

## INVESTIGAÇÃO DA AÇÃO ANTICARCINOGENICA DA TEOBROMINA EM CÉLULAS DE CÂNCER DE PELE MELANOMA (B16-F10)

Alice Kluge Borba<sup>1</sup>; Francine C. Cadoná<sup>2</sup>

### RESUMO

O câncer de pele é a neoplasia mais recorrente no Brasil e é apresentada em diferentes linhagens, sendo frequente duas: o câncer de pele não melanoma (CPNM) e o tipo melanoma (MC). O tipo melanoma é caracterizado como consequência de mutações e da proliferação de melanócitos - células que produzem a melanina. De modo geral, fatores genéticos e raciais estão associados ao desenvolvimento dessa neoplasia, todavia, em grande maioria, é devido a alta exposição à radiação ultravioleta (UV) em conjunto à falta de uso de protetores solares eficazes contra os três tipos de radiação (UVA, UVB e UVC). Dessa maneira, a exposição à UV pode causar danos ao DNA e estimular uma produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs), conduzindo ao estresse oxidativo, e conseqüentemente, levando ao dano celular e o desenvolvimento do câncer. O câncer de pele melanoma é curável nas fases iniciais e necessita de tratamentos como a quimioterapia, entretanto pode não apresentar o resultado desejado e ser bastante agressivo ao paciente. Tendo isso em vista, produtos naturais sempre foram foco de estudos para terapias adjuvantes obtendo menores efeitos colaterais e resultados semelhantes ao de outros tratamentos. Nesse cenário, encontra-se a teobromina, um alcaloide da mesma família da cafeína, encontrado em altas concentrações no cacau, a qual apresenta inúmeras propriedades medicinais, como anticarcinogênica. Diante disso, o objetivo da pesquisa foi investigar a ação anticarcinogênica da teobromina em células de câncer de pele melanoma, B16-F10. Para a realização da pesquisa células B16-F10, em uma concentração de  $2 \times 10^4$  e  $5 \times 10^4$  células/poço, foram plaqueadas e incubadas na estufa durante 24 horas para que ocorresse a adesão à placa de cultivo. Em seguida, as células foram expostas a diferentes concentrações de teobromina e de DMSO, pois a molécula foi diluída neste veículo (0,2 a 10  $\mu\text{g/mL}$ ), durante 24 e 72 horas. Posteriormente, realizou-se o ensaio de MTT e PicoGreen, para a análise das taxas de proliferação celular. Além disso, parâmetros do metabolismo oxidativo foram analisados. Os resultados encontrados no Ensaio do MTT, sugeriram que a teobromina diminui os níveis de proliferação celular a partir da concentração de 0,6  $\mu\text{g/mL}$ , sendo mais significativo nas maiores concentrações. Ademais, os resultados de 72h também sugeriram um aumento da produção de EROs nas concentrações mais elevadas. Entretanto, não houve mudanças significativas nos testes de 24h. Portanto, a pesquisa obteve resultados positivos em relação a atividade antiproliferativa em células B16-F10 e possui potencial para ser um potente agente anticarcinogênico, como uma possível terapia combinada para tratamento do câncer de pele.

<sup>1</sup>Aluna de Biomedicina da Universidade Franciscana, [alice.kluge@ufn.edu.br](mailto:alice.kluge@ufn.edu.br).

<sup>2</sup>Professora Mestre da Universidade Franciscana, [f.cadona@ufn.edu.br](mailto:f.cadona@ufn.edu.br).

