state cresciute in medium contenente il 10% di siero FBS trattato con carbone attivo (charcoal stripped serum, CSS, Thermo Scientific) depleto degli steroidi in modo da annullare l'effetto della componente steroidea esogena sulla crescita e sulla proliferazione cellulare. Per tutta la durata delle procedure sperimentali, il mezzo di coltura è stato

sostituito almeno tre volte a settimana e le cellule sono state mantenute ad una temperatura costante di 37°C in atmosfera umidificata in apposito incubatore che mantiene la percentuale di CO₂ nell'aria costante al 5%.

5.2.2 OSTEOLASTI PRIMARI

Gli osteoclasti sono stati ottenuti dalla frazione di cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) derivanti da buffy coat di donatori sani. Le PBMC sono state isolate tramite centrifugazione su gradiente di densità di Lympholyte H (Cedarlane Laboratories) e, successivamente, i monociti sono stati purificati dalla frazione mononucleata mediante selezione immuno-magnetica per la positività all'antigene di membrana CD14 (Miltenyi Biotec) secondo le istruzioni fornite dalla casa produttrice.

I monociti sono stati poi piastrati e cresciuti in RPMI 1640 (Euroclone) con siero fetale bovino FBS (Hyclone Thermo Scientific) al 10%, L-glutammina 2mM e penicillina/streptomina 100 U/ml (Euroclone) e con l'aggiunta delle citochine M-CSF (25 ng/ml) e RANKL (50 ng/ml) (R&D Systems) per indurre la differenziazione in senso osteoclastico. Parallelamente le cellule sono state cresciute in medium contenente il 10% di siero FBS trattato con carbone attivo (charcoal stripped serum, CSS, Thermo Scientific) depleto degli steroidi in modo da annullare l'effetto della componente steroidea esogena sulla crescita e sul differenziamento osteoclastico.

Il mezzo di coltura è stato sostituito ogni 3 giorni fino al termine del protocollo di differenziamento della durata di 12-14 giorni.

5.2.3 OSTEOLASTI PRIMARI

Gli osteoblasti sono stati ottenuti da cellule staminali mesenchimali umane (hMSC) isolate da campioni di midollo osseo. Le cellule mononucleate (MNC) da midollo sono state isolate tramite centrifugazione su gradiente di densità di Lympholyte H (Cedarlane Laboratories) e successivamente seminate in α -MEM (Euroclone) supplementato con il 20% siero fetale bovino (Hyclone Thermo Scientific) alla densità di 2000 cellule/cm². Dopo 3 giorni le cellule non adese sono state eliminate tramite lavaggio e ed è stato aggiunto terreno fresco. Quando le cellule aderenti alla superficie della fiasca hanno raggiunto il 70% circa della confluenza, le cellule sono state staccate mediante tripsinizzazione, contate e riseminate alla stessa densità.

Le hMSC sono state successivamente seminate in piastre 6 well in medium osteogenico utilizzato per promuovere la differenziazione in osteoblasti costituito da α -MEM supplementato con il 10% siero fetale bovino FBS (Hyclone Thermo Scientific) L-glutammina 2mM e penicillina/streptomina 100 U/ml (Euroclone) con l'aggiunta di 50 μ M di acido ascorbico, 10 nM di desametasone e 10mM di glicerofosfato (Sigma Aldrich).

Parallelamente le cellule sono state cresciute in medium contenente il 10% di siero FBS trattato con carbone attivo (charcoal stripped serum, CSS, Thermo Scientific) depleto degli steroidi in modo da annullare l'effetto della componente steroidea esogena sulla crescita e sul differenziamento osteoblastico.

5.2.4 CO-COLTURE

Sono state allestite co-culture indirette di osteoclasti e osteoblasti primari utilizzando il mezzo condizionato osteoblastico. Quest'ultimo è stato isolato dagli osteoblasti maturi, trattati farmacologicamente, dopo 21/28 giorni di coltura, dopo "wash out" di 48 h in assenza di siero. Il contenuto proteico è stato quantificato mediante il Kit DC Protein Assay (Bio-Rad) e una quantità pari a circa 20µg di proteine è stata aggiunta al mezzo di coltura osteoclastico. Dopo 12 giorni è stato valutato il grado di differenziamento e l'attività degli osteoclasti condizionati dal mezzo osteoblastico mediante i saggi funzionali TRAP e di riassorbimento osseo.

5.3 TRATTAMENTI FARMACOLOGICI

Abiraterone acetato, enzalutamide (MVD3100) e cabozantinib (XL-184) forniti da Selleckem Chemicals sono stati somministrati alle cellule tumorali (LNCaP e PC-3) per 48 h, agli osteoclasti primari e agli osteoblasti primari ogni 3 giorni durante tutto il protocollo differenziativo. Le concentrazioni farmacologiche utilizzate sono le seguenti:

abiraterone: 5 µM / 10 µM su cellule tumorali/osteoblasti/osteoclasti

enzalutamide: 5 µM / 10 µM su cellule tumorali/osteoblasti/osteoclasti

cabozantinib: 0.1µM / 0.3 µM / 0.5 µM su osteoclasti primari; 1µM / 3 µM su osteoblasti, 0.2µM / 1 µM / 5 µM su cellule tumorali.

5.4 COLORAZIONE CITOCHEMICA PER LA FOSFATASI ACIDA TARTRATO RESISTENTE (TRAP)

Questa metodica consente di verificare l'avvenuto differenziamento osteoclastico dopo 12-14 giorni di coltura attraverso la rilevazione dell'attività fosfatasi acida dell'enzima TRAP, marcatore specifico degli osteoclasti.

Le cellule sono state fissate con soluzione fissante contenente formaldeide al 3,7%, soluzione citrata e acetone (Sigma Aldrich). Per rilevare i livelli di TRAP è stata preparata una soluzione costituita da sodio acetato 2.5 M, naftol AS-BI acido fosforico, nitrito di sodio, acido tartarico, e sali fast garnet GBC (reagenti contenuti nel kit Fosfatasi Acida Sigma Aldrich). Le cellule sono state incubate con questa soluzione a 37°C per 1 h. Il naftolo AS-BI rilasciato mediante idrolisi

enzimatica, si accoppia al fast garnet GBC formando depositi insolubili nei siti di attività. Quindi solo le cellule contenenti una fosfatasi acida che non risente della presenza dell'acido tartarico mostreranno la corretta colorazione, costituita da granuli citoplasmatici tra il violaceo e il rosso scuro. Per avere una stima quantitativa del differenziamento osteoclastico le cellule multinucleate TRAP positive con 3 o più nuclei che, per definizione vengono considerati osteoclasti maturi, sono state contate.

5.5 SAGGIO DI RIASSORBIMENTO OSSEO

Per analizzare l'attività osteoclastica i monociti sono stati seminati in pozzetti rivestiti da una superficie di fosfato di calcio inorganico (Corning Osteo Assay Surface) che mima la matrice ossea e differenziati in senso osteoclastico con l'aggiunta delle citochine M-CSF (25 ng/ml) e RANKL (50 ng/ml). Al termine del protocollo di differenziamento il medium è stato aspirato e gli osteoclasti sono stati rimossi mediante l'aggiunta di una soluzione di ipoclorito di sodio al 10% per 5 min e successivi lavaggi in acqua bi-distillata. L'area delle lacune presenti (ossia la superficie totale riassorbita) è stata quantificata usando il software di elaborazione digitale di immagini ImageJ.

5.6 COLORAZIONE CITOCHIMICA PER LA FOSFATASI ALCALINA (ALP)

Questa metodica consente di valutare il differenziamento delle hMSC in osteoblasti cresciute in mezzo osteogenico attraverso la rilevazione dell'attività della fosfatasi alcalina, marcatore specifico osteoblastico.

Le cellule sono state fissate con soluzione fissante contenente formaldeide al 3,7%, soluzione citrata e acetone (Sigma Aldrich). Successivamente le cellule sono state incubate con soluzione colorante alcalina costituita da soluzione alcalina FBB, soluzione di nitrito di sodio e soluzione alcalina di naftol AS-BI per 15 min (tutti i reagenti sono contenuti nel kit Fosfatasi Acida Sigma Aldrich). La valutazione quantitativa dell'intensità di colorazione e, quindi, della positività per il marcatore ALP è stata calcolata utilizzando il software di elaborazione digitale di immagini ImageJ.

5.7 COLORAZIONE CITOCHIMICA PER DEPOSITI DI CALCIO (ALIZARIN RED)

Per la valutazione della capacità di mineralizzazione della matrice, le cellule mesenchimali sono state fissate con 10% di formaldeide e successivamente incubate con una soluzione di Alizarin red S 2% a pH 4.2 (Sigma Aldrich). Dopo 45 min le cellule sono state osservate al microscopio ottico per individuare i nuclei di mineralizzazione costituiti da precipitati di calcio-fosfato, riconoscibili come noduli rossi. La colorazione Alizarin Red è stata letta e quantificata a 550 nm allo spettrofluorimetro (Tecan).

5.8 SAGGIO MTT

Per valutare la vitalità cellulare è stato eseguito il saggio MTT (Sigma Aldrich). Il saggio MTT (3,(4,5-dimethylthiazol-2)2,5 difeniltetrazolium bromide) è un test colorimetrico per misurare l'attività di enzimi mitocondriali che riducono l'MTT a formazano, facendo virare il composto da un colore giallo ad un colore blu-violetto intenso, processo che si verifica solo nelle cellule metabolicamente attive.

Le cellule sono state seminate in piastra da 96 well in 90 µl di terreno di crescita completo a cui sono stati aggiunti 10 µl di substrato MTT a ciascun pozzetto e la piastra è stata incubata in atmosfera umidificata a 37°C per 4 h. Dopo il tempo di incubazione, il surnatante è stato rimosso e sono stati aggiunti 100 µl di solvente MTT. L'assorbanza o densità ottica è stata letta a 570 nm allo spettrofluorimetro (Tecan).

5.9 ESTRAZIONE DELL'RNA E RETROTRASCRIZIONE

L'RNA totale è stato isolato dalle cellule aggiungendo 1 ml di TRIZOL[®] Reagent (Invitrogen) ad ogni pozzetto. La soluzione è stata vigorosamente mescolata con pipetta in modo da indurre la lisi delle cellule, e infine il campione omogeneizzato è stato trasferito in provette RNasi-free e incubato per 5 min a 4 ° C per consentire la completa dissociazione dei complessi di nucleoproteine. Per la fase di separazione, 0,2 ml di cloroformio sono stati aggiunti alle provette. I campioni sono stati agitati vigorosamente per 10 secondi e centrifugati a 13.000 x g per 15 min. Dopo la centrifugazione, la miscela risultava separata in una fase rossa, una del fenolo-cloroformio, contenente proteine e lipidi, un' interfase di DNA ed una fase incolore acquosa. L'RNA rimane esclusivamente nella fase acquosa. La fase acquosa è stata accuratamente trasferita in una nuova provetta senza disturbare l'interfase. Per far precipitare l'RNA dalla fase acquosa, sono stati aggiunti 0,5 ml di alcool isopropilico. I campioni sono stati incubati a -4 ° C per 10 min e centrifugati a 13.000 g per 15 min. Il precipitato di RNA, invisibile prima della centrifugazione, forma un pellet gelatinoso sui lati e sul fondo della provetta. Al fine di eliminare completamente il surnatante, il pellet di RNA è stato lavato due volte con 1 ml di etanolo al 75%. I campioni sono stati mescolati centrifugati a 7500 x g per 5 min. Infine, l'RNA è stato diluito in acqua trattata con DEPC al fine di rimuovere DNAsi e RNAsi (15- 20 microlitri) e la quantificazione dell' RNA è stata effettuata utilizzando NanoDrop, considerando la densità ottica a 260 nm e 280 nm per determinare la concentrazione e la purezza del campione.

La reversione dell'RNA estratto in cDNA è stata effettuata tramite il kit "High Capacity cDNA Reverse Trascrizione" (Applied Biosystem). Per ogni campione da revertire è stata preparata una soluzione con la quantità di RNA da retro trascrivere in acqua RNase-free, per un volume totale di 10 µl. I volumi per campione sono: 2 µl di RT-buffer 10X, 0,8 µl di dNTP Mix 25X (100mM), 2 µl di

RT-Random Primers 10X, 1 μ l di Multiscribe Reverse Transcriptase 50 U/ μ l, 4.2 μ l di acqua RNase-free (volume totale pari a 10 μ l). Ad ogni provetta con l'RNA sono stati quindi aggiunti 10 μ l di mix di reazione per un volume finale di 20 μ l; infine le provette sono state poste in un termociclatore e programmati i seguenti step:

10 min a 25°C (per equilibrare la reazione)

120 min a 37°C (azione enzimatica)

5 min a 85°C (inattivazione dell'enzima)

Hold a 4°C (conservazione).

5.10 REAL-TIME PCR

Negli esperimenti descritti in questa tesi è stata utilizzata la tecnologia TaqMan: essa prevede l'impiego di oli nucleotidi sonda, complementari a geni bersaglio e coniugati in 5' a un colorante "reporter" fluorescente e in estremo 3' ad un "quencher". Il quencher assorbe e maschera la fluorescenza emessa dal reporter (eccitato dallo strumento) fino a quando l'attività esonucleasica 5'----3' della Taq DNA-polimerasi in fase di amplificazione non li separa. La fluorescenza rimane quindi per i primi 20 cicli circa ad un livello basale; quando invece la quantità di amplificato comincia a crescere in maniera esponenziale, si ha un corrispondente aumento della fluorescenza stessa. L'indicatore della quantità di cDNA di partenza è il cosiddetto ciclo soglia (Ct), ossia la frazione di ciclo in cui comincia l'aumento esponenziale. Il valore del Ct è inversamente proporzionale alla quantità di cDNA di partenza ed è da esso che parte l'elaborazione dei dati.

L'uso di geni di riferimento (housekeeping), che sono espressi costitutivamente nei vari tipi cellulari, permette di normalizzare i valori.

Per preparare la miscela dei componenti della reazione PCR, sono stati mescolati i seguenti reagenti in provette RNase-free: 10 μ l di TaqMan Gene Expression Master Mix, 1 μ l di sonda TaqMan, 5 μ l di acqua RNase-free e 4 μ l di cDNA, per un volume finale di 20 μ l per reazione.

Le condizioni dei cicli termici sono stati impostati come segue: 10 min a 95°C, necessari per attivare l'enzima AmpliTaq Gold e 4° cicli di PCR composti da 15 secondi a 95°C per il processo di denaturazione e 1 min a 60°C per i passaggi di annealing/extension.

La qPCR è stata effettuata con la macchina 7900 HT Real Time PCR System (Applied Biosystem). In questa tesi, i geni che sono stati analizzati utilizzando le sonde specifiche TaqMan (Applied Biosystem) sono ANDROGEN RECEPTOR, CYP17A1, C-MET, VEGFR2, TRAP, CATEPSINA K, MMP-9, RANKL, OPG, OSTEOCALCINA, ALP, RUNX2.

Le PCR sono state eseguite in triplicato per ogni campione ed i valori di Ct sono presi come valori medi dei triplicati. Si è proceduto, quindi, con il calcolo del deltaCt espresso come la differenza tra il Ct del gene target e quello dell'housekeeping (in questo caso GUSB). Successivamente i livelli di espressione sono stati poi espressi come 2-deltadeltaCt, valore definito "fold change", che

quantifica l'incremento o decremento di espressione rispetto ad un campione scelto come "controllo".

5.11 ESTRAZIONE DELLE PROTEINE

Gli estratti proteici totali sono stati ottenuti lisando le cellule con 0,5 ml di RIPA Buffer (Sigma Aldrich).con l'aggiunta di un cocktail di inibitori di proteasi e di fosfatasi (Sigma Aldrich). I campioni sono stati omogenati a 4°C, incubati per 15 min in ghiaccio e centrifugati a 14.000 rpm per 10 minuti a 4°C. Il sopranatante contenente le proteine totali è stato recuperato e si è proseguito con la determinazione della concentrazione proteica. La quantificazione delle proteine presenti nei vari campioni è stata realizzata con l'impiego del Kit DC Protein Assay (Bio-Rad). Utilizzando tale tecnica, assieme all'analisi dei campioni è necessario realizzare anche una curva di taratura che fornisca una relazione matematica tra i valori di assorbanza ottenuti e le concentrazioni corrispondenti. Tale curva è stata costruita utilizzando concentrazioni note e crescenti di BSA in tampone di lisi (RIPA Buffer). Nella determinazione proteica si è lavorato in multiwell da 96 pozzetti. Ad ogni pozzetto sono stati aggiunti 1 µl di campione e 19 µl di acqua bidistillata, mentre per realizzare la curva di taratura in ciascun pozzetto si sono aggiunti 0, 1, 2, 4, 6 e 8 µl di BSA (soluzione stock 1 mg/ml), 1 µl di RIPA Buffer e acqua bidistillata fino ad un volume di 20 µl. A questo punto, in tutti i pozzetti si sono addizionati vari reagenti del Kit DC Protein Assay come da protocollo: 25 µl di una miscela di reagente A (soluzione alcalina) + reagente S (in un rapporto di 20 µl di reagente S per ml di reagente A) e 200 µl del reagente B (diluizione del Reagente di Folin). Il tutto è stato incubato al buio e in agitazione per circa 15-30 min. La successiva lettura allo spettrofotometro ($\lambda = 655 \text{ nm}$) ha consentito la costruzione di una curva di taratura utilizzando i valori noti di concentrazione e assorbanza della BSA; da tale curva è poi stato possibile ricavare le concentrazioni proteiche dei vari campioni in funzione delle loro assorbanze. Per ogni lisato proteico sono stati caricati su gel 50 µg di proteine. I campioni sono stati preparati per il caricamento portandoli tutti allo stesso volume finale mediante aggiunta di RIPA Buffer e addizionando a ciascuno 5X Protein Sample Buffer (20% glicerolo, 10% SDS, 2% beta-mercaptoetanolo, 0.5% blu di bromofenolo, 250 mM Tris, pH 6.8). I campioni sono poi stati bolliti per 5 min, brevemente centrifugati e quindi sottoposti ad analisi mediante Western blotting.

