

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DA ASSOCIAÇÃO DE
QUIMIOTERÁPICOS CLÁSSICOS COM BUTIRATO SÓDICO E ZOLEDRONATO
EM LINHAGENS CELULARES DE SARCOMA DE EWING

MICHEL PINHEIRO DOS SANTOS

Porto Alegre

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DA ASSOCIAÇÃO DE
QUIMIOTERÁPICOS CLÁSSICOS COM BUTIRATO SÓDICO E ZOLEDRONATO
EM LINHAGENS CELULARES DE SARCOMA DE EWING

MICHEL PINHEIRO DOS SANTOS

Orientadora: Profa. Dra. Ana Lúcia Abujamra.

Co-orientador: Prof. Dr. Rafael Roesler.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Medicina: Ciências Médicas, UFRGS, como
requisito para obtenção do título de Doutor

Porto Alegre, novembro de 2013

CIP - Catalogação na Publicação

dos Santos, Michel Pinheiro

AVALIAÇÃO IN VITRO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DA ASSOCIAÇÃO DE QUIMIOTERÁPICOS CLÁSSICOS COM BUTIRATO SÓDICO E ZOLEDRONATO EM LINHAGENS CELULARES DE SARCOMA DE EWING / Michel Pinheiro dos Santos. -- 2013.

130 f.

Orientadora: Ana Lucia Abujamra.

Coorientador: Rafael Roesler.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. Farmacologia. 2. Cancerologia. 3. Biologia celular. 4. Epigenética. I. Abujamra, Ana Lucia, orient. II. Roesler, Rafael, coorient. III. Título.

Instituições e Fontes Financiadoras

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Pesquisas em Câncer no Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, com financiamento do Instituto do Câncer Infantil do Rio Grande do Sul através do Projeto Rafael Koff Acordi e do Hospital de Clínicas de Porto Alegre através do Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE).

Dedicatória

Aos meus mestres,

Incentivadores e fontes de sabedoria e conhecimento.

À minha família,

Início de tudo, base e porto seguro.

À minha amada Milena e ao nosso pequeno Pablo,

Meus amores, minha vida.

Às crianças com câncer,

Razão maior de todo o esforço.

Agradecimentos

O caminho é longo...

Os esforços não são pequenos e não dizem respeito a uma só pessoa.

Agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente para este “sonho” se tornar realidade...

À Oncosinos, em especial ao Dr. Antônio Fabiano Ferreira Filho e a Dra. Daniela Lessa da Silva, por todo o apoio e ensinamentos nestes quase 10 anos de convivência.

Aos colegas de trabalho do Instituto Geral de Perícias (IGP/RS), pelo apoio, principalmente, no que diz respeito às trocas de plantões que viabilizaram a realização de alguns experimentos.

À Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), em especial ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas (PPGCM).

Ao Instituto do Câncer Infantil (ICI/RS) e ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) por disponibilizarem a estrutura necessária e, principalmente, pelo financiamento do estudo através do Projeto Rafael Koff Acordi e do Fundo de Incentivo a Pesquisa, respectivamente.

Aos colegas do Laboratório de Pesquisas em Câncer do Centro de Pesquisas do HCPA (especialmente à Dra. Caroline Brunetto de Farias), que além de me

ensinarem quase tudo que sei em pesquisa, sempre me incentivaram, apoiaram e foram, acima de tudo, amigos.

Ao meu Co-orientador, Dr. Rafael Roesler, que me estendeu a mão nos momentos mais críticos e viabilizou esse “sonho”.

À minha Orientadora, Dra. Ana Lúcia Abujamra, que sempre acreditou no meu potencial e me apoiou mesmo nos momentos de maior incerteza e instabilidade. Minha mestra maior, exemplo de profissional e de pessoa. Tenho o maior orgulho de ser o primeiro aluno de doutorado orientado por ela.

À minha grande família, especialmente aos meus amados pais, que nunca mediram esforços e me apoiaram incondicionalmente.

À minha esposa Milena, meu amor, e ao nosso filho Pablo, minha vida, pelo amor, carinho, compreensão e apoio. Por estarem todos os dias ao meu lado, tornando a vida melhor, mais doce e repleta de felicidade.

E, acima de tudo, agradeço a Deus.

"Não há transição que não implique um ponto de partida, um processo e um ponto de chegada. Todo amanhã se cria num ontem, através de um hoje. De modo que o nosso futuro baseia-se no passado e se corporifica no presente. Temos de saber o que fomos e o que somos, para sabermos o que seremos."

Paulo Freire

Resumo

Introdução: o sarcoma de Ewing é um dos tipos mais agressivos de câncer pediátrico. Esse tipo de câncer é um tumor primitivo neuroectodérmico, grupo que inclui ainda outros tumores pediátricos como o meduloblastoma e o neuroblastoma. Apesar de avanços significativos desde o surgimento da quimioterapia, ainda há necessidade de aumento dos índices de cura, redução da toxicidade da quimioterapia e redução da resistência ao tratamento em pacientes com essa doença. Inibidores da acetilação de histonas (HDACIs ou HDIs) e bifosfonatos têm um futuro promissor no tratamento de câncer, especialmente quando utilizados conjuntamente ou em associação com outros agentes citotóxicos, como antineoplásicos clássicos. No entanto, os efeitos destes tratamentos combinados ainda não haviam sido devidamente estudados em Sarcoma de Ewing. **Objetivos:** este estudo se propôs a avaliar, *in vitro*, os efeitos do inibidor da acetilação de histonas, butirato sódico (NaB), do bifosfonato, zoledronato (ZA), da associação destes dois agentes e de combinações dos mesmos com antineoplásicos clássicos sobre a proliferação, viabilidade e sobrevivência celular em sarcoma de Ewing. **Métodos:** as linhagens celulares de sarcoma de Ewing, SK-ES-1 e RD-ES, foram tratadas com NaB, ZA, doxorubicina, etoposídeo ou vincristina e com diferentes combinações destes agentes. O crescimento tumoral *in vitro*, incluindo parâmetros de proliferação e viabilidade celular, foi analisado pelos métodos de contagem celular por exclusão com azul de tripan e MTT. Os efeitos tardios (sobrevivência) também foram estudados através da determinação da formação de colônias (ensaio colonogênico). **Resultados:** a combinação de NaB e ZA teve um efeito citotóxico sinérgico 72h após o tratamento, persistindo durante 10-14 dias após o tratamento, em ambas as linhagens celulares testadas. Todas as combinações entre NaB ou ZA

e os antineoplásicos clássicos testados apresentaram efeitos citotóxicos sinérgicos 72h após os tratamentos em ambas linhagens celulares, com a exceção das seguintes associações: NaB + VCR e ZA + Doxo, que apresentaram apenas efeito aditivo nas células RD-ES, quando comparados com cada um dos agentes em monoterapia. Estes efeitos “agudos” observados em ambas as linhagens celulares de sarcoma de Ewing foram confirmados pelo ensaio clonogênico. **Conclusão:** os dados obtidos sugerem que o uso combinado de bifosfonatos e HDIs e a associação destes agentes com quimioterápicos clássicos representam promissoras alternativas no tratamento de sarcoma de Ewing e proporcionam a base para novos estudos.

PALAVRAS-CHAVE: sarcoma de Ewing, butirato sódico, ácido zoledrônico, terapia adjuvante, quimioterapia, efeito sinérgico.

Abstract

Background: Ewing sarcoma, often referred to as Ewing's sarcoma family tumors, is a peripheral primitive neuroectodermal tumor. Ewing sarcoma is the second most common solid bone and soft tissue malignancy of children and young adults. Despite significant advances in cancer chemotherapy, there is still need for increased rates of cure, reduction of toxicity of chemotherapy and reduced resistance to treatment in patients with this disease. Histone deacetylase inhibitors (HDACIs or HDIs) and bisphosphonates have a promising future in the treatment of cancer as targeted anticancer drugs, especially when used together or in combination with other cytotoxic agents. However, the effects of these combined treatments have not yet been properly evaluated in Ewing sarcoma. **Objective:** In the present study, we evaluated the *in vitro* cytotoxic effects (on cellular proliferation, viability, and survival) elicited by the co-treatment of sodium butyrate (NaB) and zoledronic acid (ZA) alone or in combination with three anti-cancer drugs strongly recommended to treat Ewing sarcoma (doxorubicin, etoposide and vincristine) in two human cell lines. **Methods:** two Ewing sarcoma cell lines, SK-ES-1 and RD-ES, were treated with NaB, ZA, doxorubicin, etoposide, vincristine and with different combinations of these drugs. The proliferation and cell viability were analyzed by counting cell in a hemocytometer, by exclusion of trypan blue and by MTT assay. The survival and proliferation of cells were also studied by clonogenic assay. **Results:** our results demonstrate that the combination of NaB and ZA has a synergistic cytotoxic effect at 72h after treatment, persisting for 10-14 days post-treatment, in both cell lines tested. All combinations between NaB or ZA and classical antineoplastic drugs demonstrated a synergistic cytotoxic effect at 72h post-treatment in SK-ES-1 and RD-ES cells, with the exception of NaB plus VCR, and ZA plus Doxo, which showed only an additive effect in RD-ES

cells when compared to each agent alone. These acute effects observed in both Ewing sarcoma cells were confirmed by the clonogenic assay. **Conclusion:** These data suggest that HDIs and bisphosphonate co-treatment in combination with classical chemotherapeutic drugs is a promising therapeutic venue the treatment of Ewing sarcoma, and provide a basis for further study in this field.

KEYWORDS: Ewing sarcoma, sodium butyrate, zoledronic acid, adjuvant therapy, chemotherapy, synergistic effect.

Lista de Tabelas

Tabela 1. Principais inibidores de histonas desacetilases estudados em câncer e outras doenças.....	32
---	----

Lista de Figuras

Figura 1.	Ilustração histopatológica de um sarcoma de Ewing típico.....	21
Figura 2.	Alvos e terapias em desenvolvimento pré-clínico e clínico em crianças e adolescentes com sarcoma de Ewing.....	28
Figura 3.	Acetilação e desacetilação de histonas.....	29
Figura 4.	Fórmula molecular do butirato sódico (NaB).....	35
Figura 5.	Remodelação óssea: processo de equilíbrio entre formação e reabsorção óssea, envolvendo osteoblastos e osteoclastos.....	37
Figura 6.	Osteoclastogênese: processo de diferenciação dos osteoclastos por intervenção direta dos osteoblastos através do sistema RANKL/RANK/OPG.....	39
Figura 7.	Fórmula molecular do ácido zoledrônico (ZA).....	40
Figura 8.	Mecanismo da inibição da reabsorção óssea osteoclástica pelos bifosfonatos	41
Figura 9.	Mecanismos de ação antitumoral dos bifosfonatos.....	42

Lista de Abreviaturas

BPs	Bifosfonatos
DMSO	Dimetilsulfóxido
Doxo	Doxorrubicina ou adriamicina
EFTs	Tumores da família de Ewing
ENCCA	Rede Europeia para Pesquisa do Câncer em Crianças e Adolescentes
ES	Sarcoma de Ewing
EUA	Estados Unidos da América
FISH	Hibridização em sítio fluorescente
FK-228	Depsipeptídeo
HATs	Histonas acetil transferases
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HDACi	Inibidores de histonas desacetilases
HDACIs	Inibidores de histonas desacetilases
HDACs	Histonas desacetilases
HDI	Inibidores de histonas desacetilases
IC₅₀	Concentração de cada agente necessária para inibir 50% do

crescimento celular

ICI/RS	Instituto do Câncer Infantil do Rio Grande do sul
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LBH-589	Panobinostat
M-CSF	Fator estimulador de colônias de macrófagos
MTT	Ensaio colorimétrico para avaliação da viabilidade celular, usando o corante tetrazólio: MTT (brometo de 3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio
NaB	Butirato sódico
N-BPs	Bifosfonatos nitrogenados
OPG	Osteoprotegerina
PPGCM	Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas
PPi	Pirofosfato
PPNET	Tumor neuroectodérmico primitivo periférico
PXD101	Belinostat
RCBP	Registro de câncer de base populacional
RP2D	Dose de fase II recomendada para adultos
RTPCR	Reação em cadeia da polimerase por transcriptase reversa

SAHA	Ácido hidroxâmico
SB939	Pracinostat
TRAIL	Ligante indutor de apoptose do fator de necrose tumoral
TSA	Tricostatina A
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
VCR	Vincristina
VP-16	Etoposídeo
VPA	Ácido valpróico
ZA	Ácido zoledrônico

Sumário

1 Introdução	18
2 Revisão da literatura	21
2.1 Sarcoma de Ewing.....	21
2.1.1 Aspectos gerais.....	21
2.1.2 Epidemiologia.....	23
2.1.3 Bases biológicas da doença.....	24
2.1.4 Prognóstico.....	26
2.1.5 Tratamento.....	27
2.1.6 Novas perspectivas.....	28
2.2 Histonas desacetilases e seus inibidores.....	29
2.2.1 Modulação epigenética.....	29
2.2.2 Histonas desacetilases (HDACs).....	31
2.2.3 Histonas desacetilases e câncer.....	31
2.2.4 Inibidores de histonas desacetilases e a terapia do câncer.....	32
2.2.5 HDACIs e tumores de Ewing.....	36
2.3 Metabolismo ósseo e bifosfonatos.....	38
2.3.1 Reabsorção óssea e osteoclastogênese.....	38
2.3.2 Bifosfonatos.....	40
2.3.3 Bifosfonatos e a terapia do câncer.....	42
2.3.4 Bifosfonatos e tumores de Ewing.....	44
2.4 O uso combinado de HDACIs e bifosfonatos em câncer.....	45

3	Objetivos.....	48
3.1	Objetivo principal.....	48
3.2	Objetivos secundários.....	48
4	Referências bibliográficas da revisão.....	50
5	ARTIGO EM INGLÊS.....	68
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	113
7	APÊNDICE.....	116
7.1	Artigo científico publicado na revista <i>Oncology Reports</i>	116

1 Introdução

O termo “sarcoma de Ewing” é usado para definir uma família de tumores pediátricos, que inclui o sarcoma de Ewing clássico, o tumor de Askin e outros tipos de tumores neuroectodérmicos primitivos. O sarcoma de Ewing é o segundo tipo mais comum de tumor ósseo e de tecidos moles em crianças ¹⁻⁴. Os tumores da família do sarcoma de Ewing apresentam uma alteração biológica comum, que consiste na translocação entre os cromossomos 11 e 22, que leva ao surgimento de oncogenes quiméricos formados pela fusão entre o gene EWS com um oncogene ETS ⁵. Este tumor está entre os mais agressivos tipos de câncer pediátricos, com alto potencial metastático e resistência aos tratamentos. Os tratamentos atuais consistem de quimioterapia neoadjuvante, ressecção cirúrgica local, com o salvamento do membro, seguida de quimioterapia adjuvante com ou sem radioterapia. A maioria dos regimes de quimioterapia são baseados em combinações de agentes alquilantes, principalmente ifosfamida e ciclofosfamida, com antraciclinas (como a doxorrubicina), com alcalóides da vinca (como a vincristina), com actinomicina D e com etoposídeo ⁶. Antes da era da quimioterapia, menos de 10% dos pacientes com sarcoma de Ewing sobreviviam ⁷. O uso atual de terapia multimodal agressiva melhorou as taxas de sobrevida a longo prazo de pacientes com doença localizada na maioria dos centros clínicos (50-70%). No entanto, pacientes com metástases clinicamente detectáveis no momento do diagnóstico, ou que não respondem à terapia, ou com recidiva da doença têm um prognóstico significativamente pior (~20%). Além disso, 30-40% dos doentes com sarcoma de Ewing apresentam recidiva da doença. Esses têm um prognóstico particularmente decepcionante, com uma probabilidade de sobrevivência de não

mais de 20%^{3,5,8}. Além disso, os agentes quimioterapêuticos clássicos são muitas vezes utilizados em doses elevadas, provocando vários efeitos adversos e toxicidade, incluindo neurotoxicidade (vincristina), alterações hematológicas (ifosfamida ou etoposídeo) ou cardiotoxicidade (doxorubicina)⁹⁻¹². Por estas razões, são necessários ainda esforços para a identificação e desenvolvimento de novas terapias⁶. Uma melhor compreensão da complexa biologia do sarcoma de Ewing, com a identificação e caracterização dos mecanismos moleculares e celulares que regulam seu crescimento, transformação e metástase, é necessária para a expansão do número de alvos terapêuticos conhecidos e o desenvolvimento de terapias-alvo inovadoras que permitam o aumento dos índices de cura e melhoria na qualidade de vida dos pacientes¹³⁻¹⁸.

O balanço entre acetilação e desacetilação de histonas é um importante fator na regulação da expressão gênica eucariótica. Inibidores de histona deacetilases (HDACs ou HDIs), tais como o butirato sódico (NaB), estão em evidência como uma potencial nova classe de agentes antineoplásicos, porque esses compostos são capazes de promover ou intensificar uma variedade de diferentes mecanismos anticancerígenos, como apoptose, parada do ciclo celular e diferenciação celular, e podem estimular a resposta imune e ter atividade antiangiogênica. Diversos HDIs estão atualmente em fase de ensaios clínicos, devido à sua capacidade para reverter alguns dos estados epigenéticos aberrantes associados ao câncer. A maioria destes estudos têm mostrado que a hiperacetilação de histonas pode ser conseguida de forma segura em seres humanos, e que o tratamento com tais agentes é plausível¹⁹⁻²¹. Além disso, a utilização de HDIs, isoladamente ou em associação com outros agentes, como fármacos antineoplásicos clássicos ou bifosfonatos, representa uma promissora alternativa de tratamento em câncer²¹⁻²⁴.

Os bifosfonatos (BPs) são bem conhecidos por seu efeito antirreabsortivo sobre o metabolismo ósseo, proporcionando um efeito redutor sobre a morbidade da metástase óssea de diferentes tipos de tumores, e também servindo como uma opção terapêutica primária para a hipercalcemia maligna. O zoledronato (ZA), o membro mais potente da família dos bifosfonatos nitrogenados (N-BPs), inibe a atividade de reabsorção osteoclástica através da inibição da farnesil-difosfato sintase e da prenilação de proteínas. No entanto, muito além do seu efeito sobre o metabolismo ósseo, os bifosfonatos também apresentam ações biológicas pleiotrópicas: podem mediar a liberação de fatores de crescimento, influenciar na adesão celular, ter efeitos antiangiogênicos e pró-apoptóticos em diversos tipos de tumores ²⁵. Estudos recentes, *in vitro* e *in vivo*, sugerem que os bifosfonatos apresentam atividade antitumoral, especialmente, quando associados a outros agentes citotóxicos, tais como aqueles utilizados na quimioterapia clássica ²⁶⁻²⁸.

HDIs e bifosfonatos têm um futuro promissor no tratamento de câncer, como terapias-alvo inovadoras, especialmente quando utilizados em conjunto ou em combinação com outras moléculas, tais como fármacos anticancerígenos clássicos. No entanto, em sarcoma de Ewing, os possíveis efeitos da co-administração de HDIs e bifosfonatos e da associação desses agentes com fármacos anticâncer clássicos ainda não foram devidamente investigados. O presente estudo propôs-se a avaliar, *in vitro*, os efeitos citotóxicos induzidos por NaB, por ZA e por combinações destes agentes, entre si, ou associados a fármacos clássicos usados no tratamento de sarcoma de Ewing (doxorrubicina, etoposídeo e vincristina), em duas linhagens de células humanas, SK-ES-1 e RD-ES.

2 Revisão da literatura

2.1 Sarcoma de Ewing

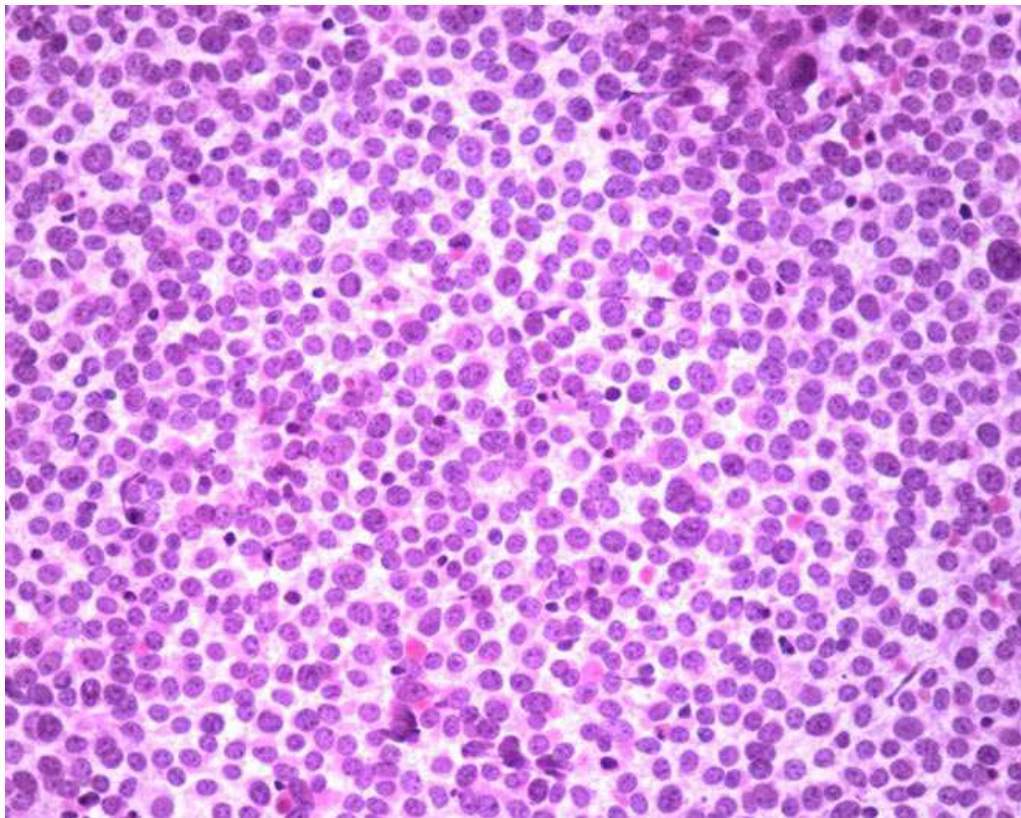
2.1.1 Aspectos gerais

Em 1921, James Ewing descreveu, pela primeira vez, um tumor que foi classificado como endotelioma difuso do osso, acreditando que o mesmo havia surgido a partir de vasos sanguíneos do tecido ósseo ^{2,3,29}. Mais tarde, ele descreveu a histopatologia, como células redondas, pequenas, com citoplasma pálido e com pequenos núcleos hiper cromáticos, caracterizando o tumor como um "mieloma endotelial". Hoje, os "tumores de Ewing" são descritos como células pequenas, azuis e com formato arredondado (Figura 1) e sua família compreende um espectro de neoplasias de células neuroectodérmicas primitivas, que são células embrionárias que migram da crista neural. Esses tumores acometem primariamente ossos e tecidos moles. Dependendo do grau de diferenciação neural, são denominados Sarcoma de Ewing (ES), quando é um tumor indiferenciado, ou Tumor Neuroectodérmico Primitivo Periférico (PPNET), quando apresenta características de diferenciação neural. PPNET na parede torácica é referido como tumor de Askin ^{2-4,29,30}.

Tumores da família do Ewing (EFTs) são neoplasias altamente agressivas (malignas). As causas desses tumores são praticamente desconhecidas e apesar dos avanços terapêuticos (com intervenção cirúrgica, quimio e raditerapia), os pacientes com essas doenças têm uma baixa taxa de sobrevida. A localização mais comum é nos ossos, sendo 80% Sarcoma de Ewing e 20% PPNET. Na família de Sarcoma de Ewing, os ossos longos e chatos são igualmente acometidos. Sarcoma

de Ewing e PNET podem ocorrer em quase todos os ossos do corpo, sendo que, em ordem de frequência, são observados em ossos pélvicos, seguidos de fêmur, tíbia e úmero. Estes tumores malignos são caracterizados por rápido crescimento e elevado potencial para desenvolvimento de metástases, principalmente nos pulmões, ossos e medula óssea^{3,4}.

Figura 1. Ilustração histopatológica de um sarcoma de Ewing típico.



Fonte: Sarcomaimages – The internet database of bone and soft tissue tumors, 2013. Disponível em: <http://www.sarcomaimages.com/index.php?v=Ewing's-Sarcoma> (acessado em 20 de outubro de 2013).