**Palavras-chave:** *Theobroma cacao* L.; produtos naturais; B16-F10; estudo *in vitro*; efeito oxidativo.

## ABSTRACT

Skin cancer is the most recurrent neoplasm in Brazil and is presented in different lineages, with two being common: non-melanoma skin cancer (NMSC) and melanoma type (MC). The melanoma type is characterized as a consequence of mutations and the proliferation of melanocytes - cells that produce melanin. In general, genetic and racial factors are associated with the development of this neoplasm, however, in the vast majority, it is due to high exposure to ultraviolet radiation (UV) together with the lack of use of sunscreens effective against the three types of radiation (UVA, UVB and UVC). Therefore, exposure to UV can cause damage to DNA and stimulate excessive production of reactive oxygen species (ROS), leading to oxidative stress, and consequently, leading to cellular damage and the development of cancer. Melanoma skin cancer is curable in the early stages and requires treatments such as chemotherapy, however it may not produce the desired result and be quite aggressive to the patient. With this in mind, natural products have always been the focus of studies for adjuvant therapies, obtaining fewer side effects and results similar to other treatments. In this scenario, there is theobromine, an alkaloid from the same family as caffeine, found in high concentrations in cocoa, which has numerous medicinal properties, such as anticarcinogenic properties. Therefore, the objective of the research was to investigate the anticarcinogenic action of theobromine on melanoma skin cancer cells, B16-F10. To carry out the research, B16-F10 cells, at a concentration of  $2 \times 10^4$  and  $5 \times 10^4$  cells/well, were plated and incubated in the oven for 24 hours to allow adhesion to the culture plate to occur. Next, the cells were exposed to different concentrations of theobromine and DMSO, as the molecule was diluted in this vehicle (0.2 to 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), for 24 and 72 hours. Subsequently, the MTT and PicoGreen assay was carried out to analyze cell proliferation rates. Furthermore, parameters of oxidative metabolism were analyzed. The results found in the MTT Assay suggested that theobromine decreases the levels of cell proliferation from a concentration of 0.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , being more significant at higher concentrations. Furthermore, the 72h results also suggested an increase in ROS production at higher concentrations. However, there were no significant changes in the 24-hour tests. Therefore, the research obtained positive results regarding antiproliferative activity in B16-F10 cells and has the potential to be a potent anticarcinogenic agent, as a possible combined therapy for the treatment of skin cancer.

**Keywords:** *Theobroma cacao* L.; natural products; B16-F10; *in vitro* study; oxidative stress.

**Eixo Temático:** Atenção Integral e Promoção à Saúde (AIPS).

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer de pele tipo melanoma (MC) é uma neoplasia grave que é causada por diversos fatores genéticos ou epigenéticos, como a exposição à radiação ultravioleta (UV) em conjunto à falta de uso de protetores solares eficazes contra os três tipos de radiação (UVA, UVB e UVC). Dessa maneira, a exposição à UV pode causar danos ao DNA e estimular uma produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs), conduzindo ao estresse oxidativo, e conseqüentemente, levando ao dano celular e o desenvolvimento do tumor. Então, o melanoma é consequência de mutações e da proliferação de melanócitos (células que produzem a melanina) de forma desordenada e acelerada.

O diagnóstico precoce é fundamental pois somente nas fases iniciais, o câncer pode ser tratado efetivamente. O tratamento não cirúrgico utilizado no Brasil é a quimioterapia feita por via endovenosa sistêmica (na corrente sanguínea atingindo todo corpo) ou regional por perfusão ou infusão (no local onde há as células cancerígenas). Os quimioterápicos mais utilizados são Dacarbazina, Paclitaxel, Cisplatina, Carboplatina e Vinblastina que são bastante agressivos (Instituto Melanoma Brasil). Nesse cenário, torna-se necessário procurar por terapias adjuvantes e com menos efeitos negativos no paciente, visto que apesar de possuir baixa incidência tornou-se relevante aos órgãos de saúde pública devido ao crescente número de pessoas diagnósticas em diversos países e ao nível de letalidade apresentado pelo tumor em fases tardias (LEITE; LOPES, 2021).

