



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS – RIO
CLARO



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Efeitos da α -tomatina na proliferação celular, apoptose e expressão de RNAm dos genes *APC*, *Ciclina A2*, *Catenina*, *CASP9*, *BAK*, *BAX* e *BCL-XL* em células HT29

PRISCILA LUMI ISHII

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

Fevereiro
2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS - RIO CLARO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Efeitos da α -tomatina na proliferação celular, apoptose e expressão de RNAm dos genes *APC*, *Ciclina A2*, *Catenina*, *CASP9*, *BAK*, *BAX* e *BCL-XL* em células HT29.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Lúcia Regina Ribeiro

Fevereiro

2011

574.87 Ishii, Priscila Lumi

I79e Efeitos da α -tomatina na proliferação celular, apoptose e expressão de RNAm dos genes APC, Ciclina A2, Catenina, CASP9, BAK, BAX e BCL-XL em células HT29 / Priscila

Lumi Ishii. – Rio Claro : [s.n.], 2011

61 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro

Orientador: Lúcia Regina Ribeiro

Co-Orientador: Mário Sérgio Mantovani

1. Citologia. 2. Expressão gênica. 3. Nutrigenômica. 4.
Alimentos. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Efeitos da alfa-tomatina na proliferação celular, apoptose e expressão de RNAm dos genes APC, Ciclina A2, Catenina, CASP9, BAK, BAX e BCL-XL em células HT29

AUTORA: PRISCILA LUMI ISHII

ORIENTADORA: Profa. Dra. LUCIA REGINA RIBEIRO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR) , pela Comissão Examinadora:



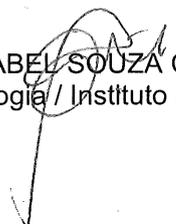
Profa. Dra. LUCIA REGINA RIBEIRO

Departamento de Patologia / Faculdade de Medicina de Botucatu



Prof. Dr. DANIEL ARAKI RIBEIRO

Departamento de Biociências - Universidade Federal de Sao Paulo



Profa. Dra. MARIA IZABEL SOUZA CAMARGO

Departamento de Biologia / Instituto de Biociências de Rio Claro

Data da realização: 17 de fevereiro de 2011.

DEDICATÓRIA

À DEUS

“Ao que está assentado sobre o trono, e ao Cordeiro, sejam dadas ações de graças, e honra, e glória, e poder para todo o sempre (Apocalipse 5:13).”

AOS MEUS PAIS: TAKEMI E KINUKO

Mais uma vez vou repetir: que sem vocês não teria concluído esta etapa.

Sou grata a Deus por ter sido presenteada com pais tão maravilhosos, que sempre me deram amor, carinho e apoio. Sei que muitas vezes abriram mão de muitas coisas pela minha felicidade, pela minha educação e conforto. Espero poder colher esses frutos para vocês.

Obrigada por sempre me apoiarem e me darem suporte de todas as formas possíveis.

Amo vocês incondicionalmente.

AGRADECIMENTOS

À MESTRE PROFA. DRA. LÚCIA REGINA RIBEIRO

Com todo respeito pela orientação, confiança, estímulo, oportunidade e dedicação a este trabalho.

AO MESTRE PROF. MÁRIO SÉRGIO MANTOVANI

Por ter aberto as portas do seu laboratório, pela oportunidade oferecida, confiança, apoio e pelos ensinamentos que foram fundamentais para conclusão deste trabalho.

AOS MEUS IRMÃOS FABIANO E WAGNER

Meus grandes exemplos, amigos e irmãos. Pelo carinho, companheirismo, conselhos e por me apoiarem sempre.

Vocês são inspiração para mim.

ÀS MINHAS CUNHADAS JULIANA E GRAZIELA

Mais que cunhadas, amigas.

Obrigada pelo carinho, companheirismo e por sempre estarem presentes nos momentos mais importantes para mim.

AO MEU MELHOR AMIGO, COMPANHEIRO E NAMORADO LEANDRO

*“Não te amo como fosse rosa de sal, topázio
ou flecha de cravo que propagam fogo.
Te amo como se amam certas coisas obscuras,
secretamente, entre a sombra e a alma.*

*Te amo como a planta que não floresce, e
leva dentro de si, oculta, a luz daquelas flores.
E graças ao teu amor, vive oculto em meu corpo,
o apertado aroma que ascende da terra.*

*Te amo sem saber como, nem quando, nem onde.
Te amo diretamente sem problemas nem orgulho;
Assim te amo porque não sei te amar de outra maneira,
senão assim deste modo em que não sou nem és.
Tão perto que tua mão sobre meu peito é minha,
tão perto que se fecham teus olhos com meu sono.”*

A Dança – Pablo Neruda

Com certeza você tem grande parte neste trabalho, desde os momentos mais simples até os momentos no laboratório em que eu nem imaginava o quanto você se tornaria importante para mim.

Obrigada por sempre estar ao meu lado, me compreender, ter tanta paciência e me apoiar como amigo, companheiro, namorado e profissional.

A cada dia que passa você tem se tornado cada vez mais essencial para mim.

AOS AMIGOS MARI E RODRIGO,

Passamos muitos momentos juntos desde a graduação e durante esse tempo pude crescer muito com vocês.

Obrigada pela amizade, pelos conselhos, pela colaboração neste trabalho e pelo apoio em todos os momentos. Agradeço também pelo incentivo, encorajamento e pela motivação que vocês sempre me deram.

AOS AMIGOS DO LABORATÓRIO ANDRESSA NIWA, CLÍSIA, DANIELE SARTORI, DIOGO VESENICK, ELIANE BARROSO, JULIANA MARCARINI, MARCELA TSUBOY, MARIANA MAURO, NATÁLIA DE PAULA, PATTHE, RODRIGO CABRAL, RODRIGO VIDA, SANDRA LEPRI, SIMONE SEMPREBOM E LEONARDO ZANELATO.

Agradeço pelos bons momentos que passamos juntos no laboratório, pelo auxílio, pelo companheirismo e pela recepção desde os primeiros dias no laboratório.

ÀS AGENCIAS FINANCIADORAS

CAPES, CNPq e Fundação Araucária.

