

UNIVERSIDADE FRANCISCANA

CURSO DE BIOMEDICINA

CAMILA MEDIANEIRA DA SILVA D'ÁVILA

**EFEITO ANTICARCINOGENICO DO CACAU (*Theobroma cacao*, L.) EM
CÉLULAS CÂNCER COLORRETAL (HT-29) VIA MODULAÇÃO DOS
HALLMARKS DO CÂNCER**

SANTA MARIA- RS

2022

CAMILA MEDIANEIRA DA SILVA D'ÁVILA

**EFEITO ANTICARCINOGENICO DO CACAU (*Theobroma cacao*, L.) EM
CÉLULAS CÂNCER COLORRETAL (HT-29) VIA MODULAÇÃO DOS
HALLMARKS DO CÂNCER**

Projeto de trabalho final de graduação (TFG)
apresentado ao Curso de Biomedicina, Área de
Ciências da Saúde, da Universidade Franciscana -
UFN, como requisito parcial para aprovação na
disciplina TFG (II)

Orientadora: Prof^ª. Dra. Francine Cadoná

Santa Maria- RS

2022

EFEITO ANTICARCINOGENICO DO CACAU (*Theobroma cacao*, L.) EM CÉLULAS CÂNCER COLORRETAL (HT-29) VIA MODULAÇÃO DOS HALLMARKS DO CÂNCER

ANTICARCINOGENIC EFFECT OF COCOA (THEOBROMA CACAO, L.) ON COLORECTAL CANCER CELLS (HT-29) BY CANCER HALLMARKS MODULATION

Camila Medianeira da Silva D'Ávila¹, James Eduardo Lago Londero², Altevir Rossato Viana², André Passaglia Schuch², Catia Santos Branco³, Karina Zanella Lodi³, Jean Lucas Gutknecht da Silva⁴, Luciana Maria Fontanari Krause⁵, Nathieli Bianchin Bottari¹, Maria Rosa Chitolina Schetinger⁴, Francine Carla Cadoná^{6*}

1 Curso de Pós-Graduação em Biomedicina, Universidade Franciscana, Brasil.

2 Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Santa Maria, Brasil.

3 Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Brasil.

4 Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, Brasil.

5 Universidade Federal de Santa Maria, Brasil.

6 Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde e da Vida, Universidade Franciscana, Santa Maria, RS, Brasil.

* Autor correspondente: Francine Carla Cadoná. Rua dos Andradas, 1614, Santa Maria, RS, CEP: 97010-032, Fone: +55 55 32201200. E-mail: francinecadona@gmail.com

RESUMO

O câncer colorretal (CCR) é considerado um dos tumores mais comuns, com altas taxas de mortalidade no mundo. Já que o CCR é bastante resistente à quimioterapia, a busca por novos agentes anticarcinogênicos é essencial. Diante disso, destaca-se o cacau (*Theobroma cacao* L.), uma fonte riquíssima de moléculas bioativas. Assim, o objetivo do estudo foi investigar o efeito anticarcinogênico do cacau em células de câncer de colorretal (HT-29) via modulação dos *hallmarks* do câncer. Para isso, as células HT-29 foram expostas a diferentes concentrações do cacau (100 - 2000 µg/mL) durante 72 h. Além disso, o efeito do cacau, foi analisado associado à IC50 do 5-Fluorouracil (5-FU), por 72 h. Após o período de incubação, análises que contemplaram alguns dos *hallmarks* do câncer foram realizadas, como proliferação e ciclo celular, apoptose, genotoxicidade e metabolismo oxidativo e energético. Os resultados sugeriram que o cacau não interferiu na ação do 5-FU. Enquanto o cacau isolado apresentou ação antiproliferativa em células HT-29 em todas as concentrações testadas em 72 horas. Foi possível observar um aumento na produção do estresse oxidativo, inibição da formação de colônias, ativação da apoptose e necrose, confirmada pelo aumento da expressão da proteína envolvida com a apoptose (AIF), bloqueio do ciclo celular, indução de genotoxicidade e modulação do metabolismo energético da célula. Diante disso, os resultados destacam o cacau como um potente agente adjuvante anticarcinogênico, com um excelente perfil para ser utilizado em novas terapias para o CCR.

Palavras-chave: produto natural, sementes de cacau, atividade anticarcinogênica, estudo *in vitro*.

ABSTRACT

*Colorectal cancer (CRC) is considered one of the most common tumors, with high mortality rates in worldwide. Since CRC is resistant to chemotherapy, the search for new anticarcinogenic agents is essential. Thus, cocoa (*Theobroma cocoa L.*) can be highlight since it presents several bioactive molecules. In this scenario, the aim of the study was to investigate the anticarcinogenic effect of cocoa on colorectal cancer cells (HT-29) via modulation of cancer hallmarks. For this, HT-29 cells were exposed to different cocoa concentrations (100 - 2000 µg/mL) for 72 h. Furthermore, the effect of cocoa was analyzed at the IC50 of 5-Fluorouracil (5-FU) for 72 h. After the incubation period, analyzes that contemplated some of the cancer markers were carried out, such as the cell cycle, apoptosis, genotoxicity and oxidative and energy metabolism. The results suggested that cocoa did not interfere with the action of 5-FU. While isolated cocoa showed cytotoxic action on HT-29 cells at all concentrations in 72 hours. It was possible to observe an increase in the production of oxidative stress, formation of colonies inhibition, activation of apoptosis and necrosis, confirmed by the increase in the expression of the protein linked with apoptosis (AIF), cell cycle arrested, induction of genotoxicity and metabolism modulation cell energy. Taking this into account, the results highlight cocoa as a potent anticarcinogenic adjuvant agent, with an excellent profile to be used in new therapies for CRC.*

Keywords: *natural product, cocoa seeds, anticarcinogenic activity, in vitro study.*

INTRODUÇÃO

Câncer é um termo genérico usado para descrever um grande grupo de doenças relacionadas que se caracterizam principalmente por um crescimento descontrolado de células anormais (HASSANPOUR; DEGHANI, 2017). Praticamente qualquer célula no corpo pode se tornar uma célula cancerosa (carcinogênese) depois de sofrer uma série de mutações genéticas sucessivas (HASSANPOUR; DEGHANI, 2017). Nesse processo de transformação, de célula normal para maligna, a célula adquire capacidades que são comuns em cânceres. Essas características, segundo Hanahan e Weinberg (2011), perfazem oito com mais dois facilitadores, os quais são conhecidos como *Hallmarks*. Dentre as características das células cancerígenas é possível destacar: sustentação da sinalização proliferativa, escape os supressores de crescimento, resistência à morte celular, imortalidade replicativa, ativação da invasão e metástase, desregulação da energia celular e do metabolismo e evasão à destruição imunológica. Já em relação as características facilitadoras, é possível ressaltar: a instabilidade do genoma e consequente mutação e inflamação promotora de tumores (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Dentre os cânceres mais incidentes no mundo, destaque-se o câncer colorretal (CCR), o qual é uma neoplasia multifatorial que acomete o trato gastrointestinal inferior, originando-se através da proliferação exacerbada das células do revestimento interno do colón e/ou reto, dando origem a um pólipó, este que, com o tempo pode vir a se transformar em um adenocarcinoma (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2020).

O CCR é considerado um dos tumores mais comuns, com altas taxas de mortalidade no mundo, sendo o terceiro maior incidente entre homens e mulheres, uma doença que vem aumentando a cada ano (HASSANPOUR; DEGHANI, 2017; MORGAN, 2022). Estima-se um aumento de cerca de 3,2 milhões de novos casos e 1,6 milhões de mortes causadas pela doença até 2040 (MORGAN, 2022).

O surgimento dessa neoplasia tem uma associação multifatorial, onde os fatores genéticos estão correlacionados com o aumento da doença em de jovens (PIRES *et al.*, 2021). Segundo Brenner e colaboradores (2014), apesar da hereditariedade ser responsável por uma parte dos casos de câncer colorretal, não corresponde com a maioria das ocorrências, sendo resultado de um desenvolvimento ao longo dos anos através de fatores esporádicos. Assim, a maioria dos casos estaria relacionada com o estilo de vida como o uso de tabaco, consumo de bebidas alcóolicas, excesso de peso, sedentarismo e a dieta (principalmente com um alto consumo de carnes vermelhas e processadas) (PIRES *et al.*, 2021). A *American Cancer Society* (2020) correlaciona o aumento do risco de surgimento do CCR a fatores como, histórico de doença inflamatória intestinal, diabetes tipo 2 e idade, sendo recomendado o início do rastreamento da doença a partir dos 45 anos.

De acordo com a *American Joint Committee on Cancer* (2017) o diagnóstico de CCR é feita pelo sistema TNM (Tamanho, Linfonodos, Metástase), onde se leva em consideração 3 importantes informações: a extensão do tumor (T), a invasão para linfonodos adjacentes (N) e a metástase (M). Sendo assim, o estágio 0 é quando o câncer está em sua fase inicial, conhecida como carcinoma in situ; o estágio 1 é quando o tumor já atingiu o revestimento interno (T1) com possibilidade de atingir a camada muscular espessa (T2); no estágio 2 o tumor passa a atingir as camadas finas e externas do tecido conjuntivo, chamada serosa (T3); é no estágio 3 que o tumor passa a acometer cerca de 1 a 6 linfonodos (N1 – N2) próximos da região; por fim o estágio 4 é quando há metástase (M1).

O câncer colorretal é tratável e, em sua maioria, curável, se diagnosticado precocemente, o que, em muitos casos, acaba por não ocorrer, seja pela procura ou

sintomatologia tardia, gerando assim, um número elevado da doença diagnosticada já em estágio de grau III (BRASIL, 2014).

A maioria dos casos necessita de remoção cirúrgica em conjunto com o tratamento com quimioterapia adjuvante, altamente recomendada para casos em estágio de grau III e, excepcionalmente, em alguns casos de grau II, assim como também o uso da quimioterapia neoadjuvante associada com a radioterapia (BRASIL, 2014). No entanto, apesar da grande resposta de melhora, em alguns casos pode haver uma resistência ao tratamento (BLONDY *et al.*, 2020; SETHY; KUNDU, 2021).

Um dos mais usados e importantes quimioterápicos, atualmente utilizados, são baseados em flouropirimidina, sendo o mais comum e conhecido o 5-Fluorouracil (5-FU), considerado seu análogo sintético (BLONDY *et al.*, 2020). Nas estratégias de tratamento, seja para quimioterapia neoadjuvante ou para quimioterapia adjuvante, o 5-FU é altamente recomendado, muitas vezes, em associação com outros dois ou três medicamentos, seu uso é indicado para casos de grau III, algumas exceções de grau II, no controle ao câncer colorretal (BRASIL, 2014; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2020).

O 5-FU é um quimioterápico antimetabólito que através da administração intravenosa, entra nas células pelos mesmos mecanismos de transporte facilitado do uracil. Ao ser metabolizado na via anabólica, o 5-FU gera metabólitos ativos que inibem a atividade da timidilato sintase (TS) que leva a inibição da síntese da Timina e consequente dano do DNA e a morte celular. Por fim, é excretada na urina ou como CO² durante a expiração (LONGLEY; HARKIN; JOHNSTON, 2003)

Apesar do aumento na taxa de resposta quando se associado o 5-FU a outros medicamentos, segundo Blondy e colaboradores (2020), a sobrevida permanece relativamente baixa, sendo, principalmente em casos de câncer metastático. A causa do surgimento de resistência ao tratamento que leva a sua falha. O câncer colorretal com presença de resistência, seja inata ou adquirida ao tratamento, apresenta em suas células uma resposta de modulação de algumas funções celulares, como um mecanismo de defesa ao quimioterápico (BLONDY *et al.*, 2020; SETHY; KUNDU, 2021).

