

# Efeito Anti-Tumoral dos Bisfosfonatos: uma Nova Perspectiva Terapêutica

## *Anti-Tumor Effect of Bisphosphonates: a New Therapeutic Perspective*

Déborah V. Vasconcellos<sup>1</sup>, Maria Eugenia L. Duarte<sup>2</sup>, Raquel C. Maia<sup>3</sup>

### **Resumo**

Os bisfosfonatos (BFs) são potentes inibidores da reabsorção óssea mediada por osteoclastos. Essas drogas são efetivas na redução do cálcio sérico em pacientes com hipercalcemia maligna, assim como também no tratamento da dor óssea, osteoporose e metástases ósseas.

Diversos estudos demonstram que os BFs possuem efeito em outras células além dos osteoclastos. Em células tumorais podem agir induzindo a apoptose, inibindo a proliferação celular, inibindo a adesão e a invasividade celular ou as metástases ósseas. O mecanismo molecular subjacente a estes efeitos parece ser a inibição de enzimas da via do mevalonato, o que leva a um impedimento da prenilação de GTPases como Ras e Rho, importantes para a manutenção da integridade do citoesqueleto e tráfego de vesículas nas células.

As evidências dos recentes estudos laboratoriais e clínicos sugerem que os BFs têm um papel importante como tratamento suplementar e possivelmente complementar na terapia do câncer. Um entendimento mais profundo e completo sobre o efeito anti-tumoral destas drogas pode sugerir possibilidades terapêuticas novas e seletivas.

**Palavras-chave:** efeito anti-tumoral; bisfosfonatos; metástases; apoptose.

### **Abstract**

Bisphosphonates are potent osteoclast-mediated bone reabsorption inhibitors. These drugs are effective in reducing serum calcium levels in patients with malignant hypercalcaemia, as well as in bone pain, osteoporosis and bone metastasis treatment.

Several studies have demonstrated that bisphosphonates are effective in other cell types than osteoclasts. In tumour cells they can act inducing apoptosis, inhibiting cell proliferation, inhibiting cell adhesion and invasion or bone metastasis. The underlying molecular mechanism to these effects seems to be the inhibition of mevalonate pathway enzymes, which leads to a prenylation impairment of GTPases like Ras and Rho, important in maintaining cellular cytoskeleton integrity and vesicles trafficking.

Evidences from recent laboratorial and clinical studies suggest that bisphosphonates have an important role as a supplemental, and possibly as complementary treatment in cancer therapy. A more complete understanding concerning the anti-tumor effect of these drugs may suggest new and selective therapeutical possibilities.

**Key words:** anti-tumor effect; bisphosphonates; metastasis; apoptosis.

<sup>1</sup>- Mestranda do Laboratório de Hematologia Celular e Molecular do Hospital do Câncer I (HC-I) / Instituto Nacional de Câncer (INCA) e do Programa de Pós-graduação em Ciências Morfológicas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) - Rio de Janeiro - Brasil.

<sup>2</sup> - Professora do Departamento de Histologia e Embriologia da UFRJ - Rio de Janeiro - Brasil

<sup>3</sup>- Médica Hematologista, PhD. Chefe do Laboratório de Hematologia Celular e Molecular do Hospital do Câncer I / INCA - Rio de Janeiro - Brasil.

*Enviar correspondência para:* Raquel C. Maia - Laboratório de Hematologia Celular e Molecular - Hospital do Câncer I - Instituto Nacional de Câncer - Praça da Cruz Vermelha, 23/7º andar - Centro - Rio de Janeiro - Brasil - *e-mail:* rcmaia@inca.gov.br

## BISFOSFONATOS

Os bisfosfonatos (BFs) são análogos do pirofosfato endógeno, no qual um átomo de carbono substitui o átomo central de oxigênio. Propriedades do pirofosfato indicavam que este poderia ser explorado em doenças de calcificação ectópica ou de aumento da reabsorção óssea.<sup>1</sup> No entanto, a incapacidade de o pirofosfato agir quando administrado oralmente, inibindo a reabsorção óssea, propiciou o desenvolvimento de análogos com ações similares, porém mais resistentes à ação enzimática, como é o caso dos BFs.<sup>2</sup> *In vivo*, os BFs se ligam fortemente à hidroxiapatita da superfície óssea e atuam preferencialmente em sítios de grande formação e reabsorção ósseas.<sup>1</sup>

Todos os BFs possuem propriedades físico-químicas e farmacocinéticas similares. Geralmente esses compostos são fracamente adsorvidos a partir do trato gastrointestinal por serem pouco lipofílicos. Os BFs circulantes desaparecem rapidamente do plasma e aproximadamente a metade é capturada pelo osso, sendo o restante excretado sem modificações pelos rins. Essa classe de drogas não é metabolizada pelo fígado.<sup>3,4</sup>

### INDICAÇÕES CLÍNICAS PARA O USO DOS BISFOSFONATOS

Após mais de três décadas de pesquisas e desenvolvimento, os BFs tornaram-se indispensáveis no tratamento de doenças ósseas, tanto benignas quanto malignas.<sup>5,6</sup> Essas drogas são potentes inibidores da reabsorção óssea mediada por osteoclastos<sup>7</sup> e são efetivas na redução das concentrações de cálcio no soro de pacientes com hipercalemia maligna.<sup>8,9</sup> Além disso, eles são uma nova modalidade de tratamento para metástases ósseas, já que reduzem a quantidade e a taxa de complicações esqueléticas no mieloma múltiplo (MM) e no câncer de mama avançado<sup>10,11</sup>, e também aliviam a dor óssea causada por metástases de vários tumores sólidos, com conseqüente aumento da qualidade de vida do paciente (Quadro 1).<sup>12,13</sup>