5.12 WESTERN BLOTTING

I lisati proteici sono stati sottoposti a corsa elettroforetica su gel di poliacrilammide in sodio dodecilsolfato (SDS-PAGE) per ottenere la separazione delle proteine in base alle loro dimensioni. Dopo l'elettroforesi SDS-PAGE, le proteine separate sul gel sono state trasferite su filtro di nitrocellulosa usando una cameretta di trasferimento "Trans-Blot" (Bio-Rad). L'avvenuto

trasferimento delle bande proteiche è stato visualizzato mediante colorazione per 10 minuti del filtro di nitrocellulosa con colorante Rosso Ponceau. Il filtro è stato saturato mediante incubazione per 1 ora a temperatura ambiente in una soluzione al 5% con 1X PBS contenente 0.05% Tween-20 (PBS/T) a 4°C per 1 h in un tampone di saturazione composto da 5% di latte scremato (non-fat dry milk) in PBS/T. I blots sono poi stati incubati per 2h a RT con i seguenti anticorpi primari diluiti in 5% BSA in PBS/T: *anti- Androgen Receptor*, *anti-Estrogen Receptor*, *anti-Progesteron Receptor*, (Cell Signaling); *anti-Catepsina K*, *anti- osteocalcina* (Santa Cruz Biotechnolgy); *anti-β-Actina* (Sigma Aldrich). Le membrane sono state successivamente incubate per 1h con anticorpo secondario coniugato con perossidasi di rafano (HRP) diluito in 5% latte scremato in PBS/T. Per ciascun anticorpo primario si è utilizzato uno dei due secondari rabbit-HRP (Cell Signaling) o mouse-HRP (Sigma Aldrich). I blots sono poi stati visualizzati mediante il metodo della chemiluminescenza (ECL). La rilevazione del segnale e l'analisi dei risultati sono stati eseguiti mediante il sistema Chemidoc (Bio-Rad) e il software di analisi Image Lab (Bio-Rad).

5.13 SAGGIO DI PROLIFERAZIONE (CURVE DI CRESCITA)

L'impatto dei farmaci sulla crescita/proliferazione delle cellule tumorali PC-3 è stata valutata facendo una conta al giorno in cui le cellule sono state piastrate (T0) e dopo ogni giorno per 4 giorni successivi (T96 h). I farmaci abiraterone ed enzalutamide, da soli ed in combinazione, sono stati somministrati al T0 alla concentrazione di 10µM. Il numero di cellule ad ogni tempo è stato rappresentato graficamente in scala LOG10 in funzione del tempo; inoltre è stato calcolato anche il tempo di duplicazione della linea tumorale nelle diverse condizioni sperimentali.

5.14 SAGGIO DI PROLIFERAZIONE (KI67)

La valutazione dell'indice di proliferazione delle cellule tumorali è stata effettuata attraverso la quantificazione percentuale di cellule tumorali positive per Ki-67, antigene espresso durante le fasi G1 e M del ciclo cellulare. È stato eseguito un saggio in immunofluorescenza con l'anticorpo specifico anti-Ki67 (Cell Signaling) ed analizzato al microscopio a fluorescenza.

In dettaglio le cellule sono state fatte crescere su un vetrino copri oggetto fino a raggiungere circa il 70% di confluenza, successivamente fissate in terreno completo contenente il 4% di paraformaldeide per un tempo di 20 minuti a 37°C. Si è proceduto, quindi, con lo smascheramento dei siti di legame dell'antigene mediante incubazione in antigen retrieval buffer (0.1 M Tris-HCl a pH 9.5 contenente il 5% di urea) per 20 minuti a circa 95°C e con la permeabilizzazione in PBS 1X contenente lo 0,1% di Triton X-100 per 10 minuti a RT. Dopodichè le cellule sono state incubate per 30 minuti in PBS 1X contenente il 10% di FBS (blocking buffer) e poi incubate per un'ora a RT

con l'anticorpo anti-Ki67. Terminato il tempo di incubazione, le cellule sono state incubate al buio per 45 minuti a RT con l'anticorpo secondario anti-rabbit Alexa Fluor 555(Cell Signaling). Successivamente il vetrino è stato controcolorato con una soluzione 1:1 DAPI (0.2 ng/mL)-Vectashield. Sono stati analizzati diversi campi ad un ingrandimento 20X e, per ognuno di essi, è stato rilevato il numero di cellule presenti e il numero di cellule Ki67 positive in modo da ottenere un indice di proliferazione espresso in percentuale, nelle diverse condizioni sperimentali.

5.15 SAGGIO DI APOPTOSI (TUNEL)

Il tasso di apoptosi è stato determinato utilizzando il kit "In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein" (TUNEL assay, Roche Diagnostic). Il saggio TUNEL prevede l'utilizzo dell'enzima deossinucleotidiltransferasi terminale (TdT) che, dopo fissaggio e permeabilizzazione delle cellule apoptotiche, catalizza l'aggiunta di nucleotidi marcati con fluoresceina (fluorescein-dUTP) alle estremità 3'-OH libere in modo templato-indipendente, evidenziabili mediante fluorescenza.

Il saggio è stato condotto seminando le cellule in terreno completo, in chamber-slide (BD Falcon) da otto pozzetti, lasciate aderire per circa 6 h e successivamente esposte ai vari trattamenti farmacologici per 48h. La densità di semina è stata calcolata in modo da ottenere dopo 48 h una confluenza all'incirca del 70-80%. Dopo 48 h le cellule sono state fissate con paraformaldeide al 4% in PBS per 1 h a temperatura ambiente e permeabilizzate con una soluzione 0.1% Triton X-100 in 0.1% di sodio citrato per 2 minuti in ghiaccio. Dopo alcuni lavaggi in PBS, le cellule sono state incubate con 50 µl della miscela TUNEL (composta dall'enzima TdT e dalla fluorescein-dUTP) per 1h al buio, a 37°C e in atmosfera umidificata. I vetrini sono stati quindi trattati con un montante acquoso contenente DAPI, per la marcatura dei nuclei. Con un microscopio a fluorescenza sono stati osservati i nuclei apoptotici colorati di verde (ex = 488 nm; em = 515-565 nm) e i nuclei di tutte le cellule colorati in blu (ex = 360 nm; em = 460 nm). Utilizzando un obiettivo 20x, sono stati fotografati dieci campi random e sono state contate le cellule positive per i fluorocromi. Infine, dal rapporto cellule TUNEL-positive e numero di cellule totali 4',6-diamidino-2-fenilindolo cloridrato (DAPI)-positive è stata determinata la percentuale di cellule apoptotiche. In ogni saggio sono stati introdotti due tipi di controllo:

- controllo negativo: costituito da cellule non trattate, base per quantificare la percentuale di apoptosi spontanea;
- controllo positivo: costituito da cellule trattate con Staurosporina (Sigma) per 6 h, prima di aggiungere la miscela Tunel, per indurre la frammentazione del DNA.

5.16 ANALISI STATISTICA

I risultati ottenuti nelle diverse condizioni sperimentali sono stati analizzati utilizzando il test t di Student. Tutte le P inferiori a 0.05 sono state considerate significative. L'elaborazione grafica e i test statistici sono stati eseguiti mediante il programma GraphPad Prism (San Diego, CA).

6. RISULTATI

6.1 ABIRATERONE ED ENZALUTAMIDE

6.1.1 EFFETTO SU LINEE CELLULARI DI CARCINOMA PROSTATICO

Il primo step è stato quello di valutare l'espressione dei target molecolari di abiraterone, l'enzima CYP17A1, e di enzalutamide, il Recettore degli Androgeni (AR), nelle due linee tumorali prostatiche, LNCaP e PC-3, rispettivamente androgeno dipendenti/indipendenti mediante Real Time PCR. I risultati mostrano che CYP17A1 è espresso sia nelle LNCaP che nelle PC-3 ed i livelli di mRNA risultano equiparabili nelle due linee tumorali; per quanto riguarda l'AR, i nostri risultati confermano che è espresso solo nelle cellule LNCaP. La presenza della proteina AR nelle due linee è stata analizzata anche mediante Western Blot (fig.7); inoltre sono stati valutati anche la presenza del recettore del progesterone (isoforma A/B) e del recettore degli estrogeni α .

I nostri dati mostrano il profilo triplo negativo (AR-/PR-/ER-) delle cellule ormono-indipendenti, PC-3, e quello triplo positivo (AR+/PR+/ER+) delle cellule ormono dipendenti LNCaP.

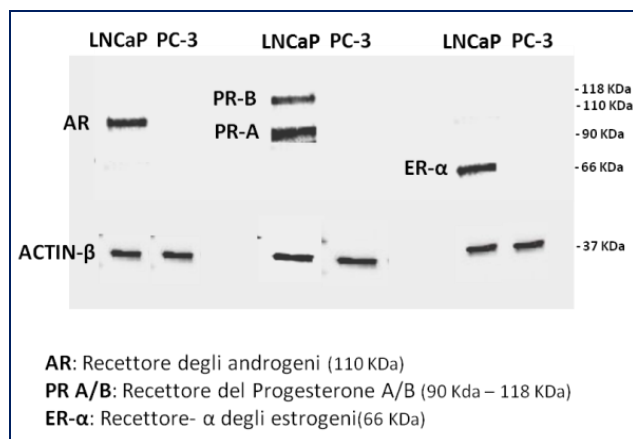


Fig 7. Caratterizzazione dell'espressione dei recettori AR/PR/ER nelle cellule tumorali prostatiche tumorali LNCaP e PC-3 (Western Blot.)

Il passo successivo è stato quello di valutare l'effetto sulla proliferazione cellulare trattando entrambe le linee tumorali con abiraterone ed enzalutamide alla concentrazione di 10 μ M, da soli ed in combinazione, per 48 ore.

Sono state adottate due condizioni sperimentali di crescita delle cellule: terreno completo contenente di siero FBS e mezzo contenente il 10% di charcoal stripped serum, CSS, depleto degli steroidi, in modo da annullare l'effetto della componente steroidea esogena sulla crescita e sulla proliferazione cellulare.

I risultati hanno evidenziato che il trattamento con i due agenti determinava una riduzione statisticamente significativa della quota cellulare proliferante Ki67+ in medium contenente FBS. (fig.8); nella condizione di assenza di steroidi, solo l'abiraterone inibiva in maniera significativa la proliferazione delle cellule LNCaP.

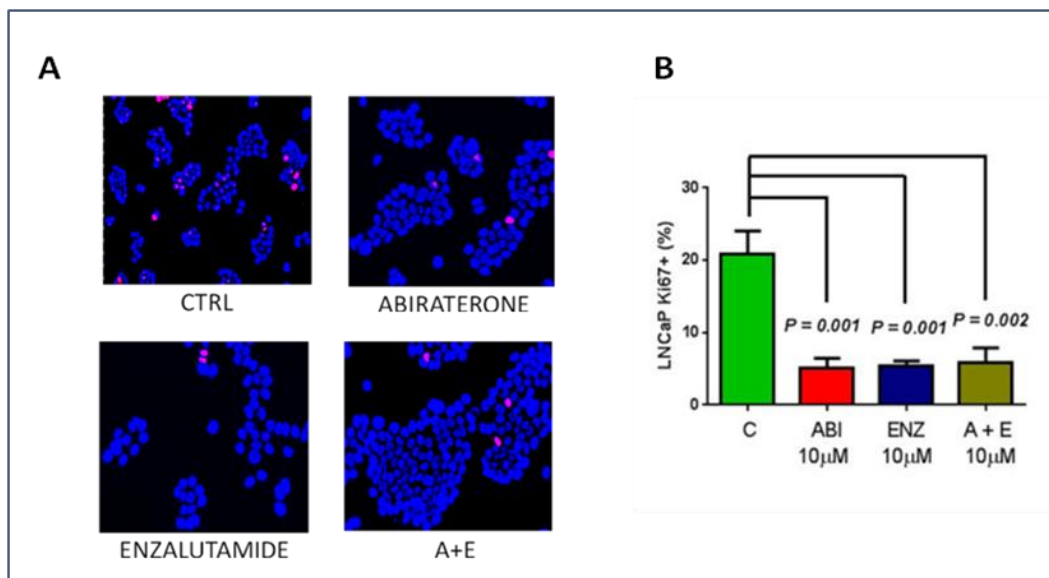


Fig 8. Effetto dei trattamenti farmacologici sulle LNCaP. A. Immunofluorescenza su LNCaP utilizzando l'anticorpo primario anti-Ki 67 (rosso) e controcolorate con DAPI (blu). B. Percentuale delle cellule Ki67+.

Per quanto riguarda l'effetto prodotto dai due farmaci sulle cellule androgeno-indipendenti PC-3, i risultati hanno mostrato che solo l'abiraterone inibiva significativamente la proliferazione (fig.9A e B). Questi dati sono stati confermati valutando la vitalità ed i tempi di duplicazione delle PC-3 dopo trattamento con abiraterone ed enzalutamide mediante curve di crescita cellulari (da T0 a T96h) (fig.9C e D) sia in presenza che in assenza di steroidi.

La combinazione dei due farmaci non produceva un effetto nè additivo nè sinergico in nessuna delle due linee cellulari.

Successivamente è stato valutato il tasso di apoptosi mediante saggio in fluorescenza (TUNEL) adottando le stesse condizioni sperimentali utilizzate in precedenza per la valutazione della proliferazione. I risultati hanno evidenziato che il trattamento con abiraterone ed enzalutamide non aveva impatto significativo sull'apoptosi in entrambe le linee tumorali (fig.10).

Questi dati suggeriscono che l'inibizione della proliferazione cellulare da parte di abiraterone potrebbe avvenire secondo un meccanismo che sembra essere androgeno-indipendente.

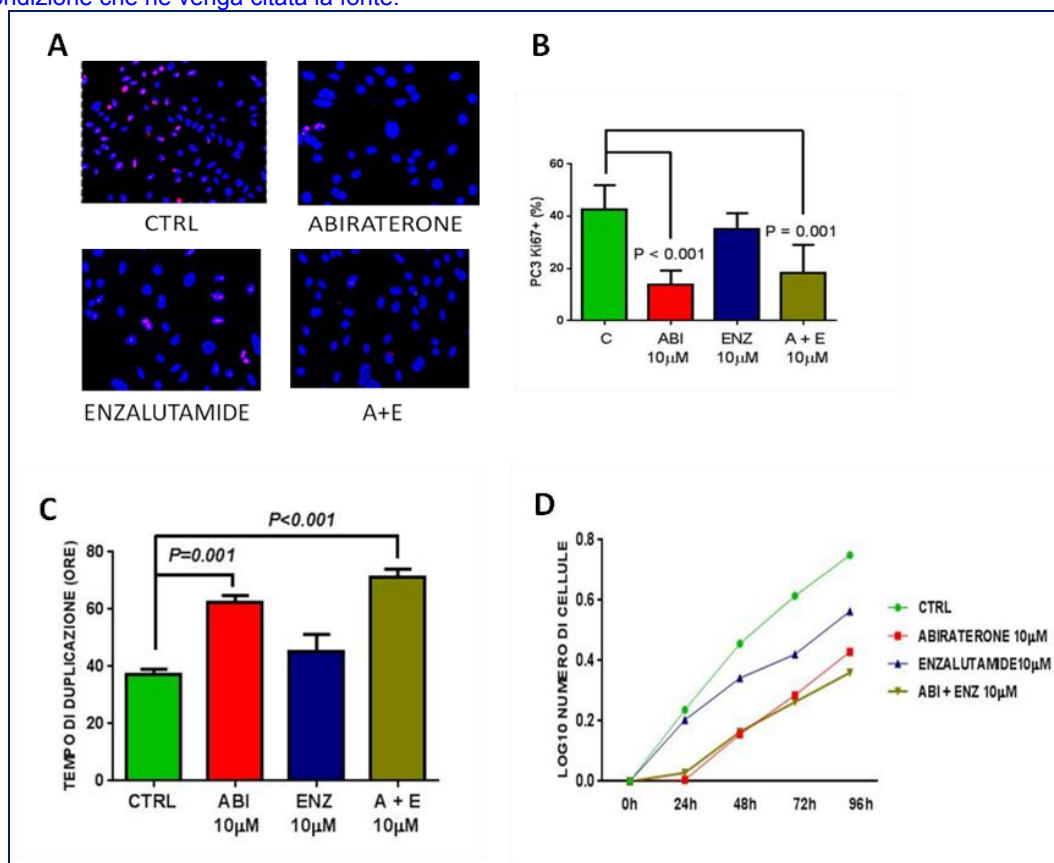


Fig 9. Effetto dei trattamenti farmacologici sulle PC-3. A. Immunofluorescenza su PC-3 utilizzando l'anticorpo primario anti-Ki67 (rosso) e controcolorate con DAPI (blu). B. Percentuale delle cellule Ki67+. C. Tempo di duplicazione. D. Curve di crescita (T0h-T96h)

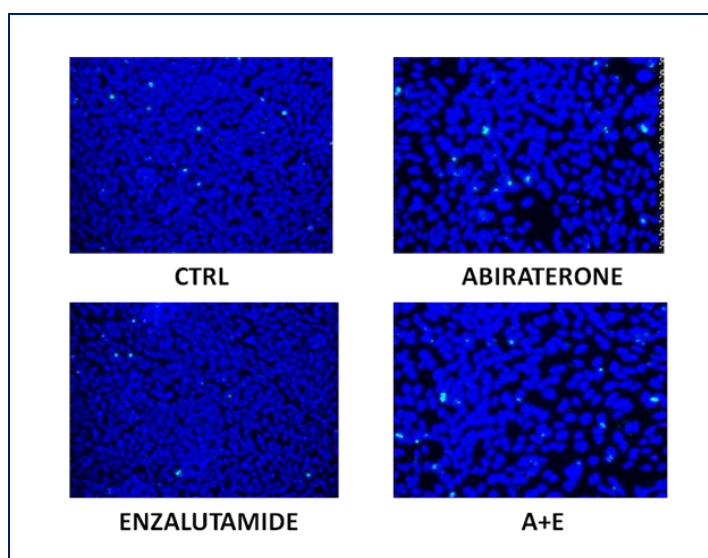


Fig 10. Effetto dei trattamenti farmacologici sull'apoptosi delle PC-3. Immagini rappresentative del saggio TUNEL in immunofluorescenza (in verde i nuclei apoptotici)

6.1.2 EFFETTO SUGLI OSTEOCLASTI UMANI PRIMARI

Il primo passo è stato, anche qui, quello di valutare l'espressione dei target molecolari CYP17A1 e AR nelle diverse fasi del differenziamento osteoclastico mediante Real Time PCR. In particolare i livelli di mRNA sono stati analizzati al T0gg (monociti), al T6gg (pre-osteoclasti) ed al T12gg (osteoclasti maturi). I dati mostrano che CYP17A1 risulta espresso durante tutte le fasi del processo maturativo osteoclastico ed i livelli di mRNA sono più alti nelle fasi precoci del differenziamento; AR risulta, anch'esso, espresso nei vari stadi maturativi ma con un aumento progressivo dei livelli di trascritti negli stadi più tardivi (fig.11). Il grafico riporta l'espressione relativa degli mRNA di CYP17A1 e AR normalizzati per l'espressione del gene costitutivamente espresso GUS β .

