

LARISSA SCHIMIDT ROSSETI

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA ACETONA CIANIDRINA EM MODELO
EXPERIMENTAL DE CARCINOMA MAMÁRIO (4T1LUC)**

CAMPO GRANDE
2018

LARISSA SCHIMIDT ROSSETI

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA ACETONA CIANIDRINA EM MODELO
EXPERIMENTAL DE CARCINOMA MAMÁRIO (4T1LUC)**

Dissertação apresentada a Pós-
Graduação Saúde e
Desenvolvimento na Região Centro-
oeste, FAMED/UFMS, para obtenção
do título de Mestre.

Orientador: Profa. Dra. Landara
Schettert Silva.

CAMPO GRANDE
2018

*Dedico esse trabalho aos meus pais Adalberto (in memoriam)
e Sônia, com todo meu amor e gratidão, por tudo que fizeram por
mim ao longo da vida.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me achar merecedora de mais essa benção. A presente dissertação de mestrado não poderia chegar a bom porto sem o precioso apoio de várias pessoas.

Não posso deixar de agradecer a minha orientadora, Professora Doutora Landara Schettert Silva, por toda a paciência, empenho e sentido prático com que sempre me orientou neste trabalho. Muito obrigada por me ter dado todo apoio quando necessário sem nunca me desmotivar.

Desejo igualmente agradecer a todos os meus colegas do Mestrado em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, especialmente ao meu colega e amigo Igor Domingos de Souza, cujo apoio, encorajamento e amizade estiveram presentes em todos os momentos.

RESUMO

O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito antitumoral da acetona cianidrina em modelo de carcinoma (4T1LUC). Foram utilizados 12 camundongos da linhagem hairless (HRS/J), sendo 06 machos e 06 fêmeas adultos. Foram distribuídos em um grupo controle e um grupo tratado, que receberam acetona cianidrina na dose de 1,5mg/kg por via intraperitoneal no sétimo e décimo segundo dia após a inoculação e submetidos a eutanásia três dias após a última aplicação. Todos os animais foram submetidos ao exame de RX para verificação da presença ou ausência do tumor. Nos machos e fêmeas tratados, houve crescimento do tumor inoculado por via subcutânea (SC) e não houve crescimento do tumor inoculado por via intraperitoneal (IP). Nos machos e fêmeas não tratados houve crescimento do tumor por via SC e não houve crescimento do tumor inoculado por via IP. Pesquisas relacionadas ao combate ao câncer têm proporcionado inegáveis avanços importantes quanto à complexidade de desenvolvimento do tumor, notadamente a respeito dos processos moleculares que constituem a estrutura que permite ou faculta a transformação progressiva de células sadias em derivados extremamente malignos.

Palavras-chave. Carcinoma Mamário, Modelo Experimental, Acetona Cianídrica, Remissão de Tumor

ABSTRACT

The antitumor effect of acetone cyanidrin in murine carcinoma model (4T1LUC) was evaluated in 12 hairless mice (HRS / J), being 06 males and 06 adult females. The treated animals received acetone cyanohydrin at a dose of 1,5mg / kg intraperitoneally on the seventh and twelfth day after inoculation and submitted to euthanasia three days after the last application. All animals underwent X-ray examination to verify the presence or absence of the tumor. In the treated males and females, there was growth of the tumor inoculated SC and there was no growth of the inoculated tumor via IP. In untreated males and females, there was tumor growth via SC and there was no tumor growth inoculated via IP. Research related to the fight against cancer has provided undeniable important advances in the complexity of tumor development, notably regarding the molecular processes that constitute the structure that allows or enables the progressive transformation of healthy cells into extremely malignant derivatives.

Keywords. Murine Mammary Carcinoma, Experimental Model, Cyanidric Acetone, Tumor Remission

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	13
2.1 CÂNCER.....	13
2.2 MODELO EXPERIMENTAL DO CARCINOMA MAMÁRIO (4T1 LUC).....	16
2.3 EFEITO DA ACETONA CIANIDRINA NA REMISSÃO DE TUMORES.....	19
3 OBJETIVOS.....	23
3.1 OBJETIVO GERAL.....	23
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
4 METODOLOGIA.....	24
4.1 TIPO DE ESTUDO.....	24
4.2 AMOSTRA/DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	24
4.3 CULTIVO DAS CÉLULAS TUMORAIS.....	25
4.4 PROCEDIMENTOS.....	26
4.5 EUTANÁSIA E COLETA DO MATERIAL.....	27
5 RESULTADOS.....	29
6 DISCUSSÃO.....	30
7 CONCLUSÃO.....	33
REFERÊNCIAS.....	34
ANEXO I.....	38
ANEXO II.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC - Acetona Cianidrina

BLI - Bioluminescência

CT - Tomografia computadorizada

2D - Duas dimensões

3D - Três dimensões

FAMED - Faculdade de Medicina

FLI - Fluorescência

IP - Inoculado por via introperitoneal

KVA - Uma unidade de medida que corresponde a 10^3 voltamperes (ou 1.000 VA em notação decimal).

NIR - Núcleo Interno de Regulação

TFD - Terapia Fotodinâmica

OMS - Organização Mundial de Saúde

PPGSD - Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste

RX - Raio X

SC - Inoculado por via subcutânea

UFMS - Universidade Federal de Campo Grande

UNB - Universidade de Brasília

LISTA DE SÍMBOLOS

°C Graus Celsius

CO₂ Dióxido de Carbono ou Gás Carbônico

cm² Centímetro quadrado

DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium

µg Micrograma

mL Mililitro

Mg Miligrama

Kg Kilograma

rpm Rotações por minuto

U União

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Camundongo hairless (HRS/J) Fonte – Biotério UFMS.....24
- Figura 2.** Xtreme in vivo ii/bruker localizado no laboratório de modelos experimentais de doença do ppgsd/ famed.....27
- Figura 3.** Fotografia mostrando volume verificado macroscopicamente no dorso do animal, local onde foi feito o enxerto (seta).....28
- Figura 4.** Fotografia (esquerda) mostrando a presença do tumor no subcutâneo de um animal do grupo controle (seta). Animais posicionados para palpação e inspeção de massa tumoral conforme grupos tratado e controle (direita).....30
- Figura 5.** Imagem de RX (XTREME), mostrando presença (seta) ou ausência de tumor nos animais do grupo tratado.....31
- Figura 6.** Imagem de RX, do XTREME, mostrando a presença de tumores no dorso dos animais do grupo controle (seta).....31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados do crescimento tumoral nos sítios inoculados nos animais, conforme grupos tratados e controle, presença e ausência de massa tumoral visível ao 7, 12 e 15 dias de evolução após a inoculação das células.....	29
---	----

INTRODUÇÃO

O câncer é uma das moléstias que mais matam em todo o mundo, vitimando milhares de indivíduos todos os anos. Devido a esse fato é considerado um dos maiores inimigos da saúde e humana, tendo sido combatido incansavelmente ao longo da história. Nesse embate, um dos instrumentos utilizados na tentativa de compreensão da etiologia dos tumores, com o objetivo de combatê-lo, é o chamado modelo experimental.

Neste trabalho, utilizou-se o modelo experimental de carcinoma mamário 4T1LUC para avaliar os efeitos da acetona cianidrina em camundongos, dado que a literatura tem apresentado bons resultados no que tange à utilização dessa acetona na remissão de tumores em animais (RAMALHO et al., 2010).

Para a realização da pesquisa, utilizaram-se 12 camundongos da espécie hairless (HRS/J), seis machos e seis fêmeas oriundos do biotério central da UFMS. O objetivo que norteou o estudo foi o de avaliar o efeito antitumoral da acetona cianidrina em modelo de carcinoma mamário (4T1LUC), como já exposto. No entanto, o que se buscou foi, também, contribuir de alguma maneira com os esforços envidados pelos pesquisadores do grupo de carcinogênese da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, grupo este que tem se empenhado incansavelmente na busca de terapêuticas que possam ajudar no combate ao câncer no País.

Assim sendo, devido à importância do câncer de mama e à experiência do grupo de carcinogênese com o uso da acetona cianidrina, resolveu-se realizar um estudo experimental do tratamento de câncer mamário murinho com essa substância.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CÂNCER

O câncer pode ser entendido, grosso modo, como o crescimento descontrolado de células dos corpos, tanto humanos quanto de animais. Sua ação consiste em invadir tecidos e órgãos atrapalhando suas funções, o que pode levar à morte em casos cujo diagnóstico e o consequente início do tratamento foram tardios. Esse crescimento desordenado torna-se mais agressivo quando aliado a ele temos a migração dessas células para outras regiões do corpo (metástases). O câncer no Brasil é a segunda causa morte por doença (DENORAIS et. al., 2002; OMS, 2015).

Nos anos de 2016/2017, a estimativa de ocorrência de câncer girava entorno de 596.070 novos casos da doença no Brasil. Destes, esperavam-se 295.200 casos novos em homens e 300.870 casos entre as mulheres, acentuando a relevância do problema dessa doença no País.

No que se refere ao biênio 2018-2019, a estimativa para o Brasil prevê a incidência de aproximadamente 600 mil novos casos de câncer, para cada ano. Globalmente, a estimativa atualizada para o sub-registro, indica a possibilidade de ocorrência de 640 mil casos novos. Tais possibilidades denotam o perfil de uma nação marcada pela alta incidência de cânceres de próstata, pulmão, mama feminina e cólon e reto; apresentando, ainda, altas taxas para os cânceres do colo do útero, estômago e esôfago (INCA, 2017).

