

UNIVERSIDADE SAGRADO CORAÇÃO

DANIELLY PETERLINI

MARIANE CAETANO FERREIRA

**AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO COM CACAU –
Theobroma cacao L. SOBRE O CRESCIMENTO DO
TUMOR ASCÍTICO DE EHRLICH EM FASE DE PRÉ E
PÓS- IMPLANTAÇÃO TUMORAL EM CAMUNDONGOS
SUÍÇOS.**

BAURU
2011

DANIELLY PETERLINI
MARIANE CAETANO FERREIRA

**AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO COM CACAU –
Theobroma cacao L. SOBRE O CRESCIMENTO DO
TUMOR ASCÍTICO DE EHRlich EM FASE DE PRÉ E
PÓS- IMPLANTAÇÃO TUMORAL EM CAMUNDONGOS
SUÍÇOS.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Centro de Ciências da Saúde como parte dos
requisitos para obtenção do título de
Farmacêutico, sob orientação da Prof^a. Dr^a.
Dulce H. J. Constantino.

BAURU
2011

Peterlini, Danielly

P479a

Avaliação do tratamento com cacau - *Theobroma cacao L.* sobre o crescimento do tumor ascítico de Ehrlich em fase de pré e pós-implantação tumoral em camundongos suíços / Danielly Peterlini, Mariane Caetano Ferreira -- 2011.

35f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Dulce Helena Constantino.

Co-orientadora: Profa. Ms. Márcia Clélia Leite Marcelino.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Sagrado Coração - Bauru - SP

1. Cacau (*Theobroma cacao L.*). 2. Flavonóides. 3. Câncer. 4. Óxido nítrico. I. Ferreira, Mariane Caetano. II. Constantino, Dulce Helena. III. Marcelino, Márcia Clélia Leite. IV. Título.

**DANIELLY PETERLINI
MARIANE CAETANO FERREIRA**

**AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO COM CACAU – *Theobroma cacao* L.
SOBRE O CRESCIMENTO DO TUMOR ASCÍTICO DE EHRLICH EM
FASE DE PRÉ E PÓS- IMPLANTAÇÃO TUMORAL EM CAMUNDONGOS
SUÍÇOS.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde como parte dos requisitos para obtenção do título de Farmacêutico, sob orientação da Prof^a. Dr^a. Dulce H. J. Constantino.

Banca examinadora:

Profa. Ms. Márcia Clélia Leite Marcelino
Universidade Sagrado Coração

Profa. Esp. Tatiana Alonso Lunardi Casoto
Universidade Sagrado Coração

Bauru, 07 de dezembro de 2011.

Dedicamos este trabalho aos nossos familiares, por terem nos apoiado em todos os momentos para a concretização deste sonho, a finalização desta etapa de nossas vidas.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo imenso amor que tem por nós. Por estar presente em todos os momentos das nossas vidas. Por nos carregar nos braços nos momentos mais difíceis. Por nunca nos deixar desistir dos nossos sonhos. Pela nossa saúde, pela nossa família e por cada dia que ainda viveremos. Pela oportunidade de conhecermos pessoas maravilhosas e amizades que levaremos por toda a nossa vida.

Aos nossos pais, pelo carinho, amor e dedicação. Pelo apoio constante, investimento, preocupação e por estarem sempre presentes em nossas vidas.

Aos nossos marido, noivo e irmãos, pelo incentivo nas horas de desespero, por sempre confiarem nas nossas capacidades, pela paciência, amor, e carinho.

À nossa querida Orientadora Profa. Dra. Dulce H. J. Constantino, por ter acreditado em nós, em nossa capacidade e por ter investido seu tempo em todos os momentos de realização deste trabalho.

À nossa querida Co-Orientadora Profa. Ms. Márcia C. L. Marcelino, pela idéia e pela orientação dos primeiros passos deste trabalho.

Ao nosso querido Prof. Ms. Fernando Tozze Alves Neves, por ter nos ajudado em muitas etapas deste trabalho, que foram decisivas para a conclusão deste.

À Universidade Sagrado Coração pela oportunidade de desenvolver esta pesquisa, por toda a estrutura física disponível, como o Biotério, o Laboratório de Biologia e os equipamentos utilizados, e pelos funcionários desses locais que sempre nos auxiliaram no que foi necessário.

Ao CNPq pelo financiamento deste trabalho, apoio indispensável para realização da pesquisa científica desenvolvida.

RESUMO

Câncer é a segunda causa de morte por doença no Brasil e um dos fatores desencadeantes é a presença de radicais livres que resultam em mudanças na estrutura do DNA ocasionando rearranjos gênicos e o surgimento de oncogenes. O uso de substâncias antioxidantes contribuem para a neutralização destes radicais, podendo ser utilizados para atividade terapêutica. Por apresentar vários componentes com atividade antioxidante e antineoplásicos, o cacau (*Theobroma cacao* L.) gera um grande interesse de ser estudado, já que nele se encontram substâncias como os flavonóides. Dentre estes se destacam as procianidinas, associadas a um estímulo na produção do óxido nítrico, um derivado do oxigênio com potente efeito citotóxico e muito estudado por suas propriedades antitumorais. Neste estudo avaliamos o efeito do tratamento com solução de cacau em camundongos portadores do tumor de Ehrlich, para tanto foram constituídos quatro grupos de 7 animais cada. Um grupo foi tratado por sete dias com solução de cacau, 0,1mL 1x/dia, via oral e outro grupo com água destilada, 0,1mL, 1x/dia via oral. Decorridos os sete dias os quatro grupos foram inoculados com 0,1mL de suspensão contendo 10^4 células tumorais por mL, por via intraperitoneal. Os grupos que já haviam iniciado o tratamento seguiram o mesmo esquema por mais dez dias. Os outros dois grupos iniciaram o tratamento 24h após o implante, no mesmo esquema dos grupos já citados e mantido o tratamento por dez dias. Ao final do período de tratamento os animais foram eutanasiados com dose letal de ketamina e xylasina. O tratamento prévio com solução aquosa de cacau mostrou uma tendência em reduzir o número total de células presentes no lavado peritoneal e a produção de NO, reduziu significativamente o número de células mononucleares e mostrou tendência à redução no número de células tumorais e aumento no espriamento de macrófagos. O tratamento pós-implante tumoral com solução aquosa de cacau mostrou uma tendência em reduzir o número total de células presentes no lavado peritoneal, não afetou a produção de óxido nítrico e o influxo de células mononucleares, mostrou uma tendência ao aumento no número de células tumorais, não afetando o espriamento de macrófagos. O tratamento prévio com solução de cacau, em nosso modelo experimental, foi mais efetivo no controle do crescimento tumoral, enquanto o tratamento pós-implante apresentou efeito inverso, favorecendo o crescimento neoplásico.

Palavras-chave: Cacau (*Theobroma cacao* L.). Flavonóides. Câncer. Óxido Nítrico.

ABSTRACT

Cancer is the second leading cause of death by disease in Brazil and a triggering factor is the presence of free radicals that result in structural changes in DNA caused gene rearrangements and the appearance of oncogenes. The use of antioxidants help to neutralize these radicals, which can be used for therapeutic activity. By presenting various components with antioxidant and anticancer activity, cocoa (*Theobroma cacao* L.) generates a great interest to be studied, since it are substances such as flavonoids. Among these stand out procyanidins, a stimulus associated with the production of nitric oxide, a byproduct of oxygen with potent cytotoxic and much studied for their antitumor properties. This study evaluated the effect of treatment with a solution of cocoa mice bearing the Ehrlich tumor, will consist of four for both groups of seven animals each. One group was treated for seven days with a solution of cocoa, 1/day 0,1 mL orally and another group with distilled water, 0,1 mL, oral 1/day. After seven days the four groups were inoculated with 0,1 ml containing 10^4 tumor cells per mL, intraperitoneally. The groups that have already started treatment follow the same pattern for another ten days. The other two treatment groups will begin 24 hours after implantation, the same pattern of the groups mentioned and maintenance of treatment for ten days. At the end of the treatment period the animals will be euthanized with a lethal dose of ketamine and xylazine. Pretreatment with aqueous cocoa showed a tendency to reduce the total number of cells present in the peritoneal cavity and reduced NO production, significantly reduced the number of mononuclear cells and showed tendency to decrease in the number of tumor cells and increase in the spreading of macrophages. Tumor implantation after treatment with aqueous solution of cocoa showed a tendency to reduce the total number of cells present in the peritoneal cavity, did not affect nitric oxide production and the influx of mononuclear cells, showed a tendency to increase in the number of tumor cells, not affecting the spreading of macrophages. Prior treatment with a solution of cocoa in our experimental model, was more effective in controlling tumor growth, whereas treatment after implantation showed the opposite effect, favoring neoplastic growth.

