

Efeito Antiproliferativo do Zoledronato em Linhagens Celulares Tumorais

Antiproliferative Effect of Zoledronate on Tumor Cell Lines

Effecto Antiproliferativo del Zoledronato en Linajes Celulares Tumorales

Patricia Maria Wiziack Zago¹; Valéria Costa Fontes²; Simeone Júlio dos Santos Castelo Branco³; Rayse Rayane Lima de Farias⁴; Viviane Hass⁵; Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz⁶; Mary Ann Foglio⁷

Resumo

Introdução: Bisfosfonatos são fármacos utilizados para o tratamento de enfermidades ósseas, como a osteoporose e metástases ósseas, em razão do seu mecanismo de ação, que consiste na diminuição do processo de reabsorção do osso. Outros estudos verificaram que bisfosfonatos de alta potência, como o zoledronato, poderiam auxiliar no tratamento de outras enfermidades malignas por causa da promoção de um efeito antiproliferativo. **Objetivo:** Este estudo *in vitro* objetivou avaliar a atividade antiproliferativa de zoledronato em diferentes linhagens de células tumorais. **Método:** Nove linhagens humanas (U251; MCF7; NCI/ADR-RES; 786-0; NCI-H460; PC-3; OVCAR-3; HT29; K-562 e HaCaT) foram submetidas ao tratamento com as concentrações de 0,12; 1,2; 12 e 120 µM de zoledronato e tiveram sua atividade proliferativa avaliada após 48 horas, utilizando-se o corante sulforrodamina B. **Resultados:** Verificou-se que as concentrações de 12 µM e 120 µM de zoledronato foram eficazes para a redução em 50% e 100%, respectivamente, da proliferação das células 786-0 (carcinoma renal). A maior concentração de zoledronato (120 µM) promoveu um efeito citostático (redução da proliferação celular em 50%) para as células HaCaT (queratinócito humano não tumoral), HT-29 (carcinoma de cólon), NCI-ADR/RES (adenocarcinoma de ovário com fenótipo de multirresistência) e NCI-H460 (carcinoma pulmonar). **Conclusão:** Esses resultados sugerem um promissor efeito auxiliar do zoledronato para o tratamento de alguns tipos de tumores; estudos complementares *in vitro* e *in vivo* são necessários para a validação dessa hipótese.

Palavras-chave: Bisfosfonatos; Células Neoplásicas Circulantes; Proliferação Celular.

Abstract

Introduction: Bisphosphonates are used in the treatment of bone diseases such as osteoporosis and bone metastases, because of their ability to inhibit bone resorption. There is evidence that high-potency bisphosphonates, such as zoledronate, are useful in the treatment of other malignancies because they have an antiproliferative effect. **Objective:** To evaluate the antiproliferative activity of zoledronate in different tumor cell lines. **Method:** This was an *in vitro* study in which nine human cell lines (U251, MCF7, NCI/ADR-RES, 786-0, NCI-H460, PC-3, OVCAR-3, HT29, K-562, and HaCaT) were treated with 0.12, 1.2, 12, and 120 µM of zoledronate, their proliferative activity being evaluated 48 h later with sulforhodamine B assay. **Results:** At the 12 µM and 120 µM doses, zoledronate effectively reduced the proliferation of 786-0 (renal carcinoma) cells by 50% and 100%, respectively. At the highest concentration (120 µM), zoledronate had a cytostatic effect (50% reduction in cell proliferation) on HaCaT (non-tumor human keratinocyte), HT-29 (colon carcinoma), NCI-ADR/RES (multidrug-resistant ovarian adenocarcinoma), and NCI-H460 (lung carcinoma) cells. **Conclusion:** These results suggest a promising auxiliary effect of zoledronate for the treatment of some tumors. Further *in vitro* and *in vivo* studies are needed in order to test that hypothesis.

Key words: Bisphosphonates; Neoplastic Cells, circulating; Cell Proliferation.