## MECANISMOS DE AÇÃO DOS BISFOSFONATOS

Os mecanismos pelos quais os BFs atuam na reabsorção óssea em nível celular envolvem provavelmente a inibição da formação e/ou recrutamento de osteoclastos a partir de células precursoras imaturas,<sup>7,14</sup> inibição da ativação de osteoclastos, inibição da atividade de osteoclastos maduros e/ou indução de apoptose.<sup>15,16,17</sup>

A inibição da formação de osteoclastos foi demonstrada com vários BFs em sistemas experimentais *in vitro*, nos quais osteoclastos foram gerados a partir da medula óssea.<sup>14</sup> Seu papel *in vivo* é evidenciado pela cinética da inibição da reabsorção e a redução do número de osteoclastos após tratamentos prolongados.<sup>17</sup>

Atualmente é aceito que muitos fatores que estimulam a reabsorção óssea mediada por osteoclastos, tais como paratormônio, prostaglandina E, interleucina-1 e fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), agem indiretamente via osteoblastos. Existem evidências de que os osteoblastos produzem fatores que estimulam a atividade de osteoclastos maduros.<sup>17</sup> Owens et al. demonstraram que o alendronato (um tipo de BF) não afetava o número de osteoclastos de ratos *in vitro*, porém reduzia sua atividade em determinada concentração na presença de osteoblastos.<sup>18</sup> Na ausência de osteoblastos, a concentração necessária para a redução da atividade dos osteoclastos era maior, sugerindo que o mecanismo de ação dos BFs também se dá via inibição da ativação de osteoclastos por osteoblastos.<sup>17</sup>

A inibição direta da atividade dos osteoclastos é sugerida por observações *in vivo* do desaparecimento da borda ondulada, que é a membrana convoluta dos osteoclastos associada a sua atividade.<sup>19,20</sup> Essa membrana parece ser o sítio do tráfego bidirecional: enzimas lisossomais e prótons são liberados no hemivacúolo de reabsorção, que age como um lisossomo gigante, enquanto o cálcio e os produtos de degradação da matriz são internalizados e transportados via transcitose para a membrana baso-lateral da célula.<sup>21,22</sup> Osteoclastos

Quadro 1. Indicações clínicas para o uso dos bisfosfonatos

- Tratamento da hipercalemia induzida por tumor
- Tratamento da dor óssea;
- Redução de complicações esqueléticas em pacientes com metástases ósseas ou mieloma múltiplo;
- Tratamento da doença de Paget óssea;
- Tratamento da osteoporose pós-menopausa;
- Prevenção da perda óssea causada por tratamento com glicocorticóides;
- Aumento da densidade óssea na fibrodiasplasia;
- Alívio dos sintomas da osteogênese imperfecta.

examinados em microscópio eletrônico após administração de alendronato não possuíam a membrana convoluta e pareciam quiescentes.<sup>20</sup> Essa observação é uma forte indicação da inativação de osteoclastos por BFs *in vivo*.<sup>17</sup>

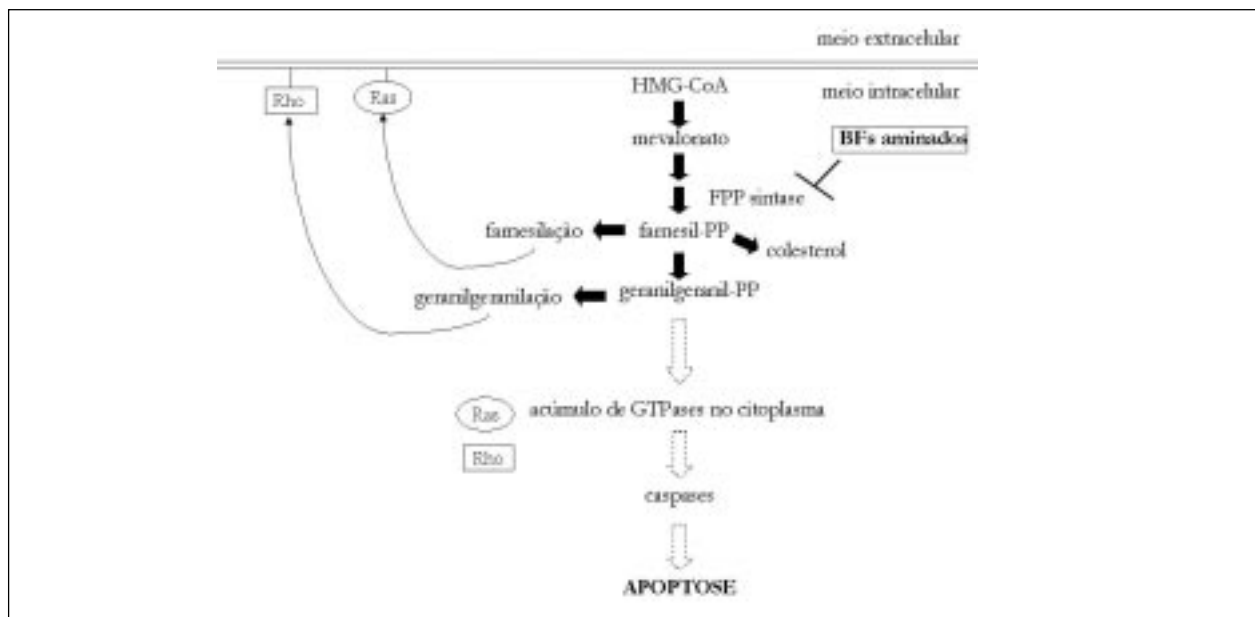
A apoptose, ou morte celular programada, foi descrita em osteoclastos há muitos anos e talvez seja a via normal de morte dessas células.<sup>17</sup> O tempo de vida dos osteoclastos, estimado a partir de estudos histológicos, é de duas a quatro semanas *in vivo* e de no máximo duas semanas *in vitro*. Já foi descrito que os BFs aumentam a apoptose de osteoclastos, tanto *in vivo* quanto *in vitro*.<sup>15</sup>