ES é muitas vezes subdiagnosticado. Um dos primeiros sintomas é a dor leve no local do tumor, mas, conforme o tumor cresce, a dor aumenta de intensidade e se faz necessária a terapia com analgésicos^{4,29}. A dor é frequentemente seguida pelo aparecimento de uma massa palpável, que pode estar sensível e inflamada. Na maioria das vezes, estes tumores surgem a partir dos ossos, e em alguns casos,

uma fratura patológica secundária a trauma menor pode ser o sinal típico que dá início a intervenção médica. Raramente, estes tumores surgem a partir de tecidos moles e, nestes casos, são rotulados como ES extraósseo ou extraesquelético. O Tumor Neuroectodérmico Primitivo Periférico da área tóracopulmonar é frequentemente denominado tumor de Askin. Dados de 18 estudos dos Estados Unidos da América (EUA), Europa e Japão, que incluíram 1505 pacientes, mostraram a seguinte distribuição: Sarcoma de Ewing do osso (87%), Sarcoma de Ewing extraósseo (8%), PPNET ósseo e extra-ósseo (5%)^{3,4,34}. Caso estes tumores sejam profundos, a massa tumoral pode ser indiscernível durante um longo período de tempo, resultando em maior volume do tumor no diagnóstico e, conseqüentemente, num pior prognóstico¹.

2.1.2 Epidemiologia

O sarcoma de Ewing é o segundo tipo mais comum de tumor ósseo e de tecidos moles em crianças¹⁻⁴. Caucasianos apresentam as maiores taxas de desenvolvimento de ES, enquanto asiáticos e afrodescendentes raramente desenvolvem a doença^{4,29}. O diagnóstico é mais frequente entre os 11 e os 20 anos (64%), seguido da faixa até os 10 anos (27%) e 9% entre os 21 e os 30 anos, sendo que o pico de idade de ocorrência é 15 anos. Cerca de 55% dos indivíduos afetados são do sexo masculino^{3,4}.

Nos EUA, ES afeta cerca de 250 a 400 pacientes a cada ano, sendo que 80% desses casos ocorrem antes dos 18 anos, com uma taxa de 0,3 casos por milhão de crianças menores de 3 anos de idade e de 4,6 casos por milhão de adolescentes com idade entre 15-19 anos. Internacionalmente, a média anual da taxa de incidência consiste em menos de 2 casos por milhão de crianças. No Reino Unido,

uma média de seis crianças por ano são diagnosticadas, principalmente os meninos em estágio inicial de puberdade ³¹⁻³³. No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) apresenta, entre seus últimos trabalhos, publicações que tratam direta ou indiretamente sobre câncer infantil. Em 2008, foi publicada a obra intitulada “Câncer da criança e adolescente no Brasil: dados dos registros de base populacional e de mortalidade” ³⁴. Essa obra, estabeleceu, entre outras coisas, a incidência por tipo de câncer, valor absoluto, taxas bruta e ajustada por idade, por 1.000.000 de crianças e adolescentes, para cada registro de câncer de base populacional (RCBP), no período de 1998 a 2002. Em relação ao RCBP de Porto Alegre, a incidência bruta de tumor de Ewing e sarcomas ósseos relacionados foi de 2,40; sendo que para meninas foi de 1,89 e, para meninos, de 2,92. Outra publicação relevante foi a “Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil”. Entretanto, essa obra, como a maioria das publicações brasileiras, avalia os tumores pediátricos conjuntamente, de modo a não dispormos de informações específicas em relação ao sarcoma de Ewing. Segundo esse estudo, o percentual mediano dos tumores pediátricos observados no nosso país encontrava-se próximo de 3% e que, em 2012, à exceção dos tumores da pele não melanoma, a estimativa de ocorrência seria de cerca de 11.530 casos novos de câncer em crianças e adolescentes até os 19 anos ³⁵.

2.1.3 Bases biológicas da doença

Desde a sua primeira descrição, os tumores da família de Ewing eram tidos como tumores malignos enigmáticos, pobremente diferenciados, de histogêneses incertas e comportamentos biológicos agressivos. Originalmente, se pensava que estes tumores fossem diferentes, mas atualmente são conhecidas características biológicas que indicam um mesmo tumor. A cerca de duas décadas, o entendimento da biologia de Sarcoma de Ewing deu um salto com a identificação de recorrentes

fusões gênicas, que impulsionam a oncogênese nesta doença. Estes tumores apresentam uma alteração biológica comum. Essa anormalidade citogenética consiste na translocação entre os cromossomos 11 e 22, que leva ao surgimento de oncogenes quiméricos formados pela fusão entre o gene EWS com um oncogene ETS (ou, menos comumente, consiste na translocação 21;22 ou 7;22). A fusão mais comum, encontrada em 85% dos casos, ocorre entre o segmento 5' do gene EWS e o segmento 3' do gene FLI-1, da família ETS, resultando na produção da proteína EWS-FLI1, a qual provavelmente age como ativador aberrante da transcrição gênica, provocando diversas alterações celulares relacionadas, por exemplo, ao surgimento da doença ^{5,37-40}. A alteração EWS-FLI1 facilita a formação de interações proteína-proteína que regulam a transcrição de inúmeros genes e o "splicing" alternativo de mRNA. Inúmeras funções biológicas são moduladas pela atividade de EWS-FLI1: ativação das vias de IGFR, PDGFR, VEGFR, SHH; inibição das vias de Wnt, TGF β RII; condução ao fenótipo maligno EW: proliferação, angiogênese, alterações no sistema imunológico, potencial metastático e resistência aos tratamentos ⁴¹.

O novo arranjo genômico específico pode ser detectado por hibridização *in situ* por imunofluorescência (FISH) e reação em cadeia de polimerase por transcriptase reversa (RTPCR). Sua característica antigênica comum é a expressão na superfície da célula de uma molécula de adesão, a glicoproteína MIC2, que pode ser detectada por um número de anticorpos monoclonais ³⁶.

Outro dado biologicamente relevante é o fato das células de sarcoma de Ewing apresentarem características de células-tronco mesenquimais ^{42,43}. Além disso, células-tronco tumorais, ou células iniciadoras de tumores, foram identificadas

em ES e podem estar relacionadas ao surgimento, progressão e resistência à quimioterapia^{42,44}.

2.1.4 Prognóstico

O principal fator prognóstico em ES é a presença ou ausência de doença metastática, e enquanto 80% dos pacientes têm doença clinicamente localizada, assume-se que metástases subclínicas estão presentes em praticamente todos os pacientes^{2,4}. A doença metastática torna-se evidente em apenas semanas ou meses em pacientes que não recebem tratamento adequado. Os sintomas, incluindo febre, mal estar, perda de peso e anemia, estão presentes em 10-20% dos pacientes e acredita-se que estão relacionados à citocinas circulantes, que são o resultado direto de um grande volume tumoral. Para pacientes com doença localizada, aqueles com lesões de extremidades tendem a ter um prognóstico melhor do que aqueles com lesões primárias axiais (como por exemplo, envolvendo costelas, clavícula, pélvis, coluna vertebral, do couro cabeludo, crânio, ou esterno), principalmente, porque estes últimos não podem ser removidos cirurgicamente com uma margem negativa adequada. Doença primária pélvica, idade superior a 12 anos e um nível sérico de desidrogenase láctica elevada são geralmente indicadores prognósticos desfavoráveis^{2,3}. Um elevado nível de desidrogenase láctica, aliado a um intervalo menor que três meses entre o início dos sintomas e o diagnóstico está exponencialmente relacionado à diminuição da sobrevida e pode ser um preditor de doença metastática².

De um modo geral, fatores prognósticos positivos incluem boa resposta clínica e patológica (>90% necrose tumoral) à quimioterapia. Entre os fatores que influenciam negativamente o prognóstico estão presença de metástases ao

diagnóstico, localização em ossos pélvicos, tumores grandes (>100 ml ou >8 cm em diâmetro) e idade superior a 17 anos ³⁶.

2.1.5 Tratamento

Antes da era da quimioterapia, a sobrevivência dos pacientes com ES era inferior a 10%, apesar da radiosensibilidade desses tumores fosse bem conhecida. Com a aplicação de regimes terapêuticos modernos multimodais, incluindo quimioterapia de indução e controle local com cirurgia, radioterapia ou uma combinação de ambas as modalidades, taxas de cura de aproximadamente 50-70% podem ser obtidas em pacientes com doença localizada. O prognóstico dos pacientes com metástases ao diagnóstico, no entanto, mantém-se inferior, indicando as limitações das estratégias atuais de tratamento. O tratamento com quimioterapia deve ser intenso e de longo prazo, sendo que a maioria dos protocolos são baseados na combinação de agentes alquilantes (ifosfamida, ciclofosfamida) e antraciclinas (doxorubicina), com adição de alcalóides da vinca (vincristina), actinomicina D e etoposídeo ⁴⁵⁻⁴⁷.

O maior problema em relação ao tratamento de ES são os pacientes com metástases clinicamente detectáveis no momento do diagnóstico, ou com recidiva (cerca de 30-40%) da doença ou que não respondem à terapia. Esses pacientes têm um prognóstico particularmente decepcionantes, com uma probabilidade de sobrevivência de não mais que 20% ^{3,5,8}.

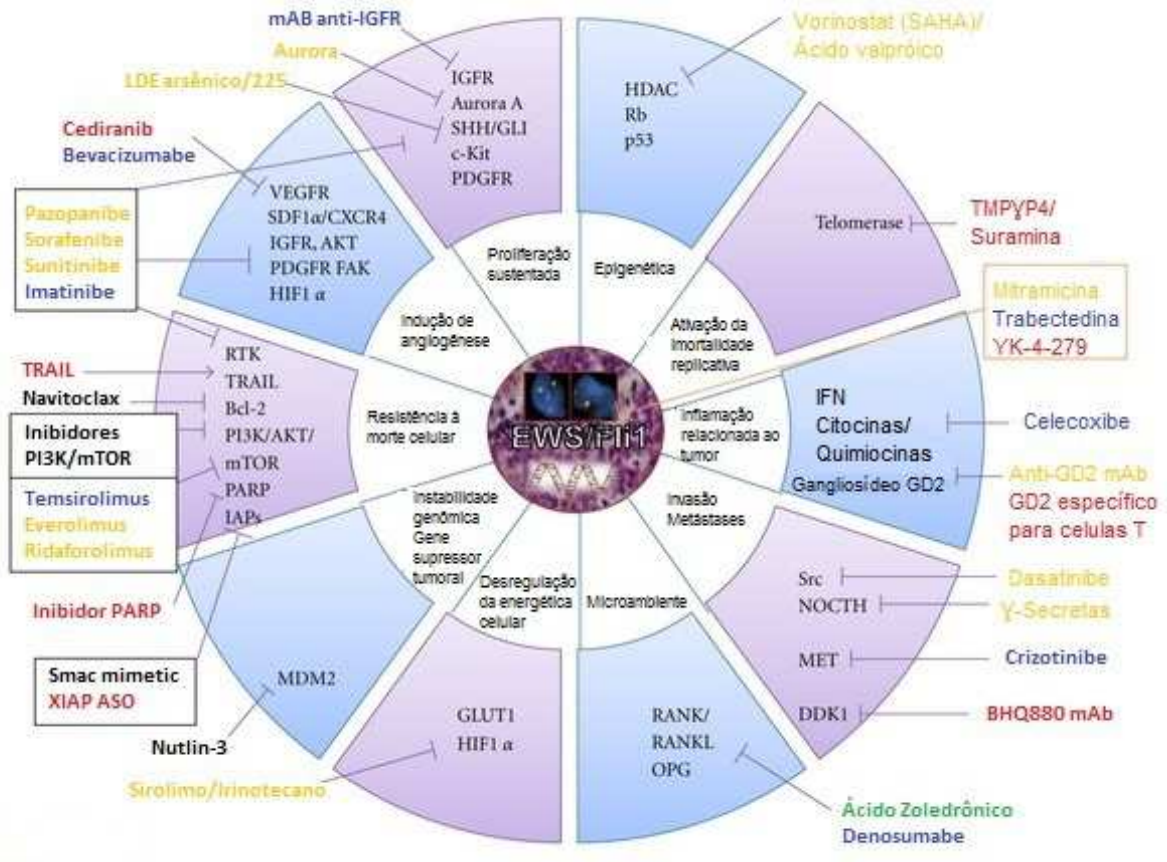
Outro fator que deve ser levado em consideração, uma vez que a quimioterapia deve ser intensa (doses elevadas) e a longo prazo, são os diversos efeitos secundários tóxicos, incluindo neurotoxicidade (vincristina), alterações hematológicas (ifosfamida ou etoposídeo) ou cardiotoxicidade (doxorubicina) que os

agentes quimioterapêuticos clássicos provocam nos pacientes, levando, muitas vezes, a suspensão do tratamento⁹⁻¹².

2.1.6 Novas perspectivas

Nos últimos anos, pesquisadores vêm tentando compreender melhor a complexa biologia do sarcoma de Ewing, a fim de propiciar o desenvolvimento de tratamentos inovadores. Diversas alternativas terapêuticas em potencial estão em fase de estudo, dentre as quais se destacam as terapias-alvo relacionadas: a redução da expressão de EWS-FLI1 com o emprego de oligonucleotídeos, RNA, ou siRNA; a inibição de vias de sinalização de fatores de crescimento, como a via *IGF-1R/PI3K/AKT/mTOR*; a utilização de inibidores de tirosinas quinase; o uso de inibidores multialvo, como imatinibe, desatinibe, sorafenibe, sunitinibe e pazopanibe; a inibição de crescimento celular dependente de reguladores do ciclo celular; o uso de moléculas pró-apoptóticas e de inibidores de moléculas anti-apoptóticas; a inibição de angiogênese; a inibição do fenótipo metastático; a modulação da resposta imune antitumoral; a modulação do microambiente ósseo, com emprego de agentes, como bifosfonatos e anticorpos monoclonais; a modulação epigenética, através do uso de HDACIs; entre outros^{48,49}. A figura abaixo, adaptada a partir de um recente artigo de revisão, representa os principais alvos e terapias-alvo para sarcoma de Ewing que estão sendo estudados (Figura 2)⁴⁸.

Figura 2. Alvos e terapias em desenvolvimento pré-clínico e clínico em crianças e adolescentes com sarcoma de Ewing.



Legenda: As diferentes cores indicam o desenvolvimento clínico atual dos agentes testados. (Vermelha) fase pré-clínica; (laranja) Fase I; (azul) Fase II; (verde) Fase III; (preta) Fase I ou II em adultos.

Fonte: adaptado de Gaspar et al., Sarcoma 2012. Original disponível em: <http://www.hindawi.com/journals/srcm/2012/301975/> (acessado em 27 de julho de 2013).

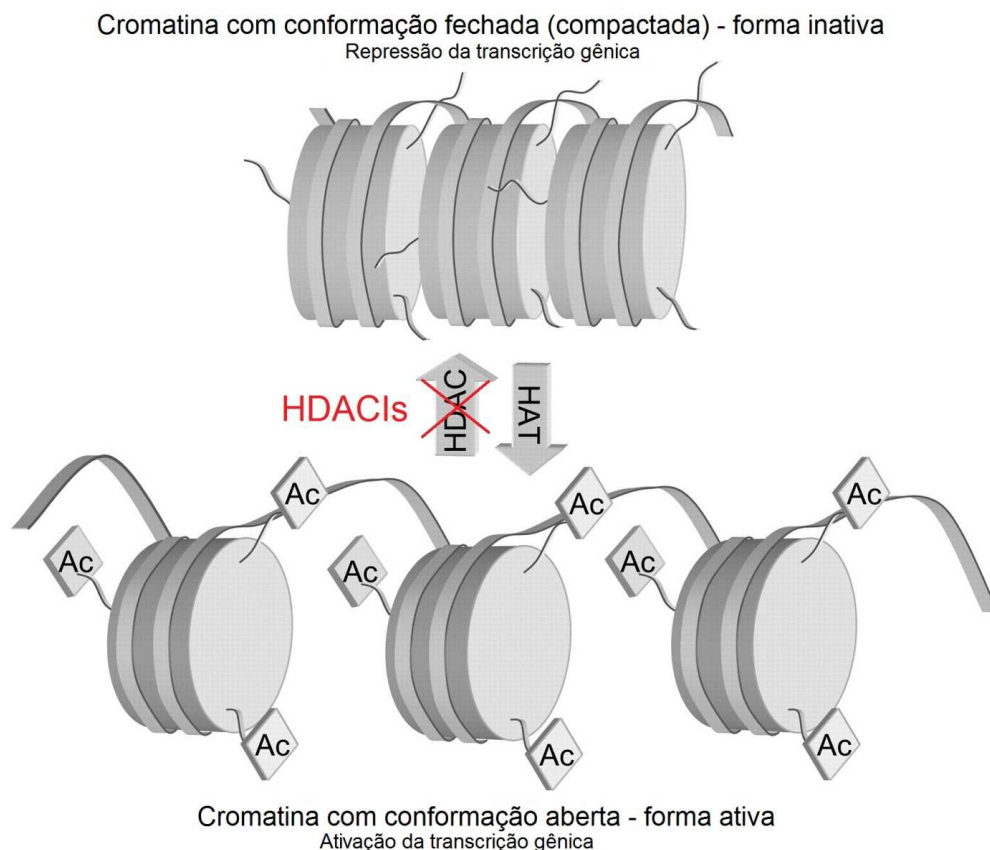
2.2 Histonas desacetilases e seus inibidores

2.2.1 Modulação epigenética

A organização da cromatina é crucial para a regulação da expressão gênica. Em particular, propriedades e posicionamento do nucleossomo influenciam na transcrição em resposta a sinais extra- ou intracelulares. A acetilação e desacetilação de histonas desempenham importante papel na regulação transcricional de células eucarióticas, e são catalisadas por famílias específicas de

enzimas, as histonas acetil transferases (HATs) e as histonas desacetilases (HDACs) respectivamente. HDACs são uma família de enzimas (presentes em bactérias, fungos, plantas e animais) que remove o resíduo acetil dos aminoácidos lisina presentes na extensão N-terminal do núcleo das histonas. Conseqüentemente, aumentam a carga positiva na porção N-terminal do núcleo das histonas, o que reforça a interação com a carga negativa do DNA e bloqueia o acesso da maquinaria transcricional ao DNA. A acetilação neutraliza as cargas das histonas, gerando uma conformação do DNA mais aberta (Figura 3) ^{19,50,51}.

Figura 3. Acetilação e desacetilação de histonas.



Nota: Acetilação e desacetilação de histonas catalisadas pelas enzimas histonas acetil transferases (HAT) e histonas desacetilases (HDAC), respectivamente. A acetilação neutraliza as cargas das histonas, gerando uma conformação do DNA mais aberta. Inibidores da desacetilação de histonas (HDACIs), impedem a desacetilação catalisadas pelas HDACs, promovendo a hiperacetilação de histonas.

Fonte: adaptado de Ho et al., J Nutr 2009. Original disponível em: <http://jn.nutrition.org/content/139/12/2393.long> (acessado em 22 de outubro de 2013).

2.2.2 Histonas desacetilases (HDACs)

Até o momento, ao menos 18 isoenzimas de HDACs foram identificadas nos seres humanos e mamíferos, sendo classificadas com base na sua homologia com proteínas de levedura. Onze dessas HDACs são enzimas dependentes de zinco: Classe I (HDACs 1, 2, 3 e 8) tem homologia com a levedura RPD3; classe IIa (HDACs 4, 5, 7 e 9) tem homologia com a levedura HDA1; classe IIb (HDACs 6 e 10) tem dois sítios catalíticos e classe IV (HDAC11) conservou resíduos compartilhados com ambas as classes I e II. HDACs de classe III incluem sirtuínas de 1 a 7, que tem homologia com a levedura Sir2 e tem uma exigência absoluta de NAD⁺. As isoformas da classe I são conhecidas por representarem um alvo para os novos inibidores de HDACs (HDIs ou HDACIs). A eficácia de alguns HDACIs foram correlacionadas com uma redução da atividade de HDACs de classe I ^{20,22}.

2.2.3 Histonas desacetilases e câncer

O balanço entre acetilação e desacetilação de histonas é um importante fator na regulação da expressão gênica e está, então, ligado ao controle do destino celular. A perturbação da atividade de HAT ou HDAC pode estar associada com o desenvolvimento de câncer, e nestes casos os processos moleculares envolvidos com a ativação ou repressão da transcrição são possíveis alvos para terapia anticâncer. Em câncer, HDACs foram avaliados pela primeira vez em leucemia promielocítica aguda. Desde então, o silenciamento ou inibição de HDAC tem mostrado ter um impacto no ciclo celular, crescimento celular, descondensação da cromatina, diferenciação celular, apoptose e angiogênese em diversos tipos de câncer ⁵⁰⁻⁵³.

Mutações estruturais em HDACs associadas ao câncer parecem ser raras, enquanto a expressão alterada e o recrutamento aberrante de diferentes HDACs têm sido relatados em muitos tumores humanos ⁵⁴⁻⁶⁸. A análise sistemática dos níveis de expressão de HDACs em linhagens celulares de câncer, assim como, em culturas primárias de células de câncer humanas e de várias amostras de biópsia de tumores humanos, frequentemente, encontra níveis mais elevados de expressão do que no tecido normal correspondente ^{59,65}. Vários estudos têm relatado uma ligação funcional entre HDACs classe I e o desenvolvimento de tumores sólidos malignos ⁶⁹⁻⁷⁴. Por outro lado, a correlação entre HDACs classe II e desenvolvimento de câncer tem sido relatada com menor frequência ²².

2.2.4 Inibidores de histonas desacetilases e a terapia do câncer

O desenvolvimento de inibidores de HDACs (HDIs, HDACIs ou HDACi) como fármacos anticancerígenos iniciou-se a partir de um simples produto químico, dimetilsulfóxido (DMSO). Uma vez que a inibição da atividade de HDACs reverte o silenciamento epigenético frequentemente observado em câncer, diversos compostos, naturais e sintéticos, passaram a ser desenvolvidos para fins terapêuticos (Tabela 1). Normalmente, HDACIs são classificados em grupos ou classes, incluindo ácidos graxos de cadeia curta (como ácido valpróico [VPA] e butirato sódico [NaB]), ácidos hidroxâmicos (como SAHA), Tricostatina A [TSA], Panobinostat [LBH-589], Belinostat [PXD101]), benzamidas (MS-275), peptídeos cíclicos (como trapoxin, apicidin e depsipeptídeo), cetonas eletrofílicas, moléculas híbridas, bem como uma variedade de outros compostos químicos ⁷⁵⁻⁸⁰.

Tabela 1. Principais inibidores de histonas desacetilases estudados em câncer e outras doenças.

Classe	Composto
Ácidos graxos de cadeia curta	Acido valpróico
	Butirato sódico (NaB)
Derivados do ácido hidroxâmico	Ácido hidroxâmico (SAHA)
	Tricostatina A (TSA)
	Panobinostat (LBH-589)
	Belinostat (PXD101)
Benzamidas	MS-275
	CI-994
Peptídeos cíclicos	Romidepsina ou depsipeptídeo (FK-228)
Cetonas eletrofílicas	Trapoxina B
Moléculas híbridas	CHAP31

Fonte: adaptado de Abujamra et al., Leuk Res 2010. Original disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0145212609004305> (acessado em 24 de outubro de 2013).

Inibidores de HDACs possuem graus variados de especificidade, embora o mecanismo molecular anticâncer de cada agente específico não esteja completamente claro. A criação de inibidores com maior especificidade permitirá que a função de cada agente seja melhor elucidada, além de melhorar a eficácia e

reduzir a toxicidade. A pesquisa atual na terapia do câncer está focada no desenho de fármacos que ajam especificamente contra alterações moleculares encontradas apenas nas células transformadas. O objetivo é associar um tipo específico de tumor com um determinado perfil de expressão gênica, definindo assim a alteração responsável por cada câncer^{20,50,75}.