Resumen

Introducción: Los bisfosfonatos son fármacos utilizados para el tratamiento de enfermedades óseas, como la osteoporosis y metástasis óseas debido a su mecanismo de acción, que consiste en la disminución del proceso de reabsorción del hueso. Otros estudios observaron que los bisfosfonatos de alta potencia, como el zoledronato, podrían ayudar en el tratamiento de otras enfermedades malignas debido a la promoción de un efecto antiproliferativo. **Objetivo:** Este estudio *in vitro* objetivó evaluar la actividad antiproliferativa de zoledronato en diferentes linajes de células tumorales. **Método:** Los nueve humano linajes (U251, MCF7, NCI / ADR-RES, 786-0, NCI-H460, PC-3, OVCAR-3, HT29, K-562 and HaCaT) se sometieron al tratamiento con las concentraciones de 0,12; 1,2; 12 y 120 µM de zoledronato y tuvieron su actividad proliferativa evaluada después de 48 horas utilizando el colorante sulforrodamina B. **Resultados:** Se comprobó que las concentraciones de 12 µM y 120 µM de zoledronato fueron efectivas para reducir en un 50% y un 100%, respectivamente, de la proliferación de las células 786-0 (carcinoma renal). La mayor concentración de zoledronato (120 µM) promovió un efecto citostático (reducción de la proliferación celular en un 50%) para las células HaCaT (queratinocito humano no tumoral), HT-29 (carcinoma de colon), NCI-ADR/RES (adenocarcinoma de ovário con fenotipo de multirresistencia) y NCI-H460 (carcinoma pulmonar). **Conclusión:** Estos resultados sugieren un prometedor efecto auxiliar del zoledronato para el tratamiento de algunos tumores; se requieren más estudios *in vitro* e *in vivo* para validar esta hipótesis.

Palabras clave: Bisfosfonatos; Células Neoplásicas Circulantes; Proliferación Celular.

¹ Cirurgiã-Dentista. Doutora em Odontologia. Programa de Graduação em Odontologia da Universidade Ceuma. São Luís (MA), Brasil. E-mail: patizago@hotmail.com.

² Biomédica. Universidade Ceuma. São Luís (MA), Brasil. E-mail: valeria.cfontes@gmail.com.

³ Acadêmico de biomedicina. Universidade Ceuma. São Luís (MA), Brasil. E-mail: simeonecastelo@gmail.com.

⁴ Acadêmica de Odontologia. Departamento de Odontologia. Universidade Ceuma. São Luís (MA), Brasil. E-mail: rayse_ray03@hotmail.com.

⁵ Cirurgiã-Dentista. Doutora em Dentística Restauradora. Departamento de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Norte do Paraná (Unopar). Departamento de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Ceuma. São Luís (MA), Brasil. E-mail: vivike_hass@hotmail.com.

⁶ Farmacêutica. Doutora em Ciências. Divisão de Farmacologia e Toxicologia do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas. Universidade Estadual de Campinas (Unicamp). Campinas (SP), Brasil. E-mail: aa_ruiz@hotmail.com.

⁷ Química. Doutora em Química. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Unicamp. Campinas (SP), Brasil. E-mail: foglioma@gmail.com.

Endereço para correspondência: Patrícia Maria Wiziack Zago. Universidade Ceuma. Campus Renascença. Rua Josué Montello, 1 - Renascença. São Luís (MA), Brasil. CEP 65075-120.



INTRODUÇÃO

O câncer é responsável por mais de 12% dos óbitos no mundo. Com a esperança de vida aumentada, estima-se que a incidência da doença alcançará mais de 15 milhões de novos casos em 2020, sendo um problema de saúde pública no mundo. No Brasil, com o recente envelhecimento da população, verifica-se um aumento na prevalência de cânceres associados ao nível socioeconômico do indivíduo, como os cânceres de mama, próstata, cólon e reto (melhores níveis socioeconômicos), e colo do útero, pênis, estômago e cavidade oral (níveis socioeconômicos mais baixos)¹. Com o crescente aumento na incidência da doença, muito tem sido pesquisado na tentativa de se encontrar novas alternativas para o tratamento de tumores, sejam terapêuticas completamente inéditas ou auxiliares para tratamentos já estabelecidos. Entre os fármacos promissores, com potencial de auxiliar nas terapias antitumorais, tem-se a classe dos bisfosfonatos².