De acordo com os prognósticos, as maiores ocorrências trarão casos de cânceres de próstata (68 mil) em homens e mama (60 mil) em mulheres. Em termos de porcentagem, os tipos de câncer mais recorrentes em homens serão próstata (31,7%), pulmão (8,7%), intestino (8,1%), estômago (6,3%) e cavidade oral (5,2%). Nas mulheres, os cânceres de mama (29,5%), intestino (9,4%), colo do útero (8,1%), pulmão (6,2%) e tireoide (4,0%) figurarão entre os principais (BRASIL, 2016).

As taxas de incidência ajustadas por idade tanto para homens (217,27/100 mil) quanto para mulheres (191,78/100 mil) são consideradas

intermediárias e compatíveis com as apresentadas para países em desenvolvimento (BRASIL, 2016).

A distribuição da incidência por Região geográfica mostra que as Regiões Sul e Sudeste concentram 70% da ocorrência de casos novos; sendo que, na Região Sudeste, encontra-se quase a metade dessa incidência. Existe, entretanto, grande variação na magnitude e nos tipos de câncer entre as diferentes Regiões do Brasil. Nas Regiões Sul e Sudeste, o padrão da incidência mostra que predominam os cânceres de próstata e de mama feminina, bem como os cânceres de pulmão e de intestino (BRASIL, 2016).

A Região Centro-Oeste, apesar de semelhante, incorpora em seu perfil os cânceres do colo do útero e de estômago entre os mais incidentes. Nas Regiões Norte e Nordeste, apesar de também apresentarem os cânceres de próstata e mama feminina entre os principais, a incidência dos cânceres do colo do útero e estômago tem impacto importante nessa população. A Região Norte é a única do País na qual as taxas dos cânceres de mama e do colo do útero se equivalem entre as mulheres (BRASIL, 2016).

O Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA, 2017) reafirma seu propósito de fortalecer a vigilância de câncer publicando as estimativas para o biênio 2018-2019, com a certeza de que esta edição se constituirá em uma ferramenta a ser utilizada por gestores, profissionais da saúde e de áreas afins, bem como a sociedade em geral, no apoio à implementação das ações de prevenção e controle de câncer.

Para que possa se desenvolver, o câncer dependente não somente de transformações ocorridas no interior da própria célula modificada, mas também de inter-relações entre essas células e o seu microambiente. O câncer procede de mutações genéticas e algumas variações fisiológicas na célula são essenciais para que a doença se apresente. Dentre tais alterações, seis podem ser consideradas fundamentais na fisiologia celular e que facultam o crescimento tumoral: autossuficiência em sinais de crescimento, insensibilidade a sinais de inibição de crescimento, evasão da apoptose, potencial replicativo ilimitado, manutenção da angiogênese e, finalmente, invasão tecidual e metástase (PANTALEÃO, 2010).

De maneira geral, leciona Pantaleão (2010), os cânceres podem ser categorizados em Carcinomas – neoplasias originárias de tecidos epiteliais

(epidermoides, quando originado de epitélio; e adenocarcinomas, se oriundos de ductos e/ou glândulas), sarcomas (neoplasias originárias de tecidos conjuntivos, de preenchimento ou de sustentação), leucemias (neoplasias originárias de medula) e linfomas (neoplasias originárias de tecidos linfoides).

Conforme informações obtidas por Cabral (2016), o American Cancer Society categoriza o câncer como doença crônica, pertencendo, assim, ao grupo das doenças cardiovasculares, moléstias que acometem o aparelho respiratório e o diabetes. Doenças responsáveis por aproximadamente 70% das mortes ocorridas no mundo. Desse número, 15% de óbitos são causados pelos cânceres – o que numericamente equivaleria a 8.2 milhões de vítimas fatais da doença por ano.

Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) apresentados em 2017 informam que a cada ano 8,8 milhões de pessoas falecem de câncer, a maioria em países em que a renda é baixa e média – que demonstra um recrudescimento nos casos fatais desde 2012. Essa prevalência dos casos de câncer em países em que a renda é média e baixa se deve ao baixo índice de oferta de serviços de diagnóstico e tratamento. Isso devido aos frequentes problemas estruturais em relação à saúde nesses países. Um dos setores que mais sofrem é o destinado aos serviços de patologia. Conforme informações da OMS, em 2015, aproximadamente 35% dos países de baixa renda relataram que os serviços de patologia estavam geralmente disponíveis no setor público, em comparação com mais de 95% dos países de alta renda.

Dentre os vários tipos de câncer de mama, o que tem maior prevalência é o que atinge mulheres em diversas partes do mundo, tanto em países desenvolvidos quanto em emergentes. Isso ocorre devido à crescente longevidade da população mundial, o que acarretaria a elevação da incidência dessa neoplasia (TORRE et. al., 2015; SIEGEL et. al., 2016). No Brasil, em 2015, o câncer de mama foi responsável por 18 mil óbitos (OMS, 2015). Ainda conforme informações da Organização Mundial de Saúde (OMS, 2015), a expansão das mortes é um fenômeno global, haja vista que há 15 anos o total de óbitos não ultrapassava a marca de 6,9 milhões de indivíduos, passando para 8,1 milhões em 2010 e 8,8 milhões em 2015. De acordo com a OMS, a expansão de 22,2% no quantitativo de vítimas fatais em decorrência do câncer no mundo desde o início do século é uma das maiores já registradas pela medicina

moderna. Atualmente, uma a cada seis mortes no mundo é causada por câncer (OMS, 2017).

2.2 MODELO EXPERIMENTAL DO CARCINOMA MAMÁRIO (4T1 LUC)

Nos últimos anos, um número considerável de pesquisas tem se voltado para a análise dos processos que buscam entender a dinâmica dos tumores. Nesse sentido, esforços foram envidados para tentar encontrar a cura para as afecções que têm o câncer como principal agente etiológico. No que diz respeito ao conhecimento sobre a carcinogênese, a maior parte advém da análise de tecidos tumorais *in vitro*, especificamente aqueles em estágio bastante avançado de desenvolvimento, retirados de pacientes (PANTALEÃO, 2010).

No combate contra o câncer, um dos mais relevantes instrumentos são os modelos tumorais, já que têm como objetivo contribuir com o processo de investigação que promove abordagens diferentes no que tange ao diagnóstico por imagem do câncer, facultando que as hipóteses sejam testadas rigorosamente no contexto de um sistema biológico complexo. Nas últimas décadas, vieram a público uma gama considerável de técnicas e equipamentos que possibilitaram a obtenção de imagens de modelos tumorais de maneira não invasiva, com o objetivo de potencializar a utilidade de modelos de câncer *in vivo*. Procedimentos não invasivos são relevantes para aferir características da biologia do tumor, seus aspectos anatômicos e funcionais em cada animal de modo individual e dinâmico. A imagenologia, métodos que usam imagem como meio de diagnóstico, possibilita verificar aspectos da biologia do tumor que não são ostensivos e avaliar de forma não invasiva a resposta tumoral ao tratamento no decorrer do tempo (LYONS, 2015; WANG et. al., 2016).

A técnica que utiliza a imagem por bioluminescência é um método bastante comum de imagem para modelos de câncer, graças a sua sensibilidade apurada e processo que não envolve alta complexidade, considerada também muito segura e de custo justo. Contudo, face à imposição de transformar em nível genético as células alvo antes da imagem, não é comumente aplicável na clínica. No processo de bioluminescência, as células- alvo tumorais exteriorizam

um gene que faz manifestar luciferase e produzir luz quando é ministrado um determinado substrato químico não endógeno (MEZZANOTTE, 2014; STACER et. al., 2013, TSENG, 2016).

Outros esforços técnico-científicos têm sido envidados no combate ao câncer. Nesse sentido, muitas pesquisas têm sido realizadas fazendo uso da tecnologia de transfecção de tumores com proteínas fluorescentes para observar o comportamento dos tumores *in vivo*, bem como desenvolver o conhecimento a respeito da progressão tumoral e do processo de metástase (PANTALEÃO, 2010; TSENG, 2016). Esses procedimentos técnicos facultam aos pesquisadores verificar o processo que envolve a micro metástase *in vivo*, processo impossível de ser percebido utilizando métodos tradicionais.

Os processos que utilizam a Bioluminescência (BLI) e a Fluorescência (FLI) utilizam-se de componentes ópticos avançados, incluindo uma câmera CCD ultrasensível e dois conjuntos de filtros de excitação/emissão, que permitem que o sistema opere em ampla faixa espectral, visível à luz infravermelha próxima (NIR). A simples varredura 2D BLI/FLI para sinal de superfície oferece uma ferramenta poderosa para muitas aplicações em pesquisa pré-clínica, e os modos de varredura 3D BLI/FLI expandem os recursos deste sistema além da imagem ótica padrão. A bioluminescência adquirida no modo de digitalização 3D fornece assinaturas espectrais suficientemente brilhantes, diferindo com profundidade de fonte, para permitir a localização 3D e reconstrução precisa. O 3D, no modo de varredura de fluorescência, utiliza uma estratégia de transiluminação para fornecer luz de excitação, o que excita efetivamente o sinal do tecido profundo, o que permite a detecção e quantificação de fluorescência em modelos, como o câncer ortotópico e a inflamação pulmonar, que não podem ser visualizados de forma tão eficaz em 2D. O pareamento desses conjuntos de dados óticos 3D com o componente de tomografia computadorizada (CT) do sistema fornece contexto biologicamente relevante e anatomicamente preciso para melhor interpretar seus resultados de imagem (TSENG, 2016).

Para que se possa compreender com mais precisão a dinâmica dos processos associados à progressão neoplásica, têm sido propostos diversos modelos experimentais. Dentre eles, os camundongos figuram como o principal modelo experimental utilizado para representar a grande variedade de eventos

que ocorrem no desenvolvimento do câncer de mama humano. Dentre as vantagens da sua utilização estão: seu pequeno tamanho, o que facilita o seu alojamento e manipulação; rápida reprodução e longa vida útil; sequenciamento completo do seu genoma já disponível; manipulação genética com grande facilidade e por fim, compartilham muitas semelhanças fisiológicas com seres humanos (MANNING, BUCK et. al., 2016).