Os BFs podem ser divididos em dois subgrupos, dependendo da presença ou não de nitrogênio. Pesquisas recentes sugerem que os primeiros BFs usados clinicamente e não-aminados (etidronato e clodronato) são metabolizados em análogos citotóxicos de ATP<sup>23</sup>, sendo estes os responsáveis pela inibição da atividade dos osteoclastos. Por outro lado, os BFs aminados, mais novos e potentes - pamidronato, ibandronato, alendronato e zoledronato -, induzem apoptose nos osteoclastos, inibindo enzimas da via do mevalonato e prevenindo a prenilação (principalmente a geranilgeranilação) de pequenas proteínas que se ligam a GTP, que são essenciais para o tráfego de vesículas e manutenção da integridade do citoesqueleto.<sup>6,15,24,25,26,27,28</sup>

A geranilgeranilação é a ligação de um lipídio de 20 carbonos (geranilgeranil) a certas proteínas, incluindo proteínas-G regulatórias chaves, tais como Rac, Rho, Cdc-42, e vários membros da família Rab. A geranilgeranilação é necessária para ancorar essas proteínas na membrana plasmática ou em membranas intracelulares. A ausência desse processo resulta em um bloqueio ou mudança em eventos sinalizadores que em última instância levam à indução das caspases e à apoptose (Figura 1).<sup>25,27,29</sup>

Foi demonstrado que a apoptose induzida por BFs em osteoclastos envolve mudanças morfológicas características, perda de potencial de membrana da mitocôndria e ativação de caspases, sendo que a caspase-3 parece ser a principal caspase efetora ativada no processo.<sup>30</sup> Em um outro trabalho, todos os BFs utilizados induziram a formação de núcleo picnótico dependente de caspase e a clivagem da Mst1 kinase para formar a espécie ativa de 34 kDa, o que sugere que os BFs agem diretamente nos osteoclastos induzindo apoptose.<sup>27</sup> Porém, em trabalho publicado por Benford et al., apenas os BFs aminados causaram um aumento na atividade de proteases "caspase-3-like" em macrófagos J774, não sendo observada nos BFs não-aminados nem em concentrações que sabidamente reduzem a viabilidade ou inibem a proliferação celular.<sup>25</sup>

Figura 1. Mecanismo de ação dos bisfosfonatos



Os BFs aminados induzem a apoptose inibindo a farnesil pirofosfato sintase (FPP sintase) e prevenindo a prenilação de pequenas GTPases, que são essenciais para o tráfego de vesículas e manutenção da integridade do citoesqueleto. A prenilação é necessária para ancorar essas proteínas na membrana plasmática ou em membranas intracelulares. A ausência desse processo resulta em um bloqueio ou mudança em eventos sinalizadores que em última instância levam à indução das caspases e à apoptose.

**MECANISMOS DE AÇÃO DOS BISFOSFONATOS NOS TUMORES**

Várias pesquisas demonstraram que os BFs também possuem efeito em outras células além dos osteoclastos, incluindo células tumorais. Já existe uma quantidade considerável de dados *in vitro* demonstrando que os BFs têm ação citostática, induzem apoptose e inibem a adesão e a invasividade de células tumorais (Tabela 1), interferem no processo metastático (Tabela 2), têm efeito na secreção de fatores de crescimento e citocinas e inibem a angiogênese tumoral (Tabela 3).<sup>6</sup>

Embora em menor escala, evidências *in vivo* demonstrando a ação dos BFs em tumores estão começando a se acumular.<sup>6</sup>

***Inibição da proliferação celular e indução de apoptose***

Trabalhos recentes indicam que BFs podem ter um efeito anti-proliferativo direto e induzir apoptose tanto em linhagens de células de MM humano<sup>31</sup> quanto em plasmócitos de pacientes com MM.<sup>32</sup> A adição de geranilgeraniol e farnesol, dois intermediários da via do mevalonato, previne a apoptose induzida pelos BFs e reverte parcialmente a interrupção do ciclo celular,<sup>33</sup> sugerindo que seu mecanismo de ação em células de

MM seja o mesmo que nos osteoclastos. Células da linhagem de mieloma IM-9 transfectadas com um vetor expressando a proteína anti-apoptótica Bcl-2 mostraram-se completamente protegidas contra a apoptose, demonstrando viabilidade normal e DNA intacto.<sup>32</sup>

Gordon et al. observaram que uma única infusão de pamidronato em 16 pacientes com MM causou um aumento importante na apoptose de plasmócitos *in vivo* em 10 pacientes e um pequeno aumento em 4 deles.<sup>34</sup> Os BFs pamidronato e zoledronato também induziram apoptose em plasmócitos humanos *in vitro*, provavelmente causada pela inibição da via do mevalonato e perda de pequenas GTPases, já que mesmo concentrações baixas de zoledronato causaram acúmulo de Rap1A não-preniladas em culturas de células mononucleares da medula óssea.<sup>34</sup>

Em trabalho publicado por Tassone et al. foi observado que a combinação do BF zoledronato com dexametasona, esta última normalmente utilizada no tratamento de pacientes com MM, possui efeito sinérgico em linhagens celulares de mieloma humano *in vitro*, o que leva a uma interessante perspectiva sobre essa combinação terapêutica *in vivo*.<sup>35</sup>

Em trabalho recente realizado por Nishida et al. foi

Tabela 1. Trabalhos pré-clínicos sobre a ação anti-tumoral dos bisfosfonatos em linhagens tumorais

