

RONDON TOSTA RAMALHO

**EFEITO DO TRATAMENTO COM ACETONA CIANIDRINA NA
EVOLUÇÃO DO TUMOR SÓLIDO E ASCÍTICO DE EHRlich**

CAMPO GRANDE
2014

RONDON TOSTA RAMALHO

**EFEITO DO TRATAMENTO COM ACETONA CIANIDRINA NA
EVOLUÇÃO DO TUMOR SÓLIDO E ASCÍTICO DE EHRlich**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Doutor.
Orientador: Prof. Dr. Ricardo Dutra Aydos

CAMPO GRANDE
2014

RONDON TOSTA RAMALHO

**EFEITO DO TRATAMENTO COM ACETONA CIANIDRINA NA
EVOLUÇÃO DO TUMOR SÓLIDO E ASCÍTICO DE EHRlich**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Doutor.
Orientador: Prof. Dr. Ricardo Dutra Aydos

Resultado _____

Campo Grande (MS), 04 de Abril de 2014.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ricardo Dutra Aydos

Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Prof^a. Dra. Marney Pascoli Cereda

Instituição: Universidade Católica Dom Bosco

Prof^a. Dra. Danielle Bogo

Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Dr. José Lacerda Brasileiro

Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Dr. Fabrício Colacino

Instituição: Hospital do Câncer Alfredo Abrão

Este trabalho é dedicado a minha família pela paciência e compreensão nos momentos mais difíceis desta jornada. Em especial a minha esposa, Fabiana S P Ramalho, pela ajuda incondicional.

Agradeço, à Fabiana, minha esposa, pela ajuda nas revisões dos textos e apoio incondicional a este projeto.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ricardo Dutra Aydos pelo voto de confiança e por toda colaboração no desenvolvimento deste projeto. E meu sincero agradecimento a todo conhecimento compartilhado comigo no decorrer desses anos.

A Professora Dra. Iandara Schettert Silva pela ajuda e atenção dispensada para a elaboração do modelo experimental.

A Professora Dra. Maria Auxiliadora (Dorinha) por sua sincera atenção dispensada nas análises histológicas que foram de fundamental importância para este trabalho.

A todos os funcionários do Biotério Central da UFMS pela paciência e ajuda.

Aos funcionários da secretaria acadêmica do Programa, em especial à Vera Nascimento.

Ao amigo Pedro Cassino pela ajuda nos procedimentos com os animais.

A todos os Professores do Programa pela dedicação em repassar o conhecimento.

A Professora Isabella Saliba Pereira pela ajuda nas traduções de meus artigos.

A CAPES pela concessão de bolsa de doutorado.

O homem é tão inteligente que ele se sente impelido a inventar teorias para explicar o que acontece no mundo. Infelizmente, ele não é inteligente o suficiente, na maioria dos casos, para encontrar explicações corretas.

Aldous Huxley

A mente crédula[...]experimenta um grande prazer em acreditar em coisas estranhas, e quanto mais estranhas forem, mais facilmente serão aceitas; mas nunca leva em consideração as coisas simples e plausíveis, pois todo mundo pode acreditar nelas.

Samuel Butler, Characters (1667-9)

A ciência requer o ceticismo mais vigoroso e intransigente, porque a imensa maioria das ideias está simplesmente errada, e a única maneira de separar o joio do trigo é pela análise e experiências críticas. Se somos tão abertos a novas ideias a ponto de ser crédulos, e se não temos nem um micrograma de senso cético, não podemos distinguir ideias promissoras das que pouco valem. Aceitar acriticamente toda noção, ideia e hipótese professada equivale a não conhecer nada. As ideias se contradizem umas às outras; somente pelo exame cético podemos decidir entre elas. Algumas são de fato melhores do que outras.

Parte da obra O MUNDO ASSOMBRADO PELOS DEMÔNIOS (1997) de Carl Sagan

RESUMO

Ramalho, RT. Efeito do tratamento com acetona cianidrina na evolução do tumor sólido e ascítico de Ehrlich. Campo Grande, 2014. [Tese - Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

Objetivo: Estudar o efeito da Acetona Cianidrina (AC) nos tumores ascítico e sólido de Ehrlich.

Métodos: Para o desenvolvimento do tumor ascítico, 1×10^3 células do Tumor de Ehrlich (TE) foram inoculados em 30 camundongos Swiss, distribuídos em 3 grupos (n=10): GC (salina); GAC1 ($1,864 \text{ mg.Kg}^{-1}$ de AC) e GAC2 ($2,796 \text{ mg.Kg}^{-1}$ de AC) tratados a partir do 3º dia a cada 48h até o 13º; no 15º dia, os animais sofreram eutanásia e determinou-se o número de células viáveis na ascite. Para o desenvolvimento do tumor sólido, $2,5 \times 10^5$ células do Tumor de Ehrlich (TE) foram inoculados em 10 camundongos Swiss, distribuídos em 2 grupos (n=10): GC (salina); GAC ($2,796 \text{ mg.Kg}^{-1}$ de AC) tratados a partir do 3º dia a cada 48h até o 13º; no 15º dia, os animais sofreram eutanásia seguida da dissecação do tumor para avaliação da atividade antitumoral. Paralelamente, as células de TE foram incubadas com AC ($0,5, 1,0, 2,0 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$), verificando-se a viabilidade celular e o percentual de inibição do crescimento (PIC) após 1, 2, 3, 4, 18 e 24 horas.

Resultados: No tumor ascítico ocorreu redução do volume e do número de células viáveis no GAC1 e GAC2, em relação ao GC. No GAC1, um dos animais não apresentou ascite; já no GAC2, tal fato ocorreu com dois animais e no GC, todos os animais desenvolveram ascite. No tumor sólido houve diferença significativa entre os dois grupos em relação à ocorrência de necrose coagulativa ($p=0,0001$) e uma diferença significativa no volume tumoral ($p=0,0189$). A ação da AC *in vitro* foi dose e tempo dependente e não houve diferença significativa entre as três doses.

Conclusão: A AC foi capaz de promover uma redução do tumor, bem como impedir o desenvolvimento tumoral em 20% dos animais tratados no TAE; no TSE a AC foi capaz de inibir o crescimento tumoral, bem como aumentar a área de necrose.

Descritores: Antineoplásicos, Compostos de enxofre, Tiosulfato Sulfurtransferase

ABSTRACT

Ramalho, RT. Effect of treatment with acetone cyanohydrin in the development of solid and ascites Ehrlich tumors. Campo Grande; 2014. [Thesis - Graduate Program in Health and Development in the Midwest Region, Federal University of Mato Grosso do Sul].

Objective: To demonstrate the effect of Acetone cyanohydrin (AC) in ascites and solid Ehrlich tumors.

Methods: For the ascite tumor, 30 Swiss mice were inoculated with 1×10^3 cells of Ehrlich tumor (ET) and divided into 3 groups ($n = 10$): GC (saline); GAC1 (1,864 mg.Kg⁻¹ AC) and GAC2 (2,796 mg.Kg⁻¹ AC), all of them treated from the 3th day every 48 hours until the 13th; on the 15th day, the animals were euthanized and the number of viable cells in the ascites were determined. For solid tumor 10 Swiss mice were inoculated with 2.5×10^5 cells of Ehrlich tumor (ET) and divided into 2 groups ($n = 10$): GC (saline), GAC (2,796 mg.Kg AC⁻¹) treated from the 3th day every 48h until the 13th; in the 15th day, the animals were euthanized then the tumors were dissected to evaluate the antitumor activity. In parallel, ET cells were incubated with AC (0.5, 1.0, 2.0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) to verify cell viability and the percentage of growth inhibition (PGI) after 1, 2, 3, 4, 18 and 24 hours.

Results: In ascite tumor the volume was reduced as well as the number of viable cells in GAC1 and GAC2 compared to GC. In GAC1, one of the animals showed no ascites; while in GAC2 this happened with two animals and CG, all animals developed ascites. In solid tumor, we observed a highly significant difference between the two groups regarding the occurrence of coagulative necrosis ($p = 0.0001$) and a significant difference in tumor volume ($p = 0.0189$). The action of AC in vitro was dose and time dependent and there was no significant difference among the three doses.

Conclusion: The AC was able to promote tumor reduction and prevent tumor development in 20% of animals treated in AE; in the SET AC was able to inhibit tumor growth and increase the area of necrosis.

Keywords: antineoplastic agents, compounds of sulfur, thiosulfate sulfurtransferase.

LISTAS DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 - Estimativas de câncer para o ano de 2014 das taxas brutas de incidência por 100 habitantes e do número de casos, segundo sexo e localização primária.....	16
Quadro 2 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014 por sexo, exceto pele não melanoma.....	16
Quadro 3 - Informações físico-químicas da Acetona Cianidrina.....	31
Tabela 1 - Valores absolutos das células e porcentagem de inibição de crescimento das células de Tumor Ascítico de Ehrlich tratadas com acetona cianidrina (0.5, 1.0 e 2.0 µg/mL).....	45
Tabela 2 - Valores absolutos das células e volume total do Tumor Ascítico de Ehrlich para cada animal dos grupos.....	46
Tabela 3 - Efeito do tratamento de Acetona Cianidrina no volume e contagem de células tumorais viáveis em camundongos portadores de Tumor Ascítico de Ehrlich.....	47
Tabela 4 - Valores das porcentagens de necrose e o volume tumoral no Tumor Sólido de Ehrlich para cada animal dos grupos.....	51
Tabela 5 - Efeito do tratamento da Acetona Cianidrina no Tumor Sólido de Ehrlich em relação aos parâmetros de Necrose e Volume Tumoral.....	51

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1 - Etapas envolvidas na metástase de células de câncer.....	20
Figura 2 - Esquema que representa a reação de transferência do enxofre catalisada pela rodanase.....	22
Figura 3 - Participação das sulfotransferases na desintoxicação do cianeto. MPST 3-mercaptopiruvato enxofretransferase. CN- Cianeto. SCN- Tiocianato.....	23
Figura 4 - L-Cisteína e suas vias metabólicas. <i>CST</i> γ -Cistationase. <i>MPST</i> 3-mercaptopiruvato enxofretransferase. <i>CBS</i> Cistationina β -sintase. <i>CDO</i> Cisteína dioxigenase. <i>CAT</i> Cisteína aminotrasferase. A Metionia é convertida em homocisteína pela <i>S</i> -adnosilmetionia (<i>SAM</i>). A homocisteína é convertida em cisteína pela <i>CBS</i> e <i>CST</i> . A cisteína é convertida em H ₂ S ou <i>sulfane sulfur</i> pela <i>CST</i> e <i>CAT</i> em conjunto com a <i>MPST</i>	25
Figura 5 - Fórmula Molecular e Estrutural da Acetona Cianidrina.....	28
Figura 6 - Mecanismo da desintoxicação do cianeto mediada pela rodanase.....	31
Figura 7 - Tumor Sólido de Ehrlich implantado subcutâneo na parede abdominal esquerda do camundongo.....	39
Figura 8 - Extração do Tumor Sólido de Ehrlich após 15 dias de inoculação subcutânea na parede abdominal esquerda do camundongo.....	40
Figura 9 - Obtenção das medidas tumorais, utilizando paquímetro de precisão ZAAS.....	40
Figura 10 - Ilustração da determinação da área total do tumor de Ehrlich e da área de necrose do tumor, utilizando o software AutoCAD.	42
Figura 11 - Curva de inibição de crescimento após tratamento com Acetona Cianidrina <i>in vitro</i> em relação ao controle.....	44

Figura 12 - Histologia do tumor de Ehrlich apresentando auto grau de diferenciação, infiltrado inflamatório e pseudo cápsula.....	48
Figura 13 - Necrose por coagulação. Seta verde destacando o núcleo em picnose com diminuição de volume e intensa basofilia. Seta amarela, cariorexe. Seta preta, núcleo fragmentado. Seta branca, dissolução da cromatina com desaparecimento de estrutura nuclear....	49
Figura 14 - Necrose de coagulação. Em (a) necrose de coagulação no grupo GC; em (b) necrose de coagulação no grupo GAC.....	50
Figura 15 - Imagem ilustrativa de tumores extraídos dos camundongos após 15 dias da inoculação. Destaque para a apresentação dos volumes tumorais de cada animal dos grupos em ordem crescente de volume.....	50
Figura 16 - Gráfico representando as médias com desvio padrão da porcentagem de necrose nos grupos GC e GAC.....	52
Figura 17 - Gráfico representando as médias com desvio padrão do volume tumoral nos grupos GC e GAC.....	52

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Acetona Cianidrina
CAT	Cisteína aminotransferase
CBS	Cistationina β -sintase
CDO	Cisteína dioxigenase
CN	Cianeto
CST	Cistationase
DL	Dose Letal
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's</i>
GAC	Grupo Acetona Cianidrina
GC	Grupo Controle
GSH	Glutathiona
HCN	Cianeto
HE	Hematoxilina-eosina
MpST	mercaptopiruvato sulfotransferase
PIC	Porcentagem de inibição do crescimento
SCN	Tiocianato
TAE	Tumor Ascítico de Ehrlich
TSE	Tumor Sólido de Ehrlich
UFMS	Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
VT	Volume Tumoral

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
g	Gramas
g/cm ³	Gramas por centímetro cúbico
h	Horas
hPa	Hectopascal (Pressão atmosférica)
Kg	Quilograma
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm Hg	Milímetro de mercúrio
mm ²	Milímetro quadrado

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1 Biologia das Células do Câncer.....	19
2.1.1 Apoptose e Câncer.....	20
2.1.2 Rodanase e Câncer.....	21
2.1.3 <i>Sulfane sulfur</i> e Câncer.....	24
2.2 Tumor de Ehrlich.....	26
2.3 Tratamento do Câncer.....	27
2.4 Acetona Cianidrina.....	28
2.4.1 Toxicologia e fisiopatologia do cianeto.....	30
2.4.2 Cianeto e células do câncer.....	32
3 Objetivos.....	34
3.1 Geral.....	34
3.2 Específico.....	34
4 METODOLOGIA.....	35
4.1 Manutenção do Tumor <i>in vivo</i> e obtenção das células tumorais.....	35
4.2 Avaliação da inibição de crescimento de células do tumor de Ehrlich após tratamento com Acetona Cianidrina <i>in vitro</i>.....	36
4.2.1 Preparação das células e cultura.....	36
4.2.2 Cálculo da Porcentagem de Inibição de Crescimento.....	36
4.3 Avaliação da Acetona Cianidrina no Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE).....	37
4.3.1 Animais.....	37
4.3.2 Transplante de tumor.....	37
4.3.3 Programa de Tratamento.....	37
4.3.4 Viabilidade das Células de TAE.....	38
4.4 Avaliação da Acetona Cianidrina no Tumor Sólido de Ehrlich (TSE).....	38
4.4.1 Implantação do TSE.....	38
4.4.2 Programa de Tratamento.....	39
4.4.3 Extração do Tumor Sólido de Ehrlich.....	39
4.4.4 Quantificação do volume tumoral.....	40
4.4.5 Preparo do fragmento tumoral para histologia.....	41
4.4.6 Quantificação da porcentagem de necrose na área tumoral.....	41
4.5 Análise Estatística.....	42

4.5.1 Avaliação da PIC em células do TE e o efeito no TAE após tratamento com Acetona Cianidrina.....	42
4.5.2 Avaliação da Acetona Cianidrina no TSE.....	43
5 RESULTADOS.....	44
5.1 Avaliação da Porcentagem Inibição de Crescimento da Acetona Cianidrina <i>in vitro</i>	44
5.2 Avaliação da Acetona Cianidrina no Tumor Ascítico de Ehrlich.....	46
5.3 Avaliação do efeito da Acetona Cianidrina no Tumor Sólido de Ehrlich.....	47
6 DISCUSSÃO.....	53
7 CONCLUSÃO.....	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
ANEXO A - Carta de aprovação da Comissão de Ética no uso de animais..	67
ANEXO B - Artigo Acta Cirúrgica: Sulfane Sulfur deficiency in malignant cells, increasing the inhibiting action of acetone cyanohydrin in tumor growth	68

1 INTRODUÇÃO

O câncer tem início quando as células em uma parte do corpo começam a crescer fora de controle. Existem muitos tipos, mas todos eles começam devido a esse crescimento celular descontrolado (ALMEIDA et al., 2005).

Esta enfermidade está presente na humanidade, muito provavelmente, desde seu surgimento. Muitas evidências de sua existência em nossos antepassados já foram observadas em múmias humanas fossilizadas, e foram encontrados relatos em manuscritos antigos, embora a palavra câncer ainda não tivesse sido utilizada (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2012).

Algumas das primeiras evidências de câncer foram encontradas entre os tumores ósseos fossilizados, múmias humanas no Egito antigo e manuscritos antigos. Crescimentos sugestivos de câncer de osso chamado osteosarcoma foram observados em múmias. Destruição óssea do crânio, como observado no câncer da cabeça e pescoço também foram encontrados. É o caso do Papiro Edwin Smith (datado de 3000 AC), que é uma cópia de parte de um livro do antigo Egito sobre cirurgia do trauma, onde se descreve oito casos de tumores ou úlceras da mama, citando características sobre a doença, mas não trazendo relato sobre tratamento. A palavra câncer veio aparecer em documentos redigidos pelo grego Hipócrates (460 - 370 AC), sendo usados por ele os termos carcinos e carcinoma, que em grego significa caranguejo. Mais tarde, o médico romano Celsus (28-50 AC) traduziu este termo para câncer, palavra latina para caranguejo (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2012).

No Brasil, as estimativas para o ano de 2014 (Quadro 1), válidas também para o ano de 2015, apontam a ocorrência de aproximadamente 576 mil casos novos de câncer, reforçando a magnitude do problema desta doença no país. Os tipos mais incidentes serão os cânceres de próstata, traqueia, brônquios e pulmão, cólon e reto e estômago para o sexo masculino; e os cânceres de mama, cólon e reto, colo uterino, traqueia, brônquios e pulmão para o sexo feminino (Quadro 2), (BRASIL, 2014).

Localização Primária da Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos							
	Homens				Mulheres			
	Estado		Capitais		Estado		Capitais	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Próstata	68.800	70,42	17.540	82,93	-	-	-	-
Mama Feminina	-	-	-	-	57.120	56,09	19.170	80,67
Colo do Útero	-	-	-	-	15.590	15,33	4.530	19,20
Traqueia, Brônquio e Pulmão	16.400	16,79	4.000	18,93	10.930	10,75	3.080	13,06
Colón e Reto	15.070	15,44	4.860	22,91	17.530	17,24	5.650	23,82
Estômago	12.870	13,19	2.770	13,07	7.520	7,41	2.010	8,44
Cavidade Oral	11.280	11,54	2.220	10,40	4.010	3,92	1.050	4,32
Laringe	6.870	7,03	1.460	6,99	770	0,75	370	1,26
Bexiga	6.750	6,89	1.910	8,91	2.190	2,15	730	2,97
Esôfago	8.010	8,18	1.460	6,76	2.770	2,70	540	0,00
Ovário	-	-	-	-	5.680	5,58	2.270	9,62
Linfoma de Hodgkin	1.300	1,28	410	5,72	880	0,83	420	8,64
Linfoma não Hodgkin	4.940	5,04	1.490	6,87	4.850	4,77	1.680	7,06
Glândula Tireoide	1.150	1,15	470	1,76	8.050	7,91	2.100	9,08
Sistema Nervoso Central	4.960	5,07	1.240	5,81	4.130	4,05	1.370	5,81
Leucemias	5.050	5,20	1.250	5,78	4.320	4,24	1.250	5,15
Corpo do Útero	-	-	-	-	5.900	5,79	2.690	11,24
Pele Melanoma	2.960	3,03	950	4,33	2.930	2,85	1.150	4,57
Outras Localizações	37.520	38,40	9.070	42,86	35.350	34,73	8.590	36,49
Subtotal	203.930	208,77	51.100	241,30	190.520	187,13	58.710	248,46
Pele não Melanoma	98.420	100,75	19.650	92,72	83.710	82,24	22.540	95,26
Todas as Neoplasias	302.350	309,53	70.750	334,08	274.230	269,35	81.250	343,85

Quadro 1 - Estimativas de câncer para o ano de 2014 das taxas brutas de incidência por 100 habitantes e do número de casos, segundo sexo e localização primária*

*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10.