Uma das maiores causas para a resistência ao câncer colorretal ao tratamento com 5-FU, está relacionada a modulação das células cancerígenas em relação a transição epitélio-mesenquimal e ao microambiente tumoral que apresentaria o surgimento de células-tronco cancerígenas, o que dificultaria a ação do quimioterápico 5-FU (SETHY; KUNDU, 2021). Além disso, pelo foco das terapias estarem em células cancerígenas em fase mais tardia, as células-tronco cancerígenas quiescentes acabam por sobreviver e gerar uma recidiva da doença (DAS; ISLAM; LAM, 2020).

Apesar de comum, a resistência das células-tronco cancerígenas ao 5-FU está ligada, principalmente, a dois *Halmarks* dos oito existentes atualmente, sendo a sustentação de sinalização proliferativa e a resistência à morte celular. Outras formas de resistência ao 5-FU pelas células-tronco cancerígenas é o desenvolvimento da ativação de vias de reparo de DNA, trocas metabólicas, a doença residual mínima e a absorção do medicamento comprometida (HANAHAN; WEINBERG, 2011; ZHENG, 2017)

Assim, faz-se necessário a procura por tratamentos novos ou que auxiliem a ação do 5-FU, afim de aumentar suas taxas de efetividade no tratamento do câncer de colorretal (BLONDY *et al.*, 2020; SETHY; KUNDU, 2021). Por isso, procurando novas alternativas, passou-se a ser estudado produtos naturais e muito se descobriu que em diversos alimentos e plantas poderiam ser encontrados efeitos promissores relacionados à anticarcinogênese e com possibilidade de efeitos adversos reduzidos ou nulos (SHIN; HWANG; CHOI, 2019).

As plantas sempre foram utilizadas como forma de tratamento de diversas doenças ao longo da história do mundo, sendo considerada “a fonte mais antiga de medicamentos

para o homem” (BRANDÃO *et al.*, 2010). Visando a busca de novos tratamentos, as plantas se tornaram um grande foco de estudos em diversas áreas, assim dando continuidade aos seus usos medicinais (SHIN; HWANG; CHOI, 2019).

Os europeus, no século XVI, já usavam o cacau e seus derivados, seja de forma isolada ou combinada com outras ervas e plantas, para tratamento de dores de cabeça e inflamações. Desde então o cacau (*Theobroma cacao*, L.), há muito vem sendo estudado e trouxe interesse pelas suas substâncias bioativas, sendo relatado como um grande antioxidante, anti-inflamatório e anticancerígeno (BAHARUM *et al.*, 2016). Em estudo, foi relatado ser uma planta rica em compostos fenólicos, como flavonoides, catequinas e procianidinas, em comparação com outros alimentos, como o vinho e o chá verde (YAÑES *et al.*, 2021; KHAN; NICOD, 2012).

A quantidade de substâncias bioativas presentes na matriz química do fruto varia de acordo com componentes externos e genéticos da planta (JALIL; ISMAIL, 2008). Além de substâncias fenólicas, no cacau também há presença das metilxantinas, como teobromina, teofilina e cafeína, sendo a teobromina a mais predominante (LEE *et al.*, 2003).

Segundo estudos, a variedade de substâncias fenólicas, teriam efeito quimio-protetor por combater espécies reativas de oxigênio (EROs) (OTHMAN *et al.*, 2007). Por isso, Martins e seus colaboradores (2020) avaliaram esse efeito em células endoteliais humanas que foram submetidas ao estresse oxidativo, o resultado foi uma proteção ao dano oxidativo e resposta de defesa antioxidante. Hong e colaboradores (2013), de acordo com seus levantamentos epidemiológicos, descrevem a importância das substâncias fenólicas na dieta, pois atrasaria ou atenuaria o aparecimento de doenças como o próprio CCR, já que assim os danos oxidativos e a inflamação seriam reduzidos.

Os flavonoides são foco em diversos estudos, pois possuem atividades quimiopreventiva, já que são capazes de induzir a apoptose e a inibição da proliferação de células tumorais, e antioxidante, associado as procianidinas, já que aprisionariam os EROs (VAUZOUR *et al.*, 2010; JALIL *et al.*, 2008). De acordo com o estudo de Zhu e colaboradores (2013) em ratos machos, os flavonoides, procianidinas, catequinas e epicatequinas fornecem um efeito protetor na membrana plasmática, aumentando a capacidade antioxidante.

Segundo Baharum e colaboradores (2016), os flavonoides presentes no cacau, teriam desempenho em atividades antitumorais como a inibição da proliferação celular, apoptose e inibição da angiogênese. Já para Yañes e colaboradores (2021), os flavonoides teriam, também, ação anti-inflamatória e propriedades antivirais.

Além disso, outros estudos sugerem que os flavonoides apresentariam capacidade de modular a via de transdução de sinais proliferativos e enzimas do metabolismo de procarcinogênicos, além de bloquear a angiogênese (PICK *et al.*, 2011). *In vitro*, os flavonoides apresentam efeito preventivo contra alguns tipos de câncer, entre eles o de mama, pulmão, próstata, fígado e CCR (MARTIN; GOYA; RAMOS, 2013; PÉREZ-CANO *et al.*, 2013).

Assim, o cacau com suas moléculas bioativas teria ação em doenças inflamatórias, em casos onde há presença de EROs, além de ação antiviral, antioxidante, quimio-protetor e preventivo. O cacau aparenta ser um potencial medicamento preventivo e para tratamento de doenças infecciosas e cancerígenas, com grande benefício nutracêutico (BAHARUM *et al.*, 2016; YAÑES *et al.*, 2021).

Neste contexto, onde se nota a ocorrência de um crescente aumento de casos de câncer colorretal, pode-se reconhecer ser um preocupante problema de saúde pública. Apesar dos protocolos estabelecidos para o tratamento, o diagnóstico tardio e a recidiva da doença acabam dificultando e, por vezes, impossibilitando resultados positivos na

quimioterapia, comprometendo a qualidade de vida do paciente. Logo, há uma grande busca por novas terapias ou moléculas anticarcinogênicas e que também auxiliem a ação do quimioterápico. Nesse sentido, a utilização de substâncias naturais, em que sua matriz química é rica em bioativos, vem sendo bastante estudada nas últimas décadas. O cacau (*Theobroma cacao*, L.) é um fruto, que vem sendo altamente visado em estudos, com grandes potenciais antitumorais e antioxidantes, por ser rico em compostos fenólicos e metilxantinas, sendo um potencial nutracêutico a compor as novas alternativas terapêuticas anticarcinogênicas.

Tendo em vista a matriz química rica do cacau além do seu grande potencial medicinal, o presente trabalho investigou os efeitos *in vitro* das sementes do cacau em células de câncer da linhagem HT-29 de forma isolada e em associação com o quimioterápico, 5-FU, visando a investigação das modulações dos *Hallmarks* do câncer.

MATERIAS E MÉTODOS

PREPARO DA SOLUÇÃO DE CACAU

O pó das sementes do cacau foi obtido da empresa distribuidora Florien®, onde as informações a respeito da qualidade e origem da planta foram asseguradas com laudo técnico fornecido pela empresa. Para a produção da solução de cacau na concentração de 8 mg/mL foi pesado em um balão volumétrico o equivalente a 400 mg do pó de cacau e adicionado 50 mL de PBS. A amostra foi colocada em ultrassom durante 30 minutos, e após, transferida para um béquer, seguindo por mais 30 minutos em banho-maria a 40 °C com agitação magnética e posteriormente filtrada em papel filtro quantitativo (diâmetro de 12,5 cm, faixa preta). Por fim, a amostra foi filtrada utilizando membranas de 0,22 µm para esterilização e armazenadas em freezer a -20 °C para posterior uso nos experimentos.

Em estudo anterior realizado em nosso grupo de pesquisa, as moléculas bioativas presentes na solução de cacau foram analisadas por HPLC (Alto Desempenho Cromatografia Líquida), de acordo com o método validado por Roggia *et al.* (2020). Nossos achados indicaram que a solução de cacau apresentou concentrações de catequina, epicatequina, teobromina, teofilina e cafeína, garantindo uma formulação com qualidade para ser usado em todos os experimentos (dados ainda não publicados).

CULTURA CELULAR

A linhagem celular de câncer colorretal (HT-29) foi adquirida comercialmente a partir do Banco de Células do Rio de Janeiro e cultivadas em condições ideais de cultivo de células, utilizando meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibióticos penicilina (100 U/mL) /estreptomicina (100 mg/mL), até a aquisição do número de células e confluência de 95% para a realização de todos os ensaios propostos.

TRATAMENTOS

As células HT-29, em uma concentração de 5×10^4 células/mL em uma placa de 96 poços, foram expostas a diferentes concentrações de solução de cacau (100; 250; 500; 750; 1000; 1250; 1500; 1750; 2000 µg/mL) durante 72 horas, com exceção do poço controle, onde se encontram apenas as células HT-29. Além disso, o efeito da solução de cacau, nas mesmas concentrações utilizadas, foi analisado associado ao quimioterápico 5-FU, pelo mesmo período de incubação. Primeiramente, foi realizado uma curva de

concentração do quimioterápico (0,5; 1; 5; 10; 15; 25; 50; 100; 150; 200 $\mu\text{g/mL}$), com vista a encontrar a IC50 (concentração inibitória média), a qual foi posteriormente associada a diferentes concentrações da solução de cacau.

MENSURAÇÃO DE PROLIFERAÇÃO E VIABILIDADE CELULAR

Ensaio do MTT

Para a realização do ensaio do brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT), foi descartado o sobrenadante da placa de 96 poços e adicionado tampão fosfato para lavar possíveis interferentes do cacau e ressuspender as células. Após isso, foi adicionado o reagente MTT e incubado por 1 hora a 37 °C, onde o reagente foi reduzido e convertido ao composto formazan. Após a incubação e registro fotográfico, se adiciona para solubilizar o formazan o dimetilsulfóxido (DMSO). A quantificação foi feita colorimetricamente através do espectrofotômetro em um comprimento de onda de 560 nm. O valor da absorbância é proporcional ao número de células viáveis (KANG *et al.*, 2010).

Ensaio de quantificação de DNA livre

O ensaio fluorimétrico de quantificação de DNA livre no meio foi realizada utilizando uma placa de 96 poços preta onde se adiciona TE 1x seguida do sobrenadante da placa com tratamento e por fim o reagente DNA-PicoGreen®, da marca Invitrogen (Life Technologies) é adicionado e a placa é incubada por 5 minutos. Onde o corante fluorescente se liga a concentrações de DNA fita dupla. A leitura da fluorescência foi feita por espectrofluorimetria com 480 nm de excitação e 520 nm de emissão (HA *et al.*, 2011).

Ensaio do Clonogênico

O ensaio clonogênico foi realizado com 1,5 mL com concentração de 1×10^4 de células por poço em triplicada em placas de seis poços. As células foram incubadas até formar 50 células por colônia (aproximadamente 7 dias). Posteriormente, as colônias foram coradas com cristal violeta e o número de colônias foi contado pelo software ImageJ (CUBILLOS-ROJAS *et al.*, 2014).