RESUMO

A Nutrigenômica é definida como o efeito da dieta na expressão gênica, e a extensão pela qual as diferenças genéticas entre os indivíduos influenciam a resposta a um padrão específico de dieta, à ingestão de alimentos funcionais e à suplementação de micronutrientes, em termos de um resultado para a saúde humana. A α -tomatina é um glicoalcalóide encontrado no tomate (*Lycopersicon esculentum*) que possui funções biológicas importantes como a redução dos níveis de colesterol LDL, inibição do crescimento de células cancerosas, estimulação do sistema imune e efeito antimetastático. O objetivo deste estudo foi avaliar a citotoxicidade da α -tomatina, os seus efeitos na proliferação celular, na indução de apoptose e expressão de RNAm dos genes *APC*, *Ciclina A2*, *Catenina*, *CASP9*, *BAK*, *BAX* e *BCL-XL* em células HT29. As células foram cultivadas em meio de cultura DMEM, suplementado com 10% de soro bovino fetal, e tratadas nas concentrações de 0,1, 1 e 10 $\mu\text{g/mL}$ para o ensaio do MTT e proliferação celular. Na análise de apoptose morfológica utilizou-se as concentrações de 0,1, 1 e 2 $\mu\text{g/mL}$. Já para a avaliação da expressão gênica utilizou-se a concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$. Após 12 horas de tratamento, o RNA das células foi extraído e a expressão dos genes foi avaliada através do método de PCR em tempo real. O gene *GPDH* foi utilizado como normalizador. A análise estatística foi realizada por ANOVA/Tukey para o ensaio do MTT. Os resultados do ensaio de cinética de proliferação celular, viabilidade celular e avaliação da indução de apoptose foram analisados estatisticamente através de ANOVA/Dunnet, e para a análise da expressão gênica utilizou-se o método de Pfaffl *et al.* (2002), através do cálculo estimado pelo método $\Delta\Delta\text{Ct}$. Os estudos experimentais indicaram que a α -tomatina foi citotóxica apenas na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$. Na avaliação da proliferação celular não houve diferenças significativas nos tratamentos com α -tomatina, com exceção da concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ em que a proliferação celular foi inibida desde as primeiras 24 horas de tratamento. Na análise de apoptose morfológica não houve diferenças significativas em nenhum dos tratamentos avaliados. Com relação aos dados de expressão gênica apenas o gene *APC* teve sua expressão alterada pelo tratamento com a α -tomatina, de maneira significativa. Com base nos nossos resultados, podemos sugerir que a α -tomatina possui atividade antiproliferativa nas primeiras 24h de tratamento, não induz a apoptose nessa linhagem celular utilizada e provoca o rompimento das membranas celulares, consequentemente, aumentando a expressão do gene *APC* relacionado ao ciclo celular.

Palavras-chave: α -tomatina; expressão gênica; *APC*, *Ciclina A2*, β -*catenina*, *Caspase-9*, *BAK*, *BAX* e *BCL-XL*.

ABSTRACT

Nutrigenomics is defined as the effect of diet on gene expression, and the extent to which genetic differences between individuals influence the response to a specific pattern of diet, intake of functional foods and micronutrient supplementation, in terms of a result for human health. The α -tomatine is highlighted as a glycoalkaloid found in tomato (*Lycopersicon esculentum*) that has important biological functions such as reducing levels of LDL cholesterol, inhibit cancer cell growth, stimulation of the immune system and antimetastatic effect. In view of these considerations, the objective of this study was to evaluate the cytotoxicity of α -tomatine, their effects on cell proliferation, induction of apoptosis and morphological expression of mRNA of *APC* gene, *Cyclin A2*, β -*Catenin*, *CASP9*, *BAK*, *BAX* and *BCL-XL* in HT29 cells. The cells were grown in DMEM culture medium supplemented with 10% fetal bovine serum, and treated at concentrations of 0.1, 1 and 10 μ g/mL for the MTT assay and cell proliferation. In the morphological analysis of apoptosis, we used concentrations of 0.1, 1 and 2 μ g/mL. As for the evaluation of gene expression we used a concentration of 1 mg/mL. After 12 hours of treatment, the RNA from cells was extracted and gene expression was evaluated by the method of real-time PCR. The gene GPDH was used as normalizer. Statistical analysis was performed by ANOVA / Tukey test for MTT. The test results of kinetics of cell proliferation, cell viability and assessment of apoptosis were analyzed with ANOVA / Dunnet, and for analysis of gene expression we used the method of Pfaffl et al. (2002), by calculating estimated by $\Delta\Delta$ Ct. Experimental studies suggested that α -tomatine was cytotoxic only at concentration of 10 μ g/mL. In the evaluation of cell proliferation were no significant differences in the treatments with α -tomatine, except that for the concentration of 10 mg / mL in the cell proliferation was inhibited from the first 24 hours of treatment. In the morphological analysis of apoptosis no significant differences in any of the treatments. With regard to gene expression data only the *APC* gene expression was altered by treatment with α -tomatine, significantly. Based on our results, we suggest that α -tomatine has antiproliferative activity in the first 24h of treatment does not induce apoptosis in this cell line and causes disruption of cell membranes, thereby increasing the expression of *APC* gene related to cell cycle.

Keywords: α -tomatine; gene expression; *APC*, *Cyclin A2*, β -*catenin*, *Caspase-9*, *BAK*, *BAX* e *BCL-XL*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química do composto α -tomatina.....	16
Figura 2 – Fórmula molecular da α -tomatina.....	39
Figura 3 – Valores das absorbâncias encontrados no ensaio do MTT após 24 horas de tratamento com α -tomatina em células HT29.....	59
Figura 4 – Cinética de proliferação celular observada nos tratamentos de α -tomatina em três concentrações nos tempos de 24, 48, 72 e 96h em células HT-29.....	59
Figura 5 – Frequência média de células apoptóticas observadas em células HT29, tratadas com α -tomatina.....	60
Figura 6 – Expressão relativa dos genes <i>APC</i> , <i>β-catenina</i> , <i>BAK</i> , <i>BAX</i> , <i>BCL-XL</i> , <i>caspase-9</i> , <i>ciclina A2</i> com tratamento de 1 μ g/mL de α -tomatina.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequência de primers utilizados na reação de PCR em Tempo Real.....	42
Tabela 2 – Valores médios \pm Desvio padrão da absorbância obtida no Ensaio MTT, após 24 horas de tratamento com a α -tomatina em células HT29.....	58