Fonte: Brasil, 2014.

Localização primária	casos	%			Localização primária	casos	%
Próstata	68.800	22,8%			Mama Feminina	57.120	20,8%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	16.400	5,4%			Colón e Reto	17.530	6,4%
Colón e Reto	15.070	5,0%			Colo do Útero	15.590	5,7%
Estômago	12.870	4,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.930	4,0%
Cavidade Oral	11.280	3,7%			Glândula Tireoide	8.050	2,9%
Esôfago	8.010	2,6%			Estômago	7.520	2,7%
Laringe	6.870	2,3%			Corpo do Útero	5.900	2,2%
Bexiga	6.750	2,2%			Ovário	5.680	2,1%
Leucemias	5.050	1,7%			Linfoma não Hodgkin	4.850	1,8%
Sistema Nervoso Central	4.960	1,6%			Leucemias	4.320	1,6%

Quadro 2 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014 por sexo, exceto pele não melanoma*

*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10.

Fonte: Brasil, 2014.

No Mato Grosso do Sul, as estimativas para o ano de 2014, válidas também para o ano de 2015, apontam a provável ocorrência de 8.120 casos novos de câncer, com maior incidência do tumor de próstata, com 1.020 casos (BRASIL, 2014).

Em todo o mundo, diversos grupos estão desenvolvendo pesquisas avançadas para buscar formas alternativas de tratamentos, mais eficazes e menos agressivos aos pacientes. Uma destas vias é o uso de células transgênicas e nanoterapia (CORTÉS et al., 2002; KOUSPAROU et al., 2002).

A incessante busca por substâncias que sejam tóxicas apenas para células cancerígenas é uma necessidade para o aperfeiçoamento da quimioterapia no tratamento do câncer. Neste sentido, a Acetona Cianidrina comprovou em estudos iniciais possuir uma ação *in vitro* frente a células do Tumor de Ehrlich e possuir um nível adequado de preservação de células não-tumorais (RAMALHO, 2010).

Baseado nestes resultados, o presente projeto amplia os estudos com esta droga, e entra para a fase *in vivo*, pesquisando a ação da Acetona Cianidrina sobre o Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE) e Tumor Sólido de Ehrlich (TSE) em camundongos.

O Tumor de Ehrlich é uma neoplasia transplantável que corresponde a um adenocarcinoma mamário de camundongo fêmea. Trata-se de um modelo prático e muito utilizado para análise antineoplásica devido ao curto período de tempo para estudo, uma vez que o desenvolvimento da neoplasia se dá de maneira rápida, e também pelo conhecimento prévio da quantidade de células do tumor inoculadas nos animais (PALERMO et al., 2003; VALADARES e QUEIROZ, 2002; KLEIN e KLEIN, 1951).

A ação da Acetona Cianidrina baseia-se em seu metabólito cianeto, proveniente de sua degradação espontânea em pH ligeiramente alcalino, que atua de forma letal na célula maligna aproveitando uma falha no metabolismo do cianeto nestas células, devido a uma ação suprimida da enzima rodanase responsável pela desintoxicação do mesmo. Essa ação residual da enzima rodanase seria desencadeada por uma falta de substrato para a reação, conhecido como *sulfane sulfur*, responsável por fornecer enxofre para eliminação do cianeto na forma de tiocianato (TOOHEY, 1989; ZOTTOLA, 2009).

Atualmente, encontram-se revisões na literatura que trazem informações como características dos compostos sulfane e sua afinidade em reagir com cianeto, bem

como evidência do metabolismo do enxofre nos processos de malignidade, a deficiência de cistationase em muitas células malignas, diferenças no metabolismo de homocisteína entre células normais e malignas. Além disso, evidenciam também uma importante informação quanto ao defeito no metabolismo de enxofre em células cancerosas, juntamente com os efeitos antitumorais *in vivo* de fontes de *sulfane sulfur*. Este fato parece demonstrar que a proliferação incontrolável de células malignas pode estar relacionada a uma deficiência de *sulfane sulfur* e a uma ação incontrolável de um conjunto enzimático que normalmente é inativado por ele. Tumores com altas taxas, intrinsecamente, 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, (TOOHEY, 1989; WODEK et al., 1993; JURKOWSKA e WRÓBEL, 2008).

Os avanços em diversos campos do conhecimento têm levado a um progresso na medicina jamais visto na história da humanidade. Este progresso também se evidencia nos conhecimentos adquiridos em relação ao câncer, onde aprendemos nas últimas décadas mais do que tudo que aprendemos em todos os séculos anteriores. Este crescimento no conhecimento sobre a biologia do câncer nos levou a um poder maior de combate à doença, bem como sua prevenção, diagnóstico precoce e novas formas de tratamento. Mas sabemos que muito ainda temos para aprender nessa busca incessante do conhecimento. Com base nisso, o presente estudo busca evidenciar a ação do cianeto, proveniente da acetona cianidrina em pH alcalino, explorando a deficiência de *sulfane sulfur* em células malignas, promovendo nas mesmas uma intoxicação irreversível.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Biologia das Células do Câncer

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento maligno de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo disseminar (metástase) para outras regiões do corpo, (BRASIL, 2011; SURESH, 2007).

Esta doença resulta de mau funcionamento biológico das células. As células doentes proliferam-se descontroladamente e modificam a organização do tecido. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores (acúmulo de células cancerosas) ou neoplasias malignas. Por outro lado, um tumor benigno significa simplesmente uma massa localizada de células que se multiplicam vagarosamente e se assemelham ao seu tecido original, raramente constituindo um risco de vida, (BRASIL, 2011; ALMEIDA et al., 2005; SURESH, 2007).

Polímeros proteicos, são importante elementos do citoesqueleto celular e são responsáveis por determinar a forma e a rigidez mecânica da célula. Estas estruturas, bem como receptores de superfícies, encontram-se alterados no câncer, o que leva a uma mudança na capacidade dessas células de se esticar ou contrair-se. Como resultado, a motilidade das células tumorais pode ser muito diferente daquela encontrada em células normais, levando tais células a migrarem através dos tecidos para diferentes locais do corpo humano, induzindo à metástase tumoral, (Figura 1), (SURESH, 2007).

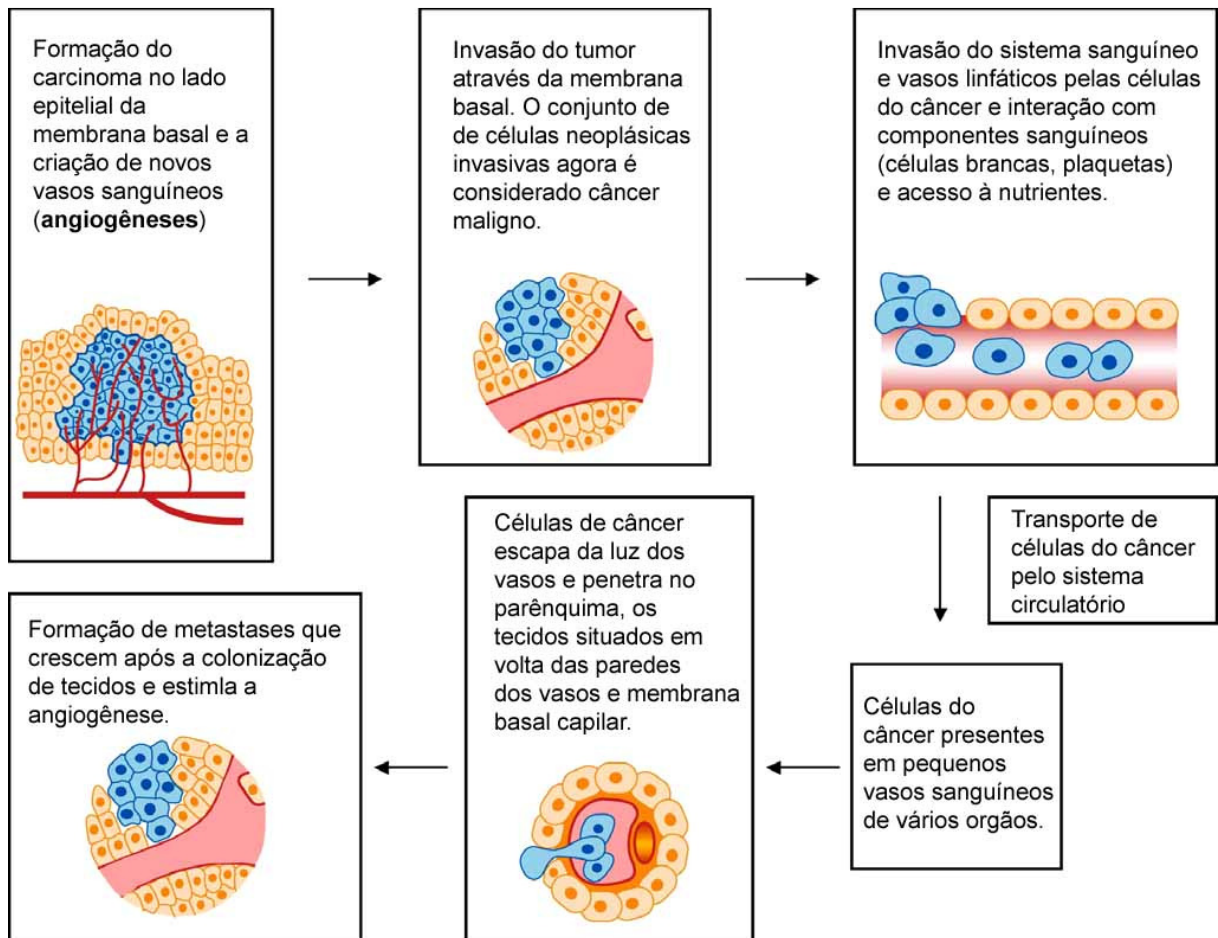


Figura 1 - Etapas envolvidas na metástase de células de câncer.

Fonte: Traduzido de Suresh (2007) adaptado com modificações de Weinberg (2006).

2.1.1 Apoptose e Câncer

Apoptose é o processo de morte celular programada e fisiológica, que ocorre através de uma série de eventos controlados geneticamente, sem alterações nos tecidos. Sua ocorrência deve-se a diversas alterações morfológicas e bioquímicas. Uma interrupção neste evento pode levar o tecido a um crescimento anormal, tornando a apoptose um método de controle celular de suma importância para a célula. A apoptose em mamíferos pode ser iniciada através da ativação de receptores específicos presentes na superfície celular, chamados receptores da morte, ou pela via intrínseca ou mitocondrial (BERGANTINI et al., 2005).

A apoptose pode ainda resultar da ativação do gene supressor de tumor p53. Sabe-se que mais da metade dos cânceres humanos são devidos, principalmente, a uma deficiência na função desse gene. O gene p53 atua como um reparador de

danos no DNA, utilizando a indução da apoptose para prevenir, assim, a proliferação de células com o DNA mutado e ainda, promover a correção da mutação através da ativação da proteína de reparo (LEVINE, MOMAND, FINALY, 1991; ARRUDA et al., 2008; RIVOIRE et al., 2001).

Embora o câncer exiba características muito heterogêneas, todos os tumores malignos adquiriram a propriedade de crescer além dos limites impostos às células normais. A expansão clonal de uma célula transformada depende de um descontrole da sua capacidade proliferativa e de uma crescente incapacidade de morrer por apoptose. Portanto, apesar da enorme variabilidade do câncer, evidências demonstram que a resistência à apoptose é uma das características mais marcantes da maioria dos tumores malignos (GRIVICICH et al., 2007).

2.1.2 Rodanase e Câncer

Rodanase (tiossulfato sulfotransferase) é uma sulfotransferase envolvida na desintoxicação de cianeto e processos de antioxição. A Rodanase transporta *sulfane sulfur* ligado covalentemente a outro átomo de enxofre, a partir de certos doadores de enxofre (como tiossulfato, polissulfetos e persulfides), para vários aceptores, entre eles o cianeto, (Figura 2), (WOOD, 1982; BORDO e BORK, 2002; WRÓBEL et al. 2004).

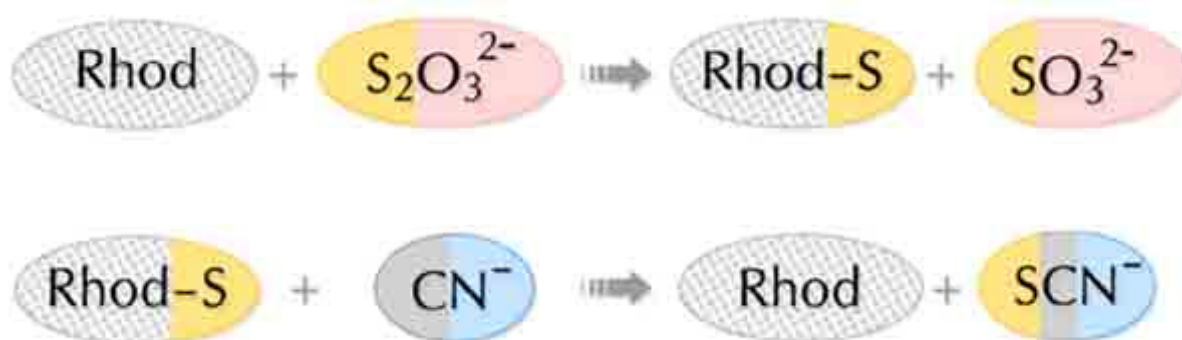


Figura 2 - Esquema representando a reação de transferência do enxofre catalisada pela rodanase
Fonte: Bordo e Bork (2002)

O papel biológico da rodanase ainda é amplamente debatido devido ao fato de que os substratos encontrados *in vivo* não parecem representar aqueles identificados nas reações *in vitro*. As proposições referentes às suas funções biológicas incluem a desintoxicação do cianeto, formação de complexos ferro-enxofre, manutenção do *pool* de *sulfane*, metabolismo do selênio e a biossíntese da tiamina, entre outras (BORDO e BORK, 2002; BIRKENKAMP-DEMTRODER et al., 2002).

As células neoplásicas possuem uma total falta de atividade da Cistationase (CST), enquanto a atividade de cisteína aminotransferase, 3-mercaptopiruvato sulfotransferase (MpST) e rodanase é somente residual. Tal comportamento prejudica a biossíntese e transporte de compostos a partir do *sulfane sulfur* nestas células (TOOHEY, 1989; PARK et al., 2005), Figura 3. Toohey (1989) sugere que a proliferação descontrolada de células neoplásicas é resultado da deficiência de *sulfane sulfur* e hiperatividade dessas enzimas, que seria inibida em células normais por esta forma ativa de enxofre. A rodanase também encontra-se com baixa atividade em fígados de camundongos portadores de Tumor Ascítico de Ehrlich, devido a uma diminuição nos níveis de *sulfane sulfur* (KWIECIEN et al. 2006).

Nas células do Tumor Ascítico de Ehrlich, em contraste com células normais do fígado e células do rim, existe uma total dependência do fornecimento de cisteína a partir da reação catalisada por γ -glutamil-transpeptidase. A inibição da atividade γ -glutamil-transpeptidase limita significativamente a atividade das sulfotransferases, prejudicando a defesa antioxidante, bem como a desintoxicação de drogas nessas células cancerosas e pode seletivamente aumentar sua vulnerabilidade à quimioterapia e radioterapia (WRÓBEL et al., 2004).

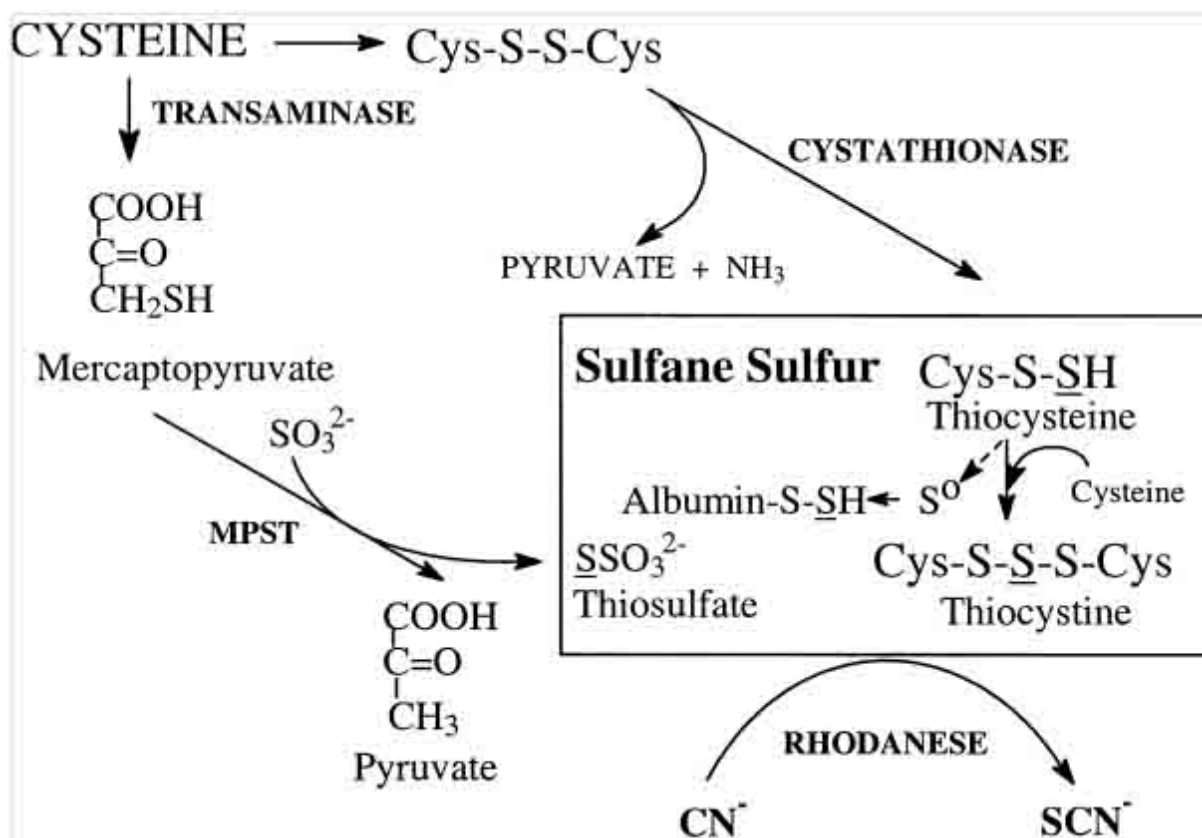


Figura 3 - Participação das sulfotransferases na desintoxicação do cianeto. MPST 3-mercaptopiruvato enxofretransferase. CN^- Cianeto. SCN^- Tiocianato. Fonte:Wróbel et al. (2004).