AVALIAÇÃO DO METABOLISMO OXIDATIVO

Quantificação de diclorofluoresceína (DCF)

Para análise da taxa total de EROs foi usado o reagente 2'-7'- diclorodihidro fluoresceína diacetato (DCFH-DA) e o ensaio foi realizado em uma placa de 96 poços preta. Foi adicionado Tris HCL, seguida do sobrenadante da placa de tratamento, e por fim, o DCFH-DA e incubado por 1 hora. Durante esse tempo o reagente atravessa a membrana celular, reage com o EROs e produz 2',7'-diclorofluoresceína (DCF), responsável pela fluorescência. A leitura foi realizada por espectrofluorimetria com 488 nm de excitação e 525 nm de emissão (ESPOSTI, 2002).

Determinação de Óxido Nítrico

A mensuração da produção de Óxido nítrico foi realizada numa placa de 96 poços, onde é adicionado o sobrenadante da placa de tratamento seguido do reagente de Griess e incubado por 15 minutos. A sulfanilamida do reagente de Griess é responsável pela formação de sais de diazônio a partir do sobrenadante, esses sais quando interagem com o azo-composto (N-1- naftiletilenodiaminobicloridrato) forma a coloração rosada. A mensuração foi realizada por espectrofotometria com 540 nm de comprimento da onda (NOH *et al.*, 2015).

Determinação de produção de Superóxido

Essa técnica foi baseada na formação do sal de formazan via reação entre o Cloreto de Nitrobluetetrazolium (NBT) e o ânion radical superóxido. A mensuração foi realizada por colorimetria através de espectrofotômetro com comprimento de onda de 550 nm (MORABITO *et al.*, 2010).

CITOMETRIA DE FLUXO

Deteção do apoptose e da necrose e análise do ciclo celular

Análises complementares de citometria de fluxo foram realizadas para confirmar a citotoxicidade do tratamento usando 7 ADD e Anexina V (BD Pharmingen™). 7 ADD cora células necróticas e células apoptóticas tardias, enquanto a Anexina V permite identificação que sofreram apoptose inicial. A detecção foi realizada através da conexão entre o receptor celular com os anticorpos fluorescentes à 7 ADD e Anexina V. A análise foi feita de acordo com instruções do fabricante. Logo, as células foram semeadas em garrafas, a uma concentração de 5×10^4 células/mL, utilizando 2 mL dos diferentes tratamentos em DMEM e incubados por 72 horas. Após a incubação, as células foram tripsinizadas para serem isoladas e foram lavadas duas vezes com PBS frio e, em seguida, ressuspenso em 1X Binding Buffer a uma concentração de 5×10^4 células/mL. Após, 100 μ L da solução (1×10^5 células) contendo as células foi transferido para tubos de 5 mL. As células ressuspenso foram submetidas a vórtex suave e coloração com 5 μ L de 7 ADD e 5 μ L de PI e incubadas por 15 min no escuro à temperatura ambiente, 400 μ L de 1X Binding Buffer foi adicionado a cada tubo, e a fluorescência de células foi analisada por citometria de fluxo de acordo com especificações do fabricante (LECOUER *et al.*, 2002).

A análise do ciclo celular também foi realizada usando fluxo citometria após 72 h de tratamento das HT-29 com cacau e 5-Fu. O reagente PI pode se inserir entre as bases do DNA e assim mede a quantidade de moléculas presentes na amostra. No entanto, o PI também pode se conectar com moléculas de RNA, e então a amostra precisa de um tratamento prévio com nucleases para eliminar essa interferência. As células foram semeadas em garrafas, a uma concentração de 5×10^4 células/mL e utilizando 2 mL dos diferentes tratamentos em DMEM e incubados por 72 horas. Após a incubação, as células foram tripsinizadas, lavadas com PBS e ressuspenso em Etanol 70% (a suspensão foi colocada no vortex) a -20°C durante a noite. Antes da análise, as células foram centrifugadas e lavado uma vez com PBS; após isso, as células foram ressuspenso em 500 μ L de solução PI em PBS: 50 μ g/ml PI de solução estoque 50x (2,5 mg/mL), 0,1 mg/ml RNase A e 0,05% Triton X-100, e incubado por 40 minutos a 37°C . Finalmente, 3 ml de PBS foram adicionados a lavagem e ressuspenso em 500 μ L de PBS para análise de fluxo (WILLIAM-FALTAOS *et al.*, 2006).

DETECÇÃO DA EXPRESSÃO PROTEICA

Western Blot

Células HT-29 tratadas com cacau e 5-FU durante 72 h foram isoladas e misturadas com tampão de amostra Laemmli, desnaturado por ebulição (100 °C) por 5 min. Resumidamente, 3000 células/IL (20 IL) foram carregadas e as proteínas foram separadas em géis SDS-PAGE 7,5–15%. Após, as proteínas foram eletrotransferidas para membranas nitrocelulose (Amersham Hybond™-C Extra). As membranas foram bloqueadas com 5% de leite em pó desnatado e foram coradas durante a noite a 4 °C com anticorpos primários. Especificamente, poli clivado e total (ADP-ribose) polimerase (PARP), Fator Indutor de Apoptose (AIF), foram marcados com anticorpos primários, e a b-actina foi usada como controle de carga. Os anticorpos foram diluídos a 1:2000. Após a incubação com anticorpos primários, as membranas foram lavadas com PBS-T (solução salina tamponada com PBS contendo 0,1% de Tween-20) para remover anticorpos primários não ligados. As membranas foram então coradas com IgG anti-coelho conjugado-peroxidase ou IgG de camundongo secundário anticorpos (1:2000) por 1 h em temperatura ambiente. As membranas foram lavadas repetidamente. A detecção de proteínas foi realizada usando um protocolo de quimioluminescência (*Amersham Bioscience*). As imagens da banda de proteína foram capturadas usando o Image Scanner™ III (*GE Healthcare*) e comparações pareadas das bandas de proteínas foram realizadas usando o software Image-J 1.45 (BRANCO *et al.*, 2015).

QUANTIFICAÇÃO DE LESÃO DE DNA GENÔMICO

Ensaio de EAsy-GeL

O ensaio EAsy-GeL foi realizado para quantificar os danos no DNA genômico. Primeiro, o DNA genômico foi isolado das células tratadas usando um protocolo de extração de sal. Amostras de DNA isoladas foram tratadas com TE (volume final: 20 µL) para detectar quebras de fita dupla (ou seja, tratamento neutro). Paralelamente, para detectar quebras de fita simples, amostras isoladas de gDNA foram tratadas com TE (volume final: 20 µL) e posteriormente com 3 uL de Na₂HPO₄ 1M (pH 12,85) por 15 s (misturando levemente 10 vezes) à temperatura ambiente (ou seja, tratamento alcalino/neutro). Em seguida, a solução de DNA foi tratada com 9 µL de HCl 0,1M (misturando levemente 10 vezes) e mantida em gelo por 4 min. 2 µL de solução de azul de bromofenol (0,25% de azul de bromofenol, 60% de glicerol) foram adicionados às amostras dos tratamentos neutro e alcalino/neutro. As amostras foram então submetidas à eletroforese neutra por 2 h em gel de agarose 0,8% corado com corante Unisafe 20000x (uma alternativa ao brometo de etídio). Por fim, a imagem do gel foi usada para determinar o comprimento médio da população de DNA em cada esfregaço e o número de quebras de DNA por par de quilobases. Também quantificamos a intensidade de fluorescência da banda de DNA intacta ($\geq 23,13$ kbp) em cada amostra para medir os níveis observados de degradação do DNA das amostras tratadas em relação às amostras de controle (expressas como alteração de dobra) (LONDERO *et al.*, 2021).

ENSAIOS DE HIDRÓLISE DE NUCLEOTÍDEOS

Para ensaios enzimáticos 20 μL de células (0,9–1,0 mg/mL de proteína) foram adicionados à mistura de reação de NTPDase ou 5'-nucleotidase para um volume final de 200 μL e foram pré-incubados por 10 min a 37 °C de acordo com o método Lanzetta e outros (1979). A reação foi iniciada pela adição de ATP ou ADP como substrato em uma concentração final de 1,0 mM. A E-5'-nucleotidase foi determinada usando o método descrito por Heymann e colaboradores (1984). O fosfato liberado pela hidrólise de ATP, ADP e AMP foi medido usando KH_2PO_4 como padrão. Os resultados foram relatados como $\eta\text{mol Pi liberado/min/mg}$ de proteína.

A atividade da ADA foi estimada espectrofotometricamente conforme descrito por pesquisas anteriores como a medição da amônia produzida quando a adenosina desaminase atua em excesso de adenosina. Para o ensaio, 50 μL de S1 reagiram por 60 min com 21 mmol/L de adenosina, pH 6,5, a 37 °C. A reação foi interrompida adicionando uma solução de fenol 106,2 mM e nitroprussiato de sódio 167,8 nM e uma solução de hipoclorito. Sulfato de amônio a 75 μM foi usado como solução de amônio. A quantidade de amônia produzida foi medida a 620 nm e os resultados foram expressos em unidades por miligrama (U/mg).

O teor de proteína foi determinado usando o método de azul de Coomassie de acordo com Bradford (1976) usando albumina de soro bovino como padrão.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística por meio de teste de Anova de uma via, seguido de *post hoc de Dunnet*, utilizando o programa de produção de gráficos estatísticos *Graph Pad Prism 5.0*. A análise de genotoxicidade foi conduzida teste ANOVA de uma via seguido pelo teste de *Tukey*, usando o mesmo programa estatístico. Os tratamentos foram expressos como porcentagem do controle (%). Foram considerados resultados estatisticamente significativos àqueles nos quais o $p < 0,05$.

RESULTADOS

O CACAU REDUZIU A PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS DE CÂNCER COLORRETAL

A solução de cacau foi capaz de reduzir a proliferação das células HT-29 nas concentrações maiores (750 - 2000 $\mu\text{g/mL}$) quando expostas ao tratamento durante 72 horas (figura 1B), as imagens de microscópio confirmam o resultado (objetiva 10x) (figura 1A). Apesar disso, foi possível mensurar a redução da proliferação celular através do aumento de DNA de células lisadas nas menores concentrações (100-500 $\mu\text{g/mL}$) e

maiores concentrações de cacau (1500-2000 $\mu\text{g/mL}$) (figura 1C), gerando um efeito hermético.