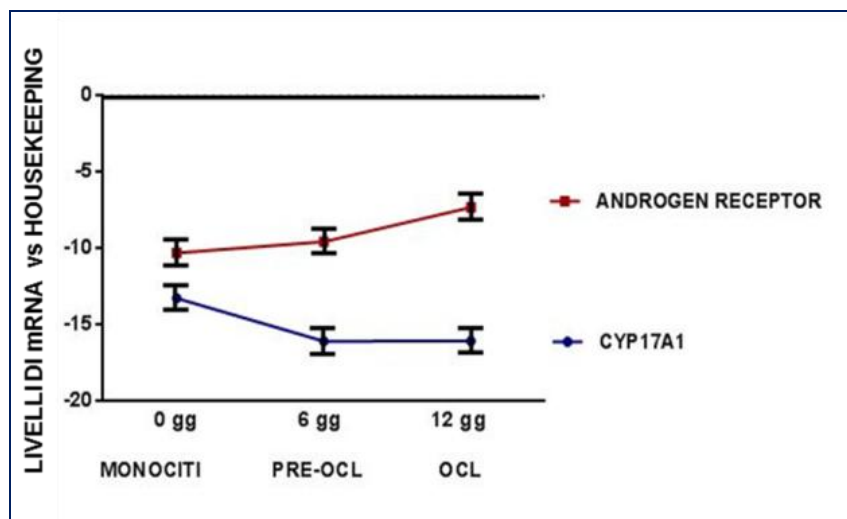


Fig 11. Livelli di mRNA di CYP17A1 e di AR espressi durante il differenziamento osteoclastico normalizzati per GUS β (REAL TIME PCR)

Il passo successivo è stato quello di testare l'effetto di abiraterone ed enzalutamide sul differenziamento osteoclastico mediante saggio colorimetrico TRAP. I farmaci sono stati somministrati entrambi a due dosi differenti (5 μ M / 10 μ M) da soli ed in combinazione, ogni 3 giorni durante tutto il protocollo differenziativo. I risultati ottenuti per i due farmaci sono diversi: il trattamento con abiraterone ha un potente effetto inibitorio, statisticamente significativo, sulla maturazione osteoclastica, ad entrambe le concentrazioni farmacologiche; il trattamento con enzalutamide non sembra, invece, avere alcun impatto sul differenziamento osteoclastico; il trattamento combinato dei due farmaci non produce nessun effetto additivo, ma un blocco della maturazione osteoclastica paragonabile all'effetto del solo abiraterone (fig.12). L'istogramma della

fig.12, riportata di seguito, mostra la percentuale del numero osteoclasti maturi (per definizione cellule TRAP+ con tre o più nuclei) nelle diverse condizioni di trattamento.

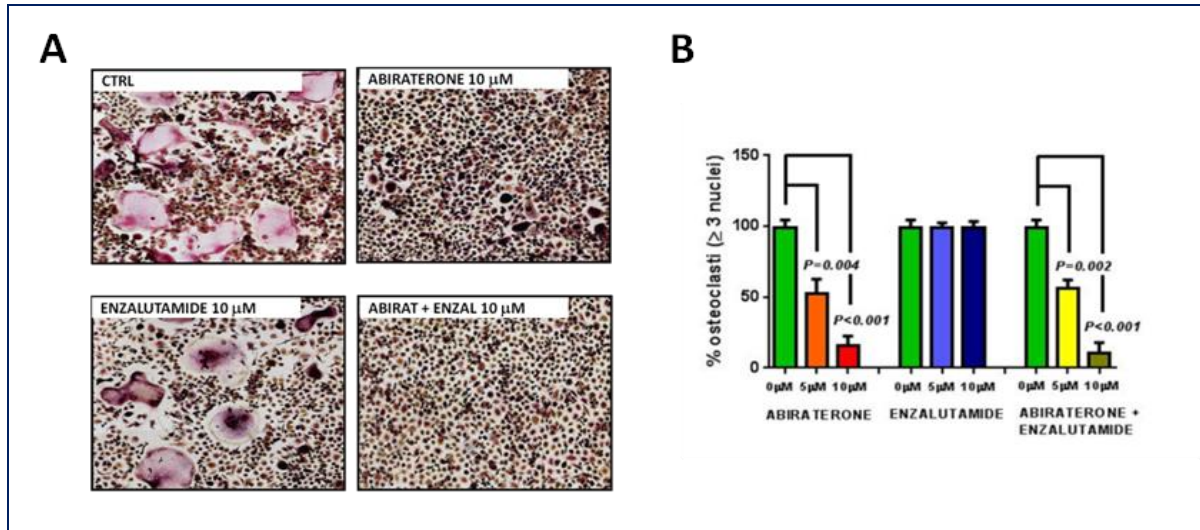


Fig 12. Effetto dei trattamenti farmacologici sul differenziamento osteoclastico. A. Immagini rappresentative della colorazione TRAP (siero FBS). B. Percentuale di osteoclasti TRAP+ nei diversi trattamenti rispetto al controllo (considerato 100%).

Parallelamente i monociti sono stati differenziati in senso osteoclastico in terreno di crescita contenente siero depleto della componente steroidea ed è stato valutato il grado di differenziamento mediante saggio TRAP nelle diverse condizioni di trattamento. I risultati ottenuti sono esattamente in linea con quelli ottenuti in presenza di ormoni steroidei e sono mostrati nella fig.13.

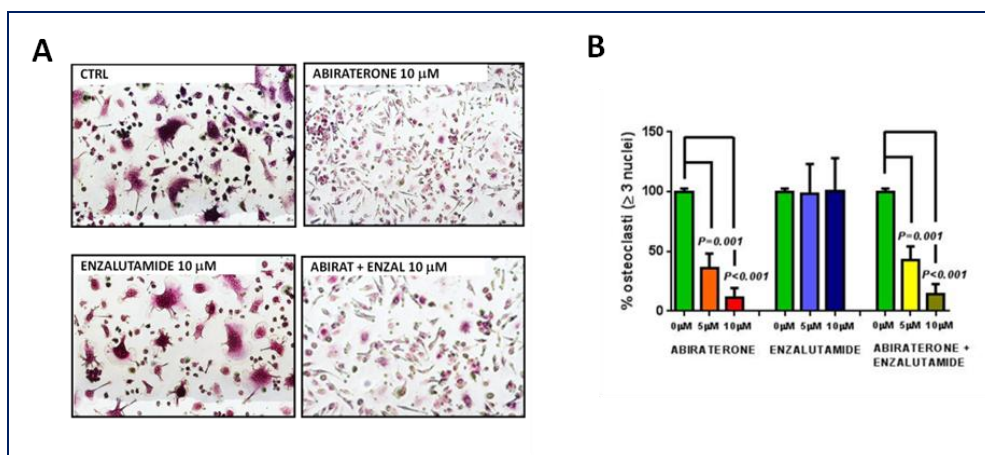


Fig 13. Effetto dei trattamenti farmacologici sul differenziamento osteoclastico. A. Immagini rappresentative della colorazione TRAP (siero charcoal-stripped). B. Percentuale di osteoclasti TRAP+ nei diversi trattamenti rispetto al controllo (considerato 100%).

Successivamente è stato analizzato l'effetto del trattamento con abiraterone ed enzalutamide sull'attività osteoclastica seminando direttamente i monociti in pozzetti rivestiti da una superficie di fosfato di calcio inorganico e valutando l'area delle lacune prodotte dagli osteoclasti al termine del processo differenziativo. I risultati confermano i dati TRAP, ossia che il trattamento con abiraterone inibisce significativamente il riassorbimento osseo sia in presenza che in assenza di ormoni steroidei ed, al contrario, l'enzalutamide non sembra avere effetto sull'attività di riassorbimento (fig.14).

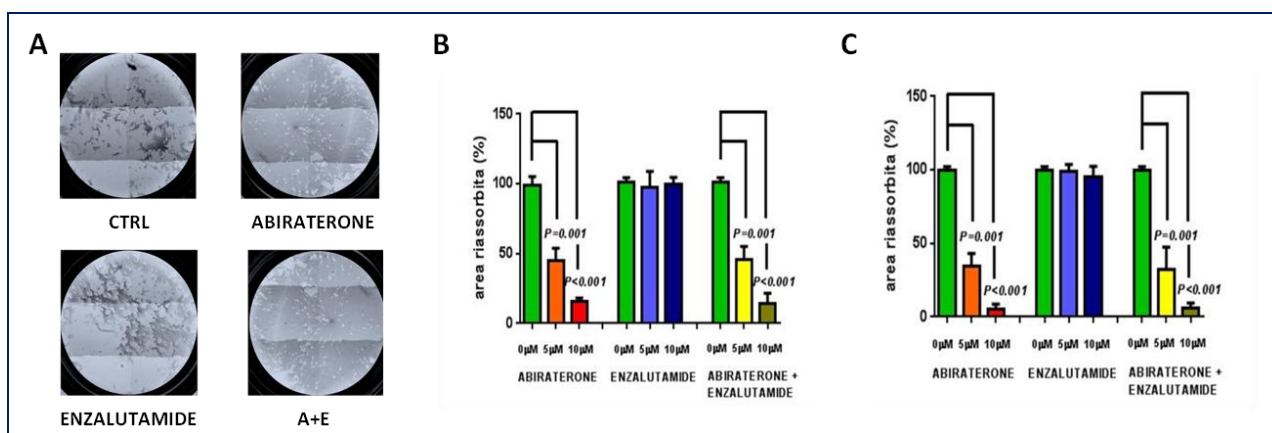


Fig 14. Effetto dei trattamenti farmacologici sull'attività osteoclastica. A. Immagini rappresentative di osso riassorbito (colorazione chiara) da parte degli osteoclasti in pozzetti 96 well rivestiti di matrice ossea. B e C. Percentuale dell'area riassorbita da parte degli osteoclasti trattati rispetto al controllo (considerato 100%). in siero FBS (B) e in siero charcoal-stripped (C).

L'analisi della vitalità cellulare degli osteoclasti maturi dopo trattamento con abiraterone ed enzalutamide è stata effettuata mediante saggio MTT. I risultati mostrano che entrambi i farmaci non hanno un impatto significativo sulla vitalità degli osteoclasti (fig.15).

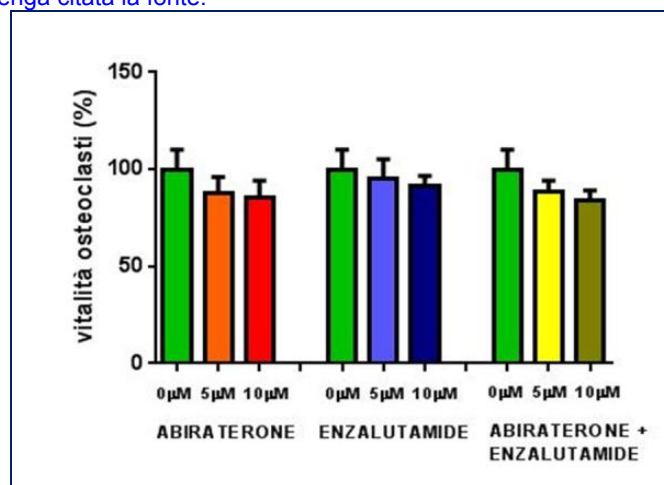


Fig 15. Effetto dei trattamenti farmacologici sulla vitalità osteoclastica (saggio MTT).

Infine abbiamo analizzato se l'abiraterone e l'enzalutamide modulavano l'espressione di alcuni geni "marker" osteoclastici come TRAP, Catepsina-K (CAT K), e metalloproteinasi (MMP-9). I risultati, ancora una volta, mostrano che solo l'abiraterone down-modulava significativamente l'espressione di tutti e tre i geni considerati (fig.16A). La riduzione dei livelli di espressione di CAT K è stata confermata anche mediante Western Blot (fig.16B).

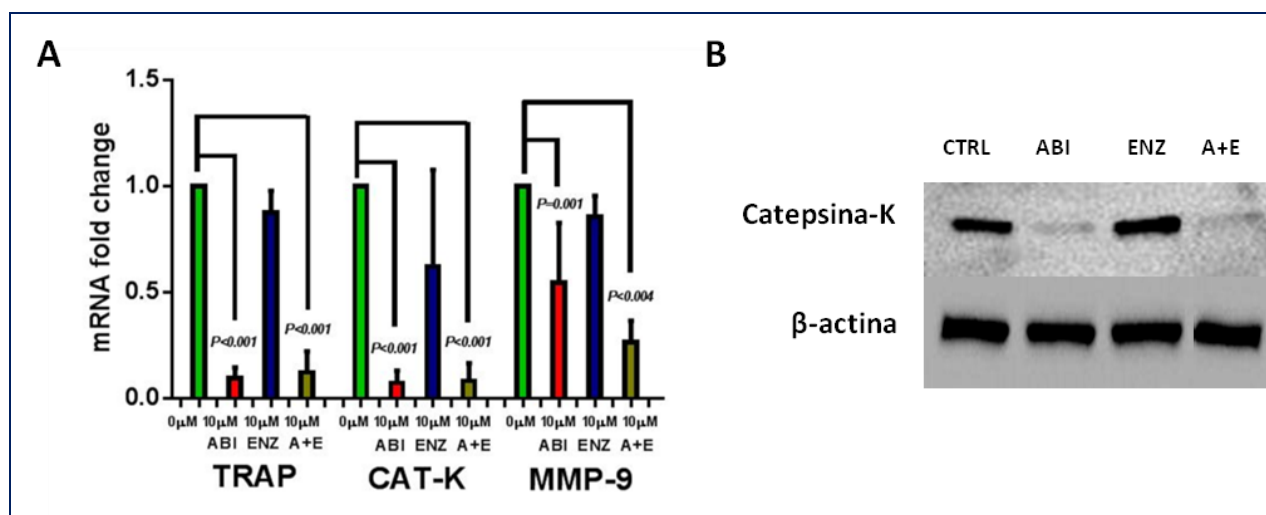


Fig 16. Effetto dei trattamenti farmacologici sull'espressione genica e proteica osteoclastica. A. Livelli di mRNA di TRAP, CAT-K e MMP-9 normalizzati per GUSβ (REAL TIME PCR). B. Livelli proteici di catepsina-K normalizzati per la β-actina (Western Blot).

6.1.3 EFFETTO SUGLI OSTEOLASTI UMANI PRIMARI

Anche per quanto concerne gli osteoblasti, il primo approccio è stato quello di valutare l'espressione dei target molecolari CYP17A1 e AR nelle diverse fasi del processo di differenziamento osteoblastico mediante Real Time PCR. I livelli di mRNA sono stati analizzati al T0gg (cellule mesenchimali), al T14gg (pre-osteoblasti) ed al T21gg (osteoblasti maturi). I dati mostrano che entrambi, CYP17A1 ed AR, risultano espressi durante tutte le fasi del processo maturativo osteoblastico ed i livelli di mRNA sono mantenuti stabili durante tutto il differenziamento (fig.17). Il grafico riporta l'espressione relativa degli mRNA di CYP17A1 ed AR normalizzati per l'espressione del gene costitutivamente espresso GUS β .

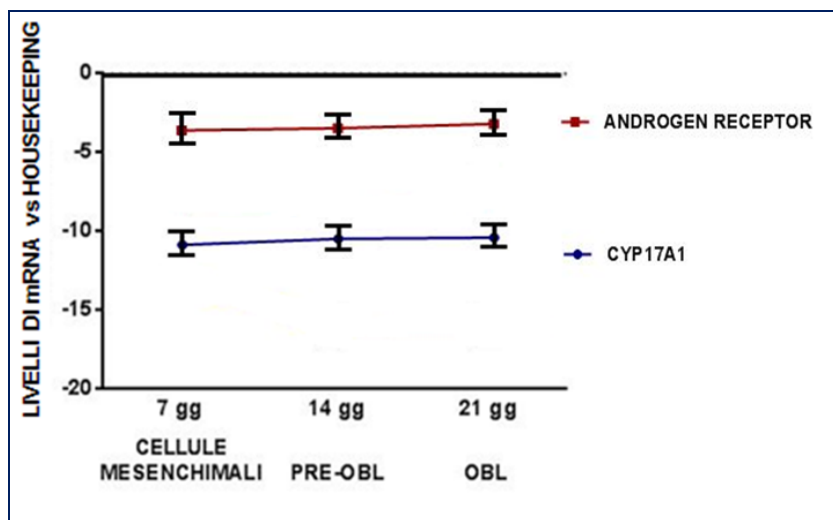


Fig 17. Livelli di mRNA di CYP17A1 e di AR espressi durante il differenziamento osteoblastico normalizzati per GUS β (REAL TIME PCR)

L'effetto del trattamento con abiraterone ed enzalutamide sul differenziamento osteoblastico è stato valutato mediante saggio colorimetrico ALP in condizioni sperimentali di assenza/presenza steroidi. I farmaci sono stati somministrati a due dosi differenti (5 μ M / 10 μ M) da soli ed in combinazione, ogni 3 giorni, durante tutto il protocollo differenziativo.