Lin et al. (2010) citam estudos que sugerem por meio de experimentos *in vivo* e *in vitro* que a cisteína provavelmente atua como um agente pró-oxidante, promovendo danos oxidativos de DNA e levando a uma superprodução de radicais livres e peróxido de hidrogênio, o que promove uma mutação genética e como consequência o desenvolvimento de um câncer. Segundo Lin, existe evidência de um risco maior no desenvolvimento do câncer de mama entre mulheres com concentrações elevadas de cisteína plasmática.

Segundo Murphy et al. (2011), a cisteína está envolvida em uma série de vias relevantes para a carcinogênese, mas ainda há uma escassez de estudos epidemiológicos que determinem seu papel na etiologia do câncer. Os autores relacionam uma diminuição significativa do risco de câncer esofágico e gástrico frente a grandes concentrações de cisteína no soro. Esta diferença encontrada por eles em relação a outros estudos ocorre, possivelmente, pelo grande número de vias

biológicas que a cisteína modula. Sendo que seu papel na carcinogênese é provavelmente determinado pelo tipo de tumor e pelo contexto fisiológico.

2.1.3 *Sulfane sulfur* e Câncer

O termo *Sulfane sulfur* refere-se ao conjunto de compostos que apresentam um átomo de enxofre ligado covalentemente a um outro átomo de enxofre reduzido. "Proteínas associadas a enxofre", "enxofre ligado" e "enxofre ácido-lábil" referem-se a compostos específicos com *sulfane sulfur*. Portanto, *sulfane sulfur* não deve ser utilizado de forma intercambiável com os termos já citados (ICIEK e WLODEK, 2001).

O *Sulfane sulfur* é gerado a partir de várias vias metabólicas já descritas, sendo frequente a existência de proteínas carreadoras, capazes de estabilizar e transportar *sulfane sulfur*. A deficiência no metabolismo anaeróbico de enxofre está relacionada a processos neoplásicos, infecções por vírus e imunodeficiência, sugerindo que este possa exercer uma função reguladora nas células por meio de modificação nos grupos -SH, e esta atividade elevada e meia-vida curta lhe conferem características de um eficiente regulador (ICIEK e WLODEK, 2001).

Toohey (1989), apresenta uma revisão trazendo informações como características dos compostos *sulfane* e sua afinidade em reagir com cianeto, bem como evidência do metabolismo do enxofre nos processos de malignidade, a deficiência de cistationase em muitas células malignas e diferenças no metabolismo de homocisteína entre células normais e malignas. O texto apresenta também uma importante informação quanto ao defeito no metabolismo de enxofre em células cancerosas, juntamente com os efeitos antitumorais *in vivo* de fontes de *sulfane sulfur*. Esses dados procuram demonstrar que a proliferação incontrolável de células malignas pode estar relacionada a uma deficiência de *sulfane sulfur* e uma ação incontrolável de um conjunto enzimático que normalmente é inativado por este composto. Tumores com altas taxas, intrinsecamente, de crescimento podem ter atividades mais baixas da enxofre-transferase do que o tecido normal ou tumores com baixas taxas de crescimento.

Shibuya et al. (2009) demonstraram que o H_2S produzido no cérebro de camundongos a partir de cisteína através do metabolismo com cisteína aminotransferase e 3-mercaptopiruvato sulfotransferase eram estocados sob a forma estável de *sulfane sulfur* conjugado, e que esta também é a maior fonte, fisiologicamente relevante, produtora de H_2S no cérebro, (Figura 4).

Em seus estudos, Jurkowska e Wróbel (2008), concluíram que o teor de *sulfane sulfur* é menor em células astrocitoma U373, em comparação com os astrócitos de camundongo. N-acetilcisteína, um precursor de L-cisteína inibiu a proliferação das células U373, constatação essa que foi associada com a estimulação da atividade 3-mercapto sulfo transferase (MPST) e elevação do nível de *sulfane sulfur*. e que, em comparação com as células normais, as atividades de MPST e rodanase estão significativamente diminuídas em linhagens U373 astrocitoma.

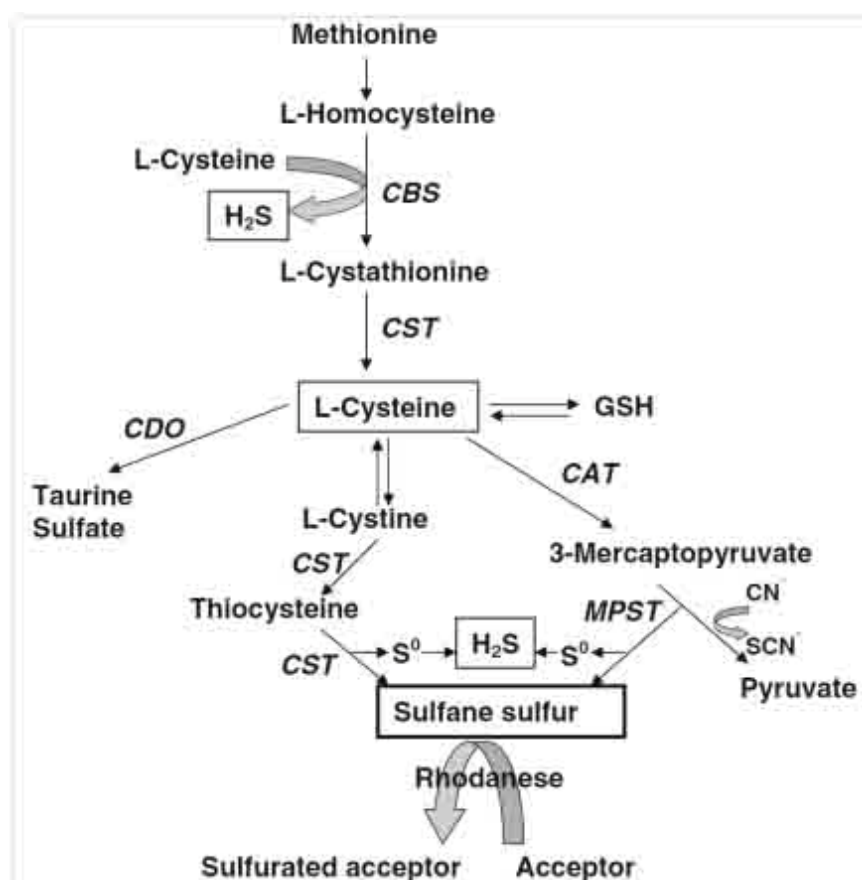


Figura 4 - L-Cisteína e suas vias metabólicas. CST γ-Cistationase. MPST 3-mercaptopiruvato enxofretransferase. CBS Cistationina β-sintase. CDO Cisteína dioxigenase. CAT Cisteína aminotrasferase. A Metionina é convertida em homocisteína pela S-adenosilmetionina (SAM). A homocisteína é convertida em cisteína pela CBS e CST. A cisteína é convertida em H_2S ou *sulfane sulfur* pela CST e CAT em conjunto com a MPST.

Fonte: Jurkowska et al. (2011).

Segundo Schnelldorfer et al. (2000), citados por Jurkowska et al. (2011), um aumento dose-dependente dos níveis de Glutathione (GSH) estimulou a proliferação de células, ao passo que a diminuição de GSH provocou a inibição do crescimento celular e aumento da apoptose em células pancreáticas cancerosas.

2.2 Tumor de Ehrlich

É uma neoplasia transplantável de origem maligna que corresponde ao adenocarcinoma mamário do camundongo fêmea, podendo sofrer as influências dos hormônios envolvidos na gênese do câncer de mama, como estrógeno, prolactina, andrógenos e até mesmo dos hormônios tireoidianos. O tumor pode crescer nestes animais de duas formas distintas, ascítica (quando inoculado intraperitonealmente) e sólida (quando inoculado no subcutâneo) (PALERMO et al., 2003; VALADARES e QUEIROZ, 2002). Por tais características, é utilizado como modelo no estudo da ação de componentes físicos, químicos e biológicos sobre o crescimento, patogênese, cinética, imunologia, bioquímica e terapêutica dos tumores (PALERMO et al., 2003; VALADARES e QUEIROZ, 2002).

No estudo *in vivo* para a atividade antitumoral, o Tumor de Ehrlich é um modelo prático para análise antineoplásica de diversos compostos. Sua vantagem sobre os demais tumores está principalmente na possibilidade do conhecimento prévio da quantidade e características das células tumorais inoculadas. Outra característica importante é a possibilidade de um tempo curto de estudo, devido à rapidez no desenvolvimento da neoplasia, já que a forma ascítica atinge seu pico de proliferação no sétimo dia, enquanto na forma sólida seu pico ocorre no décimo quarto dia (KLEIN e KLEIN, 1951; SILVA, 2006b).

O Tumor de Ehrlich é induzido pelo transplante de células tumorais oriundas de outro animal que já possui a neoplasia desenvolvida, podendo ser inoculado diretamente no peritônio do animal receptor, desenvolvendo a forma ascítica, ou diretamente por via subcutânea ou coxim plantar, desenvolvendo, assim, a forma sólida do tumor de Ehrlich (RAMALHO et al., 2010; SILVA et al., 2002).

No aspecto histológico, o tumor de Ehrlich apresenta-se como uma massa tumoral envolvida por uma pseudocápsula e constituída por células pleomórficas

com citoplasma abundante e às vezes apresentando vacúolos. Além disso, células gigantes multinucleadas e figuras de mitose aparecem com certa frequência neste tumor, o qual pode apresentar extensa área de necrose oriunda da morte de células neoplásicas (ABDEL-RAHMAN E KABEL, 2012; OLORIS et al., 2002; BELO et al., 2004).

2.3 Tratamento do câncer

O tratamento do câncer teve um desenvolvimento muito lento ao longo do tempo. No passado, não se imaginava possível qualquer tipo de tratamento curativo, principalmente quando o câncer tinha se disseminado; além disso, acreditava-se que uma possível intervenção poderia ser mais prejudicial do que o tratamento. A história só começou a mudar por volta do século 19 e início do século 20, onde grandes avanços em cirurgia geral e cirurgia de câncer foram alcançados (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2012).

Segundo Almeida et al., (2005), o objetivo do tratamento do câncer é erradicá-lo e as ações para que isso ocorra podem ser de diferentes formas: cirurgia, radioterapia, terapia hormonal, imunoterapia, terapias orientadas e quimioterapia. A cirurgia é usada para extrair todo o tumor, quando não há metástase. A radioterapia, normalmente é usada em conjunto com a cirurgia com intuito de melhorar o tratamento, mas também pode ser usada, com bastante eficiência, isoladamente. Os autores citam que com estes tratamentos locais, cerca de um terço dos pacientes consegue a cura da doença. Já nos demais casos ocorre o aparecimento de micrometástases, indicando uma abordagem sistêmica.

As pesquisas com terapia hormonal buscam uma melhor compreensão de como os hormônios influenciam o crescimento do câncer. Tais estudos têm influenciado o desenvolvimento de novas drogas para o tratamento da doença, além de auxiliarem na maneira como se utilizam outras drogas, com o intuito de se diminuir o desenvolvimento de câncer. Na área da imunoterapia, os cientistas estudam vacinas que aumentam a resposta imunológica do organismo às células cancerosas. As terapias orientadas atuam influenciando os processos que controlam o crescimento, a divisão e proliferação das células cancerosas, bem como os sinais

que fazem com que as células cancerosas possam sofrer apoptose (ALMEIDA et al., 2005; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2012).

A quimioterapia tem como objetivo destruir as células neoplásicas preservando as normais. Esse comportamento não é observado na maioria dos quimioterápicos que atuam de forma não seletiva, eliminando tanto células neoplásicas quanto células normais, principalmente células de crescimento rápido. Por este motivo, observa-se vários efeitos colaterais do tratamento: náuseas, perda de cabelos e suscetibilidade maior às infecções. Atualmente, vários estudos buscam reduzir os efeitos colaterais da quimioterapia (ALMEIDA et al., 2005).

2.4 Acetona Cianidrina (AC)

Também conhecida por 2 - Metil Lactonitrila ou α - Hidroxisobutironitrila, é um líquido aquoso, incolor, com odor suave de amêndoa, característica esta devido à presença de cianeto de hidrogênio (HCN). Miscível em água, é muito utilizada na fabricação de acrílico (Poli Metil Metacrilato), além de seu uso na indústria farmacêutica e de cosméticos. A acetona Cianidrina se decompõe espontaneamente em acetona e HCN na presença de água (CETESB, 2013; USA, 2009). Mais informações a respeito da Acetona Cianidrina são demonstradas no Quadro 1.

A Acetona Cianidrina possui massa molecular de 85,11, densidade de 0,925 a 25°C, bem como ponto de fusão de -19°C. A fórmula molecular e estrutural é demonstrada na Figura 5.

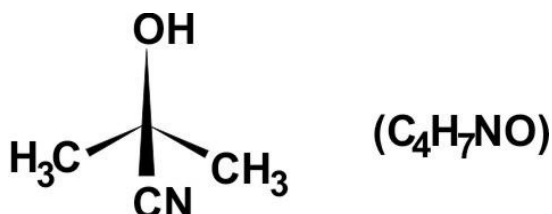


Figura 5 - Fórmula molecular e estrutural da Acetona Cianidrina
Fonte: Merck Índice (2005), Idibie (2007)

Parâmetros	Informação
Fórmula molecular	$(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{OH})\text{CN}$
Peso Molecular	85,1
Estado Físico	Líquido
Cor	Transparente Levemente amarelado
Sinônimos	2-Propanone cyanohydrin; 2-cyano- 2-propanol; 2-cyano-2-hydroxypropane; hydroxyisobutyronitrile; 2-methylactonitrile; 2-hydroxy-2-methylpropionitrile; Acetoncyanhydrin
Pressão de vapor	1.07 hPa em 20 °C 0.8 mm Hg em 20 °C 1 mm Hg em 25 °C 1.6 hPa em 40 °C 12.5 hPa em 72 °C
Densidade	0.932 g/cm ³ em 19 °C 0.9267 g/cm ³ em 25 °C
Ponto de fusão	-19 °C a -20 °C
Ponto de ebulição	81 °C em 30.7 hPa 82 °C em 23 mm Hg 95 °C em 1013 hPa (decomposição em acetona e HCN)
Solubilidade	Muito solúvel em água, álcool e éter
Odor	Odor característico de amêndoa devido ao cianeto livre
Limites para explosão	2.2 % (LEL) to 12 % (UEL)
Fatores de conversão	1 ppm = 3.5 mg/m ³ 1 mg/m ³ = 0.28 ppm

Quadro 3 - Informações físico-químicas da Acetona Cianidrina

Fonte: USA, 2009

A ação da Acetona Cianidrina no organismo é semelhante à de seu equivalente molar de cianeto *in vivo*. Por exemplo, a DL_{50} intraperitoneal em camundongos para a Acetona Cianidrina é equivalente a 2,65 mg de íon cianeto/Kg, similar à do cianeto sódico que é de 2,54 mg íon cianeto/Kg e possuindo um tempo médio para a morte de 5 minutos para os dois compostos. A dose letal (DL_{50}) de Acetona Cianidrina é de 8,5 mg/Kg de peso, (MAGOS, 1962; THOMPSON, 2003).

2.4.1 Toxicologia e fisiopatologia do cianeto

O cianeto possui uma ação metabólica rápida e letal. A intoxicação ocorre principalmente através da inibição da citocromo-oxidase, uma enzima mitocondrial da cadeia respiratória. A exposição ao cianeto pode também resultar na perda da capacidade para regular os sistemas de transporte de íons que controlam o pH citosólico, com efeitos potencialmente letais. Nos mamíferos, a desintoxicação do cianeto é catalisada, em sua maior parte, pela enzima rodanase, que é normalmente encontrada no fígado, e os metabólitos não tóxicos resultantes são excretados através dos rins. Sendo uma molécula pequena, o cianeto pode facilmente penetrar nas células e não requer um mediador para exercer a sua ação (KOUSPAROU, 2002).

No que diz respeito ao metabolismo de cianeto, é importante fazer a distinção entre o metabolismo do cianeto para baixas doses, que ocorre sob as circunstâncias em que o cianeto se encontra presente em concentrações fisiológicas, e de cianeto em altas doses, em que quantidades de cianeto são muito superiores àquelas presentes em condições fisiológicas normais. O metabolismo do cianeto em doses baixas envolve a incorporação do cianeto, através de enzimas vitamina B12 dependentes (USA, 2009).

Em doses elevadas de cianeto, a via metabólica de enzimas vitamina B12 dependentes fica rapidamente saturada, levando à desintoxicação que envolve a formação enzimática de tiocianato. O ciclo catalítico se inicia com um doador de enxofre ligando-se à rodanase e transferindo um átomo de enxofre à cisteína 247, formando cisteína persulfido, (Figura 6). Esta transferência ativa a enzima e libera o doador de enxofre reduzido. A enzima ativada liga-se ao cianeto (HCN) por meio de uma ponte de hidrogênio utilizando um resíduo carregado positivamente. Em seguida, a rodanase transfere o enxofre terminal da cisteína persulfido para o HCN formando tiocianato (HSCN), que é liberado e a enzima retorna ao seu estado inicial. O tempo de meia vida para a conversão do cianeto para tiocianato a partir de uma dose não letal, em humanos, é entre 20 e 60 minutos (USA, 2009; ZOTTOLA et al., 2009).