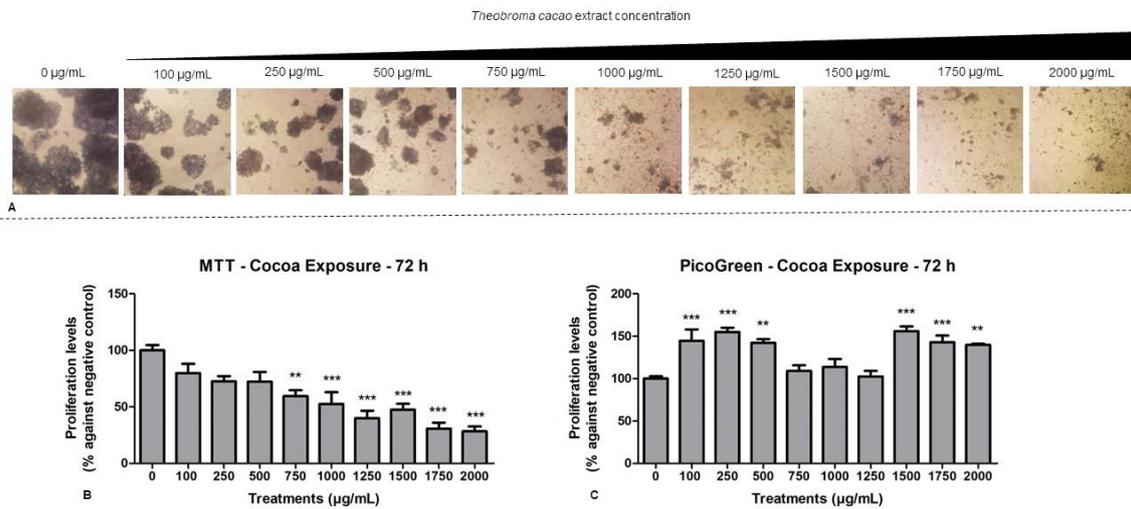


Figura 1. Células HT-29 expostas a diferentes concentrações de cacau (100; 250; 500; 750; 1000; 1250; 1500; 1750 e 2000 $\mu\text{g/ml}$) por 72 h. Imagens obtidas por microscópio óptico, via Ensaio do MTT, durante 72 h, com aumento de 10X (A). A proliferação celular foi determinada pelo ensaio MTT (B) e Ensaio do PicoGreen (C). Os resultados foram comparados com a porcentagem do controle negativo (somente células e meio). N = 3, ** ($p < 0,001$), *** ($p < 0,0001$).

O CACAU NÃO INTERFERIU NA RESPOSTA DO 5-FU

Primeiramente as células HT-29 foram expostas a diferentes concentrações do 5-FU (0,5; 1; 5; 10; 15; 25; 50; 100; 150; 200 $\mu\text{g/mL}$), com vista a encontrar a IC50 (concentração inibitória média), a qual foi posteriormente associada a diferentes concentrações do cacau. O 5-FU diminuiu os níveis de viabilidade (24 horas) e proliferação celular (72 horas) em todas as concentrações testadas, figura 2A e 2B, respectivamente. A IC50 foi determinada em 15 $\mu\text{g/mL}$.

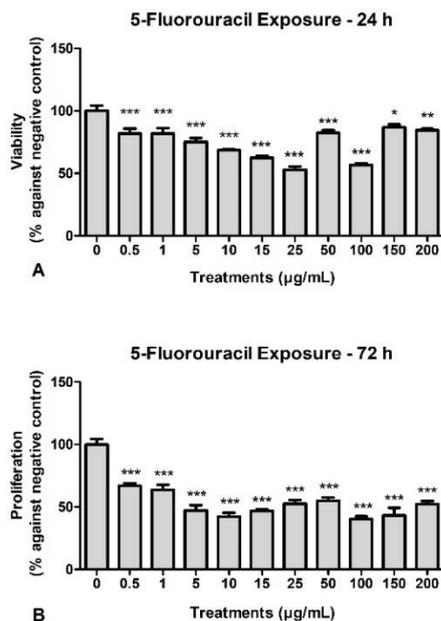


Figura 2. Células HT-29 expostas a diferentes concentrações do 5-FU (0,5; 1; 5; 10; 15; 25; 50; 100; 150; 200 µg/mL) durante 24 h (A) e 72 h (B). Os níveis de viabilidade (24 h) e proliferação (72 h) celular foram determinados pelo Ensaio do MTT. Os resultados foram comparados com o controle negativo (apenas células e meio). N = 3, * (p < 0,005), ** (p < 0,001), *** (p < 0,0001).

Ao expor as células HT-29 à concentração de IC 50 estipulada do quimioterápico, durante 72 horas, os resultados indicaram uma redução da proliferação celular e um aumento na concentração de DNA de células lisadas (figura 3B e D). Já quando associado o quimioterápico com o cacau não se obteve uma potencialização do efeito antiproliferativo, os resultados mostraram que os níveis se mantiveram iguais ao controle do quimioterápico (células tratadas apenas com o 5-FU) (figura 3C e E), as imagens de microscópio confirmam o resultado (objetiva 10x) (figura 3A).

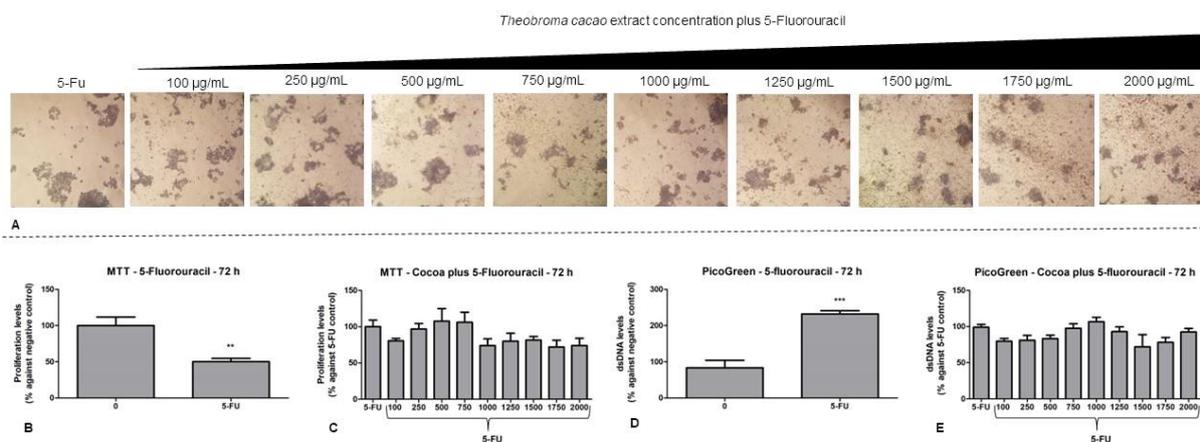


Figura 3. Células HT-29 expostas a diferentes concentrações de cacau (100; 250; 500; 750; 1000;1250; 1500; 1750 e 2000 µg/ml) e expostas a IC50 do 5-FU (15 µg/ml) por 72 h. Imagens obtidas por microscópio óptico, via Ensaio do MTT, durante 72 h, com aumento de 10X (A). A proliferação celular foi determinada pelo ensaio MTT (B e C) e Ensaio do PicoGreen (D e E). Os resultados foram comparados com a porcentagem do controle negativo (somente células e meio) (B e D) e com o controle do 5-FU (apenas células expostas somente a IC50 do 5-FU - 15 µg/mL) (C e E). N = 3, * (p < 0,005), ** (p < 0,001), *** (p < 0,0001).

CACAU REDUZIU A PROLIFERAÇÃO CELULAR PELO AUMENTO DO ESTRESSE OXIDATIVO

Em análise de ação antiproliferativa avaliada por meio da investigação do estresse oxidativo, durante 72 h, o cacau foi capaz de aumentar a concentração de DCF nas menores concentrações (100 e 250 $\mu\text{g/mL}$) (figura 4A). Além disso, o cacau foi capaz de aumentar os níveis de superóxido nas maiores concentrações (1000-1500 $\mu\text{g/mL}$) (figura 4B), no entanto os níveis de óxido nítrico se mantiveram iguais ao grupo controle (figura 4C).

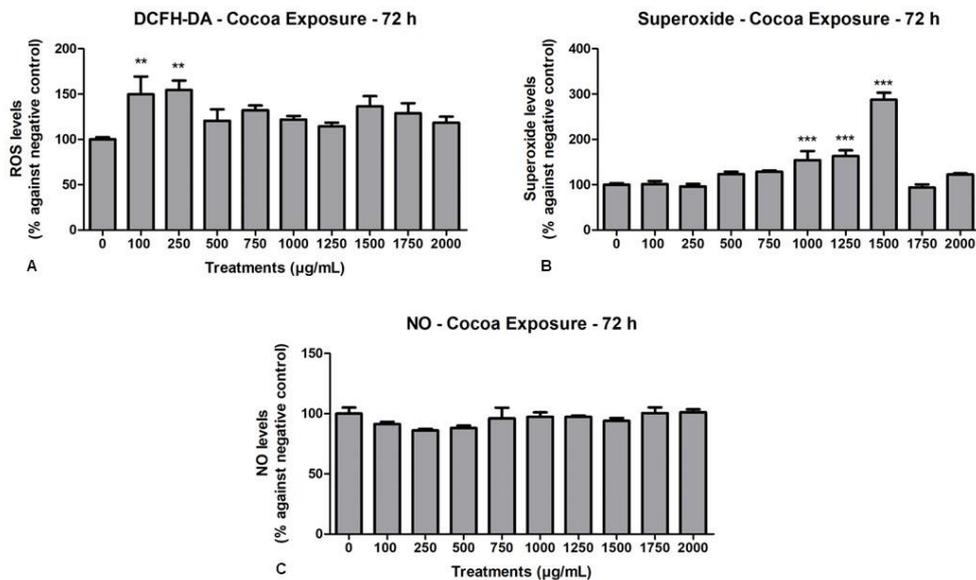


Figura 4. Células HT-29 expostas a diferentes concentrações de cacau (100; 250; 500; 750; 1000;1250; 1500;1750 e 2000 $\mu\text{g/ml}$) por 72 h. Foram determinados os níveis totais de EROs (A), e superóxido (B) e óxido nítrico (C). Os resultados foram comparados com a porcentagem do controle negativo (somente células e meio). N = 3, ** ($p < 0,001$), *** ($p < 0,0001$).

CACAU PROMOVEU UMA REDUÇÃO DAS COLÔNIAS DE CÉLULAS DE CÂNCER COLORRETAL

Obtendo resultados satisfatórios nos outros ensaios, para a análise de formação de colônias foram utilizadas as concentrações de 100 e 1000 µg/mL durante 72 horas.

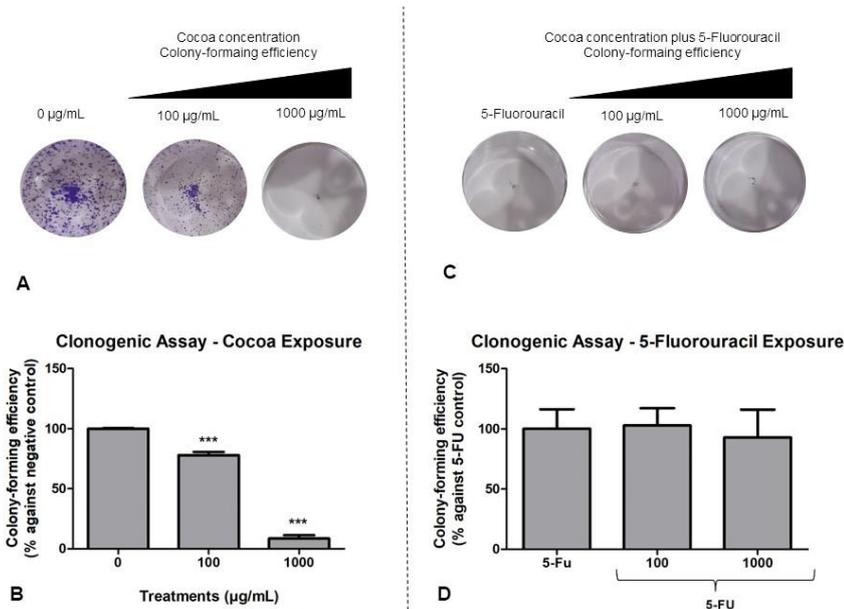


Figure 5. Análise da formação de colônias de células HT-29 expostas a 100 e 1000 µg/mL de solução de cacau isolado (A e B) e em sinergismo com o IC50 do 5-FU (15 µg/mL). As colônias foram medidas usando o Ensaio Clonogênico (7 dias de incubação) e os resultados foram comparados com a porcentagem do controle negativo (apenas células e meio) (A e B) e com o controle do 5-FU (apenas células expostas somente a IC50 do 5-FU - 15 µg/mL) (C e D). N = 3, *** (p < 0,0001).