Bisfosfonatos são fármacos utilizados para o tratamento de enfermidades ósseas como a osteoporose, doença de Paget, hipercalemia maligna e neoplasias malignas ósseas, como o mieloma múltiplo. Farmacologicamente, são análogos sintéticos de reguladores naturais da reabsorção óssea os pirofosfatos orgânicos e, assim, apresentam a capacidade de se depositarem na matriz óssea. No tecido, atuam inibindo a atividade de osteoclastos, ou até mesmo induzindo morte celular programada dessas células, provocando a diminuição dos eventos de reabsorção óssea³.

Existem três gerações de bisfosfonatos. A primeira é representada pelos compostos não nitrogenados, como etidronato e o clodronato, enquanto a segunda e terceira gerações, pelos compostos nitrogenados⁴. Alendronato, pamidronato e ibandronato, de segunda geração, são de dez a mil vezes mais potentes (mais absorvidos pelos ossos) do que os de primeira. Risedronato e zoledronato representam os medicamentos de terceira geração, sendo que este último apresenta potência 100 a 850 vezes superior à do pamidronato⁵.

O mecanismo de ação dos bisfosfonatos baseia-se na inibição da atividade de osteoclastos, induzindo as células à apoptose⁶. Em seguida, pesquisas identificaram que os bisfosfonatos possuíam efeitos também em outras células além dos osteoclastos, incluindo as tumorais e assim poderiam ser importantes auxiliares no tratamento de tumores. Em células tumorais, foram identificadas ações citostáticas, inibidoras da adesão e invasão celular⁷, indutora de apoptose e promotora de antiangiogênese tumoral⁸.

O principal fármaco estudado na identificação dessas diferentes atividades antitumorais foi o zoledronato. Um número cada vez maior de pesquisas pré-clínicas

tem demonstrado que o zoledronato apresenta efeitos antitumorais em uma variedade de doenças malignas como os cânceres de mama, próstata, pancreático e melanoma, osteossarcoma e leucemia mieloide crônica².

Verifica-se que as indicações para o uso de zoledronato têm se tornado cada vez mais frequentes, não somente para o tratamento de doenças ósseas, mas também como auxiliar na terapêutica de diferentes tipos de tumores⁹.

A partir do exposto, este estudo preliminar *in vitro* objetivou verificar outras possíveis atividades antiproliferativas de zoledronato contra diferentes linhagens de células tumorais, possuindo como objetivo específico identificar concentrações de zoledronato efetivas para um efeito antiproliferativo em diferentes linhagens celulares de cérebro, ovário, mama, rim, pulmão, próstata, cólon e medula óssea.

MÉTODO

A atividade antiproliferativa do zoledronato foi avaliada por meio de protocolo baseado no modelo NCI60¹⁰, utilizando-se o corante sulforrodamina B para avaliação final das células. Nove linhagens de células tumorais, doadas pelo *Frederick Cancer Research & Development Center, National Cancer Institute* (Frederick, MA, USA), e uma linhagem não tumoral (HaCaT, queratinócitos humanos imortalizados; número CLS[®]: 300493) foram mantidas em meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1.640 (Gibco[®]) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB, teor de hemoglobina <10 mg%, Gibco[®]) e 1% de mistura de penicilina:estreptomicina (1.000 U/mL:1.000 µg/mL, Vitrocell[®]) e incubadas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂ (Tabela 1).

As células de cada linhagem foram inoculadas em duas placas de 96 compartimentos (100µL/compartimento, densidades entre 3x10⁴ e 6,5x10⁴ cel/mL), de acordo com o tempo designado para a avaliação do crescimento celular (T₀ e T₁). Assim, após 24 horas da inoculação celular, adicionaram-se 100 µL/compartimento de zoledronato (Zometa[®]-Novartis) nas concentrações de 0,12; 1,2; 12 e 120 µM sobre as células da placa T₁ (placa teste). Nesse momento, as células inoculadas na placa T₀ foram fixadas com ácido tricloroacético 50% (TCA, 50 µL/compartimento) para determinação da quantidade de células de cada linhagem no momento da adição da amostra. Ao final de 48 horas, as células das placas T₁ foram fixadas com TCA (50 µL/compartimento) e mantidas durante 1 hora a 4 °C. Após lavagem em água corrente e secagem à temperatura ambiente, as células fixadas foram coradas com sulforrodamina B 0,4% (p/v; 50 µL/compartimento) em ácido acético 1%, mantidas por 20 min, à temperatura ambiente, e lavadas com ácido