Neste contexto, produtos naturais são foco de estudos para serem utilizados no tratamento de muitas doenças. Na atualidade, tem ganhado ênfase à procura de novos medicamentos com bases naturais e menores efeitos colaterais (SHIN; HWANG; CHOI, 2019). Como parcela deste grupo, encontra-se a teobromina, um alcaloide da mesma família da cafeína, encontrado em altas concentrações no cacau, a qual se destaca por apresentar inúmeras propriedades medicinais, como anti-inflamatória, antioxidante e antitumoral. No entanto, a ação dessa molécula frente ao melanoma ainda é desconhecida.

Portanto, o objetivo desta pesquisa é de analisar os níveis de proliferação de células de câncer melanoma, B16-F10, ao serem expostas a diversas concentrações da Teobromina proveniente do cacau *in vitro*.

## 2. METODOLOGIA

### 2.1 CULTURA CELULAR

A linhagem de células B16-F10 foi obtida comercialmente do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). Foi cultivada conforme meio de cultura ideal, *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM). Posteriormente, foi adicionado ao meio DMEM 10% de soro fetal bovino filtrado (SFB), 1% de antibiótico penicilina e 1% de antifúngico anfotericina para proteção contra possíveis bactérias e fungos. As células passaram a ser cultivadas, até obtenção da confluência ideal para a realização dos ensaios.

### 2.2 TRATAMENTOS

Células de melanoma (B16-F10), em uma concentração de  $2 \times 10^4$  e  $5 \times 10^4$  células/poço, foram expostas a diferentes concentrações de teobromina (0.2; 0.6; 2; 6 e 10  $\mu\text{g/mL}$ ), durante 24 e 72 horas, respectivamente. A teobromina foi diluída em DMSO, por isso esse veículo foi testado isolado, para eliminar qualquer tipo de interferência. A concentração máxima de DMSO foi de 1% no poço.

## 2.3 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

### 2.3.1 Ensaio do MTT

Foi realizado o ensaio do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio), conforme metodologia de Kang e colaboradores (2010). Este teste, utiliza sal de tetrazólio, hidrossolúvel e de coloração amarelada que é facilmente agregado por células viáveis que irão reduzir o composto em suas mitocôndrias devido a atividade da enzima succinato desidrogenase. Após ser reduzido, o MTT será convertido em um composto nomeado de formazan, insolúvel em água e de coloração roxo-azulado

e fica armazenado no citoplasma celular e em seguida solubilizado pela adição de DMSO (dimetilsulfóxido) que, por sua vez, será quantificado colorimetricamente por meio da espectrofotometria no comprimento de onda de 560nm, sendo o valor da absorbância proporcional ao número de células viáveis.

### **2.3.2. Ensaio fluorimétrico de quantificação de DNA livre**

Utiliza-se para realização do ensaio fluorimétrico de quantificação de DNA livre o reagente DNA-PicoGreen®, da marca Invitrogen (Life Technologies) que é um corante com fluorescência no qual se liga à pequenas concentrações de DNA fita dupla. Visando determinar a presença de DNA livre ocasionado pela possível ruptura e morte celular, o procedimento ocorre no meio celular (HA et al., 2011). Em uma placa preta de ELISA contendo 96 poços adiciona-se o corante à amostra e deixa-se em incubação durante 5 minutos para posterior leitura da fluorescência no Espectrofluorímetro a 480nm de excitação e 530nm de emissão.

### **2.3.3. Quantificação de Espécies Reativas de Oxigênio**

Utilizando o reagente 2'-7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) com capacidade de atravessar a membrana celular ao ser desacetilado pelas enzimas da mitocôndria e tornar-se 2'-7'- diclorodihidrofluoresceína que irá reagir com EROs, especialmente peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e produzir 2',7'-diclorofluoresceína emitindo fluorescência na verificação da taxa total de EROs de acordo com Esposti (2002). Com base nisso, pode-se determinar a fluorescência no espectrofluorímetro ao se basear nos comprimentos de 488nm de excitação e 525nm de emissão.