Keywords: Cocoa (*Theobroma cacao* L.). Flavonoids. Cancer. Nitric oxide.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Efeito do tratamento prévio e pós implantação do tumor ascítico de Ehrlich com solução aquosa de cacau sobre o n° total de células presentes no fluido ascítico.....	21
Figura 2 – Efeito do tratamneto prévio e pós implantação do tumor ascítico de Ehrlich com solução aquosa de cacau sobre a produção de óxido nítrico.....	22
Figura 3 – Efeito do tratamento prévio e pós implantação do tumor ascítico de Ehrlich com solução aquosa de cacau sobre o n° de células mononucleares presentes no fluido ascítico.....	23
Figura 4 – Efeito do tratamento prévio e pós implantação do tumor ascítico de Ehrlich com solução aquosa de cacau sobre o n° de células tumorais presentes no fluido ascítico.....	24
Figura 5 – Efeito do tratamento prévio e pós implantação do tumor ascítico de Ehrlich com solução aquosa de cacau sobre o n° de macrófagos espriados presentes no fluido ascítico.....	25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Efeito do tratamento prévio e pós - implantação do tumor ascítico de Ehrlich com solução aquosa de cacau sobre o número total de células presentes no fluido ascítico.....	20
Tabela 2 - Efeito do tratamento prévio e pós-implantação do tumor ascítico de Ehrlich com solução aquosa de cacau sobre a produção de óxido nítrico.....	21
Tabela 3 - Efeito do tratamento prévio e pós-implantação do tumor ascítico de Ehrlich com solução aquosa de cacau sobre o número de células mononucleares presentes no fluido ascítico.....	22
Tabela 4 - Efeito do tratamento prévio e pós-implantação do tumor ascítico de Ehrlich com solução aquosa de cacau sobre o número de células tumorais presentes no fluido ascítico.....	23
Tabela 5 - Efeito do tratamento prévio e pós-implantação do tumor ascítico de Ehrlich com solução aquosa de cacau sobre o número de macrófagos espalhados presentes no fluido ascítico.....	24

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
2	OBJETIVOS	15
2.1	GERAIS.....	15
2.2	ESPECÍFICOS.....	15
3	METODOLOGIA	16
3.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	16
3.2	ANIMAIS.....	16
3.3	NEOPLASIA.....	16
3.4	TESTE DE VIABILIDADE CELULAR.....	17
3.5	IMPLANTE TUMORAL.....	17
3.6	TRATAMENTO.....	17
3.7	EUTANÁSIA.....	18
3.8	OBTENÇÃO DO LAVADO PERITONEAL.....	18
3.9	CONTAGEM DE CÉLULAS PRESENTES NO LAVADO PERITONEAL.....	18
3.10	CONTAGEM DIFERENCIAL DE CÉLULAS MONONUCLEARES E TUMORAIS.....	18
3.11	AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO).....	18
3.12	ESPRAIAMENTO DE MACRÓFAGOS.....	19
3.13	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	19
4	RESULTADOS.....	20
5	DISCUSSÃO.....	26
6	CONCLUSÃO.....	29
	REFERÊNCIAS	30
	ANEXO A - CERTIFICADO DE ANÁLISE DO CACAU UTILIZADO NO PREPARO DA SOLUÇÃO ORAL ADMINISTRADA NOS GRUPOS DE TRATAMENTO.....	34
	ANEXO B – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVERSIDADE AUTORIZANDO A REALIZAÇÃO DA PESQUISA	35

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

O crescimento neoplásico corresponde a segunda causa de morte por doença no Brasil e é caracterizado por crescimento celular anormal e autônomo. De acordo com o comportamento biológico das células neoplásicas, as mesmas podem ser classificadas como benignas ou malignas e, estas últimas conhecidas popularmente como câncer em virtude de sua capacidade de infiltrar os tecidos vizinhos.

A iniciação e a progressão do câncer podem ser desencadeadas por fatores como a genética, o metabolismo, a dieta e o ambiente externo. Todos esses fatores podem determinar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), os radicais livres, que resultam em mudanças na estrutura do DNA. Estas alterações podem resultar na expressão de oncogenes e determinam o início de um processo anormal de proliferação celular, que podem resultar no desenvolvimento do câncer. Para evitar os danos causados pelos radicais livres o uso de substâncias com atividade antioxidante apresenta-se como uma abordagem terapêutica promissora (MATEZ; SANCHEZ-JIMENEZ, 2000).

Existem relatos de que em várias bebidas e alimentos consumidos pelo homem encontram-se substâncias naturais com poder antioxidante, portanto capazes de neutralizar radicais livres, como os chás produzidos com diferentes ervas e o vinho. Segundo Morais et al., (2009) o bom poder antioxidante dos chás pode ser explicado pela presença de substâncias capazes de inibir os radicais livres, sendo os mais importantes os compostos fenólicos, dentre eles os flavonóides como a catequina.

Estudos realizados com outro vegetal, o cacau - *Theobroma cacao* L., apontam para o fato de que o mesmo possui maior capacidade antioxidante do que o vinho tinto e o chá verde e preto, relacionando esse efeito com o teor de flavonóides (Lee et al., 2003). Cerca de 60% dos fenóis totais nos grãos de cacau são representados por monômeros flavanol (epicatequina e catequina) e oligômeros procianidinas (Dreosti, 2000). As propriedades biológicas dos flavonóides estão relacionadas com a atividade antioxidante que cada fenol exerce sobre o meio em que se encontra, sendo dependente da sua estrutura química (MAMEDE e PASTORE, 2004).

Nas sementes do cacau são encontrados diversos componentes bioativos, principalmente compostos polifenólicos, representados pelos flavonóides, como flavan-3-ols, catequina, epicatequina e dímeros procianidina B1 e B2, que são os compostos presentes em maiores

concentrações. Os flavonóides seguintes também foram identificados e quantificados: quercetina, quercetina-3-O-glicosídeo (isoquercetina), quercetina-3-O-galactosídeo, quercetina-3-O-arabinosídeo, bem como as flavonas apigenina, apigenina-8 - C-glicosídeo (vitexina), apigenina-6-C-glicosídeo (isovitexina), luteolina e luteolina-7-O-glicosídeo (SÁNCHEZ-RABANEDA et al., 2003).

Após a ingestão de bebidas a base de cacau há uma rápida absorção de compostos antioxidantes resultando em um rápido aumento nas suas concentrações plasmáticas e conseqüente efeito antioxidante dos flavonóides presentes como as catequinas, epicatequinas e procianidinas (ZHU et al., 2002).

Em estudo realizado por Wang et al. (2000), há sugestão de que o consumo de cacau ou chocolate melhora a capacidade antioxidante do plasma e diminui o conteúdo dos produtos de oxidação lipídica no plasma humano, fato atribuído pelos autores ao elevado teor de procianidinas e epicatequinas, flavonóides presentes no cacau. Outro composto encontrado no cacau teve seu efeito antioxidante comprovado em estudo *in vivo* onde foram empregados roedores alimentados com cacau: a quercetina (MORAND et al., 1998).

A avaliação da ação de flavonóides em processos neoplásicos aponta para uma relação inversa entre o consumo de diversos flavonóides e a incidência de câncer (García-Closas et al., 1999), fato comprovado em diferentes tipos de neoplasias como nas neoplasias gástricas (Arts et al., 2002), no adenocarcinoma cólon-retal em mulheres pós-menopáusicas (Peterson et al., 2003), em neoplasias da mama. Segundo Peterson e Dwyer (1998), os flavonóides inibem proteínas responsáveis pelo controle da proliferação celular que ativam a carcinogênese; reduzem a formação de estrogênio do tipo II que está envolvido com a regulação do crescimento celular; a genotoxicidade das radiações gama; a formação de DNA defeituoso quando submetido à exposição de benzopireno.