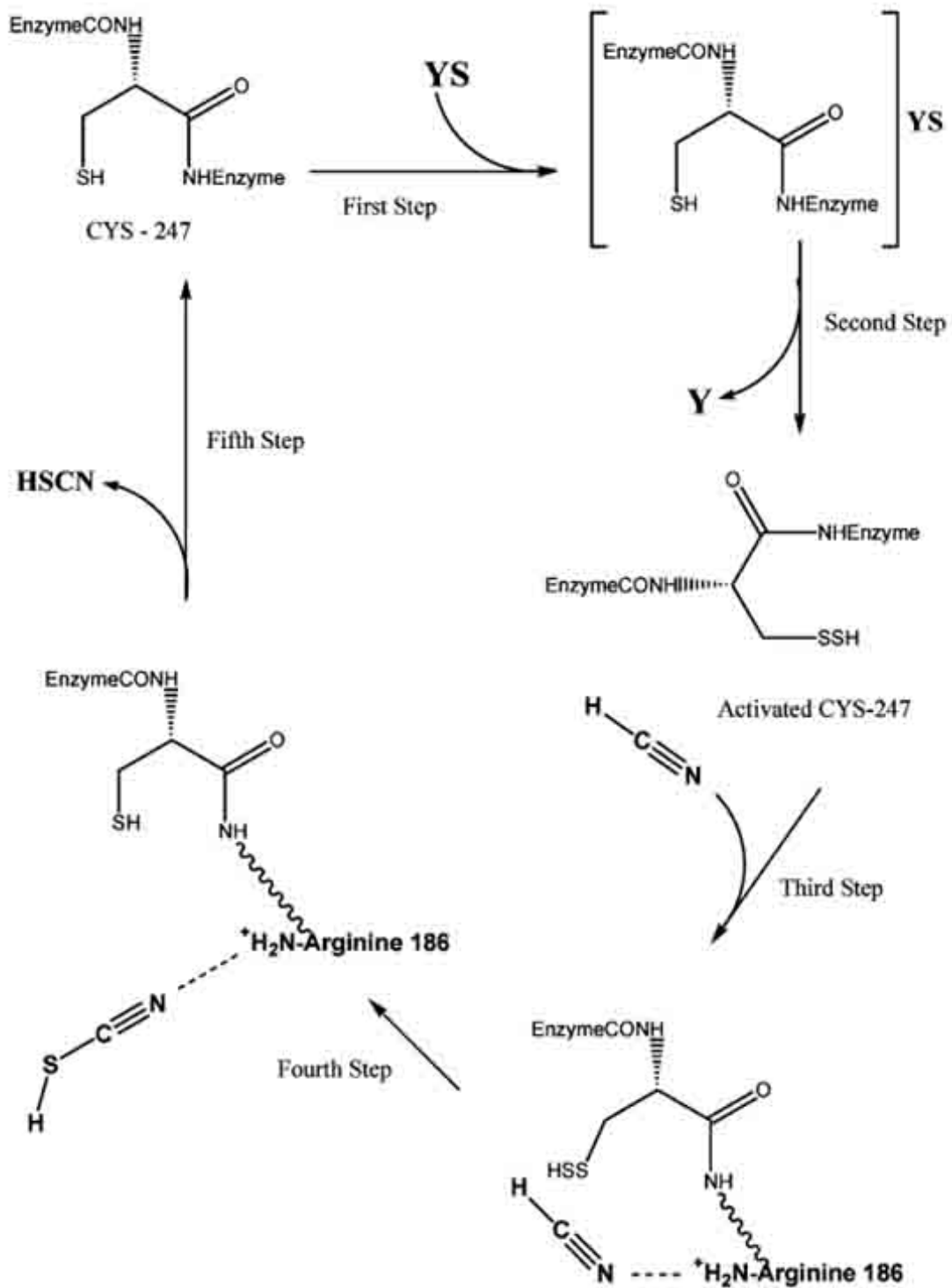


Figura 6 - Mecanismo da desintoxicação do cianeto mediada pela rodanase.
 Fonte: Zottola et al. (2009)

Alterações moleculares após a intoxicação por cianeto sugerem uma morte celular por necrose, a qual é caracterizada por uma extensa lise celular que ocorre no decorrer da lesão aguda, ocorrendo a inibição da fosforilação oxidativa

mitocondrial e levando a uma asfixia celular. Admite-se que para a indução apoptótica sejam necessários níveis elevados de energia (ATP), enquanto que durante a necrose eles são menores. Durante a exposição ao cianeto, os níveis de ATP são suspeitos de cair drasticamente devido à inibição da fosforilação oxidativa, sendo essa diminuição abaixo do nível necessário para a apoptose, consequentemente resultando em morte celular por necrose (KOUSPAROU, 2002).

2.4.2 O cianeto no controle do câncer

Encontra-se na literatura uma infinidade de trabalhos relacionados ao uso de substâncias cianogênicas, como a Linamarina e a Amigdalina, no combate ao câncer (NAVARRO e LAGMAN, 1957; WODINSKY e SWINIARSKI, 1975; JUKES, 1976; STOCK et al., 1978; SYRIGOS et al., 1998; KOUSPAROU et al., 2002; FUKUDA et al., 2003; CHEN et al., 2013). Não obstante, pode-se encontrar um número igualmente elevado de artigos com questões controversas relacionadas ao seu uso (ROSS, 1975; GREENBERG, 1975; SABER, 1977; MOSS e KHALIL, 1981; VICKERS et al., 2006).

Fukuda et al., (2003), relataram efeitos antitumorais da Amigdalina e outros componentes de sementes de pêssogo (*Prunus pérsica*). Segundo os autores, o cianeto seria o ingrediente ativo da Amigdalina no combate ao câncer e que a enzima rodanase, que tem a capacidade de desintoxicar cianeto e está presente nos tecidos normais, seria deficiente nas células cancerosas, deixando de protegê-las enquanto as células normais permaneceriam intactas. A desintoxicação do cianeto ocorre em todas as células humanas normais, mas as células cancerígenas, que apresentam uma baixa atividade de rodanase tornam-se vulneráveis ao efeito tóxico do cianeto, (JAMSHIDZADEH et al., 2001).

No conceito mais atual, em que compostos são usados em quimioterapia devido à ação mais seletiva e menos agressiva, o cianeto da Linamarina tem sido testado com sucesso, com artigos sobre o assunto sendo publicados desde 1991, como Oxtoby et al. (1991) que escreveram sobre estrutura, interações e outras características da Linamarina e Linamarase; Keresztessy et al. (2001) que identificaram e clonaram a sequência genética da mandioca, que é responsável pela síntese de Linamarase, principal enzima envolvida na degradação da Linamarina,

dando início assim ao uso da substância em testes de terapia gênica e demonstrando todo seu potencial para o tratamento do câncer; Kousparou et al. (2002) que descreveram um processo baseado na enzima β -glicosidase em combinação com uma “pro-droga” (Linamarina) com produção de cianeto citotóxico.

O uso de terapia gênica através de células-alvo vem ganhando espaço na pesquisa. Cortés et al. (2002) demonstraram que o sistema *bystander* não inativou preferencialmente células produtoras de metabólitos tóxicos, mas também as células cancerosas não produtoras em torno das células *bystander*, e que produziu cianeto suficiente para causar regressão do tumor, demonstrando o potencial do sistema de terapia gênica Linamarina/Linamarase como ferramenta para eliminação de tumores *in vivo*.

A principal hipótese do uso de substâncias cianogênicas no tratamento de câncer é ancorada pela ineficiência dessas células em eliminar o cianeto (CN^-). Iciek e Wlodek (2001) descreveram que esta baixa eficiência é comprometida pela diminuição de compostos *Sulfane sulfur*. Informaram ainda que a regressão de tumores transplantados em camundongos e inibição do tumor induzido por cancerígenos, através do uso de diferentes precursores *Sulfane sulfur*, confirmam a hipótese acima. Um ambiente perfeito para intoxicação acumulativa por cianeto é proporcionado nas células cancerígenas, devido ao efeito da rodanase ser apenas residual.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Estudar o efeito da Acetona Cianidrina no desenvolvimento dos tumores de Ehrlich.

3.2 ESPECÍFICO

3.2.1 Avaliar a porcentagem de inibição de crescimento das células do tumor de Ehrlich, *in vitro*, após tratamento com Acetona Cianidrina.

3.2.2 Avaliar a ação da Acetona Cianidrina no desenvolvimento do Tumor Ascítico de Ehrlich em camundongos.

3.2.3 Avaliar a ação da Acetona Cianidrina no desenvolvimento do Tumor Sólido de Ehrlich em camundongos.

4 METODOLOGIA

O projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de animais da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), sob protocolo número 227.

4.1 - Manutenção do tumor *in vivo* e obtenção das células tumorais

Utilizou-se como modelo experimental o tumor ascítico de Erlich em camundongos, proveniente de cepa fornecida pelo Departamento de Imunopatologia da Faculdade de Medicina da UNESP de Botucatu, SP. A manutenção do tumor *in vivo* foi feita pela injeção intraperitoneal de 2×10^6 células a cada dez dias em camundongos receptores (BALA et al., 2010).

Os animais portadores do tumor foram sacrificados por dose em excesso de anestésico (0,25mL de quetamina e xilazina na proporção de 1/1) sete dias após a inoculação tumoral. Após a assepsia da parede abdominal com álcool iodado, foi realizada a laparotomia mediana, com retirada de todo o líquido ascítico possível, por meio de aspiração com seringa de 5mL e transferência do líquido para um tubo de ensaio seco e estéril.

A seguir, o líquido foi centrifugado duas vezes a 1500 rpm durante dez minutos, sendo o sobrenadante descartado e as células tumorais novamente suspensas em solução salina tamponada ao volume original (3mL a 5mL). O número total de células na suspensão foi determinado pela contagem de células na câmara de Neubauer. A concentração desejada (10^8 células por mL) de células foi obtida mediante a diluição da suspensão em solução salina tamponada e em seguida 0,2mL da solução foi injetada intraperitoneal em camundongo sadio obtido do Biotério da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande/MS. Os camundongos inoculados foram acondicionados em caixas de polipropileno retangulares grandes (49x34x16), forradas com cama de maravalha trocada semanalmente, com ciclo de 12h claro / 12h escuro, com ventilação apropriada e alimentados com água natural e ração (oferecidas "*ad libitum*"). Os animais foram manipulados através da base da cauda, de maneira rápida e cuidadosa até que fossem colocados sobre a superfície de apoio para os procedimentos.

4.2 Avaliação da inibição de crescimento de células do tumor de Ehrlich após tratamento com Acetona Cianidrina *in vitro*

4.2.1 Preparação das células e cultura

A suspensão celular obtida a partir dos animais de manutenção foi lavada e resuspendida em meio *Dulbecco's Modified Eagle's* (DMEM), sendo ainda suplementada com 5% de soro fetal de bovino; em seguida, a suspensão celular foi ajustada para $1,0 \times 10^5$ células.mL⁻¹. Depois de ajustada a concentração, a suspensão foi separada em alíquotas de 1,0 mL e cultivadas com 0 (controle), 0,5, 1,0 e 2.0µg de Acetona Cianidrina em DMEM suplementado com 5% de soro fetal, com um pH entre 7,0 e 7.2. Após 1, 2, 3, 4, 18 e 24 horas, foram realizados testes de viabilidade celular e a porcentagem de inibição do crescimento (PIC) foi determinada, sendo este procedimento repetido duas vezes e em duplicata.

4.2.2 Cálculo da Porcentagem de Inibição de Crescimento

A fórmula abaixo foi utilizada para calcular a PIC celular:

$$\text{PIC} = 100 (1 - R/C)$$

Onde:

(R) N° de células viáveis no grupo tratado

(C) N° de células viáveis no grupo controle

Fonte: NERY (2004)

4.3 Avaliação da ação da Acetona Cianidrina no Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE)

4.3.1 Animais

Foram utilizados 30 camundongos da linhagem Swiss, machos, com peso médio de 35 ± 5 gramas, oriundos do Biotério Central da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Os animais foram mantidos no biotério de experimentação por sete dias prévios aos procedimentos.

4.3.2 Transplante do tumor

Os animais doadores sofreram eutanásia com dose excessiva de anestésico. Em seguida, realizou-se a lavagem peritoneal com 3mL de solução salina tamponada, retirando-se por aspiração os mesmos 3mL. A suspensão celular obtida foi centrifugada, o sobrenadante desprezado e o sedimento resuspendido com 3mL de solução salina tamponada. Na suspensão, foi realizado o teste de viabilidade celular através de exclusão do azul de Tripán. Em seguida, foi determinado o número de células em Câmara de Neubauer.

Todos os camundongos dos 3 grupos receberam injeção intraperitoneal contendo 0,4mL de suspensão de células do TAE (contendo $1,0 \times 10^3$ células viáveis).

4.3.3 Programa de Tratamento

O dia da inoculação do tumor nos animais foi considerado como dia zero. O tratamento foi iniciado no 3º dia e repetido a cada 48h até o 13º dia. Aleatoriamente, os animais foram distribuídos em 3 grupos: Controle (GC), n=10; Acetona Cianidrina 1 (GAC1), n=10; Acetona Cianidrina 2 (GAC2), n=10.

O GC recebeu 0,4mL de solução salina via intraperitoneal, o GAC1 recebeu 0,4mL de Acetona Cianidrina 1,864 mg/Kg intraperitoneal e o GAC2 recebeu 0,4mL de Acetona Cianidrina 2,796 mg/Kg intraperitoneal. Decorridas 48h após o último tratamento, os animais sofreram eutanásia através da administração de dose excessiva de anestésico, para medida da atividade antitumoral da Acetona Cianidrina.

4.3.4 Viabilidade das Células de TAE

A viabilidade das células de TAE foi verificada pelo teste de azul de tripan. As células foram coradas com corante azul de tripan (0,4% em solução salina normal). Aquelas que não incorporaram o corante foram consideradas viáveis, enquanto as demais eram inviáveis. Estas células viáveis e não viáveis foram contadas (RAMALHO et al. 2010).

4.4 Avaliação da Acetona Cianidrina no Tumor Sólido de Ehrlich (TSE)

4.4.1 Implantação do TSE

Foram utilizados 20 camundongos da linhagem Swiss, machos, com peso médio de 35 ± 5 gramas, oriundos do Biotério Central da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Os animais foram mantidos no biotério de experimentação por sete dias prévios aos procedimentos.

Os animais doadores sofreram eutanásia com dose excessiva de anestésico. Após foram feitas a lavagem peritoneal com 3mL de solução salina tamponada, retirando-se em seguida por aspiração os mesmos 3mL. A suspensão celular obtida foi centrifugada, o sobrenadante desprezado e o sedimento resuspendido com 3mL de solução salina tamponada. Na suspensão foi realizado o teste de viabilidade celular através de exclusão do azul de Tripan. Em seguida, foi determinado o número de células em Câmara de Neubauer.

Os camundongos foram pesados e em seguida sedados com 0,1mL de quetamina/xilazina (quetamina 0,5mg/100g de peso e xilazina 0,2mg/100g de peso) e após tricotomia foram inoculados, com auxílio de seringas e agulhas descartáveis, com 0,05mL de suspensão celular contendo $2,5 \times 10^5$ células viáveis de tumor de Ehrlich, via subcutânea, provenientes dos animais portadores para manutenção, na parede abdominal esquerda de todos os animais (Figura 7), obtendo-se, assim, a implantação do TSE. Os animais foram mantidos com o tumor durante 15 dias.

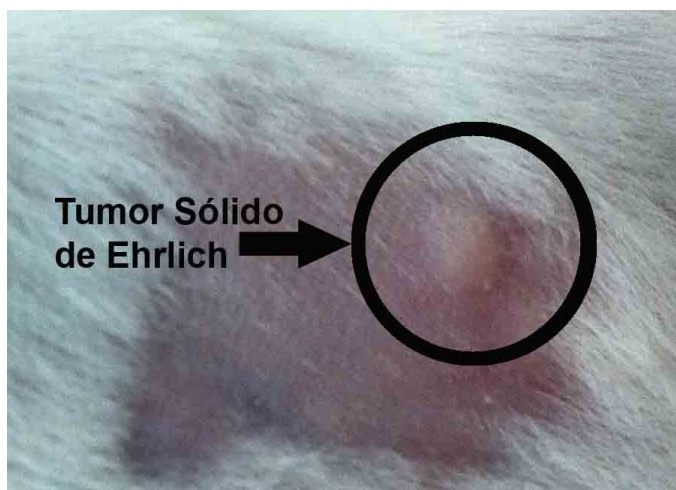


Figura 7 - Tumor Sólido de Ehrlich implantado subcutâneo na parede abdominal esquerda do camundongo.

4.4.2 Programa de Tratamento

O dia da inoculação do tumor nos animais foi considerado como dia zero. O tratamento foi iniciado no 3º dia e repetido a cada 48h até o 13º dia. Aleatoriamente, os animais foram distribuídos em 2 grupos: Controle (GC), n=10, tratados com salina; Acetona Cianidrina (GAC), n=10, tratados com 2,796 mg/Kg de Acetona Cianidrina. As doses foram aplicadas intraperitoneal. Decorridas 48h após o último tratamento, os animais sofreram eutanásia através da administração de dose excessiva de anestésico (0,25mL de quetamina e xilazina na proporção de 1/1), para avaliação da atividade antitumoral da Acetona Cianidrina no tumor sólido. Em seguida foi efetuada a pesagem dos animais.

4.4.3 Extração do Tumor Sólido de Ehrlich

A massa tumoral (Figura 8) foi coletada e sua medida no maior e menor eixo foi determinada utilizando um paquímetro digital marca ZAAS (Figura 9). E em seguida foi mantida em solução de formaldeído a 10% por um dia e transferida para álcool 70%. Após, as amostras foram enviadas ao Laboratório de Histopatologia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da UFMS, para serem incluídas em parafina, cortadas com 5µm de espessura e coradas pela hematoxilina-eosina (HE).



Figura 8 - Extração do Tumor Sólido de Ehrlich após 15 dias de inoculação subcutânea na parede abdominal esquerda do camundongo.

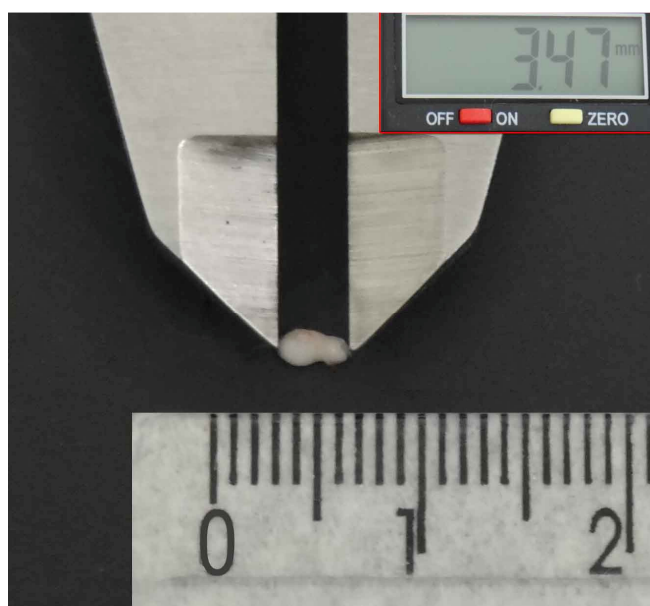


Figura 9 - Obtenção das medidas tumorais, utilizando paquímetro de precisão ZAAS.

4.4.4 Quantificação do volume tumoral

Após a extração, os tumores foram medidos manualmente (os dois diâmetros, maior e menor) utilizando-se um paquímetro (Figura 9). A realização do cálculo do volume tumoral foi de acordo com a seguinte fórmula:

$$VT = D \times d^2 / 2$$

Onde:

(VT) Volume Tumoral

(D) Diâmetro maior

(d) Diâmetro menor.

Fonte: GOMES-NETO (2008), SILVA (2006a); SHINKAI (2002)

4.4.5 Preparo do fragmento tumoral para histologia

Após a eutanásia, os fragmentos dos tumores foram coletados, medidos e fixados em formol 10% por 24 horas; em seguida, foram transferidos para álcool 70% e enviados para o Laboratório de Histopatologia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da UFMS, onde foram incluídos em parafina, cortados com 5µm de espessura e corados pela hematoxilina-eosina (HE).

4.4.6 Quantificação da porcentagem de necrose na área tumoral

As lâminas foram coradas por HE e, em seguida, submetidas à leitura e determinação das áreas de necrose; em meio à massa tumoral, as mesmas foram quantificadas utilizando o software AutoCAD 2014 (Versão gratuita para teste).

As imagens da massa tumoral foram analisadas ao microscópio em objetiva de 20X e capturadas em sua plenitude utilizando uma máquina fotográfica digital da marca Nikon modelo Coolpix. Após serem digitalizadas, as imagens foram analisadas no software AutoCAD e as áreas de necrose delimitadas por meio do cursor eletrônico e calculadas em mm², sendo também delimitada a área total da massa tumoral e calculada sua respectiva área em mm² (Figura 10).