### **2.3.4. DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO**

De acordo com a presença de nitrito orgânico na amostra será identificado a produção de óxido nítrico. O nitrito é mensurado para análise em concordância com a formação de uma coloração rosada ao adicionar reagente de Griess à amostra que já

abrange NO<sub>2</sub>. A sulfanilamida presente no reagente tem como papel formar sais de diazônio a partir do nitrito presente na amostra. Ao ocorrer a interação entre o azo-composto (N-1- naftiletilenodiamino-bicloridrato) e sais de diazônio, forma-se a coloração rosa que será quantificada pelo comprimento de onda de 540nm (NOH *et al.*, 2015).

## 2.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Após a obtenção dos resultados, estes foram analisados através do teste de Anova de uma via, e em sequência, *post hoc de Dunnet*, fazendo uso do programa de produção de gráficos estatísticos *Graph Pad Prism 5.0*. Os tratamentos serão retratados como porcentagem do controle (%) e para um resultado ser significativo deverá ser  $p < 0,05$ .

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A teobromina foi capaz de diminuir os níveis de proliferação das células B16-F10 expostas concentrações maiores (0,6 - 10 µg/mL) durante 72 horas de incubação. Essa descoberta pode ser visualizada nas imagens obtidas por microscopia óptica via Ensaio do MTT (Figura 1)