Il primo dato osservato è che gli osteoblasti, a differenza degli osteoclasti, necessitavano della componente esogena steroidea per una completa differenziazione; infatti la percentuale di cellule ALP+ misurata a 14 giorni risultava molto ridotta in assenza di steroidi (fig.18), così come la produzione di matrice ossea a 21 giorni era quasi assente.

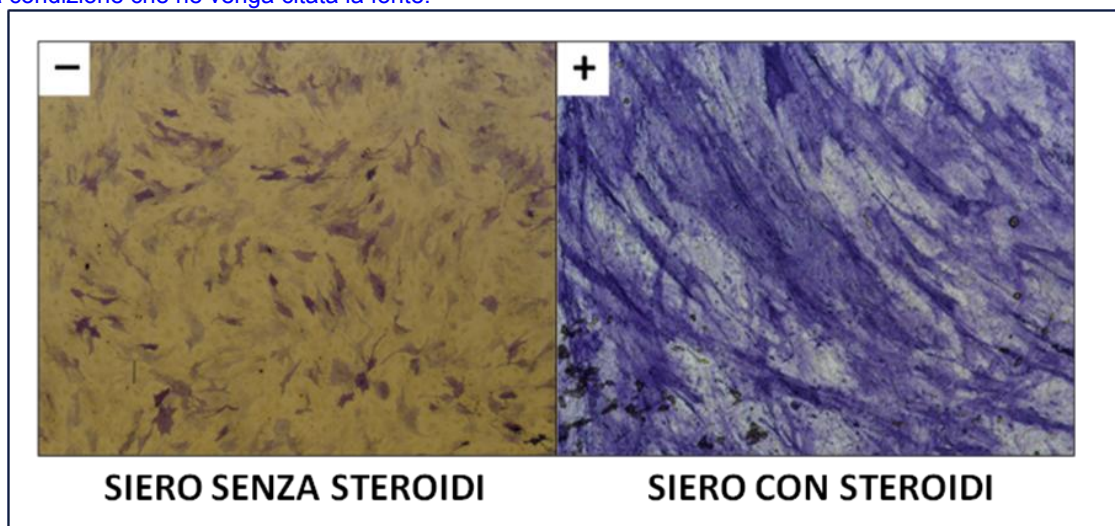


Fig 18. Immagine rappresentativa della quota di osteoblasti ALP+ (colorazione blu) in condizioni di crescita in siero FBS (con steroidi) ed in siero charcoal.stripped (depleto di steroidi)

Il trattamento con abiraterone delle cellule cresciute in siero depleto di steroidi che mostravano un ridotto livello di differenziazione osteoblastica, sembrava, tuttavia, promuoverne la maturazione. Infatti la percentuale di cellule ALP+ negli osteoblasti trattati rispetto al controllo (considerato sempre 100%) aumentava significativamente; al contrario l'enzalutamide sembrava ridurre, seppur in modo non significativo, il differenziamento osteoblastico; infine somministrando entrambi i farmaci agli osteoblasti l'aumento della percentuale delle cellule ALP+ non raggiungeva la significatività statistica.

L'effetto anabolico dell'abiraterone sugli osteoblasti primari e, quindi, l'aumento della positività al marcatore osteoblastico ALP è stato confermato anche in presenza di steroidi.

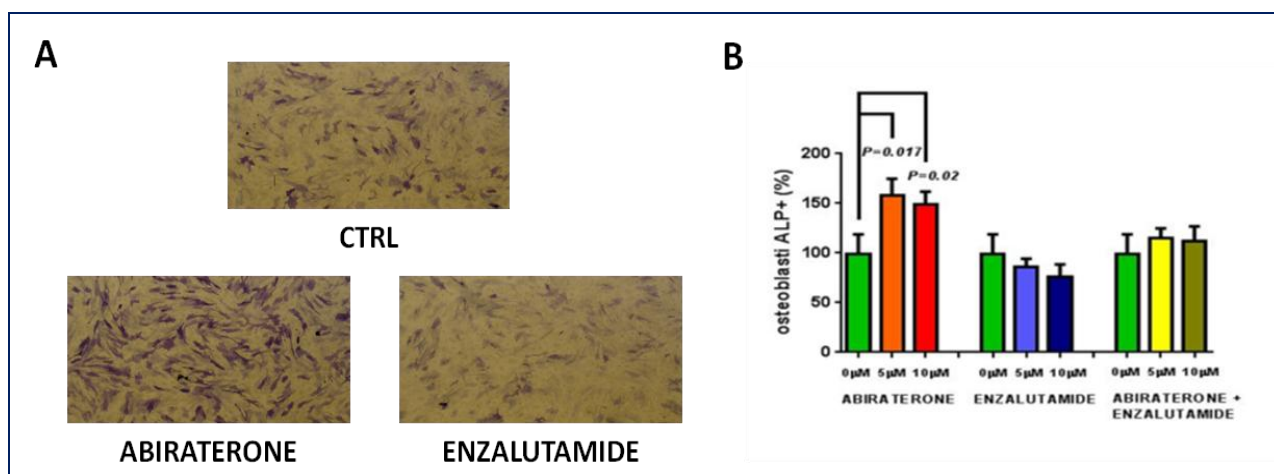


Fig 19. Effetto dei trattamenti farmacologici sul differenziamento osteoblastico. A. Immagini rappresentative della colorazione ALP (siero siero charcoal.stripped). B. Percentuale di osteoblasti ALP+ nei diversi trattamenti rispetto al controllo (considerato 100%).

L'attività degli osteoblasti è stata valutata nella condizione di crescita in presenza di steroidi dal momento che l'assenza di questi non permetteva di ottenere osteoblasti maturi funzionali in grado di produrre matrice ossea in maniera rilevante. I dati ottenuti confermavano quanto osservato con il saggio ALP, ossia che il solo trattamento con abiraterone incrementava significativamente la deposizione di matrice ossea quantificata dopo colorazione specifica Alizarin Red (fig.20).

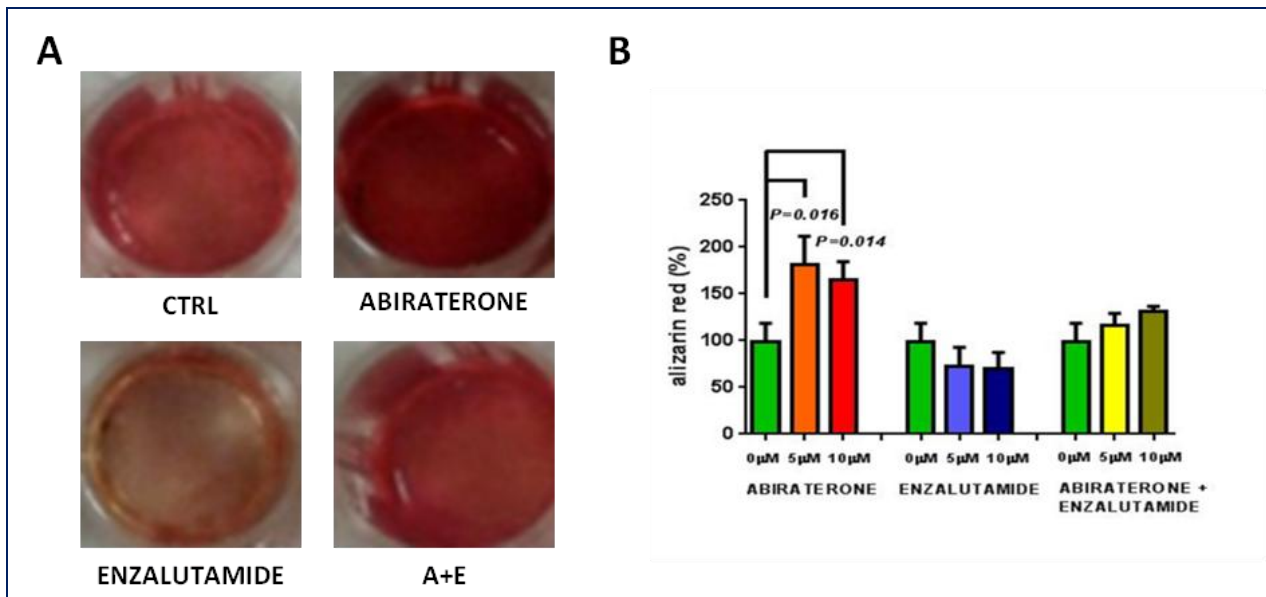


Fig 20. Effetto dei trattamenti farmacologici sull'attività osteoblastica. A. Immagini rappresentative di osteoblasti dopo colorazione Alizarin Red. B. Percentuale di positività ad Alizarin Red degli osteoclasti trattati rispetto al controllo (considerato 100%).

Successivamente è stata valutata la vitalità cellulare degli osteoblasti maturi in seguito a trattamento con i due agenti mediante saggio MTT. I risultati mostrano che nessuno dei due farmaci aveva un effetto citotossico sugli osteoblasti e non avevano impatto significativo sulla loro vitalità (fig.21).

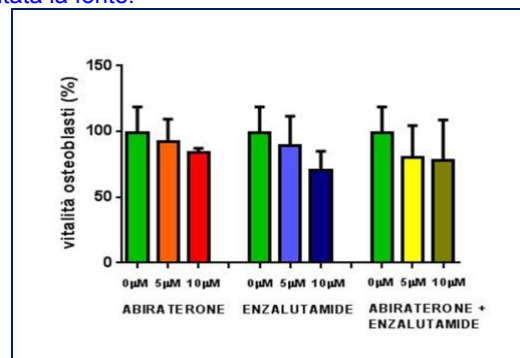


Fig 21. Effetto dei trattamenti farmacologici sulla vitalità osteoblastica (saggio MTT).

Infine abbiamo analizzato se l'abiraterone e l'enzalutamide, da soli o in combinazione, modulavano l'espressione di alcuni geni "marker" osteoblastici come ALP, osteocalcina (OCN), RUNX2 in presenza/assenza di ormoni. I risultati ottenuti risultavano, ancora una volta, sovrapponibili nelle due condizioni sperimentali (fig.22A). Per quanto riguarda il trattamento con abiraterone, è stato osservato un' up-regolazione significativa di ALP, ed un incremento, seppur non statisticamente significativo, di OCN in linea con quanto ottenuto, precedentemente, con i saggi funzionali; per quanto concerne l'enzalutamide, questo agente sembrava alterare il "balance" RANKL/OPG inducendo un' up-regolazione significativa di RANKL concomitante ad una diminuzione di OPG. L'aumento dei livelli di espressione di osteocalcina è stata confermato anche mediante Western Blot (fig.22B).

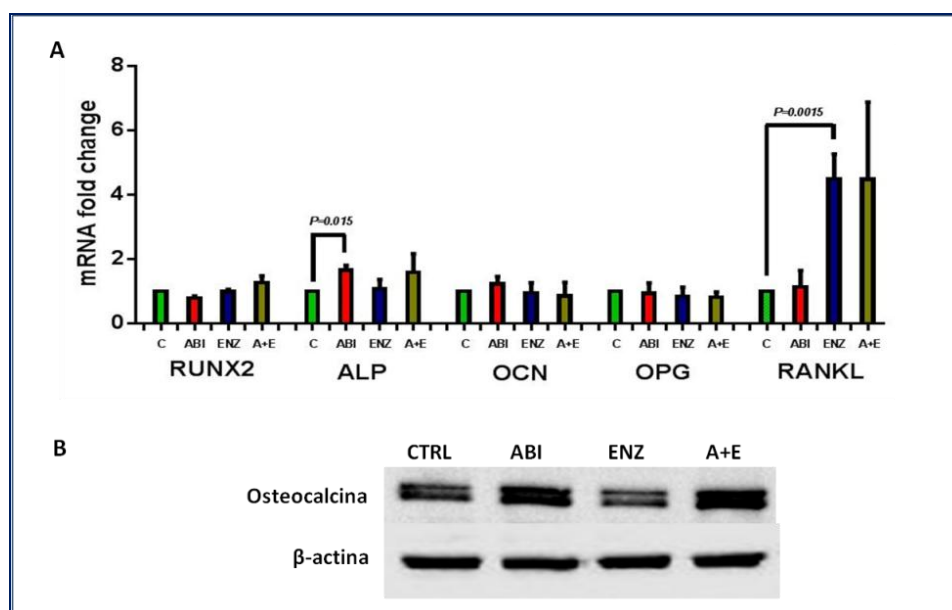


Fig 22. Effetto dei trattamenti farmacologici sull'espressione genica e proteica osteoblastica. A. Livelli di mRNA sono normalizzati per GUSβ (REAL TIME PCR). B. Livelli proteici di osteocalcina normalizzati per la β-actina (Western Blot).

7. DISCUSSIONE

Il dato più interessante che si evince dai nostri risultati è, senza dubbio, l'effetto androgeno-indipendente dell'abiraterone che sembra agire secondo un meccanismo "non canonico" che induce un blocco della proliferazione di cellule tumorali, come le PC-3. Questo tipo cellulare, infatti, non esprime il recettore degli androgeni e cresce indipendentemente da questi. I nostri dati sono in accordo con quelli dimostrati da alcuni ricercatori che, testando sulle PC-3 un inibitore dell'enzima Cyp17, chimicamente analogo all'abiraterone, avevano osservato un effetto inibitorio significativo del composto sulla crescita cellulare. Nel loro lavoro, pubblicato su *Molecular Cancer Therapeutics*, ipotizzavano un meccanismo d'azione androgeno-indipendente in cui l'inibitore di Cyp17 agiva inducendo un rapido rilascio di calcio dal reticolo endoplasmatico con conseguente aumento della concentrazione di calcio intracellulare¹¹². La perturbazione dell'omeostasi del calcio, a sua volta, induceva, la risposta allo stress del reticolo (ERSR), conosciuta anche come "Unfolded Protein Response" (UPR), che attraverso la fosforilazione del fattore di allungamento della traduzione eIF2 α e l'up-regolazione di geni di risposta allo stress, provocava un arresto del ciclo cellulare per permettere il corretto ripiegamento delle proteine¹¹². Questi ricercatori ipotizzavano che l'inibitore di Cyp17 agiva secondo questo meccanismo che aveva come risultato finale il blocco della crescita cellulare. In generale l'induzione dell'ERSR se risulta persistente può portare all'attivazione del processo apoptotico mediata principalmente dai mitocondri e/o dall'attivazione downstream di chinasi pro-apoptiche dipendenti dall'attivazione della via estrinseca¹¹³.

Il trattamento con abiraterone potrebbe, dunque, indurre lo stress del reticolo endoplasmatico ed attivare l'ERSR nelle cellule tumorali; probabilmente, però, tale stress indotto non è tanto severo da attivare il processo apoptotico, ma solo in grado di provocare un arresto della proliferazione.

D'altra parte l'apoptosi non può essere esclusa del tutto in quanto la metodica "TUNEL", utilizzata nei nostri esperimenti per la "detection" dell'apoptosi, si basa sulla rilevazione in fluorescenza della frammentazione del DNA e, quindi, permette la visualizzazione delle sole cellule in fase di apoptosi "tardiva", ma non ci permette di identificare quelle che si trovano nelle fasi "precoci" di apoptosi. Per quanto riguarda l'enzalutamide, esso agisce secondo un meccanismo "classico", legandosi e bloccando la traslocazione del recettore degli androgeni con conseguente inibizione della proliferazione cellulare nelle cellule androgeno-dipendenti LNCaP solo in presenza di una fonte steroidea esogena conferita dal siero FBS. Infatti sia in assenza di stimolazione steroidea nelle LNCaP che in cellule che non esprimono il target (AR) come le PC-3, l'enzalutamide non sembra avere alcun effetto sulla crescita e sulla vitalità cellulare.

Inoltre l'aggiunta di enzalutamide al trattamento con abiraterone nelle PC-3 non potenzia l'effetto inibitorio che il solo abiraterone esercita sulla proliferazione; anche per quanto riguarda le cellule LNCaP la combinazione dei due farmaci non produce effetti sinergici o additivi.

Successivamente è stata valutata l'azione diretta di questi due farmaci su colture primarie di osteoclasti ed osteoblasti umani in presenza/assenza di steroidi. Alcuni studi clinici hanno dimostrato che questi due agenti, oltre ad aumentare la sopravvivenza di pazienti affetti da carcinoma prostatico resistente alla castrazione, sono in grado, anche, di ridurre l'incidenza e ritardare la comparsa delle complicanze scheletriche correlate alle metastasi ossee, fornendo un solido razionale per lo studio del loro effetto diretto sulle cellule ossee. Inoltre non sono presenti studi in letteratura che hanno analizzato il potenziale effetto diretto *in vitro* di questi due farmaci su colture primarie di osteoclasti ed osteoblasti.

Il primo step ci ha consentito di verificare l'espressione di entrambi i target molecolari, CYP17 e AR, nei nostri osteoclasti ed osteoblasti primari nei diversi stadi maturativi.

I dati mostrano che l'abiraterone non sembra avere un'azione citotossica sugli osteoclasti in quanto non ne riduce la vitalità, ma piuttosto ne inibisce il differenziamento e l'attività come mostrato nei saggi funzionali TRAP e di riassorbimento osseo. Al contrario l'enzalutamide, somministrato alle stesse dosi dell'abiraterone, non sembra avere alcun impatto sulla vitalità e sulla maturazione osteoclastica.

Per quanto riguarda gli osteoblasti, ancora una volta, abbiamo ottenuto un effetto diverso somministrando i due farmaci. Infatti l'abiraterone esibisce un effetto anabolico promuovendo il differenziamento e la funzionalità degli osteoblasti, ma non intaccandone la vitalità; l'enzalutamide, invece, non mostra effetti significativi sugli osteoblasti maturi. La combinazione dei due agenti non mostra alcun effetto sinergico, additivo o antagonista, ma un effetto paragonabile a quello ottenuto trattando gli osteoclasti e gli osteoblasti con il solo abiraterone.

I nostri risultati dimostrano, per la prima volta in letteratura, un'attività sia anabolica che di inibizione osteoclastica di abiraterone *in vitro* accompagnata da una modulazione dei "geni markers" osteoclastici ed osteoblastici. Per quanto concerne l'espressione genica, i nostri dati mostrano che anche l'enzalutamide regola significativamente i livelli di espressione di alcuni geni analizzati nelle cellule osteoblastiche; in particolare il trattamento down-modula OPG e up-regola RANKL facendo ipotizzare, in questo caso, un'attivazione osteoclastica indiretta mediata dagli osteoblasti da parte di enzalutamide.