Atualmente são descritas 32.000 linhagens, dentre as quais estão as isogênicas, não isogênicas, mutantes, recombinantes, entre outras, cada linhagem é adequada a um tipo de estudo específico (EPPIG, MOTENKO et. al. 2015; CABRAL, 2016; PANTALEÃO, 2010). No que diz respeito ao câncer de mama, distintas linhagens murinas e modelos experimentais têm sido empregadas em pesquisas. Os modelos mais correntemente manipulados têm sido: espontâneos; espontâneos por mutações induzidas; induzidos por carcinogênese química, física ou biológica; xenoenxertos transplantáveis; isogênico transplantável (ALVARADO et. al. 2017).

Os modelos espontâneos são facilmente reconhecidos pelo surgimento natural dos tumores mamários – processo totalmente isento de interferência humana. Dentre estes estão algumas linhagens de camundongos como C3H (MAO, QU et. al., 2014), fêmeas Kunming (ZHENG, ZHOU et. al., 2014). Todavia, os modelos espontâneos não se limitam apenas a camundongos, sendo empregados também em cadelas (LIU, XIONG et. al. 2014) e felinos (WIESE, THAIWONG et. al., 2013; KOJIMA, et al. 1996; SEMI et. al., 2007).

No que tange aos modelos espontâneos por mutações induzidas, estes têm sua origem devido ao avanço na área de engenharia genética. Tais mutações são provocadas em embriões visando à formação de espécies geneticamente modificadas, as quais são posteriormente entrecruzadas para constituírem animais em homozigose ou heterozigose da transformação gênica induzida. Essa mutação genética é capaz de gerar tumores espontaneamente durante o processo de crescimento do animal; dado que as mutações são dirigidas a genes sabidamente associados à carcinogênese mamária (PANTALEÃO, 2010).

Estes modelos objetivam assemelhar-se ao que acontece em seres humanos, e dentre eles estão os modelos FVB/N-Tg (MMTVPyMT) 634Mul (Wilson, Bachawal et al. 2014) e C3(1)/SV40Tag (Steiner, Davis et al. 2014).

Outros modelos geneticamente modificados também têm sido utilizados. Muitos deles são knockout para os genes de interesse e assim permitem o estudo funcional deste produto gênico específico frente a um tumor transplantado (DRANOFF, 2011).

Conforme Pantaleão (2010), dentre os modelos experimentais de câncer, o carcinoma mamário 4T1 é um dos modelos mais utilizados no exame e melhor entendimento da tipologia biológica dos tumores. É reconhecido pela agressividade de sua ação, sendo uma linhagem celular profundamente tumorigênica e hostil, em que apresentam metástases em diversos órgãos do organismo afetado. No que tange ao aspecto morfológico do tumor, o carcinoma mamário 4T1 se caracteriza pela propagação epitelial maligna em ajuste sólido, com propagação de células pleomórficas e alto padrão mitótico.

2.3 EFEITO DA ACETONA CIANÍDRINA NA REMISSÃO DE TUMORES

Ramalho et al., (2010) analisaram o efeito antitumoral da acetona cianidrina em células do tumor ascítico de Ehrlich e em linfócitos humanos *in vitro*. Foi possível verificar um efeito citotóxico dose dependente frente a essas células tumorais, onde, nas concentrações de 20 e 30 1ug/ml, ocorreram 100% de morte celular em apenas 1 e 2 horas, respectivamente e, nas doses mais baixas de 0,5 – 1,0 e 2,0 1ug/ml, o efeito citotóxico foi menos intenso, aumentando gradativamente com o tempo. Nas concentrações baixas de 0,5 – 1,0 e 2,0 1ug/ml, foram observadas mais de 90% de morte celular somente após 24 horas de incubação, o que evidencia a capacidade da célula tumoral de se intoxicar de maneira irreversível e acumulativa com a acetona cianidrina, quando comparadas com os resultados apresentados pelos linfócitos humanos que, nas mesmas doses e nos mesmos tempos de incubação, atingiram um máximo de 30% de morte celular. Os autores sugerem que há uma atividade da rodanase diferenciada entre as duas células.

A ação da acetona cianidrina baseia-se em seu metabólito cianeto que atua de forma letal, na célula cancerígena, aproveitando uma falha do metabolismo do cianeto nessas células, devido a uma ação reduzida da enzima

rodanase que faz a desintoxicação das células. A falha na rodanase seria desencadeada por uma falta de substrato para a reação, conhecido como sulfane sùlfur, responsável por fornecer enxofre para a eliminação do cianeto na forma de tiocianato. Iciek e Wlodek (2001) relataram que a regressão de tumores transplantados em camundongos e inibição do tumor induzido por cancerígenos, por meio do uso de diferentes precursores sulfane sùlfur, confirmam a hipótese acima. Um ambiente perfeito para a intoxicação acumulativa por cianeto é proporcionado nas células cancerígenas, devido à rodanase ser apenas residual.

Atualmente, encontram-se revisões na literatura com informações como características dos compostos sulfane e sua afinidade em reagir com cianeto, bem como evidência do metabólito do enxofre nos processos de malignidade, a deficiência de cistationase em muitas células malignas e diferenças no metabolismo de hemocisteína entre células normais e malignas. Além disso, evidenciam, também, uma importante informação quanto ao defeito no metabolismo do enxofre em células cancerosas, juntamente com os efeitos antitumorais *in vivo* de fontes de sulfane sùlfur. Esse fato parece demonstrar que a proliferação incontrolável de células malignas pode estar relacionada a uma deficiência do sulfane sùlfur e a uma ação incontrolável de um conjunto enzimático que, normalmente, é inativado por ele. Tumores com altas taxas de crescimento podem ter atividades mais baixas da enxofre-transferase (rodanase, por exemplo) do que o tecido normal ou tumores com baixas taxas de crescimento.

A quimioterapia cianogênica, usando acetona cianidrina como fonte de cianeto, foi capaz de promover no Tumor Ascítico de Ehrlich uma redução do volume tumoral, uma diminuição no número total de células tumorais, bem como impedir o desenvolvimento tumoral em 20% dos animais tratados. No Tumor Sólido de Ehrlich, foi capaz de induzir uma inibição no crescimento tumoral, além de produzir nele um aumento na área de necrose (RAMALHO, 2014).

Outros trabalhos, com outros princípios ativos, apresentam também sucesso na remissão do Tumor de Ehrlich. Fukumasu (2008) pesquisou a ação do guaraná na progressão do tumor em questão. De acordo com os resultados do trabalho, há uma considerável desaceleração de células cancerosas em camundongos alimentados com guaraná durante sete dias antes de terem o

câncer induzido pelos pesquisadores; e mais 14 dias após o estabelecimento da doença.

Bicalho (2010) e Mijan (2012) também identificaram remissão do tumor através do uso da Terapia Fotodinâmica mediada pela Alumínio-Cloro-Ftalocianina (AICIFt) em formulação lipossomal. Essas análises demonstraram que 100% dos animais submetidos a tratamento com a TFD foi possível perceber a remissão completa dos tumores inicialmente induzidos. Nas análises histopatológicas realizadas pelos pesquisadores supracitados, percebeu-se que a TFD agiu ostensivamente na eliminação tumoral pela indução de citotoxicidade, o que leva a um intenso processo de necrose. O processo em questão foi capaz de elidir as células tumorais; contudo, acarretou a destruição do tecido muscular adjacente.

Não obstante, depois de decorridos 21 dias do término da TFD, observou-se um processo de cicatrização, com a substituição do tecido muscular por tecido conjuntivo. Dessa forma, a Terapia Fotodinâmica foi eficaz na remissão completa dos tumores induzidos nas línguas de camundongos Balb-c a partir de suspensões celulares do tumor ascítico de Ehrlich (BICALHO, 2010).

O Tumor de Ehrlich é definido na literatura especializada como uma neoplasia transplantável de origem epitelial maligna, assemelhando-se a um adenocarcinoma mamário de camundongo fêmea. Foi apresentado em 1986 por Ehrlich e descrito em 1906 como um carcinoma mamário de camundongos fêmeas. Inicialmente, o tumor foi desenvolvido experimentalmente sob a forma sólida, sendo transplantado em animais da mesma espécie (DAGLI, 1989). Mas em 1932, Loewenthal e Jahn apresentaram a forma ascítica, isto é, a forma desenvolvida no peritônio de animais inoculados com células tumorais.

O Tumor de Ehrlich é um modelo caracterizado pela praticidade, sendo largamente utilizado em análise antineoplásica por causa do reduzido intervalo de tempo para estudo, dado que a progressão evolutiva da neoplasia ocorre com muita rapidez, e também pela existência de conhecimento prévio da quantidade de células do tumor inoculadas nos animais (RAMALHO, 2014).

Consta na literatura inúmeros trabalhos referentes ao uso de substâncias cianogênicas, como a linamarina e amigdalina (CHEN, et. al., 2013; FUKUDA et. al., 2003; JUKES, 1976; KOUSPAROU et al., 2002; LAGMAN; NAVARRO, 1957; STOCK et al., 1978; WODINSKY, SWINIARSKI, 1975; SYRIGUS et. al., 1998).

Conquanto, pode-se encontrar um número igualmente elevado de artigos com questões controversas associadas ao seu uso (GREENBERG, 1975; MOSS, KHALIL, 1981; SABER, 1977; VICKERS et al., 2006).