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
1.1 α -tomatina.....	15
1.2 Toxicologia “in vitro”.....	18
1.3 Apoptose.....	19
1.4 Ensaio Biológicos.....	21
1.4.1 Ensaio de Citotoxicidade (MTT).....	21
1.4.2 Ensaio de Viabilidade Celular.....	22
1.4.3 Ensaio de Detecção de Apoptose <i>in situ</i>	22
1.4.4 PCR-RT (Tempo Real)	23
Referências.....	25
2. OBJETIVOS.....	32
2.1 Objetivo Geral.....	32
2.2 Objetivos Específicos.....	32
3.RESULTADOS.....	33
4. CONCLUSÕES.....	61

1. INTRODUÇÃO

A saúde da população humana passou por impactos importantes em função das mudanças na estrutura da sociedade contemporânea, com conseqüente mudança no modo de vida dos indivíduos. A hipertensão arterial, hipercolesterolemia, consumo insuficiente de frutas, legumes e verduras, o excesso de peso, a inatividade física, entre outros, são apontados como os principais fatores de risco para o desenvolvimento de doenças crônicas não-transmissíveis, e diversos tipos de câncer (INCA, 2010).

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), em 2010 estima-se a ocorrência de 489.270 novos casos de câncer, sendo que o câncer de pele não-melanoma é o mais incidente, seguido pelos tumores de mama feminina, próstata, pulmão, cólon e reto, estômago e colo de útero.

O câncer é definido como o conjunto de manifestações patológicas caracterizadas pela perda do controle da proliferação celular e ganho da capacidade de invadir tecidos adjacentes ou de sofrer metástases para tecidos distantes, cujo crescimento celular é quase autônomo, excedendo os tecidos normais. Como resultado de uma agressão, uma célula divide-se descontroladamente até formar uma população de células; este aglomerado localizado de células proliferativas é, então, denominado de tumor. Os tumores originam-se de células que possuem mutações ocorridas em quatro tipos de genes, incluindo os genes que regulam o crescimento celular (proto-oncogenes e genes supressores de tumor) e aqueles que regulam a apoptose e reparo do DNA (RIBEIRO *et al.*, 2003; ROBBINS *et al.*, 2005; GRIFFITHS, 2008).

Uma das principais causas freqüentes do câncer é a mutação na sequência codificante ou reguladora de um gene, cuja função principal é regular a divisão celular. O ciclo celular é controlado por sinais químicos internos e externos que se integram requerendo respostas precisas. As CDKs (Cinases Dependentes das Ciclinas) são componentes cataliticamente ativos no mecanismo do ciclo celular; essas proteínas têm como característica regular as atividades de outras proteínas por meio de sua fosforilação, que depende da presença de ciclinas que capacitam as CDKs formando o complexo ciclina/CDK. Um dos pontos de verificação mais importantes no ciclo celular denomina-se START que controla a entrada na fase S, regulado por ciclinas tipo D em conjunto com CDK4, que se ativado este complexo a célula entra em outra rodada de replicação do DNA. Dessa forma, as células normais são programadas para pausar no ponto

START para garantir que o dano do DNA seja reparado e não seja transmitido para as células filhas. Em contraste, em células tumorais, os pontos de verificação do ciclo encontram-se desregulados, por defeitos genéticos que alternadamente aumentam ou diminuem a abundância de complexos ciclina/CDK (ROBBINS *et al.*, 2005; SNUSTAD & SIMMONS, 2008).

De acordo com Silva *et al.* (2009), as mutações podem ser definidas como alterações no material genético, tais como mudanças na sequência do DNA, que, possivelmente, alteram a sequência de uma proteína ou fenótipo de um organismo. Para tanto, os danos fixados no DNA além de serem irreversíveis são também cumulativos e após um número de alterações nesses genes, a célula torna-se neoplásica (RIBEIRO *et al.*, 2003).

O desenvolvimento dos diversos tipos de câncer ocorre por fatores endógenos e ambientais. A alimentação consiste em um dos principais fatores de risco de câncer, e, atualmente, existem várias evidências sobre os efeitos da atividade física e composição corporal relacionados ao risco de diversos tipos de câncer. (WCIRF 1997; LABIANCA *et al.*, 2010).

A etiologia do câncer envolve a interação da mudança molecular da célula juntamente com fatores ambientais, com grande ênfase nos componentes da dieta. Estudos epidemiológicos e experimentais demonstraram que o consumo de frutas, vegetais e hortaliças assumem papel de destaque na prevenção do câncer. (FERGUSON, 1994; GARÓFOLO *et al.*, 2004; CAMPOS, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2009).

A exposição nutricional desde a primeira infância é um determinante importante na expressão fenotípica durante a vida adulta do indivíduo e é provável que afete a vulnerabilidade a doenças crônicas, incluindo o câncer. Estima-se que a dieta influencia de 30 a 40% de todos os casos de cânceres, e por meio dela é possível alterar o risco do desenvolvimento da doença, pela modulação dos múltiplos processos envolvidos com o início, incidência, progressão e/ou severidade. Considera-se também que os componentes dietéticos podem atuar, direta ou indiretamente, na proteção nos diversos estágios do processo do câncer, no genoma humano, alterando a expressão dos genes e seus produtos. Os componentes ativos da dieta podem modificar, simultaneamente, mais de um processo do desenvolvimento do câncer, incluindo diversos eventos, tais como o metabolismo carcinogênico, balanço hormonal, sinalização celular, controle do ciclo celular, apoptose e angiogênese. Estes componentes bioativos encontrados nos alimentos incluem nutrientes essenciais (cálcio, zinco, selênio, folato, vitaminas C, D e E) assim como os componentes não-essenciais (carotenoides, flavonoides, indoles, ácidos linoleicos

conjugados, e ácidos graxos ω -3) (WCRF, 1997; DAVIS & MILNER, 2004; TRUJILLO *et al.*, 2006; ARDEKANI & JABBARI, 2009).

A nutrigenômica avalia como os efeitos biológicos de um alimento específico, ou um componente bioativo da dieta alteram a expressão gênica, e por que os indivíduos diferem no metabolismo dos alimentos em nível molecular. Em síntese avalia como os genes ou os produtos dos genes interagem com os componentes químicos da dieta para alterar o fenótipo e, reciprocamente, como os genes e seus produtos metabolizam os nutrientes (KAPUT, 2007; ARDEKANI & JABBARI, 2009).