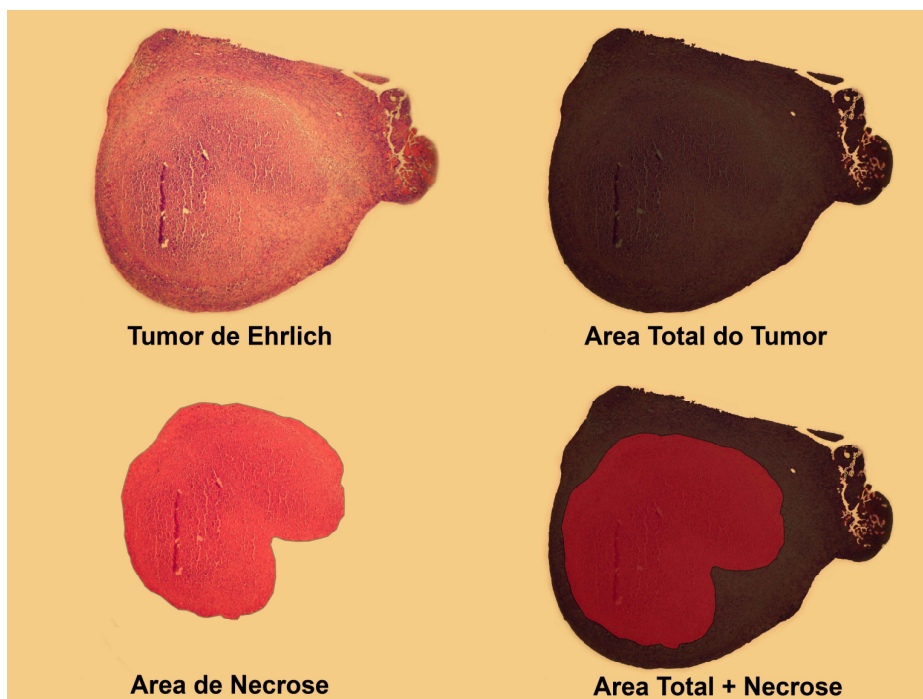


Figura 10 - Ilustração da determinação da área total do tumor de Ehrlich e da área de necrose do tumor, utilizando o software AutoCAD.

Para obter a porcentagem da área de necrose em meio à massa tumoral, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\% \text{ área de necrose} = \text{área de necrose} / \text{área total da massa tumoral}$$

Fonte: MATSUZAKI (2004)

4.5 Análise Estatística

4.5.1 Avaliação da PIC em células do TE e o efeito no TAE após tratamento com Acetona Cianidrina

Para verificar as diferenças significativas entre os grupos *in vitro* e no TAE, os resultados foram analisados com o *one-way ANOVA* seguido pelo teste de comparação múltipla de Tukey. O nível de significância foi de 5% ($p < 0,05$).

4.5.2 Avaliação da Acetona Cianidrina no TSE

Para verificar as diferenças significativas entre os grupos Controle e Tratamento no TSE, os resultados foram analisados por estatística do tipo paramétrica para duas amostras independentes com utilização do teste de t-student. O nível de significância foi de 5% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação da porcentagem de inibição de crescimento da Acetona Cianidrina *in vitro*

Com os resultados demonstrados na Figura 11 e Tabela 1, referentes à porcentagem de inibição do crescimento das células do Tumor Ascítico de Ehrlich após o tratamento com Acetona Cianidrina, constatou-se que as três doses de Acetona Cianidrina utilizadas demonstraram um mesmo padrão.

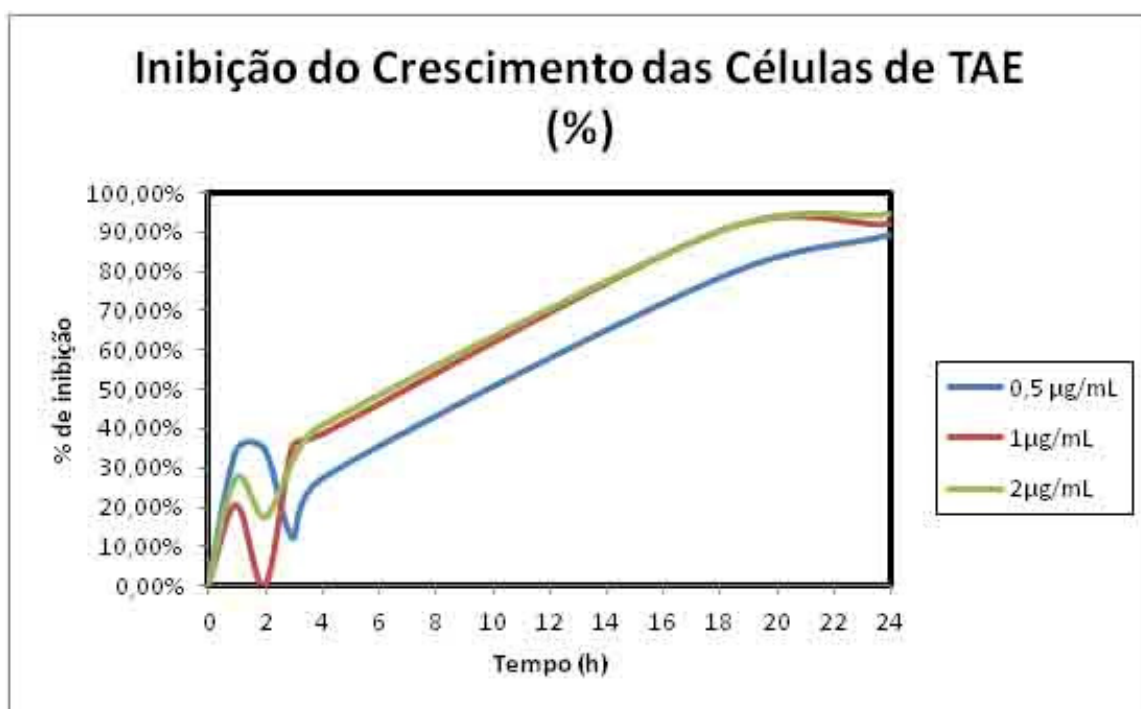


Figura 11 - Gráfico demonstrando a curva de inibição de crescimento após tratamento com Acetona Cianidrina *in vitro* em relação ao controle.

A avaliação do percentual de inibição da Acetona Cianidrina demonstrou não haver uma diferença significativa entre as três doses, 0,5, 1 e 2 µg/mL, atingindo 89,47, 92,11 e 94,74%, respectivamente.

Tabela 1 - Valores absolutos das células e porcentagem de inibição de crescimento das células de TAE tratadas com acetona cianidrina (0.5, 1.0 e 2.0 µg/mL).

	1 h		2 h		3 h		4 h		18 h		24 h	
	CV (10 ⁵)	%IC	CV (10 ⁵)	%IC	CV (10 ⁵)	%IC	CV (10 ⁵)	%IC	CV (10 ⁵)	%IC	CV (10 ⁵)	%IC
Controle	2,9		2,3		2,5		2,2		2,1		1,9	
0,5 µg/mL	1,9	34,48	1,5	34,78	2,2	12,0	1,6	27,27	0,45	78,57	0,2	89,47
01 µg/mL	2,3	20,69	2,3	0,0	1,6	36,0	1,35	38,64	0,2	90,48	0,15	92,11
02 µg/mL	2,1	27,59	1,9	17,39	1,7	32,0	1,3	40,91	0,2	90,48	0,1	94,74

(CV) Células viáveis, (%IC) porcentagem de inibição de crescimento em relação ao controle.

5.2 Avaliação da ação da Acetona Cianidrina no Tumor Ascítico de Ehrlich

Após a administração da Acetona Cianidrina, foram observadas alterações nos animais tratados; os representantes do GAC1 apresentaram prostração com duração de 5 a 10 minutos, enquanto que no GAC2 as reações foram mais intensas, apresentando agitação inicial seguida de convulsões que culminavam em prostração do animal e taquicardia. Tais sinais foram observados em todos os dias de tratamento.

A administração intraperitoneal de Acetona Cianidrina na dose de 1,864 e 2,796 mg/Kg de peso corporal levou a uma redução do volume do tumor e contagem de células viáveis dos camundongos portadores do tumor, quando comparado com os camundongos do grupo controle, $p < 0,0001$ (Tabela 2 e 3).

Tabela 2 - Valores absolutos das células e volume total do Tumor Ascítico de Ehrlich para cada animal dos grupos

Animais	GC		GAC1		GAC2	
	CV (10^7)	VT (mL)	CV (10^7)	VT (mL)	CV (10^7)	VT (mL)
1	51,00	10,0	25,0	4,8	12,60	3,5
2	44,20	8,5	17,0	3,1	27,09	4,3
3	36,00	4,5	28,8	4,0	14,80	4,0
4	46,80	9,0	21,9	3,3	14,19	3,3
5	104,50	11,0	43,0	5,1	0,00	0,0
6	37,60	7,1	42,0	5,6	15,00	3,0
7	45,43	5,9	28,5	5,0	30,00	5,0
8	74,00	11,6	0,0	0	0,00	0,0
9	48,00	10,0	18,0	3,2	20,00	5,0
10	73,92	8,4	20,0	3,9	10,85	3,1

(GC) grupo controle, (GAC1) grupo tratado com 1,864 mg/Kg de acetona cianidrina e (GAC2) grupo tratado com 2,796 mg/Kg de acetona cianidrina. (CV) Células viáveis e (VT) volume tumoral.

Tabela 3 - Efeito do tratamento de Acetona Cianidrina no volume e contagem de células tumorais viáveis em camundongos portadores de Tumor Ascítico de Ehrlich.

	Cel Totais (10⁷)	Volume (mL)
GC	56,15±21,5	8,6±2,24
GAC1	24,42±12,51*	3,8±1,69*
GAC2	14,45±9,81*	3,12±1,79*

Cada valor representa a média±DP. (n=10 camundongos por grupo)

* p<0,0001, quando tratados e comparados com o controle

No GAC1, apenas um dos animais não apresentou ascite no final de 15 dias, não se encontrando células tumorais após lavagem peritoneal com salina. No GAC2, dois animais não apresentaram ascite e também, após lavagem peritoneal não apresentaram células tumorais na contagem. Já no GC, todos os animais desenvolveram ascite e apresentaram células viáveis nas contagens.

5.3 Avaliação do efeito da Acetona Cianidrina no Tumor Sólido de Ehrlich

Após a administração da Acetona Cianidrina, também foram observadas alterações, como ocorreu no experimento com o Tumor Ascítico de Ehrlich. No GAC, os animais tiveram reações intensas como agitação inicial, com duração de aproximadamente 10 segundos, seguida de convulsões que culminavam em prostração do animal e taquicardia. Tais sinais foram observados em todos os dias de tratamento.

Todos os animais inoculados desenvolveram o Tumor Sólido de Ehrlich por volta do sétimo dia após a inoculação e apresentaram formas e tamanhos variados, não sendo possível observar diferenças significativas entre os grupos controle e aqueles tratados com Acetona Cianidrina. Quando da extração do tumor, estes apresentavam formas diversas e diferentes tamanhos com aspecto esbranquiçado e liso, sem ainda apresentar invasão dos tecidos adjacentes (Figura 15).

Histologicamente, os tumores do grupo controle apresentavam-se como uma massa neoplásica circunscrita por uma pseudocápsula, onde as células neoplásicas apresentavam alto grau de diferenciação caracterizado pelo pleomorfismo celular e com núcleos proeminentes. Observou-se a presença de células em processo mitótico em número moderado e também de células gigantes. Os tumores apresentaram ainda um infiltrado inflamatório moderado (Figura 12).

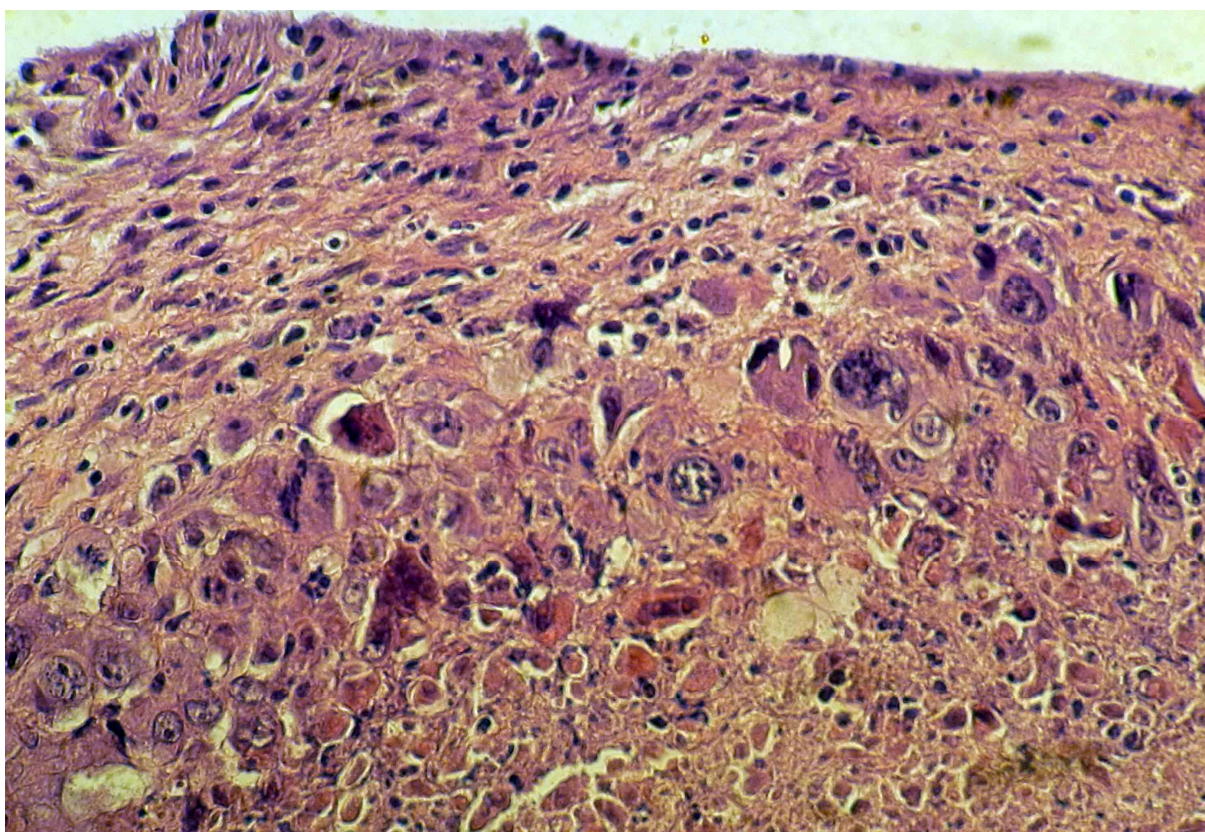


Figura 12 - Histologia do tumor de Ehrlich apresentando alto grau de diferenciação, infiltrado inflamatório e pseudo cápsula.

Observou-se ainda, nos tumores do grupo GC, áreas de necrose do tipo coagulativa, onde foi possível verificar células que apresentavam citoplasma mais eosinofílico e com núcleo picnótico, células em cariorexe, ou seja, com distribuição irregular da cromatina e acumulada na membrana nuclear, células com núcleos fragmentados e células com dissolução da cromatina e desaparecimento da

estrutura nuclear. Em alguns tumores pode-se observar a presença de tecido fibroso (Figura 13).

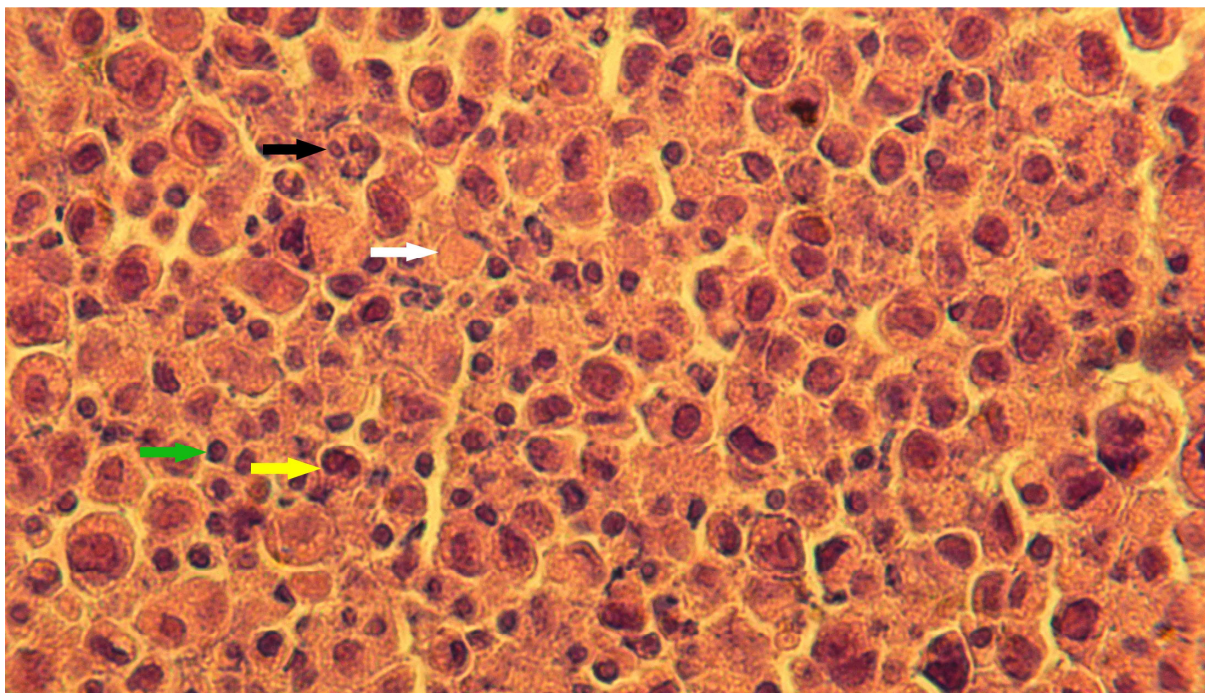


Figura 13 - Necrose por coagulação. Seta verde destacando o núcleo em picnose com diminuição de volume e intensa basofilia. Seta amarela, cariorexe. Seta preta, núcleo fragmentado. Seta branca, dissolução da cromatina com desaparecimento de estrutura nuclear.

No aspecto histológico, os tumores do GC e GAC apresentaram-se muito semelhantes. Entretanto, foi possível observar uma diferença significativa entre os dois grupos em relação à ocorrência de necrose coagulativa (Figura 14) e volume tumoral (Figura 15), sendo a avaliação do efeito da Acetona Cianidrina no TSE realizada com base nestes valores (Tabela 4 e 5).