Ribeiro (2012), após avaliação histopatológica das alterações morfológicas causadas pela acetona cianidrina em coração, pulmão, fígado e rins de camundongos sadios, concluiu que houve alterações morfológicas do tipo lesão celular que levam à apoptose, bem como adaptação celular, caracterizadas por degeneração dos túbulos remais e diminuição do tamanho e número dos glomérulos renais. No pulmão, foram encontradas áreas de fibrose, presença de macrófagos no espaço alveolar, septos espessados e desorganização estrutural. Houve uma desorganização generalizada realizada na estrutura do fígado, hepatócitos de tamanhos variados e perda de núcleo. E, no coração, presença de células adiposas, hemorragia e fibrose.

Dessa forma, como observado por Ramalho (2014, p. 18), demonstrar “a ação do cianeto proveniente da acetona cianidrina em pH alcalino, explorando a deficiência de sulfane sùlfur em células malignas e promover nelas uma intoxicação irreversível”, mas, alerta o autor “com mínimo efeito nas demais células normais, prevê a descoberta de novas substâncias para o tratamento do câncer”.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

Avaliar o efeito antitumoral da acetona cianidrina em modelo de carcinoma mamário (4T1LUC).

3.2 Objetivos Específicos

Avaliar o crescimento das células do tumor após tratamento com acetona cianidrina.

Avaliar a evolução do tumor nos animais tratados e não tratados através da fluorescência.

Verificar o aparecimento de metástases do tumor, através da imagem de RX /fluorescência

4 METODOLOGIA

4.1. Tipo de pesquisa

Pesquisa experimental. Optou-se por esse tipo de pesquisa devido ao fato de serem os modelos experimentais com animais os que mais possibilitam o acesso ao conhecimento da fisiologia, da etiopatogenia das doenças e da ação de medicamentos que estão diretamente relacionados com o combate a doenças, dentre elas o câncer de mama.

4.2 Amostra/Delineamento experimental:

Foram utilizados 12 camundongos da linhagem hairless (HRS/J) (Figura 1), sendo 06 machos e 06 fêmeas adultos oriundos do biotério central da UFMS.

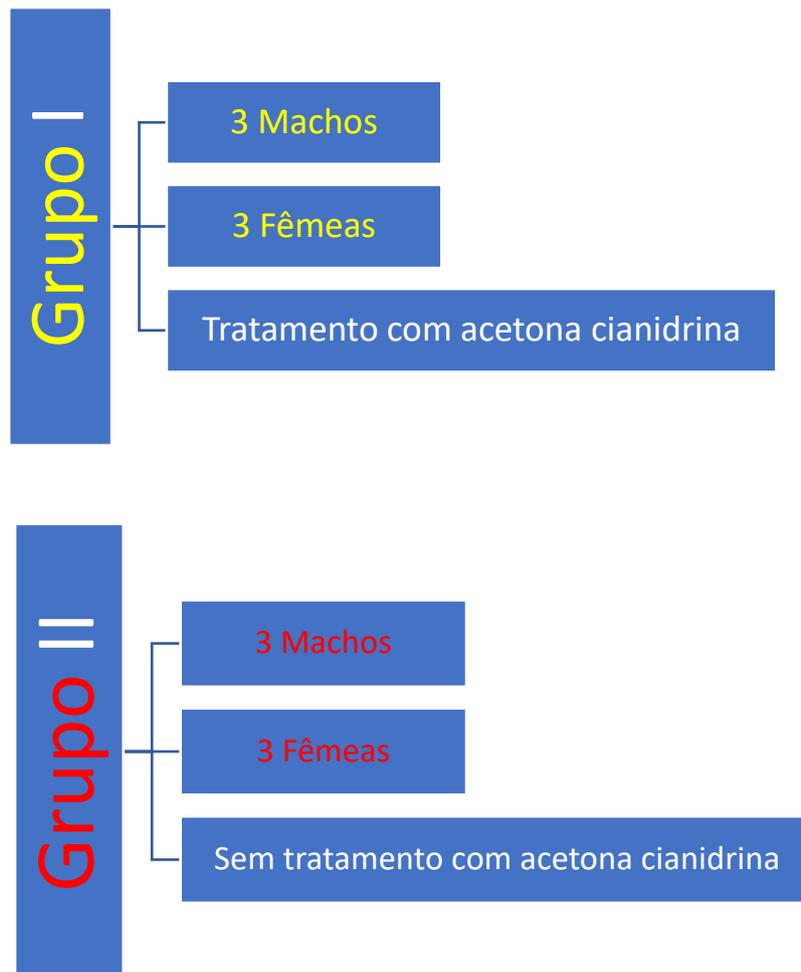
Os animais foram distribuídos em 2 grupos:

Grupo 1: 3 machos e 3 fêmeas que receberam imunossupressão e tratamento com acetona cianidrina

Grupo 2: com 3 machos e 3 fêmeas imunossuprimidos sem tratamento



Figura 1. Camundongo hairless (HRS/J) Fonte – Biotério UFMS



4.3.Cultivo das células tumorais:

A linhagem celular 4T1-Luc utilizada nesse estudo foi fornecida pela Universidade de Brasília - UnB. As células foram cultivadas inicialmente em 5,0 mL de meio de cultura em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco®) acrescido de 10% de soro fetal bovino (Gibco®) e 1% de antibiótico (Penicilina/Estreptomicina – 10.000U, LGC Biotecnologia). O cultivo celular se deu em estufa umidificada contendo 5% de CO₂ a 37°C, sistema de monocamada e em frasco de 25cm².

Após o cultivo inicial, as células foram tripsinizadas com 1,0 mL de tripsina-EDTA (0,25%, Gibco®). Em seguida, a tripsina foi inativada com 5 mL de meio de cultura suplementado. A suspensão celular foi centrifugada a

1200rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células plaqueadas em frascos de 75cm². As culturas foram mantidas com 10mL de DMEM suplementado e a tripsinização foi realizada com 2mL de tripsina. As células cresceram em sistema de monocultura até atingir confluência em número necessário para o xenoenxerto.

Antes da inoculação as células foram testadas com a probe de luciferase no Xtreme in vivo para confirmação da bioluminescência.

4.4. Procedimentos:

Os procedimentos experimentais foram conduzidos segundo as diretrizes da Declaração Universal de Direitos Animais e com aprovação do Comitê de Ética em Uso Animal da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) 793/216.

Os animais foram mantidos em ambiente climatizado a 23^oC, em caixas apropriadas e forradas com maravalha sendo trocada 3 vezes na semana. A alimentação era feita com ração NUVILAB CR-1 própria para animais de laboratório. Alimento e água eram fornecidos à vontade.

Os animais foram imunossuprimidos com dexametasona na dose de 5mg/kg por via subcutânea diariamente durante 7 dias e posteriormente as células foram inoculadas nos animais. Para o xenoenxerto, foram injetadas 1 x 10⁷ células murinas de 4T1-Luc por via subcutânea, no dorso e a mesma concentração foi injetada por via intraperitoneal.

Os animais receberam tratamento com acetona cianidrina na dose de 1,5mg/kg por via intraperitoneal no sétimo e décimo segundo dia após a inoculação e submetidos a eutanásia três dias após a última aplicação. Foi feita a diluição da acetona cianidrina usando-se 1mg em 5ml de solução salina e ministrado 0,3ml por animal, sendo a dose de 1,5mg/kg de peso. Todos os animais foram submetidos ao exame no Xtreme in vivo para verificação da presença ou ausência do tumor. (Figura 2)



Figura 2. Xtreme in vivo ii/bruker localizado no laboratório de modelos experimentais de doença do ppgsd/ famed

O aparelho de RX in vivo Xtreme, foi calibrado conforme parâmetros de KVA e tempo de exposição padronizados para todos os animais.

4.5. Eutanásia e coleta do material

No 15º dia de observação, todos os animais foram submetidos a eutanásia, mediante dose letal de anestésico. Após confirmação do óbito, foram retirados os tumores localizados no dorso, assim como foram coletados o pulmão e fígado para busca de metástases e/ou crescimento tumoral em peritônio visceral. Foi feita observação macroscópica da presença ou ausência do tumor conforme o grupo (figura 3).

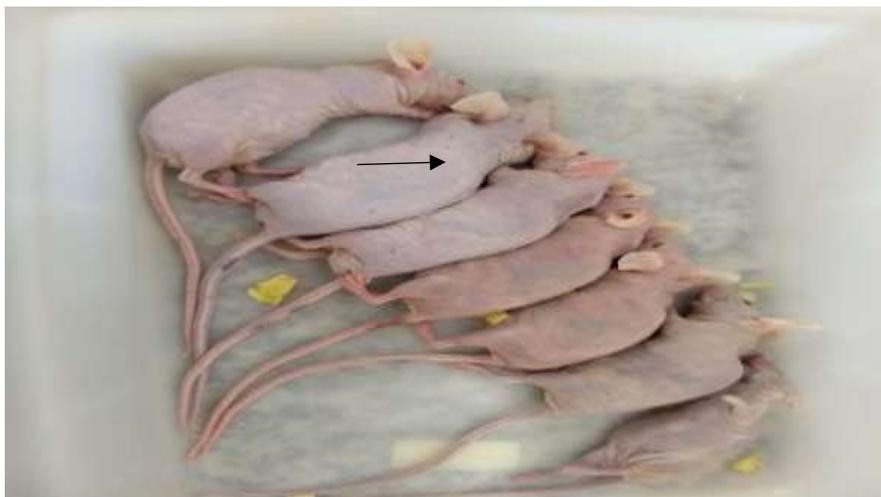


Figura 3. Fotografia mostrando volume verificado macroscopicamente no Dorso do animal, local onde foi feito o enxerto (seta)

5 RESULTADOS

Nos animais machos e fêmeas tratados, houve crescimento do tumor inoculado por via SC e não houve crescimento do tumor inoculado por via IP. Nos animais machos e fêmeas não tratados houve crescimento do tumor por via SC e não houve crescimento do tumor inoculado por via IP. (Tabela 1)

Tabela 1. Resultados do crescimento tumoral nos sítios inoculados nos animais, conforme grupos tratados e controle, presença e ausência de massa tumoral visível ao 7, 12 e 15 dias de evolução após a inoculação das células.