Autor	Linhagem	Propriedade anti -tumoral
Van der Pluijm <i>et al.</i> , 1996	câncer de mama	inibição da adesão celular
Boissier <i>et al.</i> , 1997	câncer de mama e de próstata	inibição da adesão celular
Shipman <i>et al.</i> , 1997, 1998	mieloma múltiplo	indução de apoptose
Stearns, 1998	câncer de próstata	inibição da invasividade celular
Aparicio <i>et al.</i> , 1998	mieloma múltiplo	indução de apoptose
Tassone <i>et al.</i> , 2000	mieloma múltiplo	indução de apoptose
Fromigue <i>et al.</i> , 2000	câncer de mama	indução de apoptose
Boissier <i>et al.</i> , 2000	câncer de mama e de próstata	inibição da invasividade celular
Senaratne <i>et al.</i> , 2000, 2002	câncer de mama	indução de apoptose
Jagdev <i>et al.</i> , 2001	câncer de mama	indução de apoptose
Sonnemann <i>et al.</i> , 2001	osteossarcoma	inibição da proliferação
Riebeling <i>et al.</i> , 2002	melanoma	indução de apoptose
Virtanen <i>et al.</i> , 2002	câncer de próstata	inibição da adesão, invasividade e migração celular

Tabela 2. Trabalhos pré-clínicos sobre a ação dos bisfosfonatos em modelos animais

Autor	Modelo animal	Propriedade anti-tumoral
Wingen <i>et al.</i> , 1986	Ratos SD + linhagem de carcinossarcoma de Walker 256	Redução da osteólise tumoral
Krempien <i>et al.</i> , 1988	Ratos + linhagem de carcinossarcoma de Walker 256	Inibição da destruição óssea e da hipercalemia
Hall & Stoica, 1994	Ratos Berlin Druckrey IV + linhagem de adenocarcinoma mamário ENU1564	redução da incidência e tamanho das metástases esqueléticas
Sasaki <i>et al.</i> , 1995	Camundongos "nude" + linhagem de câncer de mama MDA-MB-231	inibição do desenvolvimento de metástases ósseas
Stearns & Wang, 1996	Camundongos SCID + linhagem de câncer de próstata PC-3 ML	inibição do desenvolvimento de metástases ósseas
Yoneda <i>et al.</i> , 1997	Camundongos "nude" + linhagem de câncer de mama MDA-MB-231	redução ou inibição das lesões osteolíticas
Sasaki <i>et al.</i> , 1998	Camundongos "nude" + linhagem de câncer de mama MDA-MB-231	inibição do desenvolvimento de metástases ósseas

Tabela 3. Trabalhos pré-clínicos sobre a ação dos bisfosfonatos em linhagens não-tumorais

Autor	Linhagem	Propriedade
Sahni <i>et al.</i> , 1993	osteoblastos	inibição da atividade dos osteoclastos
Pennanen <i>et al.</i> , 1995	macrófagos	inibição da secreção de citocinas e fatores de crescimento
Sansoni <i>et al.</i> , 1995	monócitos	inibição da função apresentadora de antígeno
Wood <i>et al.</i> , 2002	células endoteliais humanas	inibição da angiogênese
Fournier <i>et al.</i> , 2002	células endoteliais humanas	inibição da angiogênese

investigado o efeito anti-tumoral dos BFs YM529 e YM175 em linhagens celulares de vários tumores hematopoéticos. Resultados de estudos em células de câncer de mama humanas indicam que os BFs também possuem efeito anti-tumoral direto nestas células, uma vez que induzem apoptose em linhagens das mesmas.<sup>1,37,38</sup> Esses trabalhos sugerem o envolvimento de caspases neste processo apoptótico,<sup>1,37</sup> em especial da caspase-3.<sup>38</sup> Já foi demonstrado por Senaratne *et al.* que a expressão da proteína Bcl-2 está diminuída em

células da linhagem de câncer de mama MDA-MB-231 expostas ao pamidronato.<sup>1</sup> Em trabalho mais recente, o mesmo grupo demonstrou que a expressão induzida de Bcl-2 nesta mesma linhagem inibe eficientemente a fragmentação do DNA induzida pelo zoledronato, que é consequência da ativação das caspases em células de câncer de mama.<sup>38</sup>

Em pesquisa recente realizada por Senaratne *et al.* foi observado que o zoledronato impediu a localização na membrana da proteína Ras em linhagens de câncer

de mama, indicando uma prenilação reduzida da mesma.<sup>38</sup> Essas observações sugerem que o processo apoptótico mediado pelo zoledronato pode ser iniciado pela inibição de enzimas da via do mevalonato levando a um impedimento da prenilação de pequenas GTPases.<sup>38</sup>

Trabalho publicado por Jagdev et al. demonstrou uma ação sinérgica entre paclitaxel e zoledronato na redução do número de células de câncer de mama e indução de apoptose das mesmas.<sup>28</sup> O mecanismo pelo qual este efeito ocorre não foi determinado, mas a inibição da via do mevalonato pelo zoledronato e a prevenção da segregação cromossômica e da divisão celular pelo paclitaxel podem resultar em um efeito apoptótico cumulativo.<sup>28</sup>

Outros trabalhos demonstram a inibição da proliferação e/ou indução de apoptose *in vitro* por BFs em linhagens de melanoma<sup>39</sup> e osteossarcoma humanos.<sup>40</sup>

### *Inibição da adesão e da invasividade celular*

Van der Pluijm et al. apresentaram evidências de que a adesão de células da linhagem de câncer de mama MDA-MB-231 à matriz extracelular óssea pode ser inibida pelo tratamento prévio de ossos corticais e trabeculares com BFs.<sup>41</sup> Em contrapartida, Boissier et al. observaram que o tratamento prévio de células de câncer de mama (MDA-MB-231 e MCF-7) e de próstata (PC-3) com BFs inibiu a adesão a matrizes extracelulares ósseas mineralizadas ou não, demonstrando um efeito direto dos BFs nas células tumorais, independente da necessidade de contato das mesmas com um mineral coberto por BFs.<sup>42</sup>