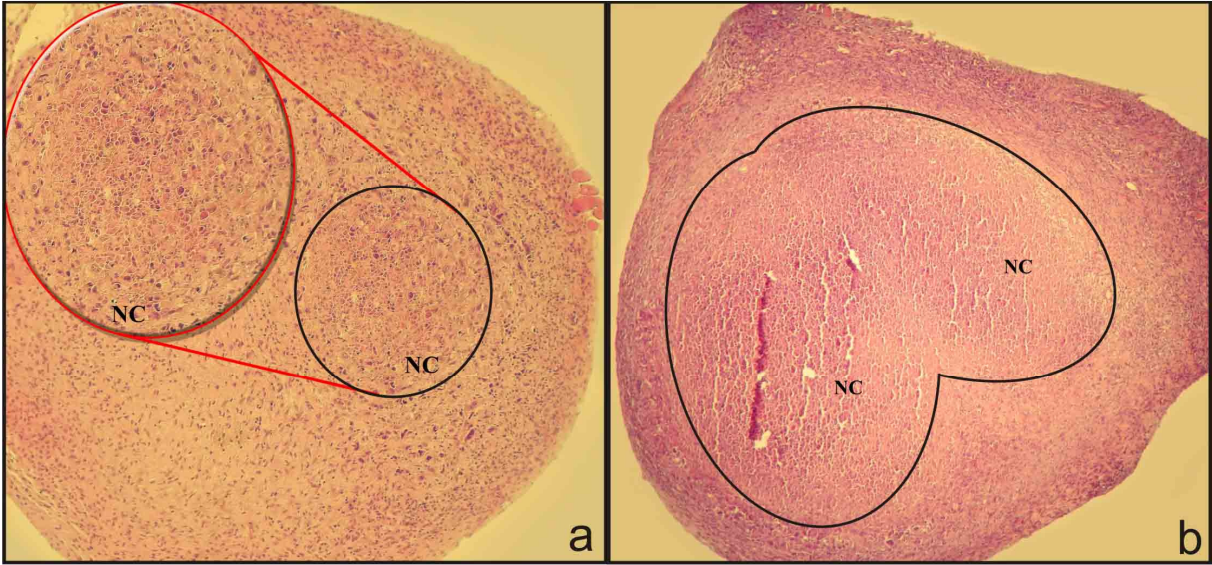


Figura 14 - Necrose de coagulação. Em (a) necrose de coagulação no grupo GC em (b) necrose de coagulação no grupo GAC.

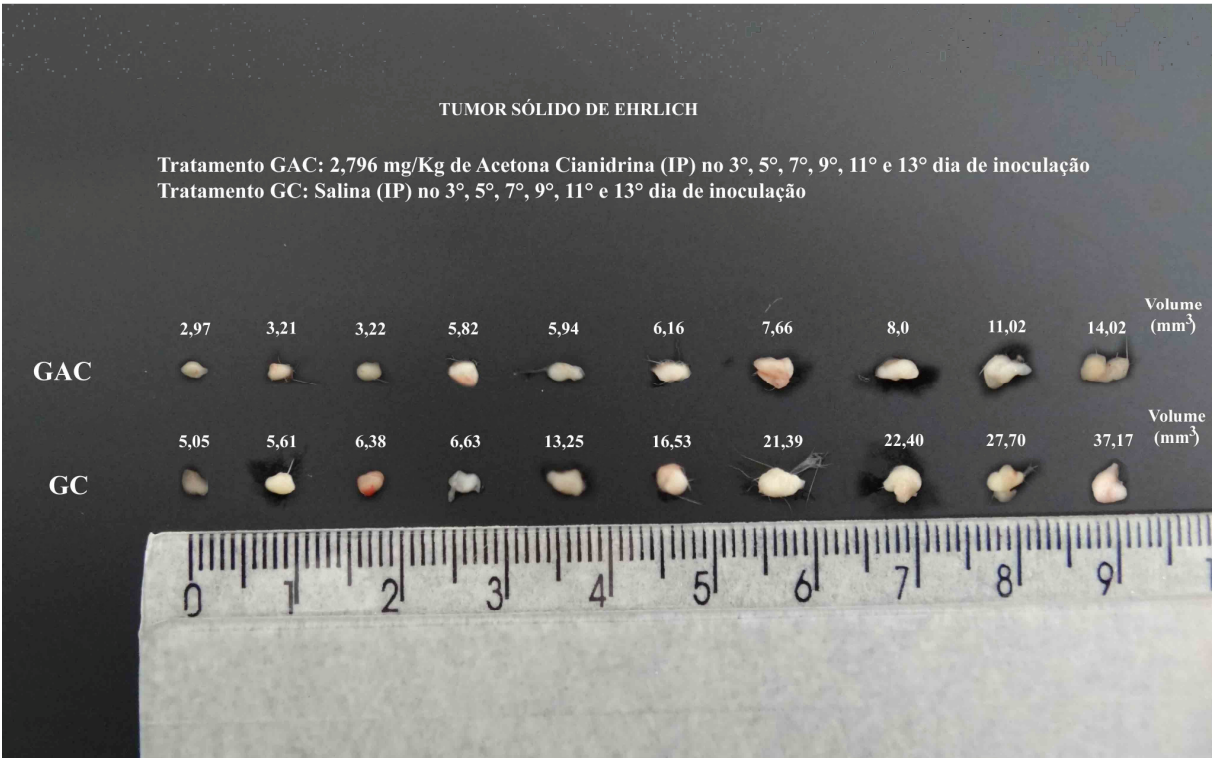


Figura 15 - Imagem ilustrativa dos tumores extraídos dos camundongos após 15 dias da inoculação. Destaque para a apresentação dos volumes tumorais de cada animal dos grupos em ordem crescente de volume.

Tabela 4 - Valores das porcentagens de necrose e o volume tumoral no Tumor Sólido de Ehrlich para cada animal dos grupos

Animais	GC		GAC	
	NC (%)	VT (mm ³)	NC (%)	VT (mm ³)
1	1,02	37,17	48,21	5,94
2	16,64	27,70	21,69	14,02
3	11,56	6,33	36,35	3,21
4	3,00	21,39	41,83	7,66
5	15,12	22,40	54,32	8,00
6	20,04	16,53	50,36	3,22
7	15,57	6,38	26,55	11,02
8	1,58	5,05	56,97	2,97
9	49,68	5,61	37,48	6,16
10	0,62	13,25	46,39	5,82

(GC) grupo controle, (GAC) grupo tratado com 2,796 mg/Kg de acetona cianidrina. (NC) Necrose e (VT) volume tumoral.

Tabela 5 - Efeito do tratamento da Acetona Cianidrina no Tumor Sólido de Ehrlich em relação aos parâmetros de Necrose e Volume Tumoral.

	Necrose (%) ^a	Volume Tumoral (mm ³) ^b
GC	13,48±14,71	16,18±10,94
GAC	42,02±11,58	6,8±3,57

Cada valor representa a média±DP. (n=10 camundongos por grupo)

^ap=0,0001 ^bp=0,0189

Os resultados da porcentagem de necrose no grupo tratado com Acetona Cianidrina apresentaram uma diferença significativa (p=0,0001) quando comparados aos resultados do grupo controle (Figura 16).

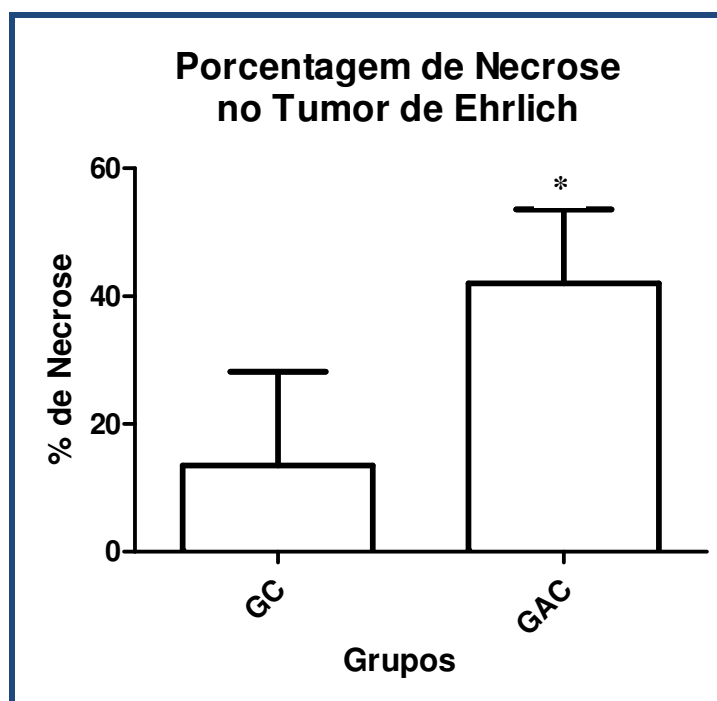


Figura 16 - Gráfico representando as médias com desvio padrão da porcentagem de necrose nos grupos GC e GAC.

* $p=0,0001$

Em relação ao volume tumoral, os resultados do grupo tratado com AC também apresentaram uma diferença significativa ($p=0,0189$) em relação aos resultados do grupo controle (Figura 17).

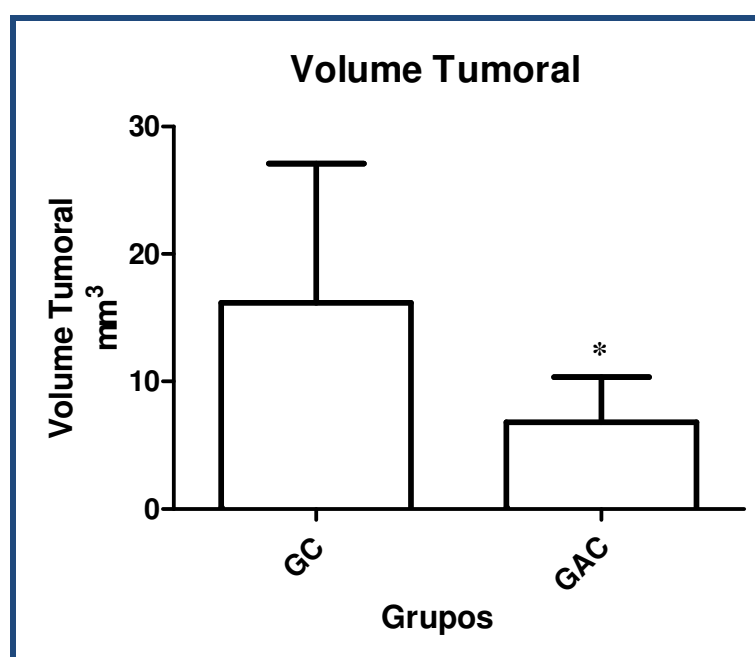


Figura 17 - Gráfico representando as médias com desvio padrão do volume tumoral nos grupos GC e GAC.

* $p=0,0001$

6 DISCUSSÃO

A Dose Letal (DL_{50}), é a quantidade suficiente para causar a morte de 50% dos indivíduos submetidos ao agente tóxico. Ramalho et al. (2007) relataram que uma DL_{50} correspondente a 35,35 mg de CN^- obtida pela liberação do cianeto da linamarina proveniente da mandioca administrada por via oral em ratos e ainda não observando evidências de anóxia em tecidos nobres (neurônios da córtex e células de Purkinje) provocadas pelo cianeto. Também não foram detectadas alterações significativas nas dosagens bioquímicas de Albumina, Glicose, Alanina Transaminase, Aspartato Transaminase e Lactato Desidrogenase.

A utilização da Acetona Cianidrina foi motivada pelo fato de que sua ação no organismo é semelhante a de seu equivalente molar de cianeto *in vivo*. Por exemplo, a DL_{50} intraperitoneal em camundongos para a Acetona Cianidrina é equivalente a 2,65 mg de íon cianeto/Kg, sendo similar à do cianeto sódico que é de 2,54 mg íon cianeto/Kg e possuindo um tempo médio para a morte de 5 minutos para os dois compostos. A dose letal (DL_{50}) de Acetona Cianidrina é de 8,5 mg/Kg de peso (MAGOS, 1962; THOMPSON et al., 2003). Neste experimento foram utilizadas doses abaixo dos valores letais, 1,864 e 2,796 mg de Acetona Cianidrina/Kg.

A literatura apresenta estudos utilizando a implantação do tumor sólido no coxim plantar (MATSUZAKI, 2004; RIBEIRO et al., 2012; VERÇOSA JUNIOR et al., 2007). A mesma forma de inoculação se mostrou de difícil manuseio, tanto no acompanhamento do crescimento tumoral como no processo histopatológico. O processo histopatológico se mostrou demorado e de difícil descalcificação da pata, devido à infiltração tumoral em meio aos diferentes tecidos presentes na pata do animal. A partir desses achados, optou-se pela inoculação subcutânea do tumor na parede abdominal (BELO et al., 2004), tornando possível observar de uma forma mais ampla o desenvolvimento do tumor. Além disso, o local se mostrou de fácil dissecação, sem a necessidade de descalcificação do tecido.

As alterações observadas nos experimentos *in vivo* após a administração de Acetona Cianidrina, como convulsões seguida de prostração, também foram evidenciadas por Ribeiro (2012) em seu estudo para avaliar os efeitos

histopatológicos da AC em órgãos vitais de camundongos. Frakes e Sharma (1986) também relatam alterações semelhantes em hamsters após intoxicação por cianeto.

O cianeto tem como propriedade uma elevada afinidade para com os metais, formando complexos com esses elementos. Após absorvido irá formar complexos com cátions metálicos de centros ativos de enzimas importantes, inibindo a sua função. O mecanismo que explica a toxicidade do cianeto envolve a inibição da cadeia respiratória mitocondrial. Este se liga ao ferro no estado férrico (Fe^{3+}) do citocromo oxidase mitocondrial, enzima que intermedia a transferência de elétrons para o oxigênio molecular, o último passo da fosforilação oxidativa. O bloqueio desta enzima interrompe, assim, a capacidade da célula usar o oxigênio, conduzindo à anóxia tecidual. Além disso, compromete o metabolismo da célula e a produção de ATP é drasticamente reduzida (POULTON, 1983; MAGOS, 1962; SOTO-BLANCO et al., 2002). Entretanto, devido à inevitável exposição ao cianeto, os organismos vivos desenvolveram um mecanismo de autodefesa através da conversão do cianeto a tiocianato, pela transferência de enxofre do grupo *sulfane sulfur* (doador de enxofre) para o cianeto pela enzima mitocondrial rodanase (SOTO-BLANCO et al., 2002; ZOTTOLA, 2009).

O *Sulfane sulfur* é gerado a partir de várias vias metabólicas e de proteínas capazes de estabilizá-lo e transportá-lo. A atividade *in vitro* de um número considerável de enzimas é regulada por compostos contendo *sulfane sulfur*. Acredita-se que esta substância possa exercer uma atividade reguladora através de modificações nos grupos -SH, e a deficiência no metabolismo anaeróbico de enxofre está relacionada a processos neoplásicos, infecções por vírus e imunodeficiência, sendo que tal atividade elevada e meia-vida curta lhe conferem características de um eficiente regulador (ICIEK e WLODEK, 2001). Em decorrência disso, as células com deficiência de *sulfane sulfur* apresentam uma atividade de rodanase significativamente diminuída (JURKOWSKA e WRÓBEL, 2008; JURKOWSKA et al., 2011). No presente estudo, esta característica das células tumorais foi explorada para promover uma forte intoxicação com cianeto, como observado no experimento *in vitro*; os resultados demonstraram uma grande capacidade de inibição de crescimento mesmo na menor dose utilizada.

Uma característica presente nas células neoplásicas é a atividade residual da rodanase, (CIBIN, 2010) em decorrência de uma deficiência de *sulfane sulfur*, tal fato faz com que o transporte e biossíntese de compostos a partir deste grupamento não ocorram de maneira satisfatória em tais células. Esta situação sugere que a proliferação descontrolada de células neoplásicas seja um resultado da deficiência deste elemento, e que esta forma ativa de enxofre promoveria uma inibição da proliferação em células normais (W'ODEK et al., 1993; MELINO et al., 2011).

Os resultados obtidos no presente estudo evidenciaram uma interação diferenciada da Acetona Cianidrina em células do Tumor de Ehrlich em relação às células normais. Tais resultados são relacionados com aqueles encontrados por Jurkowska e Wróbel (2008), que compararam células de astrocitoma U373 com células e astrócitos de camundongos, encontrando uma atividade de rodanase significativamente diminuída nessas primeiras, devido a um menor teor de *sulfane sulfur*. Toohey (1989), em sua revisão, também traz informações que corroboram com os achados, como características dos compostos *sulphane* e sua afinidade em reagir com cianeto, bem como o defeito no metabolismo de enxofre em células cancerosas, levando a uma atividade somente residual de rodanase. Alterando, com isso, a biossíntese e transporte de compostos a partir do *sulfane sulfur* nestas células.

A ação da Acetona Cianidrina nos experimentos desenvolvidos, demonstra a capacidade da célula tumoral de se intoxicar de maneira irreversível pela ação do cianeto, enquanto as células normais são refratárias para pequenas doses de cianeto devido à proteção proporcionada pela rodanase mitocondrial, com sua capacidade de desintoxicar o cianeto até um certo ponto. Uma vez que o limite é excedido, no entanto, a toxicidade é expressa. A ineficiência deste mecanismo intracelular nas células tumorais pode explicar a incapacidade das mesmas para eliminar o cianeto de maneira eficiente. Proporcionando com isso, um efeito dose e tempo dependente (YUSUF et al., 2006; CHANG et al., 2006; KOUSPAROU et al., 2002), como o ocorrido no experimento *in vitro* e demonstrados em estudo prévio (RAMALHO et al., 2010). A toxicidade do cianeto ocorre através de duas formas: a depleção de ATP causada pelo bloqueio da fosforilação oxidativa e da produção de espécies reativas de oxigênio (KOUSPAROU et al., 2002).

O comparativo do efeito da Acetona Cianidrina em células normais demonstrou-se satisfatório, evidenciando maior capacidade citotóxica ocorrida sobre as células do Tumor de Ehrlich, conforme também descrito em outros estudos utilizando cianoglicosídeos que demonstraram a ausência de intoxicação e inviabilização de células normais, (KOUSPAROU et al., 2002; NEWMARK et al., 1981).

A Acetona Cianidrina no Tumor Ascítico de Ehrlich proporcionou uma diminuição significativa no volume tumoral, levando à inibição total do tumor em 03 animais, um do GAC1 e dois do GAC2, ou seja, em sua maior dose a inibição total do crescimento tumoral ocorreu em 20% dos animais. A literatura também relata o sucesso da terapia com cianeto utilizando gene suicida, baseada na transferência de um gene que codifica uma B-glicosidase (linamarase) para células de tumor, que na presença de um substrato inócuo (linamarina) produz cianeto, levando estas células a morrerem proporcionalmente à concentração de linamarina (KOUSPAROU et al., 2002; GARCÍA-ESCUADERO et al., 2008; CORTÉS et al., 1998; CORTÉS et al., 2002).

No Tumor Sólido de Ehrlich foi observada a presença de alterações moleculares compatíveis com necrose. A presença de necrose coagulativa no TSE é frequentemente observada, principalmente em tumores maiores, onde a necrose é caracterizada por uma extensa lise celular que ocorre no decorrer da lesão aguda (ABDEL-RAHMAN e KABEL, 2012; BELO et al. 2004). No presente experimento foi observada uma necrose mais acentuada no GAC em relação ao GC, lesões estas compatíveis com a exposição ao cianeto, onde os níveis de ATP são suspeitos de cair drasticamente devido à inibição da fosforilação oxidativa, sendo essa diminuição abaixo do nível necessário para a apoptose, consequentemente resultando em morte celular por necrose (KOUSPAROU et al., 2002).

A capacidade do cianeto de penetrar na célula sem a ação de um receptor se deve ao íon cianeto ser uma molécula pequena e sua desintoxicação nos mamíferos ocorrer em maior parte mediada pela enzima rodanase (KOUSPAROU et al., 2002). Esta capacidade foi demonstrada neste experimento, onde o cianeto proveniente da degradação da Acetona Cianidrina foi liberado espontaneamente na cavidade abdominal, no Tumor Ascítico de Ehrlich diretamente dentro de um tumor,

provocando uma regressão evidente do mesmo; no experimento com Tumor Sólido de Ehrlich, o cianeto foi liberado fora tumor, cavidade abdominal, mas provocando necroses acentuadas nos mesmos, localização subcutânea.