Os efeitos das deficiências nutricionais, desequilíbrio de micronutrientes ou concentrações tóxicas de certos componentes alimentares podem levar a múltiplos efeitos biológicos. Em contrapartida, certos constituintes bioativos têm promovido efeito benéfico significativo na promoção da saúde e prevenção de doenças, por meio de sinais que são detectados pelo sistema sensor celular, afetando a expressão do genoma em vários níveis, e subsequentemente a produção de seus metabólitos (GARCÍA-CAÑAS *et al.*, 2009).

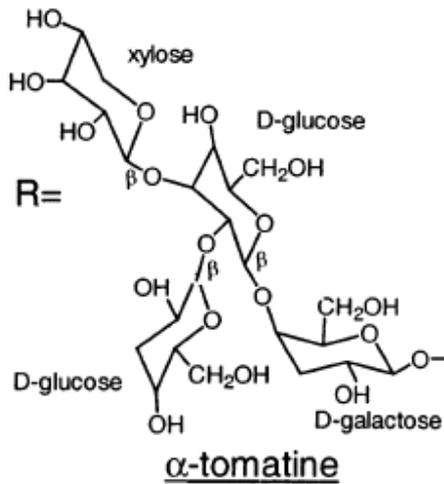
A prevenção do câncer e de outras doenças relacionadas ao processo de mutagênese (ex: aterosclerose, doenças cerebrovasculares e doenças degenerativas do coração) pode ser feita de três maneiras: evitando a exposição aos agentes mutagênicos ou carcinogênicos, favorecendo a ingestão de fatores protetores e fortalecendo os mecanismos de defesa do organismo (DE FLORA & FERGUSON, 1998).

Muitos compostos antimutagênicos e anticarcinogênicos têm sido estudados “in vitro” e “in vivo”, a partir de constituintes encontrados na natureza e, por conseguinte, nos alimentos. Deste modo, a dieta pode ser o fator chave na determinação da instabilidade genômica e na prevenção de certas doenças (RIBEIRO *et al.*, 2003).

1.1 α -tomatina

O tomate (*Lycopersicon esculentum*) é um vegetal amplamente consumido pelo homem por ser rico em vários compostos promotores da saúde como vitamina C, vitamina E, folato, potássio, flavonoides, beta-caroteno e licopeno (LEONARDI *et al.*, 2000; WILLCOX *et al.*, 2003).

Figura 1. Estrutura química do composto α -tomatina



Fonte: Lee *et al.*, 2004

Um dos glicoalcaloides encontrado no tomate é o glicoalcaloide esteroidal α -tomatina, que consiste em um tetrassacarídeo ramificado, β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)-[β -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 3)]- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-D-galactose, ligado ao O-3 da aglicona esteroidal, tomatidina. Esse glicoalcaloide é encontrado principalmente em tomates imaturos, contendo uma média de 4 – 7 mg α -tomatina/100 g do fruto fresco, sendo parcialmente degradado de acordo com os níveis de amadurecimento do fruto. O conteúdo de α -tomatina em tomates maduros varia entre 0,03 – 0,6 mg α -tomatina/100 g do fruto fresco (FRIEDMAN *et al.*, 1994; KEUKENS *et al.*, 1995; BLANKEMEYER *et al.*, 1997; KOZUKUE & FRIEDMAN, 2003; JONES *et al.*, 2005).

Concomitantemente com a descoberta da α -tomatina, vários estudos demonstraram que esta molécula possui propriedades biológicas contra fungos, bactérias, vírus, insetos, patógenos humanos como *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, atuando no papel da resistência de patógenos e predadores na planta do tomate, sugerindo que esta molécula poderia também ser biologicamente ativa farmacologicamente e nutricionalmente em animais e seres humanos (FRIEDMAN, 2002; WALKER *et al.*, 2008).

Pelas suas propriedades envolvidas na resistência de hospedeiro-planta de fitopatógenos e suas propriedades farmacológicas, Blankemeyer *et al.* (1997) realizaram um estudo expondo embriões e peles de sapo a várias concentrações de α -tomatina, e demonstraram que o mecanismo

fundamental contra fungos, insetos e outros fitopatógenos devem-se à ruptura das membranas, alterações nos fluxos de íons e correntes intersticiais entre as membranas.

Em estudos realizados com fungo patogênico filamentoso *Fusarium oxysporum*, expostos a α -tomatina, os autores sugeriram que este glicoalcaloide ativa as vias de sinalização da fosfotirosina-kinase e da proteína monomérica G levando ao aumento de Ca^{++} e a acumulação das espécies reativas de oxigênio (ROS), conseqüentemente levando à morte celular programada deste fungo (ITO *et. al.*, 2007).

Estudos com hamsters suplementados com 20 mg de α -tomatina por dia, demonstraram que este composto foi altamente eficaz na redução do colesterol. Observou-se redução significativa de 41% do colesterol LDL, nenhuma redução do colesterol HDL e diminuição de 45% na razão LDL:HDL. Isto deve-se a formação de um complexo insolúvel no trato digestório entre a α -tomatina e o colesterol, que é então eliminado pelas fezes (FRIEDMAN *et.al.*, 2000).

O principal efeito biológico dos glicoalcaloides em mamíferos é o rompimento da membrana celular pela ligação esterol e inibição da colinesterase. Entretanto, a α -tomatina tem sido destacada pelo seu potencial em atividades em certos tipos de linhagens celulares.

Lee *et. al* (2004) demonstraram que a tomatina comercial (mistura de α -tomatina e dehidrotomatina) é um potente inibidor de células de câncer de cólon HT29. Em outro estudo realizado com célula de carcinoma de pulmão A549, a α -tomatina reduziu as atividades da matriz metaloproteinase-2 (MMP-2), matriz metaloproteinase-9 (MMP-9) e do ativador do plasminogênio do tipo uroquinase (u-PA), pela supressão do fosfanositídeo 3-kinase/Akt (PI3K/Akt) ou vias de sinalização ERK1 / 2 e de inibição da NF-KB ou atividades AP1, sugerindo que a α -tomatina possa agir como um agente antimetastático contra adenocarcinoma de pulmão humano (SHIH *et.al.*, 2009).

Friedman *et al.* (2009) avaliaram várias concentrações de α -tomatina extraída de tomates verdes (*Lycopersicon esculentum*), e observaram a inibição significativa da proliferação de células de carcinoma de mama (MCF-7), carcinoma de cólon (HT29), carcinoma gástrico (AGS), hepatoma (HepG2), assim como a célula normal de fígado (Chang).