HDACs são indutores potentes de apoptose de células tumorais que pode ser mediada pela regulação da função das histonas e, subsequentemente, da transcrição gênica, e/ou pela regulação da função ou da estabilidade das proteínas não-histonas. Embora a indução da apoptose parece ser o mecanismo predominante de morte celular mediada por HDIs, mecanismos de morte celular alternativos, tais como autofagia, podem ser estimulados quando proteínas ou vias apoptóticas estão desativadas. No entanto, os eventos moleculares necessários à autofagia mediada por HDIs ainda não são conhecidos. Dependendo do estímulo, a apoptose pode prosseguir através de duas vias funcionalmente distintas, pela via extrínseca (envolvendo receptores de morte) e pela via intrínseca (via mitocondrial). Embora as fases de iniciação das duas vias serem molecularmente separadas, um número de componentes a jusante, tais como a ativação de caspase-3, são compartilhados entre as duas vias e, portanto, as características bioquímicas e morfológicas da apoptose intrínseca e extrínseca (incluindo a exposição a fosfatidilserina, a ativação de caspase efetora e a fragmentação de DNA) são semelhantes. HDACs podem sensibilizar células tumorais aos agentes que danificam DNA através de um ou mais mecanismos. Em primeiro lugar, há uma visão relativamente simplista onde a reversão da condensação de cromatina seguida pela hiperacetilação de histonas de núcleo mediada por HDACs podem aumentar a acessibilidade de agentes danificadores de DNA aos seus respectivos alvos e,

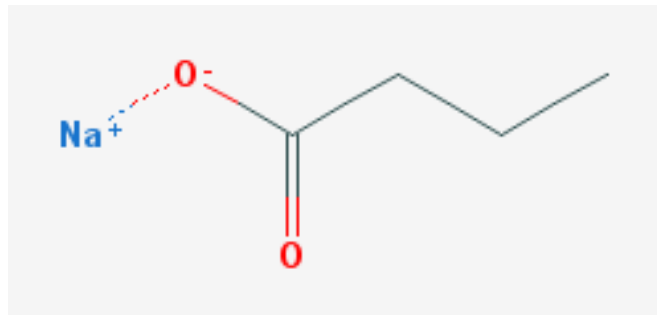
assim, melhorar os seus efeitos citotóxicos. Em segundo lugar, a remodelação da cromatina por HDIs pode induzir uma resposta que gere danos ao DNA que envolva a ativação da quinase danificadora de DNA, ATM, e pode permitir a formação de quebras no DNA ^{48,81-83}.

HDIs estão em evidência como uma potencial nova classe de agentes antineoplásicos. Isto se deve ao fato destas substâncias promoverem ou auxiliarem uma variedade de diferentes mecanismos anticâncer, como apoptose, parada do ciclo celular e diferenciação celular, além do que, as células normais são relativamente resistentes à morte celular induzida por esses agentes ^{84,85}. Ensaios clínicos recentes têm demonstrado que a hiperacetilação de histonas pode ser realizada com segurança em humanos, e que o tratamento com estes agentes é plausível ^{19-24,50,54,76}. Diversos HDIs, incluindo SAHA, depsipeptídeo, MS-275, TSA e butirato sódico, vêm sendo testados como fármacos anticâncer, sendo que os resultados mais promissores têm sido obtidos quando esses compostos são combinados a outros agentes. Efeitos sinérgicos no aumento da atividade antineoplásica de um grande número de fármacos quimioterápicos convencionais já foram relatados em diversos tipos de câncer ^{24,86-92}. Muitos estudos avaliando o uso de HDIs em câncer têm sido realizados nos últimos anos, e diversas novas patentes foram registradas ⁵⁰.

Os ácidos graxos de cadeia curta, como o butirato sódico (NaB) (Figura 4), tornaram-se tópico de pesquisa preferido em câncer, porque eles podem ser produzidos a partir da fermentação bacteriana de fibra dietética, e podem proteger contra câncer de cólon. Os compostos incluídos nesta classe são bem tolerados em pacientes, e estão atualmente sendo investigados em vários ensaios clínicos para vários tipos de cânceres. Os fármacos desta classe são facilmente metabolizados *in*

vivo, e as meia-vidas no plasma são mais curtas do que as das moléculas de outras classes de HDACIs. Por esse motivo, são necessárias doses elevadas para se obter adequado efeito terapêutico ⁹³⁻⁹⁹.

Figura 4. Fórmula molecular do butirato sódico (NaB).



Fonte: PubChem Compound, 2013. Disponível em: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=5222465> (acessado em 28 de outubro de 2013).

2.2.5 HDACIs e tumores de Ewing

Em células de ES, os efeitos de HDACIs começaram, recentemente, a ser avaliados. Um pequeno número de estudos relata informações referentes tanto à biologia tumoral quanto aos efeitos antitumorais propriamente ditos destes agentes. Sakimura et al. (2005) demonstraram que as funções anormais da oncoproteína EWS-FLI1 estão associadas tanto com a acetilação quanto com a desacetilação das histonas, sugerindo que HDACIs são promissoras terapias-alvo para EFTs ¹⁰⁰. Segundo Nakatami et al. (2003), a inibição de HDAC restaura a atividade de HAT, inibe o crescimento celular e induz a apoptose em Ewing ¹⁰¹. Outro estudo concluiu que HDACIs podem ser considerados como uma estratégia de tratamento para sarcoma de Ewing, quando utilizados em terapia única ou, principalmente, em combinação ⁸. Os mecanismos moleculares pelos quais esses agentes exercem efeitos antitumorais não são bem conhecidos em ES, assim como nos demais tipos de câncer. Em tumores da família do sarcoma de Ewing, alguns estudos avaliaram

os efeitos da acetilação pela proteína EWS-FLI1^{102,103}. Em células de ES, EWS-FLI1 reprime HAT e ativa HDAC. A inibição de HDAC restabelece a actividade de HAT, inibe o crescimento celular e induz a apoptose. O HDACI FK228 diminui a expressão de EWS-FLI1 e a proliferação de ES, e induz a apoptose dependente de TRAIL. Além disso, os inibidores de histona desacetilases inibem a proliferação e/ou sobrevivência tumoral e a reabsorção óssea associada a inflamação através da neutralização de NF-κB em osteoclastos. Este duplo efeito dos HDIs poderia conduzir a redução dos níveis de citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento no microambiente do tumor e, assim, participar na regressão do tumor^{48,81-83}.

Em relação à resistência à HDACIs, há um estudo relatando que a resistência adquirida ao HDACI, FK-228, é mediada pela glicoproteína P, por uma bomba de efluxo de drogas e pela via MAPK, e pode ser revertida com verapamil em ES¹⁰⁴.

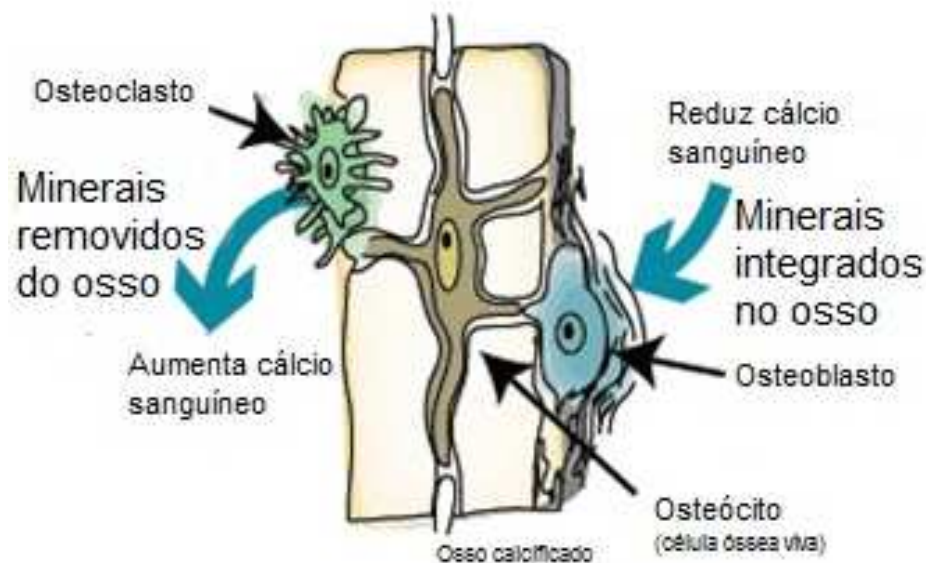
Um estudo clínico de fase I foi publicado recentemente ("IND203 a trial of the NCIC IND program/C17 pediatric phase I consortium"), avaliando a toxicidade e a farmacocinética, o qual determinou a dose de fase II recomendada para adultos (RP2D) do HDACI, pracinostat (SB939), em pacientes pediátricos com tumores sólidos refratários, incluindo ES. Este estudo concluiu que o Pracinostat é razoavelmente bem tolerado em crianças com tumores sólidos refratários e que a RP2D é 45 mg/m²¹⁰⁵.

2.3 Metabolismo ósseo e bifosfonatos

2.3.1 Reabsorção óssea e osteoclastogênese

O tecido ósseo é um tipo especializado de tecido conjuntivo formado por células e uma matriz extracelular calcificada, a matriz óssea. Os ossos funcionam como depósitos de cálcio, fosfato e outros íons, armazenando-os ou liberando-os de maneira controlada, para manter constante a concentração desses importantes íons nos líquidos corporais. A fim de manter a competência mecânica da matriz, o tecido ósseo sofre um processo contínuo de renovação que se prolonga durante toda a vida do indivíduo (Figura 5)^{104,106}.

Figura 5. Remodelação óssea: processo de equilíbrio entre formação e reabsorção óssea, envolvendo osteoblastos e osteoclastos.



Fonte: adaptado de Brown, Women to women 2013. Original disponível em: <http://www.womentowomen.com/bonehealth/natureofhealthybones.aspx> (acessado em 12 de outubro de 2013).

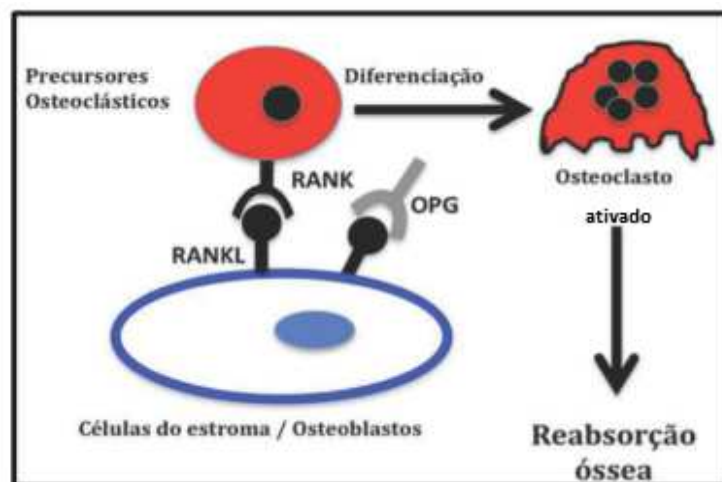
Este processo de renovação, ou remodelação óssea, envolve dois tipos de células: osteoclastos (reabsorvem a matriz calcificada, liberando cálcio para a corrente sanguínea – processo conhecido como reabsorção óssea) e osteoblastos

(sintetizam nova matriz óssea, removendo cálcio do sangue - processo conhecido como formação óssea) ^{104,106}.

O processo de formação, desenvolvimento e maturação dos osteoclastos, conhecido como osteoclastogênese (Figura 6), engloba múltiplas etapas. Para iniciar o seu processo de diferenciação, os osteoclastos necessitam da presença de células osteoblásticas (ou de células mesenquimatosas do estroma da medula óssea) capazes de produzir fatores de diferenciação e ativação, que incluem, entre outros, o fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF). Os osteoblastos expressam ainda (na sua superfície) outra proteína transmembranar conhecida como RANKL (ligante para o receptor de ativação do fator nuclear kappa B). Para que possa dar-se a ativação das células osteoclásticas é necessário que estas desenvolvam, entretanto, (também na sua superfície) um receptor transmembranar designado por RANK (receptor de ativação do fator nuclear kappa B). A interação do RANKL (presente na superfície dos osteoblastos) com o RANK (presente na superfície dos pré-osteoclastos) leva à maturação dos osteoclastos sendo um dos principais “motores de arranque” da osteoclastogênese. Os osteoblastos sintetizam ainda uma proteína, solúvel, a osteoprotegerina (OPG), com uma alta afinidade para o RANKL, impedindo ou bloqueando a ligação do RANKL ao seu receptor RANK (RANKL/RANK). Por esse mecanismo, a OPG regula a produção funcional dos osteoclastos, atuando localmente como um “bloqueio” à osteoclastogênese, reduzindo, assim, a reabsorção óssea. Em suma, o processo de diferenciação das células osteoclásticas está muito controlado pelas células osteoblásticas, através de um eixo de regulação comum, conhecido como RANKL/RANK/OPG. Assim, a presença de altos níveis de RANKL promove a osteoclastogênese, enquanto que uma maior expressão de OPG resulta numa diminuição deste processo, ou mesmo

na apoptose dos osteoclastos. O sistema de citocinas RANKL/RANK/OPG constitui no eixo fundamental na regulação da massa óssea. Com efeito, o equilíbrio entre formação e reabsorção óssea está na dependência das flutuações locais da razão RANKL/OPG ^{106,107}.

Figura 6. Osteoclastogênese: processo de diferenciação dos osteoclastos por intervenção direta dos osteoblastos através do sistema RANKL/RANK/OPG.



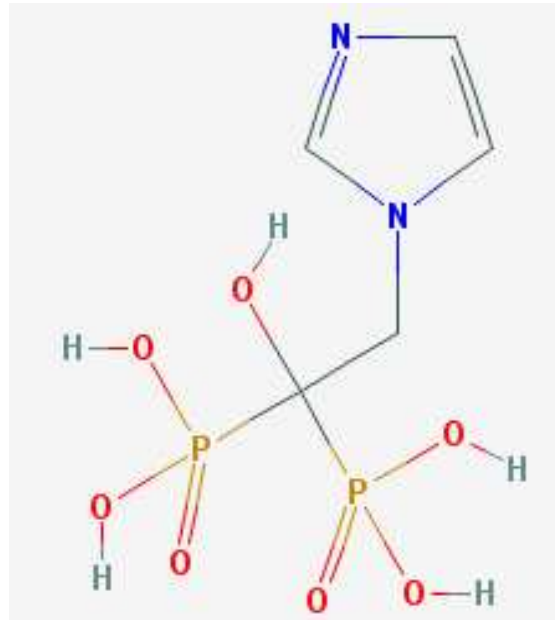
Fonte: adaptado de Judas et al., Universidade de Coimbra, 2012. Original disponível em: <http://rihuc.huc.min-saude.pt> (acessado em 14 de outubro de 2013).

2.3.2 Bifosfonatos

Bifosfonatos (BPs) são análogos sintéticos estáveis de pirofosfato (PPi). Ao contrário do PPi que tem uma estrutura central de P-O-P, BPs têm um átomo de carbono em ponte com os dois grupos de fosfato, dando uma estrutura central fundamental P-C-P que é essencial para a sua atividade biológica. A fração P-C-P é necessária para a ligação com o osso mineral e para a quelação de íons cálcio. BPs são comumente classificados em dois grupos, com base na estrutura química da cadeia lateral R2: os BPs não nitrogenados, como o etidronato e o clodronato; e os BPs nitrogenados (N-BPs), como o pamidronato, o alendronato e o ácido

zoledrônico (ZA). Os compostos nitrogenados são, significativamente, mais potentes do que os que não contêm este átomo ¹⁰⁸⁻¹¹⁰.

Figura 7. Fórmula molecular do ácido zoledrônico (ZA).



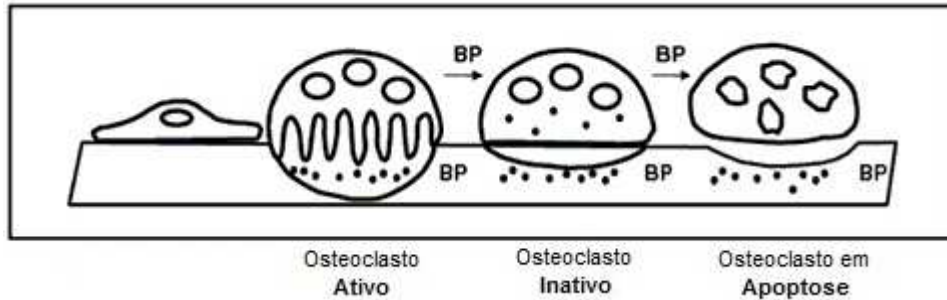
Fonte: PubChem Compound, 2013. Disponível em: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=68740> (acessado em 28 de outubro de 2013).

ZA, o mais potente membro da família dos bifosfonatos nitrogenados, pertencente à terceira geração dos BPs, caracterizado por um substituinte heterocíclico, tem uma elevada afinidade com cálcio e, por conseguinte, influe na mineralização óssea, onde parece ser internalizado seletivamente pelos osteoclastos, inibindo a reabsorção óssea exercida por essas células (Figura 8). Mais precisamente, inibe a reabsorção óssea osteoclástica através da inibição da farnesil difosfato sintase e da prenilação de proteínas através da via do mevalonato ¹¹¹⁻¹¹⁴.

Os BPs são usados extensivamente na prática clínica no tratamento de doenças com elevado catabolismo ósseo, especialmente osteoporose, doença de Paget, alguns distúrbios pediátricos esqueléticos (por exemplo, osteogênese

imperfeita, artrite reumatoide juvenil, e osteoporose idiopática juvenil), e doenças ósseas relacionadas a câncer^{115,116}.

Figura 8. Mecanismo da inibição da reabsorção óssea osteoclástica pelos bifosfonatos.



Nota: endocitose de BPs (aderidos aos ossos) pelos osteoclastos e consequente inibição da farnesil difosfato sintase e da prenilação de proteínas através da via do mevalonato, levando a apoptose destas células.

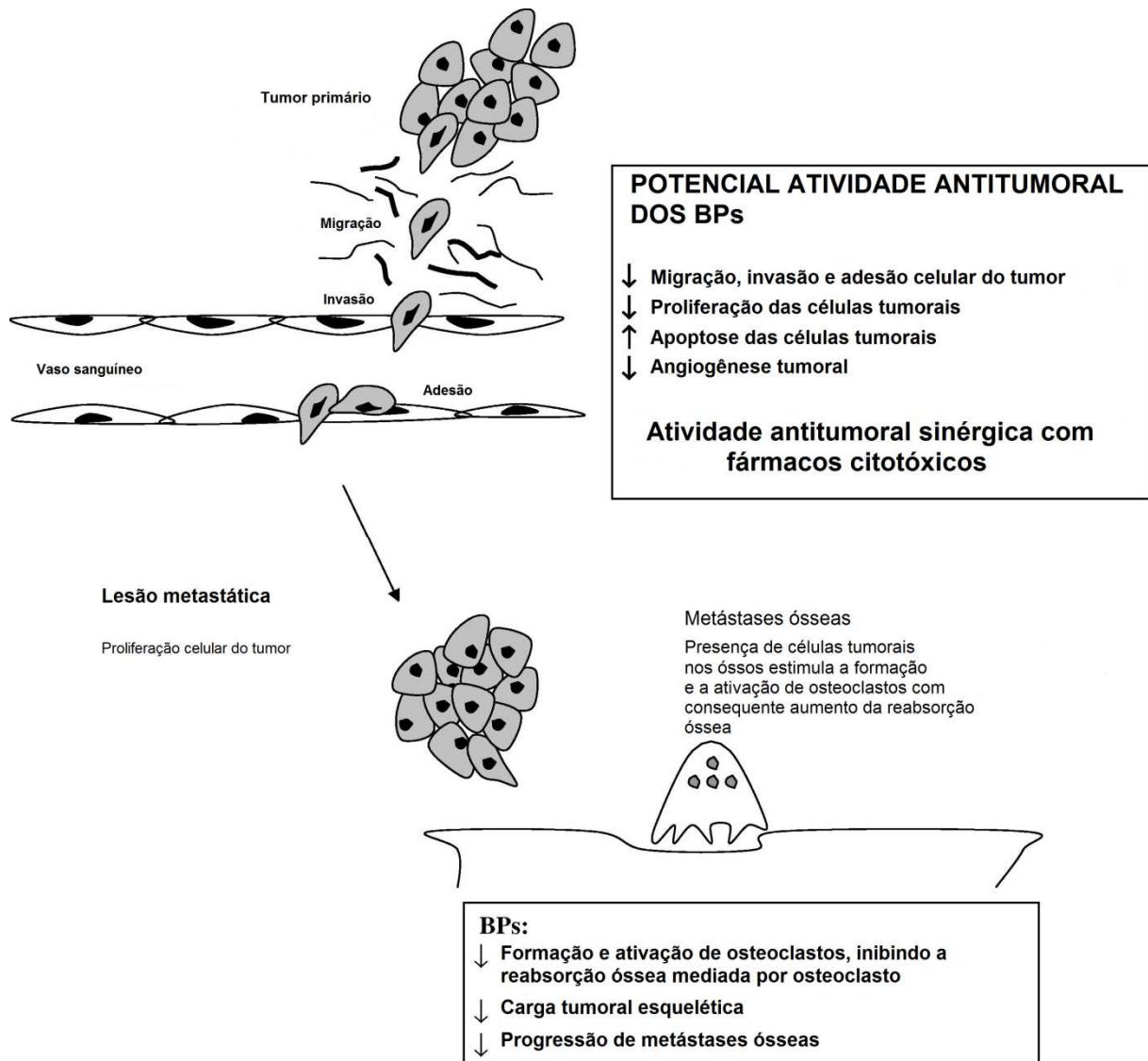
Fonte: adaptado de Rodan et al., Curr Med Res Opin 2004. Original disponível em: http://www.medscape.com/viewarticle/489616_2 (acessado em 25 de outubro de 2013).

2.3.3 Bifosfonatos e a terapia do câncer

Os bifosfonatos, em especial o ZA, são amplamente empregados no tratamento atual de neoplasias malignas com predileção para o envolvimento esquelético, sendo indicados para tratar metástases ósseas a partir de uma variedade de tumores sólidos e mieloma múltiplo¹¹⁷⁻¹²⁰.

Muito além do efeito sobre o metabolismo ósseo exercido pelos BPs, estudos revelaram que estes compostos também exercem ações biológicas pleiotrópicas com nítidos efeitos antitumorais: podem mediar liberação de fator de crescimento, interferir na adesão e invasão celular, exercer efeitos antiangiogênicos e podem induzir a apoptose em vários tipos de câncer (Figura 9)¹²¹⁻¹²³.

Figura 9. Mecanismos de ação antitumoral dos bifosfonatos.



Fonte: adaptado de Winter et al., Cancer Treat Rev 2008. Original disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0305737208000431> (acessado em 25 de outubro de 2013).

Os mecanismos envolvidos na atividade antitumoral continuam a ser investigados, mas propõe-se que BPs exerçam efeitos antitumorais diretos e indiretos. A síntese de colesterol, através da via do mevalonato, é essencial para todas as células nucleadas e, por conseguinte, qualquer tipo de célula, incluindo células tumorais (efeitos antitumorais diretos) e osteoclastos (efeitos antitumorais indiretos), que metabolizar N-BPs pode ser afetada. A apoptose de células tumorais

induzida por ZA esta associada com a libertação de citocromo C e ativação resultante da via da caspase. Isto pode ocorrer através da inibição da via do mevalonato e a consequente inibição da prenilação de sinalizadores essenciais da proteína G, tais como Ras, Rac e Rho. Como inibidores de reabsorção óssea, BPs reduzem a liberação de citocinas derivadas de osso e fatores de crescimento, essencialmente tornando o osso menos atraente para as células tumorais como um local para migração, colonização, adesão, invasão, proliferação e sobrevivência tumoral. Além disso, especialmente em tumores ósseos, BPs podem também exercer outros importantes efeitos antitumorais indiretos, uma vez que inibem a expressão de RANK e a migração de células progenitoras de osteoclastos durante a osteoclastogénese e aumentam a expressão de OPG ^{28,48,124-126}.

Uma recente publicação apresentou os resultados de um ensaio clínico prospectivo, avaliando a influência de ZA em tumores disseminados na medula óssea. Os autores concluíram que a terapia com bifosfonatos contribuiu para a erradicação de células tumorais disseminadas e influenciou positivamente na sobrevida dos pacientes ¹²⁷.