O cacau foi capaz de reduzir significativamente o número de colônias na menor em comparação com o grupo controle, entretanto a maior concentração obteve uma redução dos números (figura 5B). Contudo, quando associado ao quimioterápico os níveis se mantiveram iguais ao controle do quimioterápico (figura 5D). As imagens macroscópicas confirmam os resultados em ambos os casos (figura 5A e C).

O CACAU INDUZIU A REDUÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR PELA ATIVAÇÃO DA APOPTOSE E NECROSE

Considerando que o cacau possui ação antiproliferativa sobre as células HT-29, a indução de apoptose pelo marcador de apoptose da Anexina V e 7ADD foi determinada (Figura 6). Houve uma diminuição significativa da viabilidade celular das células tratadas com cacau em todas as concentrações testadas (100 e 1000 µg/mL), assim como pela IC50 do 5-FU (15 µg/mL) por 72 h, ratificando os resultados encontrados nos ensaios prévios. Além disso, os resultados encontrados sugeriram que o cacau na concentração de 100 µg/mL ativou a apoptose tardia e na concentração de 1000 µg/mL induziu a necrose celular. Já os resultados obtidos em relação às células expostas à IC50 do 5-FU (15 µg/mL) sugeriram modulação significativa nos níveis de apoptose inicial, tardia e necrose.

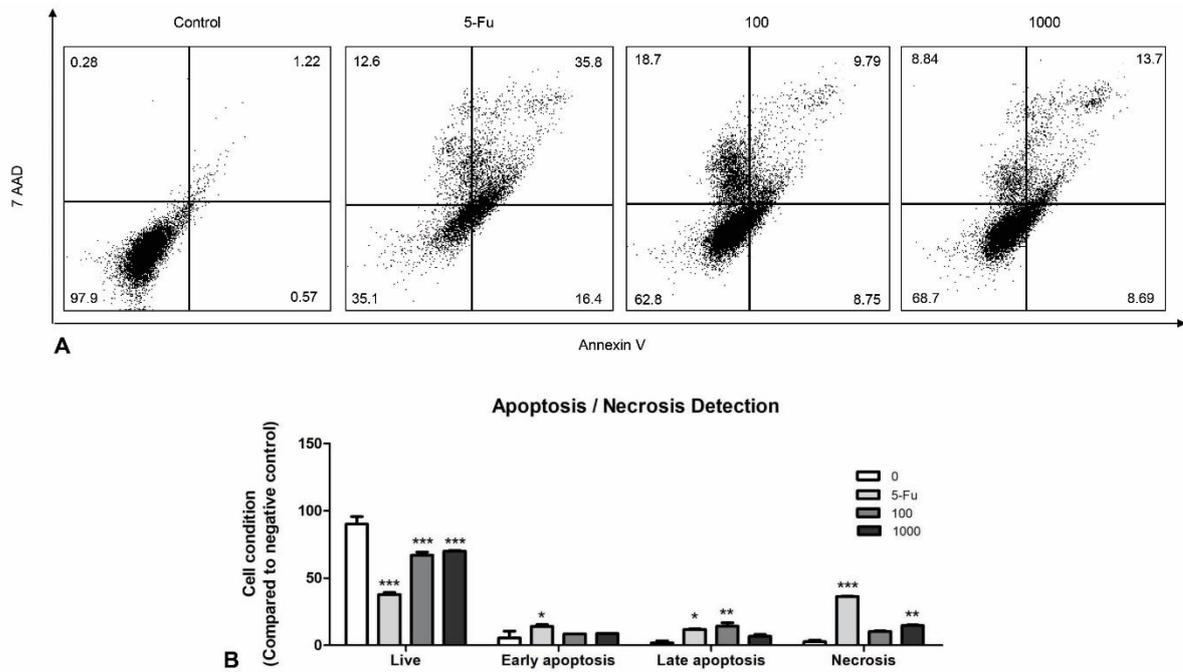


Figura 6. Células HT-29 foram tratadas por 72 horas com 5-FU (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e cacau (100 e 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$). A apoptose inicial foi determinada por Anexina V e a apoptose tarde e necrose pelo 7 ADD. Um total de 10.000 eventos foram adquiridos e analisados usando o FACS Calibur com o software CELL Quest. Células FITC Anexina V e 7 ADD negativas foram consideradas células viáveis; as células ativadas dentro do compartimento FITC Anexina V + 7ADD – foram identificadas como células apoptóticas iniciais, células enquadradas dentro do compartimento FITC Anexina V - 7ADD + foram determinadas como apoptose tardia e células fechadas dentro do compartimento Anexina-V+7ADD+ foram identificadas como células necróticas. N=3, * ($p < 0,005$), ** ($p < 0,001$), *** ($p < 0,0001$).

O CACAU MODULOU O CICLO CELULAR

Os resultados obtidos por meio da análise do ciclo celular (Figura 7) indicaram que o cacau na concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gerou uma redução na fase G2/M do ciclo, enquanto o cacau na concentração de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gerou uma parada no ciclo na fase G1 seguida de diminuição na fase G2/M do ciclo. O 5-FU gerou uma parada na fase G2/M do ciclo celular, seguida de redução na fase G1 do ciclo da célula.

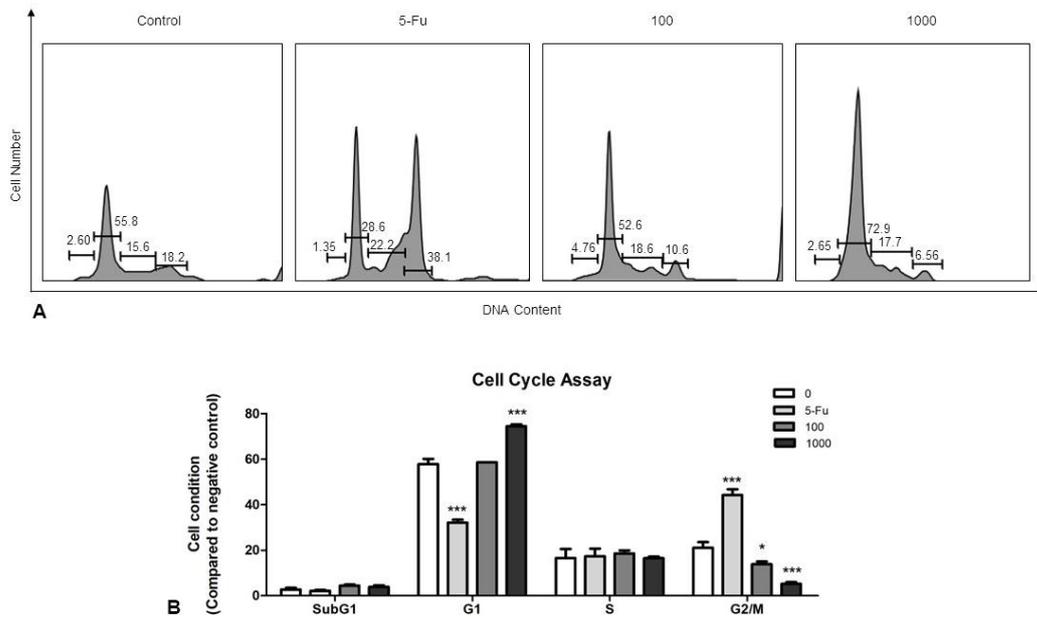


Figura 7. Perfil do ciclo celular de células HT-29 tratadas com 5-FU (15 µg/mL) e cacau (100 e 1000 µg/mL) por 72 horas. O gráfico mostra o conteúdo de DNA em cada fase do ciclo celular. N=3, ***($p < 0,0001$) e * ($p < 0,005$).

CACAU INDUZIU A EXPRESSÃO DO FATOR INDUTOR DE APOPTOSE

Para avaliar a associação de moléculas sinalizadoras apoptóticas após o tratamento com a solução de cacau, os níveis de expressão PARP e AIF foram examinados. Em células HT-29 tratadas com cacau (100 e 1000 µg/mL), foi possível observar maior indução da expressão de AIF na concentração de 100 µg/mL e de forma mais significativa na concentração de 1000 µg/mL e em igual nível no tratamento com o quimioterápico, quando comparado com o controle negativo (Figura 8A). No entanto, os níveis de expressão de PARP não foram modulados pelo tratamento com cacau (Figura 8B).

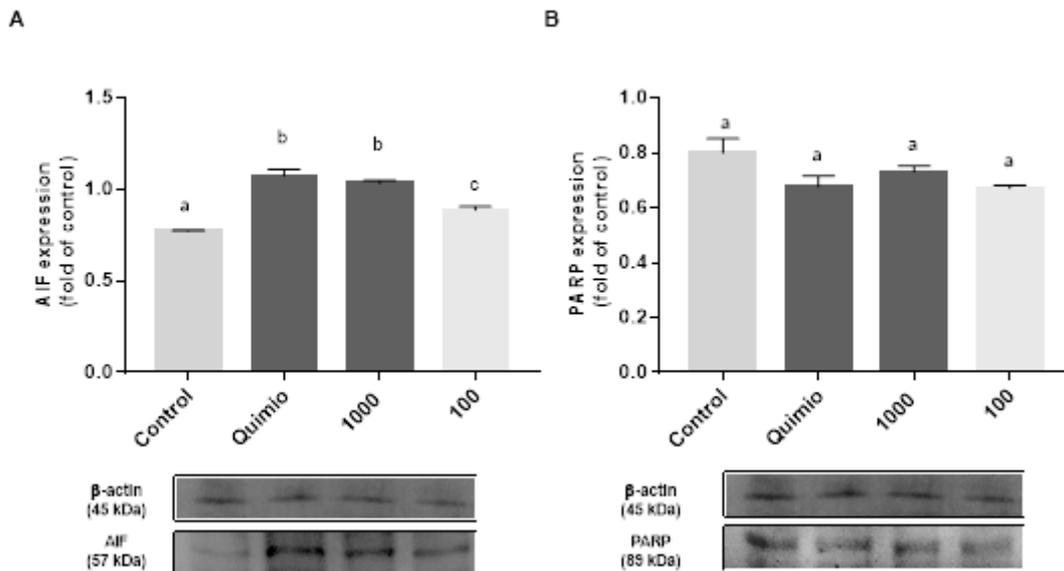


Figura 8. Efeito do cacau na expressão proteica da cascata apoptótica em células HT-29. Avaliação da expressão proteica da AIF (Fator Indutor de Apoptose) (A) e PARP (Poli-(ADP-ribose) polimerase) (B). As células foram tratadas com cacau em concentrações de 100 e 1000 $\mu\text{g/mL}$, assim como pela IC50 do 5-FU (15 $\mu\text{g/mL}$) por 72 h. Os dados do *Western blot* foram quantificados usando β -actina como controle interno. Os níveis de expressão de proteínas são expressos como a intensidade relativa das bandas.