A tomatina (comercialmente constituída por α -tomatina e dehidrotomatina) como adjuvante em vacinas também se mostrou altamente efetiva como um imunoestimulador, utilizada para potencializar a imunogenicidade de antígenos da proteína e para provocar a resposta citotóxica dos linfócitos T de animais imunizados e em ratos com malária. Após 12 dias

da imunização subcutânea de ratos com uma formulação de ovoalbumina contendo tomatina, foram observadas potentes respostas imunes CTL, CD8⁺ (AL-WANDAWI *et al.*, 1985; YANG *et al.*, 2002; MORROW, 2004; HEAL & TAYLOR-ROBINSON, 2010).

1.2 Toxicologia “*in vitro*”

A cada ano são produzidos mais de 1.000 novos produtos, que incluem substâncias químicas, medicamentos, cosméticos, pesticidas, aditivos alimentares dentre outros. A necessidade de avaliar experimentalmente as toxicidades das substâncias é de extrema importância para a saúde pública no sentido de garantir a segurança da população humana e animal.

Vários fatores ambientais e nutricionais podem induzir ou promover processos neoplásicos, dependendo da presença de componentes específicos dos alimentos, quantidade e duração da exposição submetida. Isso ocorre pela complexidade biológica e química da dieta e da dificuldade em estabelecer quais aspectos do ambiente e estilo de vida são ideais. Dentro deste aspecto, faz-se necessária a utilização de ferramentas como os biomarcadores para se determinar uma quantidade segura dos alimentos e seus componentes (HERCEG, 2007; MENDRICK, 2008).

O modelo de ensaio “*in vitro*” obteve grande aplicação na investigação toxicológica, propiciando ferramentas avançadas, protocolos confiáveis e informação mecanicista. Estes avanços ocorreram graças a diferentes abordagens, melhoria química para o teste e validação dos procedimentos, com o fim de explorar as bases celulares e moleculares de toxicidade, e estudar as modificações que os xenobióticos sofrem no ambiente celular (REPPETO, 1995).

Inicialmente, a atenção foi primariamente focada nos mecanismos que ocorrem no interior das células quando entram em contato com substâncias tóxicas, ao invés de se compreenderem as causas e as formas como ocorrem. Em seguida, o interesse concentrou-se nos mecanismos de ação de tóxicos, também pela melhoria das metodologias de cultivo, como a substituição do Fetal Calf Serum por coquetéis de nutrientes específicos, uso de fatores de matriz extracelular capazes de promover diferenciação celular, promovendo a melhoria da interação célula-célula em modelos tridimensionais (ZUCCO *et al.*, 2004).

Atualmente, um dos principais objetivos dos sistemas “in vitro” tem sido a reprodução das características do tecido original e suas interações célula-célula, para simular, na medida do possível, o ambiente vivo. Além disso, os testes de citotoxicidade “in vitro” permitem o controle cuidadoso do ambiente físico-químico e fisiológico do ambiente, dando consistência à amostra e aos dados, admitindo dessa forma a redução do número de repetições, a simplificação da análise estatística, o controle da concentração e duração da exposição da droga, e o baixo custo (FRESHNEY, 2001; ZUCCO *et al.*, 2004).

1.3 Apoptose

A apoptose é um processo ativo de morte ordenado e sincronizado, caracterizado morfologicamente por condensação do citoplasma e da cromatina nuclear, ruptura da membrana plasmática, terminando com a fragmentação da cromatina e fagocitose. Em termos bioquímicos, as células apoptóticas expõem fosfatidilserina na porção externa da membrana plasmática e sofrem a fragmentação do DNA, que envolvem duas principais vias de sinalização: uma implica a morte de receptores ao nível da membrana plasmática, enquanto o outro é regulado pela Família Bcl-2 de proteínas, incluindo proteínas pró-apoptóticas e antiapoptóticas (WETZEL & GREEN, 1999; KERR *et al.*, 2002).

Durante este processo ativo de morte celular, uma célula individual é desencadeada por um programa genético, culminando na fragmentação do DNA, condensação do núcleo e citoplasma, e separação de protuberâncias (*blebs*) formadas na superfície das células. A fragmentação celular ocorre sem a liberação do conteúdo celular no meio tecidual circundante, evitando uma resposta inflamatória (necrose), uma característica crucial da apoptose que permite a morte celular sem dano às células adjacentes (KERR *et al.*, 1972; UEDA, 1994; KANNAN & JAIN, 2000).

Quando as alterações no DNA são prejudiciais para a célula e não há correção do dano, para que este dano não seja passado à frente para as células filhas (e se o dano não pode ser reparado pelo mecanismo de reparo celular), a célula sofre morte por apoptose (ROBBINS *et al.*, 2005).

As mitocôndrias têm se destacado por desempenhar papel fundamental na regulação da morte celular, sendo consideradas como principais locais de ação de proteínas Bcl-2. A apoptose pode ser associada com a perturbação do potencial transmembrana mitocondrial e liberação de moléculas solúveis a partir do espaço intermembrana mitocondrial.

A liberação de citocromo C, se não é um evento universal, ocorre em muitos modelos tóxicos mediados pela apoptose. Especificamente, as diferentes proteínas pró-apoptóticas tais como citocromo C e Smac/Diablo, que estão presentes no espaço intermembrana dessas organelas são liberadas durante as fases iniciais da apoptose. Uma vez no citosol, o citocromo C participa na formação do complexo apoptossomo juntamente com sua molécula adaptadora, Apaf-1, resultando no recrutamento, processamento e ativação da caspase-9, na presença de dATP ou ATP. Em seguida, a caspase-9 cliva e ativa a maturação catalítica da caspase-3 e outras caspases efetoras que são responsáveis pela clivagem de várias proteínas levando a características bioquímicas e morfológicas da apoptose. A liberação do citocromo C é, portanto, considerada uma etapa inicial fundamental no processo de apoptose, apesar de os mecanismos precisos que regulam este evento ainda não estarem claros (KOOPMAN *et al.*, 1994; LIU *et al.*, 1996; SLEE *et al.*, 1999; ROBERTSON *et al.*, 2000; GOGVADZE & ORRENIUS, 2006).