Identificação	Grupo 1 tratado						Grupo 2 - controle					
	Subcutâneo			Peritoneal			Subcutâneo			Peritoneal		
	7	12	15	7	12	15	7	12	15	7	12	15
1	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-
2	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-
3	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
4	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total	0	4	2	0	0	0	0	4	4	0	0	0

6 DISCUSSÃO

A mesma técnica, inoculação por SC, utilizada por outros pesquisadores também apresentou crescimento do tumor (CASTELLÓ, 2017; RAMALHO, 2014). No caso do uso da Acetona Cianidrina, houve remissão do tumor, como já verificado por Ramalho (2014).

Ramalho, Aydos e Cereda, (2010 apud RIBEIRO, 2012), conseguiram desenvolver uma pesquisa *in vitro* na qual utilizando a acetona cianidrina oriunda da linamarina, obtida a partir da extração da mandioca, em oposição às células tumorais extraídas de camundongos. Trata-se, segundo Ribeiro, de uma matéria de origem natural, mas que pode ser sintetizada em laboratório por meio de processo relativamente simples.

O estudo, afirma Ribeiro (2012, p. 15) “[...] confirma a hipótese de que é possível avaliar o efeito do cianeto sobre células tumorais usando um modelo de liberação diferente daquele relatado na literatura, que usa a terapia gênica para produzir cianeto livre, a partir de linamarina.”

Houve crescimento de massa tumoral, em forma de nódulo de cor branca (figura 4) em 4 dos animais inoculados no sítio subcutâneo (66%), em ambos os grupos.



Figura 4. Fotografia (esquerda) mostrando a presença do tumor no subcutâneo de um animal do grupo controle (seta). Animais posicionados para palpação e inspeção de massa tumoral conforme grupos tratado e controle (direita)

No grupo tratado com acetona cianidrina, não foi possível verificar macroscopicamente e no RX, a presença do tumor em dois dos animais que

apresentaram massa tumoral ao 12^o dia (figura 5). Isso demonstra o grau de dificuldade em se conseguir bons índices de verificação a partir da associação de acetona cianidrina e o emprego de RX.

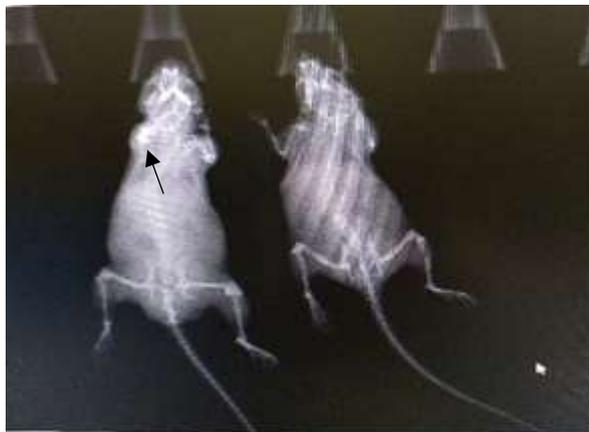


Figura 5. Imagem de RX (XTREME), mostrando presença (seta) ou ausência de tumor nos animais do grupo tratado.

Ao exame de RX não foi possível observar a luminescência das células inoculadas. Acredita-se que a probe luciferase não foi eficiente ou não foi ativada corretamente. No entanto, foi possível verificar a presença da massa tumoral, tanto macroscopicamente (palpação e inspeção) como por RX (figura 6).



Figura 6. Imagem de RX, do XTREME, mostrando a presença de tumores no dorso dos animais do grupo controle (seta)

Apesar de os resultados não terem sido os esperados, no que diz respeito a observação da luminescência das células, é correto afirmar, baseado no trabalho de Ramalho, Aydos e Cereda, (2010 apud RIBEIRO, 2012), e nos dados aqui obtidos, que as pesquisas que buscam a cura do câncer têm muito ainda a explorar a acetona cianidrina como instrumento de investigação na dinâmica processual da ocorrência de doença neoplásicas.

Não foi possível verificar metástases em órgãos ou peritônio em virtude da ausência de fluorescência das células inoculadas.

6 CONCLUSÃO

Foi possível avaliar o crescimento tumoral e o efeito antitumoral da acetona cianidrina em modelo de carcinoma mamário (4T1LUC) tendo em vista que houve crescimento das células do tumor.

A evolução do tumor nos animais tratados e não tratados através da fluorescência não foi possível ser realizada por problemas técnicos na ativação da luciferase. No entanto, foi possível avaliar a presença e ausência da massa tumoral por palpação e inspeção, bem como em Rx simples.

Não se observou o aparecimento de metástases do tumor, através da imagem de RX /fluorescência pelo mesmo motivo técnico. No entanto, não foi possível observar nenhum tipo de tumor no peritônio visceral ou parietal, considerando-se dessa forma que as células inoculadas intracavitárias não se desenvolveram.

REFERÊNCIAS

ALVARADO, A., A. et al. (2017). Experimental mammary carcinogenesis - Rat models. **Life Sci** 173: 116-134.

BICALHO, Leandro Santos. **Remissão completa de tumores de língua, induzidos com células do tumor de Ehrlich, por meio da Terapia Fotodinâmica mediada pela Alumínio-Cloro-Ftalocianina em formulação lipossomal**. 2010. 108 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade de Brasília/UNB, Brasília/DF, 2010.

BRASIL. MINISTERIO DA SAUDE. **Sistema de Informação sobre Mortalidade** – SIM. MP/Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE, 2016. MS/INCA/Conprev/Divisão de Vigilância. 42. Acesso em: 17 ago. 2018.

CABRAL, Priscilla Carvalho. **Desenvolvimento de modelo experimental murinho para o estudo da imunobiologia do melanoma**. 2016. Dissertação (Mestrado em Imunologia) – São Paulo, Instituto de Ciências Médicas, USP, 2016.

CASTELLÓ, C. M. **Ultrassonografia do tumor sólido de ehrlich inoculado em camundongos**. 2017. 61 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Animal) - Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás/ EVZ/UFG, Goiânia/GO, 2017.

CHEN, Y; MA, J; WANG, F; HU,J; CUI, A; WEI,C; YANG,Q; LI,F. Amygdalin induces apoptosis in human cervical câncer all line Hela cells. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**,v.35, n.1, p.43-51, 2013.

DAGLI, Maria Lúcia Zaidan. **Disseminação linfática do tumor de Ehrlich: estudo experimental**. São Paulo, 1989. 148p. Tese (Doutorado em Patologia Experimental e Comparada) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

DENORAIS, M.P; EPSTEIN, E.H; KOUSPAROU, C.A.. Antibody guide enzyme of Cancer producing cyanide result in necrosis of target cells. **International Journal of Cancer**,v.99, n.1. p.138- 148, may 2002.

DRANOFF, G. Experimental mouse tumour models: what can be learnt about human cancer immunology? **Nat Rev Immunol**. 2011 Dec 2;12(1):61-6. doi: 10.1038/nri3129.

EPPIG JT, MOTENKO H, RICHARDSON JE, RICHARDS-SMITH B, SMITH CL. The International Mouse Strain Resource (IMSR): cataloging worldwide mouse and ES cell line resources. **Mamm Genome**. 2015 Oct;26(9-10):448-55. doi: 10.1007/s00335-015-9600-0. Epub 2015 Sep 15, 2015.

FUKUDA,T; ITO,H; MUKAINAKA,T; TOKUDA.H; NISHINO,H; YOSHIDA,T. Anti-tumor promoting effect of glycosides from *Prunus persica* seeds. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v.26, n.2, p.271-273, feb.2003. Monthly.

FUKUMASU, Heidge. **Sobre os efeitos quimiopreventivos e antitumorais do guaraná, *Paullinia cupana* Mart var. *sorbilis*, em modelos experimentais in vivo e in vitro**. 2008. 300 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo/USP, 2008.

GREENBERG, D.M. The vitamin fraud in cancer quackery. **West J Med**. 1975; 122(4):345-8.

ICIEK, M; WLODEK, L. Biosynthesis and biological properties of compounds containing highly reactive, reduced sulfane sulfur. **Polish Journal of Pharmacology**, v.53, n.3, p.215-225, 2001.

INCA - INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2018**: incidência de câncer no Brasil. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: INCA, 2017.

JUKES, T.H. Laetrile of câncer. **Journal of the American Medical Association**, v.236, n.11, p.1284-1286, sept.1976.

KOUSPAROU, C.A; EOPENETOS, A.A; DEONARIAN, M.P. Antibody guided enzyme of câncer producing cyanide result in necrosis of target cells. **International Journal of Cancer**, v.99, p.138 – 148, 2002.

LYONS, S.K. Imaging mouse models of cancer. **Cancer J**. 2015; 21:152–64.

MEZZANOTTE, L.; AN, N.; MOL, I.M, LOWIK, C.W.G.M, KAIJZEL, E.L. A new multicolor bioluminescence imaging platform to investigate NF-kappaB activity and apoptosis in human breast cancer cells. **PLoS One**. 2014;9:1-12.

MIJAN, M. C. **Terapia fotodinâmica mediada por alumínio-cloro-ftalocianina em formulação lipossomal no tratamento de câncer de mama in vitro e in vivo**: mecanismos de ação e perfil imunoestimulatório. 2012. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

MOSS M, KHALIL N, GRAY J. Deliberate self-poisoning with Laetrile. **Can Med Assoc J**. 1981; 125(10):1126-28.