CACAU PROMOVEU GENOTOXICIDADE ATRAVÉS DE DANOS AO DNA DAS CÉLULAS

O ensaio EAsy-GeL permitiu a detecção de diferentes níveis de integridade do DNA entre os tratamentos pelos quais as células HT-29 foram expostas (figura 9A). Os resultados descritos a seguir referem-se a amostras de DNA que foram submetidas tanto a condições neutras quanto alcalinas/neutras. Considerando que se observa uma banda de DNA $\geq 23,13$ kbp sem esfregaço no controle negativo (NC), o tratamento com o quimioterápico (controle positivo - PC) induziu uma quebra excessiva do DNA, o que explica a ausência de sinal evidente de DNA no poço do gel. A concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ de cacau apresentou efeito semelhante ao tratamento com o quimioterápico. No entanto, uma concentração de cacau de 1000 $\mu\text{g/mL}$ resultou em menos quebra do que a concentração de cacau de 100 $\mu\text{g/mL}$ e o controle positivo, pois uma banda de DNA de $\geq 23,13$ kbp pode ser visualizada no poço do gel.

O número de danos no DNA por par de quilobases foi então quantificado (Figura 9B). A falta de um sinal evidente de DNA em algumas amostras dificultou a quantificação das quebras de DNA a partir da dedução do comprimento médio do DNA ('Degradação do DNA', Figura 9B). Em seguida, para comparar com eficiência as diferenças entre os tratamentos observadas na imagem do gel (Figura 9A), foi comparada a intensidade de fluorescência da banda de DNA intacta ($\geq 23,13$ kbp) (Figura 9C). De fato, a intensidade de fluorescência da banda de DNA intacta foi muito baixa no controle positivo e na concentração de cacau de 100 $\mu\text{g/mL}$ para ambos os tratamentos neutro e alcalino/neutro quando esses resultados são comparados ao controle negativo. Além disso, a intensidade de fluorescência da banda de DNA intacta no tratamento com concentração de cacau 1000 $\mu\text{g/mL}$ foi reduzida em 64% e 77% em comparação com o controle negativo nos tratamentos neutro e alcalino/neutro, respectivamente. Como os tratamentos neutro e

alcalino/neutro resultaram em resultados semelhantes, é razoável concluir que as quebras de fita dupla foram o principal tipo de quebra presente nas amostras de DNA.

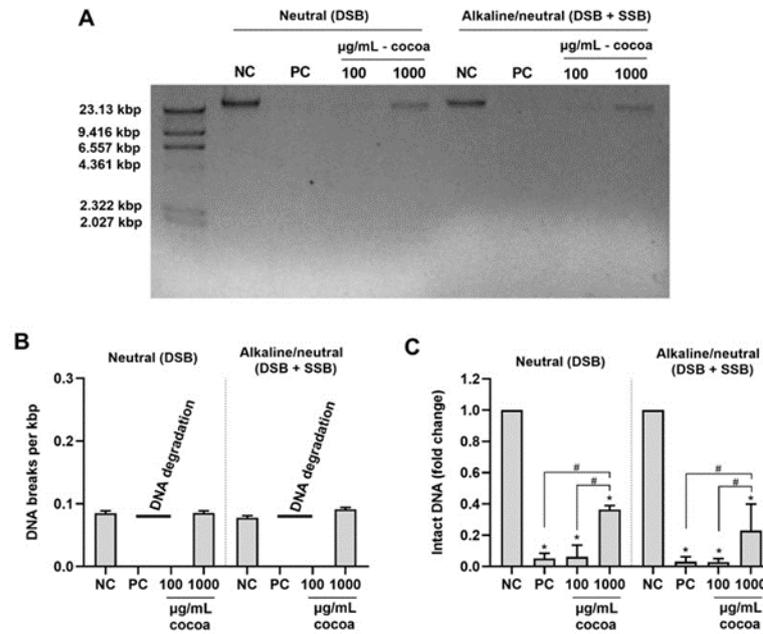


Figura 9. Danos no DNA genômico induzidos pelo cacau em células HT-29. (A) Imagem do gel. (B) Número de quebras de DNA por kbp. (C) Intensidade de fluorescência da banda de DNA intacta ($\geq 23,13$ kbp) em relação a NC. NC: controle negativo. PC: controle positivo. DSB: quebra de fita dupla. SSB: quebra de fita simples. Kbp: par de quilobases. *: Estatisticamente significativo ($p < 0,05$) em relação ao NC. #: estatisticamente significativo ($p < 0,05$) em relação a outros tratamentos que não NC.

A SOLUÇÃO DO CACAU MODULOU A HIDRÓLISE DE NUCLEOTÍDEOS

As células HT-29 tratadas com cacau na concentração de $100 \mu\text{g/mL}$ apresentaram alta atividade de NTPDase quando o ATP (Figura 10A) foi usado como substrato. No entanto, as células expostas ao 5-FU e ao cacau na maior concentração ($1000 \mu\text{g/mL}$) exibiram uma redução na hidrólise de ATP. Quando o ADP foi utilizado como substrato, houve um aumento da hidrólise dessa molécula pelo 5-FU e pelo cacau na concentração de $1000 \mu\text{g/mL}$, já o cacau na concentração de $100 \mu\text{g/mL}$ não causou alterações significativas (Figura 10B). Já quando o AMP foi adicionado como substrato, o 5-FU e o cacau na concentração de $1000 \mu\text{g/mL}$ geraram uma redução na hidrólise dessa molécula e o cacau na concentração de $100 \mu\text{g/mL}$ não modulou esse parâmetro (Figura 10C).

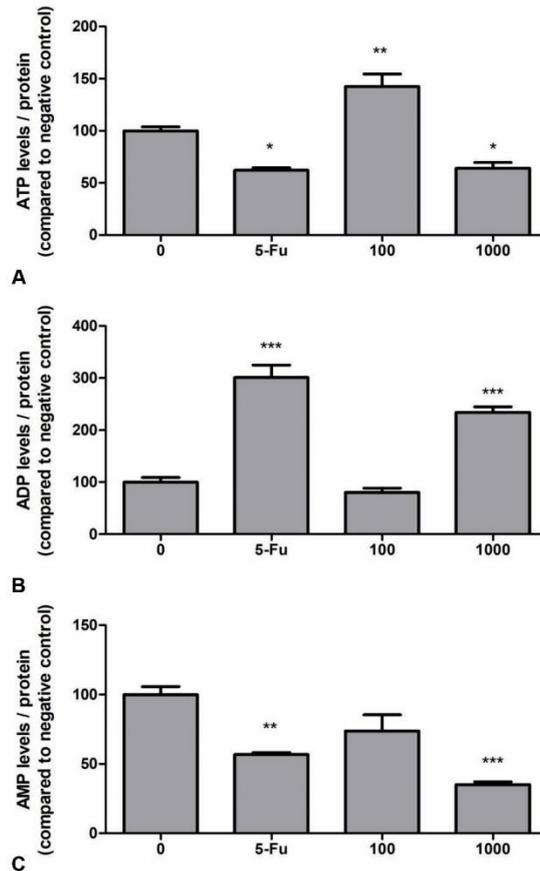


Figura 10. O efeito do cacau sobre a hidrólise de nucleotídeo. (A) hidrólise de ATP; (B) hidrólise de ADP; (C) hidrólise de AMP. As células HT-29 foram tratadas com cacau em concentrações de 100 e 1000 µg/mL, assim como pela IC50 do 5-FU (15 µg/mL) por 72 h. Os resultados foram comparados com a porcentagem do controle negativo (somente células e meio). N = 3, * (p < 0,005), ** (p < 0,001), *** (p < 0,0001).

DISCUSSÃO

O conjunto de resultados encontrados nesse estudo sugeriu que o cacau apresentou ação antiproliferativa em células HT-29 em todas as concentrações testadas. Além disso, o cacau não interferiu na ação do 5-FU, já que não alterou os níveis de proliferação celular. O mecanismo anticarcinogênico do cacau pode ser explicado por meio da modulação de muitos *hallmarks* e características facilitadoras do câncer, como, por exemplo, destacam-se: sustentação da sinalização proliferativa; resistência à morte celular; imortalidade replicativa; desregulação da energia celular e do metabolismo; instabilidade do genoma e consequente mutação e processo inflamatório promotora de tumores. Nesse cenário, foi possível observar um aumento na produção do estresse oxidativo, gerado pelo acréscimo dos níveis de DCF, superóxido, em algumas concentrações testadas. Nas concentrações estipuladas para a análise de demais mecanismos causais, 100 e 1000 µg/mL, os resultados encontrados elucidaram algumas vias dos *hallmarks* do câncer que o cacau modulou com vistas a exercer o efeito anticarcinogênico. O cacau apresentou ação antiproliferativa nas células HT-29 via inibição da formação de colônias, ativação da apoptose e necrose, confirmada pelo aumento da expressão da proteína envolvida com a apoptose (AIF), bloqueio do ciclo celular, indução de genotoxicidade e modulação do metabolismo energético da célula pela regulação dos níveis de hidrólise de nucleotídeos.

No presente estudo os resultados encontrados elucidaram muitos mecanismos de ação anticarcinogênico do cacau pela a modulação da via da AIF. A AIF, quando ativada por um estímulo apoptótico, como, por exemplo, pelo estresse oxidativo, possui a função de fragmentar o DNA ao se dirigir para o núcleo da célula (CREGAN; DAWSON; SLACK, 2004). O aumento do estresse oxidativo passa a agir como um estímulo para a liberação da AIF pela mitocôndria. Quando esse estímulo é forte, o ATP estimula os receptores ligados a proteína G afim de elevar os níveis do CA^{2+} intracelular, exigindo um maior gasto energético da célula, fornecido por uma maior hidrólise de nucleotídeos. Segundo Norberg e colaboradores (2008), o aumento prolongado do CA^{2+} intracelular é necessário para que a proteína AIF seja liberada da mitocôndria e, conseqüentemente, leve a morte celular. Esse fato explica a razão das células tratadas como o cacau apresentarem maior expressão da AIF, seguido de aumento da hidrólise do ATP e ADP, degradação do DNA e conseqüentemente apoptose (Figura 11).