As catequinas, um dos tipos de flavonóides presentes no cacau, apresentaram efeitos benéficos tanto na inibição e iniciação do câncer, quanto na supressão do crescimento de células tumorais (Ramarathanam et al., 1995), enquanto a procianidina derivada do cacau inibiu seletivamente a proliferação de diversas linhagens de células de câncer de mama humano, sugerindo que a inibição da proliferação celular por este composto está associado com o sítio específico de defosforilação de proteínas reguladoras do ciclo celular (Ramljak et al., 2005). Já a atividade anticarcinogênica da quercetina parece ser devido a sua ação em diferentes estágios de

desenvolvimento tumoral como a inibição de proteínas tradutoras de sinais (Kang; Liang, 1997), redução da atividade enzimática das células tumorais (Rodgers & Grant, 1998), inibição da angiogênese (Igura et al., 2001), indução da apoptose (Richter et al., 1999; Xiao et al., 1997), ou inibição da expressão de oncogenes (Ranelletti et al., 2000). Há indícios de apresentar atividade anti metastática, como foi observado in vitro onde a quercetina inibiu a mobilidade de células de melanoma murino (ZHANG et al., 2000).

A instalação e desenvolvimento de uma neoplasia é acompanhada de uma resposta de defesa que, até certo ponto, é capaz de controlar o crescimento neoplásico. Porém, um ponto crítico do desenvolvimento tumoral é o escape tumoral às defesas do hospedeiro, as células tumorais são capazes de modular a resposta de defesa com a finalidade de favorecer o seu crescimento.

Vários fatores endógenos se somam na modulação da resposta de defesa do organismo e, alguns desses fatores como o óxido nítrico (NO), podem ser influenciados por substâncias que compõe a dieta do indivíduo.

O NO é um gás com meia vida curta (11s) produzido através da ação da enzima óxido nítrico sintetase utilizando como substrato o aminoácido semi-essencial L-arginina. O NO é produzido por células endoteliais e apresenta efeito relaxante do músculo liso, sendo importante na manutenção da pressão arterial. Também é produzido por células de defesa durante o processo inflamatório e apresenta efeitos citotóxicos e capacidade de modulação da atividade de células de defesa.

Mann et al (2007) observaram que polifenóis contidos no vinho tinto, chá verde e preto e chocolate escuro ativam rapidamente proteínas tradutoras de sinais presentes no citoplasma (cinases), resultando na ativação da enzima óxido nítrico sintetase - NOS e aumento da síntese de NO. De acordo com Grassi et al (2005) o consumo de chocolate escuro rico em flavonol reduz a pressão arterial e a resistência à insulina, melhorando o relaxamento vascular dependente do NO. O efeito de vasodilatação endotélio-dependente através do uso de chocolate escuro também foi visto por Engler et al (2004) que relatou que este efeito está associado ao aumento nas concentrações plasmáticas de epicatequina em adultos saudáveis. A epicatequina induz relaxamento vascular agindo no endotélio e aumentando o nível de NO (Chen et al., 2002). As procianidinas do cacau também demonstraram aumentar a produção de NO através da ativação endotelial da NOS e induzir o relaxamento dependente do endotélio (Karim; McCormick;

Kappagoda, 2000). Um estudo realizado com adultos saudáveis, mas com excesso de peso, mostrou que a ingestão aguda de qualquer chocolate escuro ou líquido de cacau melhorou significativamente a função endotelial e diminuiu a pressão arterial (Faridi et al., 2008). A proteção antioxidante conferida pelos flavonóides no endotélio vascular pode reduzir o risco de aterosclerose, incluindo sua ação de inibir a conversão oxidativa do NO a peroxinitrito (PRYOR e SQUADRITO, 1995).

No sistema imunitário e na inflamação, o NO endógeno exerce efeitos pró e anti-inflamatórios (Nathan, 1992). Os efeitos pró-inflamatórios do NO não são evidentes sob condições fisiológicas agudas, podendo, nestes casos, mediar funções anti-inflamatórias, como a inibição de adesão de neutrófilos, atividade da cicloxigenase, formação de citocinas e reabsorção óssea (SCHMIDT e WALTER, 1994).

Durante a resposta imunitária celular, a maioria das células adquire a capacidade de expressar a forma de NOS induzida - iNOS (Nathan e Xie, 1994). A ação do NO depende da célula T reconhecer um antígeno específico, embora sua ação na resposta imune mediada por células não seja específica (Schmidt e Walter, 1994). A expressão dos antígenos Ia por macrófagos murinos torna-se crucial para que haja a interação com linfócitos T e conseqüente secreção de IFN- γ , um importante co-indutor da síntese de NO (XIE et al., 1992; THOMPSON et al., 1998).

O NO também apresenta ação antitumoral (Murta et al., 1999), sendo esta dependente da quantidade de NO gerada e da interação das células do hospedeiro com as do tumor. Esta interação pode gerar efeito ora estimulante ora inibitório na imunidade antitumoral (O'SULLIVAN e LEWIS, 1994; MURTA et al., 1999).

A análise em conjunto dos fatos citados anteriormente deram sustentação para realização de um estudo mais aprofundado sobre os efeitos do tratamento pré e pós – implantação do tumor de Ehrlich em sua forma ascítica. O tumor de Ehrlich é um dos poucos tumores murinos transplantáveis e, por este motivo muito empregado em estudos sobre oncologia experimental. Trata-se de um tumor de origem mamária transplantado com sucesso para a cavidade peritoneal onde é mantido por repiques semanais até os dias atuais (Lowenthal e Jahn, 1932), portanto um bom modelo experimental para estudos sobre o desenvolvimento neoplásico e compreensão dos mecanismos envolvidos na interação tumor/hospedeiro.

Dois fatos importantes levaram ao desenvolvimento deste trabalho. Em primeiro lugar a pesquisa foi realizada com uma substância de baixo custo e que faz parte da dieta de grande parte da população e em segundo lugar, na atualidade há uma busca por terapias alternativas para uma série de doenças, dentre elas o câncer, e que esta terapia além de efetiva apresente menor taxa de efeitos colaterais.

Desta forma neste trabalho buscou-se elucidar os efeitos do tratamento com cacau sobre o desenvolvimento tumoral, comparando o efeito dos tratamentos pré e pós-implante tumoral.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAIS

Avaliar o tratamento via oral com cacau sobre o tumor ascítico de Ehrlich em fase de pré e pós-implantação do tumor.

2.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar o crescimento tumoral;
- Esclarecer os efeitos do cacau sobre a resposta inflamatória: quantificação de células mononucleares presentes no lavado peritoneal e espraçamento de macrófagos;
- Quantificar a produção de óxido nítrico;
- Analisar os parâmetros acima frente ao tratamento pré e pós-implantação do tumor de Ehrlich.

3 METODOLOGIA

3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram constituídos quatro grupos de 7 animais cada. Os animais foram alojados em gaiolas de propileno e receberam ração comercial para camundongos e água "*ad libitum*". Um grupo foi tratado por sete dias com solução de cacau, 0,1mL, uma vez ao dia, por via oral e outro grupo foi tratado com água destilada, 0,1mL, uma vez ao dia, por via oral. Decorridos os sete dias os quatro grupos foram inoculados com suspensão contendo 10^4 células tumorais por mL, por via intraperitoneal. Os grupos que já haviam iniciado o tratamento seguiram o mesmo esquema por mais dez dias. Os outros dois grupos iniciaram o tratamento 24h após o implante, no mesmo esquema dos grupos já citados e mantido o tratamento por dez dias. Ao final do período de tratamento os animais foram eutanasiados com ketamina e xylasina (0,1mL de cada) e foi então recolhido o lavado peritoneal para subsequente avaliação: a) contagem do n° total de células; b) produção de NO; c) quantificação de células tumorais; d) quantificação de células mononucleares; e) espriamento de macrófagos.

Este protocolo foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Sagrado Coração (protocolo n° 053/10), encontrado no anexo B.

3.2 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos da linhagem Swiss, machos, com idade entre 30 e 45 dias e procedentes do Biotério da Universidade Sagrado Coração - USC. Durante os experimentos os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno (7 animais por caixa), com ingestão de água "*ad libitum*" e ração comercial específica para camundongos.

3.3 NEOPLASIA

Neste estudo foi empregado o tumor de Ehrlich, mantido no Biotério da Universidade Sagrado Coração - USC. As células neoplásicas foram mantidas "*in vivo*" por repiques semanais em camundongos suíços, através do implante de 10^7 células tumorais por via intraperitoneal. Na

obtenção de inóculos para implante do tumor, o fluido ascítico foi retirado, por punção da cavidade peritoneal, e a suspensão foi lavada por duas vezes em solução fisiológica a 1500 rpm, 10 minutos. A determinação do número total de células neoplásicas foi realizada através da contagem em Câmara de Neubauer, e a concentração desejada foi obtida mediante diluição em PBS estéril.