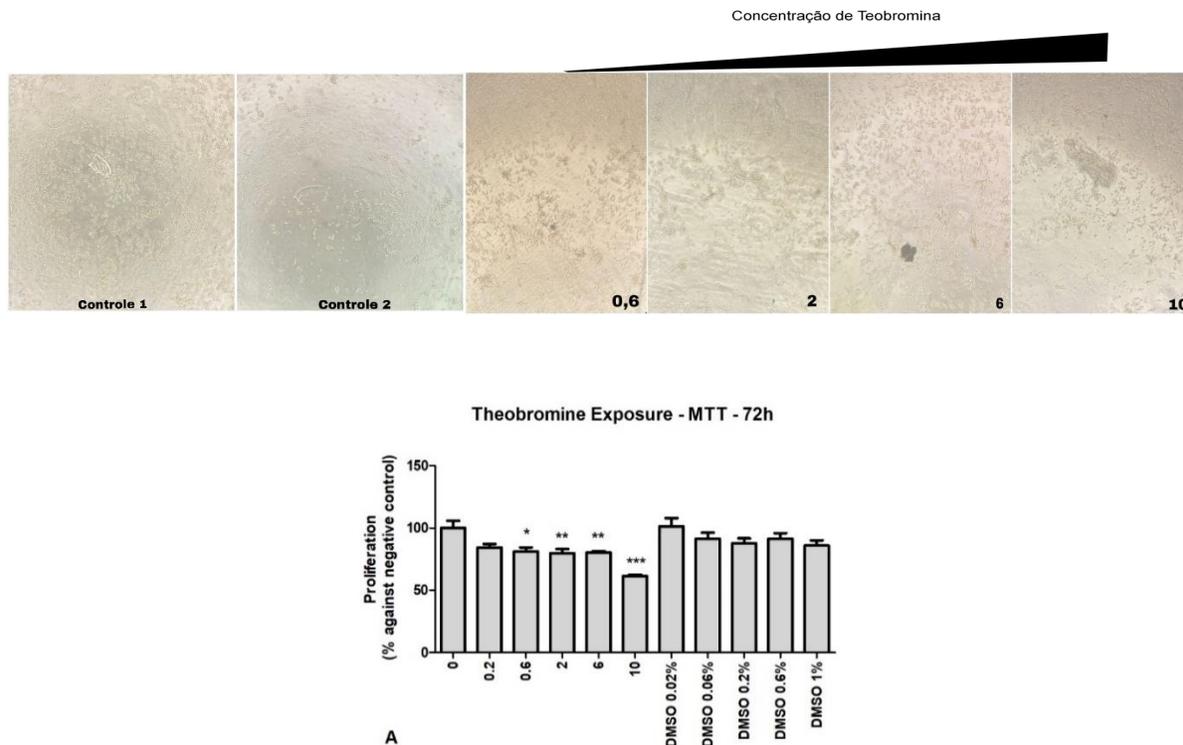


Figura 1. Células B16-F10 expostas a diferentes concentrações da Teobromina (0,2 a 10 µg/mL) por 72 horas. A proliferação celular foi determinada pelo Ensaio do MTT. Os resultados foram comparados com a porcentagem do controle negativo (células e meio apenas).

Os resultados obtidos evidenciam uma ação antiproliferativa *in vitro* de linhagens celulares de melanoma, desta forma, indo ao encontro de estudos realizados por Kozikowski e colaboradores (2003), no qual, foi observado as frações ricas em procianidina preparadas a partir das sementes de *cacau* inibem crescimento *in vitro* em linhagens celulares de câncer de mama humano, pois ao utilizar células MDA-MB-231, puderam concluir que a inibição do crescimento é obtida a partir da parada do ciclo celular em G0/ G1. Entretanto, em 2005, um estudo realizado por Ramljak e colaboradores, puderam observar o efeito citotóxico em células de câncer de mama (MDA MB-231, MDA MB-436, MDA MB-468, SKBR-3 e MCF-7) concluindo que essas são seletivas quanto aos efeitos citotóxicos da procianidina pentamérica, indicando que a inibição da

proliferação celular baseada nesse composto presente no cacau pode estar associada à regulação negativa de várias proteínas reguladoras do ciclo celular ou à desfosforilação específica do local.

A atividade antiproliferativa do cacau (um dos produtos naturais que contém a teobromina em grande quantidade) foi testada em estudos *in vitro* anteriores com extratos metanólicos presentes nas plantas de cacau (folha, casca fermentada e não fermentada, miolo e raiz) em ensaio de MTT com células de câncer de mama (MCF-7) e células normais do fígado (WRL-68), este estudo revelou que existia um maior potencial antiproliferativo contra células cancerígenas, assim como observado na Figura 1 apenas com o extrato da teobromina.

Posteriormente, em 2016, os autores utilizaram de diversas linhagens de câncer e pelo teste de MTT analisaram a atividade citotóxica do cacau e como resultado, a menos viabilidade celular foi encontrada em células do câncer de mama (MCF-7).

Outrossim, os resultados acerca da ação anticancerígena da teobromina também vão ao encontro da pesquisa realizada por Cadoná *et al.* (CADONÁ *et al.*, 2016), na qual, a teobromina apresentou atividade antiproliferativa contra células de câncer colorretal (HT-29) por meio de modulação da expressão gênica em conjunto à via de crescimento – relação entre Bax/Bcl-2 foi regulada positivamente nas células expostas, tendo como consequência uma diminuição da proliferação celular.

Tendo isso em vista, para analisar tais efeitos nesta pesquisa, ensaios foram necessários para obter uma avaliação do mecanismo causal presente por meio da análise do estresse oxidativo em 72h de exposição. A conclusão alcançada foi um aumento da produção de EROs na concentração de 2, 6 e 10 µg/mL (Figura 2C). As células expostas às diferentes concentrações do DMSO não apresentaram alterações significativas (Figura 2B).