Tabela 1. Linhagens celulares empregadas na avaliação da atividade antiproliferativa

Linhagem	Órgão/doença	Morfologia
U251	Cérebro: glioma	Epitelial
MCF7	Mama: adenocarcinoma	Epitelial
NCI/ADR-RES	Ovário: adenocarcinoma*	Epitelial
786-0	Rim: adenocarcinoma	Epitelial
NCI-H460	Pulmão: carcinoma tipo não pequenas células	Epitelial
PC-3	Próstata: adenocarcinoma	Epitelial
OVCAR-3	Ovário: adenocarcinoma	Epitelial
HT29	Cólon: adenocarcinoma	Epitelial
K-562	Medula óssea: leucemia	Linfoblástica
HaCaT	Pele: linhagem não tumoral	Epitelial

*Linhagem com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos.

acético 1% para remoção do excesso de corante. Após secagem à temperatura ambiente, o corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com solução de tampão Trizma Base (150 µL/compartimento, pH 10, Sigma®) e a leitura espectrofotométrica da absorbância foi feita por meio do leitor de microplacas em 540 nm. Com os valores de absorbância antes (T_0) e depois (T_1 e T_A) do tempo de exposição, foi calculado o crescimento celular, em porcentagem, para cada linhagem frente a cada uma das concentrações testadas, considerando-se:

$$\text{Se } T_A > T_0 \rightarrow \%C = 100 \times [(T_A - T_0) / (T_1 - T_0)]$$

$$\text{Se } T_A \leq T_0 \rightarrow \%C = 100 \times [(T_A - T_0) / (T_0)]$$

Onde:

T_A = média da absorbância da célula tratada – absorbância do branco da amostra (placa T_1);

T_1 = absorbância da suspensão celular sem tratamento após as 48 horas de exposição (placa T_1);

T_0 = absorbância da suspensão celular sem tratamento no início das 48 horas de exposição (placa T_0).

Foi gerado um gráfico correlacionando o crescimento celular de cada linhagem em função da concentração de zoledronato, utilizando-se *software Origin 8 SR4*. Considerou-se o efeito citostático do fármaco quando a concentração utilizada reduziu a proliferação celular em 50%, enquanto o efeito citocida representou os valores

dessa porcentagem iguais ou inferiores a zero. Ainda com auxílio do *software* indicado, foi calculada a concentração necessária para inibir em 50% a proliferação celular, denominada GI_{50} (*Growth inhibition 50*)¹⁰. Calculou-se também o índice de seletividade (IS) considerando os valores de GI_{50} da ação do fármaco na linhagem não tumoral sobre os valores de GI_{50} da ação do fármaco na linhagem tumoral¹¹.

RESULTADOS

O efeito antiproliferativo do zoledronato frente às diferentes linhagens de células humanas, tumorais e não tumorais, está apresentado na Figura 1 e na Tabela 2 (valores de GI_{50} e de IS).

Observou-se uma baixa atividade de zoledronato para a inibição da proliferação de diferentes células tumorais humanas. A linhagem mais sensível ao zoledronato, no modelo experimental empregado, foi a linhagem 786-0 (carcinoma renal), com zoledronato inibindo 50% da proliferação (GI_{50}) em uma concentração calculada de 11,1 µM e IS de 10,4 (Tabela 2). Já para as linhagens tumorais humanas NCI-ADR/RES (adenocarcinoma de ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos), NCI-H460 (carcinoma pulmonar não pequenas células) e HT29 (carcinoma de cólon), e para a linhagem não tumoral de queratinócitos humanos HaCaT, o zoledronato apresentou efeito citostático com GI_{50} próximo à maior concentração avaliada. Para as demais linhagens, o zoledronato foi inativo ($GI_{50} > 120$ µM e $IS < 2$).