3.4 TESTE DE VIABILIDADE CELULAR

Com o objetivo de se determinar a viabilidade celular a um volume de suspensão de células, foi acrescido um volume de Azul de Trypan na concentração de 0,2%. A seguir, uma gota da suspensão foi colocada entre lâmina e lamínula, e procedida a contagem percentual, considerando-se vivas as células que excluam o corante e mortas as que incorporarem o Azul de Trypan. O percentual de células vivas foi determinado através de contagem de 200 células. Em todos os protocolos foram empregadas somente as suspensões que apresentaram viabilidade superior a 95%.

3.5 IMPLANTE TUMORAL

Após a obtenção das células tumorais, foi estabelecida a concentração de 10^4 /mL e cada animal foi inoculado por via intraperitoneal com volume de 0,1mL da suspensão.

3.6 TRATAMENTO

Os animais foram tratados com solução de cacau na dose de 0,4g/kg de peso, num volume de 0,1mL, por via oral, uma vez ao dia. Um dos grupos teste foi tratado sete dias antes do implante tumoral e o outro 24h após o implante. Os grupos controle foram tratados no mesmo esquema citado, porém receberam água destilada num volume de 0,1mL, uma vez ao dia.

O certificado de análise do cacau utilizado no preparo da solução oral administrada se encontra no anexo A.

3.7 EUTANÁSIA

Os animais foram eutanasiados com dose letal de ketamina (0,1mL) e xylasina (0,1 mL), administrada por via intraperitoneal com auxílio de seringa hipodérmica. Durante este procedimento todo o cuidado foi observado para restringir ao mínimo o sofrimento do animal.

3.8 OBTENÇÃO DO LAVADO PERITONEAL

Com auxílio de seringa descartável foram inoculados 3 mL de solução fisiológica na cavidade peritoneal. O abdome do animal foi massageado e posteriormente foi realizada uma incisão no abdome com o objetivo de se introduzir uma pipeta Pasteur e recolher o lavado peritoneal. Todo este procedimento foi realizado após o sacrifício do animal.

3.9 CONTAGEM DE CÉLULAS PRESENTES NO LAVADO PERITONEAL

Após a remoção do lavado peritoneal, a suspensão de células foi diluída na proporção de 1:100, uma alíquota de 0,5mL foi separada. A esta alíquota foi adicionado um volume de 0,05mL do corante Cristal Violeta. Posteriormente as células tumorais e mononucleares foram contadas em câmara de Neubauer.

3.10 CONTAGEM DIFERENCIAL DE CÉLULAS MONONUCLEARES E TUMORAIS

Foram realizadas distensões da suspensão obtida do lavado peritoneal e coradas pelo método da hematoxilina-eosina (HE). Posteriormente, através de microscopia, foram avaliados cinco campos microscópios aleatórios e não coincidentes.

3.11 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO)

A determinação da concentração de nitrito é uma forma indireta de se determinar a concentração de óxido nítrico (NO). Este procedimento foi feito utilizando-se o método de Griess que quantifica indiretamente a produção de NO pela determinação de nitritos e nitratos

acumulados no sobrenadante das células, após o tratamento (MOSHAGE, 1995). Para tanto a cada 0,2mL de lavado peritoneal foi acrescido de 1,8mL do reativo de Griess (sulfanilamida a 1% em ácido fosfórico a 5% e Naphtylenediamina a 0,1% em água destilada). Como branco do teste foi empregado 1,8 mL de solução fisiológica acrescido de 0,2 mL do lavado peritoneal. A reação ocorreu num período de 20 min, após o qual foi realizada a leitura em espectrofotômetro (CELM) em comprimento de onda 540nm. O cálculo dos resultados foi realizado através da comparação do comprimento de onda dos testes com o comprimento de onda de um padrão com 100 ug de nitrito/mL.

3.12 ESPRAIAMENTO DE MACRÓFAGOS

Foi removida uma alíquota de 200 uL do lavado peritoneal. A esta alíquota foram acrescidos 200 uL de meio RPMI 1640. O material foi depositado em lâmina de microscopia e incubado a 37°C por 1h. Decorrido este período as lâminas foram lavadas vigorosamente com auxílio de pipeta automática para remoção das células não aderentes. As lâminas foram então coradas pela HE e posteriormente contadas em microscópio óptico a proporção de macrófagos espraçados e não espraçados.

3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Primeiramente foi empregado o teste de normalidade de Komogorov-Smirnov, no sentido de certificar-se se as variáveis estavam normalmente distribuídas. Posteriormente, o teste de hipótese t de Student no modo pareado e de médias independentes, no sentido de analisar comparativamente os valores médios do número total de células presentes no lavado peritoneal, células tumorais, células mononucleares, macrófagos espraçados. Para analisar os resultados referentes à produção de óxido nítrico foi empregado o teste não paramétrico de Man Whitney. No estudo estatístico observaremos um nível de significância $p < 0,05$. Os dados obtidos foram avaliados com auxílio do software Sigma Stat versão 3.1 (Jandel Scientific).

4 RESULTADOS

Este estudo visou avaliar o efeito do tratamento com solução aquosa de cacau sobre o crescimento do Tumor Ascítico de Ehrlich, assim como verificar se o tratamento prévio influenciaria o crescimento tumoral de maneira similar ao tratamento pós-implante tumoral. Para tanto, dois grupos receberam tratamento prévio com água destilada ou solução de cacau sete dias antes do implante tumoral e, outros dois grupos receberam o mesmo tratamento, porém após o implante tumoral. Os tratamentos foram então mantidos por mais dez dias.

Um dos parâmetros avaliados foi o número total de células presentes no fluido ascítico, que corresponde à somatória do número total de células tumorais e mononucleares, (dados demonstrados na tabela 1 e figura 1). Não foi possível verificar efeito significativo tanto no grupo tratado previamente quanto no grupo que recebeu tratamento pós-implante tumoral. Porém os resultados sugerem uma tendência nos dois grupos em reduzir o número total de células presentes no lavado peritoneal.

Tabela 1 - Efeito do tratamento prévio e pós - implantação do tumor ascítico de Ehrlich com solução aquosa de cacau sobre o número total de células presentes no fluido ascítico.

Grupos^a	Número total de células ($\times 10^4$/mL)
CPR	495,14 \pm 92,86 ^{b,c}
PR	438,40 \pm 86,27
CPO	487,00 \pm 138,37
PO	438,57 \pm 127,91

a- CPR=animais tratados previamente por sete dias com água destilada (0,1ml, VO, 1x/dia); PR= animais tratados previamente por sete dias com solução de cacau (0,1ml, VO, 1x/dia); CPO= animais tratados após o implante tumoral com água destilada (0,1ml, VO, 1x/dia); PO= animais tratados após o implante tumoral com solução de cacau (0,1ml, VO, 1x/dia);

b- Resultados expressos em media \pm desvio padrão;

c- n= 6 a 7 animais por grupo.

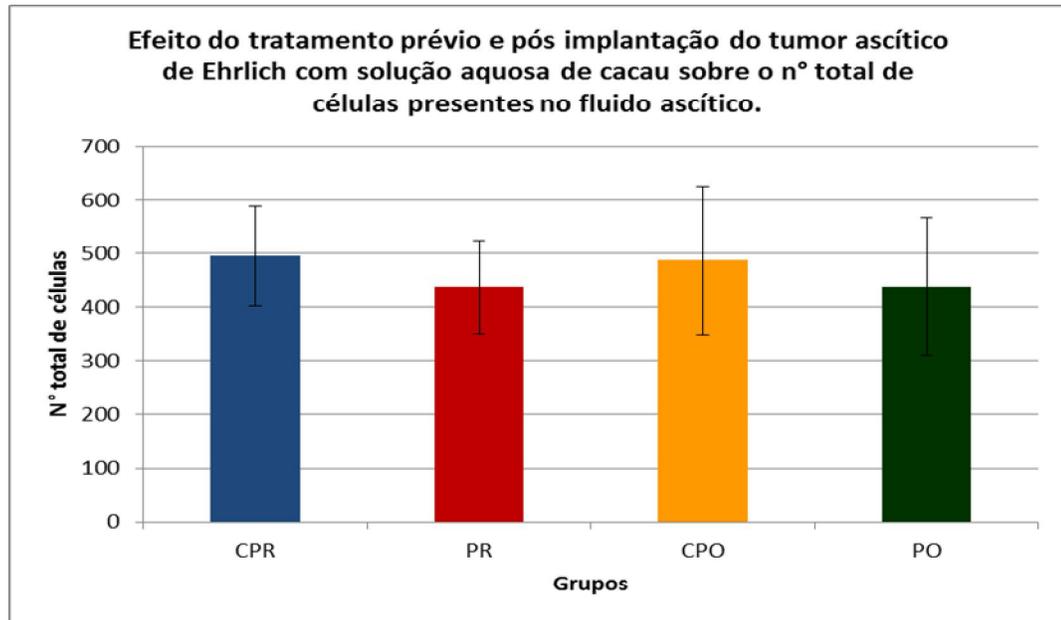


Figura 1 – Efeito do tratamento prévio e pós implantação do tumor ascítico de Ehrlich com solução aquosa de cacau sobre o n° total de células presentes no fluido ascítico.