Come per le cellule tumorali, l'effetto di abiraterone sembrerebbe essere androgeno-indipendente dal momento che la sua azione anabolica e repressiva sugli osteoclasti è esercitata sia in presenza che assenza di steroidi.

Anche l'effetto di abiraterone sulle cellule ossee potrebbe essere ricondotto allo stress del reticolo endoplasmatico e alla fosforilazione di eIF2 α che, come detto prima, causa un blocco del processo di sintesi proteica per la maggior parte delle proteine per favorirne il corretto ripiegamento, ma che allo stesso tempo ne promuove la sintesi di alcune tra le quali ATF4¹¹⁴. Quest'ultima è un fattore di trascrizione che promuove l'osteoblastogenesi up-regolando i livelli di osteocalcina e incrementando la deposizione di matrice ossea. Inoltre l'inibizione della defosforilazione di eIF2 α

ottenuta con la somministrazione di alcuni composti specifici (salubrinal e guanabenz), non solo provoca un up-regolazione di ATF4 promuovendo l'osteoblastogenesi, ma down-modula NFATc1 responsabile dell'attivazione osteoclastica.

In definitiva la nostra ipotesi è che il trattamento con abiraterone induce la risposta allo stress del reticolo endoplasmatico mediante la fosforilazione di eIF2 α in cellule tumorali, osteoblasti ed osteoclasti che, a sua volta, provoca, da una parte il blocco della proliferazione tumorale senza indurre apoptosi, dall'altra incrementa la trascrizione di ATF4 responsabile della differenziazione osteoblastica e diminuisce quella NFATc1 con conseguente inibizione del riassorbimento osseo (fig.23).

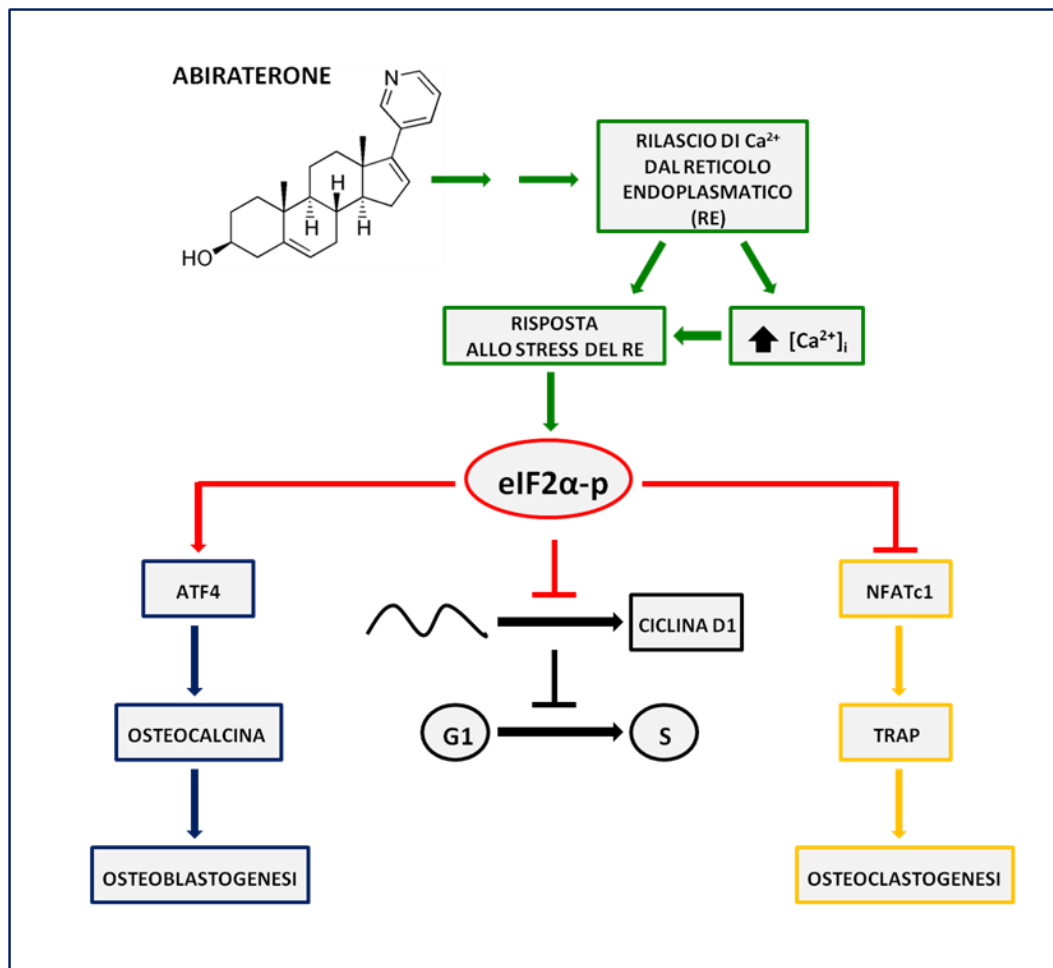


Fig 23. Potenziale meccanismo di azione androgeno-indipendente di abiraterone che inibisce la proliferazione tumorale e l'osteoclastogenesi e promuove l'osteoblastogenesi (Modified from ¹Bruno RD, et al. Mol. Cancer Ther. 2008; ²Hamamura K, et al. J Bone Rev. Miner. Metab. 2013)

8. RISULTATI

8.1 CABOZANTINIB

8.1.1 EFFETTO SU LINEE CELLULARI DI CARCINOMA PROSTATICO

Il primo step è stato sempre quello di valutare l'espressione dei target molecolari del cabozantinib, c-MET e VEGFR-2, nelle due linee tumorali prostatiche PC-3 e LNCaP mediante Real Time PCR. I risultati mostravano che entrambi i bersagli tirosin-chinasici sono espressi dalle due linee tumorali e che, in particolare c-MET, risulta maggiormente espresso nelle PC-3, modello di tumore prostatico metastatico. Questi dati sono in accordo con le numerose evidenze riportate in letteratura che sottolineano il ruolo chiave di c-MET nel promuovere la progressione e metastatizzazione tumorale²⁹. Il grafico riporta l'espressione relativa degli mRNA di c-MET e VEGFR-2 normalizzati per l'espressione del gene costitutivamente espresso GUS β (fig.24).

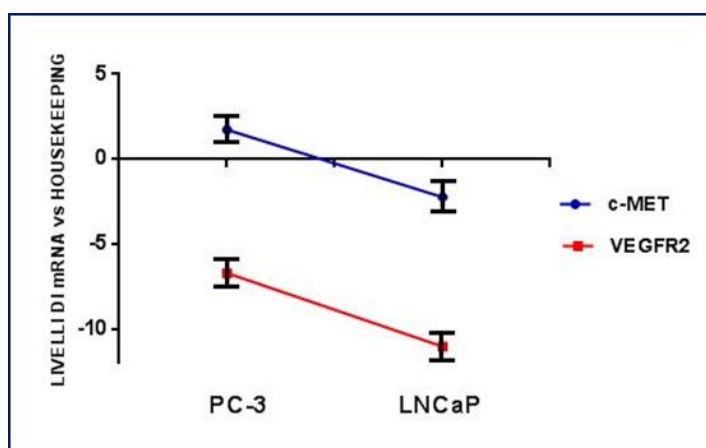


Fig 25. Livelli di mRNA di c-MET e di VEGFR-2 espressi da LNCaP e PC-3 normalizzati per GUS β (REAL TIME PCR).

Focalizzandoci sulla linea tumorale PC-3 abbiamo valutato l'effetto del cabozantinib su due parametri tra i più rilevanti dal punto di vista biologico, la proliferazione e l'apoptosi esponendo le cellule tumorali a diverse dosi del farmaco per 48 ore. La proliferazione è stata analizzata in fluorescenza utilizzando l'anticorpo anti-Ki67, l'apoptosi mediante il kit commerciale TUNEL che permette di visualizzare le cellule apoptotiche in fluorescenza.

I dati mostravano che solo alla dose più elevata somministrata di 5 μ M si osservava un'inibizione statisticamente significativa della proliferazione cellulare ($P = 0.043$) come riportato nella fig.26. L'istogramma evidenzia, infatti, una riduzione significativa della percentuale di cellule tumorali Ki67

positive rispetto al controllo. Al contrario il trattamento con cabozantinib non sembrava avere un impatto significativo sull'apoptosi.

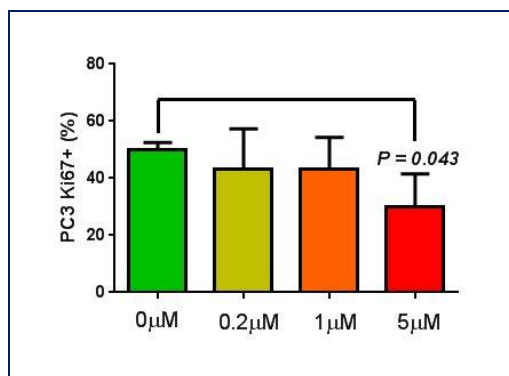


Fig 26. Effetto del cabozantinib sulla proliferazione delle PC-3. Percentuale delle cellule Ki67+.

8.1.2 EFFETTO DEL CABOZANTINIB SUGLI OSTEOLASTI UMANI PRIMARI

La caratterizzazione dei target molecolari del cabozantinib, c-MET e VEGFR-2, è stata eseguita durante le diverse fasi del differenziamento osteoclastico mediante Real Time PCR. In particolare i livelli di mRNA sono stati analizzati al T0gg (monociti), al T6gg (pre-osteoclasti) ed al 12gg (osteoclasti maturi). I dati mostravano che entrambi i targets risultavano espressi nelle varie fasi del processo maturativo osteoclastico e i livelli di trascritti variavano nei diversi tempi analizzati (fig.27). Il grafico riporta l'espressione relativa degli mRNA di c-MET e VEGFR-2 normalizzati per l'espressione del gene costitutivamente espresso GUS β .

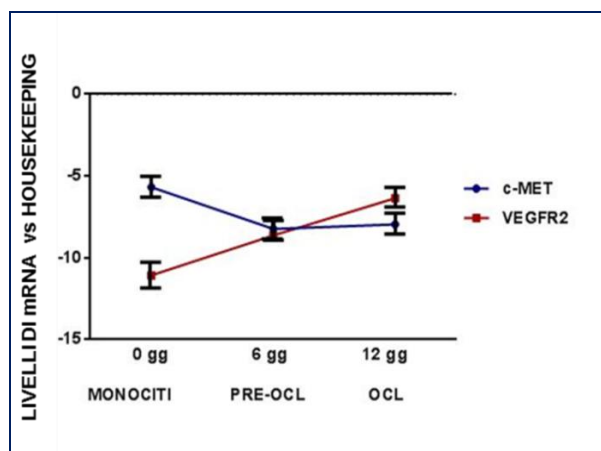


Fig 27. Livelli di mRNA di c-MET e di VEGFR-2 espressi durante il differenziamento osteoclastico normalizzati per GUS β (REAL TIME PCR).

La valutazione dell'effetto del trattamento con cabozantinib a dosi differenti (0.1 μ M / 0.3 μ M / 0.5 μ M) sul differenziamento osteoclastico è stata effettuata mediante saggio colorimetrico TRAP. I risultati mostravano che il trattamento inibiva la maturazione osteoclastica già a basse dosi (0.1 μ M) ma questa inibizione raggiungeva la significativa statistica alla concentrazione di 0.5 μ M ($P = 0.019$). L'istogramma, riportato di seguito mostra la riduzione percentuale del numero osteoclasti maturi (per definizione cellule TRAP+ con tre o più nuclei) nelle cellule trattate con cabozantinib rispetto al controllo (fig.28).

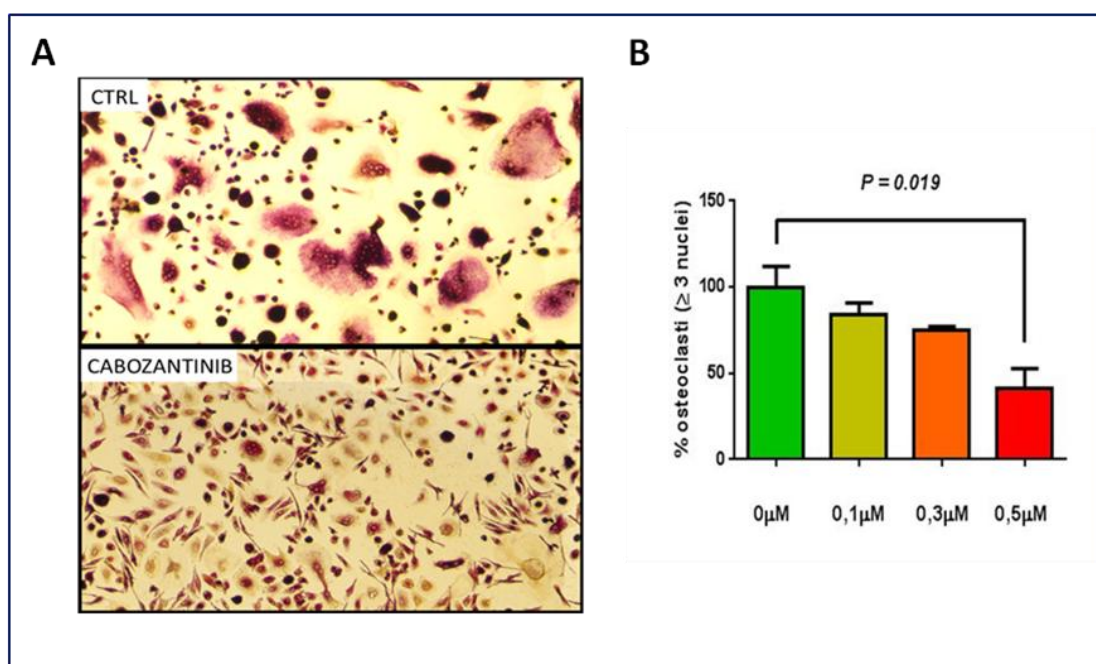


Fig 28. Effetto del cabozantinib sul differenziamento osteoclastico. A. Immagini rappresentative della colorazione TRAP. B. Percentuale di osteoclasti TRAP+ trattati rispetto al controllo (considerato 100%).

La valutazione dell'impatto del trattamento con cabozantinib sull'attività osteoclastica è stata analizzata seminando direttamente i monociti in pozzetti rivestiti da una superficie di fosfato di calcio inorganico e valutando l'area delle lacune prodotte dagli osteoclasti al termine del processo differenziativo. I risultati mostravano che il trattamento con cabozantinib inibiva significativamente il riassorbimento osseo (fig.29).

Successivamente è stata valutata la vitalità cellulare degli osteoclasti maturi al termine del protocollo di differenziamento e di trattamento con cabozantinib mediante saggio MTT. I risultati mostravano che il trattamento non aveva un impatto significativo sulla vitalità degli osteoclasti (fig. 30).

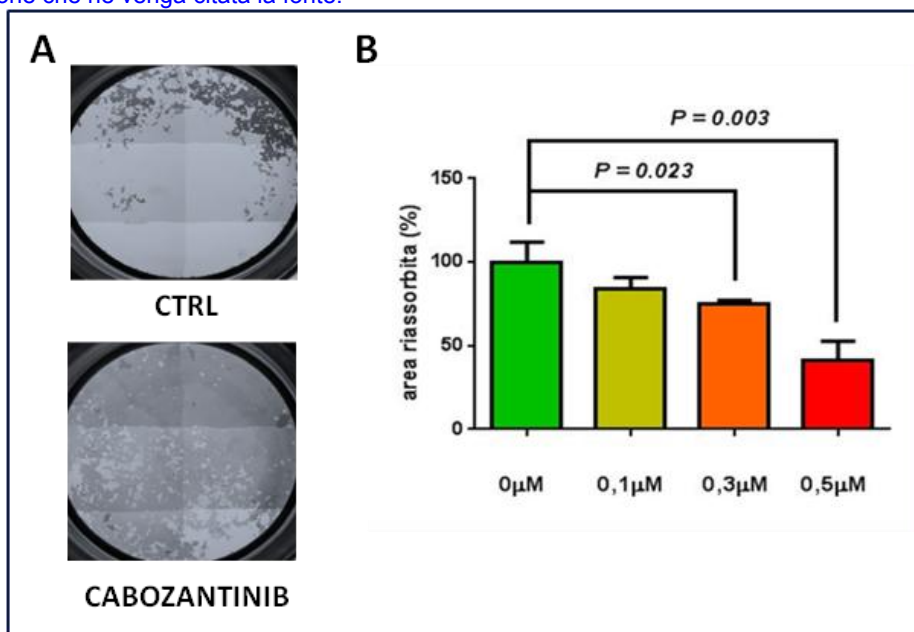


Fig 29. Effetto del cabozantinib sull'attività osteoclastica. A. Immagini rappresentative di osso riassorbito (colorazione chiara) da parte degli osteoclasti in pozzetti 96 well rivestiti di matrice ossea. B. Percentuale dell'area riassorbita da parte degli osteoclasti trattati rispetto al controllo (considerato 100%).

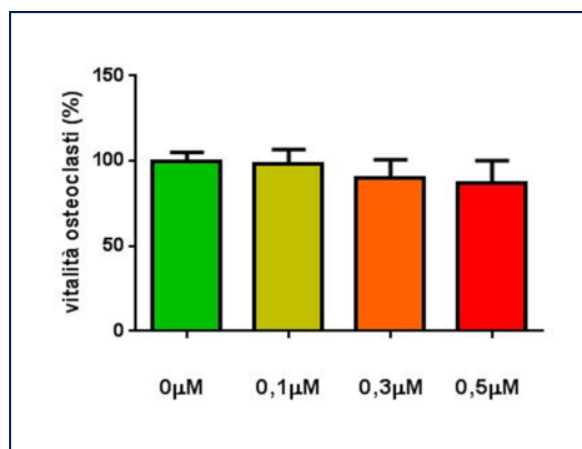


Fig 30. Effetto del cabozantinib sulla vitalità osteoclastica (saggio MTT).