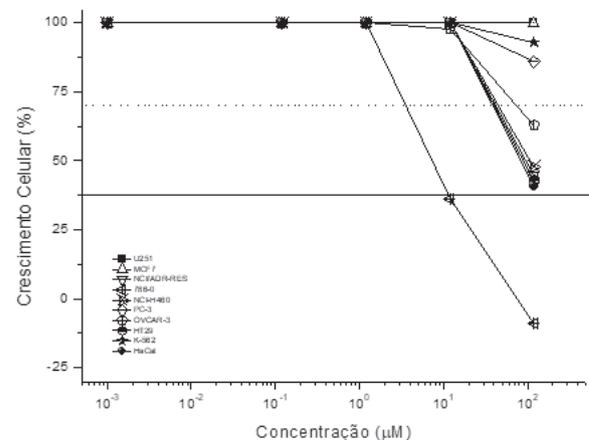


Figura 1. Efeito do zoledronato (concentração em µM) após 48 horas de exposição sobre a proliferação (%) de linhagens celulares humanas. Linhagens tumorais humanas: U251 – glioma, MCF7 – mama, NCI-ADR/RES – ovário, com fenótipo de multiresistência, 786-0 – rim, NCI-H460 – pulmão, tipo não pequenas células, PC-3 – próstata, OVCAR-03 – ovário, HT29 – cólon, K562 – leucemia; linhagem não tumoral humana: HaCaT – queratinócito.

Tabela 2. Concentração de zoledronato (em μM) capaz de inibir em 50% o crescimento de linhagens celulares humanas (GI_{50}) após 48 horas de exposição e índice de seletividade do fármaco

Linhagens*	Zoledronato GI_{50} (μM)	Índice de seletividade (IS)**
U251	> 120	< 0,9
MCF7	> 120	< 0,9
NCI-ADR/RES	117,7	0,98
786-0	11,1	10,4
NCI-H460	119,1	0,9
PC-3	> 120	< 0,9
OVCAR-03	> 120	< 0,9
HT29	116,8	0,9
K562	> 120	< 0,9
HaCaT	115,9	

*Linhagens tumorais humanas: U251 – glioma, MCF7 – mama, NCI-ADR/RES – ovário, com fenótipo de multirresistência, 786-0 – rim, NCI-H460 – pulmão, tipo não pequenas células, PC-3 – próstata, OVCAR-03 – ovário, HT29 – cólon, K562 – leucemia; linhagem não tumoral humana: HaCaT – queratinócito.

**Índice de seletividade (IS) = razão entre GI_{50} da ação do zoledronato sobre a célula não tumoral (HaCaT) e GI_{50} da ação do zoledronato sobre a célula tumoral.

DISCUSSÃO

O câncer está entre as maiores causas de morte mundiais e com expectativas de aumentar ainda mais os casos novos até 2030¹². Alguns tipos de câncer tendem a ser curáveis; no entanto, os cânceres de pulmão, cólon, mama e próstata têm prognósticos bastante divergentes, principalmente aqueles com diagnóstico tardio¹³. Assim, pesquisas vêm sendo direcionadas na tentativa de se encontrarem novos agentes terapêuticos auxiliares para o tratamento de diferentes tipos de tumores e, entre esses, um fármaco bastante estudado tem sido o zoledronato, um bisfosfonato nitrogenado de terceira geração e de grande potência².

Clinicamente, o zoledronato tem apresentado efetividade para o tratamento de doenças ósseas líticas e blásticas, com ações antiproliferativas em células ósseas¹⁴ e reduzindo sintomas ósseos decorrentes de metástases nesse tecido provenientes de tumores primários de próstata, bexiga, mama, pulmão e mieloma múltiplo¹⁵. A ação inibitória aos osteoclastos e a ligação à hidroxapatita óssea são características de zoledronato estabelecidas na literatura. Além disso, estudos clínicos e laboratoriais identificaram a eficácia do zoledronato não somente contra tumores ósseos, mas também contra os tumores de mama, próstata e pulmão¹⁶⁻¹⁸.

No presente trabalho, diferentes linhagens celulares representativas de cânceres bastante prevalentes na população brasileira, como tumores de próstata, mama, pulmão e

cólon¹², foram submetidas ao tratamento com zoledronato em concentrações que variaram de 0,12 a 120 μM .