Com relação à produção de NO, constatamos que o tratamento prévio mostrou uma tendência para reduzir a produção deste mediador químico. O mesmo não foi observado no grupo que recebeu o tratamento pós-implante. Estes resultados se encontram demonstrados na tabela 2 e figura 2.

Tabela 2 - Efeito do tratamento prévio e pós-implantação do tumor ascítico de Ehrlich com solução aquosa de cacau sobre a produção de óxido nítrico.

Grupos ^a	Óxido Nítrico – NO (ug/mL)
CPR	4,28 ± 3,31 ^{b,c}
PR	2,04 ± 1,34
CPO	1,28 ± 0,92
PO	2,90 ± 2,25

a- CPR=animais tratados previamente por sete dias com água destilada (0,1ml, VO, 1x/dia); PR= animais tratados previamente por sete dias com solução de cacau (0,1ml, VO, 1x/dia); CPO= animais tratados após o implante tumoral com água destilada (0,1ml, VO, 1x/dia); PO= animais tratados após o implante tumoral com solução de cacau (0,1ml, VO, 1x/dia);

b- Resultados expressos em mediana ± desvio padrão;

c- n= 6 a 7 animais por grupo.

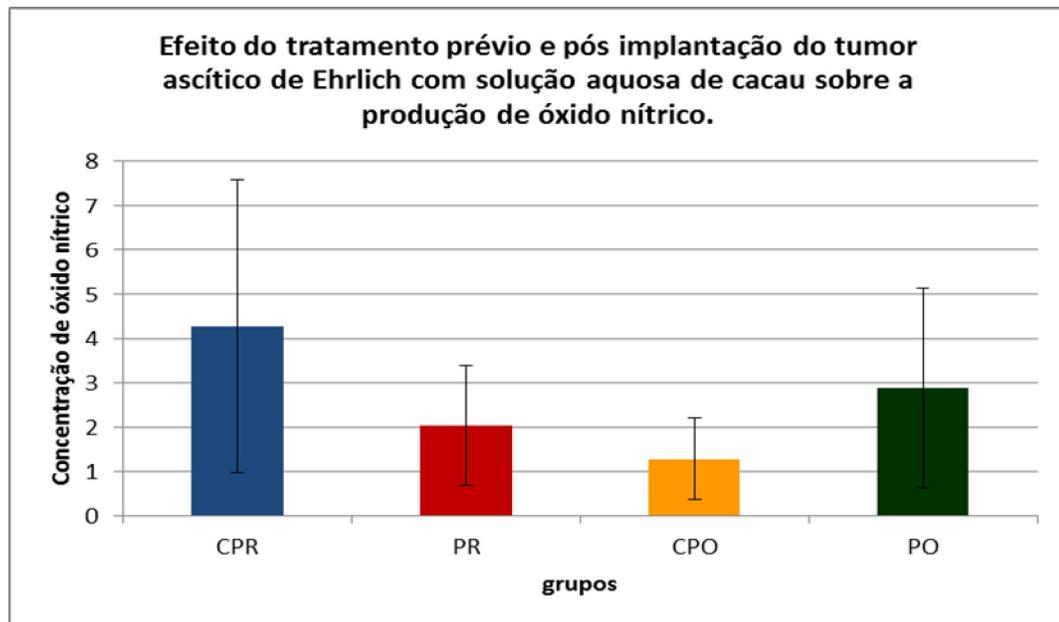


Figura 2 – Efeito do tratamneto prévio e pós implantação do tumor ascítico de Ehrlich com solução aquosa de cacau sobre a produção de óxido nítrico.

Buscamos correlacionar o tratamento com a quantificação de células tumorais e mononucleares presentes no lavado peritoneal, para tanto realizamos a contagem diferencial de células em distensões coradas pela hematoxilina-eosina. O tratamento prévio com solução aquosa de cacau reduziu significativamente o número de células mononucleares, já o tratamento pós-implante tumoral não mostrou qualquer efeito sobre este parâmetro (dados demonstrados na tabela 3 e figura 3).

Tabela 3 - Efeito do tratamento prévio e pós implantação do tumor ascítico de Ehrlich com solução aquosa de cacau sobre o número de células mononucleares presentes no fluido ascítico.

Grupos ^a	Número de células mononucleares (média de cinco campos microscópicos)
CPR	20,43 ± 12,52 ^{b,c}
PR	7,17 ± 5,49*
CPO	10,83 ± 4,17
PO	11,17 ± 8,21

a- CPR=animais tratados previamente por sete dias com água destilada (0,1ml, VO, 1x/dia); PR= animais tratados previamente por sete dias com solução de cacau (0,1ml, VO, 1x/dia); CPO= animais tratados após o implante tumoral com água destilada (0,1ml, VO, 1x/dia); PO= animais tratados após o implante tumoral com solução de cacau (0,1ml, VO, 1x/dia);

b- Resultados expressos em media ± desvio padrão;

c- n= 6 a 7 animais por grupo;

* - P< 0,05 na comparação com o grupo controle.

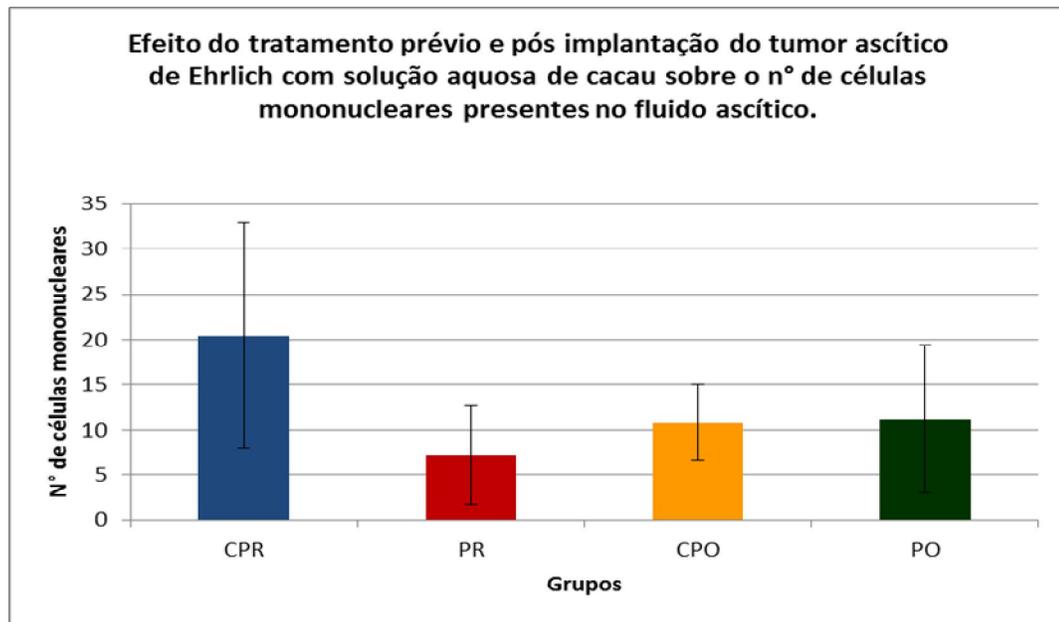


Figura 3 – Efeito do tratamento prévio e pós implantação do tumor ascítico de Ehrlich com solução aquosa de cacau sobre o n° de células mononucleares presentes no fluido ascítico.

Ao avaliarmos o número de células tumorais observamos uma tendência do tratamento prévio em promover uma redução destas células, porém tal efeito, em nossas condições, não foi estatisticamente significativo. Já o tratamento pós-implante mostrou uma tendência ao favorecimento do crescimento tumoral. Estes resultados se encontram demonstrados na tabela 4 e figura 4.

Tabela 4 - Efeito do tratamento prévio e pós implantação do tumor ascítico de Ehrlich com solução aquosa de cacau sobre o número de células tumorais presentes no fluido ascítico.