Infine abbiamo analizzato l'effetto del cabozantinib sulla regolazione dell'espressione di alcuni geni "marker" osteoclastici come TRAP, CAT-K, MMP-9. I risultati evidenziavano che il cabozantinib down-modulava significativamente l'espressione del gene TRAP e CAT-K ma non del gene MMP-9 (fig.31).

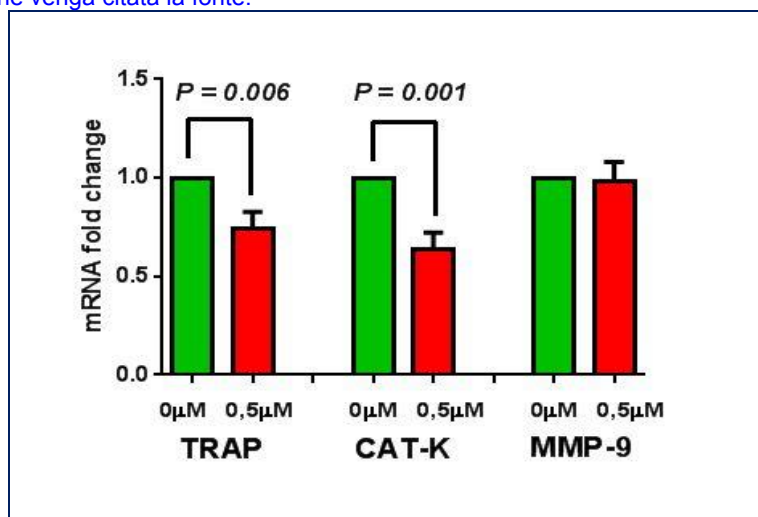


Fig 31. Effetto del cabozantinib sull'espressione genica degli osteoclasti. Livelli di mRNA normalizzati per GUSβ (REAL TIME PCR).

8.1.3 EFFETTO DEL CABOZANTINIB SUGLI OSTEOLASTI UMANI PRIMARI

Anche per quanto riguarda gli osteoblasti, il primo step è stato quello di valutare l'espressione dei targets molecolari del cabozantinib, c-MET e VEGFR-2, nelle diverse fasi del differenziamento osteoblastico mediante Real Time PCR. In particolare i livelli di mRNA sono stati analizzati al T0gg (cellule mesenchimali), al T14gg (pre-osteoblasti) ed al 21gg (osteoblasti maturi). I dati mostravano che c-MET e VEGFR-2 erano entrambi espressi ed i livelli di mRNA mantenuti stabili durante tutte le fasi del processo maturativo osteoblastico; inoltre c-MET e VEGFR-2 risultavano rispettivamente iper- e ipo-espressi rispetto al gene housekeeping GUSβ (fig.32). Il grafico riporta l'espressione relativa degli mRNA di c-MET e VEGFR-2 normalizzati per l'espressione del gene costitutivamente espresso GUSβ.

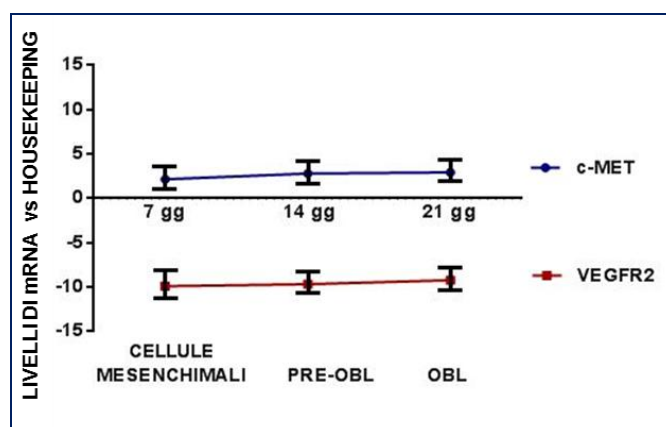


Fig 32. Livelli di mRNA di c-MET e di VEGFR-2 espressi durante il differenziamento osteoblastico normalizzati per GUSβ (REAL TIME PCR)

L'effetto del trattamento con cabozantinib sul differenziamento osteoblastico è stato valutato mediante saggio colorimetrico ALP. Il farmaco è stato somministrato a due dosi differenti ($1\mu\text{M}$ / $3\mu\text{M}$), ogni 3 giorni, durante tutto il protocollo differenziativo. I risultati mostravano che la percentuale di cellule ALP+ negli osteoblasti trattati risultava essere paragonabile a quella della condizione di controllo come mostrato nella fig.33.

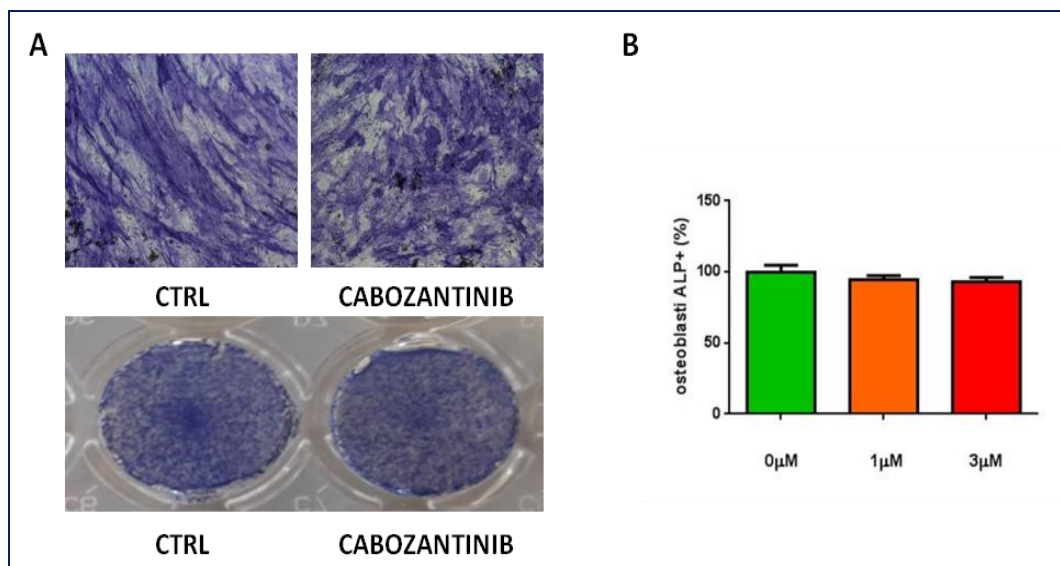


Fig 33. Effetto del cabozantinib sul differenziamento osteoblastico. A. Immagini rappresentative della colorazione ALP. B. Percentuale di osteoblasti ALP+ trattati con cabozantinib rispetto al controllo (considerato 100%).

Successivamente è stata valutata l'attività degli osteoblasti, misurando la quantità di matrice ossea depositata mediante colorazione specifica Alizarin red. I dati ottenuti mostravano che il trattamento con cabozantinib non modificava la capacità degli osteoblasti di produrre matrice ossea (fig.34).

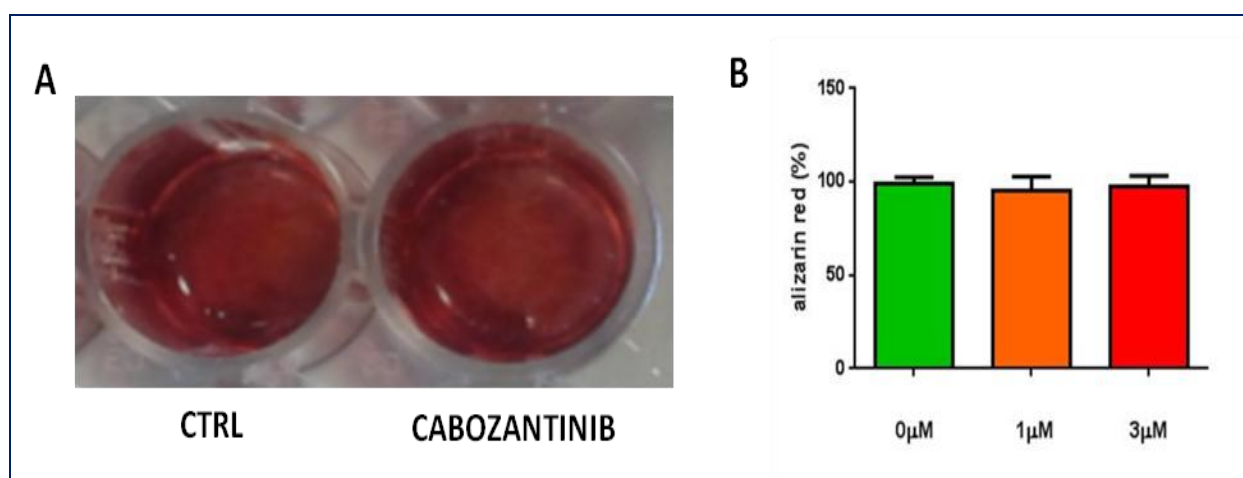


Fig 34. Effetto del cabozantinib sull'attività osteoblastica. A. Immagini rappresentative di osteoblasti dopo colorazione Alizarin Red. B. Percentuale di positività ad Alizarin Red degli osteoclasti trattati rispetto al controllo (considerato 100%).

Per analizzare un eventuale effetto del cabozantinib sulla vitalità degli osteoblasti è stato eseguito il saggio MTT. I risultati mostravano che il cabozantinib non aveva un'azione citotossica sulle cellule, non impattando in maniera significativa sulla vitalità degli osteoblasti a nessuna delle concentrazioni analizzate (fig.35).

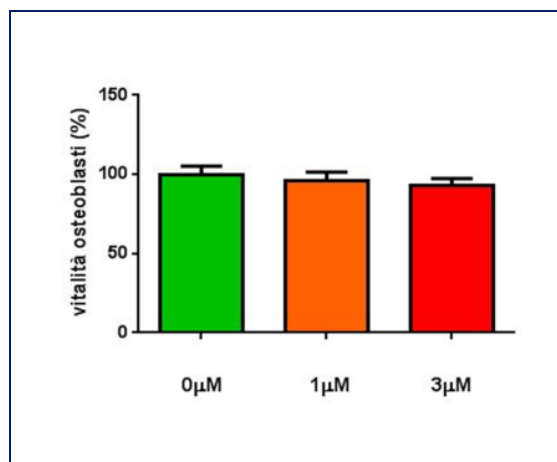


Fig 35. Effetto del cabozantinib sulla vitalità osteoblastica (saggio MTT).

Infine abbiamo analizzato se il trattamento con cabozantinib modulava l'espressione di alcuni geni "marker" osteoblastici come ALP, osteocalcina (OCN), RUNX2 negli osteoblasti. I risultati mostravano un' up-regolazione di ALP e RUNX2, ed una down-modulazione di OCN che però non raggiungevano la significatività statistica. Per quanto concerne l'espressione genica, un dato molto interessante osservato, dopo trattamento con cabozantinib, è l'aumento dell'espressione di OPG ed una diminuzione concomitante dei livelli di RANKL, sottolineando un ruolo chiave del cabozantinib nella regolazione del " balance" RANKL/OPG (fig.36).

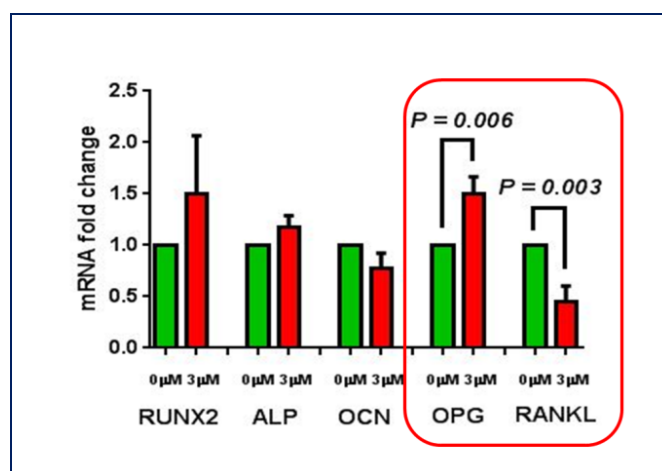


Fig 36. Effetto del cabozantinib sull'espressione genica degli osteoblasti. Livelli di mRNA normalizzati per GUSβ (REAL TIME PCR).

8.1.4 EFFETTO SULLE CO-COLTURE OSTEOLASTI-OSTEOCLASTI UMANI

Sulla base di quest'ultimi risultati, per valutare il potenziale effetto del cabozantinib sull'interazione tra le cellule ossee, sono stati allestiti sistemi di co-coltura di osteoclasti/osteoblasti in cui il mezzo condizionato collezionato da osteoblasti maturi, trattati e non con cabozantinib, è stato aggiunto agli osteoclasti durante tutto il protocollo di differenziamento. In particolare il mezzo condizionato è stato prelevato dagli osteoblasti primari dopo 21 gg di coltura e successivo wash out di 48 h in assenza di siero. Il surnatante contenente citochine e fattori secreti dagli osteoblasti nelle 48 h di wash out è stato quantificato ed una quantità pari a 20 µg è stata aggiunta ogni 3 gg al mezzo di coltura degli osteoclasti. Al termine del processo di differenziazione sono stati eseguiti i saggi funzionali TRAP e riassorbimento osseo.

I risultati mostravano che il cabozantinib inibiva anche indirettamente il differenziamento e l'attività osteoclastica (fig.37) in maniera significativa stimolando gli osteoblasti a secernere fattori inibenti la funzionalità osteoclastica.

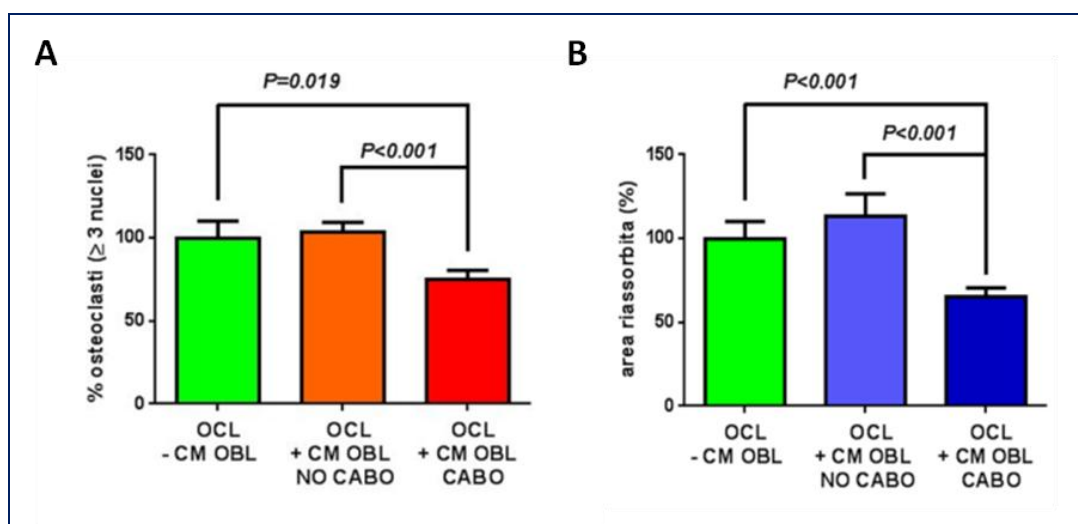


Fig 37. Effetto del mezzo condizionato degli osteoblast (trattati e non con cabozantinib) sul differenziamento e sull'attività osteoclastica. A. Percentuale di osteoclasti TRAP+ trattati rispetto al controllo (considerato 100%). B. Percentuale dell'area riassorbita da parte degli osteoclasti trattati rispetto al controllo (considerato 100%).

9. DISCUSSIONE

L'effetto del cabozantinib *in vitro* sui tre "attori" principali che dominano "la scena" nel microambiente osseo, ossia la cellula tumorale, l'osteoclasta e l'osteoblasta, non solo confermano tutte le evidenze riportate in letteratura circa il ruolo chiave del pathway di c-MET e VEGFR-2 nella progressione tumorale, ma evidenziano, anche, la sua importanza nella regolazione dell'omeostasi ossea e del rimodellamento osseo ed un'azione diretta del cabozantinib su cellule osteoclastiche ed osteoblastiche umane.

Per quanto riguarda l'effetto del cabozantinib sulle cellule tumorali abbiamo utilizzato una linea di carcinoma prostatico, le PC-3 che non esprimono il recettore per gli androgeni e che abbiamo visto esprimere alti livelli di c-MET e VEGFR-2. Alcuni dati riportati in letteratura evidenziano un'associazione tra recettore per gli androgeni e c-MET che viene inibito dal segnale androgenico e questo spiegherebbe i bassi livelli di espressione di c.MET rilevati, invece, nelle cellule responsive agli androgeni LNCaP³¹.

I risultati ottenuti trattando le cellule tumorali PC-3 mostrano che il cabozantinib agisce causando solo un blocco significativo della proliferazione cellulare ma non inducendo il processo apoptotico. Questi dati sottolineano come le PC-3, un fenotipo cellulare aggressivo e indipendente dagli androgeni, in realtà risulta essere molto sensibile al cabozantinib suggerendo l'efficacia di questo agente tirosin-chinasico in tumori resistenti alla castrazione in fase avanzata.

Per quanto riguarda l'effetto del cabozantinib sulle cellule ossee, è già noto che i target molecolari del cabozantinib, c-MET e VEGFR-2, sono espressi sia dagli osteoclasti che dagli osteoblasti. Recentemente è stato dimostrato un'attività anabolica del cabozantinib in modelli murini di tumore alla prostata metastatico ed *in vitro* su linee cellulari di osteoclasti ed osteoblasti murini¹¹⁵. Tuttavia non sono presenti in letteratura dati circa l'effetto diretto del cabozantinib sul differenziamento di colture cellulari primarie di osteoclasti ed osteoblasti umani e alcun dato riguardante la modulazione dell'espressione genica in seguito a trattamento con questo inibitore tirosin-chinasico. I nostri dati, *in vitro*, mostrano che l'effetto del cabozantinib sugli osteoclasti non sembra ridurre la vitalità osteoclastica, ma, piuttosto, ne inibisce il differenziamento e l'attività osteoclastica come mostrato nei saggi funzionali TRAP e di riassorbimento osseo. Inoltre l'analisi dell'espressione genica dei "geni markers" osteoclastici post trattamento ha evidenziato una significativa down-modulazione dei geni TRAP e Catepsina-K.