Cânceres de mama e próstata têm alta prevalência na população brasileira¹² e, apesar de pesquisas demonstrarem um efeito antiproliferativo de zoledronato em células tumorais de mama¹⁶, esses efeitos foram relatados com esquema terapêutico de 168 horas de exposição a concentrações de até 50 μM de zoledronato. Na presente pesquisa, empregando-se tempo de exposição menor (48 horas) e concentrações mais altas (até 120 μM) de zoledronato, não foi observado qualquer efeito antiproliferativo sobre a linhagem de mama estudada (MCF7), sugerindo que o efeito antiproliferativo de zoledronato sobre a mama possa estar mais relacionado ao tempo de exposição do que ao aumento da concentração. Similarmente, Asbagh et al.¹⁸ verificaram um efeito dose e tempo-dependente para atividade de zoledronato sobre linhagens de câncer de próstata PC-3 e DU-145, com efeito citotóxico máximo após 72 horas de tratamento com a concentração de 100 μM . Mais uma vez, no presente estudo, o tempo de exposição de 48 horas não foi suficiente para que o zoledronato interferisse na proliferação da linhagem PC-3 (GI_{50} > 120 μM).

Resultados promissores, no entanto, foram obtidos para as linhagens tumorais de carcinoma renal, de cólon e pulmonar tratadas com zoledronato.

A célula 786-0 (carcinoma renal) apresentou uma maior sensibilidade ao tratamento com zoledronato, com efeito citostático a partir da concentração de 12 μM e efeito citocida na concentração de 120 μM . Com relação ao IS, observou-se que o efeito citostático foi cerca de dez vezes maior sobre a linhagem tumoral (786-0) do que sobre a não tumoral (HaCaT). É importante ressaltar que esse IS fornece uma indicação sobre um possível efeito antiproliferativo sobre tecidos normais¹¹; porém, como representa uma abordagem toxicológica alvo-dirigida (atividade sobre proliferação), o IS não permite prever outros efeitos sistêmicos do zoledronato.

Resultados antiproliferativos semelhantes estão descritos na literatura a respeito do efeito de zoledronato sobre as células tumorais renais ACNH (adenocarcinoma), A-498 (carcinoma) e CAKI-2 (carcinoma de célula clara). Nessas linhagens, o zoledronato reduziu 50% da viabilidade celular nas concentrações de 12,5 μM , 25 μM e 50 μM , respectivamente, com redução de mais de 96% na viabilidade em concentrações acima de 100 μM ¹⁹.

O efeito citostático de zoledronato na maior concentração (120 μM) foi observado também para as linhagens de carcinoma de cólon (HT29), carcinoma pulmonar (NCI-H460) e adenocarcinoma ovariano com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos (NCI-ADR/RES). Estudos anteriores identificaram efeito

antiproliferativo de zoledronato em células de carcinoma de cólon, demonstrando que essa ação é dependente da dose e do tempo de exposição para a indução de morte celular^{20,21}. Também, frente a linhagens tumorais pulmonares, há relatos de que o zoledronato é capaz de induzir mecanismos de morte celular e promover parada do ciclo celular, agindo de modo concentração e tempo dependentes²². Com base na revisão da literatura, esse é o primeiro relato de efeito citostático de zoledronato em uma linhagem de tumor ovariano com fenótipo de multirresistência. Os dados obtidos neste trabalho sugerem alguma interferência de zoledronato nos mecanismos de resistência, uma vez que a linhagem de adenocarcinoma ovariano OVCAR-03, que não expressa fenótipo de resistência, não teve sua proliferação afetada por zoledronato nas condições experimentais empregadas.

Finalmente, verificou-se que a linhagem de queratinócitos humanos não tumorais HaCaT sofreu a ação citostática de altas concentrações de zoledronato (120 μM). A literatura relata uma série de trabalhos em que células epiteliais não tumorais sofreram uma diminuição significativa de sua viabilidade quando tratadas com concentrações de zoledronato que variaram de 1 a 100 μM ²³. É importante ressaltar que muitos efeitos adversos decorrentes de um determinado tratamento quimioterápico derivam da ação antiproliferativa sobre células não tumorais. Assim, são particularmente afetadas as células epiteliais da pele, folículos capilares e da medula óssea que apresentam uma proliferação celular mais rápida do que outros tipos celulares não tumorais, sofrendo rapidamente a ação do tratamento quimioterápico²⁴.