Grupos^a	Número de células tumorais (média de cinco campos microscópicos)
CPR	107,71 ± 45,01 ^{b,c}
PR	89,15 ± 48,14
CPO	93,00 ± 63,00
PO	123,33 ± 38,55

a- CPR=animais tratados previamente por sete dias com água destilada (0,1ml, VO, 1x/dia); PR= animais tratados previamente por sete dias com solução de cacau (0,1ml, VO, 1x/dia); CPO= animais tratados após o implante tumoral com água destilada (0,1ml, VO, 1x/dia); PO= animais tratados após o implante tumoral com solução de cacau (0,1ml, VO, 1x/dia);

b- Resultados expressos em media ± desvio padrão;

c- n= 6 a 7 animais por grupo.

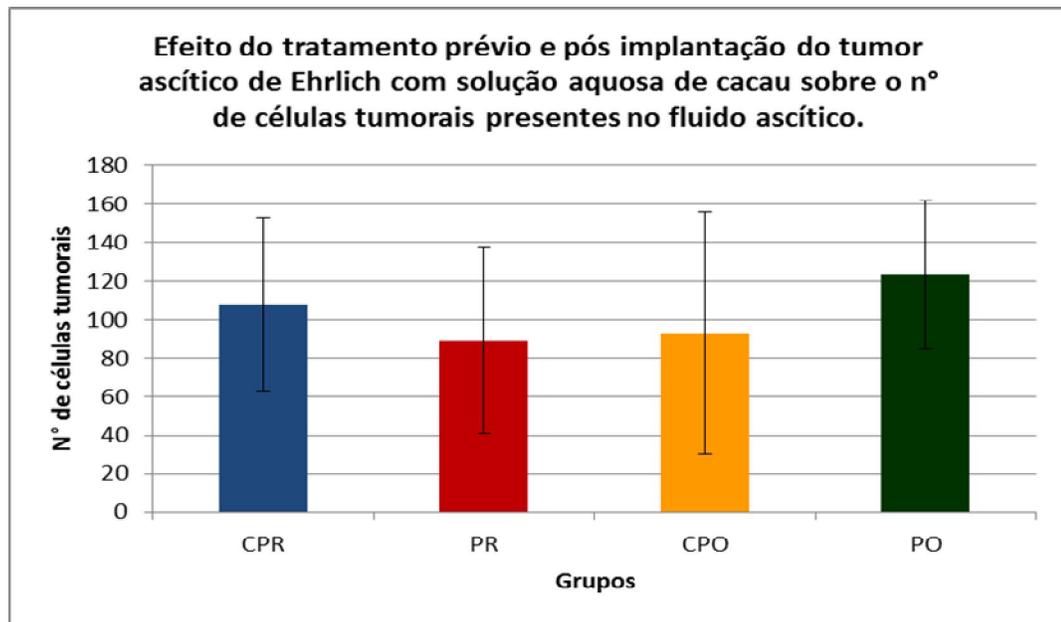


Figura 4 – Efeito do tratamento prévio e pós implantação do tumor ascítico de Ehrlich com solução aquosa de cacau sobre o n° de células tumorais presentes no fluido ascítico.

Outro parâmetro avaliado foi o efeito dos tratamentos sobre o espriamento de macrófagos peritoneais. Nenhum dos tratamentos realizados foi capaz de influenciar significativamente o estado de ativação destas células, entretanto o tratamento prévio mostrou uma tendência ao aumento desta ativação, fato que pode ser constatado com os resultados apresentados na tabela 5 e figura 5.

Tabela 5 - Efeito do tratamento prévio e pós implantação do tumor ascítico de Ehrlich com solução aquosa de cacau sobre o número de macrófagos espriados presentes no fluido ascítico.

Grupos ^a	Número de macrófagos espriados/200uL do lavado peritoneal
CPR	16,28 ± 11,64 ^{b,c}
PR	22,71 ± 10,89
CPO	31,28 ± 14,16
PO	30,00 ± 13,92

a- CPR=animais tratados previamente por sete dias com água destilada (0,1ml, VO, 1x/dia); PR= animais tratados previamente por sete dias com solução de cacau (0,1ml, VO, 1x/dia); CPO= animais tratados após o implante tumoral com água destilada (0,1ml, VO, 1x/dia); PO= animais tratados após o implante tumoral com solução de cacau (0,1ml, VO, 1x/dia);

b- Resultados expressos em media ± desvio padrão;

c- n= 6 a 7 animais por grupo.

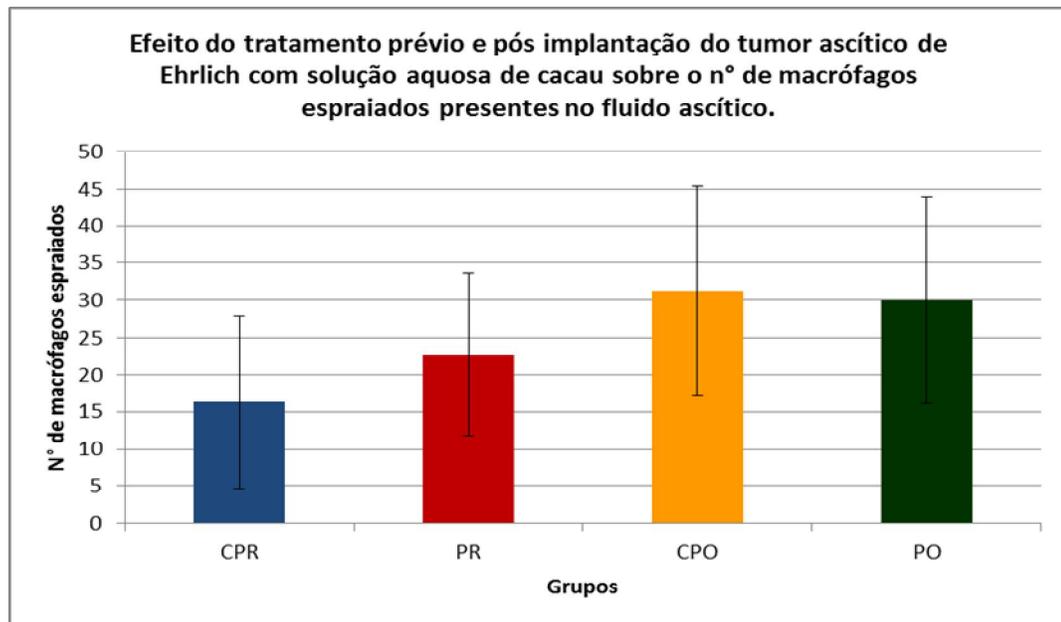


Figura 5 – Efeito do tratamento prévio e pós implantação do tumor ascítico de Ehrlich com solução aquosa de cacau sobre o n° de macrófagos espreiados presentes no fluido ascítico.

5 DISCUSSÃO

Neste estudo pudemos constatar que o tratamento prévio com solução aquosa de cacau mostrou uma tendência em reduzir o número total de células presentes no lavado peritoneal. Esta população de células avaliadas corresponde a somatória das células tumorais implantadas e também das células de defesa presentes, como os macrófagos, linfócitos e suas subpopulações. O fato deste tratamento reduzir a quantidade destas células não reflete de imediato um efeito supressor sobre o crescimento tumoral e buscando esclarecer melhor este efeito foi realizada a contagem diferencial das células presentes no lavado peritoneal. Paralelo a este resultado observamos que o tratamento prévio mostrou uma tendência em reduzir a produção de óxido nítrico, um mediador químico importante no desenvolvimento neoplásico e que pode apresentar um papel favorável ao desenvolvimento tumoral ou inibitório do mesmo. Este efeito dúbio está relacionado ao tipo de tumor e também a fase evolutiva em que o mesmo se encontra.

A ação anti-tumoral do NO (Murta et al., 1999) depende da quantidade de NO gerada e também da interação das células de defesa do hospedeiro com as células tumorais. Esta interação pode gerar efeito ora estimulante ora inibitório das células envolvidas na resposta imune anti-tumoral (O'Sullivan e Lewis, 1994; Murta et al., 1999), como os macrófagos e os linfócitos natural killer.

O efeito de indução tumoral pelo NO pode ocorrer devido este ser o mediador final da angiogênese estimulada pelo VEGF (Fator de crescimento endotelial vascular), o maior implicado na angiogênese nas neoplasias humanas (Veikkola et al. 2000), sendo a angiogênese um dos fatores que favorecem a manutenção do crescimento tumoral, através do fornecimento de nutrientes e oxigênio as células tumorais.