D'altro canto il cabozantinib non sembra avere impatto significativo sul differenziamento delle cellule mesenchimali in senso osteoblastico e sul processo di mineralizzazione ossea.

Un dato molto interessante è sicuramente l'effetto del cabozantinib sulla modulazione dell'espressione genica degli osteoblasti per quanto concerne la riduzione del "balance" RANKL/OPG. I risultati mostrano, infatti, che il trattamento farmacologico incrementa significativamente l'espressione di OPG e ne riduce quella di RANKL facendo ipotizzare un

meccanismo di inibizione dell'attività osteoclastica indiretto mediato dagli osteoblasti. Per verificare questa ipotesi sono stati messi a punto sistemi di co-cultura di osteoclasti/osteoblasti in cui il mezzo condizionato proveniente da osteoblasti maturi, trattati e non, con cabozantinib è stato aggiunto agli osteoclasti in coltura durante tutto il protocollo di differenziamento ed, al termine, eseguiti i saggi funzionali osteoclastici. I risultati mostrano che gli osteoclasti cresciuti con il mezzo condizionato collezionato da osteoblasti trattati con cabozantinib, dopo wash out di 48 h, risultano meno differenziati e con ridotta capacità di riassorbire matrice ossea. Questi dati confermano l'ipotesi che il cabozantinib interviene nella regolazione del "cross-talk" tra osteoblasti/osteoclasti stimolando la produzione di OPG e riducendo i livelli secreti di RANKL da parte degli osteoblasti che risulta in una riduzione dell'attività osteoclastica (fig.38).

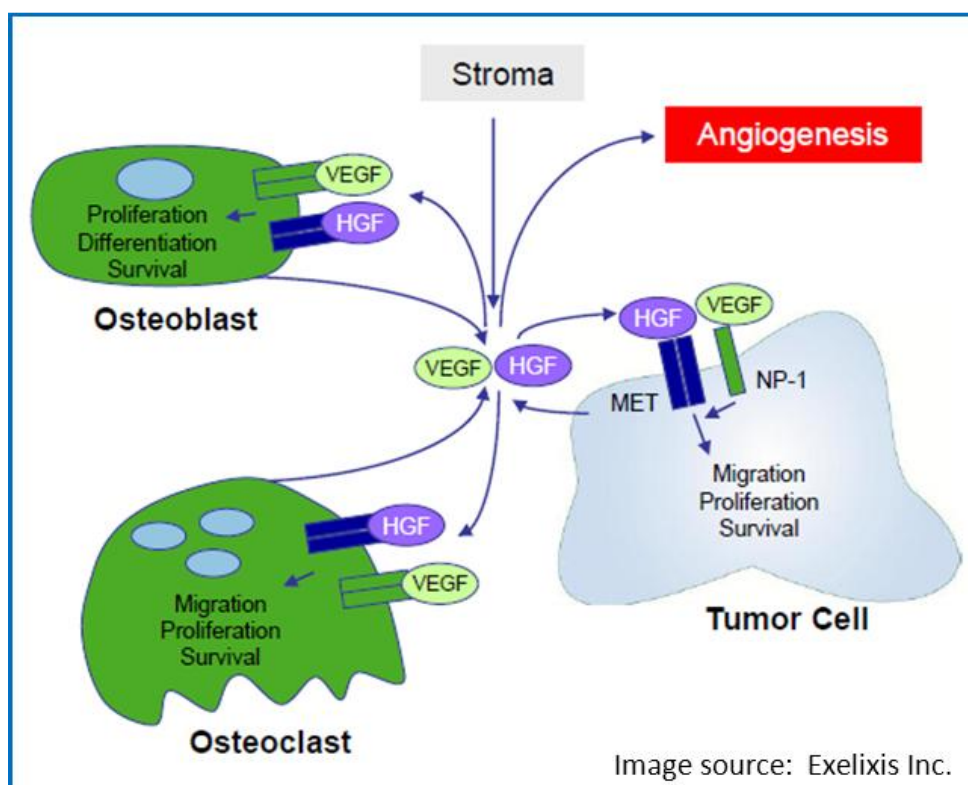


Fig 37. Cabozantinib agisce regolando il cross-talk tra cellula tumorale, osteoclasta ed osteoblasta

10. CONCLUSIONI

Molti studi in letteratura hanno valutato l'impatto clinico di questi farmaci di "nuova generazione" incentrandosi principalmente sulla loro attività anti-tumorale, ma nessun lavoro, ad oggi, ha valutato il loro effetto diretto sul microambiente osseo che, come è ampiamente noto, rappresenta il "soil" dove il tumore cresce e si sviluppa.

I risultati del nostro studio in vitro evidenziano il ruolo cruciale di queste nuove molecole, in primis l'abiraterone non solo nel "targeting" e nell'inibizione della proliferazione tumorale, ma nell'agire direttamente sul rimodellamento osseo regolando il differenziamento, l'attività e la funzionalità di osteoclasti ed osteoblasti.

I dati più incoraggianti del nostro lavoro riguardano sicuramente l'abiraterone capace di inibire il riassorbimento osseo ed, allo stesso tempo, di promuovere la deposizione di nuova matrice ossea da parte degli osteoblasti in assenza di steroidi, condizione che mima molto bene quella di deprivazione ormonale a cui è sottoposto il paziente affetto da carcinoma prostatico. Questi risultati consolidano, ed in un certo senso giustificano, i dati molto promettenti pubblicati in seguito ai recenti trial clinici sull'abiraterone che evidenziavano non solo un miglioramento in termini di sopravvivenza globale, ma anche nella qualità di vita "scheletrica" intesa come riduzione dell'incidenza e ritardo della comparsa delle complicanze scheletriche correlate alle metastasi ossee.

L'enzalutamide è un altro farmaco di nuova generazione, utilizzato anch'esso nel carcinoma prostatico resistente alla castrazione, che ha ottenuto risultati molto incoraggianti in diverse sperimentazioni cliniche sia in termini di miglioramento di OS, PFS che di riduzione degli eventi scheletrici associati alle metastasi ossee. I nostri dati mostrano che l'enzalutamide non sembra avere un effetto diretto sul differenziamento osteoclastico ed osteoblastico; tuttavia sembra avere un impatto sulla modulazione dell'espressione di alcuni geni degli osteoblasti, in particolare incrementando significativamente i livelli di RANKL. Questo dato, se confermato, potrebbe fornire un forte razionale per l'utilizzo dell'enzalutamide in combinazione con il denosumab, che ha come bersaglio molecolare proprio il RANKL e che oggi rappresenta il gold standard terapeutico nel trattamento delle metastasi ossee.

Infine i dati sul cabozantinib confermano in cellule osteoclastiche ed osteoblastiche umane l'azione diretta di questo farmaco sull'osso già riscontrata in modelli preclinici murini di tumore alla prostata. I nostri dati in vitro, supportati da quelli preclinici e clinici che hanno dimostrato un effetto di cabozantinib nell'indurre un elevato tasso di risposte obiettive a livello delle metastasi ossee di pazienti affetti da neoplasia prostatica in fase di resistenza alla castrazione, suggeriscono la potenziale attività del farmaco non solo nell'inibire la proliferazione tumorale, ma anche nel modulare in senso favorevole la risposta delle cellule del microambiente osseo alla colonizzazione tumorale.

11. BIBLIOGRAFIA

1. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2012;62(1):10-29.
2. Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol.* 2007;18(3):581-92.
3. Documento AIOM-AIRTUM. I numeri del cancro in Italia. 2012. Intermedia Editore, Capitolo 6:70-74.
4. Shaneyfelt T, Husein R, Bublely G, Mantzoros CS. Hormonal predictors of prostate cancer: a meta-analysis. *J Clin Oncol.* 2000;18(4):847-53.
5. Montie JE, Pienta KJ. Review of the role of androgenic hormones in the epidemiology of benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Urology.* 1994;43(6):892-9.
6. Steinberg GD, Carter BS, Beaty TH, Childs B, Walsh PC. Family history and the risk of prostate cancer. *Prostate.* 1990;17(4):337-47.
7. Paris PL, Witte JS, Kupelian PA, Levin H, Klein EA, Catalona WJ, Casey G. Identification and fine mapping of a region showing a high frequency of allelic imbalance on chromosome 16q23.2 that corresponds to a prostate cancer susceptibility locus. *Cancer Res.* 2000 Jul 1;60(13):3645-9.
8. Wu YQ, Chen H, Rubin MA, Wojno KJ, Cooney KA. Loss of heterozygosity of the putative prostate cancer susceptibility gene HPC2/ELAC2 is uncommon in sporadic and familial prostate cancer. *Cancer Res.* 2001;61(24):8651-3.
9. Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, Dhanasekaran SM, Mehra R, Sun XW, Varambally S, Cao X, Tchinda J, Kuefer R, Lee C, Montie JE, Shah RB, Pienta KJ, Rubin MA, Chinnaiyan AM. Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science.* 2005;310(5748):644-8.
10. Gray IC, Stewart LM, Phillips SM, Hamilton JA, Gray NE, Watson GJ, Spurr NK, Snary D. Mutation and expression analysis of the putative prostate tumour-suppressor gene PTEN. *Br J Cancer.* 1998;78(10):1296-300.
11. Chan JM, Gann PH, Giovannucci EL. Role of diet in prostate cancer development and progression. *J Clin Oncol.* 2005;23(32):8152-60.

12. Hammond GL, Avvakumov GV, Muller YA. Structure/function analyses of human sex hormone-binding globulin: effects of zinc on steroid-binding specificity. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2003 Jun;85(2-5):195-200. Review.
13. Amanatullah DF, Reutens AT, Zafonte BT, Fu M, Mani S, Pestell RG. Cell-cycle dysregulation and the molecular mechanisms of prostate cancer. *Front Biosci.* 2000;5:D372-90. Review.
14. Silver RI, Wiley EL, Davis DL, Thigpen AE, Russell DW, McConnell JD. Expression and regulation of steroid 5 alpha-reductase 2 in prostate disease. *J Urol.* 1994;152(2 Pt 1):433-7.
15. Shang Y, Myers M, Brown M. Formation of the androgen receptor transcription complex. *Mol Cell.* 2002;9(3):601-10. Erratum in: *Mol Cell.* 2003;11(6):1697.
16. DePrimo SE, Diehn M, Nelson JB, Reiter RE, Matese J, Fero M, Tibshirani R, Brown PO, Brooks JD. Transcriptional programs activated by exposure of human prostate cancer cells to androgen. *Genome Biol.* 2002;3(7):RESEARCH0032.
17. Nelson PS, Clegg N, Arnold H, Ferguson C, Bonham M, White J, Hood L, Lin B. The program of androgen-responsive genes in neoplastic prostate epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(18):11890-5.
18. Feldman BJ, Feldman D. The development of androgen-independent prostate cancer. *Nat Rev Cancer.* 2001;1(1):34-45. Review.
19. Pienta KJ, Bradley D. Mechanisms underlying the development of androgen-independent prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2006;12(6):1665-71. Review.
20. Liu LL, Xie N, Sun S, Plymate S, Mostaghel E, Dong X. Mechanisms of the androgen receptor splicing in prostate cancer cells. *Oncogene.* 2014;33(24):3140-50.
21. Huggins C, Hodges CV. Studies on prostatic cancer. I. The effect of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. 1941. *J Urol.* 2002;167(2 Pt 2):948-51;discussion 952.
22. Scher HI, Halabi S, Tannock I, Morris M, Sternberg CN, Carducci MA, Eisenberger MA, Higano C, Bubley GJ, Dreicer R, Petrylak D, Kantoff P, Basch E, Kelly WK, Figg WD, Small EJ, Beer TM, Wilding G, Martin A, Hussain M; Prostate Cancer Clinical Trials Working Group. Design and end points of clinical trials for patients with progressive prostate cancer

- and castrate levels of testosterone: recommendations of the Prostate Cancer Clinical Trials Working Group. *J Clin Oncol.* 2008;26(7):1148-59.
23. Tannock IF, Osoba D, Stockler MR, Ernst DS, Neville AJ, Moore MJ, Armitage GR, Wilson JJ, Venner PM, Coppin CM, Murphy KC. Chemotherapy with mitoxantrone plus prednisone or prednisone alone for symptomatic hormone-resistant prostate cancer: a Canadian randomized trial with palliative end points. *J Clin Oncol.* 1996;14(6):1756-64.
24. Tannock IF, de Wit R, Berry WR, Horti J, Pluzanska A, Chi KN, Oudard S, Théodore C, James ND, Turesson I, Rosenthal MA, Eisenberger MA; TAX 327 Investigators. Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. *N Engl J Med.* 2004;351(15):1502-12.
25. Berthold DR, Pond GR, Soban F, de Wit R, Eisenberger M, Tannock IF. Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer: updated survival in the TAX 327 study. *J Clin Oncol.* 2008;26(2):242-5.
26. Bouchet BP, Galmarini CM. Cabazitaxel, a new taxane with favorable properties. *Drugs Today (Barc).* 2010;46(10):735-42.
27. de Bono JS, Oudard S, Ozguroglu M, Hansen S, Machiels JP, Kocak I, Gravis G, Bodrogi I, Mackenzie MJ, Shen L, Roessner M, Gupta S, Sartor AO; TROPIC Investigators. Prednisone plus cabazitaxel or mitoxantrone for metastatic castration-resistant prostate cancer progressing after docetaxel treatment: a randomised open-label trial. *Lancet.* 2010;376(9747):1147-54.
28. Scher HI, Sawyers CL. Biology of progressive, castration-resistant prostate cancer: directed therapies targeting the androgen-receptor signaling axis. *J Clin Oncol.* 2005;23(32):8253-61. Review.
29. Lee RJ, Smith MR. Targeting MET and vascular endothelial growth factor receptor signaling in castration-resistant prostate cancer. *Cancer J.* 2013;19(1):90-8. Review.
30. van Leenders G, van Balken B, Aalders T, Hulsbergen-van de Kaa C, Ruitter D, Schalken J. Intermediate cells in normal and malignant prostate epithelium express c-MET: implications for prostate cancer invasion. *Prostate.* 2002;51(2):98-107.
31. Verras M, Lee J, Xue H, Li TH, Wang Y, Sun Z. The androgen receptor negatively regulates the expression of c-Met: implications for a novel mechanism of prostate cancer progression. *Cancer Res.* 2007;67(3):967-75.

32. Knudsen BS, Gmyrek GA, Inra J, Scherr DS, Vaughan ED, Nanus DM, Kattan MW, Gerald WL, Vande Woude GF. High expression of the Met receptor in prostate cancer metastasis to bone. *Urology*. 2002;60(6):1113-7.
33. Pallares J, Rojo F, Iriarte J, Morote J, Armadans LI, de Torres I. Study of microvessel density and the expression of the angiogenic factors VEGF, bFGF and the receptors Flt-1 and FLK-1 in benign, premalignant and malignant prostate tissues. *Histol Histopathol*. 2006;21(8):857-65.
34. Bok RA, Halabi S, Fei DT, Rodriguez CR, Hayes DF, Vogelzang NJ, Kantoff P, Shuman MA, Small EJ. Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor urine levels as predictors of outcome in hormone-refractory prostate cancer patients: a cancer and leukemia group B study. *Cancer Res*. 2001;61(6):2533-6.
35. George DJ, Halabi S, Shepard TF, Sanford B, Vogelzang NJ, Small EJ, Kantoff PW. The prognostic significance of plasma interleukin-6 levels in patients with metastatic hormone-refractory prostate cancer: results from cancer and leukemia group B 9480. *Clin Cancer Res*. 2005 1;11(5):1815-20.
36. de Bono JS, Logothetis CJ, Molina A, Fizazi K, North S, Chu L, Chi KN, Jones RJ, Goodman OB Jr, Saad F, Staffurth JN, Mainwaring P, Harland S, Flaig TW, Hutson TE, Cheng T, Patterson H, Hainsworth JD, Ryan CJ, Sternberg CN, Ellard SL, Fléchon A, Saleh M, Scholz M, Efstathiou E, Zivi A, Bianchini D, Loriot Y, Chieffo N, Kheoh T, Haqq CM, Scher HI; COU-AA-301 Investigators. Abiraterone and increased survival in metastatic prostate cancer. *N Engl J Med*. 2011 26;364(21):1995-2005.
37. Fizazi K, Scher HI, Molina A, Logothetis CJ, Chi KN, Jones RJ, Staffurth JN, North S, Vogelzang NJ, Saad F, Mainwaring P, Harland S, Goodman OB Jr, Sternberg CN, Li JH, Kheoh T, Haqq CM, de Bono JS; COU-AA-301 Investigators. Abiraterone acetate for treatment of metastatic castration-resistant prostate cancer: final overall survival analysis of the COU-AA-301 randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 study. *Lancet Oncol*. 2012;13(10):983-92. Erratum in: *Lancet Oncol*. 2012;13(11):e464.
38. Ryan CJ, Smith MR, de Bono JS, Molina A, Logothetis CJ, de Souza P, Fizazi K, Mainwaring P, Piulats JM, Ng S, Carles J, Mulders PF, Basch E, Small EJ, Saad F, Schrijvers D, Van Poppel H, Mukherjee SD, Suttman H, Gerritsen WR, Flaig TW, George DJ, Yu EY, Efstathiou E, Pantuck A, Winkquist E, Higano CS, Taplin ME, Park Y, Kheoh T, Griffin T, Scher HI, Rathkopf DE; COU-AA-302 Investigators. Abiraterone in metastatic prostate cancer without previous chemotherapy. *N Engl J Med*. 2013;368(2):138-48. Erratum in: *N Engl J Med*. 2013;368(6):584.
39. Scher HI, Beer TM, Higano CS, Anand A, Taplin ME, Efstathiou E, Rathkopf D, Shelkey J, Yu EY, Alumkal J, Hung D, Hirmand M, Seely L, Morris MJ, Danila DC, Humm J, Larson S,

Fleisher M, Sawyers CL; Prostate Cancer Foundation/Department of Defense Prostate Cancer Clinical Trials Consortium. Antitumour activity of MDV3100 in castration-resistant prostate cancer: a phase 1-2 study. *Lancet*. 2010 ;375(9724):1437-46.