O mecanismo pelo qual os BFs aminados inibem a adesão de células tumorais à matriz óssea permanece desconhecido mas, provavelmente, a modulação de moléculas de adesão tais como caderinas, lamininas e integrinas está envolvida.<sup>6</sup> No entanto, em pesquisa realizada por Boissier et al., apesar de os autores demonstrarem que os BFs modulam a adesão celular, as drogas não afetaram a expressão de integrinas na membrana das células tumorais.<sup>42</sup>

Boissier et al. observaram que os BFs inibiram a atividade proteolítica de várias metaloproteinases em linhagens de câncer de mama (MDA-MB-231) e de próstata (PmPC-3).<sup>43</sup> Stearns demonstrou que o alendronato inibiu a secreção, estimulada por TGF- $\beta$ 1, da metaloproteinase MMP-2 em células de câncer de próstata (PC-3 ML), o que levou a um bloqueio na degradação do colágeno-1 e a conseqüente redução da capacidade de invasão da célula tumoral.<sup>44</sup>

Virtanen et al. observaram que a inibição da

invasividade de células de câncer de próstata (PC-3) induzida pelo alendronato era similar à induzida pela mevastatina (inibidor da via do mevalonato) e que ambas foram moduladas pelos intermediários geranylgeraniol e trans-trans-farnesol.<sup>45</sup> O pré-tratamento com alendronato também inibiu a migração celular. Os resultados deste trabalho demonstraram que a via do mevalonato, que leva à prenilação de proteínas, pode ser importante para a invasividade e migração de células tumorais *in vitro*.<sup>45</sup>

### *Inibição de metástases ósseas in vivo*

Através da inibição da reabsorção óssea mediada por osteoclasto, os BFs diminuem a liberação pelo osso de fatores de crescimento promotores de tumor e retardam a progressão de metástases ósseas. Como resultado, não só a osteólise é reduzida, mas também ocorre uma redução no número e no tamanho de tumores no osso.<sup>6</sup>

Sasaki et al.<sup>46</sup> e Hall e Stoica<sup>47</sup> examinaram o efeito do risedronato em modelos animais de metástases ósseas e observaram que a droga reduziu a incidência,<sup>47</sup> diminuiu a progressão ou inibiu o desenvolvimento<sup>46</sup> e diminuiu o volume tumoral de metástases ósseas.<sup>46,47</sup>

Vários outros estudos também demonstraram a inibição de metástases ósseas por diversos BFs em modelos animais.<sup>48,49,50,51,52</sup> Em contrapartida, Shevrin et al. não observaram redução na incidência, tamanho ou número de metástases ósseas com o uso de etidronato em um modelo de metástase usando a linhagem celular de câncer de próstata humano PC-3.<sup>53</sup>

Estudo recente publicado por Michigami et al. demonstrando os efeitos do ibandronato em modelos de metástases em camundongos, sugere que os BFs não são efetivos em metástases viscerais quando administrados tanto preventivamente quanto terapêuticamente.<sup>54</sup>

Os resultados de estudos randomizados em pacientes com câncer de mama primário que receberam oralmente 1600mg/dia de clodronato são conflitantes. Um dos trabalhos,<sup>55</sup> realizado com 302 pacientes, mostrou uma redução da incidência e do número de novas metástases ósseas e viscerais e um aumento da sobrevida. Outro estudo,<sup>56</sup> compreendendo 299 pacientes, não encontrou nenhum efeito nas metástases ósseas, mas um aumento no número de metástases viscerais e uma redução na sobrevida. Resultados de um estudo controlado mais recente,<sup>57</sup> compreendendo 1.069 pacientes, mostraram uma redução significativa na ocorrência de metástases ósseas apenas durante o período de tratamento e redução na mortalidade, porém nenhum efeito nas metástases viscerais. Outros estudos randomizados foram iniciados com clodronato e outros BFs, incluindo pamidronato e

zoledronato intravenosos e ibandronato oral.<sup>58</sup>

### *Inibição da angiogênese*

Foi demonstrado em trabalho recente que o zoledronato é um potente inibidor da angiogênese.<sup>59</sup> *In vitro* esta droga inibiu a proliferação de células endoteliais (CE) humanas estimuladas com soro fetal bovino, fator de crescimento de fibroblasto básico (bFGF) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Em anéis aórticos cultivados e em ensaios com membrana corioalantóica de ovo de galinha, o zoledronato reduziu o brotamento de vasos. Quando administrado sistemicamente a camundongos o zoledronato inibiu potentemente a angiogênese induzida por implantes subcutâneos impregnados com bFGF.<sup>59</sup>

Fournier et al. observaram que o tratamento de CE com BFs reduziu a proliferação, induziu apoptose e diminuiu a formação de tubos similares a capilares *in vitro*.<sup>60</sup> Este grupo também estudou os efeitos dos BFs na revascularização da próstata induzida por testosterona em ratos castrados, visto que foi anteriormente observado que os BFs acumulam-se transitariamente na próstata desses animais, e observaram que tanto o IBA quanto o ZOL induziram redução de 50% da revascularização da próstata.<sup>60</sup> Neste mesmo trabalho, os autores quantificaram vasos sanguíneos em biópsias ósseas de pacientes com doença de Paget antes e após tratamento com clodronato e constataram uma redução de 40% da vascularização após o tratamento com o BF.