Já as caspases, estão presentes constitutivamente em formas precursoras (30-50 kDa), as quais são clivadas proteoliticamente para a ativação. As caspases são comumente divididas em dois grupos: caspases iniciadoras com pró-domínio longo (caspase-2, -8, -9 e -10) e caspases efetoras (caspase-3, -6 e -7) com pró-domínio curto. As caspases iniciadoras são ativadas com a ajuda do adaptador de moléculas, uma vez ativadas, estas são responsáveis pela clivagem e ativação das caspases efetoras. As caspases efetoras, por sua vez, clivam em outras pró-caspases bem como uma série de outras proteínas celulares, levando às alterações bioquímicas e morfológicas da apoptose (ORRENIUS, 2004; GOGVADZE & ORRENIUS, 2006).

1.4 Ensaios Biológicos

1.4.1 Ensaio de citotoxicidade (MTT)

Os ensaios de citotoxicidade “in vitro” permitem o controle cuidadoso das características físico-químicas, dando consistência de amostragem e dados reprodutíveis das linhagens celulares, além da simplicidade na execução e análise. Estes testes são baseados na alteração da permeabilidade da membrana plasmática e consequente liberação de componentes no sobrenadante ou na absorção de corantes, normalmente, excluídas por células viáveis (WYLIE, 2008).

A avaliação da citotoxicidade é essencial para determinação de concentrações citotóxicas basais e para definir os níveis de intervalo de concentração para fornecer informações significativas sobre os parâmetros dos testes “in vitro” (EISENBRAND *et al.*, 2002).

Para muitos testes biológicos é interessante a análise de sobrevivência e proliferação das células, sob ação de uma substância, como um parâmetro inicial de toxicidade. Isso pode ser determinado pelos testes de citotoxicidade, sendo os mais comumente empregados: o *neutral red* teste, o teste de dosagem proteica, teste da lactato desidrogenase (LDH), teste da mensuração do ATP e o teste do [3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromide] (MTT) (FOTAKIS & TIMBRELL, 2006; ULUKAYA *et al.*, 2008).

O Ensaio do MTT é um método amplamente utilizado para a análise de citotoxicidade, viabilidade celular e proliferação de células vivas. O mais utilizado foi proposto por Mossman (1983) (4, 5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromide] (MTT), no qual as células vivas coradas em roxo podem ser analisadas colorimetricamente. A redução do MTT é geralmente atribuída à atividade mitocondrial, mas também tem sido relacionada às enzimas não-mitocondriais, assim como os endossomas e lisossomos. Os resultados podem ser lidos em espectrofotômetro de varredura (leitor de ELISA). As principais vantagens deste ensaio são a sua rapidez e precisão (VELLONEN, 2004; MOSSMAN, 1983).

1.4.2 Ensaio de Viabilidade Celular

A viabilidade celular pode ser definida como o número de células saudáveis na amostra por contagem manual sob microscopia de luz em câmara de Neubauer, utilizando-se o reagente azul de tripan.

O azul de tripan é impermeável à membrana celular, corando apenas células que sofreram dano em sua membrana, ou seja, as que estão mortas serão coradas, naquelas em que a membrana se encontra íntegra, o corante não conseguirá penetrar.

1.4.3 Ensaio para Detecção de Apoptose “in situ”

O termo apoptose é derivado da designação grega para “decadência”. Foi primeiramente reconhecida em 1972 por Kerr *et al.*, para definir características morfológicas como vesículas citoplasmáticas, condensação da cromatina, retração celular e perda da aderência (PALLARDI *et al.*, 1997; KIECHLE *et al.*, 2002).

De acordo com Robbins *et al.* (2005), a apoptose é a via de morte celular induzida por programa celular altamente regulado, em que as células ativam enzimas que degradam seu DNA nuclear e as proteínas citoplasmáticas, com permanência da membrana plasmática intacta, mas com alteração da forma tornando-se alvo primário da fagocitose.

A apoptose ocorre naturalmente no processo de morte celular, sendo essencial para o desenvolvimento normal e a manutenção da homeostase dos organismos multicelulares, sendo importante para a remoção de células danificadas, infectadas ou potencialmente neoplásicas. A apoptose pode ser desencadeada por inúmeros fatores como sinais mediados por receptores, remoção do fator de crescimento, drogas antitumorais e, em algumas condições danos no DNA (KERR *et al.*, 1994; THOMPSON *et al.*, 1995; KIECHLE *et al.*, 2002).

A resposta celular a um efeito tóxico pode ser reversível, quando resultante de privação de nutrientes ou fatores de crescimento ou quando controlada positiva ou negativamente por um regulador de crescimento; ou irreversível, quando as células entram em apoptose, senescência ou se diferenciam (FRESHNEY, 2001).

Considera-se que a apoptose é um fenômeno que auxilia na manutenção da homeostase tanto do ponto de vista fisiológico como patológico do organismo (SHAH *et al.*, 1994; ROBBINS *et al.*, 2005).

A indução da apoptose pode ser investigada via diversos parâmetros: alterações na morfologia celular, rearranjos nas membranas, fragmentação do DNA, ativação de caspases, liberação do citocromo C da mitocôndria, entre outros (EISENBRAND *et al.*, 2002).

A identificação da apoptose, por análise das alterações morfológicas, por exemplo, constitui um procedimento padrão pela sua simplicidade, baixo custo e precisão (PLENCHETTE *et al.*, 2004). A técnica faz uso de corantes, como por exemplo, o alaranjado de acridina, que penetram na célula e coram seu DNA (WYLLIE, 2008).

1.4.4 PCR em Tempo Real

Os perfis de expressão gênica tem sido uma das principais ferramentas da biologia molecular. A reação quantitativa de cadeia em polimerase (RT-qPCR) consiste em um método que difere de outros métodos de avaliação da expressão gênica pela sua acurácia, sensibilidade, simplicidade e rapidez na mensuração da expressão dos genes. Esta técnica permite a análise das diferenças quantitativas nos diversos níveis de expressão gênica entre diferentes amostras, por meio da quantificação de uma sequência de polinucleotídeos selecionada, amplificando a sua concentração inicial para um nível em que a detecção exata pode ser realizada (DERVEAUX *et al.*, 2010; TAYLOR *et al.*, 2010; TICHOPAD *et al.*, 2010).

O SYBR Green é fluoróforo em suspensão, agente intercalante que emite sinais de fluorescência verde com a excitação da luz emitida pelo sistema óptico do termociclador quando se liga entre a fita dupla do DNA. Esta fluorescência é medida em função da temperatura, reduzindo gradualmente de acordo com o aumento na temperatura do produto amplificado (VALONES *et al.*, 2009).