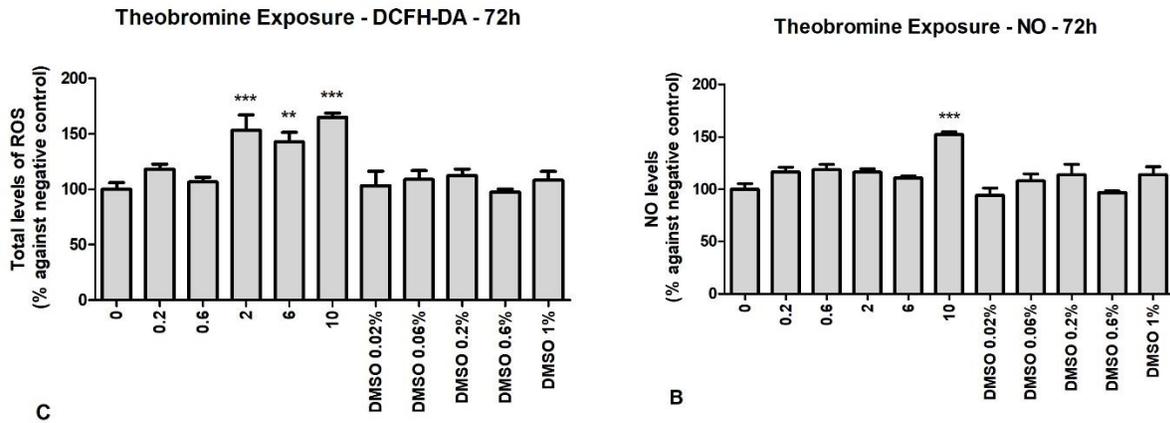


Figura 2. Células B16-F10 expostas às concentrações de teobromina (0,2, 0,6, 2, 6, 10 µg/mL) por 72 horas. Sendo mensurados os níveis de EROs (C) e óxido nítrico (B).

Os gráficos obtidos demonstram uma ação antiproliferativa das células estudadas à medida que se aumenta o estresse oxidativo em conformidade com o estudo realizado por Kozikowski e colaboradores (2003) - foi observado que as frações ricas em procianidina preparadas a partir das sementes de *cacau* inibem crescimento *in vitro* em linhagens celulares de câncer de mama humano (MDA-MB-231).

Os resultados obtidos também vão ao encontro de estudos que apontaram a presença de células anti-inflamatórias no microambiente de células tumorais, sendo responsáveis por prover citocinas e proteases para sobrevivência e progressão cancerígena. O ERO está presente nestas células, e desta maneira, promove a proliferação de células cancerosas e vias de inflamação, viabilizando a angiogênese, metástase e sobrevivência (AGGARWAL, et al. 2019). Por possuírem EROs elevado, são sensíveis a uma geração adicional dessas moléculas, levando à apoptose (PHILION, et al. 2017).

Entretanto, as análises realizadas com as mesmas concentrações em 24 horas não possuíram alterações significativas sobre atividade antiproliferativa da teobromina em células de melanoma (Figura 3).

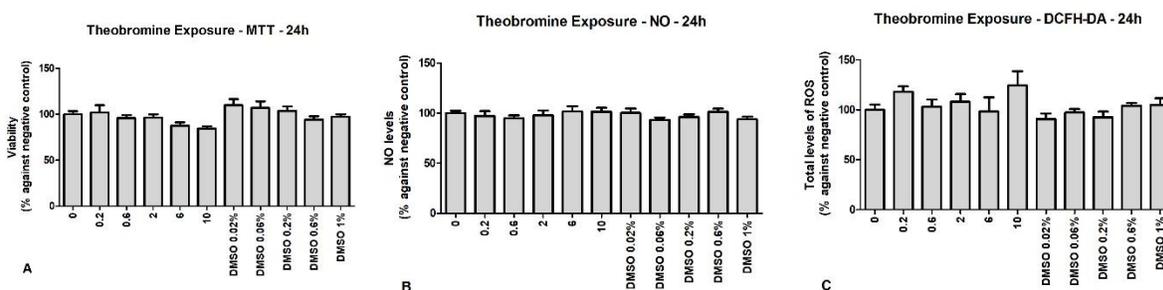


Figura 3. Células B16-F10 expostas às concentrações de teobromina (0,2, 0,6, 2, 6, 10 µg/mL) por 48 horas. Sendo mensurados os níveis de proliferação celular por meio de MTT (A), níveis de óxido nítrico (B) e EROs (C).