A interferência na via metabólica do mevalonato e posterior indução de apoptose celular é mecanismo de ação estabelecido para os bisfosfonatos nitrogenados como o zoledronato⁹, principalmente quando empregados em altas doses (acima de 100 μM)²⁴. Valores de 1 a 10 μM de zoledronato são encontrados no plasma sanguíneo de pacientes com enfermidades ósseas, 15 minutos após a infusão do medicamento²⁵; assim, verifica-se que possivelmente a utilização de zoledronato, com finalidade antitumoral em outras células que não células ósseas, deveria ser empregada de maneira específica para determinada linhagem tumoral e utilizando doses muito altas da medicação (100 μM). Além disso, talvez um benefício do fármaco para a finalidade antitumoral seria evidente clinicamente apenas para células sensíveis às concentrações usualmente empregadas do medicamento, como 10 μM e, assim, de acordo com a presente pesquisa, somente a linhagem tumoral renal se beneficiaria de um efeito antitumoral de zoledronato. Os estudos *in vitro* são essenciais na determinação de possíveis novos agentes terapêuticos para o tratamento de diversas enfermidades,

no entanto, devem ser confirmados por meio de estudos *in vivo* e clínicos controlados, para a determinação do efetivo efeito promissor de determinado fármaco como zoledronato.

CONCLUSÃO

Neste estudo preliminar *in vitro*, o zoledronato apresentou um promissor efeito auxiliar principalmente para o tratamento de tumores renais; no entanto, mais estudos *in vitro* e *in vivo* são necessários para a validação dos dados obtidos.

CONTRIBUIÇÕES

Patricia Maria Wiziack Zago foi responsável pela elaboração da pesquisa, atuou na concepção, desenho, análise e interpretação dos dados da pesquisa; na redação e revisão crítica com contribuição intelectual e na aprovação final da versão para publicação. Valéria Costa Fontes e Simeone Júlio dos Santos Castelo Branco atuaram na redação e revisão crítica com contribuição intelectual. Rayse Rayane Lima de Farias atuou na redação e revisão crítica com contribuição intelectual, e na aprovação final da versão para publicação. Viviane Hass e Mary Ann Foglio atuaram na revisão e aprovação final da versão para publicação. Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz atuou na concepção, desenho, análise e interpretação dos dados da pesquisa; na redação e revisão crítica com contribuição intelectual e na aprovação final da versão para publicação.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp), pelo apoio financeiro durante a execução do projeto sob o número de processo 2010/07781-0. A autora Mary Ann Foglio também agradece ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de produtividade em desenvolvimento tecnológico.

DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSES

Nada a Declarar.

REFERÊNCIAS

1. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. A situação do câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2006.
2. Costa L, Harper P, Coleman RE, Lipton A. Anticancer evidence for zoledronic acid across the cancer continuum. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2011;77 (Supl.):S31-7.