Link et al. (2006) demonstraram a eficiência do cianeto em camundongos na eliminação de um tumor sólido de células de glândulas mamárias deste animal. Após quatro dias de tratamento foi observada uma redução significativa na taxa de crescimento tumoral, quando comparado a tumores controles e foi observada uma correlação entre os níveis elevados de cianeto e a regressão do tumor. Os mesmos autores avaliaram a concentração de cianeto no sangue dos animais, cujos vestígios detectados indicavam claramente que o cianeto injetado ou gerado pelo sistema pró-droga no tumor foi difundido através dos tecidos para a corrente sanguínea. Neste estudo também foi evidenciada uma regressão tumoral, tanto no Tumor Sólido de Ehrlich como no Tumor Ascítico de Ehrlich, porém, diferentemente do constatado por Link et al., após a administração da Acetona Cianidrina foram observadas alterações intensas, como agitação inicial seguida de convulsões que culminava em prostração do animal e taquicardia. Tais efeitos também foram observados por Frakes e Sharma (1986).

As evidências observadas no presente estudo sugerem que a ação seletiva do cianeto deve-se a uma deficiência na sua eliminação observada na célula tumoral, como amplamente discutido na literatura.

7 CONCLUSÃO

No experimento *in vitro* a Acetona Cianidrina induziu uma forte inibição do crescimento das células do Tumor de Erlich e não apresentou diferença significativa entre as doses utilizadas.

A Acetona Cianidrina, através de seu equivalente molar de cianeto, foi capaz de promover no Tumor Ascítico de Ehrlich uma redução no 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, a Acetona Cianidrina - através de seu equivalente molar de cianeto, foi capaz de induzir uma inibição no crescimento tumoral, bem como de produzir no mesmo um aumento na área de necrose.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdel-Rahman MN, Kabel AM. Comparative study between the effect of methotrexate and valproic acid on solid Ehrlich tumour. *J Egypt Natl Canc Inst.* 2012; 24(4):161-7.

Agrawal SS, Saraswati S, Mathur R, Pandey M. Antitumor properties of Boswellic acid against Ehrlich ascites cells bearing mouse. *Food and Chemical Toxicology.* 2011; 49:1924–34

Almeida, V.L.; Leitão, A.; Reina, L.C.B.; Montanari, C.A.; Donnici, C.L., Lopes, M.T.P.; Câncer e Agentes Antineoplásicos Ciclo-Celular específicos e Ciclo-Celular não específicos que interagem com o DNA: Uma introdução. *Quim. Nova.* 2005; 28(1):118-29.

American Cancer Society. The History of Cancer.. Disponível em <http://www.cancer.org/cancer/cancerbasics/thehistoryofcancer/index>. Acessado em 02/04/2012.

Arruda JT, Bordin BM, Miranda LCB, Maia DLM, Moura KKVO. Proteína p53 e o câncer: controvérsias e esperanças. *Estudos.* 2008. 35(1/2):123-141.

Bala A, Kar B, Haldar PK, Mazumder UK, Bera S. Evaluation of anticancer activity of Cleome gynandra on Ehrlich's Ascites Carcinoma treated mice. *Journal of Ethnopharmacology.* 2010; 129:131–4.

Balogopalan C, Padmaja G, Nanda SK, Moorthy SN. Cassava in food, feed, and industry. CRC Press Inc., Florida. 1988.

Belo AV, Barcelos LS, Ferreira MA, Teixeira MM, Andrade SP. Inhibition of inflammatory angiogenesis by distant subcutaneous tumor mice. *Life Sci.* 2004 Apr 23;74(23):2827-37.

Bergantini APF, Castro FA, Souza AM, Fett-Conte AC. Leucemia mielóide crônica e o sistema Fas-FasL. *Rev. bras. hematol. hemoter.* 2005; 27(2):120-125.

Birkenkamp-Demtroder K, Christensen LL, Olesen SH, Frederiksen CM, Aaltonen P, Lauri A, Sørensen SL, Flemming B, Hagemann R, Orntoft TF. Gene Expression in Colorectal Cancer. *Cancer Research.* 2002; 62:4352–63.

Bordo D, Bork P. The rhodanese/Cdc25 phosphatase superfamily. *EMBO reports,* 2002; 8:741-6.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Disponível em: http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322 acessado em 26/03/2011

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Estimativa 2014 : incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2014. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/estimativa-24012014.pdf>. Acessado em 17/02/2014.

CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Ficha de informação de produto químico. Disponível em : http://sistemasinter.cetesb.sp.gov.br/produtos/ficha_completa1.asp?consulta=ACETONA%20CIANIDRINA. Acessado em: 10/05/2013.

Chang H, Shin M, Yang H, Lee J, Kim Y, Lee M, Kim J, Kim K, Kim C. Amygdalin Induces Apoptosis through Regulation of Bax and Bcl-2 Expressions in Human DU145 and LNCaP Prostate Cancer Cells. *Biol Pharm Bull*. 2006; 29:1597-1602.

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. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2013; 35(1):43-51.

Cibin TR, Gayathri Devi D, Abraham A. Chemoprevention of Skin Cancer by the Flavonoid Fraction of *Saraca asoka*. *Phytother Res*. 2010; 24:666-72.

Cortés ML, Escudero VG, Hughes MA, Izquierdo M. Cyanide bystander effect of the linamarase/linamarin killer-suicide gene therapy system. *Journal of General Medicine*. 2002; 4:407-14.

Cortés ML, Felipe P, Martín V, Hughes MA, Izquierdo M. Successful use of a plant gene in the treatment of cancer in vivo. *Gene Therapy*. 1998; 5:1499–507.

Frakes RA, Sharma RP. Comparative Metabolismo of Linamarin and Amigdalín in Hamster. *Fd Chem. Toxic*. 1986; 24(5):417-20.

Fukuda T, Ito H, Mukainaka T, Tokuda H, Nishino H, Yoshida T. Anti-tumor promoting effect of glycosides from *Prunus persica* seeds. *Biol Pharm Bull*. 2003; 26:271-3.

García-Escudero V, Gargini R, Izquierdo M. Glioma Regression In vitro and In vivo by a Suicide Combined Treatment. *Mol Cancer Res*. 2008; 6(3):407-17.

Gomes Neto A, Simão AFL, Miranda SP, Mourão LTC, Bezerra NP, Almeida PRC, Ribeiro RA. Experimental rat lung tumor model with intrabronchial tumor cell implantation. *Acta Cir Bras*. 2008; 23(1):84-92.

Greenberg DM. The vitamin fraud in cancer quackery. *West J Med*. 1975; 122(4):345-8.

Grivicich I, Regner A, da Rocha AB. Morte Celular por Apoptose. *Revista Brasileira de Cancerologia*. 2007; 53(3):335-43.

Iciek, M; Włodek, L. Biosynthesis and biological properties of compounds containing highly reactive, reduced sulfane sulfur. *Pol. J. Pharmacol.* 2001; 53:215-25

Idibie CA, Davids H, Iyuke, SE. Cytotoxicity of purified cassava linamarin to a selected cancer cell lines. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2007; 30:261-9

Jamshidzadeh A, Aminlari ME, Rasekh HR. Rhodanese and Arginase activity in normal and cancerous tissues of human breast, esophagus, stomach and lung. *Archives of Iranian Medicine.* 2001; 4(2):88-92.

Jukes TH. Laetrile for cancer. *JAMA.* 1976; 236(11):1284-6.

Jurkowska H, Wróbel M. N-acetyl-L-cysteine as a source of sulfane sulfur in astrocytoma and astrocyte cultures: correlations with cell proliferation. *Amino Acids.* 2008; 34:231–7.

Jurkowska, H; Placha, W; Nagahara, N; Wróbel, M. The expression and activity of cystathionine- γ -lyase and 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase in human neoplastic cell lines. *Amino Acids.* 2011; 41:151–8

Keresztessy Z, Brown K, Dunn A, Hughes MA. Identification of essential-site residues in the cyanogenic β -glucosidase (linamarase) from cassava (*Manihot esculenta* Crantz) by site-directed mutagenesis. *Biochemical Journal.* 2001; 353:199-205.

Klein G, Klein E. The transformation of a solid transplantable mouse carcinoma into a "ascite tumor". *Cancer Res* 1951;11:466-9.

Kousparou CA, Epenetos AA, Deonarain MP. Antibody-guided enzyme of cancer producing cyanide result in necrosis of targeted cells. *Int. J. Cancer.* 2002; 99:138-48,

Kwiecień I, Michalska M, Włodek L. The selective effect of cystathionine on doxorubicin hepatotoxicity in tumor-bearing mice. *Eur. J. Pharmacol.* 2006; 550:39–46

Levine, A. J.; Momand, J, Finlay, CA.. The p53 Tumour suppressor gene. *Nature.* 1991. 351:453.

Lin J, Lee H, Song Y, Cook NR, Selhub J, Manson JE, Buring JE, Zhang SM. Plasma homocysteine and cysteine and risk of breast cancer in women. *Cancer Res.* 2010; 70(6):2397-405.

Link N, Aubel C, Kelm JM, Marty RR, Greber D, Djonov V, Bourhis J, Weber W, Fussenegger M. Therapeutic protein transduction of mammalian cells and mice by nucleic acid-free lentiviral nanoparticles. *Nucleic Acids Research.* 2006; 34(2):e16.

Magos L. A study of acrylonitrile poisoning in relation to methaemoglobin-cn complex formation. *Brit J industr Med*. 1962; 19:283-6.

Matsuzaki P. Avaliação dos efeitos do extrato etanólico, resíduo butanólico e resíduo aquoso de *Pfaffia paniculata* sobre o crescimento do tumor de Ehrlich em suas formas ascítica e solida [Dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2004

Melino S, Sabelli R, Paci M. Allyl sulfur compounds and cellular detoxification system: effects and perspectives in cancer therapy. *Amino Acids*. 2011; 41:103–12.

MERCK INDEX. 14 ed. Whitehouse Station, Merck Research Laboratories, Division of Merck & Co., CD-ROM, 2005

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

Murphy G, Fan JH, Mark SD, Dawsey SM, Selhub J, Wang J, Taylor PR, Qiao YL, Abnet CC. Prospective Study of Serum Cysteine Levels and Oesophageal and Gastric Cancer in China. *Gut*. 2011; 60(5):618-23.

Navarro MD, Lagman CL. Breast carcinoma with lung and bone metastases treated with laetrile; case report. *J Philipp Med Assoc*. 1957; 33(1):16-20.

Newmark J, Brady RO, Grimley PM, Gal AE, Waller SG, Thistlethwaite R. Amygdalin (Laetrile) and prunasin β -glucosidases: Distribution in germ-free rat and in human tumor tissue. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1981; 78(10):6513-16.

Nery LHR. Eficácia da dexametazona e da doxorubicina no tumor de Ehrlich transplantados em camundongos BALB/c [Dissertação]. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa; 2004

Oloris SSC, Dagli ML, Guerra JL. Effect of b-caroteno on development of the solid Ehrlich tumor in mice. *Life Sci*. 2002 Jun 28;71(6):717-24.

Oxtoby E, Dunn MA, Pancoro A, Hughes MA. Nucleotide and derived amino acid sequence of the cyanogenic β -glucosidase (linamarase) from white clover (*Trifolium repens* L.). *Plant Mol. Biol*. 1991; 17:209-19.

Palermo-Neto J, Massoco CO, Souza WR. Effects of physical and psychological stressors on behaviour, macrophage activity, and Ehrlich tumor growth. *Brain Behavior and Immunity* 2003;17:43-54.

Park HJ, Yoon SH, Han LS, Zheng LT, Jung KH, Uhn YK, Lee JH, Jeong JS, Joo WS, Yim SV, Chung JH, Hong SP. Amygdalin inhibits genes related to cell cycle in SNU-C4 human colon cancer cells. *World J. Gastroenterology*. 2005; 11(33): 5156-61.

Poulton JE. Cyanogenic compounds in plants and their toxic effects. In: Keeler RF, TU AT. Handbook of natural toxins: Plant and fungal toxins. Marcel Dekker. 1983; 1:117-57.

Ramalho RT, Aydos RD, Cereda MP. Evaluation of acetone cyanohydrin effect in “*in vitro*” inactivation of the Ehrlich ascites tumor cells. Acta Cir Bras. 2010; 25(1):111-16.

Ramalho RT, lopes AM, Cereda MP. Avaliação da dose letal (DL50) oral da Linamarina extraída de mandioca, em ratos. Revista Brasileira de Toxicologia, ISSN 1415-2983 In: XV CONGRESSO BRASILEIRO DE TOXICOLOGIA. 2007; 20(03):145.

Ribeiro AF. Alterações histopatológicas causadas pelo efeito da acetona cianidrina em fígado, rins, coração e pulmão de camundongos [Dissertação]. Campo Grande. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. 2012.

Ribeiro AFC, Telles TC, Ferraz VP, Souza-Fagundes EM, Cassali GD, Carvalho AT, Melo MM. Effect of *Arrabidaea chica* extracts on the Ehrlich solid tumor development. Rev Bras Farmacogn. 2012; 22(2):364-73.

Rivoire, W. A. et al. Bases biomoleculares da oncogênese cervical. Revista Brasileira de Cancerologia. 2001; 47(2):179-84.

Ross JF. Editorial: Laetriles--not a vitamin and not a treatment. West J Med. 1975; 122(4):326-7.

Saber FA. Laetrile: is it really a matter of free choice? Am J Public Health. 1977; 67(9):871-2.

Shibuya, N; Tanaka, M; Yoshida, M; Ogasawara, Y; Togawa, T; Ishii, K; Kimura, H. 3-Mercaptopyruvate Sulfurtransferase Produces Hydrogen Sulfide and Bound Sulfane sulfur in the Brain. ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING. 2009; 11(4):703-14

Shinkai M; Ueda K; Ohtsu S; Honda H; Kohri K; Kobayashi T. Effect of Functional Magnetic Particles on Radiofrequency Capacitive Heating: An in vivo Study. Jpn. J. Cancer Res. 2002; 93:103–8

Silva RJ Da, Silva MG, Vilela LC, Fecchio D. Antitumor effect of Bothrops jararaca venom. Mediators Inflamm. 2002;11:9-104.

Silva SL; Silva SFR; Farias IN; Mota RS; Moraes ME; Campos HH; Ferreira FV; Filho MOM. Um novo modelo de isolamento do tumor de Walker utilizando o gradiente de Ficoll-Hypaque. Acta Cir Bras. 2006a; 21(2):101-5

Silva, A.E., Santos, F.G.A., Cassali, G.D.. Marcadores de proliferação celular na avaliação do crescimento do tumor sólido e ascítico de Ehrlich. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 2006b; 58(4):658-61.

Soto-Blanco B, Marioka PC, Gorniak SL. Effects of Long-Term Low-Dose Cyanide Administration to Rats. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2002; 53:37-41

Stock CC, Tarnowski GS, Schmid FA, Hutchison DJ, Teller MN. Antitumor tests of amygdalin in transplantable animal tumor systems. *J Surg Oncol.* 1978; 10(2):81-8.

Suresh S. Biomechanics and biophysics of cancer cells. *Acta Materialia.* 2007; 55:3989–4014.

Syrgos KN, Rowlinson-Busza G, Epenetos AA. In vitro cytotoxicity following specific activation of amygdalin by beta-glucosidase conjugated to a bladder cancer-associated monoclonal antibody. *Int J Cancer.* 1998; 78(6):712-9.

Thompson RW, Valentine HL, Valentine WM. Cytotoxic mechanisms of hydrosulfide anion and cyanide anion in primary rat hepatocyte cultures. *Toxicology.* 2003; 188:149-59.

Toohey JI. Sulfane sulfur in biological systems: a possible regulatory role. *Biochem J.* 1989; 264:625–32.

USA. The National Academies. National Research Council (NRC). Acute Exposure Guideline Levels for Selected Airborne Chemicals, vol. 7. Washington, DC: National Academy Press. 2009

Valadares MC, Queiroz MLS. The effect of a titanocene dichloride derivative, Ti IV (C₅H₅)₂NCS₂ on the hematopoietic response of Ehrlich tumour-bearing mice. *Eur J Pharmacol* 2002;439:35-42.

Verçosa Junior D, Melo MM, Cassali GD, Dantas-Barros AM, Silva Junior PGP. Influência de *Agaricus blazei* Murrill sobre o tumor sólido de Ehrlich e linfonodos poplíteos de camundongos. *Arq Bras Vet Zootec.* 2007; 59(1):150-4.

Vickers AJ, Kuo J, Cassileth BR. Unconventional anticancer agents: a systematic review of clinical trials. *J Clin Oncol.* 2006; 24(1):136-40.

Wodek L., Wróbel M., Czubak J.: Transamination and transsulphuration of L-cysteine in Ehrlich ascites tumor cells and mouse liver. The nonenzymatic reaction of L-cysteine with pyruvate. *Int. J. Biochem.*, 1993, 25:107–12

Wodinsky I, Swiniarski JK. Antitumor activity of amygdalin MF (NSC-15780) as a single agent and with beta-glucosidase (NSC-128056) on a spectrum of transplantable rodent tumors. *Cancer Chemother Rep.* 1975; 59(5):939-50.

Wood, J. L. 1982. Biochemical functions of persulfides. *Adv. Exp. Med. Biol.* 148:327–42.

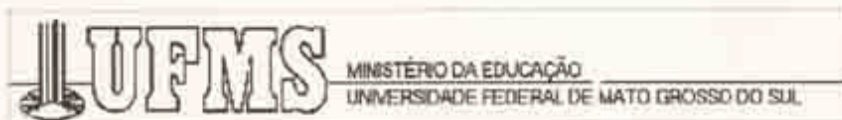
Wróbel M, Jurkowska H, Sliwa L, Srebro Z. Sulfurtransferases and Cyanide Detoxification in Mouse Liver, Kidney, and Brain. *Toxicol Mech Methods.* 2004; 14:331–7.

Yusuf UF, Ahmadun F, Rosli R, Iyuke SE, Billa N, Abdullah N, Umar-Tsafe N. An in vitro inhibition of human malignant cell growth of crude water extract of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and commercial linamarin. *Songklanakarin J Sci Technol.* 2006; 28:145-55.

Zottola MA, Beigel K, Soni SD, Lawrence R. Disulfides as Cyanide Antidotes: Evidence for a New In Vivo Oxidative Pathway for Cyanide Detoxification. *Chem. Res. Toxicol.* 2009; 22:1948–53.

Zottola MA. A partial exploration of the potential energy surfaces of SCN and HSCN: Implications for the enzyme-mediated detoxification of cyanide. *J Mol Graph Model.* 2009; 28: 183–6

ANEXOS

ANEXO A - Carta de aprovação da Comissão de Ética no uso de animais**C E R T I F I C A D O**

Certificamos que o Protocolo nº 227/2009 do Prof. Ricardo Dutra Aydos, referente ao projeto de pesquisa **"Efeito do tratamento com acetona cianidrina na evolução do tumor sólido e ascítico de EHRlich"**, está de acordo com os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com a legislação vigente e demais disposições da ética em investigação que envolvem diretamente os animais e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA/UFMS, em reunião de 25 de agosto de 2009.