Constatamos também uma redução significativa no número de células mononucleares e uma tendência à redução no número de células tumorais e, uma tendência do tratamento prévio com cacau em aumentar o número de macrófagos espalhados. Estes fatos revelam que o tratamento influenciou o número de células, porém não podemos afirmar que interferiu no estado de ativação das células de defesa, pois houve concomitante redução das células tumorais e, tal efeito ocorreu ao mesmo tempo em que houve redução na produção de óxido nítrico e aumento do espalhamento de macrófagos. Estes fatos apontam para um papel facilitador do crescimento tumoral relacionado à produção de NO e fica ainda mais evidente quando constatamos que o

tratamento prévio reduz o crescimento tumoral e que, paralelo a isto, há uma diminuição do NO e um discreto aumento no espraiamento de macrófagos, sugerindo que o NO seria produzido por outras células não somente macrófagos e, estudos futuros seriam necessários para esclarecer estes dados.

Portanto em nosso modelo experimental fica evidente este envolvimento do NO na facilitação do crescimento tumoral, enquanto que os macrófagos se mostram associados à contenção do crescimento tumoral.

O tratamento pós-implante tumoral com solução aquosa de cacau mostrou uma tendência em reduzir o número total de células presentes no lavado peritoneal e não afetou a produção de óxido nítrico, corroborando os achados anteriores. Este tratamento não afetou o influxo de células mononucleares e mostrou uma tendência ao aumento no número de células tumorais, não afetando o espraiamento de macrófagos.

Estes dados mostram que este tratamento pós-implante não foi capaz de controlar o crescimento tumoral e direcionam firmemente para um efeito pró-tumor do óxido nítrico.

O efeito antitumoral observado com o tratamento prévio vem sendo amplamente investigado. Há sugestão de que o consumo de cacau ou chocolate melhora a capacidade antioxidante do plasma e promove redução na produção de radicais livres originados pela oxidação lipídica, fato atribuído pelos autores ao elevado teor de procianidinas e epicatequinas, flavonóides presentes no cacau (WANG et al. 2000). Outro componente do cacau teve seu efeito antioxidante comprovado em estudo *in vivo* onde foram empregados roedores alimentados com cacau: a quercetina (MORAND et al., 1998).

A ação de flavonóides em processos neoplásicos mostram relação inversa entre seu consumo e a incidência de câncer (García-Closas et al.,1999), como nas neoplasias gástricas (Arts et al., 2002), no adenocarcinoma cólon-retal em mulheres pós-menopáusicas (Peterson et al., 2003), em neoplasias da mama. Os flavonóides inibem proteínas responsáveis pelo controle da proliferação celular que ativam a carcinogênese; reduzem a formação de estrogênio do tipo II que está envolvido com a regulação do crescimento celular; a genotoxicidade das radiações gama; a formação de DNA defeituoso quando submetido à exposição de benzopireno (PETERSON e DWYER ,1998).

As catequinas, um dos tipos de flavonóides presentes no cacau, apresentaram efeitos benéficos tanto na inibição e iniciação do câncer, quanto na supressão do crescimento de células

tumorais (Ramarathanam et al.,1995), enquanto a procianidina derivada do cacau inibe a proliferação de diversas linhagens de células de câncer de mama humano, sugerindo que a inibição da proliferação celular por este composto está associado com o sítio específico de defosforilação de proteínas reguladoras do ciclo celular (Ramljak, et al.,2005). Já a atividade anticarcinogênica da quercetina parece ser devido a sua ação em diferentes estágios de desenvolvimento tumoral como a inibição de proteínas tradutoras de sinais (Kang; Liang, 1997), redução da atividade enzimática das células tumorais (Rodgers & Grant, 1998), inibição da angiogênese (Igura et al., 2001), indução da apoptose (Richter et al., 1999; Xiao et al., 1997), ou inibição da expressão de oncogenes (Ranelletti et al., 2000). Há indícios de apresentar atividade anti metastática, como foi observado *in vitro* onde a quercetina inibiu a mobilidade de células de melanoma murino (ZHANG et al., 2000).

Portanto, o tratamento prévio com solução de cacau, em nosso modelo experimental, foi mais efetivo no controle do crescimento tumoral, enquanto o tratamento pós-implante apresentou efeito inverso, favorecendo o crescimento neoplásico. Estudos adicionais são fundamentais para esclarecer as tendências observadas neste estudo e o estado de ativação das células envolvidas na resposta de defesa contra o crescimento neoplásico.

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos com o desenvolvimento deste estudo podemos concluir que:

- O tratamento prévio com solução aquosa de cacau mostrou uma tendência em reduzir o número total de células presentes no lavado peritoneal e a produção de óxido nítrico. Provocou redução significativa no número de células mononucleares e uma tendência à redução no número de células tumorais e aumento no espriamento de macrófagos;
- O tratamento pós-implante tumoral com solução aquosa de cacau mostrou uma tendência em reduzir o número total de células presentes no lavado peritoneal e não afetou a produção de óxido nítrico. Este tratamento não afetou o influxo de células mononucleares e mostrou uma tendência ao aumento no número de células tumorais, não afetando o espriamento de macrófagos;
- O tratamento prévio com solução de cacau, em nosso modelo experimental, foi mais efetivo no controle do crescimento tumoral, enquanto o tratamento pós-implante apresentou efeito inverso, favorecendo o crescimento neoplásico.

REFERÊNCIAS

ARTS, I.C. et al. Dietary catechins and cancer incidence among postmenopausal women: the Iowa Women's Health Study. **Cancer Causes and Control**, vol.13, nº 4, p.373–382, may, 2002.

CHEN, Z.W. et al. Epicatechin induces and modulates endothelium-dependent relaxation in isolated rat mesenteric artery rings. **Acta Pharmacologica Sinica**, vol.23, nº 12, p.1188–1192, 2002.

DREOSTI, I.E. Antioxidant polyphenols in tea, cocoa and wine. **Nutrition**, vol.16, nº 7-8, p.692-694, jul-aug, 2000.

ENGLER, M.B. et al. Flavonoid-Rich Dark Chocolate Improves Endothelial Function and Increases Plasma Epicatechin Concentrations in Healthy Adults. **Journal of the American College of Nutrition**, vol.23, nº 3, p.197-204, 2004.

FARIDI, Z. et al. Acute dark chocolate and cocoa ingestion and endothelial function: a randomized controlled crossover trial^{1–4}. **The American Journal of Clinical Nutrition**, vol. 88, nº 1, p.58–63, jul, 2008.

GARCIA-CLOSAS, R. et al. Intake of specific carotenoids and flavonoids and the risk of gastric cancer in Spain. **Cancer Causes and Control**, vol.10, nº 1, p.71–75, feb, 1999.

GRASSI, D. et al. Cocoa Reduces Blood Pressure and Insulin Resistance and Improves Endothelium-Dependent Vasodilation in Hypertensives. **Hypertension**, vol.46, p.398-405, jul, 2005.

IGURA K. et al. Resveratrol and quercetin inhibit angiogenesis in vitro. **Cancer Letters**, vol.171, nº 1, p.11–16, aug, 2001.

KANG, T.B.; LIANG, N.C. Studies on the inhibitory effects of quercetin on the growth of HL-60 leukemia cells. **Biochemical Pharmacology**, vol.54, nº 9, p.1013–1018, nov, 1997.

KARIM, M.; MCCORMICK; K., KAPPAGODA, C.T. Effects of cocoa extracts on endothelium-dependent relaxation. **The Journal of Nutrition**, vol.130, p.2105S–2108, aug, 2000.

LEE, K.W. et al. Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, vol.51, n°. 25, p.7292-7295, 2003.

LOWENTHAL, H.; JAHN, G. Übertragungs versuche mit carcinomatoser mause-ascitesflüssigkeit und ihr verhalten gegen physikalische und chemische einwirkungen. **Z. Krebsforsch.**, vol.37, p.439-47, 1932.

MAMEDE, M.E.O.; PASTORE, G.M. Compostos fenólicos do vinho: estrutura e ação antioxidante. **Boletim do CEPPA**. Curitiba, vol.22, n° 2, p.233-252, jul /dez, 2004.

MANN, G.E. et al. Activation of endothelial nitric oxide synthase by dietary isoflavones: Role of NO in Nrf2-mediated antioxidant gene expression. **Cardiovascular Research**, vol.75, n° 2, p.261-274, 2007.

MATÉS, J.M; SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, F.M. Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications in câncer therapy. **The Internacional Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.32, n°.2, p. 157-170, 2000.

MORAND, C. et al. Plasma metabolites of quercetin and their antioxidant properties. **American Journal of Physiology**, vol.275, n° 1, p.212–219, jul, 1998.

MORAIS, S.M. et al. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. n°.19, p.315-320, jan-mar, 2009.