2.3.4 Bifosfonatos e tumores de Ewing

Uma vez que ES é caracterizado por uma reabsorção óssea acentuada, qualquer estratégia terapêutica que tenha como alvo os osteoclastos, tais como o uso de bifosfonatos, é promissora ^{2,4,128}. Potenciais efeitos antitumorais observados em osteossarcoma podem ser explicados por uma atividade direta sobre as células tumorais, por uma forte modulação do microambiente do tumor, ou por estimulação da resposta imune ¹²⁹⁻¹³³. No sarcoma de Ewing, bifosfonatos parecem exercer atividades semelhantes ^{27,28,134}. Os resultados obtidos por Zhou et al. (2005)

indicaram que o ácido zoledrônico pode proporcionar uma nova abordagem terapêutica no tratamento de doentes com sarcoma de Ewing, uma vez que ZA induziu a apoptose e inibiu o crescimento do tumor ósseo primário em ES através de um mecanismo que envolveu a supra-regulação da osteoprotegerina. Além disso, ZA teve um efeito sinérgico com o paclitaxel em uma linhagem celular de sarcoma de Ewing humano (TC71), tanto *in vitro* quanto em modelos animais ²⁸. Outro estudo concluiu que ZA representa uma nova estratégia terapêutica adjuvante para diminuir as doses das quimioterapias utilizadas no tratamento de pacientes com sarcoma de Ewing, uma vez associações entre ZA e ifosfamida tiveram efeitos antitumorais sinérgicos quando avaliados em modelo animal: esta combinação com um ciclo de ifosfamida resultou em um efeito inibitório semelhante a três ciclos de ifosfamida (quando empregada em monoterapia) ²⁷. Em relação a estudos clínicos, um trabalho do tipo Relato de caso “Case” foi publicado mostrando que o uso de um tratamento alternativo (associando ZA e quimioterapia clássica) foi eficaz em pacientes com sarcoma de Ewing recorrente ¹³⁵. Na Europa, o uso de ácido zoledrônico em combinação com quimioterapia de primeira linha está sendo testado em pacientes com ES localizado, em um estudo clínico randomizado de fase III (Ewing 2008 e Euro-EWING2012). Em modelos juvenis, ZA diminuiu o crescimento ósseo endocondral de forma reversível ^{48,128}.

2.4 O uso combinado de HDACIs e bifosfonatos em câncer

Assim como ocorre com os quimioterápicos clássicos, o uso de HDIs e bifosfonatos em monoterapia apresenta algumas limitações. Estudos sugerem que o uso clínico de alguns HDACIs (para tratar câncer e uma infinidade de outras doenças) pode ter efeitos indesejáveis sobre as populações de células ósseas ^{136,137}. Além disso, o crescimento ósseo endocondral pode ser transitoriamente perturbado

por altas doses de ZA, correspondentes ao tratamento de tumores pediátricos ósseos primários ¹²⁸. Não está claro se a administração concomitante de uma terapia osteogénica (por exemplo, bifosfonatos) pode atenuar a perda óssea induzida por HDACIs ¹³⁷. Por outro lado, possíveis efeitos esqueléticos indesejáveis provocados pelo uso de HDACIs (que estão sendo estudados em ensaios clínicos) podem ser considerados como efeitos colaterais aceitáveis pelos oncologistas e seus pacientes, devido aos efeitos benéficos que estas substâncias podem produzir em tumores alojados nos ossos ¹³⁶. O tratamento atual do câncer se baseia em poliquimioterapia, ou seja, no emprego de mais de um fármaco com diferentes mecanismos de ação, visando combater o tumor por diferentes “caminhos”, o que possibilita a obtenção de melhores resultados terapêuticos. Em relação ao uso de bifosfonatos e HDACIs, no tratamento de câncer, o panorama é semelhante: estudos recentes, *in vitro* e *in vivo*, sugerem fortemente que o sucesso terapêutico de bifosfonatos e HDACIs no tratamento de câncer está diretamente ligado a poliquimioterapia, ou seja, ao uso combinado com outros agentes citotóxicos, tais como quimioterápicos clássicos. O uso destas associações pode permitir também a diminuição das doses de cada agente empregado, de modo a reduzir complicações freqüentes e evitar a necessidade de redução de dose ou interrupção temporária do tratamento, como resultado de toxicidade ou resistência aos medicamentos tradicionais. Isso por si só já pode melhorar as chances de sucesso e a qualidade de vida dos pacientes ¹⁹⁻²⁸.

Entre os diferentes sarcomas infantis, sarcoma de Ewing parece especialmente adequado para o tratamento com o ácido zoledrónico (devido ao seu papel na modulação do microambiente ósseo) e com HDIs ⁴⁸. Embora algumas associações entre HDCAIs ou bifosfonatos com fármacos antineoplásicos clássicos

^{24,138,139} terem sido avaliadas em alguns tipos de câncer, muito pouco se sabe a respeito dos efeitos destas combinações em sarcoma de Ewing. Além disso, os efeitos do uso combinado de HDACIs e BPs permanecem praticamente desconhecidos em câncer¹⁴⁰ e, no nosso entendimento, ainda não foram avaliados em ES.

3 Objetivos

3.1 Objetivo principal

Avaliar, *in vitro*, os efeitos sobre a proliferação, viabilidade e sobrevivência celular do inibidor de histona desacetilase, butirato sódico (NaB), do bifosfonato, ácido zoledrônico (ZA), de diferentes combinações destas substâncias entre si e de associações das mesmas com antineoplásicos clássicos usados no tratamento atual de Sarcoma de Ewing.

3.2 Objetivos secundários

- 3.2.1 Padronizar condições de crescimento em cultura das células de sarcoma de Ewing, SK-ES-1 e RD-ES;
- 3.2.2 Determinar as curvas de crescimento celular das linhagens de sarcoma de Ewing, SK-ES-1 e RD-ES;
- 3.2.3 Determinar as curvas de dose dos fármacos antineoplásicos clássicos vincristina (VCR), etoposídeo (VP-16) e doxorubicina (Doxo), nas células SK-ES-1 e RD-ES;
- 3.2.4 Determinar as curvas de dose do butirato sódico (NaB) e do ácido zoledrônico (ZA), nas células SK-ES-1 e RD-ES;
- 3.2.5 Calcular o IC_{50} para cada agente testado, nas células SK-ES-1 e RD-ES;
- 3.2.6 Avaliar os efeitos de NaB, de ZA e dos antineoplásicos clássicos sobre a proliferação e a viabilidade das células SK-ES-1 e RD-ES;
- 3.2.7 Avaliar os efeitos de diferentes combinações entre NaB, ZA e antineoplásicos clássicos (VCR, VP-16 e Doxo) sobre a proliferação e

a viabilidade celular, nas linhagens SK-ES-1 e RD-ES;

3.2.8 Avaliar os efeitos de NaB, de ZA e dos antineoplásicos clássicos sobre a sobrevivência celular, nas linhagens SK-ES-1 e RD-ES;

3.2.9 Avaliar os efeitos de diferentes combinações entre NaB, ZA e antineoplásicos clássicos (VCR, VP-16 e Doxo) sobre a sobrevivência celular, nas linhagens SK-ES-1 e RD-ES.

4 Referências bibliográficas da revisão

1. Ricchetti ET, Erol B, Stern J, Russo P, States L, Dormans JP. Lower back pain and mass in a 13-year-old girl. *Clin Orthop Relat Res* 2005;430:248-257.
2. Carvajal R, Meyers P. Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal family of tumors. *Hematol Oncol Clin North Am* 2005;19:501-525.
3. Karosas AO. Ewing's sarcoma. *Am J Health Syst Pharm* 2010;67:1599-1605.
4. Iwamoto Y. Diagnosis and treatment of Ewing's sarcoma. *Jpn J Clin Oncol* 2007;37:79-89.
5. Riggi N, Stamenkovic I. The Biology of Ewing sarcoma. *Cancer Lett* 2007;254:1-10.
6. Jürgens H, Dirksen U. Ewing sarcoma treatment. *Eur J Cancer* 2011;47:366-367.
7. Bernstein M, Kovar H, Paulussen M, Randall RL, Schuck A, Teot LA, et al. Ewing's sarcoma family of tumors: current management. *Oncologist* 2006;11:503–519.
8. Sonnemann J, Dreyer L, Hartwig M, Palani CD, Hong le TT, Klier U, et al. Histone deacetylase inhibitors induce cell death and enhance the apoptosis-inducing activity of TRAIL in Ewing's sarcoma cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 2007;133:847-858.
9. Johnson IS, Armstrong JG, Gorman M, Burnett JP. The vinca alkaloids: a new class of oncolytic agents. *Cancer Res* 1963;23:1390–1427.
10. Zalupski M, Baker LH. Ifosfamida. *J Natl Cancer Inst* 1988;80:556–566.
11. Hande KR. Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitors. *Eur J Cancer* 1998;34:1514–1521.

12. Schimmel KJ, Richel DJ, Van Den Brink RB, Guchelaar HJ. Cardiotoxicity of cytotoxic drugs. *Cancer Treat Rev* 2004;30:181–191.
13. Casas-Ganem J, Healey JH. Elucidation of the molecular mechanisms of malignant bone tumors: refining diagnosis and identifying novel targets for treatment. *J Nati Compr Canc Netw* 2005;3:142-146.
14. Davis S, Mesltzer PS. Ewing's sarcoma: General insights from a rare model. *Cancer Cell* 2006;9:331-332.
15. Leavey PJ, Collier AB. Ewing sarcoma: prognostic criteria, outcomes and future treatment. *Expert Rev Anticancer Ther* 2008;8:617-624.
16. Ludwig JA. Ewing sarcoma: historical perspectives, current state-of-the-art, and opportunities for targeted therapy in the future. *Curr Opin Oncol* 2008;20:412-418.
17. Maheshwari AV, Cheng EY. Ewing sarcoma family of tumors. *J Am Acad Orthop Surg* 2010;18:94-107.
18. Seddon BM, Whelan JS. Emerging chemotherapeutic strategies and the role of treatment stratification in Ewing sarcoma. *Paediatr Drugs* 2008;10:93-105.
19. Abujamra AL, Dos Santos MP, Roesler R, Schwartzmann G, Brunetto AL. Histone deacetylase inhibitors: a new perspective for the treatment of leukemia. *Leuk Res* 2010;34:687-695.
20. Marks PA. Histone deacetylase inhibitors: a chemical genetics approach to understanding cellular functions. *Biochim Biophys Acta* 2010;1799:717-725.

21. Marks PA. The clinical development of histone deacetylase inhibitors as targeted anticancer drugs. *Expert Opin Investig Drugs* 2010;19:1049-1066.
22. Hoshino I, Matsubara H. Recent advances in histone deacetylase targeted cancer therapy. *Surg Today* 2010;40:809-815.
23. Pili R, Salumbides B, Zhao M, Altiok S, Qian D, Zwiebel J, et al. Phase I study of the histone deacetylase inhibitor entinostat in combination with 13-cis retinoic acid in patients with solid tumours. *Br J Cancer* 2012;106:77-84.
24. dos Santos MP, Schwartzmann G, Roesler R, Brunetto AL, Abujamra AL. Sodium butyrate enhances the cytotoxic effect of antineoplastic drugs in human lymphoblastic T-cells. *Leuk Res* 2009;33:218-221.
25. Clézardin P. Bisphosphonates' antitumor activity: an unravelled side of a multifaceted drug class. *Bone* 2011;48:71-79.
26. Stresing V, Daubiné F, Benzaid I, Mönkkönen H, Clézardin P. Bisphosphonates in cancer therapy. *Cancer Lett* 2007;257:16-35.
27. Odri GA, Dumoucel S, Picarda G, Battaglia S, Lamoureux F, Corradini N, et al. Zoledronic acid as a new adjuvant therapeutic strategy for Ewing's sarcoma patients. *Cancer Res* 2010;70:7610-7619.
28. Zhou Z, Guan H, Duan X, Kleinerman ES. Zoledronic acid inhibits primary bone tumor growth in Ewing sarcoma. *Cancer* 2005;104:1713-1720.
29. Bernstein M, Heinrich K, Paulussen M et al. Ewing sarcoma family of tumors: Ewing sarcoma of bone and soft tissue and the peripheral primitive neuroectodermal

tumors. In: Pizzo PA, Poplack DG, eds. Principles and practice of pediatric oncology, 5th ed. Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins;2005:1002-1032.

30. Kretschmar CS. Ewing's sarcoma and the "peanut" tumors. N Engl J Med 1994;331:325-327.

31. Maki RG. Pediatric sarcomas occurring in adults. J Surg Oncol 2008;97:360-8.

32. Goldman L, Schafer AI. Goldman's Cecil Medicine. 24. ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2012.

33. Strauss LG. Ewing Sarcoma Imaging. New York: Medscape; 2013. eMedicine article n°389464.

34. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. Câncer da criança e adolescente no Brasil: dados dos registros de base populacional e de mortalidade. Rio de Janeiro: INCA; 2008.

35. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2011.

36. Instituto Nacional de Câncer [homepage na internet]. Tumores de Ewing [acesso em 21 jun 2013]. Disponível em: http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/tumores_ewing.

37. Balamuth NJ, Womer RB. Ewing's sarcoma. Lancet Oncol 2010;11:184-192.

38. Kovar H. Progress in the molecular biology of ewing tumors. Sarcoma 1998;2:3-17.

39. Kauer M, Ban J, Kofler R, Walker B, Davis S, Meltzer P, et al. A molecular function map of Ewing's sarcoma. *PLoS One* 2009;4(4):e5415.
40. Jedlicka P. Ewing Sarcoma, an enigmatic malignancy of likely progenitor cell origin, driven by transcription factor oncogenic fusions. *Int J Clin Exp Pathol* 2010;3(4):338-347.
41. Erkizan HV, Uversky VN, Toretsky JA. Oncogenic partnerships: EWS-FLI1 protein interactions initiate key pathways of Ewing's sarcoma. *Clin Cancer Res* 2010;16(16):4077–4083.
42. Riggi N, Suvà ML, De Vito C, Provero P, Stehle JC, Baumer K, et al. EWS-FLI-1 modulates miRNA145 and SOX2 expression to initiate mesenchymal stem cell reprogramming toward Ewing sarcoma cancer stem cells. *Genes Dev* 2010;24(9):916-932.
43. Tirode F, Laud-Duval K, Prieur A, Delorme B, Charbord P, Delattre O. Mesenchymal stem cell features of Ewing tumors. *Cancer Cell* 2007;11(5): 421-429.
44. Jiang X, Gwee Y, Russell D, Cao C, Douglas D, Hung L, et al. CD133 expression in chemo-resistant Ewing sarcoma cells. *BMC Cancer* 2010;10:116.
45. Paulussen M, Craft AW, Lewis I, Hackshaw A, Douglas C, Dunst J, et al. Results of the EICESS-92 study: Two randomized trials of Ewing's sarcoma treatment – Cyclophosphamide compared with ifosfamide in standard-risk patients and assessment of benefit of etoposide added to standard treatment in high-risk patients. *J Clin Oncol* 2008;26(27):4385–4393.

46. Granowetter L, Womer R, Devidas M, Krailo M, Wang C, Bernstein M, et al. Dose-intensified compared with standard chemotherapy for nonmetastatic Ewing sarcoma family of tumors: a Children's Oncology Group Study. *J Clin Oncol* 2009;27(15):2536–2541.
47. Ferrari S, Sundby Hall K, Luksch R, Tienghi A, Wiebe T, Fagioli F, et al. Nonmetastatic Ewing family tumors: high-dose chemotherapy with stem cell rescue in poor responder patients. Results of the Italian Sarcoma Group/Scandinavian Sarcoma Group III protocol. *Ann Oncol* 2011;22(5):1221–1227.
48. Gaspar N, Di Giannatale A, Georger B, Redini F, Corradini N, Enz-Werle N, et al. Bone sarcomas: from biology to targeted therapies. *Sarcoma* 2012;2012:301975.
49. Kovar H, Alonso J, Aman P, Aryee DN, Ban J, Burchill SA, et al. The first European interdisciplinary ewing sarcoma research summit. *Front Oncol* 2012;2:54.
50. Paris M, Porcelloni M, Binaschi M, Fattori D. Histone deacetylase inhibitors: from bench to clinic. *J Med Chem* 2008;51(6):1505–1529.
51. Kouraklis G, Theocharis S. Histone deacetylase inhibitors and anticancer therapy. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 2002;2:477–484.
52. Timmerman S, Lehrmann H, Popesskaya A, Harel-Bellan A. Histone acetylation and disease. *Cell Mol Life Sci* 2001;58:728–736.
53. Warrell Jr RP, He L, Richon V, Calleja E, Pandolfi P. Therapeutic targeting of transcription in acute promyelocytic leukemia by use of an inhibitor of histone deacetylase. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:1621–1625.

54. Marks PA, Xu WS. Histone deacetylase inhibitors: potential in cancer therapy. *J Cell Biochem* 2009;107(4):600-608.
55. Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* 2008;358(11):1148–1159.
56. Ellis L, Atadja PW, Johnstone RW. Epigenetics in cancer: targeting chromatin modifications. *Mol Cancer Ther* 2009;8(6):1409–1420.
57. Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell* 2007;128(4):683–692.
58. Ma X, Ezzeldin HH, Diasio RB. Histone deacetylase inhibitors: current status and overview of recent clinical trials. *Drugs* 2009;69(14):1911–1934.
59. Nakagawa M, Oda Y, Eguchi T, Aishima S, Yao T, Hosoi F, et al. Expression profile of class I histone deacetylases in human cancer tissues. *Oncol Rep* 2007;18(4):769–774
60. Zhang Z, Yamashita H, Toyama T, Sugiura H, Ando Y, Mita K, et al. Quantitation of HDAC1 mRNA expression in invasive carcinoma of the breast*. *Breast Cancer Res Treat* 2005;94(1):11–16.
61. Ayton PM, Cleary ML. Molecular mechanisms of leukemogenesis mediated by MLL fusion proteins. *Oncogene* 2001;20(40):5695–5707.
62. Lin RJ, Sternsdorf T, Tini M, Evans RM. Transcriptional regulation in acute promyelocytic leukemia. *Oncogene* 2001;20(49):7204–7215.
63. Marquard L, Poulsen CB, Gjerdrum LM, de Nully Brown P, Christensen IJ, Jensen PB, et al. Histone deacetylase 1, 2, 6 and acetylated histone H4 in B- and T-cell lymphomas. *Histopathology* 2009;54(6):688–698.

64. Chang HH, Chiang CP, Hung HC, Lin CY, Deng YT, Kuo MY. Histone deacetylase 2 expression predicts poorer prognosis in oral cancer patients. *Oral Oncol* 2009;45(7):610–614.
65. Weichert W. HDAC expression and clinical prognosis in human malignancies. *Cancer Lett* 2009;280(2):168–176.
66. Gloghini A, Buglio D, Khaskhely NM, Georgakis G, Orlowski RZ, Neelapu SS, et al. Expression of histone deacetylases in lymphoma: implication for the development of selective inhibitors. *Br J Haematol* 2009;147(4):515–525.
67. Oehme I, Deubzer HE, Lodrini M, Milde T, Witt O. Targeting of HDAC8 and investigational inhibitors in neuroblastoma. *Expert Opin Investig Drugs* 2009;18(11):1605–1617.
68. Dokmanovic M, Clarke C, Marks PA. Histone deacetylase inhibitors: overview and perspectives. *Mol Cancer Res* 2007;5(10):981–989.
69. Wilson AJ, Byun DS, Popova N, Murray LB, L'Italien K, Sowa Y, et al. Histone deacetylase 3 (HDAC3) and other class I HDACs regulate colon cell maturation and p21 expression and are deregulated in human colon cancer. *J Biol Chem* 2006; 281:13548–13558.
70. Nakagawa M, Oda Y, Eguchi T, Aishima S, Yao T, Hosoi F, et al. Expression profile of class I histone deacetylases in human cancer tissues. *Oncol Rep* 2007;18:769–774.

71. Ishihama K, Yamakawa M, Semba S, Takeda H, Kawata S, Kimura S, et al. Expression of HDAC1 and CBP/p300 in human colorectal carcinomas. *J Clin Pathol* 2007;60:1205–1210.
72. Zhu P, Martin E, Mengwasser J, Schlag P, Janssen KP, Gottlicher M. Induction of HDAC2 expression upon loss of APC in colorectal tumorigenesis. *Cancer Cell* 2004;5:455–463.
73. Krusche CA, Vloet AJ, Classen-Linke I, von Rango U, Beier HM, Alfer J. Class I histone deacetylase expression in the human cyclic endometrium and endometrial adenocarcinomas. *Hum Reprod* 2007;22(11):2956–2966.
74. Weichert W, Röske A, Gekeler V, Beckers T, Ebert MP, Pross M, et al. Association of patterns of class I histone deacetylase expression with patient prognosis in gastric cancer: a retrospective analysis. *Lancet Oncol* 2008;9(2):139–148.
75. Carew JS, Giles FJ, Nawrocki ST. Histone deacetylase inhibitors: mechanisms of cell death and promise in combination cancer therapy. *Cancer Lett* 2008;269(1):7–17.
76. Kouraklis G, Theocharis S. Histone deacetylase inhibitors: a novel target of anticancer therapy (review). *Oncol Rep* 2006;15:489–494.
77. Bouchain G, Leit S, Frechette S, Khalil EA, Lavoie R, Moradei O, et al. Development of potential antitumor agents. Synthesis and biological evaluation of a new set of sulfonamide derivatives as histone deacetylase inhibitors. *J Med Chem* 2003;46(5):820–830.

78. Piekarz R, Bates S. A review of depsipeptide and other histone deacetylase inhibitors in clinical trials. *Curr Pharm Des* 2004;10:2289–2298.
79. Van Ommeslaeghe KEG, Brex V, Papeleu P, Iterbeke K, Geerlings P, Tourwe D, et al. Amide analogues of TSA: synthesis, binding mode analysis and HDAC inhibition. *Bioorg Med Chem Lett* 2003;13:1861–1864.
80. Jeong MR, Hashimoto R, Senatorov VV, Fujimaki K, Ren M, Lee MS, et al. Valproic acid, a mood stabilizer and anticonvulsant, protects rat cerebral cortical neurons from spontaneous cell death: a role of histone deacetylase inhibition. *FEBS Lett* 2003;542:74–78.
81. Frew AJ, Johnstone RW, Bolden JE. Enhancing the apoptotic and therapeutic effects of HDAC inhibitors. *Cancer Lett* 2009;280:125-133.
82. Blanchard F, Chipoy C. Histone deacetylase inhibitors: new drugs for the treatment of inflammatory diseases? *Drug Discov Today* 2005;10:197-204.
83. Minucci S, Pelicci PG. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nat Rev Cancer* 2006;6:38-51.
84. Ruefli AA, Ausserlechner MJ, Bernhard D, Sutton VR, Tainton KM, Kofler R, et al. The histone deacetylase inhibitor and chemotherapeutic agent suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) induces a cell-death pathway characterized by cleavage of Bid and production of reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(19):10833–10838.

85. Ungerstedt JS, Sowa Y, Xu WS, Shao Y, Dokmanovic M, Perez G, et al. Role of thioredoxin in the response of normal and transformed cells to histone deacetylase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(3): 673–678.
86. Arnold NB, Arkus N, Gunn J, Korc M. The histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid induces growth inhibition and enhances gemcitabine-induced cell death in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2007;13:18–26.
87. Dowdy SC, Jiang S, Zhou XC, Hou X, Jin F, Podratz KC, et al. Histone deacetylase inhibitors and paclitaxel cause synergistic effects on apoptosis and microtubule stabilization in papillary serous endometrial cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2006;5:2767–2776.
88. Fuino L, Bali P, Wittmann S, Donapaty S, Guo F, Yamaguchi H, et al. Histone deacetylase inhibitor LAQ824 down-regulates Her-2 and sensitizes human breast cancer cells to trastuzumab, taxotere, gemcitabine, and epothilone B. *Mol Cancer Ther* 2003;2:971–984.
89. Kim MS, Blake M, Baek JH, Kohlhagen G, Pommier Y, Carrier F. Inhibition of histone deacetylase increases cytotoxicity to anticancer drugs targeting DNA. *Cancer Res* 2003;63:7291–7300.
90. Rikiishi H, Shinohara F, Sato T, Sato Y, Suzuki M, Echigo S. Chemosensitization of oral squamous cell carcinoma cells to cisplatin by histone deacetylase inhibitor, suberoylanilide hydroxamic acid. *Int J Oncol* 2007;30:1181–1188.
91. Bolden JE, Peart MJ, Johnstone RW. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* 2006;5:769–784.