Campo Grande (MS), 28 de agosto de 2009.


Dr. Maria Araújo Teixeira
Presidente da CEUA

ANEXO B Artigo Acta Cirúrgica: Sulfane Sulfur deficiency in malignant cells, increasing the inhibiting action of acetone cyanohydrin in tumor growth

7 - ORIGINAL ARTICLE EXPERIMENTAL ONCOLOGY

Sulfane sulfur deficiency in malignant cells, increasing the inhibiting action of acetone cyanohydrin in tumor growth¹

Rondon Tosta Ramalho¹, Ricardo Dutra Aydos², Iandara Schetter³, Peterson Vieira de Assis¹, Pedro Carvalho Cassino⁴

¹Master, Fellow PhD degree, Health and Development Postgraduate Program, Federal University of Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande-MS, Brazil. Conception and design of the study, acquisition and interpretation of data, manuscript preparation.

²PhD, Associate Professor, Department of Surgery, UFMS, Campo Grande-MS, Brazil. Guidance and experimental design of the study.

³PhD, Associate Professor, Department of Surgery, UFMS, Campo Grande-MS, Brazil. Veterinary assistance in the experimental study.

⁴Master, Health and Development Postgraduate Program, UFMS, Campo Grande-MS, Brazil. Interpretation of data, critical revision.

⁵Fellow Master degree, Health and Development Postgraduate Program, UFMS, Campo Grande-MS, Brazil. Acquisition and statistical analysis of data.

ABSTRACT

PURPOSE: To demonstrate the irreversible poisoning action of the acetone cyanohydrin (AC) in malignant cells.

METHODS: Thirty male Swiss mice were inoculated with 1×10^5 Ehrlich tumor (ET) cells. The mice were divided into three groups (n=10): CG (saline); ACG1 (1.864 mg/Kg of AC) and ACG2 (2.796 mg/Kg of AC), treated every 48 hours from day 3 until day 13. On day 15 the mice were euthanized and the number of viable cells in ascites was determined. In the meantime, ET cells were incubated with AC (0.5, 1.0, 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Cell viability and percentage of growth inhibition (PGI) were checked after one, two, three, four, 18 and 24 hours.

RESULTS: There was reduction in volume and number of viable cells in ACG1 and ACG2 compared to CG. In ACG1 one of the animals did not present ascites. In ACG2 two mice did not present ascites and in CG none of the mice present ascites. The action of AC was dose and time dependent and there was no significant difference among the three doses.

CONCLUSION: The acetone cyanohydrin promoted reduction of the tumor and also prevented tumor development in 20% of the treated animals.

Key words: Antineoplastic Agents. Sulfur Compounds. Thiosulfate Sulfurtransferase. Mice.

Introduction

Cancer study is being conducted by numerous scientists around the world and their findings in oncology make it one of the greatest and most rapidly evolving areas in modern medicine, causing great technological advances and a growing understanding of what cancer is.

Although cancer has many heterogeneous characteristics, malignant tumors have developed a feature which causes them to grow beyond the imposed limits of the regular cells. The clonal expansion of a transformed cell depends on its uncontrolled proliferative capacity and an increasing inability to die by apoptosis. Therefore, even though there is a great variety of cancer types, evidence has shown that resistance to apoptosis is one of the most remarkable characteristics of the majority of malignant tumors¹.

A feature of neoplastic cells is a complete lack of Cystathionase (CST) activity, while cysteine aminotransferase, 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (MPSST) e rhodanese activity is only residual. As a result, the biosynthesis and transport of compounds from the sulfane sulfur set do not occur in these cells. Toohey suggests that the uncontrolled proliferation of neoplastic cells is a result of the deficiency of sulfane sulfur and hyperactivity of these enzymes, which would be inhibited in regular cells by that active form of sulfur^{2,3}.

The term sulfane sulfur refers to the set of compounds that contain one sulfur atom covalently bonded to another reduced sulfur atom. Proteins associated to sulfur, bonded sulfur and refer to specific compounds with sulfane sulfur. Thus, sulfane sulfur should not be used to relate to any of the terms mentioned above^{3,4}.

Sulfane Sulfur is generated from various metabolic pathways already described, and it is common to find carrier proteins with the ability to stabilize and transport it. Compounds that contain sulfane sulfur are able to regulate the activity of several enzymes and also have antioxidant properties. This deficiency in the anaerobic metabolism of sulfur is related to neoplastic processes, viral infections and immunodeficiency, suggesting that the sulfane sulfur may exert a regulatory function in cells by modifying the -SH groups and this high activity and short half-life characteristics make it an efficient regulator⁴.

Currently, there are some reviews in the literature carrying information such as characteristics of the sulfane compounds and its affinity to react with cyanide, evidence of metabolism in the malignancy processes, cystathionase deficiency in many malignant cells, and differences in homocysteine metabolism between normal and malignant cells⁵. It was also possible to gather

important information regarding the defective sulfur metabolism in cancer cells with antitumor effects in sources of sulfane sulfur. This fact seems to show that the uncontrollable proliferation of malignant cells may be related to sulfane sulfur deficiency and to an uncontrollable action of the enzyme set, which is normally inactivated by such substance. Tumors with inherently high growth rates may have lower sulfur-transferase activities (rhodanese, for example) than the normal tissue and tumors with low growth rates^{3,6}.

The action of acetone cyanohydrin is based on its cyanide metabolite that comes from its spontaneous degradation in slightly alkaline pH, which acts in lethal malignant cells taking advantage of a flaw in the cyanide metabolism in these cells, due to a suppressed action of the rhodanese enzyme, responsible for their detoxification. This residual action of the rhodanese enzyme would be triggered by a lack of substrate for the reaction, known as sulfane-sulfur, responsible for providing sulfur for disposal of cyanide as thiocyanate⁷.

The advances in various fields of knowledge have led to increased insights about cancer biology, offering by far more means to fight the disease, its prevention, early diagnosis and new forms to treat it. However, it is known that there is still much to learn. Based on that, the present study seeks to highlight the action of cyanide from acetone cyanohydrin in alkaline pH, exploring the sulfane sulfur deficiency in malignant cells, which promotes on them irreversible poisoning.

Methods

The research project was approved by the Ethics Committee in animal use of the Federal University of Mato Grosso do Sul (UFMS), under protocol number 227/2009.

A total of 30 male Swiss mice weighing an average of 35g from the animal colony of the Federal University of Mato Grosso do Sul were used in this study. The animals were kept in the experiment for seven days prior the procedures. Randomly, the animals were divided into three groups: Control (CG), n=10, saline treated; Acetone cyanohydrin 1 (ACG1), n=10, treated with 1,864 mg/Kg of Acetone cyanohydrin; and Acetone cyanohydrin 2 (ACG2), n=10, treated with 2,796 mg/Kg of Acetone cyanohydrin.

Tumor transplant

The cells were kept in mice by the intraperitoneal transplantation of 2×10^6 EAT cells. Every ten days the formed intraperitoneal fluid was removed and transplanted in another

animal.

Donor animals were euthanized with an overdose of anesthetic. After that a peritoneal wash was performed with 3 ml. of saline and then performed again the same 3 ml. withdrawal by suction. The obtained cell suspension was centrifuged, the supernatant discarded and the pellet resuspended in 3 ml of saline. In the suspension, cell viability test was performed through the Trypan blue exclusion. Next, it was determined the number of cells in Newbauer chamber.

All three groups of mice received injections containing 0.4 ml of cell suspension of Ehrlich ascites tumor (containing 1.0×10^5 viable cells) in the peritoneal cavity.

Treatment program

The day of tumor inoculation in the animals was regarded as day 0. Treatment was initiated on day 3 and repeated every 48 hours until day 13. The CG received 0.4 ml of saline intraperitoneally, ACG1 received 0.4 ml of acetone cyanohydrin 1.864 mg/kg intraperitoneally and, the ACG2 received 0.4 ml of acetone cyanohydrin 2.796 mg/kg intraperitoneally. 48 hours after the last treatment, the animals were euthanized by an overdose of anesthetic to measure the antitumor activity of acetone cyanohydrin.

EAT cell viability

EAT cell viability was checked Trypan blue test. The cells were stained with Trypan blue (0.4% in normal saline); those that did not incorporate the dye were considered viable, while others were unfeasible. These viable and non-viable cells were counted.

In vitro experimental design

Cell preparation and culture

The EAT cells suspension obtained was washed two times and resuspended in Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM) supplemented with 5% fetal bovine serum and the suspension adjusted to 1.0×10^5 cells/ml. After adjusting the concentration of 1.0×10^5 EAT cells the suspensions were separated into aliquots of 1.0 ml. and cultured with 0 (control), 0.5, 1.0 and 2.0 µg of acetone cyanohydrin in DMEM supplemented with 5% fetal serum, with a pH between 7.0 and 7.2. After one, two, three, four, 18 and 24 hours cell viability tests were performed and the percentage of

growth inhibition (PGI) was determined, and this procedure was repeated twice in duplicate.

To check significant differences among groups, the results were analyzed with one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test. The significance level was 5% ($p < 0.05$).

Results

In vitro experiment

The AC intraperitoneal administration at dose of 1.864 and 2.796 mg/kg body weight led to a reduction in tumor volume and viable cell count of tumor-bearing mice compared to control mice EAT (Table 1).

TABLE 1 – Effect of Acetone cyanohydrin in volume and count of viable tumor cells in mice with EAT.

	Total cells (10^5)	Volume (mL)
CG	56.15±21.5	8.6±2.24
ACG1	24.42±12.51*	3.8±1.69*
ACG2	14.45±9.81*	3.12±1.79*

Each value represents the average ±DP. (n=10 mice per group)

* $p < 0.0001$, when treated and compared to the control group

In ACG1, only one animal showed no ascites at the end of 15 days, not presenting tumor cells after peritoneal wash with saline. In ACG2, two animals showed ascites and after the wash showed no peritoneal tumor cell counting. In the CG, all animals developed ascites and showed viable cells counting.

In vitro experiment

With the results shown in Figure 1, concerning the percentage of inhibition of EAT cell growth after treatment with AC, it was found that doses of AC used showed the same pattern, where the inhibition was dose- and time-dependent.

Sulfane sulfur deficiency in malignant cells, increasing the inhibiting action of acetone cyanohydrin in tumor growth

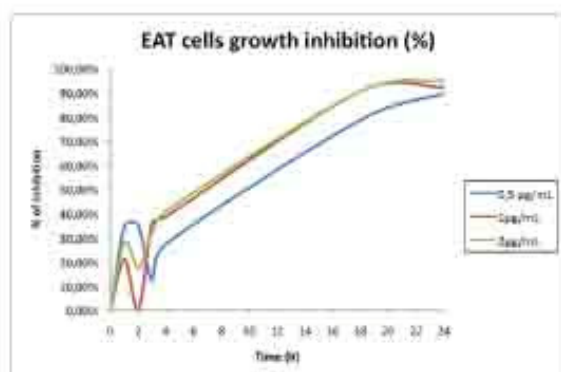


FIGURE 1 - inhibition growth curve after treatment with in vitro acetone cyanohydrin compared to control group.

The evaluation of the inhibition of the AC showed no significant difference between the three doses, 0.5, 1 and 2 mg / mL. 24 hours after reaching 89.47, 92.11 and 94.74% respectively.

Discussion

The use of Acetone cyanohydrin was motivated by the fact that its action in the organism is similar to its molar equivalent of cyanide. For example, the intraperitoneal lethal dose (LD50) in mice to Acetone cyanohydrin is equivalent to 2.65 mg of cyanide ion/kg which is similar to that of sodium cyanide which is 2.54 mg/kg cyanide ion and has an average five minute-time to death for the two compounds. The LD50 of acetone cyanohydrin is 8.5 mg/kg weigh⁸⁹. In this experiment we used doses under the lethal values, 1.864 and 2.796 mg of acetone cyanohydrin/Kg.

The tumor inhibition without causing acute poisoning in animals was only possible due to cyanide act promoting the inhibition of cytochrome C oxidase, an enzyme directly involved in mitochondrial respiration, thus promoting a decrease in ATP levels and resulting in cellular injury or establishing cell death, depending on its concentration^{4,10}. However, due to unavoidable exposure to cyanide, living organisms have developed a self-defense mechanism by conversion of cyanide to thiocyanate by the transfer of sulfur from the sulfane sulfur group (sulfur donors) for the cyanide by the rhodanese mitochondrial enzyme^{10,11}. A feature present in cancer cells is the residual activity of rhodanese¹², due to a deficiency of sulfane sulfur, which makes transport and biosynthesis of sulfur from sulfane not occur satisfactorily in such cells. This suggests that the uncontrolled proliferation of cancer cells is a result of deficiency of this compound, and that this active form of sulfur promotes inhibition of regular cell proliferation^{11,18}.

The sulfane sulfur is generated from multiple metabolic pathways and from protein which are capable of stabilize and transport it. The activity of a number of enzymes is regulated by compounds containing sulfane sulfur. It is believed that this substance can exert a regulatory activity through changes in -SH groups, and disability in the anaerobic metabolism of sulfur is related to neoplastic processes and immunodeficiency virus infections, and such high activity and short half-life confer characteristics of an efficient regulator⁴. As a result, cells with sulfane sulfur deficiency have a significantly diminished rhodanese activity^{2,10}.

The action of acetone cyanohydrin in both experiments, and , demonstrates the ability of tumor cells to irreversibly poison the action of cyanide, while normal cells are resistant to small doses of cyanide due to the protection afforded by mitochondrial rhodanese with its ability to detoxify cyanide to a certain extent. Once the limit is exceeded, however, the toxicity is expressed. The absence of this intracellular mechanism in tumor cells may explain their inability to eliminate cyanide efficiently. This provides a dose and time dependent effect^{11,12}, as occurred in the experiment and previous study⁷. Cyanide toxicity occurs in two ways: ATP depletion caused by blockage of oxidative phosphorylation and production of reactive oxygen⁷.

The acetone cyanohydrin led to a significant decrease in tumor volume, leading to inhibition of the tumor in 3 animals, one from ACG1 and two from ACG2, which means that the higher dose in the cure rate was approximately 20%. The literature also reports the success of therapy with cyanide using suicide gene, based on the transfer of an encoding B-glucosidase (linamarase) gene to tumor cells which, in the presence of an innocuous substrate (linamarin), produces cyanide, causing these cells to die proportionally to the concentration of linamarin^{17,20}.

Evidence observed in the present study suggests that the selective action of cyanide is due to a deficiency in its elimination, which is observed in tumor cells as widely discussed in the literature. We believe that further studies are necessary before it is possible to fully understand the mechanism of action involved in the process.

Conclusions

Acetone cyanohydrin, through its molar equivalent of cyanide, was able to promote a reduction in tumor volume, a decrease in the total number of tumor cells, as well as prevent tumor development in 20% of the treated animals. In the experiment the acetone cyanohydrin presented a dose and time dependent action.

References

- Grivietz I, Regner A, da Rocha AB. Morte celular por apoptose. *Rev Bras Cancerol*. 2007;53(3):335-43.
- Jurkowska H, Wróbel M. N-acetyl-L-cysteine as a source of sulfane sulfur in astrocytoma and astrocyte cultures: correlations with cell proliferation. *Amino Acids*. 2008;34:231-7.
- Toohay JE. Sulphane sulphur in biological systems: a possible regulatory role. *Biochem J*. 1989;264:625-32.
- Isick M, Wlodek L. Biosynthesis and biological properties of compounds containing highly reactive, reduced sulfane sulfur. *Pol J Pharmacol*. 2001;53:215-25.
- Jurkowska H, Placha W, Nagahara N, Wróbel M. The expression and activity of cystathionine- γ -lyase and 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase in human neoplastic cell lines. *Amino Acids*. 2011;41:151-8.
- Jurkowska H, Wróbel M. N-acetyl-L-cysteine as a source of sulfane sulfur in astrocytoma and astrocyte cultures: correlations with cell proliferation. *Amino Acids*. 2008;34:231-7.
- Rumalho RT, Aydos RD, Ceceda MP. Evaluation of acetone cyanohydrin effect in "in vitro" inactivation of the Ehrlich ascites tumor cells. *Acta Cir Bras*. 2010;25(1):111-6.
- Magos L. A study of acrylonitrile poisoning in relation to methaemoglobin-co complex formation. *Br J Industr Med*. 1962;19:283-6.
- Thompson RW, Valentine HL, Valentine WM. Cytotoxic mechanisms of hydrosulfide anion and cyanide anion in primary rat hepatocyte cultures. *Toxicology*. 2003;188:149-59.
- Soto-Blanco B, Marioka PC, Goniak SI. Effects of long-term low-dose cyanide administration to rats. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2002;53:37-41.
- Zottola MA. A partial exploration of the potential energy surfaces of SCN and HSCN: implications for the enzyme-mediated detoxification of cyanide. *J Mol Graph Model*. 2009;28:183-6.
- Cibin TR, Guyathar Devi D, Abraham A. Chemoprevention of skin cancer by the flavonoid fraction of *Saraca asoka*. *Phytother Res*. 2010;24:666-72.
- Wlodek L, Wróbel M, Czysak J. Transamination and transsulfuration of L-cysteine in Ehrlich ascites tumor cells and mouse liver. The nonenzymatic reaction of L-cysteine with pyruvate. *Int J Biochem*. 1993;25:107-12.
- Melino S, Subelli R, Paci M. Allyl sulfur compounds and cellular detoxification system: effects and perspectives in cancer therapy. *Amino Acids*. 2011;41:103-12.
- Yusuf UF, Ahmadun F, Rosli R, Iyuke SE, Billa N, Abdullah N, Umar-Taufe N. An in vitro inhibition of human malignant cell growth of crude water extract of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and commercial linumirin. *Songklanakarin J Sci Technol*. 2006;28:145-53.
- Chang H, Shin M, Yang H, Lee J, Kim Y, Lee M, Kim J, Kim K, Kim C. Amygdalin induces apoptosis through regulation of Bax and Bcl-2 expressions in human DU145 and LNCaP prostate cancer cells. *Biol Pharm Bull*. 2006;29:1597-602.
- Kousparou CA, Epenetos AA, Deonamin MP. Antibody-guided enzyme therapy of cancer producing cyanide results in necrosis of targeted cells. *Int J Cancer*. 2002;99:138-48.
- García-Escudero V, Gargini R, Izquierdo M. Glioma Regression In vitro and In vivo by a suicide combined treatment. *Mol Cancer Res*. 2008;6(3):407-17.
- Cortés ML, García-Escudero V, Hughes M, Izquierdo M. Cyanide bystander effect of the linamarase/linumirin killer-suicide gene therapy system. *J Gene Med*. 2002;4:407-14.
- Cortés ML, Felipe P, Martín V, Hughes MA, Izquierdo M. Successful use of a plant gene in the treatment of cancer in vivo. *Gene Ther*. 1998;5:1499-507.

Acknowledgement

To Prof. Isabella Saliba Pereira for revising the English language.

Correspondence:

Rondon Tosta Rumalho
Rua Talles, 178
79041-560 Campo Grande - MS, Brasil
rondontosta@gmail.com

Received: June 12, 2013

Review: Aug 14, 2013

Accepted: Sept 12, 2013

Conflict of interest: none

Financial source: none

Research performed at Laboratory of Experimental Carcinogenesis, Federal University of Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande-MS, Brazil. Part of PhD degree thesis, Health and Development Postgraduate Program. Tutor: Ricardo Dutra Aydos.