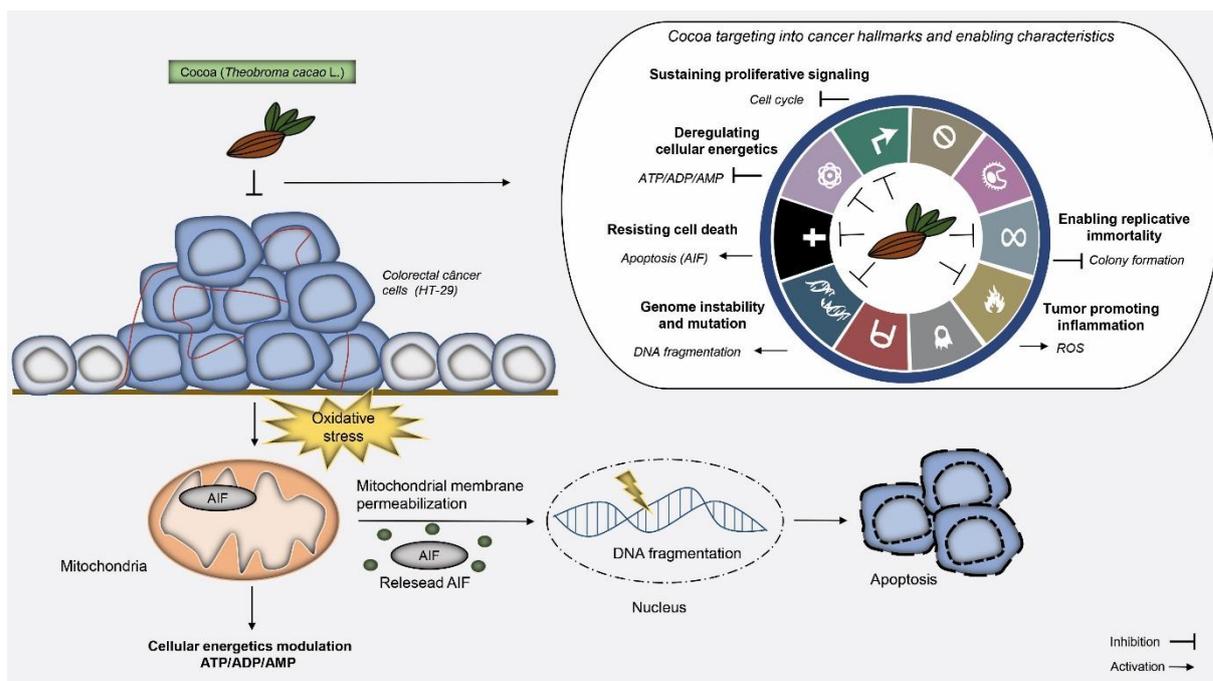


Figura 11. Representação esquemática dos resultados encontrados no presente estudo. O cacau apresentou efeito citotóxico nas células de câncer colorretal (HT-29) testadas, reduzindo a viabilidade e proliferação celular e aumentando o estresse oxidativo. Essas descobertas podem ser associadas ao direcionamento do cacau para algumas características do câncer e características facilitadoras, como a modulação da sustentação da sinalização proliferativa; resistência à morte celular; imortalidade replicativa; desregulação da energia celular e do metabolismo; instabilidade do genoma e conseqüente mutação e inflamação promotora de tumores. Os resultados encontrados elucidaram muitos mecanismos de ação anticarcinogênico do cacau via a modulação da AIF. As setas indicam aumento da expressão ou ativação. Barras T indicam inibição ou atividade reduzida.

Corroborando com os achados encontrados no presente estudo, uma investigação prévia usando o chá de *Camellia ptilophylla*, indicou efeito anticarcinogênico em células de câncer de próstata (PCa PC-3). As células foram expostas ao extrato do chá de cacau branco, por um período de 72h, onde obtiveram resultados satisfatórios, ocorrendo a inibição da proliferação celular, apoptose associada ao ponto de checagem G2 (SONG *et al.*, 2009). No presente estudo, o cacau também ativou a apoptose, porém agiu bloqueando a fase G1 do ciclo da célula. Ratificando esses achados o estudo de Bauer e colaboradores (2016) relatou que grãos de cacau submetidos a diferentes condições de processamento

apresentam citotoxicidade contra células de câncer de pulmão humano (A549) por diminuir a proliferação celular via estímulo à apoptose e parada do ciclo celular. Os resultados sugeriram que o extrato de cacau promoveu parada na fase G1 e aumentou o número de células apoptóticas quando comparado ao controle negativo.

Ainda, Baharum e colaboradores (2014) analisaram através do ensaio MTT em células de câncer de mama (MCF-7), a atividade antiproliferativa dos extratos de distintas partes de plantas do cacau, conforme os resultados do ensaio, a parte que mais apresentou atividade antiproliferativa foi o extrato das folhas, mas em nenhum momento do estudo teve danificação das células normais (BAHARUM *et al.*, 2014).

Em um estudo mais recente, também de Baharum e colaboradores (2016), foram avaliadas a atividade citotóxica do cacau em células cancerígenas de diferentes linhagens, HeLa de câncer cervical, MCF-7 e MDA-MB-231 de câncer de mama, A549 de câncer de pulmão, HepG2 de câncer de fígado, HT-29 de câncer colorretal, e de fígado humano normal WRL-68. A célula que apresentou menor viabilidade celular foi a linhagem de câncer de mama MCF-7, sendo que todas, sem distinção foram expostas a diversos extratos de cacau. Sobretudo, expõe-se que o cacau e suas moléculas bioativas estão associados à atividade anticarcinogênica, avaliadas através do ensaio do MTT (AKIM; HAMID; ROSMIN, 2016).

O chocolate é um produto processado a partir do cacau, que é rico em flavonoides, antioxidantes e bioativos que tem sido associado a saúde, e está presente em muitos alimentos. Os flavonoides possuem atividades antioxidantes, anti-inflamatórias e anticancerígenas através de diferentes vias, induzindo apoptose em diferentes tipos de cânceres, e inibindo a proliferação celular. No estudo desenvolvido por Ebuehi e colaboradores (2019), avaliaram a redução da atividade mitótica do extrato hidroalcolico da semente de cacau, onde indicaram influência significativa na divisão celular, revelando que o extrato pode ter propriedade anticarcinogênese, encontrados no cacau e em outros alimentos ricos em polifenóis.

O extrato de cacau e os flavonoides já demonstraram isoladamente em estudos *in vitro* propriedades anti-inflamatórias, dentre essas atividades destaca-se a ação dos compostos flavonoides como a (-)-epicatequina e as procianidinas por terem também efeitos antiproliferativos. Vários flavonoides foram relatados por inibir a proteína envolvida na resistência ao câncer de mama (BCRP) codificada pelo *ABCG2* gene (DE FEO *et al.*, 2020; PEREZ-VIZCAINO; FRAGA, 2018).

As atividades antioxidante, anti-inflamatórias e anticancerígenas dos flavonoides acontecem por meio de diversas vias. Os flavonoides do cacau podem impedir a atividade do NF-KB que é um fator de transcrição envolvido no controle da expressão de diversos genes ligados à resposta inflamatória, o excesso de EROs intracelular no estresse oxidativo também ativa esse fator de transcrição, ou seja, além de impedir a ativação desses fatores na sequência também auxilia na transcrição de citocinas por diminuição dos EROs intracelulares (ENGLER; ENGLER, 2006; HAZAFA *et al.*, 2020).

Os ingredientes fenólicos do cacau possuem uma excelente ação antioxidante, levando em consideração os principais mecanismos da cancinogênese estão relacionados à produção e EROs, sendo que a ingestão de alimentos rico em antioxidantes pode reduzir esses níveis, amortecendo o surgimento de doenças relacionadas ao estresse oxidativo. Em um estudo *in vitro* foi avaliado grãos de cacau processado de diferentes formas na viabilidade celular em células de câncer de pulmão humano (A549), através do ensaio de MTT observou-se uma diminuição da viabilidade celular promoveram um aumento nas células apoptóticas, sugere-se que os grãos de cacau apresentam um efeito protetor contra o câncer de pulmão (BAUER *et al.*, 2016).

Corroborando com a presente investigação, no estudo *in vitro* de Gao e colaboradores (2020) realizado em células de câncer de cólon humano (HCT 116) compararam os efeitos antiproliferativos e pró-apoptóticos do extrato aquoso do chá de cacau, seu alcalóide principal foi a teobromina e o chá de yunnan daye (*Camellia Sinensis*), seu alcalóide principal foi a cafeína. Os resultados apontaram que o chá de cacau mostrou ação antiproliferativa e indução de apoptose, maior quando comparado os resultados do chá de *Camellia Sinensis*. Além do estudo *in vitro* os pesquisadores realizaram testes *in vivo* em camundongos machos com cinco semanas de idade. Os animais receberam aplicações via subcutânea no flanco de células HCT 116, assim que os camundongos desenvolveram tumores com diâmetros de 5mm foram divididos em grupos, onde diariamente eram submetidos à uma ingesta via intragástrica, 80 mg/ Kg água como controle, 160 mg/Kl de chá de cacau como grupos de tratamento, 20 mg/kg de 5-FU como controle positivo. Os resultados foram comparados grupo controle e tratamento sendo que o tratamento reduziu os volumes de tumores durante 4 semanas de tratamento, já no tratamento e controle positivo o peso do tumor foi reduzido em 45,12% e 51,22% respectivamente, indicativas apontam que o chá de cacau é tão eficaz quanto o medicamento, e que poderiam induzir necrose (GAO *et al.*, 2020).

Ademais, outro ponto importante que deve ser destacado é a problemática envolvida com o tratamento quimioterápico, como, por exemplo, os efeitos adversos e a resistência tumoral (BLONDY *et al.*, 2020; SETHY; KUNDU, 2021). Devido ao fato da quimioterapia gerar muitos efeitos colaterais, a busca por novos agentes adjuvantes que apresentem significativa ação anticarcinogênica seletiva e com um importante perfil de segurança em células saudáveis, é extremamente necessário. Nesse sentido, uma investigação prévia, realizada no mesmo grupo de pesquisa do presente estudo, analisou a ação citotóxica do cacau em células de melanoma (A-375 e B16-F10). Nesse estudo os resultados indicaram que o cacau apresentou ação citotóxica seletiva nas células de melanoma, porém não afetou as células de linhagem humana de fibroblastos (HFF-1) nas mesmas concentrações utilizadas no presente estudo (MELLO *et al.*, 2022). Além disso, esse estudo reportou que o cacau exibiu ação anticarcinogênica em célula de melanoma por meio do aumento do estresse oxidativo e potencializou a ação do quimioterápico, paclitaxel. Apesar dos resultados encontrados no presente estudo também terem indicado ação anticarcinogênica via aumento na produção de estresse oxidativo, o cacau não foi capaz de potencializar a ação do quimioterápico 5-FU.

Portanto, acredita-se que pelo fato de o cacau apresentar moléculas bioativas em sua matriz química com importantes respostas em células cancerígenas, sugere-se que o mesmo desempenhe ação citotóxica em células de câncer colorretal, apresentando assim um notável potencial para ser utilizado como um agente adjuvante para o desenvolvimento de novas terapias contra o câncer de colorretal, apresentando um perfil seguro e seletivo para células cancerígenas.

CONCLUSÃO

Conclui-se deste estudo que o cacau possui efeito antiproliferativo por meio da modulação de muitos *hallmarks* do câncer, apresentando uma importante ação anticarcinogênica em células HT-29, podendo ser um potente e inovador agente adjuvante. Torna-se indispensável o seguimento da pesquisa, para aprofundar o estudo dos biomarcadores com relação ao cacau, de forma individualizada. Podendo ser personalizados tratamentos para pacientes com recidivas e com prognósticos desfavoráveis, apresentando efeitos colaterais reduzidos ou nulos.