Em estudo realizado por Santini et al. em 25 pacientes com metástases ósseas e tratados com pamidronato, observou-se uma diminuição significativa e persistente dos níveis séricos de VEGF, sugerindo um efeito anti-angiogênico desta droga.<sup>61</sup>

### *Efeitos na secreção de citocinas e fatores de crescimento*

No complexo micro-ambiente de uma metástase óssea, altas concentrações locais de BFs podem exercer efeitos não apenas nos osteoclastos e nas células tumorais, mas também em outros tipos celulares que influenciam a proliferação de células tumorais através da liberação de fatores, como osteoblastos, células estromais da medula óssea e monócitos.<sup>6</sup>

Pennanen et al.(1995) demonstraram que os BFs possuem efeito inibitório na secreção de citocinas (IL-1, IL-6 e TNF $\alpha$ ) por macrófagos da linhagem RAW 264 *in vitro*.<sup>62</sup>

Sahni et al. sugerem que parte da inibição da atividade dos osteoclastos pelos BFs seria mediada pela ação de osteoblastos, pois a diminuição do agente estimulatório encontrado no meio condicionado por

estas células inibiria a atividade reabsortiva daquelas.<sup>63</sup>

Sansonni et al. observaram que o alendronato inibe a função apresentadora de antígeno dos monócitos provavelmente através da inibição da produção de IL-1, o que poderia contribuir para o efeito inibitório da droga na reabsorção óssea.<sup>64</sup>

## CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os resultados de uma série de estudos recentes revelam que os BFs possuem efeito anti-tumoral em diferentes tipos de neoplasias e que o mecanismo de ação destas drogas também pode ser diverso, incluindo inibição da proliferação celular, indução de apoptose, inibição da adesão e da invasividade celular, inibição da angiogênese e efeitos na secreção de fatores de crescimento e citocinas pelo micro-ambiente tumoral.

Um entendimento mais profundo e completo sobre os mecanismos pelos quais os BFs influenciam o potencial metastático ou induzem a apoptose podem sugerir possibilidades terapêuticas novas e seletivas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Senaratne SG, Pirianov G, Mansi JL, Arnett TR, Colston KW. Bisphosphonates induce apoptosis in human breast cancer cell lines. *Br J Cancer* 2000;82:1459-68.
2. Fleisch H. Diphosphonates: history and mechanisms of action. *Metab Bone Dis Rel Res* 1981;4/5:279-88.
3. Fleisch H. Bisphosphonates. Pharmacology and use in the treatment of tumour-induced hypercalcaemic and metastatic bone disease. *Drugs* 1991;42:919-44.
4. Berruti A, Dogliotti L, Tucci M, Tarabuzzi R, Fontana D, Angeli A. Metabolic bone disease induced by prostate cancer: rationale for the use of bisphosphonates. *J Urol* 2001;166:2023-31.
5. Brown DL, Robbins R. Developments in the therapeutic applications of bisphosphonates. *J Clin Pharmacol* 1999;39:651-60.
6. Green JR. Anti-tumor potential of biphosphonates. *Med Klin* 2000;95 Suppl 2:23-8.
7. Booncamp PM, van der Wee-Pals LJA, van Wijk-van Lennep MML, Thesing CW, Bijvoet OL. Two modes of action of bisphosphonates on osteoclastic resorption of mineralized matrix. *J Bone Miner Res* 1986;1:27-39.
8. Ryzen E, Martodan R, Troxell M, Benson A, Paterson A, Shepard K, et al. Intravenous etidronate in the management of malignant hypercalcaemia. *Arch Intern Med* 1985;145:449-52.
9. Kanis JA, Urwin GH, Gray RE, Beneton MN, McCloskey EV, Hamdy NA, et al. Effects of intravenous etidronate on skeletal and calcium metabolism. *Am J Med* 1987;82:55-70.