92. Glaser KB. HDAC inhibitors: clinical update and mechanism-based potential. *Biochem Pharmacol* 2007;74:659–671.
93. Archer SY, Meng S, Shei A, Hodin RA. p21(WAF1) is required for butyrate-mediated growth inhibition of human colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(12):6791–6796.
94. Conley BA, Egorin MJ, Tait N, Rosen DM, Sausville EA, Dover G, et al. Phase I study of the orally administered butyrate prodrug, tributyrin, in patients with solid tumors. *Clin Cancer Res* 1998;4(3):629–634.
95. Edelman MJ, Bauer K, Khanwani S, Tait N, Trepel J, Karp J, et al. Clinical and pharmacologic study of tributyrin: an oral butyrate prodrug. *Cancer Chemother Pharmacol* 2003;51(5):439–444.
96. Entin-Meer M, Rephaeli A, Yang X, Nudelman A, Vandenberg SR, Haas-Kogan DA. Butyric acid prodrugs are histone deacetylase inhibitors that show antineoplastic activity and radiosensitizing capacity in the treatment of malignant gliomas. *Mol Cancer Ther* 2005;4(12):1952–1961.
97. Kelly WK, O'Connor OA, Marks PA. Histone deacetylase inhibitors: from target to clinical trials. *Expert Opin Invest Drugs* 2002;11(12):1695–1713.
98. Acharya MR, Sparreboom A, Venitz J, Figg WD. Rational development of histone deacetylase inhibitors as anticancer agents: a review. *Mol Pharmacol* 2005;68(4):917–932.

99. Tischler JL, Abuaita B, Cuthpert SC, Fage C, Murphy K, Saxe A, et al. Simple inhibitors of histone deacetylase activity that combine features of short-chain fatty acid and hydroxamic acid inhibitors. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2008;23(4):549–555.
100. Sakimura R, Tanaka K, Nakatani F, Matsunobu T, Li X, Hanada M, et al. Antitumor effects of histone deacetylase inhibitor on Ewing's family tumors. *Int J Cancer* 2005;116(5):784–792.
101. Nakatani F, Tanaka K, Sakimura R, Matsumoto Y, Matsunobu T, Li X, et al. Identification of p21WAF1/CIP1 as a direct target of EWS-Fli1 oncogenic fusion protein. *J Biol Chem* 2003;278(17):15105–15115.
102. Schlottmann S, Erkizan HV, Barber-Rotenberg JS, Knights C, Cheema A, Uren A, et al. Acetylation Increases EWS-FLI1 DNA Binding and Transcriptional Activity. *Front Oncol* 2012;2:107.
103. Li Y, Li X, Fan G, Fukushi J, Matsumoto Y, Iwamoto Y, et al. Impairment of p53 acetylation by EWS-Fli1 chimeric protein in Ewing family tumors. *Cancer Lett* 2012;320(1):14-22.
104. Okada T, Tanaka K, Nakatani F, Sakimura R, Matsunobu T, Li X, et al. Involvement of Pglycoprotein and MMP1 in resistance to cyclic tetrapeptide subfamily of histone deacetylase inhibitors in the drugresistant osteosarcoma and Ewing's sarcoma cells. *Int J Cancer* 2006;118(1):90–97.
105. Zorzi AP, Bernstein M, Samson Y, Wall DA, Desai S, Nicksy D, et al. A phase I study of histone deacetylase inhibitor, pracinostat (SB939), in pediatric patients with refractory solid tumors: IND203 a trial of the NCIC IND program/C17 pediatric phase I consortium. *Pediatr Blood Cancer* 2013;60(11):1868-1874.

106. Judas F, Palma P, Falacho RI, Figueiredo H. Estrutura e dinâmica do tecido ósseo. Coimbra. Texto de apoio para os alunos do Mestrado Integrado em Medicina – Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra; 2012.
107. Araújo CS, Moreira AL. Metabolismo ósseo e equilíbrio fosfocálcico. Porto. Serviço de Fisiologia – Faculdade de Medicina da Universidade do Porto; 2006.
108. Clezardin P. Anti-tumour activity of zoledronic acid. *Cancer Treat Rev* 2005;31(3):1–8.
109. Russell RG, Rogers MJ. Bisphosphonates: from the laboratory to the clinic and back again. *Bone* 1999;25:97–106.
110. Rogers MJ, Gordon S, Benford HL, Coxon FP, Luckman SP, Monkkonen J, et al. Cellular and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Cancer* 2000;88:2961–2978.
111. Rodan GA, Fleisch HA. Bisphosphonates: mechanisms of action. *J Clin Invest* 1996;87:2692–2696.
112. Russell RG. Bisphosphonates: from bench to bedside. *Ann NY Acad Sci* 2006;1068:367–401.
113. Sato M, Grasser W, Endo N, Akins R, Simmons H, Thompson DD, et al. Bisphosphonate action: alendronate localization in rat bone and effects on osteoclast ultrastructure. *J Clin Invest* 1991;88:2095–2105.
114. 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;10:1478–1487.

115. Bone HG. Ten years' experience with alendronate for osteoporosis in postmenopausal women. *N Engl J Med* 2004;350:1189–1199.
116. Heymann D, Ory B, Gouin F, Green JR, Rédini F. Bisphosphonates: new therapeutic agents for the treatment of bone tumors. *Trends Mol Med* 2004;10:337–343.
117. Rosen LS, Gordon D, Kaminski M, Howell A, Belch A, Mackey J, et al. Zoledronic acid versus pamidronate in the treatment of skeletal metastases in patients with breast cancer or osteolytic lesions of multiple myeloma: a phase III, double-blind, comparative trial. *Cancer J* 2001;7:377–387.
118. Saad F, Gleason DM, Murray R, Tchekmedyian S, Venner P, Lacombe L, et al. A randomized, placebo-controlled trial of zoledronic acid in patients with hormone-refractory metastatic prostate carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2002;94:1458–1468.
119. Rosen LS, Gordon D, Tchekmedyian S, Yanagihara R, Hirsh V, Krzakowski M, et al. Zoledronic acid versus placebo in the treatment of skeletal metastases in patients with lung cancer and other solid tumors: a phase III, double-blind, randomized trial – the Zoledronic Acid Lung Cancer and Other Solid Tumors Study Group. *J Clin Oncol* 2003;21:3150–3157.
120. Kohno N, Aogi K, Minami H, Nakamura S, Asaga T, Iino Y, et al. Zoledronic acid significantly reduces skeletal complications compared with placebo in Japanese women with bone metastases from breast cancer: a randomized, placebo-controlled trial. *J Clin Oncol* 2005;23:3314–3321.
121. Cordoba R, Ramirez E, Lei SH, Lopez de la Guia A, Sanjurjo MJ, Carcas AJ, et al. Hypercalcemia due to an interaction of all-trans retinoic acid (ATRA) and

itraconazole therapy for acute promyelocytic leukemia successfully treated with zoledronic acid. *Eur J Clin Pharmacol* 2008;64(10):1031-1032.

122. Karabulut B, Karaca B, Varol U, Muslu U, Cakar B, Atmaca H, et al. Enhancing cytotoxic and apoptotic effect in OVCAR-3 and MDAH-2774 cells with all-trans retinoic acid and zoledronic acid: a paradigm of synergistic molecular targeting treatment for ovarian cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 2010;29:102.

123. Karabulut B, Karaca B, Atmaca H, Kisim A, Uzunoglu S, Sezgin C, et al. Regulation of apoptosis-related molecules by synergistic combination of all-transretinoic acid and zoledronic acid in hormone-refractory prostate cancer cell lines. *Mol Biol Rep* 2011;38(1):249-259.

124. Winter MC, Holen I, Coleman RE. Exploring the anti-tumour activity of bisphosphonates in early breast cancer. *Cancer Treat Rev* 2008;34:453-475.

125. Caraglia M, Santini D, Marra M, Vincenzi B, Tonini G, Budillon A. Emerging anti-cancer molecular mechanisms of aminobisphosphonates. *Endocr Relat Cancer* 2006;13:7-26.

126. Ottewell PD, Woodward JK, Lefley DV, Evans CA, Coleman RE, Holen I. Anticancer mechanisms of doxorubicin and zoledronic acid in breast cancer tumor growth in bone. *Mol Cancer Ther* 2009;8:2821-2832.

127. Banys M, Solomayer EF, Gebauer G, Janni W, Krawczyk N, Lueck HJ, et al. Influence of zoledronic acid on disseminated tumor cells in bone marrow and survival: results of a prospective clinical trial. *BMC Cancer* 2013;13(1):480.

128. Battaglia S, Dumoucel S, Chesneau J, Heymann MF, Picarda G, Gouin F, et al. Impact of oncopediatric dosing regimen of zoledronic acid on bone growth: preclinical studies and case report of an osteosarcoma pediatric patient. *J Bone Miner Res* 2011;26: 2439-2451.
129. Hirbe AC, Roelofs AJ, Floyd DH, Deng H, Becker SN, Lanigan LG, et al. The bisphosphonate zoledronic acid decreases tumor growth in bone in mice with defective osteoclasts. *Bone* 2009;44:908–916.
130. Giuliani N, Pedrazzoni M, Passeri G, Girasole G. Bisphosphonates inhibit IL-6 production by human osteoblast-like cells. *Scand J Rheumatol* 1998;27:38–41.
131. Tenta R, Sourla A, Lembessis P, Koutsilieris M. Bone-related growth factors and zoledronic acid regulate the PTHrP/PTH.1 receptor bioregulation systems in MG-63 human osteosarcoma cells. *Anticancer Res* 2006;26:283–291.
132. Muraro M, Mereuta OM, Saglio F, Carraro F, Berger M, Madon E, et al. Interactions between osteosarcoma cell lines and dendritic cells immune function: an in vitro study. *Cell Immunol* 2008;253:71–80.
133. Chauvin C, Philippeau JM, Hémond C, Hubert FX, Wittrant Y, Lamoureux F, et al. Killer dendritic cells link innate and adaptive immunity against established osteosarcoma in rats. *Cancer Res* 2008;68:9433–9440.
134. Sonnemann J, Eckervogt V, Truckenbrod B, Boos J, Winkelmann W, van Valen F. The bisphosphonate pamidronate is a potent inhibitor of Ewing's sarcoma cell growth in vitro. *Anticancer Drugs* 2003;14:767–771.

135. Siddiqui T, Marsh Rde W, Allegra C, Whittaker D, Scarborough M, Gibbs P, et al. Effective salvage treatment of recurrent Ewing sarcoma utilizing chemotherapy and zoledronic acid. *Clin Adv Hematol Oncol* 2010;8:499-504.
136. Pratap J, Akech J, Wixted JJ, Szabo G, Hussain S, McGee-Lawrence ME, et al. The histone deacetylase inhibitor, vorinostat, reduces tumor growth at the metastatic bone site and associated osteolysis, but promotes normal bone loss. *Mol Cancer Ther* 2010;9:3210-3220.
137. McGee-Lawrence ME, Westendorf JJ. Histone deacetylases in skeletal development and bone mass maintenance. *Gene* 2011;474:1-11.
138. Zhao M, Tominaga Y, Ohuchida K, Mizumoto K, Cui L, Kozono S, et al. Significance of combination therapy of zoledronic acid and gemcitabine on pancreatic cancer. *Cancer Sci* 2012;103:58-66.
139. Bayrak OF, Aydemir E, Gulluoglu S, Sahin F, Sevli S, Yalvac ME, et al. The effects of chemotherapeutic agents on differentiated chordoma cells. *J Neurosurg Spine* 2011;15: 620-624.
140. Sonnemann J, Bumbul B, Beck JF. Synergistic activity of the histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid and the bisphosphonate zoledronic acid against prostate cancer cells in vitro. *Mol Cancer* 2007;6:2976-2984.

5 ARTIGO EM INGLÊS

Oncology Reports

Research Article

***In vitro* antitumor effect of sodium butyrate and zoledronic acid combined with traditional chemotherapeutic drugs: A paradigm of synergistic molecular targeting in the treatment for Ewing sarcoma**

Running title: Synergistic effect of sodium butyrate, zoledronic acid and chemotherapy in Ewing sarcoma

DOI: 10.3892/or.2013.2907

Michel Pinheiro dos Santos^{1,3}; Caroline Brunetto de Farias^{1,2,4}; Rafael Roesler^{1,4,5}; Algemir Lunardi Brunetto^{1,2,4}; Ana Lucia Abujamra^{1,2,3,4}

1- Cancer Research Laboratory, University Hospital Research Center (CPE-HCPA), Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

2- Children's Cancer Institute and Pediatric Oncology Unit, Federal University Hospital (HCPA), Porto Alegre, RS, Brazil

3- Medical Sciences Program, School of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

4- National Institute for Translational Medicine (INCT-TM), Porto Alegre, RS, Brazil

5- Laboratory of Neuropharmacology and Neural Tumor Biology, Department of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

To whom correspondence should be addressed:

Prof. Ana Lucia Abujamra, PhD

R. Ramiro Barcelos, 2350, 3° Leste – Oncologia Pediátrica,

Porto Alegre-RS 90035-903 Brazil

Email: aabujamra@hcpa.ufrgs.br

Phone: +55 51 3359-7616

Fax: +55 51 3330-8087

Abstract

Histone deacetylase inhibitors and bisphosphonates have a promising future in the treatment of cancer as targeted anticancer drugs, particularly when used together or in combination with other cytotoxic agents. However, the effects of these combined treatments have not yet been systematically evaluated in Ewing sarcoma. The in vitro effects on cellular proliferation, viability and survival were investigated in two Ewing sarcoma cell lines, SK-ES-1 and RD-ES. The cell lines were treated with sodium butyrate, a histone deacetylase inhibitor and zoledronic acid, a bisphosphonate, alone, together or in combination with chemotherapeutic drugs recommended for clinical treatment of Ewing sarcoma. The data demonstrated that the combination of sodium butyrate and zoledronic acid had a synergistic cytotoxic effect at 72 h following treatment, persisting for 10-14 days post-treatment, in both cell lines tested. All combinations between sodium butyrate or zoledronic acid and the traditional antineoplastic drugs (doxorubicin, etoposide and vincristine) demonstrated a synergistic cytotoxic effect at 72 h in SK-ES-1 and RD-ES cells, except for the combinations of sodium butyrate with vincristine and of zoledronic acid with doxorubicin, which showed only an additive effect in RD-ES cell lines as compared to each agent alone. These acute effects observed in both Ewing sarcoma cell lines were confirmed by the clonogenic assay. The present data suggest that combining histone deacetylase inhibitors and bisphosphonates with traditional chemotherapeutic drugs is a promising therapeutic strategy for the treatment of Ewing sarcoma, and provides a basis for further studies in this field.

Keywords: Ewing sarcoma, sodium butyrate, zoledronic acid, adjuvant therapy, chemotherapy, synergistic effect.

Introduction

Ewing sarcoma (ES), often referred to as Ewing's sarcoma family tumors (ESFTs), is a peripheral primitive neuroectodermal tumor (PNET). ES is the second most common solid bone and soft tissue malignancy of children and young adults following osteosarcoma, and accounts for ~3% of all malignancies in pediatric patients (1-3). This disease most commonly occurs in the second decade of life, and ~55% of affected individuals are male (4). It is associated in 85% of cases with the (11;22)(q24;q12) chromosomal translocation that generates fusion of the 50 first segments of the EWS gene with the 30 last segments of the FLI-1 gene of the ETS family. The resulting EWS-FLI-1 fusion protein is believed to behave as an aberrant transcriptional activator that contributes to ESFT development by altering the expression of its target genes in a permissive cellular environment (5). Current treatments comprise neoadjuvant chemotherapy and local surgical resection with limb salvage, followed by adjuvant chemotherapy with or without radiotherapy. Most combination chemotherapeutic regimens are based on alkylating agents, primarily ifosfamide and cyclophosphamide and anthracyclines, supplemented with vinca alkaloids, actinomycin D and etoposide (6). Before the era of chemotherapy, the survival rate of ES patients was <10% (7). The current use of an aggressive multimodal therapy has improved long-term survival rates of patients with localized disease in most clinical centers by 50-70%. However, patients with clinically detectable metastases at diagnosis, who do not respond to therapy or with disease relapse, have a significantly poorer prognosis (20%). In addition, 30-40% of patients with ES experience disease relapse. They have a particularly dismal prognosis, with a survival likelihood that does not exceed 20% (3,5,8). Moreover, traditional chemotherapeutic agents are often used in high doses, causing several toxic side-

effects, including neurotoxicity in the case of vincristine, hematological side-effects in the case of ifosfamide or etoposide or cardiotoxicity in the case of doxorubicin (9-12). For these reasons, efforts to identify new therapies are still warranted (6).

Epigenetic alterations, such as histone deacetylation, are known to contribute to cellular transformation by silencing critical genes. Histone deacetylase inhibitors (HDACIs or HDIs), such as sodium butyrate (NaB), represent a potentially novel class of antineoplastic agents with the potential to act as adjuvants, since they promote or enhance a variety of distinct anticancer mechanisms, including apoptosis, cell cycle arrest, cellular differentiation, immune stimulatory and antiangiogenic activities. A number of HDIs are currently under clinical trials, owing to their ability to revert some of the aberrant epigenetic states associated with cancer. These studies have shown that histone hyperacetylation can be safely achieved in humans, and that treatment with such agents is plausible (13-15). The use of HDIs alone or in association with other molecules, such as traditional chemotherapeutic drugs, could be a promising alternative for the treatment of cancer patients in the future (15-18).

The bisphosphonates (BPs) are generally well-known for their antiresorptive effects on bone metabolism, providing a reductive effect on the morbidity of skeletal metastasis of different types of tumors, and also serving as a primary therapeutic option for malignant hypercalcemia. Zoledronic acid (ZA), the most potent member of the nitrogen-containing bisphosphonate family (N-BPs), inhibits osteoclastic resorptive activity partly through inhibition of farnesyl-diphosphate synthase and protein prenylation. However, far beyond their effect on bone turnover, bisphosphonates have pleiotropic biological effects: they can mediate growth factor release, cell adhesion, antiangiogenic effects and apoptosis in various types of tumors (19). Recent in vitro and in vivo studies suggest that bisphosphonates exhibit

antitumor activity, especially when associated with other cytotoxic agents, such as those employed in traditional chemotherapy (20-22).

HDIs and bisphosphonates have a promising future in the treatment of cancer as targeted anticancer agents, especially when used together or in combination with other molecules, such as traditional anticancer drugs. However in ES, the possible effects of co-administering HDIs and bisphosphonates, and of associating HDIs or bisphosphonates with traditional anticancer drugs have not yet been systematically investigated. In the present study, we evaluated the *in vitro* cytotoxic effects elicited by the co-treatment with NaB and ZA alone or in combination with three anticancer drugs strongly recommended for the treatment of ES (doxorubicin, etoposide and vincristine) in two human ES cell lines, SK-ES-1 and RD-ES.

Materials and methods

Cell lines and reagents. The human Ewing sarcoma cell lines SK-ES-1 and RD-ES were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC; Rockville, MD, USA) and grown in RPMI-1640 medium (Gibco-BRL, Carlsbad, CA, USA), containing 0.1% Fungizone® (250 mg/kg; Invitrogen Life Technologies, São Paulo, Brazil), 100 U/l gentamicin (4 mg/ml; Nova Pharma, Brazil) and 10% (SK-ES-1) or 15% (RD-ES) fetal bovine serum (FBS; Soral, Campo Grande, Brazil), at 37°C in a humidified incubator under 5% CO₂. Sodium butyrate (NaB) and trypan blue were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA); zoledronic acid (ZA), vincristine (VCR) and doxorubicin (Doxo) were obtained from Faulding/LIBBS (São Paulo, Brazil); and etoposide (VP-16) was purchased from Bristol-Myers Squibb (São Paulo, Brazil).

Cellular proliferation and viability assay. The cells were seeded at a density of 2.5×10^4 cells/well (SK-ES-1) and 3.5×10^4 cells/well (RD-ES) in 24-well plates and

allowed to grow for 24 h. The medium was replaced and different doses of NaB, ZA, VCR, VP-16 and Doxo, alone or in combination, were added to the culture medium. To measure cellular proliferation, the medium was removed 72 h following the treatments, cells were washed with Hanks' balanced salt solution (Invitrogen Life Technologies) and were detached with 100 μ l of 0.25% trypsin solution. To inactivate trypsin, 100 μ l of complete medium was added, and 10 μ l of the resulting cellular suspension was mixed with 10 μ l trypan blue (0.4%). Cells were then manually counted in a hemocytometer to determine the ratio of dead to viable cells (23,24). The mean of triplicate experiments for each dose was used to calculate the IC50 and the combination index (CI) values. The results were confirmed by an MTT assay (25).

Colony formation assay (clonogenic survival assay). Following counting, SK-ES-1 and RD-ES cells were seeded into 6-well plates without treatment (1,000 cells/well). After incubation for 10-14 days, the cells were fixed with 70% ethanol and counterstained with 0.5% crystal violet (26).

Optimized digital counting of colonies for the clonogenic assays. To analyze the clonogenic assay data, colonies were digitalized and an optimized digital colony counting was performed using ImageJ software (version 1.37 for Windows) (27). The method developed by Cai et al (27) was validated according to the experimental conditions. After drying the crystal violet stain, images from each plate were obtained using a desktop scanner (Lexmark X342n XL). Each plate was placed at the same position on the light table by aligning it with the center of the exposed preview light window. In order to separate colonies from the dark grey background, each plate was scanned in color or grey-scale mode. The scanned images were saved as 16-bit tiff files with a resolution setting of 600 dots per inch (DPI) and were analyzed using the ImageJ software as follows: First, image files of the same plate were opened, then

the background was subtracted ('Process\Subtract Background...') to correct for unevenness of transmission light. The default setting for a rolling ball radius of 15.0 pixels was chosen and the light background was checked. Following background subtraction, the images were converted into 8-bit grey scale images. Second, the macro 'Make_ovalscan.txt' was run, resulting in the appearance of the region of interest in the shape of a circle that corresponds to a circular well area. Next, colony counting was performed by setting the threshold values ('Image\Adjust\Threshold...'), the measurements ('Analyze\ Set Measurements...') and the parameters that were measured and displayed: the area, the mean grey value, the standard deviation (SD), the integrated density and the display label. The colonies were analyzed ('Analyze\Analyze Particles...') with a range of predefined values for particle (colony) size ('5-Infinity') and circularity ('0.30-1.00'). The effects of drugs on treated colonies were expressed as the surviving fraction of the colonies (SF) and the average size of the colonies (AS) evaluated with the following formulas:

- i)
$$SF = \frac{\text{Number of colonies in treated cells}}{\text{Number of colonies in control}} \times 100$$
- ii)
$$AS = \frac{\text{Total area of colonies in treated cells}}{\text{Number of colonies in treated cells}}$$

To confirm the results, the colonies in each well were also manually counted using light microscopy. Only colonies consisting of at least 50 cells were counted.

Statistical analysis. Results are representative of three independent experiments performed in triplicates, and are expressed as mean values \pm standard deviation (SD) of independent experiments. Data were analyzed by a one-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Tukey-Kramer test, using the SPSS program,

version 16.0. P-values (P) <0.05 were considered to indicate statistically significant differences.

Median dose-effect analysis. The combination index, a measure of synergism and antagonism, is calculated based on the method described by Chou and Talalay along with the release of the computer software CalcuSyn (Biosoft, Ferguson, MO, USA), designed to assess drug interactions. This method takes into account both the potency of each drug or combination of drugs and the shape of the dose-effect curve. The CalcuSyn software version 2.11 for Windows was used to calculate the CI, with synergy, additivity and antagonism defined as $CI < 0.9$, $CI = 0.9-1.1$ and $CI > 1.1$ respectively, and $CI \leq 0.3$ defined as strong synergy. For this analysis, we chose clinically achievable concentrations of NaB, ZA, VCR, Doxo and VP-16 that were below the IC₅₀ values (28,29).