NAVARRO, M.D; LAGMAN,C.L. Breast carcinoma with lung and bone metastases treated with laetrile; case report. **Journal Philippine of Medicine Association**,v.33, n.1, p.16-20, 1957.

NEWTON, G.W; SCHMIDT, J.P; LEWIS,L. Amygdalin toxicity studies in rats predict chronic cyanidrine poisoning in humans. **Western Journal of Medicine**,v.149,n.2, p.134-197, feb.1988.

OLIVEIRA, E.X.; MELO, EC, Pinheiro RS, Noranha CP, Carvalho MS. Acesso à assistência oncológica: mapeamento dos fluxos origem-destino das internações e dos atendimentos ambulatoriais. O caso do câncer de mama. **Cad Saude Publica**. 2011 Feb;27(2):317-26.

ORGANIZACAO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **C=Media centre**. 2017. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/early-cancer-costs/en/> Acesso em: 22 fev. 2018.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). Brasil. **Folha Informativa Câncer**. Disponível em: https://www.paho.org/bra.../index.php?option=com_content&view=article&id=5588:folha-informativa-cancer&Itemid=839 Acesso em: 20 set. 2018.

PANTALEÃO C, LUCHS A. **Câncer e modelos experimentais de tumores murinos**. Rev Inst Adolfo Lutz. São Paulo, 2010; 69(4):439-45.

PASSOS, M. J. Imunoterapia um novo paradigma no tratamento do câncer. **Revista Portuguesa de Oncologia**, v.1, n.4, p.52-57, 2014.

RAMALHO, R.T; AYDOS, R.D; CEREDA, M.P. Evaluation of acetone cyanohydrins effect in *in vitro* inactivation of the Ehrlich ascites tumor cells. **Acta Cirurgica Brasileira**, v.25, n.1, p.11-116, jan./feb. 2010.

RAMALHO, R.T; AYDOS,R.D; SCHETTERT,I;CASSINO,P.C. Histopathological evaluation of tumor necrosis and volume after cyanogenic chemotherapy. **Acta Cirurgica Brasileira**, v.29, suppl.2, p.38-42, 2014.

RAMALHO, R. T. **Efeito do tratamento com acetona cianidrina na evolução do tumor sólido e ascítico de Ehrlich**. Dissertação (Doutorado – em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste) – Faculdade de Medicina/UFMS,Campo Grande, 2014.

RIBEIRO, A.F. **Alterações histopatológicas causadas pelo efeito da acetona cianidrina em fígado, rins, coração e pulmão de camundongos**.2012. 43f. Dissertação (Mestrado em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste) – Faculdade de Medicina/UFMS, Campo Grande,2012.

SABER, F.A. Laetrile: is it really a matter of free choice? **American Journal of Public Health**, v.67, n.9, p.871-872, sept.1977.

SANTOS NOVAES, P.E.R. Radioterapia no melanoma: há lugar? **Acta Oncológica Brasileira**, v.23; n.3, p.536-540, 2003.

SELMI A.L., DE NARDI A.B., DALECK C.R., LAUFER AMORIM R., RODASKI S., HAUER PIEKARZ C. & WERNER J. 2007. Correlation between cyclooxygenase-2 and ki-67 in the mammary neoplasias of dogs. **WSAVA Congress, Sydney**, Australia. Disponível em: <http://www.ivis.org> Acesso em: 22 nov. 2017.

SIEGEL, R.L.; MILLER, K.D.; JEMAL, A. Cancer statistics 2016. **CA Cancer, JClin** 66:7–30, 2016.

SOLER-MARTIN, C; RIERA, J; SCOANE, A; CUTIELAS, B; AMBROSIO, S; BOADAS-VAELLO, P; LORENS, J. The targets of acetone cyanhydrin neurotoxicity in the rat are not the ones expected in an animal model of Kanzo. **Neurotoxicology and Teratology**, v.32, n.2, p. 289-294, mar./apr.2010.

STACER, A.C.; NYATI, S.; MOUDGIL, P.; IYENGAR, R.; LUKER, K.E, REHEMTULLA, A.; LUKER, G.D. NanoLuc reporter for dual luciferase imaging in living animals. **Mol Imaging**. 2013;12(7):1–13.

STEINER, J., J. DAVIS, et al. Dose-dependent benefits of quercetin on tumorigenesis in the C3(1)/SV40Tag transgenic mouse model of breast cancer. **Cancer Biol Ther** 15(11): 1456-1467, 2014.

STOCK, C.C; TARNOWSKI, G.S; SCHMID, F.A; HUTCHISON, D.J TELLER, M.N. Antitumor tests of amygdalin in transplantable animal tumor systems. **Journal of Surgical Oncology**, v.10, n.2, p.81-88, 1978.

SYRIGOS, K.N; ROWLINSON-BUSZA, G; EPENETOS, A.A. In vitro Cytotoxicity following specific activation of amygdalin by beta-glucosidase conjugated to a bladder cancer-associated monoclonal antibody. **International Journal of Cancer**, v.78, n.7, p.712-719, 1978.

TSENG, J-C , Ph.D. JEFFREY, K. V. PETERSON, D. Optical Imaging on the IVIS SpectrumCT System: General and Technical Considerations for 2D and 3D Imaging. **PerkinElmer**, Inc. Hopkinton, MA.

TORRE, L.A.; BRAY F, SIEGEL, R.L, FERLAY, J.; LORTET-TIEULENT J.; JEMAL A. Global cancer statistics, 2012. **CA Cancer J Clin** 65:87–108, (2015)

VICKERS, A.J; KUO, J; CASSILETH, B.R. Unconventional anticancer agents: a systematic review of clinical trials. **Journal of Clinical Oncology**, v.24, n.1, p.136-140,2006.

WANG, Y, TSENG, J.C, SUN, Y, BECK, A.H, KUNG, A.L. Noninvasive imaging of tumor burden and molecular pathways in mouse models of cancer. **Cold Spring Harbor Laboratory Press** [online] 2016:135-45 [acesso 12 set 2016]. Disponível em: <http://cshprotocols.cshlp.org>.

WODINSKY, I; SWINIARSK, J.K. Antitumor activity of amygdalin MF (NSC-15780) as a single agent and with beta-glucosidase (NSC-128056) on a spectrum of transplantable rodents tumor. **Cancer Chemotherapy Reports** , v.59, n.5, p.939-950,1975.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Fight against cancer: strategies that prevent, cure and care**, 2007.

ANEXO I

Artigo de revisão publicado em Periódico Qualis Capes A2 Interdisciplinar International Journal of Development Research (IJDR) - Vol. 08, Issue, 04, pp.20072-20075, April, 2018. Disponível em: <http://www.journalijdr.com/experimental-model-murine-breast-carcinoma-4t1-luc-and-evaluation-effect-acetone-cyanidine-remission>

ISSN 2230-9926; Area - Science, Engineering & Technology, Health Science, Physical Science, Social Science

EXPERIMENTAL MODEL OF THE MURINE BREAST CARCINOMA (4T1 LUC) AND EVALUATION OF THE EFFECT OF ACETONE CYANIDINE IN THE REMISSION OF TUMOR

¹ Larissa Schimidt Rosseti, ¹Iandara Schettert Silva, ¹Rodrigo Juliano Oliveira, ¹Ramalho Tosta Ramalho, ¹Valdir Aragão do Nascimento, ¹Iara Barbosa Ramos, ²Nathalia Novak Zobiole, ¹Letícia Alves Paiva.

ABSTRACT: Studies involving the fight against cancer have provided several advances that provide the understanding of the development of tumors, mainly regarding the molecular processes that constitute the structure that allows or enables the progressive transformation of healthy cells into malignant ones. Examinations at the molecular level of tumor development in patients is not very common, since there is a need for biopsies at various stages of transformation. This manuscript is a review that presents and discusses some aspects of the experimental approaches, techniques and strategies used in the study of tumors in murine models with emphasis on the immune response against cancer, specifically the effects of acetone cyanide on tumor remission.

Keywords: Murine Mammary Carcinoma, Experimental Model, Cyanidric Acetone, Tumor Remission

¹ Post-graduate Program in Health and Development in the Mid-West Region, Federal University of Mato Grosso do Sul, 79070-900, Campo Grande, MS, Brazil

²Professor of the Faculty Mato Grosso do Sul (FACSUL), 79005-000, Campo Grande, MS, Brazil.

INTRODUCTION

Cancer can be roughly understood as the uncontrolled growth of cells in both human and animal bodies. Its action is to invade tissues and organs altering its functions, which can lead to death in cases whose diagnosis and the consequent onset of treatment were late. This disordered growth becomes more aggressive when allied to it we have the migration of these cells to other regions of the body (metastases). Cancer in Brazil is the second cause of death due to illness (DENORAIS et. al., 2002; OMS, 2015).

The development of cancer depends not only on transformations within the modified cell itself, but also on the interrelations between these cells and their microenvironment. The cancer proceeds from genetic mutations and some physiological variations in the cell are essential for the disease to manifest itself. There are six alterations that can be considered fundamental in the cellular physiology and that allow tumor growth, that is, we have self-sufficiency in signs of growth, insensitivity to signs of growth inhibition, evasion of apoptosis, unlimited replicative potential, maintenance of angiogenesis and, finally, tissue invasion and metastasis (PANTALEÃO, 2010).

According to Pantaleão (2010), cancers can be categorized into carcinomas - neoplasms originating from epithelial tissues (epidermoid, when originating from epithelium, and adenocarcinomas from ducts and/or glands), sarcomas (neoplasms originating from connective tissues, (neoplasms originating from the marrow) and lymphomas (neoplasms originating from lymphoid tissues).