10. Berenson JR, Linchtenstein A, Porter L, Dimopoulos MA, Bordoni R, George S, et al. Efficacy of pamidronate in reducing skeletal events in patients with advanced multiple myeloma. Myeloma Aredia Study Group. *N Engl J Med* 1996;334:488-93.
11. Hortobagyi GN, Theriault RL, Porter L, Blayney D, Lipton A, Sinoff C, et al. Efficacy of pamidronate in reducing skeletal complications in patients with breast cancer and lytic metastasis. Protocol 19. Aredia Breast Cancer Study Group. *N Engl J Med* 1996;335:1785-91.
12. Ernst DS, MacDonald RN, Paterson AH, Jensen J, Brasher P, Bruera E. A doubleblind cross-over trial of intravenous clodronate in metastatic bone pain. *J Pain Symptom Manage* 1992;7:4-11.
13. Purohit OP, Anthony C, Radstone CR, Owen J, Coleman RE. High-dose intravenous pamidronate for metastatic bone pain. *Br J Cancer* 1994;70:554-8.
14. Hughes DE, MacDonald BR, Russell RGG, Gowen M. Inhibition of osteoclast-like cell formation by bisphosphonates in long-term cultures of human bone marrow. *J Clin Invest* 1989;83:1930-5.
15. Hughes DE, Wright KR, Uy HL, Sasaki A, Yoneda T, Roodman GD, et al. Bisphosphonates promote apoptosis in murine osteoclasts in vitro and in vivo. *J Bone Miner Res* 1995;10:1478-87.
16. Selander KS, Monkkonen J, Karhukorp E, Harkonen P, Hannuniemi R, Vaananen KK. Characteristics of clodronate-induced apoptosis in osteoclasts and macrophages. *Mol Pharmacol* 1996;50:1127-38.
17. Rodan GA. Mechanisms of action of bisphosphonates. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1998;38:375-88.
18. Owens JM, Fuller K, Chambers TJ. Osteoclast activation: potent inhibition by the bisphosphonate alendronate through a nonresorptive mechanism. *J Cell Physiol* 1997;172:79-86.
19. Plasmans CMT, Jap PHK, Kuypers W, Slooff TJJ. Influence of a diphosphonate on the cellular aspect of young bone tissue. *Calcif Tissue Int* 1980;32:247-56.
20. Sato M, Grasser W, Endo N, Akins R, Simmons H, Thompson DD, et al. Bisphosphonates action. Alendronate localization in rat bone and effects on osteoclast ultrastructure. *J Clin Invest* 1991;88:2095-105.
21. Nesbitt SA, Horton MA. Trafficking of matrix collagens through boneresorbing osteoclasts. *Science* 1997;276:266-69.
22. Salo J, Lenenkari P, Mulari M, Metsikko K, Vaananen HK. Removal of osteoclast bone resorption products by transcytosis. *Science* 1997;276:270-73.
23. Frith JC, Monkkonen J, Blackburn GM, Russell RGG, Rogers M. Clodronate and liposome-encapsulated clodronate are metabolized to a toxic ATP analog, adenosine 5'-(*b.g*-dichloromethylene) triphosphate, by mammalian cells in vitro. *J Bone Miner Res* 1997;12:1358-67.
24. Luckman SP, Coxon FP, Ebetino FH, Russell RGG, Rogers MJ. Heterocycle-containing bisphosphonates cause apoptosis and inhibit bone resorption by preventing protein prenylation: evidence from structure-activity relationships in J774 macrophages. *J Bone Miner Res* 1998;13:1668-78.
25. Benford HL, Frith JC, Auriola S, Mönkkönen J, Rogers J. Farnesol and geranylgeraniol prevent activation of caspases by aminobisphosphonates: biochemical evidence for two distinct pharmacological classes of bisphosphonate drugs. *Mol Pharmacol* 1999;56:131-40.
26. Fisher JE, Rogers MJ, Halasy JM, Luckman P, Hughes DE, Masarachia PJ, et al. Alendronate mechanism of action: geranylgeraniol, an intermediate in the mevalonate pathway, prevents inhibition of osteoclast formation, bone resorption, and kinase activation in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:133-8.
27. Reszka AA, Halasy-Nagy JM, Masarachia PJ, Rodan GA. Bisphosphonates act directly on the osteoclast to induce caspase cleavage of mst1 kinase during apoptosis. *J Biol Chem* 1999;274:34967-73.
28. Jagdev SP, Coleman RE, Shipman CM, Rostami HA, Croucher PI. The bisphosphonate, zoledronic acid, induces apoptosis of breast cancer cells: evidence for synergy with paclitaxel. *Br J Cancer* 2001;84:1126-34.
29. Coxon FP, Benford HL, Russel RGG, Rogers MJ. Protein synthesis is required for caspase activation and induction of apoptosis by bisphosphonate drugs. *Mol Pharmacol* 1998;54:631-8.
30. Benford HL, McGowan NW, Helfrich MH, Nuttal ME, Rogers MJ. Visualization of bisphosphonate-induced caspase-3 activity in apoptotic osteoclasts in vitro. *Bone* 2001;28:465-73.
31. Shipman CM, Rojers MJ, Apperley JF, Russell RGG, Croucher PI. Bisphosphonates induce apoptosis in human myeloma cell lines: a novel anti-tumour activity. *Br J Haematol* 1997;98:665-72.
32. Aparicio A, Gardner A, Tu Y, Savage A, Berenson J, Lichtenstein A. In vitro cyto-reductive effects on multiple myeloma cells induced by bisphosphonates. *Leukemia* 1998;12:220-9.
33. Shipman CM, Croucher PI, Russell RGG, Helfrich MH, Rojers MJ. The bisphosphonates incadronate (YM175) causes apoptosis of human myeloma cells in vitro by inhibiting the mavalonate pathway. *Cancer Res* 1998;58:5294-7.
34. Gordon S, Helfrich MH, Sati HI, Greaves M, Ralston SH, Culligan DJ, et al. Pamidronate causes apoptosis of plasma cells in vivo in patients with multiple myeloma. *Br J Haematol* 2002;119:475-83.
35. Tassone P, Forciniti S, Galea E, Morrone G, Turco MC, Martinelli V, et al. Growth inhibition and synergistic induction of apoptosis by zoledronate and dexamethasone in human myeloma cell lines. *Leukemia* 2000;14:841-4.