MOSHAGE, H. et al. Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation. **Clinical Chemistry**. vol.41, n°.6, p. 892-896, jun, 1995.

MURTA, B.M.T. et al. The relationship of host immune cells, cytokine and nitric oxide production to tumor cells in ovarian carcinoma. **São Paulo Medical J**, vol.117, p.87-92, 1999.

NATHAN, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. **FASEB Journal**, vol.6, p.3051-3064, 1992.

NATHAN, N.C.; XIE, Q. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. **Cell**, vol.78, p.915-918, 1994.

O'SULLIVAN, C.; LEWIS, C.E. Tumor-associated leucocytes: Friends or foes in breast cancer carcinoma. **Journal Pathology**, vol.172, p.229-235, 1994.

PETERSON, J.; DWYER, J.; Flavonóides: dietary occurrence and biochemical activity. **Nutrition Research**, v. 18, n°.12, p. 1995-2018, 1998.

PETERSON, J. et al. Flavonoid intake and breast cancer risk: a casecontrol study in Greece. **British Journal of Cancer**, vol. 89, p.1255–1259, sep, 2003.

PRYOR, W.A.; SQUADRITO, G.L. The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. **Am J Physiol.**, vol.268, n° 5, p.699–722, 1995.

RAMARATHNAM, N. et al. The contribution of plant food antioxidants to human health. **Trends in Food Science and Technology**, v.6, n°.3, p.75-82, 1995.

RAMLJAK, D. et al. Pentameric procianidin from *Theobroma cacao* selectively inhibits growth of human breast cancer cells. **Mol Cancer Ther.** n°.4. ed.4, april, 2005.

RANELLETTI, F.O., et al. Quercetin inhibits p21-RAS expression in human colon cancer cell lines and in primary colorectal tumors. **International Journal of Cancer**, vol.85, n° 3, p.438–445, feb, 2000.

RICHTER M., EBERMANN R.; MARIAN B. Quercetin-induced apoptosis in colorectal tumor cells: possible role of EGF receptor signaling. **Nutrition and Cancer**, vol. 34, p.88–99, 1999.

RODGERS, E.H.; GRANT, M.H. The effect of the flavonoids, quercetin, myricetin and epicatechin on the growth and enzyme activities of MCF7 human breast cancer cells. **Chemico-Biological Interactions**, vol. 116, n° 3, p. 213–228, nov, 1998.

SÁNCHEZ-RABANEDA F. et al. Liquid chromatographic/electrospray ionization tandem mass spectrometric study of the phenolic composition of cocoa (*Theobroma cacao*). **Journal of Mass Spectrometry**, vol.38, n° 1, p.35–42, jan, 2003.

SCHMIDT, H.H.H.W.; WALTER, U. NO at work. **Cell**, vol. 78, p.919-925, 1994.

THOMPSON, D.C. et al. Cytokine-induced nitric oxide formation in normal but not in neoplastic murine lung epithelial cell lines. **American Journal Physiology**, vol.274, p.L922-L932, 1998.

VEIKKOLA, T. et al. Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. **Cancer Research**, vol. 60, p.203-212, jan, 2000.

WANG, J.F., et al. A doseresponse effect from chocolate consumption on plasma epicatechin and oxidative damage. **The Journal of Nutrition**, vol.130, p.2115–2119, aug, 2000.

XIAO D.; ZHU S.P.; GU Z.L. Quercetin induced apoptosis in human leukemia HL-60 cells. **Zhongguo Yao Li Xue Bao**. vol.18, n° 3, p.280–283, may, 1997.

XIE, Q.W. et al. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. **Science**, vol.256, p.225-226, 1992.

ZHANG, X.O.; XU, Q.; SAIKI, I. Quercetin inhibits the invasion and mobility of murine melanoma B16- BL6 cells through inducing apoptosis via decreasing Bcl-2 expression. **Clinical and Experimental Metastasis**, vol.18, n° 5, p.415–421, 2000.

ZHU, Q.Y., et al. Inhibitory effects of cocoa flavanols and procyanidin oligomers on free radical-induced erythrocyte haemolysis. **Experimental Biology and Medicine**, vol.227, n° 5, p.321–329, may, 2002.

ANEXO A - CERTIFICADO DE ANÁLISE DO CACAU UTILIZADO NO PREPARO DA SOLUÇÃO ORAL ADMINISTRADA NOS GRUPOS DE TRATAMENTO.

 GRUPO CENTROFLORA <i>Parcerias para um mundo melhor.</i>	CERTIFICADO DE ANÁLISE <hr/> Aprovado		
Nº 1713/09	Data da Aprovação: 08/09/09	Unidade II	Rev. 3 - 29/05/09

CACAU ESPECIAL

Produto: 20961 - Cacau Especial 10,0-12,0% Teobromina
Nome Científico: *Theobroma cacao* Linné
Solvente de Extração: Etanol/Água (1:1)
Parte Usada: Sementes
Processo de Produção: Extração Cacau Desengordurado/Padronização
Excipientes Utilizados: Nenhum
Origem da Droga Vegetal: Brasil - BA
Fabricado no: Brasil
Ratio: 5 - 7:1

Lote	
190809.1713	
Fabricação	Validade
08/2009	08/2011

ANÁLISE	ESPECIFICAÇÃO	RESULTADO	MÉTODO
<u>Físico-Químico</u>			
Aspecto	Pó Fino Higroscópico	Pó Fino Higroscópico	IT2-100
Cor	Pardo a Pardo Escuro	Pardo	IT2-100
Odor	Característico	Característico	IT2-100
Umidade (%)	Max 6,00	3,420	IT2-100
Sabor	Característico	Característico	IT2-100
Teor - Teobromina (%)	10,000 - 12,000	10,610	IT2-115
Aflatoxina B1 (µg/Kg)	Max 2,00	0,100	IT2-3RD
Aflatoxina B1+B2+G1+G2 (µg/Kg)	Max 4,00	0,400	IT2-3RD
Metais Pesados - Cd (ppm)	Max 0,50	0,320	IT2-3RD
Metais Pesados - Hg (ppm)	Max 0,10	0,060	IT2-3RD
Metais Pesados - Pb (ppm)	Max 3,00	0,270	IT2-3RD
Resíduos de Pesticidas	De acordo com Lei EC e EP 2.8.13	De Acordo	IT2-3RD
Solvente Residual	De acordo com EP 5.4	De Acordo	IT2-3RD
Ocratoxina A (µg/Kg)	Max 2,00	0,600	IT2-3RD
Metais Pesados - As (ppm)	Max 1,00	0,040	IT2-3RD
Teor Cafeína (HPLC) (%)	0,200 - 1,500	0,330	IT2-115
Cinzas Insol. em Ácido (%)	Informativo	2,340	IT2-003
Cinzas Totais (%)	Informativo	7,030	IT2-003
<u>Microbiológico</u>			
Bactérias Totais	< 1000 UFC/g	< 10 UFC/g	IT2-046
Fungos e Leveduras	< 100 UFC/g	< 10 UFC/g	IT2-046
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ausente em 10 g	Ausente	IT2-047
<i>Escherichia coli</i>	Ausente em 10 g	Ausente	IT2-047
<i>Salmonella</i> sp	Ausente em 10 g	Ausente	IT2-047
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausente em 10 g	Ausente	IT2-047
Enterobactérias Tolerantes a Bile	Ausente 10g	Ausente	IT2-047

OBSERVAÇÕES

Produto não destinado ao consumidor final.

Reinaldo Aparecido de Souza
 Responsável Técnico CRF/SP 24.284

Impresso em:
 24/11/2010
 15:24:22
 Página 1 / 1
 RQ2-021 Rev.01

**ANEXO B – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVERSIDADE
AUTORIZANDO A REALIZAÇÃO DA PESQUISA.**



PRPPG
Pró-reitoria
de Pesquisa e
Pós-graduação

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

CERTIFICADO

Baseado em parecer competente este Comitê de Ética em Pesquisa analisou o Projeto “*AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO COM CACAU- THEOBROMA CACAO. L. SOBRE CRESCIMENTO DO TUMOR ASCITICO DE EHRLICH EM FASE DE PRÉ E PÓS-IMPLANTAÇÃO TUMORAL EM CAMUDONGUS SUIÇOS*”, Protocolo nº 053/10, tendo como responsável a Pesquisadora **DULCE CONSTANTINO** e o considerou **APROVADO**.

Bauru, 24 de fevereiro de 2011.

Prof. Dr. Marcos da Cunha Lopes Virmond
Presidente Comitê de Ética em Pesquisa – USC