3. Castro LF, Ferreira AG, Ferreira EI. Bifosfonatos como transportadores osteotrópicos no planejamento de fármacos dirigidos. *Quim. Nova.* 2004;27(3):456-460.
4. Reska AA. Mecanismos de acción e los bifosfonatos. In: Moral JAR, Macías JG, organizadores. *Manual práctico de osteoporosis y enfermedades del metabolismo mineral.* Madrid: Jarpyo; 2004. p.175-81.
5. Tenenbaum HC, Shelemay A, Girard B, Zohar R, Fritz PC. Bisphosphonates and periodontics: potential applications for regulation of bone mass in the periodontium and other therapeutic/diagnosis uses. *J Periodontol.* 2002;73(7):813-22.
6. Madrid C, Sanz M. What impact do systemically administrated bisphosphonates have on oral implant therapy? A systematic review. *Clin Oral Impl Res.* 2009; 20(4 Supl.): 87-95.
7. Daubine F, Le Gall C, Gasser J, Green J, Clézardin P. Antitumor effects of clinical dosing regimens of bisphosphonates in experimental breast cancer bone metastasis. *J Natl cancer Inst.* 2007;99(4):322-30
8. Green J, Lipton A. Anticancer properties of zoledronic acid. *Cancer Invest.* 2010;28(9):944-57.
9. Vasconcellos DV, Duarte MEL, Maia RC. Anti-Tumor Effect of Bisphosphonates: a New Therapeutic Perspective. *Revi Bras Cancerol.* 2004;50(1):45-54.
10. Monks A, Scudiero D, Skehan P, Shoemaker R, Paull K, Vistica D, et al. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J Natl Cancer Inst.* 1991;83(11):757-66.
11. Badisa RB, Darling-Reed SF, Joseph P, Cooperwood JS, Latinwo LM, Goodman CB. Selective cytotoxic activities of two novel synthetic drugs on human breast carcinoma MCF-7 cells. *Anticancer Res.* 2009; 29(8):2993-6.
12. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Incidência de câncer no Brasil: estimativa 2018. Síntese de resultados e comentários. [Acesso em 30 de abril de 2018]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/casos-taxas-brasil.asp>
13. Ledford H. Old cancer drug gets fresh look. *Nature.* 2014;509:541-42.
14. Ouyang Z, Li H, Zhai Z, Xu J, Dass DR, Qin A, Dai K. Zoledronic Acid: Pleiotropic Anti-Tumor Mechanism and Therapeutic Outlook for Osteosarcoma. *Curr Drug Targets.* 2018;19(5):409-21.
15. Aapro M, Saad F, Costa L. Optimizing clinical benefits of bisphosphonates in cancer patients with bone metastases. *Oncologist.* 2010;15(11):1147-58.
16. Ibrahim T, Mercatali L, Sacanna E, Tesei A, Carloni S, Ulivi P, et al. Inhibition of breast cancer cell proliferation in repeated and non-repeated treatment with zoledronic acid. *Cancer Cell Int.* 2012;12(1):48.
17. Steinman RA, Brufsky AM, Oesterreich S. Zoledronic acid effectiveness against breast cancer metastases - a role for estrogen in the microenvironment? *Breast Cancer Res.* 2012;14(5):213.
18. Asbagh LA, Uzunoglu S, Cal C. Zoledronic acid effects interleukin-6 expression in hormone-independent prostate cancer cell lines. *Int Braz J Urol.* 2008;34(3):355-63.
19. Ullen A, Schwarz S, Lennartsson L, Kalkner KM, Sandstrom P, Costa F, et al. Zoledronic acid induces caspase-dependent apoptosis in renal cancer cell lines. *Scand J Urol Nephrol.* 2009;43(2):98-103.
20. Han FS, Lin MB, Zhu HY, Chen YQ, Shui W, Xu JM. Anti-proliferation effect of zoledronic acid on human colon cancer line SW480. *Asian Pac J Trop Med.* 2016;9(2):168-71.
21. Zhu J, Liu M, Liu Y, Zhang Y, Yang B, Zhang W. Zoledronic Acid Regulates Autophagy and Induces Apoptosis in Colon Cancer Cell Line CT26. *Biomed Res Int.* 2017;2017:7203584.
22. Di Salvatore M, Orlandi A, Bagalà C, Quirino M, Cassano A, Astone A, et al. Anti-tumour and anti-angiogenic effects of zoledronic acid on human non-small-cell lung cancer cell line. *Cell Prolif.* 2011;44(2):139-46.
23. Scheper MA, Badros A, Chaisuparat R, Cullen KJ, Meiller TF. Effect of zoledronic acid on oral fibroblasts and epithelial cells: a potential mechanism of bisphosphonate-associated osteonecrosis. *Br J Haematol.* 2009; 144(5):667-76.
24. Lou X, Zhang J, Liu S, Xu N, Liao DJ. The other side of the coin: the tumor-suppressive aspect of oncogenes and the oncogenic aspect of tumor-suppressive genes, such as those along the CCND-CDK4/6-RB axis. *Cell Cycle.* 2014;13(11):1677-93.
25. Skerjanec A, Berenson J, Hsu C, Major P, Miller WH, Jr Ravera C, et al. The pharmacokinetics and pharmacodynamics of zoledronic acid in cancer patients with varying degrees of renal function. *J Clin Pharmacol.* 2003;43(2):154-62.

Recebido em 24/5/2018
Aprovado em 4/7/2018