36. Nishida S, Kikuichi S, Haga H, Yoshioka S, Tsubaki M, Fujii K, et al. Apoptosis-inducing effect of a new bisphosphonate, YM529, on various hematopoietic tumor cell lines. *Biol Pharm Bull* 2003;26:96-100.
37. Fromigue O, Lagneaux L, Body JJ. Bisphosphonates induce breast cancer cell death in vitro. *J Bone Miner Res* 2000;15:2211-21.
38. Senaratne SG, Mansi JL, Colston KW. The bisphosphonate zoledronic acid impairs membrane localisation and induces cytochrome c release in breast cancer cells. *Br J Cancer* 2002;86:1479-86.
39. Riebeling C, Forsea AM, Raisova M, Orfanos CE, Geilen CC. The bisphosphonate pamidronate induces apoptosis in human melanoma cells in vitro. *Br J Cancer* 2002;87:366-71.
40. Sonnemann J, Eckervogt V, Truckenbrod B, Boos J, Winkelmann W, van Valen F. The bisphosphonate pamidronate is a potent inhibitor of human osteosarcoma cell growth in vitro. *Anticancer Drugs* 2001;12:459-65.
41. Van der Pluijm G, Vloedgraven H, van Beek E, van der Wee-Pals L, Löwik C, Papapoulos S. Bisphosphonates inhibit the adhesion of breast cancer cells to bone matrices in vitro. *J Clin Invest* 1996;98:698-705.
42. Boissier S, Magnetto S, Frappart L, Cuzin B, Ebetino FH, Delmas PD, et al. Bisphosphonates inhibit prostate and breast carcinoma cell adhesion to unmineralized and mineralized bone extracellular matrices. *Cancer Res* 1997;57:3890-4.
43. Boissier S, Ferreras M, Peyruchaud O, Magnetto S, Ebetino FH, Colombel M, et al. Bisphosphonates inhibit breast and prostate carcinoma cell invasion, an early event in the formation of bone metastases. *Cancer Res* 2000;60:2949-54.
44. Stearns ME. Alendronate blocks TGF- $\beta$ 1 stimulated collagen 1 degradation by human prostate PC-3 ML cells. *Clin Exp Metastasis* 1998;16:332-9.
45. Virtanen SS, Väänänen HK, Härkönen PL, Lakkakorpi PT. Alendronate inhibits invasion of PC-3 prostate cancer cells by affecting the mevalonate pathway. *Cancer Res* 2002;62:2708-14.
46. Sasaki A, Boyce BF, Story B, Wright KR, Chapman M, Boyce R, et al. Bisphosphonate risedronate reduces metastatic human breast cancer burden in bone in nude mice. *Cancer Res* 1995;55:3551-7.
47. Hall DG, Stoica G. Effect of the bisphosphonate risedronate on bone metastases in a rat mammary adenocarcinoma model system. *J Bone Miner Res* 1994;9:221-30.
48. Wingen F, Eichmann T, Manegold C, Krempien B. Effects of new bisphosphonic acids on tumor-induced bone destruction in the rat. *J Cancer Res Clin Oncol* 1986;111:35-41.
49. Krempien B, Wingen F, Eichmann T, Müller M, Schmahl D. Protective effects of a prophylactic treatment with the bisphosphonate 3-amino-1-hydroxypropane-1,1-bisphosphonic acid on the development of tumor osteopathies in the rat: experimental studies with the Walker carcinoma 256. *Oncology* 1988;45:41-6.
50. Stearns ME, Wang M. Effects of alendronate and taxol on PC-3 ML cell bone metastases in SCID mice. *Invasion Metastasis* 1996;16:116-31.
51. Yoneda T, Sasaki A, Dunstan C, Williams PJ, Bauss F, De Clerck YA, et al. Inhibition of osteolytic bone metastasis of breast cancer by combined treatment with the bisphosphonate ibandronate and tissue inhibitor of the matrix metalloproteinase-2. *J Clin Invest* 1997;99:2509-17.
52. Sasaki A, Kitamura K, Alcalde RE, Tanaka T, Suzuki A, Etoh Y, et al. Effect of a newly developed bisphosphonate, YH529, on osteolytic bone metastases in nude mice. *Int J Cancer* 1998;77:279-85.
53. Shevrin DH, Gorny KI, Rosol TJ, Kukreja SC. Effect of etidronate disodium on the development of bone lesions in an animal model of bone metastasis using the human prostate cancer cell line PC-3. *Prostate* 1991;19:149-54.
54. Michigami T, Hiraga T, Williams PJ, Niewolna M, Nishimura R, Mundy GR, et al. The effect of the bisphosphonate ibandronate on breast cancer metastasis to visceral organs. *Breast Cancer Res Treat* 2002;75:249-58.
55. Diel IJ, Solomayer EF, Costa SD, Gollan G, Goerner R, Wallwiener D, et al. Reduction in new metastases in breast cancer with adjuvant clodronate treatment. *N Engl J Med* 1998;339:357-63.
56. Saarto T, Blomqvist C, Virkkunen P, Elomaa I. Adjuvant clodronate treatment does not reduce the frequency of skeletal metastases in node-positive breast cancer patients: 5-year results of a randomized controlled trial. *J Clin Oncol* 2001;19:10-7.
57. Powles T, Paterson S, Kanis JA, McCloskey E, Ashley S, Tidy A, et al. Randomized, placebo-controlled trial of clodronate in patients with primary operable breast cancer. *J Clin Oncol* 2002;20:3219-24.
58. Paterson AH. Adjuvant bisphosphonate therapy: the future. *Semin Oncol* 2001;28(4 Suppl 11):81-5.
59. Wood J, Bonjean K, Ruetz S, Bellahcene A, Devy L, Foidart JM, et al. Novel antiangiogenic effects of the bisphosphonate compound zoledronic acid. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;302:1055-61.
60. Fournier P, Boissier S, Filleur S, Guglielmi J, Cabon F, Colombel M, et al. Bisphosphonates inhibit angiogenesis in vitro and testosterone-stimulated vascular regrowth in the ventral prostate in castrated rats. *Cancer Res* 2002;62:6538-44.
61. Santini D, Vicenzi B, Avisati G, Dicuonzo G, Battistoni F, Gavasci M, et al. Pamidronate induces modifications of circulating angiogenic factors in cancer patients. *Clin Cancer Res* 2002;8:1080-4.
62. Pennanen N, Lapinjoki S, Urtti A, Monkonen J. Effect of liposomal and free bisphosphonates on the IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF $\alpha$  secretion from RAW 164 cells in vitro.

Pharm Res 1995;12:916-22.

63. Sahni M, Guenther HL, Fleisch H, Collin P, Martin TJ. Bisphosphonates act on rat bone resorption through the mediation of osteoblasts. *J Clin Invest* 1993;91:2004-11.
64. Sansoni P, Passeri G, Fagnoni F, Mohaghehpour N, Snelli G, Brianti V, et al. Inhibition of antigen-presenting cell function by alendronate in vitro. *J Bone Miner Res* 1995;10:1719-25.