Results

A time- and dose-dependent decrease in the proliferation of ES cell lines in response to sodium butyrate, zoledronic acid or traditional antineoplastic drugs. To evaluate the cytotoxic effects of sodium butyrate on the growth of Ewing sarcoma cells, SK-ES-1 and RD-ES cell lines were exposed to increasing concentrations of NaB (0.1-10 mM) for 24, 48 and 72 h, and trypan blue counting assays were performed. There was an 8, 27 and 55% decrease in the viability of SK-ES-1 cells exposed to 0.1, 0.5 and 1 mM of NaB, respectively, as compared to the untreated controls at 72 h (Fig. 1A). In addition, there was a 11, 30 and 75% decrease in the viability of RD-ES cells exposed to 0.5, 0.75 and 3 mM of NaB, respectively, when compared to the untreated controls at 72 h (Fig. 1B). The highest cytotoxicity was observed at 72 h and IC₅₀ values of NaB in SK-ES-1 and RD-ES

cells were estimated at 0.77 and 1.08 mM, respectively. The effect of zoledronic acid on SK-ES-1 and RD-ES cells was evaluated at increasing concentrations of ZA (1-200 μ M) for 24, 48 and 72 h, and cell proliferation assays were performed. There was a 15, 45 and 80% decrease in the viability of SK-ES-1 cells exposed to 10, 25 and 100 μ M of ZA, respectively, when compared to the untreated controls at 72 h (Fig. 1C). In addition, there was a 7, 36 and 84% decrease in the cell viability of RD-ES cells exposed to 10, 50 and 200 μ M of ZA, respectively, when compared to the untreated controls at 72 h (Fig. 1D). The IC₅₀ value of zoledronic acid was 34.31 μ M for SK-ES-1 cells and 67.45 μ M for RD-ES cells.

We also examined the effects of the traditional chemotherapeutic agents doxorubicin, etoposide and vincristine on SK-ES-1 and RD-ES cell lines. The cells were exposed to increasing concentrations of Doxo (0.1-200 nM), VP-16 (0.01-10 μ M) and VCR (0.1-10 nM) for 24, 48 and 72 h, and cell proliferation assays were performed. There was a 25, 40 and 79% decrease in cell viability of SK-ES-1 cells exposed to 10, 15 and 50 nM of Doxo, respectively, when compared to the untreated controls at 72 h (Fig. 1E). In addition, there was a 10, 40 and 90% decrease in the viability of RD-ES cells exposed to 10, 30 and 100 nM of Doxo, respectively, as compared to the untreated controls at 72 h (Fig. 1F). The highest cytotoxicity was observed at 72 h and the IC₅₀ values of Doxo in SK-ES-1 and RD-ES cells were estimated at 19.83 and 32.48 nM, respectively. There was a 24, 44 and 91% decrease in the cell viability of SK-ES-1 cells exposed to 0.05, 0.1 and 0.5 μ M of VP-16, respectively, when compared to the untreated controls at 72 h (Fig. 1G). In addition, there was a 14, 35 and 68% decrease in the viability of RD-ES cells exposed to 0.05, 0.1 and 0.6 μ M of VP-16, respectively, when compared to the untreated controls at 72 h (Fig. 1H). The highest cytotoxicity was observed at 72 h

and IC50 values of VP-16 in SK-ES-1 and RD-ES cells were estimated at 0.11 and 0.17 μM , respectively. A 28, 67 and 95% decrease in the cell viability of SK-ES-1 cells was found when they were exposed to 0.5, 1 and 5 nM of VCR, respectively, when compared to the untreated controls at 72 h (Fig. 1I). In addition, there was a 25, 68 and 82% decrease in viability of RD-ES cells exposed to 1, 5 and 7.5 nM of VCR, respectively, when compared to the untreated controls at 72 h (Fig. 1J). The highest cytotoxicity was observed at 72 h and the IC50 values of VCR in SK-ES-1 and RD-ES cells were estimated at 0.71 and 2.09 nM, respectively. All tested agents caused cytotoxicity in a time- and dose-dependent manner in SK-ES-1 and RD-ES cells (data not shown).

Sodium butyrate and zoledronic acid synergistically inhibit growth in the ES cell lines. To study the potentially synergistic/additive effects of NaB and ZA combined, SK-ES-1 and RD-ES cells were exposed to concentrations chosen as clinically achievable and below or at the IC50 values of each agent alone, and of their combination for 72 h. Synergism or additivity was assessed via CI measures using the Calcosyn software. Results revealed synergistic toxicity in human Ewing sarcoma SK-ES-1 and RD-ES cells at 72 h, as compared to each agent alone (Table I). The results indicated that 0.5 mM NaB and 25 μM ZA led to a 24 and 44% decrease in the cell viability of SK-ES-1 cells, respectively, but the combination of both led to a 72% decrease (Fig. 2A). In RD-ES cells, the results were similar: 0.75 mM NaB and 50 μM ZA led to a 19 and 36% decrease in cell viability, respectively, while the combination of both led to a 73% decrease (Fig. 2A).

Sodium butyrate and traditional antineoplastic agents exhibit synergistic or additive effects on growth inhibition in the ES cell lines. These experiments were conducted in a similar fashion as described above for the NaB and ZA combination.

Results showed synergistic toxicity or additive effects in human Ewing sarcoma SK-ES-1 and RD-ES cells at 72 h, when NaB was combined with Doxo, VP-16 or VCR, as compared to each agent alone (Table I). In the SK-ES-1 cells, 0.5 mM NaB and 15 nM Doxo resulted in a 35 and 48% decrease in cell viability, respectively, but the combination of both resulted in a 83% decrease (Fig. 2B). In RD-ES cells, the results were similar; 0.75 mM NaB and 30 nM Doxo resulted in a 33 and 49% decrease in cell viability, respectively, but the combination of both resulted in a 90% decrease (Fig. 2B). NaB (0.5 mM) and 0.06 μ M VP-16 led to a 24 and 30% decrease in the cell viability of SK-ES-1 cells, respectively, but the combination of both resulted in a 78% decrease (Fig. 2C). In the RD-ES cells, the results were similar; 0.75 mM NaB and 0.08 μ M VP-16 resulted in an 18 and 19% decrease in cell viability, respectively, but the combination of both resulted in a 67% decrease (Fig. 2C). Synergistic toxicity was observed in the SK-ES-1 cells when NaB and VCR were combined, however in RD-ES cells the effect of this combination was classified as additive. In the SK-ES-1 cells, 0.5 mM NaB and 0.5 nM VCR resulted in a 19 and 21% decrease in cell viability, respectively, but the combination of both resulted in a 61% decrease (Fig. 2D). In the RD-ES cells, 0.75 mM NaB and 1.5 nM VCR led to a 33 and 40% decrease in cell viability, respectively, but the combination of both resulted in a 60% decrease (Fig. 2D).

Zoledronic acid and traditional antineoplastic agents show synergistic or additive effects on growth inhibition in the ES cell lines. Results showed synergistic toxicity or additive effect in human Ewing sarcoma SK-ES-1 and RD-ES cells at 72 h when ZA was combined with Doxo, VP-16 or VCR, as compared to each agent alone (Table I). Synergistic toxicity was observed in the SK-ES-1 cells when ZA and Doxo were combined, however in the RD-ES cells the effect of this

combination was classified as additive. In the SK-ES-1 cells, 25 μM ZA and 15 nM Doxo led to a 46 and 48% decrease in cell viability, respectively, but the combination of both resulted in a 73% decrease (Fig. 2E). In the RD-ES cells, 50 μM ZA and 30 nM Doxo resulted in a 36 and 47% decrease in cell viability, respectively, but the combination of both resulted in a 60% decrease (Fig. 2E). ZA (25 μM) and 0.06 μM VP-16 resulted in a 44 and a 30% decrease in the cell viability of SK-ES-1 cells, respectively, but the combination of both resulted in a 70% decrease (Fig. 2F). In the RD-ES cells, the results were similar: 50 μM ZA and 0.08 μM VP-16 resulted in a 36 and 19% decrease in cell viability, respectively, but the combination of both resulted in a 66% decrease (Fig. 2F). In the SK-ES-1 cells, 25 μM ZA and 0.5 nM VCR resulted in a 45 and 25% decrease in cell viability, respectively, but the combination of both resulted in a 64% decrease (Fig. 2G). In the RD-ES cells, 50 μM ZA and 1.5 nM VCR resulted in a 35 and 41% decrease in cell viability, respectively, but the combination of both resulted in a 68% decrease (Fig. 2G).

Strong synergistic growth inhibition by sodium butyrate, zoledronic acid and etoposide in the ES cell lines. A synergistic growth inhibition effect was observed when combining etoposide with sodium butyrate or etoposide with zoledronic acid as compared to each agent alone, in both SK-ES-1 and RD-ES Ewing sarcoma cancer cells. Therefore, it was postulated that this effect might increase by combining the three agents (triple treatment). Results showed a strong synergistic toxicity in SK-ES-1 and RD-ES cells at 72 h, as compared to each agent alone (Table I). The triple treatment (0.5 mM NaB plus 25 μM ZA plus 0.06 μM VP-16) resulted in a 94% decrease in cell viability of SK-ES-1 cells. This reduction was higher than that observed in the double treatments (NaB plus ZA, 72%; NaB plus VP-16, 78% and ZA plus VP-16, 70%) and much greater than that observed when each agent was

administered alone (NaB, 24%; ZA, 44% and VP-16, 31%) (Fig. 2H). In RD-ES cells, the results were similar; the 0.75 mM NaB plus 50 μ M ZA plus 0.08 μ M VP-16 combination resulted in a 96% decrease in cell viability. This reduction was higher than those obtained with the double treatments (NaB plus ZA, 3%, NaB plus VP-16, 67% or ZA plus VP-16, 66%) and much higher than those obtained with each agent alone (NaB, 18%, ZA, 36%, or VP-16, 19%) (Fig. 2H).

Combination of sodium butyrate and zoledronic acid significantly suppresses colony formation in the ES cell lines. To analyze the effects of NaB and ZA on the survival and proliferation of SK-ES-1 and RD-ES cells, a clonogenic assay was performed. As shown in Figs. 3A and 4A, NaB did not significantly suppress colony formation of SK-ES-1 cells (6%), while ZA suppressed colony formation by 62%. Co-treatment with NaB and ZA though, strongly suppressed colony formation (84%) at the doses tested. In RD-ES cells, the results were similar; NaB did not reduce colony formation (102%, not significant), while ZA suppressed colony formation by 63% and the NaB plus ZA co-treatment strongly suppressed colony formation (85%) (Figs. 3B and 4A).

Co-treatment with sodium butyrate and traditional antineoplastic agents significantly reduces colony formation in the ES cell lines. In the SK-ES-1 cells, at the doses tested, NaB did not reduce colony formation, whereas Doxo reduced it by 68%. The combination of both strongly suppressed colony formation (92%) (Figs. 3A and 4B). In the RD-ES cells, the results were similar; NaB did not reduce colony formation, (4%, not significant), Doxo suppressed it by 64%, and co-treatment with both agents strongly suppressed colony formation (92%) (Figs. 3B and 4B). The combination of NaB and VP-16, at the doses tested, strongly suppressed colony formation in SK-ES-1 cells (86%) and suppressed colony formation in RD-ES cells

(64%). NaB alone did not significantly reduce colony formation in both cell lines, and VP-16 alone reduced colony formation in SK-ES-1 and RD-ES cells by 45 and 24%, respectively (Figs. 3A and B and 4C). At the doses tested, the combination of NaB and VCR suppressed colony formation by 44%. When compared to the single treatments with NaB or VCR, colony formation was not significantly reduced in SK-ES-1 cells (Figs. 3A and 4D). However, in the RD-ES cells, co-treatment with NaB and VCR did not significantly reduce colony formation when compared to VCR alone (38 and 36%, respectively) (Figs. 3B and 4D).

Zoledronic acid, traditional antineoplastic agents and sodium butyrate significantly suppress colony formation in the ES cell lines. In the SK-ES-1 cells, at the doses tested, ZA and Doxo mono-treatment suppressed colony formation by 48 and 67%, respectively. The combination of both strongly suppressed colony formation (91%) (Figs. 3A and 4E). In the RD-ES cells, the results were similar; ZA and Doxo mono-treatment suppressed colony formation by 46 and 66%, respectively, and the combination of both drastically suppressed colony formation (97%) (Figs. 3B and 4E). ZA and VP-16 mono-treatment suppressed colony formation by 47 and 45%, respectively. The combination of both strongly suppressed colony formation (84%) at the doses tested in the SK-ES-1 cells (Figs. 3A and 4F). In the RD-ES cells, the results were similar; ZA suppressed colony formation by 45%, VP-16 weakly suppressed colony formation (24%) and the combination of both strongly suppressed colony formation (83%) (Figs. 3B and 4F). At the doses tested, ZA suppressed colony formation by 49%, whereas VCR did not significantly reduce colony formation (10%). However, combined treatment with ZA and VCR strongly suppressed colony formation (81%) (Figs. 3A and 4G). In the RD-ES cells, the results were similar; ZA or VCR suppressed colony formation (41 and 38%, respectively) and the combination of

both strongly suppressed colony formation (79%) (Figs. 3B and 4G). The triple treatment combining NaB, ZA and VP-16 at the doses tested, drastically suppressed colony formation in SK-ES-1 (99%) and in RD-ES (100%) cells. These effects were more pronounced than those obtained with treatments combining only two agents (NaB plus ZA, NaB plus VP-16) and were much greater than those obtained with each agent alone (Figs. 3A and 3B and 4H).

Effects of sodium butyrate, zoledronic acid, doxorubicin, etoposide, vincristine and combinations of these on the average size of ES colonies. Through the use of optimized digital counting, it was possible to evaluate not only the surviving fraction of the colonies, but also their average size. This is important for a more accurate assessment of the longterm effects of the tested compounds. In SK-ES-1 cells, NaB significantly enhanced the average colony size (48%), while ZA, Doxo, VP-16 and VCR did not alter the average size of the colonies formed in the clonogenic assay as compared to control (20, 12, 20 and 1%, respectively; Fig. 5A). The combined treatments with NaB plus ZA, NaB plus Doxo, NaB plus VP-16, ZA plus Doxo, ZA plus VP-16, ZA plus VCR and NaB plus ZA plus VP-16 reduced colony size (43, 41, 50, 37, 40, 36 and 76%, respectively), whereas the NaB plus VCR co-treatment increased (32%) the average size of the colonies as compared to the control (Fig. 5A). The NaB plus ZA, NaB plus Doxo and NaB plus VP-16 combinations significantly reduced the average colony size as compared to each drug alone (Fig. 5A). The NaB plus VCR combination increased the average size of the colonies as compared to VCR alone and this effect was statistically similar to that obtained with the NaB mono-treatment (Fig. 5A). A slight reduction was observed when ZA plus Doxo, ZA plus VP-16, and ZA plus VCR combinations were compared to each drug alone, however these reductions were not significant (Fig. 5A). The

combination of NaB, ZA and VP-16 strongly reduced the average size of the colonies. This reduction was higher than the one obtained with the double treatments (NaB plus ZA, NaB plus VP-16 and ZA plus VP-16) and much greater than those obtained with each agent alone (Fig. 5A). As shown in Fig. 5B, NaB enhanced the average size of RD-ES colonies by 24%, while ZA, Doxo, VP-16 and VCR reduced the average size of RD-ES colonies when compared to the control (29, 26, 20 and 19%, respectively). However, the only statistically significant difference was observed when ZA was compared to its control. The combined treatments with NaB plus ZA, NaB plus Doxo, ZA plus Doxo, ZA plus VP-16, ZA plus VCR and NaB plus ZA plus VP-16 reduced colony size (58, 47, 53, 60, 52 and 82%, respectively), whereas NaB plus VP-16 increased (13%, not significant) and NaB plus VCR reduced (5%, not significant) the average size of the colonies when compared to controls (Fig. 5B). The NaB plus ZA, ZA plus VP-16 and ZA plus VCR co-treatments reduced the average size of the colonies when compared to each drug alone (Fig. 5B). Co-treatments with NaB plus VCR and NaB plus VP-16 increased colony average size when compared with VCR and VP-16 alone (respectively) and the strength of the observed increase was similar to that obtained with the NaB mono-treatment (Fig. 5B). A slight reduction in colony size was observed when NaB plus Doxo and ZA plus Doxo co-treatments were compared to each drug alone, however these reductions were not significant (Fig. 5B). As observed in the SK-ES-1 cells, the combination of NaB, ZA and VP-16 strongly reduced the average size of the colonies formed by RD-ES cells. This reduction was more pronounced than the ones obtained with the double treatments (NaB plus ZA, NaB plus VP-16 and ZA plus VP-16) and much greater than the ones obtained with each agent alone (Fig. 5B).

Discussion

HDAC inhibitors (HDIs) and bisphosphonates are considered as promising alternatives in the treatment of cancer. Among the different childhood sarcomas, Ewing sarcoma (ES) appears particularly suitable for treatment with zoledronic acid because of the role of BPs in the modulation of the bone microenvironment (30).

In ES cells, the effects of HDIs have been evaluated. Sakimura et al (31) demonstrated that the abnormal functions of the EWS-FLI1 fusion oncoprotein are associated with both histone acetylation and deacetylation (EWS-FLI1 represses HAT and activates HDAC), suggesting that HDIs might serve as a molecular-based therapeutic application for ESFTs. Furthermore, another study concluded that HDIs may provide a novel strategy for treatment of ES, either applied as a monotherapy or in combination with TRAIL (8). The molecular mechanisms by which HDIs exert antitumor effects are not well known. In ESFTs, some studies have been undertaken to evaluate the effects of acetylation by the EWS-FLI1 protein (32,33).

Among the different classes of compounds studied for the treatment of ES, the bisphosphonates have been the most intensely evaluated, since ES is characterized by a marked bone resorption. Therefore, any therapeutic strategy that targets osteoclasts, such as the bisphosphonates, is promising (2,4,34). Potential antitumor effects observed in osteosarcoma might be explained by a direct activity on tumor cells (35), by a strong modulation of the tumor microenvironment (36,37), or by stimulation of immune effectors (38,39). In ES, bisphosphonates appear to have similar inhibitory activities (21,22,40). The results obtained by Zhou et al (22) suggest that ZA might represent a novel therapeutic approach for the treatment of patients with ES, since it induces apoptosis and inhibits primary bone tumor growth via a

mechanism involving the upregulation of osteoprotegerin. Moreover, ZA showed a synergistic effect with paclitaxel in the TC71 human ES cell line, both in vitro and in animal models (22). Other studies have concluded that ZA is a new adjuvant therapeutic strategy allows a decrease in the dosage of chemotherapeutic agents employed for treating ES patients, since ZA, when combined with ifosfamide, exhibited synergistic effects in a soft tissue model: its combination with one cycle of ifosfamide resulted in an inhibitory effect comparable to three cycles of ifosfamide alone (21). In the clinic, one case was reported where ZA combined with chemotherapy was an effective salvage treatment for recurrent ES (41). The use of zoledronic acid in combination with first-line chemotherapy for localized ES is being addressed in Europe, in randomized phase III trials (Ewing 2008 and Euro-Ewing 2012). In juvenile models, zoledronic acid decreases endochondral bone growth in a reversible manner (30,34).

Recent studies strongly suggest that successful cancer therapy is likely to involve a combination of HDIs or bisphosphonates with each other or with traditional chemotherapeutic agents (13-22). Although the associations between HDIs or bisphosphonates and traditional anticancer drugs (18,42,43) and between HDIs and ZA (44) have been evaluated in other types of cancer, to our knowledge, this is the first study to evaluate the effects of these combinations in ES.

In the present study, the experiments were carefully designed to evaluate how the co-treatment with antineoplastic drugs and NaB or ZA, and with NaB and ZA, may affect in vitro cellular proliferation. Dose curves were calculated so as to establish the lowest concentrations that significantly reduced cellular proliferation when compared to the controls, albeit without causing significant cell death. Administering these drugs at lower concentrations allowed us to assess with greater

certainly whether NaB and/or ZA enhance the effects elicited by each drug when administered in combination. We hypothesized that NaB and ZA might show synergistic cytotoxic effects when combined or in association with traditional antineoplastic drugs, in the human ES cell lines SK-ES-1 and RD-ES. Our results clearly demonstrated that HDIs, NaB and ZA, when employed alone, significantly inhibited proliferation and viability of both cell lines. More importantly, the combination of NaB with ZA exhibited a synergistic cytotoxic effect on both ES cell lines as compared to each agent alone. Furthermore, these results were confirmed by clonogenic assays, suggesting that the effects were extended to, or intensified, for a longer period of time. The co-treatments with NaB or ZA and traditional chemotherapy agents also showed acute (72 h) and chronic (10-14 days) synergistic cytotoxic effects in SK-ES-1 cells as compared to each agent alone. As clearly demonstrated by the results, the RD-ES cell line was more resistant to these treatments. The combined treatments with NaB plus VCR and ZA plus Doxo, for example, demonstrated only an additive effect in RD-ES cells when compared to each agent alone at 72 h. The effect of ZA and Doxo had long-term intensity (10-14 days), while this result was not observed for the combination of NaB with VCR. On the other hand, the chemotherapeutic agent etoposide (VP-16), in combination with NaB or ZA, demonstrated a synergistic cytotoxic effect, and in combination with NaB and ZA (triple treatment) showed a strong synergistic cytotoxic effect in both ES cell lines as compared to any agent alone. These results were also confirmed by colony formation assays. An additional evaluation of importance was the determination of the average colony size in the clonogenic assay. This measure showed that NaB alone or in any combination promoted an increase in the average size of the colonies of both cell lines when compared to the controls. On the other hand, ZA alone or in

combination with different agents not only reduced the number of colonies, but also reduced the average colony size in both cell lines. Overall, these results suggest that the combined treatments with NaB plus ZA, NaB or ZA plus Doxo and particularly, NaB and/or ZA with VP-16 represent the most promising alternatives for the development of new therapies for Ewing sarcoma.

The use of HDIs, bisphosphonates and traditional antineoplastic drugs as monotherapeutic agents has some limitations. Recent findings suggest that clinical use of HDAC inhibitors for conditions such as cancer and a multitude of other ailments might have undesirable effects on bone cell populations (45,46). Moreover, Battaglia et al suggested that endochondral bone growth is transiently disturbed by high doses of ZA, administered during the pediatric treatment of primary bone tumors (34). It is unclear whether concurrent administration of an osteogenic therapy (e.g., bisphosphonates) can attenuate HDI-induced bone loss (46). On the other hand, the negative skeletal consequences of broad-acting HDIs, currently under clinical trials, might be considered as acceptable side-effects from oncologists for patients with sarcoma or advanced metastatic tumors, due to the beneficial effects of HDIs on tumors within the bone (45). It is well established that the traditional chemotherapeutic agents tested in the present study cause a number of undesirable side-effects in patients. Furthermore, while undergoing treatment, several patients become irresponsive to these agents, especially when the latter are employed as monotherapy. Since the NaB plus ZA combination demonstrated a synergistic cytotoxic effect, and NaB or ZA can potentiate the effects of traditional cytotoxic drugs, these co-treatments might allow such drugs to be administered in smaller doses, while preserving their effects. This fact consolidates the idea that using NaB and ZA as anticancer adjuvant drugs might decrease the toxic side-effects that are

common to the current anticancer protocols. This idea is further supported by clinical studies that have shown that histone hyperacetylation can be safely achieved in humans, and that treatment with these agents is plausible (13-15). The clinical use of these co-treatments could reduce frequent disease complications and allow to bypass the need for dose reductions or temporary discontinuations of treatment as a means to address toxicity or drug resistance. This approach has the potential to improve the chances of success and the quality of life of patients per se. The results from the present study provide a basis for evaluating, in clinical trials, the combinations tested herein, as well as the effects of administering traditional anticancer drugs combined with NaB and/or ZA in lower concentrations.