According to information obtained by Cabral (2016), the American Cancer Society categorizes cancer as a chronic disease, belonging to the group of cardiovascular diseases, diseases that affect the respiratory system and diabetes. Of the diseases responsible for approximately 70% of the world's deaths, only 15% of deaths are caused by cancers, however it would amount to 8.2 million fatalities per year.

World Health Organization (WHO) data released in 2017 report that every year 8.8 million people die from cancer, mostly in low- and middle-income countries - which has shown a resurgence in fatal cases since 2012. The prevalence of cancer cases in countries where income is medium and low is due to the scarce supply of diagnostic and treatment services. This is due to frequent

structural health problems in these countries. One of the sectors that suffer the most is the one destined to the services of pathology. By 2015, according to WHO information, approximately 35% of low-income countries reported that pathology services were generally available in the public sector, compared to more than 95% of high-income countries.

Breast cancer has the highest prevalence and affects women in many parts of the world, both in developed and emerging countries. This is due to the increasing longevity of the world population, which would increase the incidence of this neoplasm (TORRE, SIEGEL et al., 2016). In the year 2015 in Brazil, breast cancer was responsible for 18 thousand deaths (WHO, 2015). In addition, according to information from the World Health Organization (WHO, 2015), the spread of deaths is a global phenomenon, since 15 years ago the number of deaths did not exceed 6.9 million individuals, increasing to 8, 1 million in 2010 and 8.8 million in 2015. According to the WHO, the 22.2% increase in the number of fatalities due to cancer worldwide since the beginning of the century is one of the largest ever recorded by modern medicine. Currently, one in six deaths in the world is caused by cancer (WHO, 2017).

EXPERIMENTAL MODEL OF THE MURARY MUMMY CARCINOMA (4T1 LUC)

In recent years, a considerable number of researches have been devoted to the analysis of processes that seek to understand the dynamics of tumors. In this sense, efforts have been developed to try to find a cure for conditions that have cancer as the main etiological agent. As far as knowledge about carcinogenesis is concerned, most come from the analysis of tumor tissues *in vitro*, specifically those in very advanced stages of development, withdrawn from patients (PANTALEÃO, 2010).

To understand the dynamics of the processes associated with neoplastic progression, several experimental models have been proposed. Studies with mice stand out as the main experimental model used to represent the wide variety of events that occur in the development of human breast cancer. The advantages

of its use in experiments, is the small size, which facilitates its lodging and manipulation; fast reproduction and long service life; complete sequencing of its already available genome; manipulation with great ease and finally, share many physiological similarities with humans (MANNING, BUCK et. al., 2016).

There are currently 32,000 murine lines, including the isogenic, non-isogenic, mutant, recombinant, among others. Each lineage is suitable for a specific study type (EPPIG, MOTENKO et al., 2015, CABRAL, 2016; PANTALEÃO, 2010). With respect to breast cancer, different murine lines and experimental models have been used in research. The most commonly manipulated models are spontaneous ones; spontaneous mutations; induced by chemical, physical or biological carcinogenesis; transplantable xenografts and isogenic transplantable (ALVARADO et. al. 2017).

Spontaneous models are easily recognized by the natural emergence of breast tumors - a process totally exempt from human interference. In this context there are some strains of mice such as C3H (MAO, QU et. al., 2014), and Kunming females (ZHENG, ZHOU et. al., 2014). However, spontaneous models are not only limited to mice, but are also used in bitches (LIU, XIONG et. al. 2014) and felines WIESE, THAIWONG et. al., 2013; KOJIMA, et al. 1996; SELMI et. al., 2007).

In spontaneous models induced mutations, their origin is due to the advance in the area of genetic engineering. Such mutations are caused in embryos for the formation of genetically modified species, which are subsequently cross-linked to constitute animals in homozygosis or heterozygosis of the induced gene transformation. This genetic mutation is able to generate tumors spontaneously during the growth process of the animal, since the mutations are directed to genes known to be associated with mammary carcinogenesis (PANTALEÃO, 2010).

Of the previously cited models that are intended to resemble what occurs in humans, there are 634Mul (Wilson, Bachawal et al., 2014) and C3 (1) / SV40Tag (STEINER, DAVIS et al. 2014). Other genetically modified models have also been used. Many of them are knockout for the genes of interest and thus allow the functional study of this specific gene product against a transplanted tumor (DRANOFF, 2011).

According to Pantaleão (2010), among the experimental models of cancer, murine mammary carcinoma 4T1 is one of the most used models in the examination and a better understanding of the biological typology of the tumors. This model is recognized by the aggressiveness of its action, being a cell line deeply tumorigenic and hostile, in which metastases occur in several organs of the affected organism. In relation to the morphological aspect of the tumor, murine mammary carcinoma 4T1 is characterized by malignant epithelial propagation in solid fit, with propagation of pleomorphic cells and mitotic pattern.

EFFECT OF CYANOID ACETONE IN TOMORROW'S REMISSION

Ramalho et al. (2010) analyzed the antitumor effect of acetone cyanohydrin on Ehrlich ascites tumor cells and human lymphocytes *in vitro*. It was possible to verify a cytotoxic effect dependent on these tumor cells, where, in the concentrations of 20 and 30 Ug.ml⁻¹, 100% of cell death occurred in only 1 and 2 hours. At lower doses of 0.5-1.0 and 2.0 Ug.ml⁻¹, the cytotoxic effect was less intense, increasing gradually with time. At low concentrations of 0.5-1.0 and 2.0 Ug.ml⁻¹, more than 90% of cell death was observed only after 24 hours of incubation. Such results evidenced the ability of the tumor cell to be intoxicated cumulatively with acetone cyanohydrin. These results were compared with the results presented by human lymphocytes that, at the same doses and in the same incubation times, reached a maximum of 30% of cell death. In this study, the authors suggest that there is a differentiated rhodanase activity between the two cells.

The action of acetone cyanidrin is based on its cytotoxic metabolite that acts in a lethal manner in the cancer cell, taking advantage of the failure of the cyanide metabolism in the cells, due to a reduced action of the enzyme rhodanase that makes the detoxification of the cells. The failure of rhodanase would be triggered by a lack of substrate for the reaction, known as sulfane sulfur, responsible for providing sulfur for the removal of cyanide in the form of thiocyanate.

The authors Iciek and Wlodek (2001) reported that the regression of transplanted tumors in mice and tumor inhibition induced by carcinogens through the use of different precursors such as sulfane sulfur, confirm the above hypothesis. A perfect environment for cumulative cyanide poisoning is provided in cancer cells, because rhodanase is only residual.

Literature reviews contain important information such as characteristics of sulfane compounds and their affinity for cyanide reactivity, as well as evidence of sulfur metabolite in malignancy processes, cystathione deficiency in many malignant cells, and differences in the metabolism of homocysteine between normal cells and malignant. In addition, they also evidence important information regarding the defect in sulfur metabolism in cancer cells, together with the *in vivo* antitumor effects of sources of sulfane sulfur. This information apparently demonstrates that the uncontrollable proliferation of malignant cells may be related to a deficiency of elements such as sulfur and to an uncontrollable action of an enzyme set that is normally inactivated by it. Tumors with high growth rates may have lower sulfur transferase activities (rhodanase, for example) than normal tissue or tumors with low growth rates.

In Ehrlich's Ascitic Tumor, cyanogenic chemotherapy using acetone cyanohydrin as a source of cyanide was able to promote a reduction in tumor volume and tumor cells, as well as prevent its development in 20% of treated animals. In the Ehrlich Solid Tumor, it was able to induce an inhibition in tumor growth, in addition to producing an increase in necrosis area (RAMALHO, 2014).

Studies using other active principles present also have been successful in remission of Ehrlich's Tumor. Fukumasu (2008) investigated the action of guarana on the progression of the tumor in question and according to the results there is a considerable deceleration of cancer cells in mice fed guarana for seven days before having the cancer induced by the researchers; and another 14 days after establishment of the disease.

Authors such as Bicalho (2010) and Mijan (2012) also identified tumor remission through the use of Aluminum-Chloro-Phthalocyanine (AlClPht) - mediated Photodynamic Therapy in liposomal formulation. The analyzes showed that in 100% of the animals treated with PDT, it was possible to detect the complete remission of the tumors initially induced. In the histopathological analyzes carried out by the aforementioned researchers, it was observed that

PDT acted ostensibly in tumor elimination by the induction of cytotoxicity. In fact, such evidence leads to an intense necrosis process. The process in question was able to elute the tumor cells, however, resulted in the destruction of adjacent muscle tissue.

Nevertheless, after 21 days after the end of the PDT, the actuators observed the healing process, in which the muscle tissue replaced by connective tissue. Thus, Photodynamic Therapy was effective in complete remission of the tumors induced in the languages of Balb-c mice from cellular suspensions of Ehrlich's ascites tumor (BICALHO, 2010).

Ehrlich's tumor is defined in the specialized literature as a transplantable neoplasm of malignant epithelial origin, resembling a mammary adenocarcinoma of female mice. It was introduced in 1986 by Ehrliche and described in 1906 as a mammary carcinoma of female mice. Initially, the tumor was experimentally developed in solid form and transplanted into animals of the same species (DAGLI, 1989). But in 1932, Loewenthal and Jahn presented the ascitic form, that is, the form developed in the peritoneum of animals inoculated with tumor cells.

Ehrlich's tumor is a model characterized by practicality, being widely used in antineoplastic analysis because of the reduced time interval for study, since the evolutionary progression of the neoplasia occurs very quickly, and also by the existence of previous knowledge of the amount of cells of the tumors inoculated in animals (RAMALHO, 2014).