No início da amplificação, as moléculas não-ligadas do SYBR Green apresentam fluorescência fraca. Após o reconhecimento dos iniciadores, algumas moléculas do SYBR Green podem se ligar à fita dupla previamente formada. Durante a polimerização, as moléculas do SYBR Green vão se ligando ao DNA recém-sintetizado, com registro no aumento da temperatura

em pequenos incrementos de 65°C a 95°C. Este aumento de temperatura desnatura gradualmente o DNA, as moléculas do SYBR Green são liberadas, e conseqüentemente induz a uma forte queda na redução da fluorescência quando ambas as fitas separam-se completamente. No final da etapa de extensão de cada ciclo do PCR é possível monitorar a quantidade de DNA amplificado pela detecção da fluorescência (NOVAIS & PIRES-ALVES, 2004; BENES & CASTOLDI, 2010).

A detecção pelo SYBR Green apresenta grandes vantagens pela sua sensibilidade, baixo custo e pela possibilidade de utilização em diferentes pares de *primers*.

REFERÊNCIAS

- AL-WANDAWI, H.; ABDUL-RAHMAN, M.; AL-SHAIKHLY, K. Tomato processing waste as essential raw materials source. **J. Agr. Food Chem.**, Easton, v. 33, p. 804 – 807, 1985.
- ARDEKANI, A. L.; JABBARI, S. Nutrigenomics and cancer. **Avicenna J. Med. Biotech.**, v. 1, p. 9 – 17, 2009.
- BENES , V.; CASTOLDI, M. Expression profiling of microRNA using real-time quantitative PCR, how to use it and what is available. **Methods**, v. 50, p. 244 – 249, 2010.
- BLANKEMEYER, J. T. et al. Effect of α -tomatine and tomatidine on membrane potential of frog embryos and active transport of ions in frog skin. **Food and Chem. Toxicol.**, v. 35, p. 639 – 646, 1997.
- CAMPOS, F. G. et al. Diet and colorectal cancer: current evidence for etiology and prevention. **Nutr. Hosp.**, v. 1, p. 18 – 25, 2005.
- DAVIS, C. D.; MILNER, J. Frontiers in nutrigenomics, proteomics, metabolomics and cancer prevention. **Mutat. Res.**, v. 551, p. 51-64, 2004.
- DE FLORA, S.; FERGUSON, L. R. Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. **Mutat. Res.**, v. 591, p. 8 – 15, 2005.
- DERVEAUX, S.; VANDESOMPELE, J.; HELLEMANS, J. How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. **Methods**, v. 50, p. 227 – 230, 2010.
- EISENBRAND, G. et al. Methods of in vitro toxicology. **Food and Chem. Toxicol.**, v. 40, p. 93 – 236, 2002.
- FERGUSON, L. R. Antimutagens as cancer chemopreventive agents in the diet. **Mutat. Res.**, v. 307, p. 395 – 410, 1994.

FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J. A. In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicol. Lett.**, v. 160, p. 171 – 177, 2006.

FRESHNEY, I. Application of cell cultures to toxicology. **Cell Biol. and Toxicol.**, v. 17, p. 213 – 230, 2001.

FRIEDMAN, M.; LEVIN, C. E.; MCDONALD, G. M. α -tomatine determination in tomatoes by HPLC using pulsed amperometric detection. **J. Agric. Food Chem.**, v. 42, n. 9, p.1959 – 1964, 1994.

FRIEDMAN, M.; FITH, T. E.; YOKOYAMA, W. H. Lowering of plasma LDL cholesterol in hamsters by the tomato glycoalkaloid tomatine. **Food Chem. Toxicol.**, v. 38, p. 549 – 553, 2000.

FRIEDMAN, M. Tomato glycoalkaloids: Role in the plant and in the diet. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, p. 5751 – 5780, 2002.

FRIEDMAN, M. et al. Tomatine-containing green tomato extracts inhibit growth of human breast, colon, liver, and stomach cancer cells. **J. Agric. Food Chem.**, v. 57, p. 5727 – 5733, 2009.

GARCÍA-CAÑAS, V. et al. Advances in Nutrigenomics research: Novel and future analytical approaches to investigate the biological activity of natural compounds and food functions. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v.51, n. 2, p. 290– 304, 2009.

GAROFOLO, A. et al. Diet and cancer: An epidemiologic view. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 17, n. 4, p. 491 – 505, 2004.

GRIFFITHS, A. J. F. et al. **Introdução à Genética**. 9° Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

GOGVADZE, V.; ORRENIUS, S. Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. **Chem.-Biol. Interact.**, v. 163, n. 1 – 2, p. 4 – 14, 2006.

HEAL, K.; TAYLOR-ROBINSON, A. W. Tomatine Adjuvantation of Protective Immunity to a Major Pre-erythrocytic Vaccine Candidate of Malaria is Mediated via CD8+ T Cell Release of IFN- γ . **J. Biomed. Biotech.**, v. 2010, p. 1 – 7, 2010.

HERCEG, Z. Epigenetics and cancer: towards an evaluation of the impact of environmental and dietary factors. **Mutagenesis**, v. 22, n. 2, p. 91–103, 2007.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). Estimativa, 2010. Disponível em: http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/index.asp?link=conteudo_view.asp&ID=5. Acesso em: 15 de janeiro de 2011.

ITO, S. et al. α -Tomatine, the major saponin in tomato, induces programmed cell death mediated by reactive oxygen species in the fungal pathogen *Fusarium oxysporum*. **FEBS Letters**, v. 581, p. 3217 – 3222, 2007.

JONES, N. A.; NEPOGODIEV, S. A.; FIELD, R. A. Efficient synthesis of methyl lycotetraoside, the tetrasaccharide constituent of the tomato defence glycoalkaloid α -tomatine. **Org. Biomol. Chem.**, v. 3, p. 3201 – 3206, 2005.

KANNAN, K.; JAIN, S. K. Oxidative stress and apoptosis. **Pathophysiology**, v. 7, n. 27, p. 153 – 163, 2000.

KAPUT, J. Nutrigenomics, 2006 update. **Clin. Chem. Lab. Med.**, v. 45, p. 279 – 287, 2007.

KEER, J. F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br. J. Cancer**, v. 26, p. 239 – 257, 1972.