An additional mechanism that remains largely unknown is the one by which the combination of bisphosphonates, HDIs and traditional chemotherapeutic agents exerts synergistic antitumor effects. As described in the literature, traditional drugs, such as doxorubicin and etoposide (VP-16), cause DNA damage (Doxo by DNA intercalation, macromolecular biosynthesis and topoisomerase II inhibition and VP-16 by topoisomerase II inhibition). Vincristine inhibits microtubule dynamics, which results in mitotic arrest and eventually, cell death. These anticancer drugs can inhibit cellular proliferation via p53-dependent and p53-independent mechanisms, resulting in cell cycle arrest and/or apoptosis. In vitro studies have shown clear antitumor effects for BPs, particularly zoledronic acid, as demonstrated by the BP-mediated induction of tumor cell apoptosis and their inhibitory effects on tumor cell adhesion, invasion, tumor cell viability, proliferation and angiogenesis (22). The mechanisms underlying this spectrum of antitumor activities are still under investigation. It was proposed that BPs exert both indirect and direct antitumor cell effects by inhibiting the farnesyl diphosphonate synthase in the mevalonate pathway. Cholesterol

synthesis via the mevalonate pathway is essential for all nucleated cells and, therefore, any cell type that metabolizes N-BPs may be affected, including tumor cells (direct antitumor effects) and osteoclasts (indirect antitumor effects). Zoledronic acid-induced tumor cell apoptosis was demonstrated to be associated with the release of cytochrome C and the resulting activation of the caspase pathway (47). This might occur via the inhibition of the mevalonate pathway and the consequent inhibition of prenylation of essential signaling G proteins such as Ras, Rac and Rho. As inhibitors of bone resorption, BPs reduce the release of bone-derived cytokines and growth factors, essentially rendering bone tissue less attractive to tumor cells as a site for tumor migration, colonization, adhesion and invasion, proliferation and survival. Furthermore, especially in bone tumors, BPs might also exert additional indirect antitumor effects of importance, since these molecules inhibit RANK expression and osteoclast progenitor migration during osteoclastogenesis while they increase osteoprotegerin (OPG) expression (22,30,47-49). HDAC inhibitors (HDIs) are enzymes that modify chromatin access to transcription factors and to gene transcription. HDIs are potent inducers of tumor cell apoptosis, which can be mediated by regulating histone function and subsequently, gene transcription, and/or by regulating the function or stability of non-histone proteins. While induction of apoptosis appears to be the predominant mechanism of HDI-mediated cell death, alternative cell death mechanisms, such as autophagy, might be stimulated when apoptotic proteins or pathways are disabled. However, the molecular events required for HDI-mediated autophagy are poorly understood. Depending on the stimulus, apoptosis can proceed via two functionally distinct pathways, the 'extrinsic' death receptor pathway and the 'intrinsic' mitochondrial pathway. Although the initiating phases of the two pathways are molecularly separate, a number of the downstream

events, such as the activation of caspase-3, are shared between the two pathways and, therefore, the biochemical and morphological features of intrinsic and extrinsic apoptosis (including phosphatidylserine exposure, effector caspase activation and DNA fragmentation) are similar. HDIs may sensitize tumor cells to DNA-damaging agents through one or more of the following mechanisms. First, according to a relatively simplistic view, reversal of chromatin condensation following HDI-mediated hyperacetylation of core histones might increase the accessibility of DNA-damaging agents to their targets and thus, enhance their cytotoxic effects. Second, chromatin remodeling by HDIs can induce a DNA damage-like response that involves the activation of the DNA damage kinase ATM, and can enable the formation of DNA strand breaks. In ES cells, EWS-FLI1 represses HAT and activates HDAC. HDAC inhibition restores HAT activity, inhibits cell growth and induces apoptosis. The HDI FK228 decreases EWS-FLI1 expression and ES proliferation and induces TRAIL-dependent apoptosis. Furthermore, HDIs inhibit tumor proliferation and/or survival and the associated inflammation/bone resorption via neutralization of NF- κ B in osteoclasts. This dual effect of HDIs could lead to reduced levels of proinflammatory cytokines and growth factors in the tumor microenvironment and, thus, contribute to tumor regression (30,50-52).

We present a schematic representation of the main established anticancer mechanisms involving BPs, HDIs and traditional chemotherapeutic drugs in Fig. 6. Based on this overview scheme, one might infer that the molecular mechanisms by which the co-treatment with NaB, ZA and the traditional drugs tested in the present study exert their effects are a complex combination of induction of proapoptotic proteins and suppression of cell cycle proteins. This hypothesis is supported by studies that evaluated similar associations in ES or other types of cancer. For

instance, Zhou et al (22), using a primary ES animal model in nude mice, demonstrated that zoledronic acid significantly inhibits osteolytic ES growth in vivo, enhances tumor sensitivity to paclitaxel and exhibits a synergistic apoptotic effect when combined with paclitaxel. Ottewell et al (49) studied the anticancer effects of doxorubicin and zoledronic acid on the metastatic growth of breast cancer tumors in the bone. They showed that the in vivo administration of doxorubicin followed by zoledronic acid caused specific changes in gene/protein expression and inhibited the mevalonate pathway in breast tumors metastasizing in the bone. The roles of doxorubicin and zoledronic acid in induction of apoptosis of tumor cells growing in the bone are unclear. Both drugs have been shown to induce apoptosis by disrupting the balance of proteins of the Bcl-2 family and mitochondrial membrane potential, leading to an activation of caspase-9 and to cleavage of caspase-3. In addition to activating the mitochondrial pathway, both drugs can induce the cleavage of caspase-8, resulting in activation of the mitochondrial-independent pathway. According to the authors, the induction of apoptosis following sequential treatment with doxorubicin and zoledronic acid could be also caused by one drug increasing the cytotoxicity of the other, or could be the result of an additive effect of both drugs acting on the same pathway (49).

Regarding the associations between HDIs and BPs, Sonnemann et al found that the suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) and ZA interacted cooperatively to induce cell death in prostate carcinoma cells, and that this combination was clearly synergistic in LNCaP and PC-3 cell lines (44). Furthermore, experiments with two other HDIs, sodium butyrate and MS-275, revealed that the effect of this combination was not specific to SAHA. The coadministration of SAHA and ZA resulted in the initiation of apoptosis, potentially activated caspase-3 and led to the accumulation of

sub-G1 cells. SAHA and ZA synergistically affected mitochondrial function, indicating that the activities of these agents converge upstream of the mitochondria. In addition, experiments using the polycaspase inhibitor z-VAD-fmk revealed that caspase activation was required for the cytotoxic effects observed when combining SAHA and ZA, as measured by propidium iodide uptake and by quantifying DNA fragmentation, further substantiating that the SAHA/ZOL-induced cell death is due to apoptosis. Since ZA acts by inhibiting the mevalonate pathway thereby preventing protein prenylation, the authors explored whether the mevalonate pathway is also the target of the cooperative action of ZA and SAHA. They found that geranylgeraniol, but not farnesol, significantly reduced ZA/SAHA-induced cell death, indicating that the synergistic action of the agents was due to the inhibition of geranylgeranylation. Consistent with this hypothesis, a direct inhibitor of geranylgeranylation, GGTI-298, was found to synergize with SAHA to induce cell death, whereas an inhibitor of farnesylation, FTI-277, had no effect. In addition, SAHA synergized with mevastatin, an inhibitor of the proximal enzyme in the mevalonate pathway. Therefore, we argue that these are the key pathways for a better understanding of the mechanisms by which the tested combinations exert synergistic anticancer effects. Our future efforts will focus on the better understanding of these mechanisms.

The study presented here is consistent with the objectives of The European Network for Cancer Research in Children and Adolescents (ENCCA), as described in 'The First European Interdisciplinary Ewing Sarcoma Research Summit' (53), and provides sufficient evidence to allow discussions on novel therapeutic approaches for the treatment of Ewing's sarcoma family tumors. The most promising results from our study rely on the possibility of using combined regimens that enhance cytotoxic effects, while reducing the undesirable side-effects that are so commonly observed in

the ES patient population. Further investigations are needed to consolidate the use of HDIs and bisphosphonates in the therapy of Ewing sarcoma. Understanding the mechanisms by which NaB and ZA mutually enhance their respective effects is also necessary, in order to potentiate their effects and to develop pharmacophore models for the development of similar drugs that display a broader, but safer, range when used in adjuvant therapy.

Acknowledgments

The present study was supported by the Rafael Koff Acordi Project (Children's Cancer Institute, Porto Alegre, Brazil) and the Academic Research Hospital Fund 10-0362 (HCPA-FIPE, Porto Alegre, Brazil). We are grateful to Mr. Eduardo Monteiro for his help with elaboration of the images presented herein, OncosinoS and Libbs for the antineoplastic agents and zoledronic acid, respectively, and to all members of the Cancer Research Laboratory.

References

1. Ricchetti ET, Erol B, Stern J, Russo P, States L and Dormans JP: Lower back pain and mass in a 13-year-old girl. *Clin Orthop Relat Res* 430: 248-257, 2005.
2. Carvajal R and Meyers P: Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal family of tumors. *Hematol Oncol Clin North Am* 19: 501-525, 2005.
3. Karosas AO: Ewing's sarcoma. *Am J Health Syst Pharm* 67: 1599-1605, 2010.
4. Iwamoto Y: Diagnosis and treatment of Ewing's sarcoma. *Jpn J Clin Oncol* 37: 79-89, 2007.
5. Riggi N and Stamenkovic I: The biology of Ewing sarcoma. *Cancer Lett* 254: 1-10, 2007.
6. Jürgens H and Dirksen U: Ewing sarcoma treatment. *Eur J Cancer* 47: 366-367, 2011.
7. Bernstein M, Kovar H, Paulussen M, *et al*: Ewing's sarcoma family of tumors: current management. *Oncologist* 11: 503-519, 2006.
8. Sonnemann J, Dreyer L, Hartwig M, *et al*: Histone deacetylase inhibitors induce cell death and enhance the apoptosis-inducing activity of TRAIL in Ewing's sarcoma cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 133: 847-858, 2007.
9. Johnson IS, Armstrong JG, Gorman M and Burnett JP Jr: The vinca alkaloids: a new class of oncolytic agents. *Cancer Res* 23: 1390-1427, 1963.
10. Zalupski M and Baker LH: Ifosfamide. *J Natl Cancer Inst* 80: 556-566, 1988.

11. Hande KR: Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitors. *Eur J Cancer* 34: 1514-1521, 1998.
12. Schimmel KJ, Richel DJ, Van Den Brink RB and Guchelaar HJ: Cardiotoxicity of cytotoxic drugs. *Cancer Treat Rev* 30: 181-191, 2004.
13. Abujamra AL, Dos Santos MP, Roesler R, Schwartzmann G and Brunetto AL: Histone deacetylase inhibitors: a new perspective for the treatment of leukemia. *Leuk Res* 34: 687-695, 2010.
14. Marks PA: Histone deacetylase inhibitors: a chemical genetics approach to understanding cellular functions. *Biochim Biophys Acta* 1799: 717-725, 2010.
15. Marks PA: The clinical development of histone deacetylase inhibitors as targeted anticancer drugs. *Expert Opin Investig Drugs* 19: 1049-1066, 2010.
16. Hoshino I and Matsubara H: Recent advances in histone deacetylase targeted cancer therapy. *Surg Today* 40: 809-815, 2010.
17. Pili R, Salumbides B, Zhao M, *et al*: Phase I study of the histone deacetylase inhibitor entinostat in combination with 13-*cis* retinoic acid in patients with solid tumours. *Br J Cancer* 106: 77-84, 2012.
18. dos Santos MP, Schwartzmann G, Roesler R, Brunetto AL and Abujamra AL: Sodium butyrate enhances the cytotoxic effect of antineoplastic drugs in human lymphoblastic T-cells. *Leuk Res* 33: 218-221, 2009.
19. Clézardin P: Bisphosphonates' antitumor activity: an unraveled side of a multifaceted drug class. *Bone* 48: 71-79, 2011.

20. Stresing V, Daubin  F, Benzaid I, M nkk nen H and Clézardin P: Bisphosphonates in cancer therapy. *Cancer Lett* 257: 16-35, 2007.
21. Odri GA, Dumoucel S, Picarda G, *et al*: Zoledronic acid as a new adjuvant therapeutic strategy for Ewing's sarcoma patients. *Cancer Res* 70: 7610-7619, 2010.
22. Zhou Z, Guan H, Duan X and Kleinerman ES: Zoledronic acid inhibits primary bone tumor growth in Ewing sarcoma. *Cancer* 104: 1713-1720, 2005.
23. de Oliveira MS, Cechim G, Braganhol E, *et al*: Anti-proliferative effect of the gastrin-release peptide receptor antagonist RC-3095 plus temozolomide in experimental glioblastoma models. *J Neurooncol* 93: 191-201, 2009.
24. Flores DG, de Farias CB, Leites J, *et al*: Gastrin-releasing peptide receptors regulate proliferation of C6 glioma cells through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanism. *Curr Neurovasc Res* 5: 99-105, 2008.
25. Schmidt AL, de Farias CB, Abujamra AL, *et al*: BDNF and PDE4, but not the GRPR, regulate viability of human medulloblastoma cells. *J Mol Neurosci* 40: 303-310, 2010.
26. Brunetto de Farias C, Rosemberg DB, Heinen TE, *et al*: BDNF/TrkB content and interaction with gastrin-releasing peptide receptor blockade in colorectal cancer. *Oncology* 79: 430-439, 2010.
27. Cai Z, Chattopadhyay N, Liu WJ, Chan C, Pignol JP and Reilly RM: Optimized digital counting colonies of clonogenic assays using ImageJ software and customized macros: Comparison with manual counting. *Int J Radiat Biol* 87: 1135-1146, 2011.

28. Chou TC and Talalay P: Quantitative analysis of dose-effect relationships: The combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enz Regul* 22: 27-55, 1984.
29. Chou TC: The median-effect principle and the combination index for quantitation of synergism and antagonism. In: *Synergism and Antagonism in Chemotherapy*. Chou TC and Rideout DC (eds). Academic Press, San Diego, pp61-102, 1991.
30. Gaspar N, Di Giannatale A, Georger B, *et al*: Bone sarcomas: from biology to targeted therapies. *Sarcoma* 2012: 301975, 2012. doi: 10.1155/2012/301975.
31. Sakimura R, Tanaka K, Nakatani F, *et al*: Antitumor effects of histone deacetylase inhibitor on Ewing's family tumors. *Int J Cancer* 116: 784-792, 2005.
32. Schlottmann S, Erkizan HV, Barber-Rotenberg JS, *et al*: Acetylation increases EWS-FLI1 DNA binding and transcriptional activity. *Front Oncol* 2: 1-12, 2012.
33. Li Y, Li X, Fan G, *et al*: Impairment of p53 acetylation by EWS-FlI1 chimeric protein in Ewing family tumors. *Cancer Lett* 320: 14-22, 2012.
34. Battaglia S, Dumoucel S, Chesneau J, *et al*: Impact of oncopediatric dosing regimen of zoledronic acid on bone growth: preclinical studies and case report of an osteosarcoma pediatric patient. *J Bone Miner Res* 26: 2439-2451, 2011.
35. Hirbe AC, Roelofs AJ, Floyd DH, *et al*: The bisphosphonate zoledronic acid decreases tumor growth in bone in mice with defective osteoclasts. *Bone* 44: 908-916, 2009.
36. Giuliani N, Pedrazzoni M, Passeri G and Girasole G: Bisphosphonates inhibit IL-6 production by human osteoblast-like cells. *Scand J Rheumatol* 27: 38-41, 1998.

37. Tenta R, Sourla A, Lembessis P and Koutsilieris M: Bone-related growth factors and zoledronic acid regulate the PTHrP/PTH.1 receptor bioregulation systems in MG-63 human osteosarcoma cells. *Anticancer Res* 26: 283-291, 2006.
38. Muraro M, Mereuta OM, Saglio F, *et al*: Interactions between osteosarcoma cell lines and dendritic cells immune function: an *in vitro* study. *Cell Immunol* 253: 71-80, 2008.
39. Chauvin C, Philippeau J, Hémond C, *et al*: Killer dendritic cells link innate and adaptive immunity against established osteosarcoma in rats. *Cancer Res* 68: 9433-9440, 2008.
40. Sonnemann J, Eckervogt V, Truckenbrod B, Boos J, Winkelmann W and van Valen F: The bisphosphonate pamidronate is a potent inhibitor of Ewing's sarcoma cell growth *in vitro*. *Anticancer Drugs* 14: 767-771, 2003.
41. Siddiqui T, Marsh Rde W, Allegra C, *et al*: Effective salvage treatment of recurrent Ewing sarcoma utilizing chemotherapy and zoledronic acid. *Clin Adv Hematol Oncol* 8: 499-504, 2010.
42. Zhao M, Tominaga Y, Ohuchida K, *et al*: Significance of combination therapy of zoledronic acid and gemcitabine on pancreatic cancer. *Cancer Sci* 103: 58-66, 2012.
43. Bayrak OF, Aydemir E, Gulluoglu S, *et al*: The effects of chemotherapeutic agents on differentiated chordoma cells. *J Neurosurg Spine* 15: 620-624, 2011.
44. Sonnemann J, Bumbul B and Beck JF: Synergistic activity of the histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid and the bisphosphonate

zoledronic acid against prostate cancer cells *in vitro*. *Mol Cancer Ther* 6: 2976-2984, 2007.

45. Pratap J, Akech J, Wixted JJ , *et al*: The histone deacetylase inhibitor, vorinostat, reduces tumor growth at the metastatic bone site and associated osteolysis, but promotes normal bone loss. *Mol Cancer Ther* 9: 3210-3220, 2010.

46. McGee-Lawrence ME and Westendorf JJ : Histone deacetylases in skeletal development and bone mass maintenance. *Gene* 474: 1-11, 2011.

47. Winter MC, Holen I and Coleman RE: Exploring the anti-tumour activity of bisphosphonates in early breast cancer. *Cancer Treat Rev* 34: 453-475, 2008.

48. Caraglia M, Santini D, Marra M, Vincenzi B, Tonini G and Budillon A: Emerging anti-cancer molecular mechanisms of aminobisphosphonates. *Endocr Relat Cancer* 13: 7-26, 2006.

49. Ottewell PD, Woodward JK, Lefley DV, Evans CA, Coleman RE and Holen I: Anticancer mechanisms of doxorubicin and zoledronic acid in breast cancer tumor growth in bone. *Mol Cancer Ther* 8: 2821-2832, 2009.

50. Frew AJ, Johnstone RW and Bolden JE: Enhancing the apoptotic and therapeutic effects of HDAC inhibitors. *Cancer Lett* 280: 125-133, 2009.

51. Blanchard F and Chipoy C: Histone deacetylase inhibitors: new drugs for the treatment of inflammatory diseases? *Drug Discov Today* 10: 197-204, 2005.

52. Minucci S and Pelicci PG: Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nat Rev Cancer* 6: 38-51, 2006.

53. Kovar H, Alonso J, Aman P, *et al*: The First European Interdisciplinary Ewing Sarcoma Research Summit. *Front Oncol* 2: 54, 2012.

Figure Legends

Table I - Combinations index values

Cell line	Concentration of drugs	CI value	Interpretation
SK-ES-1	NaB (0.5 mM) + ZA (25 μ M)	0.687	Synergism
	NaB (0.5 mM) + Doxo (15 nM)	0.503	Synergism
	NaB (0.5 mM) + VP-16 (0.06 μ M)	0.532	Synergism
	NaB (0.5 mM) + VCR (0.8 nM)	0.533	Synergism
	ZA (25 μ M) + Doxo (15 nM)	0.689	Synergism
	ZA (25 μ M) + VP-16 (0.06 μ M)	0.729	Synergism
	ZA (25 μ M) + VCR (0.8 nM)	0.769	Synergism
	NaB (0.5 mM) + ZA (25 μ M) + VP-16 (0.06 μ M)	0.287	Strong synergism
RD-ES	NaB (0.75 mM) + ZA (50 μ M)	0.539	Synergism
	NaB (0.75 mM) + Doxo (30 nM)	0.491	Synergism
	NaB (0.75 mM) + VP-16 (0.08 μ M)	0.644	Synergism
	NaB (0.75 mM) + VCR (1.5 nM)	0.987	Additivity
	ZA (50 μ M) + Doxo (30 nM)	0.922	Additivity
	ZA (50 μ M) + VP-16 (0.08 μ M)	0.738	Synergism
	ZA (50 μ M) + VCR (1.5 nM)	0.688	Synergism
	NaB (0.75mM) + ZA (50 μ M) + VP-16 (0.08 μ M)	0.236	Strong synergism

Combination index values (CI) of sodium butyrate (NaB), zoledronic acid (ZA), doxorubicin (Doxo), etoposide (VP-16) and vincristine (VCR) alone and in combination in SK-ES-1 and RD-ES cells. CI value were calculated from the cellular

proliferation and viability assay. The data represent the mean of three independent experiments.

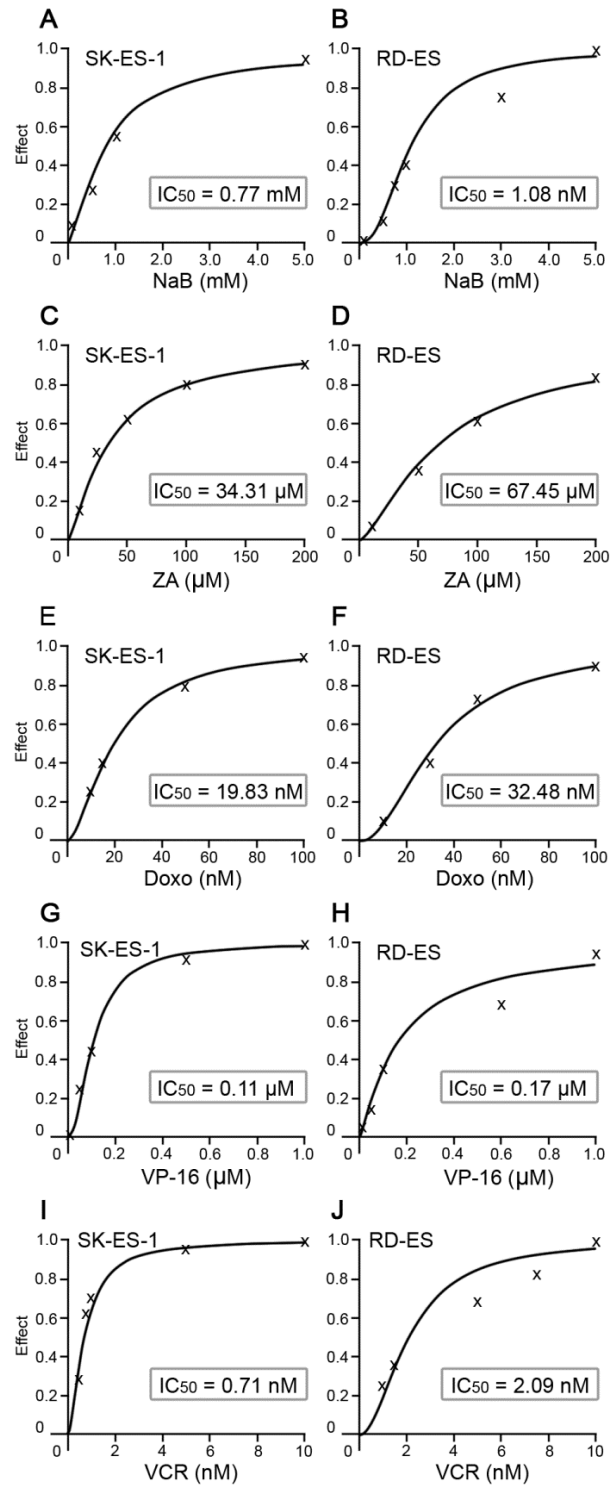


Figure 1. Dose-response study of the antitumor effect of sodium butyrate (A,B), zoledronic acid (C,D), doxorubicin (E,F), etoposide (G,H) and vincristine (I,J) in human Ewing sarcoma SK-ES-1 and RD-ES cell lines, respectively. The IC₅₀ concentration of each drug was determined by trypan blue counting assay as

described in Material and Methods after a 72 h treatment of the cells with different drug concentrations. Cell viability was assessed in triplicates, in at least three independent experiments. Data are expressed as dose-effect curves: effect (fraction affected versus control) represented on the y-axis versus dose (different doses of each agent tested) represented on the x-axis. The linear correlation coefficient (r) of the median-effect plot was greater than 0.90 for all agents tested ensuring accuracy of measurement and conformity to the mass-action. (Positive control = 100% cell viability = zero in the graphs).