There are several studies in the literature concerning the use of cyanogenic substances, such as linamarin and amygdalin (CHEN, et. al., 2013; FUKUDA et. al., 2003; JUKES, 1976; KOUSPAROU et al., 2002; LAGMAN; NAVARRO, 1957; STOCK et al., 1978; SWINIARSKI; WODINSKY, 1975; SYRIGUS et. al., 1998). However, an equally large number of articles with controversial issues associated with their use can be found (GREENBERG, 1975; MOSS, KHALIL, 1981; SABER, 1977; VICKERS et al., 2006).

After histopathological evaluation of the morphological alterations caused by acetone cyanohydrin in the heart, lung, liver and kidneys of healthy mice, Ribeiro (2012) concluded that there were morphological alterations of the type cell injury that lead to apoptosis, as well as cell adaptation, characterized by degeneration of the tubules recurrences and decreased size and number of renal glomeruli. In the lung, areas of fibrosis, presence of macrophages in the alveolar

space, thickened septa and structural disorganization were found. There was widespread disorganization in liver structure, hepatocytes of varying sizes and loss of nucleus. And, in the heart, presence of fat cells, hemorrhage and fibrosis.

As shown above, researchers demonstrate the action of cyanide from acetone cyanidrin at alkaline pH, exploiting sulfane sulfur deficiency in malignant cells and promote irreversible intoxication with minimal effect in other normal cells, predicts the discovery of new substances for the treatment of cancer (RAMALHO, 2014)

Conclusion

According to the survey carried out in this manuscript, it is notable that there is a possibility of remission of the Ehrlich Tumor by means of some substances, such as cyanide acetone, guarana and the technique of Photodynamic Therapy mediated by Aluminum-Chloro-Phthalocyanine (AlClPht) in liposomal formulation. The results make it clear, although obtained from animal experiments, that some types of cancer may be completely suppressed, or at least have their effects diminished considerably.

REFERENCES

CABRAL, Priscilla Carvalho. **Desenvolvimento de modelo experimental murinho para o estudo da imunobiologia do melanoma**. 2016. Dissertação (Mestrado em Imunologia) – São Paulo, Instituto de Ciências Médicas, USP, 2016.

BICALHO, Leandro Santos. **Remissão completa de tumores de língua, induzidos com células do tumor de Ehrlich, por meio da Terapia Fotodinâmica mediada pela Alumínio-Cloro-Ftalocianina em formulação lipossomal**. 2010. 108 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade de Brasília/UNB, Brasília/DF, 2010.

FUKUMASU, Heidge. **Sobre os efeitos quimiopreventivos e antitumorais do guaraná, Paullinia cupana Mart var. sorbilis, em modelos experimentais in vivo e in vitro**. 2008. 300 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo/USP, 2008.

ORGANIZACAO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). C=Media centre. 2017. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/early-cancer-costs/en/> Acesso em: 22 fev. 2018.

PANTALEÃO C, LUCHS A. **Câncer e modelos experimentais de tumores murinos**. Rev Inst Adolfo Lutz. São Paulo, 2010; 69(4):439-45.

CHEN, Y; MA, J; WANG, F; HU, J; CUI, A; WEI, C; YANG, Q; LI, F. Amygdalin induces apoptosis in human cervical cancer cell line HeLa cells. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v.35, n.1, p.43-51, 2013.

DAGLI, Maria Lúcia Zaidan. **Disseminação linfática do tumor de Ehrlich: estudo experimental**. São Paulo, 1989. 148p. Tese (Doutorado em Patologia Experimental e Comparada) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

DENORAIS, M.P; EPSTEIN, E.H; KOUSPAROU, C.A.. Antibody guided enzyme of Cancer producing cyanide result in necrosis of target cells. **International Journal of Cancer**, v.99, n.1, p.138- 148, may 2002.

FUKUDA, T; ITO, H; MUKAINAKA, T; TOKUDA, H; NISHINO, H; YOSHIDA, T. Anti-tumor promoting effect of glycosides from Prunus persica seeds. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v.26, n.2, p.271-273, feb.2003. Monthly.

ICIEK, M; WLODEK, L. Biosynthesis and biological properties of compounds containing highly reactive, reduced sulfanesulfur. **Polish Journal of Pharmacology**, v.53, n.3, p.215-225, 2001.

JUKES, T.H. Laetrile of cancer. **Journal of the American Medical Association**, v.236, n.11, p.1284-1286, sept.1976.

KOJIMA, H. et al. Apoptosis of pregnancy-dependent mammary tumor and transplantable pregnancy-dependent mammary tumor in mice. **Cancer Lett**, v.110, p.113-121, 1996.

KOUSPAROU, C.A; EPENETOS, A.A; DEONARIAN, M.P. Antibody guided enzyme of cancer producing cyanide result in necrosis of target cells. **International Journal of Cancer**, v.99, p.138 – 148, 2002.

LIU, D., H. XIONG, et al. Molecular homology and difference between spontaneous canine mammary cancer and human breast cancer. **Cancer Res** 74(18): 5045-5056, 2014.

MIJAN, M. C. **Terapia fotodinâmica mediada por alumínio-cloro-ftalocianina em formulação lipossomal no tratamento de câncer de mama in vitro e in vivo: mecanismos de ação e perfil imunoestimulatório**. 2012. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

NAVARRO, M.D; LAGMAN, C.L. Breast carcinoma with lung and bone metastases treated with laetrile; case report. **Journal Philippine of Medicine Association**, v.33, n.1, p.16-20, 1957.

NEWTON, G.W; SCHMIDT, J.P; LEWIS, L. Amygdalin toxicity studies in rats predict chronic cyanidrine poisoning in humans. **Western Journal of Medicine**, v.149, n.2, p.134-197, feb.1988.

PASSOS, M.J. Imunoterapia um novo paradigma no tratamento do câncer. **Revista Portuguesa de Oncologia**, v.1, n.4, p.52-57, 2014.

RAMALHO, R.T; AYDOS, R.D; CEREDA, M.P. Evaluation of acetone cyanohydrins effect in *in vitro* inactivation of the Ehrlich ascites tumor cells. **Acta Cirurgica Brasileira**, v.25, n.1, p.11-116, jan./feb. 2010.

RAMALHO, R.T; AYDOS, R.D; SCHETTERT, I; CASSINO, P.C. Histopathological evaluation of tumor necrosis and volume after cyanogenic chemotherapy. **Acta Cirurgica Brasileira**, v.29, suppl.2, p.38-42, 2014.

RIBEIRO, A.F. **Alterações histopatológicas causadas pelo efeito da acetona cianidrina em fígado, rins, coração e pulmão de camundongos**. 2012. 43f. Dissertação (Mestrado em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste) – Faculdade de Medicina/UFMS, Campo Grande, 2012.

RAMALHO, T.R. **Efeito do tratamento com acetona cianidrina na evolução do tumor sólido e ascítico de Ehrlich**. Dissertação (Doutorado – em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste) – Faculdade de Medicina/UFMS, Campo Grande, 2014.

SABER, F.A. Laetrile: is it really a matter of free choice? **American Journal of Public Health**, v.67, n.9, p.871-872, sept.1977.

SANTOS NOVAES, P.E.R. Radioterapia no melanoma: há lugar? **Acta Oncológica Brasileira**, v.23; n.3, p.536-540, 2003.

SELMI A.L., DE NARDI A.B., DALECK C.R., LAUFER AMORIM R., RODASKI S., HAUER PIEKARZ C. & WERNER J. 2007. Correlation between cyclooxygenase-2 and ki-67 in the mammary neoplasias of dogs. **WSAVA Congress, Sydney**, Australia. Disponível em: <http://www.ivis.org> Acesso em: 22 nov. 2017.

SOLER-MARTIN, C; RIERA, J; SCOANE, A; CUTIELAS, B; AMBROSIO, S; BOADAS-VAELLO, P; LORENS, J. The targets of acetone cyanohydrin neurotoxicity in the rat are not the ones expected in an animal model of Kanzo. **Neurotoxicology and Teratology**, v.32, n.2, p. 289-294, mar./apr.2010.

STOCK, C.C; TARNOWSKI, G.S; SCHMID, F.A; HUTCHISON, D.J TELLER, M.N. Antitumor tests of amygdalin in transplantable animal tumor systems. **Journal of Surgical Oncology**, v.10, n.2, p.81-88, 1978.

SYRIGOS, K.N; ROWLINSON-BUSZA, G; EPENETOS, A.A. In vitro Cytotoxicity following specific activation of amygdalin by beta-glucosidase conjugated to a bladder cancer-associated monoclonal antibody. **International Journal of Cancer**, v.78, n.7, p.712-719, 1978.

VICKERS, A.J; KUO, J; CASSILETH, B.R. Unconventional anticancer agents: a systematic review of clinical trials. **Journal of Clinical Oncology**, v.24, n.1, p.136-140,2006.

WIESE, D.A., THAIWONG, T., GURKAN, V.Y. & KIUPEL, M. Feline mammary basal-like adenocarcinomas: a potential model for human triple-negative breast cancer (TNBC) with basal-like subtype. **BioMed Central Cancer**, 13, 1-12, 2013.

WILSON, K. E., S. V. BACHAWAL, et al. Multiparametric spectroscopic photoacoustic imaging of breast cancer development in a transgenic mouse model. **Theranostics** 4(11): 1062-1071, 2014.

WODINSKY, I; SWINIARSK, J.K. Antitumor activity of amygdalin MF (NSC-15780) as a single agent and with beta-glucosidase (NSC-128056) on a spectrum of transplantable rodent tumor. **Cancer Chemotherapy Reports** , v.59, n.5, p.939-950,1975.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Fight against cancer: strategies that prevent, cure and care**, 2007.

ZHENG, L., B. ZHOU, et al. A model of spontaneous mouse mammary tumor for human estrogen receptor- and progesterone receptor-negative breast cancer. **Int J Oncol** 45(6): 2241-2249, 2014.

ANEXO II