40. Scher HI, Fizazi K, Saad F, Taplin ME, Sternberg CN, Miller K, de Wit R, Mulders P, Chi KN, Shore ND, Armstrong AJ, Flaig TW, Fléchon A, Mainwaring P, Fleming M, Hainsworth JD, Hirmand M, Selby B, Seely L, de Bono JS; AFFIRM Investigators. Increased survival with enzalutamide in prostate cancer after chemotherapy. *N Engl J Med*. 2012;367(13):1187-97.
41. Smith DC, Smith MR, Sweeney C, Elfiky AA, Logothetis C, Corn PG, Vogelzang NJ, Small EJ, Harzstark AL, Gordon MS, Vaishampayan UN, Haas NB, Spira AI, Lara PN Jr, Lin CC, Srinivas S, Sella A, Schöffski P, Scheffold C, Weitzman AL, Hussain M. Cabozantinib in patients with advanced prostate cancer: results of a phase II randomized discontinuation trial. *J Clin Oncol*. 2013;31(4):412-9.
42. Mundy GR. Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(8):584-93. Review.
43. Berruti A, Dogliotti L, Bitossi R, Fasolis G, Gorzegno G, Bellina M, Torta M, Porpiglia F, Fontana D, Angeli A. Incidence of skeletal complications in patients with bone metastatic prostate cancer and hormone refractory disease: predictive role of bone resorption and formation markers evaluated at baseline. *J Urol*. 2000;164(4):1248-53.
44. Smith MR. Osteoclast-targeted therapy for prostate cancer. *Curr Treat Options Oncol*. 2004 Oct;5(5):367-75. Review.
45. Dempster DW. Bone remodeling. 2002. In: Coe FL, Favus MJ (eds) *Disorders of bone mineral metabolism*, 2nd ed. Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore, MD, USA, 315-343.
46. Graves DT, Jiang Y, Valente AJ. The expression of monocyte chemoattractant protein-1 and other chemokines by osteoblasts. *Front Biosci*. 1999;4:D571-80. Review.
47. Li X, Qin L, Bergenstock M, Bevelock LM, Novack DV, Partridge NC. Parathyroid hormone stimulates osteoblastic expression of MCP-1 to recruit and increase the fusion of pre/osteoclasts. *J Biol Chem*. 2007 Nov 9;282(45):33098-106.
48. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle WJ. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*. 1997;89(2):309-19.

49. Wakeyama H, Akiyama T, Takahashi K, Amano H, Kadono Y, Nakamura M, Oshima Y, Itabe H, Nakayama KI, Nakayama K, Nakamura K, Tanaka S. Negative feedback loop in the Bim-caspase-3 axis regulating apoptosis and activity of osteoclasts. *J Bone Miner Res.* 2007;22(10):1631-9.
50. Zaidi M, Datta HK, Patchell A, Moonga B, MacIntyre I. 'Calcium-activated' intracellular calcium elevation: a novel mechanism of osteoclast regulation. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989;163(3):1461-5.
51. Van Bezooijen RL, Roelen BA, Visser A, Van der Wee-Pals L, De Wilt E, Karperien M, Hamersma H, Papapoulos SE, Ten Dijke P, Lowik CW. Sclerostin is an osteocyte-expressed negative regulator of bone formation, but not a classical BMP antagonist. *J Exp Med.* 2004;199(6):805-14.
52. Liotta LA, Kohn EC. The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature.* 2001;411(6835):375-9. Review.
53. Zetter BR. The cellular basis of site-specific tumor metastasis. *N Engl J Med.* 1990;322(9):605-12. Review.
54. Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev.* 1989;8(2):98-101.
55. Yoneda T, Hiraga T. Crosstalk between cancer cells and bone microenvironment in bone metastasis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;328(3):679-87. Review.
56. Cooper CR, Chay CH, Pienta KJ. The role of alpha(v)beta(3) in prostate cancer progression. *Neoplasia.* 2002;4(3):191-4. Review.
57. Lakkakorpi PT, Helfrich MH, Horton MA, Väänänen HK. Spatial organization of microfilaments and vitronectin receptor, alpha v beta 3, in osteoclasts. A study using confocal laser scanning microscopy. *J Cell Sci.* 1993;104 (Pt 3):663-70.
58. Kucia M, Reza R, Miekus K, Wanzeck J, Wojakowski W, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak J, Ratajczak MZ. Trafficking of normal stem cells and metastasis of cancer stem cells involve similar mechanisms: pivotal role of the SDF-1-CXCR4 axis. *Stem Cells.* 2005;23(7):879-94. Review.
59. Gladson CL, Welch DR. New insights into the role of CXCR4 in prostate cancer metastasis. *Cancer Biol Ther.* 2008;7(11):1849-51.

60. Jung Y, Wang J, Schneider A, Sun YX, Koh-Paige AJ, Osman NI, McCauley LK, Taichman RS. Regulation of SDF-1 (CXCL12) production by osteoblasts; a possible mechanism for stem cell homing. *Bone*. 2006;38(4):497-508.
61. Sipkins DA, Wei X, Wu JW, Runnels JM, Côté D, Means TK, Luster AD, Scadden DT, Lin CP. In vivo imaging of specialized bone marrow endothelial microdomains for tumour engraftment. *Nature*. 2005 Jun 16;435(7044):969-73.
62. Draffin JE, McFarlane S, Hill A, Johnston PG, Waugh DJ. CD44 potentiates the adherence of metastatic prostate and breast cancer cells to bone marrow endothelial cells. *Cancer Res*. 2004 Aug 15;64(16):5702-11.
63. Yin JJ, Selander K, Chirgwin JM, Dallas M, Grubbs BG, Wieser R, Massagué J, Mundy GR, Guise TA. TGF-beta signaling blockade inhibits PTHrP secretion by breast cancer cells and bone metastases development. *J Clin Invest*. 1999;103(2):197-206.
64. Guise TA, Yin JJ, Taylor SD, Kumagai Y, Dallas M, Boyce BF, Yoneda T, Mundy GR. Evidence for a causal role of parathyroid hormone-related protein in the pathogenesis of human breast cancer-mediated osteolysis. *J Clin Invest*. 1996;98(7):1544-9.
65. Jones DH, Nakashima T, Sanchez OH, Kozieradzki I, Komarova SV, Sarosi I, Morony S, Rubin E, Sarao R, Hojilla CV, Komnenovic V, Kong YY, Schreiber M, Dixon SJ, Sims SM, Khokha R, Wada T, Penninger JM. Regulation of cancer cell migration and bone metastasis by RANKL. *Nature*. 2006;440(7084):692-6.
66. Goltzman D. Mechanisms of the development of osteoblastic metastases. *Cancer*. 1997;80(8 Suppl):1581-7. Review.
67. Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys*. 2008;473(2):139-46. Review.
68. Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, Dougall WC, Tometsko ME, Roux ER, Teepe MC, DuBose RF, Cosman D, Galibert L. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature*. 1997;390(6656):175-9.
69. Nakagawa N, Kinoshita M, Yamaguchi K, Shima N, Yasuda H, Yano K, Morinaga T, Higashio K. RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;253(2):395-400.

70. Williamson E, Bilsborough JM, Viney JL. Regulation of mucosal dendritic cell function by receptor activator of NF-kappa B (RANK)/RANK ligand interactions: impact on tolerance induction. *J Immunol.* 2002;169(7):3606-12.
71. Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle WJ. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell.* 1998;93(2):165-76.
72. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Udagawa N, Takahashi N, Suda T. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(7):3597-602.
73. Huang L, Xu J, Wood DJ, Zheng MH. Gene expression of osteoprotegerin ligand, osteoprotegerin, and receptor activator of NF-kappaB in giant cell tumor of bone: possible involvement in tumor cell-induced osteoclast-like cell formation. *Am J Pathol.* 2000;156(3):761-7.
74. Huang L, Cheng YY, Chow LT, Zheng MH, Kumta SM. Receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL) is expressed in chondroblastoma: possible involvement in osteoclastic giant cell recruitment. *Mol Pathol.* 2003;56(2):116-20.
75. Granchi D, Amato I, Battistelli L, Avnet S, Capaccioli S, Papucci L, Donnini M, Pellacani A, Brandi ML, Giunti A, Baldini N. In vitro blockade of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand prevents osteoclastogenesis induced by neuroblastoma cells. *Int J Cancer.* 2004;111(6):829-38.
76. Tada T, Jimi E, Okamoto M, Ozeki S, Okabe K. Oral squamous cell carcinoma cells induce osteoclast differentiation by suppression of osteoprotegerin expression in osteoblasts. *Int J Cancer.* 2005;116(2):253-62.
77. Wittrant Y, Lamoureux F, Mori K, Riet A, Kamijo A, Heymann D, Redini F. RANKL directly induces bone morphogenetic protein-2 expression in RANK-expressing POS-1 osteosarcoma cells. *Int J Oncol.* 2006;28(1):261-9.
78. Leibbrandt A, Penninger JM. RANK/RANKL: regulators of immune responses and bone physiology. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1143:123-50. Review.

79. Ikeda T, Kasai M, Utsuyama M, Hirokawa K. Determination of three isoforms of the receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and their differential expression in bone and thymus. *Endocrinology*. 2001;142(4):1419-26.
80. Schlöndorff J, Lum L, Blobel CP. Biochemical and pharmacological criteria define two shedding activities for TRANCE/OPGL that are distinct from the tumor necrosis factor alpha convertase. *J Biol Chem*. 2001;276(18):14665-74.
81. Chesneau V, Becherer JD, Zheng Y, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Blobel CP. Catalytic properties of ADAM19. *J Biol Chem*. 2003;278(25):22331-40.
82. Tsuda E, Goto M, Mochizuki S, Yano K, Kobayashi F, Morinaga T, Higashio K. Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;234(1):137-42.
83. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle WJ. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*. 1997;89(2):309-19.
84. Chen G, Sircar K, Aprikian A, Potti A, Goltzman D, Rabbani SA. Expression of RANKL/RANK/OPG in primary and metastatic human prostate cancer as markers of disease stage and functional regulation. *Cancer*. 2006;107(2):289-98.
85. Brown JM, Zhang J, Keller ET. Opg, RANKL, and RANK in cancer metastasis: expression and regulation. *Cancer Treat Res*. 2004;118:149-72. Review.
86. Sasaki A, Ishikawa K, Haraguchi N, Inoue H, Ishio T, Shibata K, Ohta M, Kitano S, Mori M. Receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL) expression in hepatocellular carcinoma with bone metastasis. *Ann Surg Oncol*. 2007;14(3):1191-9.
87. Santini D, Perrone G, Roato I, Godio L, Pantano F, Grasso D, Russo A, Vincenzi B, Fratto ME, Sabbatini R, Della Pepa C, Porta C, Del Conte A, Schiavon G, Berruti A, Tomasino RM, Papotti M, Papapietro N, Onetti Muda A, Denaro V, Tonini G. Expression pattern of receptor activator of NFkB (RANK) in a series of primary solid tumors and related bone metastases. *J Cell Physiol*. 2011;226(3):780-4.
88. Martin TJ, Mundy GR. Bone metastasis: can osteoclasts be excluded? *Nature*. 2007;445(7130):E19; discussion E19-20.

89. Brandi ML. Denosumab: un nuovo approccio terapeutico nel trattamento dell'osteoporosi. *G.I.O.T.* 2010;36:268-277.
90. Bekker PJ, Holloway DL, Rasmussen AS, Murphy R, Martin SW, Leese PT, Holmes GB, Dunstan CR, DePaoli AM. A single-dose placebo-controlled study of AMG 162, a fully human monoclonal antibody to RANKL, in postmenopausal women. *J Bone Miner Res.* 2004;19(7):1059-66.
91. Guise TA, Yin JJ, Mohammad KS. Role of endothelin-1 in osteoblastic bone metastases. *Cancer.* 2003 Feb 1;97(3 Suppl):779-84. Review.
92. Chiao JW, Moonga BS, Yang YM, Kancherla R, Mittelman A, Wu-Wong JR, Ahmed T. Endothelin-1 from prostate cancer cells is enhanced by bone contact which blocks osteoclastic bone resorption. *Br J Cancer.* 2000;83(3):360-5.
93. Nelson JB, Chan-Tack K, Hedican SP, Magnuson SR, Opgenorth TJ, Bova GS, Simons JW. Endothelin-1 production and decreased endothelin B receptor expression in advanced prostate cancer. *Cancer Res.* 1996;56(4):663-8.
94. Yin JJ, Mohammad KS, Käkönen SM, Harris S, Wu-Wong JR, Wessale JL, Padley RJ, Garrett IR, Chirgwin JM, Guise TA. A causal role for endothelin-1 in the pathogenesis of osteoblastic bone metastases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(19):10954-9.
95. Nelson JB. Endothelin inhibition: novel therapy for prostate cancer. *J Urol.* 2003;170(6 Pt 2):S65-7; discussion S67-8. Review.
96. Nelson JB, Hedican SP, George DJ, Reddi AH, Piantadosi S, Eisenberger MA, Simons JW. Identification of endothelin-1 in the pathophysiology of metastatic adenocarcinoma of the prostate. *Nat Med.* 1995;1(9):944-9.
97. Clines GA, Mohammad KS, Bao Y, Stephens OW, Suva LJ, Shaughnessy JD Jr, Fox JW, Chirgwin JM, Guise TA. Dickkopf homolog 1 mediates endothelin-1-stimulated new bone formation. *Mol Endocrinol.* 2007;21(2):486-98.
98. Russo A, Bronte G, Rizzo S, Fanale D, Di Gaudio F, Gebbia N, Bazan V. Anti-endothelin drugs in solid tumors. *Expert Opin Emerg Drugs.* 2010;15(1):27-40.
99. Behrens J, von Kries JP, Kühl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R, Birchmeier W. Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature.* 1996;382(6592):638-42.

100. Hall CL, Kang S, MacDougald OA, Keller ET. Role of Wnts in prostate cancer bone metastases. *J Cell Biochem.* 2006;97(4):661-72. Review.
101. Hall CL, Daignault SD, Shah RB, Pienta KJ, Keller ET. Dickkopf-1 expression increases early in prostate cancer development and decreases during progression from primary tumor to metastasis. *Prostate.* 2008;68(13):1396-404.
102. Hall CL, Bafico A, Dai J, Aaronson SA, Keller ET. Prostate cancer cells promote osteoblastic bone metastases through Wnts. *Cancer Res.* 2005;65(17):7554-60.
103. Ide H, Yoshida T, Matsumoto N, Aoki K, Osada Y, Sugimura T, Terada M. Growth regulation of human prostate cancer cells by bone morphogenetic protein-2. *Cancer Res.* 1997;57(22):5022-7.
104. Lai TH, Fong YC, Fu WM, Yang RS, Tang CH. Osteoblasts-derived BMP-2 enhances the motility of prostate cancer cells via activation of integrins. *Prostate.* 2008;68(12):1341-53.
105. Rentsch CA, Cecchini MG, Thalmann GN. Loss of inhibition over master pathways of bone mass regulation results in osteosclerotic bone metastases in prostate cancer. *Swiss Med Wkly.* 2009;139(15-16):220-5.
106. Abe E, Yamamoto M, Taguchi Y, Lecka-Czernik B, O'Brien CA, Economides AN, Stahl N, Jilka RL, Manolagas SC. Essential requirement of BMPs-2/4 for both osteoblast and osteoclast formation in murine bone marrow cultures from adult mice: antagonism by noggin. *J Bone Miner Res.* 2000;15(4):663-73.
107. Gori F, Thomas T, Hicok KC, Spelsberg TC, Riggs BL. Differentiation of human marrow stromal precursor cells: bone morphogenetic protein-2 increases OSF2/CBFA1, enhances osteoblast commitment, and inhibits late adipocyte maturation. *J Bone Miner Res.* 1999;14(9):1522-35.
108. Dai J, Keller J, Zhang J, Lu Y, Yao Z, Keller ET. Bone morphogenetic protein-6 promotes osteoblastic prostate cancer bone metastases through a dual mechanism. *Cancer Res.* 2005;65(18):8274-85.
109. Virk MS, Petrigliano FA, Liu NQ, Chatziioannou AF, Stout D, Kang CO, Dougall WC, Lieberman JR. Influence of simultaneous targeting of the bone morphogenetic protein pathway and RANK/RANKL axis in osteolytic prostate cancer lesion in bone. *Bone.* 2009;44(1):160-7.

110. Santini D, Galluzzo S, Zoccoli A, Pantano F, Fratto ME, Vincenzi B, Lombardi L, Gucciardino C, Silvestris N, Riva E, Rizzo S, Russo A, Maiello E, Colucci G, Tonini G. New molecular targets in bone metastases. *Cancer Treat Rev.* 2010;36 Suppl 3:S6-S10.

111. van Bokhoven A, Varella-Garcia M, Korch C, Johannes WU, Smith EE, Miller HL, Nordeen SK, Miller GJ, Lucia MS. Molecular characterization of human prostate carcinoma cell lines. *Prostate.* 2003;57(3):205-25.

112. Bruno RD, Gover TD, Burger AM, Brodie AM, Njar VC. 17alpha Hydroxylase/17,20 lyase inhibitor VN/124-1 inhibits growth of androgen-independent prostate cancer cells via induction of the endoplasmic reticulum stress response. *Mol Cancer Ther.* 2008;7(9):2828-36.

113. Ferri KF, Kroemer G. Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat Cell Biol.* 2001;3(11):E255-63. Review.

114. Hamamura K, Tanjung N, Yokota H. Suppression of osteoclastogenesis through phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2 alpha. *J Bone Miner Metab.* 2013 Nov;31(6):618-28.

115. Dai J, Zhang H, Karatsinides A, Keller JM, Kozloff KM, Aftab DT, Schimmoller F, Keller ET. Cabozantinib inhibits prostate cancer growth and prevents tumor-induced bone lesions. *Clin Cancer Res.* 2014 Feb 1;20(3):617-30.