## 4. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados neste estudo sugerem que a teobromina apresentou efeito citotóxico para as células B16-F10, diminuindo os níveis de proliferação celular por meio do aumento do estresse oxidativo. Portanto, a teobromina possui potencial para ser um agente anticarcinogênico que poderá ser utilizado em terapias inovadoras contra o melanoma.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente a Universidade Franciscana, por toda jornada oferecida pela bolsa PROBIC assim como à minha orientadora Francine Cadoná por toda atenção dada ao projeto e sua execução.

## REFERÊNCIAS

AGGARWAL, V. *et al.* Role of reactive oxygen species in cancer progression: Molecular mechanisms and recent advancements. **Biomolecules**, v. 9, n. 11, p. 735, 2019.



ALVES, E. A.; GUIMARÃES, A. C. R. **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde.** [s.l.] EPSJV, 2009.

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.

**BCRJ - Banco de Células do Rio de Janeiro.** Disponível em: <<https://bcry.org.br>>. Acesso em: 07 set. 2023.

CADONÁ, F. C. *et al.* Natural products targeting into cancer hallmarks: An update on caffeine, theobromine, and (+)-catechin. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 62, n. 26, p. 7222–7241, 2022.

D'AVILA, C.; MACHADO, A.; CADONÁ, F. Investigação do efeito anticarcinogênico do extrato de cacau (*Theobroma cacao* L.) em linhagem celular de câncer de colorretal (HT-29). **UFN**, 2020.

EFRAIM, P.; BARRETO ALVES, A.; CALIL PEREIRA JARDIM, D. Revisão: Polifenóis em cacau e derivados: teores, fatores de variação e efeitos na saúde. **Brazilian journal of food technology**, v. 14, n. 03, p. 181–201, 2011.

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

FONTAINE, L. S.; BRANDÃO, B. J. F. DIAGNÓSTICO E PREVENÇÃO DE MELANOMA: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA. **BWS Journal**, v. 5, p. 1–10, 6 set. 2022.

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.

HOMCY LOPES, C.; ROCHA DE MELO LEITE, A. K. FATORES DE RISCO, PATOGENIA E ASPECTOS CLÍNICOS DO MELANOMA NO BRASIL: UMA REVISÃO INTEGRATIVA. **Revista de Patologia do Tocantins**, v. 8, n. 3, p. 125–129, 2021.

**Instituto Melanoma Brasil.** Disponível em: <<https://www.melanomabrasil.org>>. Acesso em: 08 set. 2023.

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.

KOZIKOWSKI, A. P. *et al.* Studies in polyphenol chemistry and bioactivity. 4.1 synthesis of trimeric, tetrameric, pentameric, and higher oligomeric epicatechin-derived procyanidins having all-4 $\beta$ ,8-interflavan connectivity and their inhibition of cancer cell



growth through cell cycle arrest<sup>1</sup>. **The Journal of organic chemistry**, v. 68, n. 5, p. 1641–1658, 2003.

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.

MARTIN, M. A.; GOYA, L.; RAMOS, S. Potential for preventive effects of cocoa and cocoa polyphenols in cancer. **Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 56, p. 336–351, 2013.

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.

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.

PHILION, C. *et al.* Cymbopogon citratus and Camellia sinensis extracts selectively induce apoptosis in cancer cells and reduce growth of lymphoma xenografts in vivo. **Oncotarget**, v. 8, n. 67, p. 110756–110773, 2017.

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

**Tipos de Câncer**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/>>. Acesso em: 08 set. 2023.

VUCENIK, I. *et al.* Inositol hexaphosphate (IP6) blocks proliferation of human breast cancer cells through a PKC $\delta$ -dependent increase in p27Kip1 and decrease in retinoblastoma protein (pRb) phosphorylation. **Breast cancer research and treatment**, v. 91, n. 1, p. 35–45, 2005.