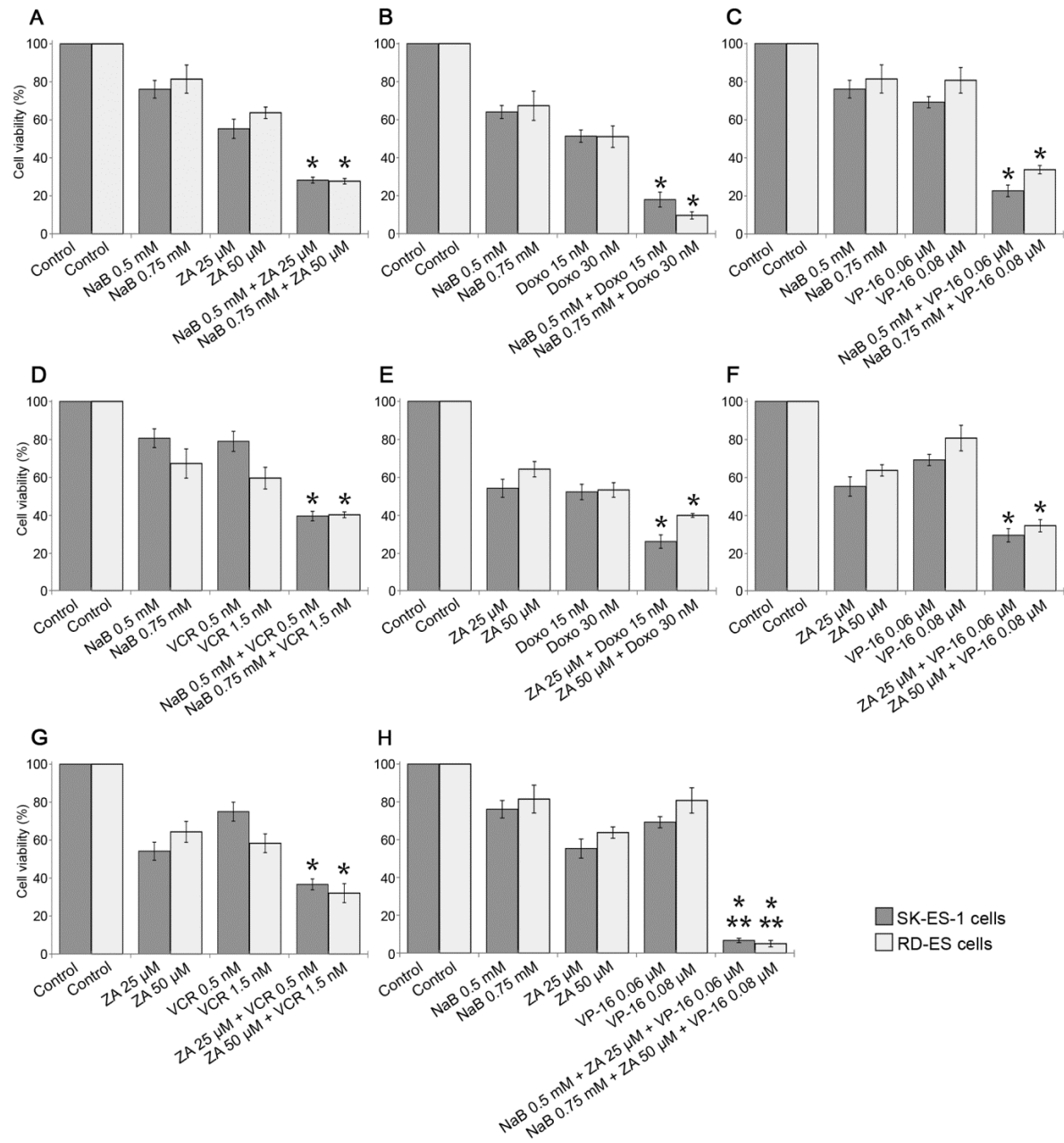


Figure 2. Cytotoxic effects of different combinations of sodium butyrate (NaB), zoledronic acid (ZA), doxorubicin (Doxo), etoposide (VP-16) and vincristine (VCR) on cellular proliferation and viability. SK-ES-1 and RD-ES cell lines were treated for 72 h with **(A)** NaB 0.5 or 0.75 mM and ZA 25 or 50 μ M, **(B)** NaB 0.5 or 0.75 mM and Doxo 15 or 30 nM, **(C)** NaB 0.5 or 0.75 mM and VP-16 0.06 or 0.08 μ M, **(D)** NaB 0.5 or 0.75 mM and VCR 0.5 or 1.5 nM, **(E)** ZA 25 or 50 μ M and Doxo 15 or 30 nM, **(F)** ZA 25 or 50 μ M and VP-16 0.06 or 0.08 μ M, **(G)** ZA 25 or 50 μ M

VCR 0.5 or 1.5 nM, **(H)** NaB 0.5 or 0.75 mM and VP-16 0.06 or 0.08 μ M and ZA 25 or 50 μ M, respectively. Cellular proliferation and viability was assessed in triplicates, in at least three independent experiments. Data are expressed as % mean of control and standard deviation are shown (*error bars*). *P* value was determined using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Tukey-Kramer test, $P < 0.05$ was considered significant. All treatments promoted a statistically significant reduction in cell growth when compared to control. *, $P < 0.05$ versus single agents. **, $P < 0.05$ versus double treatments.

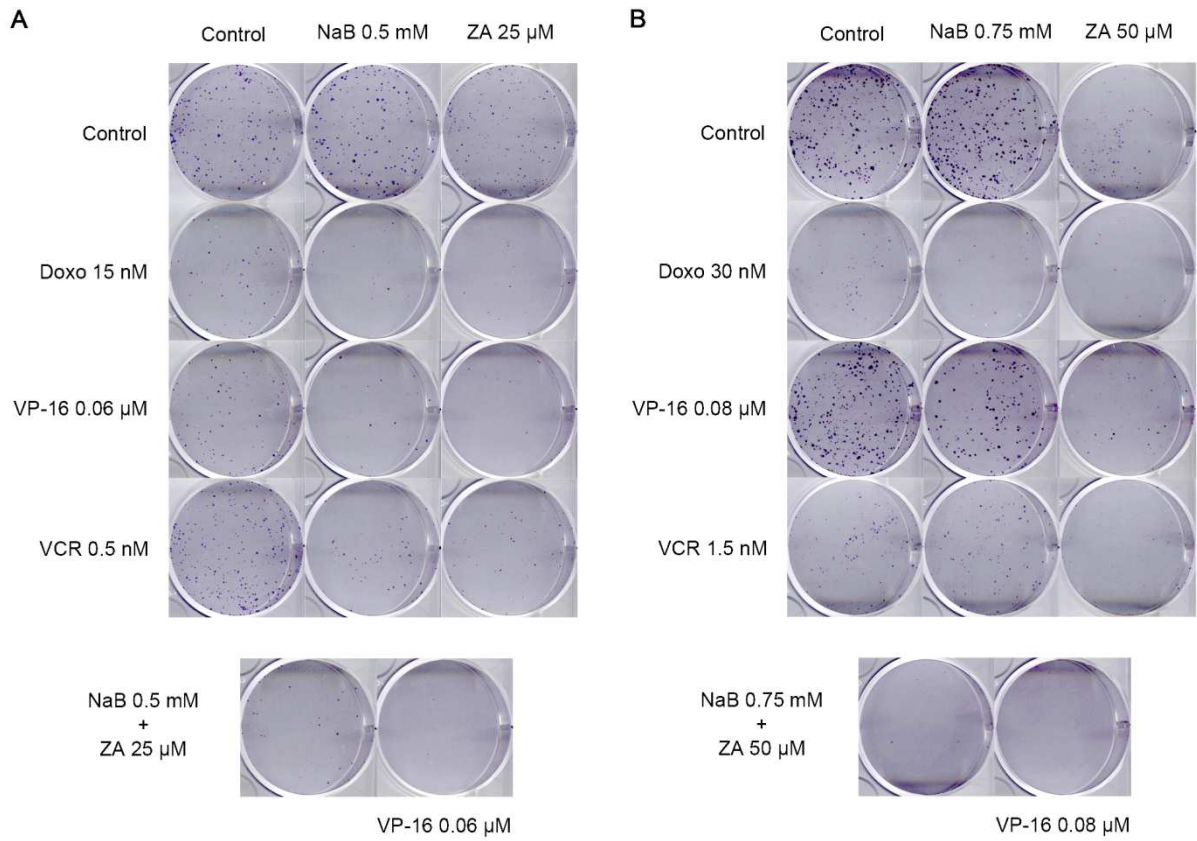


Figure 3. Representative pictures of cell survival experiments performed in triplicate with SK-ES-1 (A) and RD-ES (B) cells.

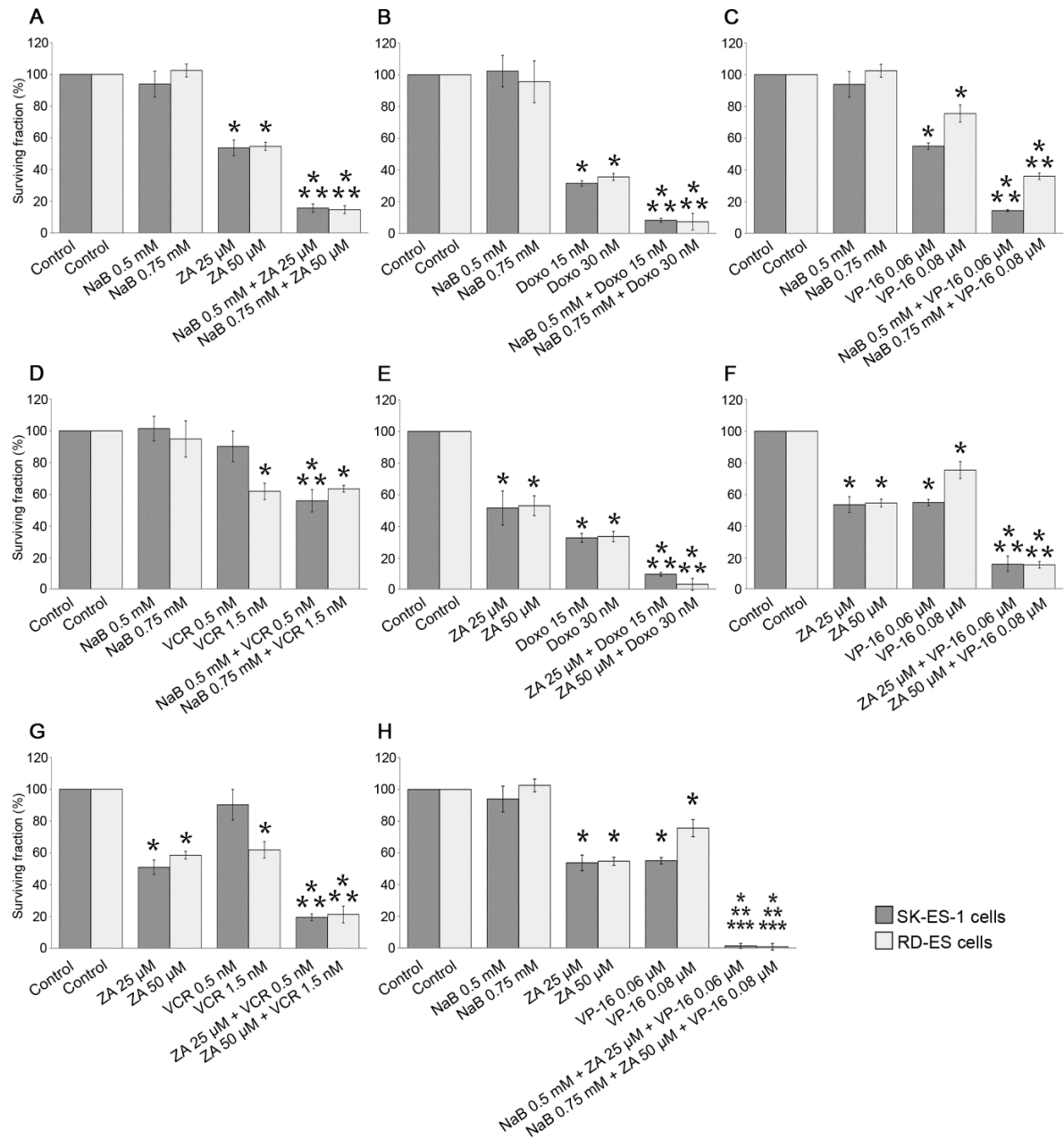


Figure 4. Combination effects of sodium butyrate (NaB) and/or zoledronic acid (ZA) and doxorubicin (Doxo), etoposide (VP-16) or vincristine (VCR) on suppression of colony formation in Ewing sarcoma cells. Colony formation of SK-ES-1 and RD-ES cells treated with **(A)** NaB 0.5 or 0.75 mM and ZA 25 or 50 μ M, **(B)** NaB 0.5 or 0.75 mM and Doxo 15 or 30 nM, **(C)** NaB 0.5 or 0.75 mM and VP-16

0.06 or 0.08 μM , **(D)** NaB 0.5 or 0.75 mM and VCR 0.5 or 1.5 nM, **(E)** ZA 25 or 50 μM and Doxo 15 or 30 nM, **(F)** ZA 25 or 50 μM and VP-16 0.06 or 0.08 μM , **(G)** ZA 25 or 50 μM VCR 0.5 or 1.5 nM, **(H)** NaB 0.5 or 0.75 mM and VP-16 0.06 or 0.08 μM and ZA 25 or 50 μM , respectively, for 72 h. The assay was initiated by plating 1×10^3 cells per well into 6-well plates. After 10-14 days, cells were fixed and stained with crystal violet as described in Material and Methods. Colony formation was analyzed by optimized digital counting colonies of clonogenic assays using Image J software. The results are shown as the mean \pm SEM percentage surviving fraction for three different experiments. *P* value was determined using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Tukey-Kramer test, $P < 0.05$ was considered significant. *, $P < 0.05$ versus control. **, $P < 0.05$ versus single agents. ***, $P < 0.05$ versus double treatments.

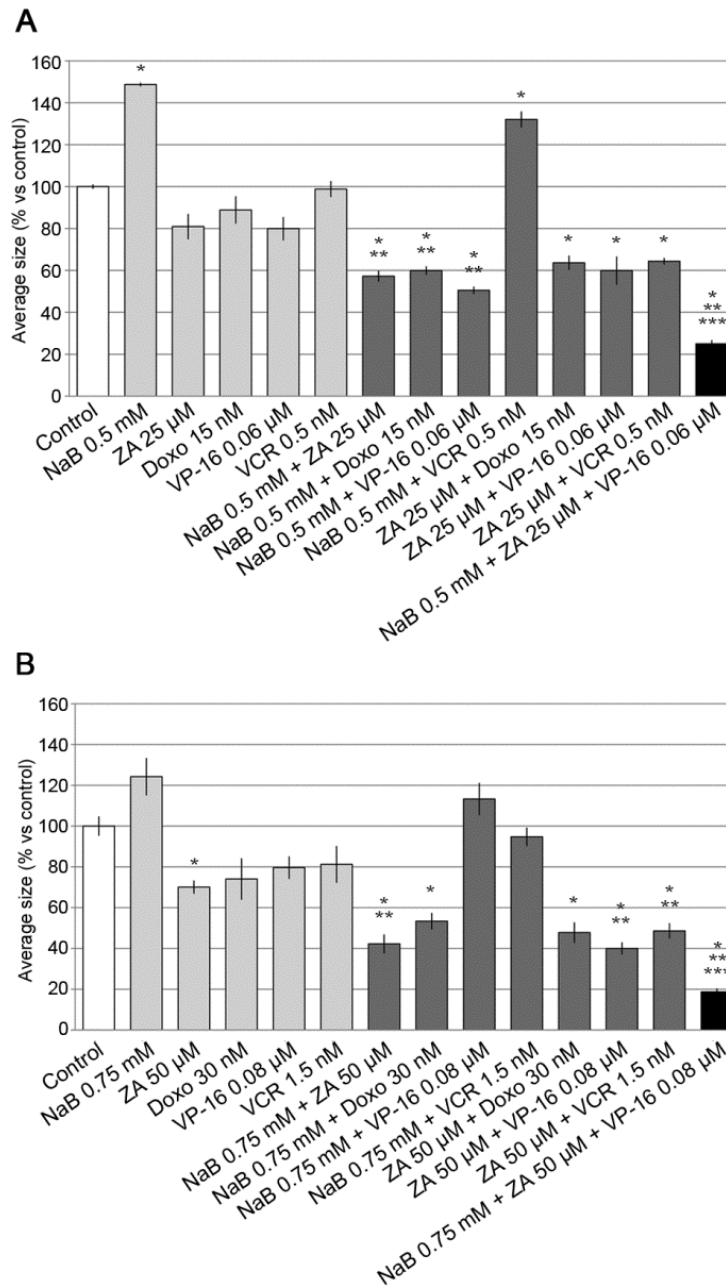


Figure 5. Effects of sodium butyrate (NaB), zoledronic acid (ZA), doxorubicin (Doxo), etoposide (VP-16) or vincristine (VCR) and different combinations of these drugs on average size of the colonies formed in clonogenic assay in Ewing sarcoma cells. After evaluating the number of colonies formed in surviving assay, the average size of colonies was also determined by optimized digital

counting colonies of clonogenic assays using Image J software in SK-ES-1 **(A)** and RD-ES **(B)** cells. The average size of colonies for each treatment is expressed as % mean of control and standard deviation are shown (*error bars*). *P* value was determined using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Tukey-Kramer test, *P*<0.05 was considered significant. *, *P*<0.05 versus control. **, *P*<0.05 versus single agents. ***, *P*<0.05 versus double treatments.

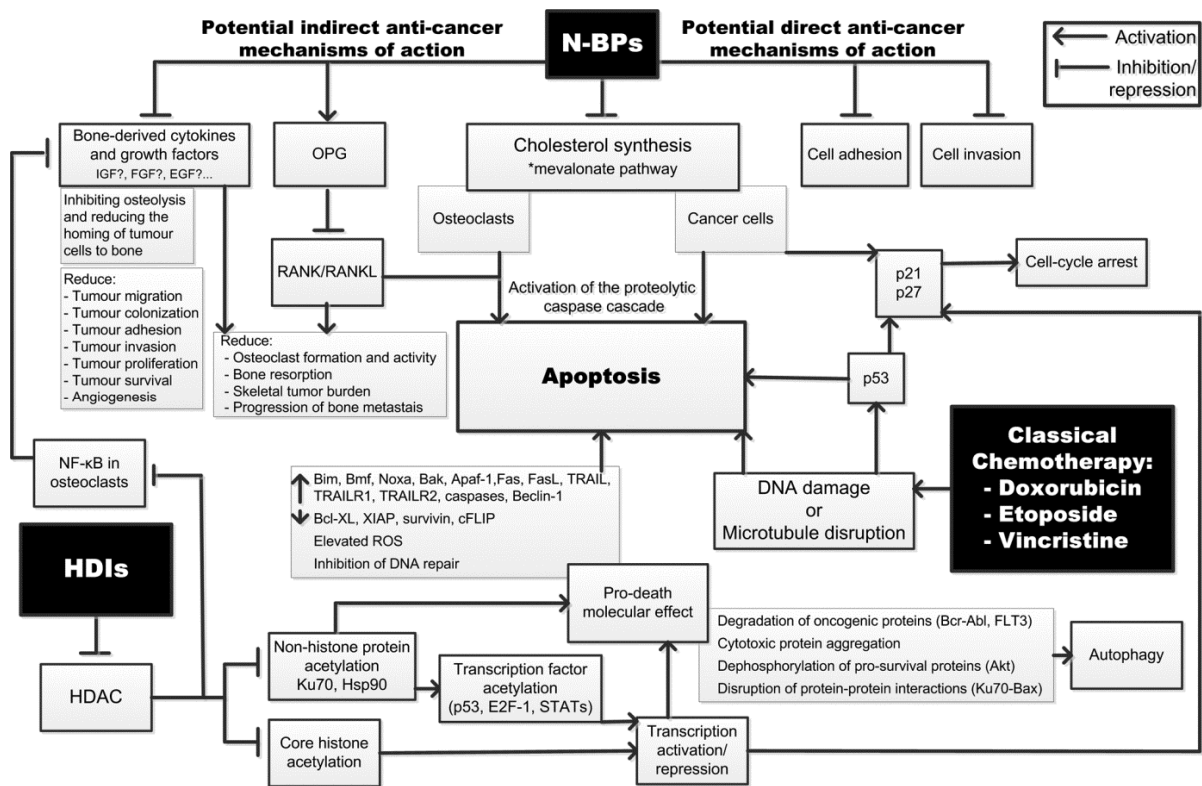


Figure 6. Schematic representation of the anti-tumor activity of the nitrogen-containing bisphosphonate family (N-BPs), histone deacetylase inhibitors (HDIs) and classical chemotherapeutic drugs (doxorubicin, etoposide and vincristine) as shown in pre-clinical studies. Recent studies have demonstrated synergistic anti-tumor effects when combining BPs, HDIs and cytotoxic agents. The molecular mechanisms by which these combinations exert their antitumor effects have not yet been elucidated, but, it is possible that they are due to a complex combination of induction of proapoptotic proteins and suppression of cell cycle proteins.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nossos experimentos foram cuidadosamente desenhados para avaliar *in vitro* os efeitos de diferentes associações entre NaB (HDI), ZA (bifosfonato) e antineoplásicos clássicos (amplamente usados no tratamento atual de ES) sobre a proliferação e sobrevivência de células de sarcoma de Ewing. Curvas de doses foram realizadas para se estabelecer as menores concentrações destes agentes que significativamente reduziam a proliferação celular sem produzir morte celular significativa, quando comparados ao controle. Administrando estas substâncias em baixas concentrações, permitiu-nos avaliar com maior propriedade se NaB ou ZA, de fato, alterava os efeitos gerados por cada composto testado.

Nós hipotetizamos que ZA e NaB poderiam mostrar efeitos citotóxicos sinérgicos quando combinados entre si ou quando em associação com fármacos antineoplásicos clássicos nas linhagens celulares humanas de sarcoma de Ewing, SK-ES-1 e RD-ES. Os nossos resultados demonstram claramente que o HDI ou o bisfosfonato testados, quando utilizados em monoterapia, revelaram uma significativa inibição da proliferação e viabilidade de ambas as linhagens celulares. Mais importante, contudo, é que a combinação de NaB com ZA teve um efeito citotóxico sinérgico em ambas as células de ES quando comparado com qualquer dos agentes em monoterapia. Além disso, estes resultados foram confirmados por ensaios clonogénicos, sugerindo que estes efeitos se estenderam ou se intensificaram por um período de tempo maior. Os tratamentos combinados entre NaB ou ZA e antineoplásicos clássicos também mostraram efeitos citotóxicos sinérgicos tanto em 72 h quanto 10-14 dias após os tratamentos, nas células SK-ES-1, quando comparados com qualquer agente em monoterapia. A linhagem celular

RD-ES se mostrou mais resistente aos tratamentos empregados. Em relação às associações testadas com antineoplásicos clássicos, os tratamentos combinados de NaB com ZA, NaB ou ZA com Doxo e, especialmente, NaB e/ou ZA com VP-16 se mostraram as alternativas mais promissoras para o desenvolvimento de novas terapias contra o sarcoma de Ewing.

Esse estudo vai de encontro aos objetivos estabelecidos pela “Rede Europeia para Pesquisa do Câncer em Crianças e Adolescentes (ENCCA)”, conforme descrito em “A primeira cúpula europeia de pesquisa interdisciplinar em sarcoma de Ewing”, e fornece dados suficientes para permitir discussões em relação a novas abordagens terapêuticas para o tratamento da família de tumores de Ewing. O maior legado que este estudo traz é mostrar que é plausível, em sarcoma de Ewing e doenças relacionadas, a utilização de regimes combinados (usando HDIs e bifosfonatos) que permitam a obtenção de tratamentos mais eficazes e, ao mesmo tempo, que produzam menores efeitos colaterais, toxicidade e resistência, que são comumente observados na prática clínica. Por laudo lado, é nítido que investigações adicionais são necessárias, especialmente no âmbito clínico, para consolidar o uso de HDIs e de bifosfonatos no tratamento de sarcoma de Ewing. Os resultados apresentados neste estudo fornecem as bases para futuras avaliações destas combinações em ensaios clínicos.

Uma melhor compreensão dos mecanismos pelos quais NaB e ZA aumentam os efeitos um do outro (efeito sinérgico) também é necessário, a fim de se potenciar estes efeitos e se desenvolver modelos farmacofóricos que permitam o desenvolvimento de substâncias semelhantes mais eficazes e seguras para serem utilizadas na terapia adjuvante. Neste trabalho, ainda apresentamos uma representação esquemática teórica dos principais mecanismos anticancerígenos

atribuídos aos HDIs, BPs e antineoplásicos clássicos testados. Analisando conjuntamente os mesmos, pôde-se inferir que os mecanismos moleculares pelos quais os cotratamentos exercem os seus efeitos consistem em uma complexa combinação de indução de proteínas pró-apoptóticas com a supressão de proteínas do ciclo celular. Acreditamos que estes são os pontos-chave para uma melhor compreensão dos mecanismos pelos quais as combinações testadas exercem efeitos antitumorais sinérgicos. A partir dos resultados obtidos, esforços fazem-se necessários para que se possa entender melhor esses mecanismos.