REFERÊNCIAS

- AKIM, Abdah; HAMID, Roslida Abd; ROSMIN, Kasran. BIOACTIVITY-GUIDED FRACTIONATION OF POTENT ANTI-CANCER PROPERTIES FROM NON-EDIBLE TISSUES OF *Theobroma cacao*. **Malaysian Cocoa Journal**, [s. l.], v. 9, n. August 2017, p. 170–181, 2016.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer A-Z**. Inglês, Estados Unidos, 2020. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/>
- AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER. **Chapter 20 - Colon and Rectum**. In: *AJCC Cancer Staging Manual*. 8th ed. New York, NY: Springer; 2017.
- BAHARUM, Zainal *et al.* In vitro antioxidant and antiproliferative activities of methanolic plant part extracts of *Theobroma cacao*. **Molecules**, [s. l.], v. 19, n. 11, p. 18317–18331, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules191118317>
- BAHARUM, Zainal *et al.* *Theobroma cacao*: Review of the Extraction, Isolation, and Bioassay of Its Potential Anti-cancer Compounds. **Tropical life sciences research**, vol. 27,1, 21-42, 2016.
- BAUER, Deborah *et al.* Antioxidant Activity and Cytotoxicity Effect of Cocoa Beans Subjected to Different Processing Conditions in Human Lung Carcinoma Cells. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [s. l.], v. 2016, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2016/7428515>
- BLONDY, Sabrina *et al.* 5-Fluorouracil resistance mechanisms in colorectal cancer: From classical pathways to promising processes. **Cancer science**, 111(9), 3142–3154, 2020.
- BRADFORD MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein dye binding. **Anal Biochem** 72:248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Branco Cdos S, *et al.* Mitochondria and redox homeostasis as chemotherapeutic targets of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze in human larynx HEP-2 cancer cells. **Chem Biol Interact**. 2015 Apr 25;231:108-18. doi: 10.1016/j.cbi.2015.03.005. Epub 2015 Mar 11. PMID: 25770932.
- BRANDÃO, Hugo N. *et al.* Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v. 33, n. 6, pp. 1359-1369, 2010.
- BRASIL. **Portaria n ° 958**, de 26 de setembro de 2014. Aprova as Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas do Câncer de colo e Reto. Ministério da Saúde: Secretaria de Atenção à Saúde. 2014. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2014/novembro/24/MINUTA-Portaria-SAS-DDT-Colon-e-Reto-23-09-2014-corrigido-em-24-11-2014.pdf>
- BRENNER, Hermann; KLOOR, Matthias; POX, Christian Peter. Colorectal cancer. **The Lancet**, Volume 383, Issue 9927, Pages 1490-1502, 2014.

CREGAN, S., DAWSON, V. & SLACK, R. Papel do AIF na morte celular dependente e independente de caspase. **Oncogene** 23 , 2785–2796 (2004).
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207517>

CUBILLOS-ROJAS M, AMAIR-PINEDO F, PEIR O-JORD an R, BARTRONS R, VENTURA F, *et al.* The E3 ubiquitin protein ligase HERC2 modulates the activity of tumor protein p53 by regulating its oligomerization. **J Biol Chem** 289, 14782–14795, 2014.

DAS, Plabon Kumar; ISLAM, Farhadul; LAM, Alfred K. The roles of cancer stem cells and therapy resistance in colorectal carcinoma. **Cells**, 9.6: 1392, 2020.

DE FEO, Martina *et al.* Anti-Inflammatory and Anti-Nociceptive Effects of Cocoa: A Review on Future Perspectives in Treatment of Pain. **Pain and Therapy**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 231–240, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40122-020-00165-5>

EBUEHI, Osaretin A.T. *et al.* Hydro-ethanol seed extract of Theobroma cacao exhibits antioxidant activities and potential anticancer property. **Journal of Food Biochemistry**, [s. l.], v. 43, n. 4, p. 1–10, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jfbc.12767>

ENGLER, Mary B.; ENGLER, Marguerite M. The emerging role of flavonoid-rich cocoa and chocolate in cardiovascular health and disease. **Nutrition Reviews**, [s. l.], v. 64, n. 3, p. 109–118, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1301/nr.2006.mar.109-118>

ESPOSTI, M. Degli. The roles of Bid. **Apoptosis**, v. 7, n. 5, p. 433–440, 2002.

GAO, Xiong *et al.* Cocoa tea (*Camellia ptilophylla*) induces mitochondria-dependent apoptosis in HCT116 cells via ROS generation and PI3K/Akt signaling pathway. **Food Research International**, Volume 129, 2020, 108854, ISSN 0963-9969,
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108854>.

HA, Tran Thi Ngoc *et al.* Elevated levels of cell-free circulating DNA in patients with acute dengue virus infection. **PLoS ONE**, v. 6, n. 10, p. 1–7, 2011.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, 144.5: 646-674, 2011.

HASSANPOUR, Seyed Hossein; DEHGHANI, Mohammadamin. Review of cancer from perspective of molecular. **Journal of Cancer Research and Practice**, 4.4: 127-129, 2017.

HAZAFI, Abu *et al.* The Role of Polyphenol (Flavonoids) Compounds in the Treatment of Cancer Cells. **Nutrition and Cancer**, [s. l.], v. 72, n. 3, p. 386–397, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/01635581.2019.1637006>

HEYMANN D, REDDINGTON M, KREUTZBERG GW (1984) Subcellular localization of 5'-nucleotidase in rat brain. **J Neurochem** 43:971–978.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1984.tb12832.x>

HONG, Mee Young *et al.* Effects of dark chocolate on azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci. **Nutrition and Cancer**, v. 65, n. 5, p. 677–685, 2013.

JALIL, A.; ISMAIL, A. Polyphenols in cocoa and cocoa products: is there a link between antioxidant properties and health? **Molecules**, v. 13, n. 9, p. 2190-2219, 2008.

KANG, Ki Sung *et al.* Docosahexaenoic acid induces apoptosis in MCF-7 cells In Vitro and In Vivo via reactive oxygen species formation and caspase 8 activation. **PLoS ONE**, v. 5, n. 4, 2010.

KHAN, N.; NICOD, N. Biomarcadores do consumo de cacau. Em: **Chocolate e Saúde** . Springer, Milano, p. 33-40, 2012.

LANZETTA PA, ALVAREZ LJ, REINACH PS, CANDIA AO (1979) An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate. **Anal Biochem** 15:95–97. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90115-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90115-5)

LECOEUR H, de OLIVEIRA-PINTO LM, GOUGEON ML. Multiparametric flow cytometric analysis of biochemical and functional events associated with apoptosis and oncosis using the 7-aminoactinomycin D assay. **J Immunol Methods**. 2002 Jul 1;265(1-2):81-96. doi: 10.1016/s0022-1759(02)00072-8. PMID: 12072180.

LEE, K. W.; KIM, Y.; LEE, H.; LEE, C. Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 51, n. 25, p. 7292-7295, 2003.

LONDERO, J. E. L., SCHAVINSKI, C. R., SILVA, F. D., PICCOLI, B. C., SCHUCH, A. P. Development of a rapid electrophoretic assay for genomic DNA damage quantification. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 210 (2021) 111859. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111859>

LONGLEY, Daniel B.; HARKIN, D. Paul; JOHNSTON, Patrick G. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. **Nature reviews cancer**, 3.5: 330-338, 2003.

MALEKI, S.; CRESPO, J.; CABANILLAS, B.. Efeitos anti inflamatórios dos flavonóides. **Química de Alimentos** , p. 125124, 2019.

MARTIN, M.A.; GOYA, L.; RAMOS, S. Potential for preventive effects of cocoa and cocoa polyphenols in cancer. **Food and Chemical Toxicology**, v. 56, p. 336-351, 2013.

MARTINS, T.; PALOMINO, O.; ÁLVAREZ-CILLEROS, D.; MARTÍN, M.A.; RAMOS, S.; GOYA, L. Cocoa Flavanols Protect Human Endothelial Cells from Oxidative Stress. **Plant Foods for Human Nutrition**, p. 1-8, 2020.

MELLO, Gabriela Haas de *et al.* Cocoa presents cytotoxicity against melanoma cancer cell lines (A-375 and B16-F10) and improves chemotherapy activity by increasing oxidative stress. *Journal of food biochemistry*, e14512. 4 Nov. 2022, doi:10.1111/jfbc.14512

MORABITO C. *et al.* Modulation of redox status and calcium handling by extremely low frequency electromagnetic fields in C2C12 muscle cells: A real-time, single-cell approach. **Free Radical Biology & Medicine** 48 (2010) 579–589.

Morgan E. *et al.* Global burden of colorectal cancer in 2020 and 2040: incidence and mortality estimates from GLOBOCAN. **Gut**, September 2022. doi: 10.1136/gutjnl-2022-327736

NOH, Hyung Jun *et al.* Anti-inflammatory activity of a new cyclic peptide, citrusin XI, isolated from the fruits of Citrus unshiu. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 163, n. 2, p. 106–112, 2015.

NORBERG, E. *et al.* Um aumento no Ca²⁺ intracelular é necessário para a ativação da calpaína mitocondrial para liberar AIF durante a morte celular. **Cell Death Differ** 15 , 1857–1864 (2008). <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.123>

OTHMAN, A.; ISMAIL, A.; GHANI, A.; ADENAN, I. Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans. **Food Chemistry**, v. 100, n. 4, p. 1523/-530, 2007.

PÉREZ-CANO, Francisco J. *et al.* The effects of cocoa on the immune system. **Frontiers in Pharmacology**, v. 4, n. June, p. 1–12, 2013

PEREZ-VIZCAINO, Francisco; FRAGA, Cesar G. Research trends in flavonoids and health. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [s. l.], v. 646, p. 107–112, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.abb.2018.03.022>

PICK, Anne *et al.* Structure–activity relationships of flavonoids as inhibitors of breast cancer resistance protein (BCRP). **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 6, p. 2000–2012, 2011.

PIRES, Maria Eugênia de Paula *et al.* Rastreamento do Câncer Colorretal: Revisão de literatura. **Brazilian Journal of Health Review**, Curitiba, v.4, n.2, p. 6866-6881 mar./apr. 2021.

ROGGIA, I.; DALCIN, A.J.; DE SOUZA, D.; MACHADO, A.; DE SOUZA, D.; DA CRUZ, I.; RIBEIRO, E.; OURIQUE, A.; GOMES, P. Guarana: Stability-Indicating RP-HPLC method and safety profile using microglial cells. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 94, p. 103629, 2020.

SETHY, Chinmayee; KUNDU, Chanakya. 5-Fluorouracil (5-FU) resistance and the new strategy to enhance the sensitivity against cancer: Implication of DNA repair inhibition. **Biomedicine & pharmacotherapy**, 137, 111285, 2021.

SHIN, Hye Ji; HWANG, Kyung-A; CHOI, Kyung Chul. Antitumor Effect of Various Phytochemicals on Diverse Types of Thyroid Cancers. **Nutrients**, 11, 125, 2019.

SONG X, SHI X, LI Y, PENG L, LI C, YANG X, YE C, LI J, HE Y, HUANG H, MIAO A, ZHAO C, WU J, and LIN C. Studies of cocoa tea, a wild tea tree containing theobromine. **Frontiers of Biology in China** 4:460–468 (2009).

VAUZOUR, David *et al.* Polyphenols and human health: Prevention of disease and mechanisms of action. **Nutrients**, v. 2, n. 11, p. 1106–1131, 2010.

WILLIAM-FALTAOS, S.; ROUILLARD, D.; LECHAT, P.; BASTIAN, G. Cell cycle arrest and apoptosis induced by oxaliplatin (L-OHP) on four human cancer cell lines. **Anticancer Res.**, 2006, 26, 2093-1099.

YAÑES, Osvaldo *et al.* Theobroma cacao L. compounds: Theoretical study and molecular modeling as inhibitors of main SARS-CoV-2 protease. **Biomed Pharmacother**, Aug;140:111764, 2021.

ZHENG, Hua-Chuan. The molecular mechanisms of chemoresistance in cancers. **Oncotarget**, 8.35: 59950, 2017.

ZHU, Q.Y.; HOLT, R.R.; LAZARUS, S.A.; OROZCO, T.J.; KEEN, C.L. Inhibitory effects of cocoa flavanols and procyanidin oligomers on free radical-induced erythrocyte hemolysis. **Experimental Biology and Medicine**. 227(5): 321-329, 2013.