KERR, J. F.; WINTERFORD, C. M.; HARMON, B. V. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. **Cancer**, v. 73, p. 2013 – 2026, 1994.

KERR, J. F. History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. **Toxicology**, v. 181,182, p. 471 – 474, 2002.

KIECHLE, F. L.; ZHANG, X. Apoptosis: biochemical aspects and clinical implications. **Clinica Chimica Acta**, v. 326, p. 27 – 25, 2002.

KOOPMAN, G. et al. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. **Blood**, n. 84, v. 4, p. 1415 – 1420, 1994.

KOZUKUE, N.; FRIEDMAN, M. Tomatine, chlorophyll, β -carotene and lycopene content in tomatoes during growth and maturations. **J. Sci. Food Agric.**, v. 83, p. 195 – 200, 2003.

LABIANCA, R. et al. Colon câncer. **Crit. Rev. Oncol. Hematol.**, v.74, p. 106 – 133, 2010.

LEE, K-R. et al. Glycoalkaloids and metabolites inhibit the growth of human (HT29) and liver (HepG2) cancer cells. **J. Agric. Food. Chem.**, v. 52, p. 2832 – 2839, 2004.

LEONARDI, C. et al. Antioxidative activity and carotenoid and tomatine contents in different typologies of fresh consumption tomatoes. **J. Agric. Food. Chem.**, v. 48, p. 4723 – 4727, 2000.

LIU, X. et al. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome C. **Cell**, v. 86, p. 147 – 157, 1996.

MENDRICK, D. L. Genomic and genetic biomarkers of toxicity. **Toxicology**, v. 245, p. 175 – 181, 2008.

MORROW, W. J. W.; YANG, Y-W.; SHEIKH, N. A. Immunobiology of the tomatine adjuvant. **Vaccine**, v. 22, p. 2316 – 2327, 2004.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation cytotoxic assays. **J. Immunol. Methods**, v. 65, p. 55 – 63, 1983.

NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, 33º ed., p. 10 – 13, 2004.

OLIVEIRA, R. J. et al. Effects of polysaccharide β -glucan on clastogenicity and teratogenicity caused by acute exposure to cyclophosphamide in mice. **Regul. Toxicol. Pharmacol.**, v. 53, p.164 – 173, 2009.

ORRENIUS, S. Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. **Toxicol. Lett.**, v. 149, p. 19 – 23, 2004.

PALLARDY, M.; PERRIN-WOLFF, M.; BIOLA, A. Cellular Stress and Apoptosis **Toxicol. In Vitro**, v. 11, p. 573 – 578, 1997.

PLENCHETTE, S. et al. Analyzing markers of apoptosis in vitro. **Methods Mol. Bio.**, v. 281, p. 313 – 331, 2004.

REPETTO, G. Recientes avances en la validación y aceptación de métodos alternativos in vivo e in vitro. **Rev. Toxicol.**, v. 12, p. 3 – 9, 1995.

RIBEIRO, L. R.; MARQUES, E. K. **A importância da mutagênese ambiental na carcinogênese humana.** In: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. Mutagênese Ambiental. Canoas: Ed. ULBRA, 2003. p. 21 – 27.

ROBBINS, S. et al. **Patologia: Bases Patológicas das Doenças.** 7° Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

ROBERTSON, M. J. et al. Regulation of human natural killer cell migration and proliferation by the exodus subfamily of CC chemokines. **Cell Immunol.**, v. 199, p. 8 – 14, 2000.

SHAH, N. M. et al. Glial growth factor restricts mammalian neural crest stem cells to a glial fate. **Cell**, v. 77, p. 349 – 360, 1994.

SHIH, Y. W. et al. Alpha-tomatine inactivates PI3K/ Akt and ERK signaling pathways in human lung adenocarcinoma A549 cells: effect on metastasis. **Food Chem. Toxicol.**, v. 47, p. 1985 – 1995, 2009.

SILVA, A. F. **Efeitos da beta-glucana extraída de *Agaricus blazei* na expressão dos genes *ERCC5*, *CASP9*, *TP53* e *CYP1A1* em células de hepatoma humano.** 2009. 55 p. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

SLEE, E. A. et al. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner, **J. Cell Biol.**, v. 144, p. 281 – 292, 1999.

SNUSTAD, D. P.; SIMMONS, M. J. **Fundamentos de Genética.** 4° Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

TAYLOR, S. et al. A practical approach to RT-qPCR—Publishing data that conform to the MIQE guidelines. **Methods**, v. 50, S1 – S5, 2010.

THOMPSON, C. B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. **Science**, v. 267, p. 1456 – 146, 1995.

TICHOPAD, A. et al. Quality control for quantitative PCR based on amplification compatibility test. **Methods**, v. 50, p. 308 – 312, 2010.

TRUJILLO, E.; DAVIS, C.; MILNER, J. Nutrigenomics, Proteomics, Metabolomics, and the Practice of Dietetics. **J. Am. Diet Assoc.**, v. 106, p. 03 – 413, 2006.

UEDA, N.; SHAH, S. Apoptosis. **J. Lab. Clin. Méd.**, v. 124, p. 169 – 177, 1994.

ULUKAYA, E. et al. The MTT assay yields a relatively lower result of growth inhibition than the ATP assay depending on the chemotherapeutic drugs tested. **Toxicol. In vitro**, v. 22, p. 232 – 239, 2008.

VALONES, M. A. A. et al. Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: a review. **Braz. J. Microbiol.**, v. 40, p. 1 – 11, 2009.

VELLONEN, K. S.; HONKAKOSKI, P.; URTTI, A. Substrates and inhibitors of efflux proteins interfere with the MTT assay in cells and may lead to underestimation of drug toxicity. **Eur. J. Pharm. Sci.** v. 23, p.181 – 188, 2004.

WALKER, B. W.; MANHANKE, N.; STINE, K. J. Comparison of the interaction of tomatine with mixed monolayers containing phospholipid, egg sphingomyelin and sterols. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 1778, p. 2244 – 2257, 2008.

WETZEL, E. B.; GREEN, D. R. Apoptosis: checkpoint at the mitochondrial frontier. **Mutat. Res.**, v. 434, p. 243 – 251, 1999.

WILLCOX, J. K.; CATIGNANI, G. L.; LAZARUS, S. Tomatoes and cardiovascular health. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v. 43, p. 1 – 18, 2003.

World Cancer Research Fund. **Food, nutrition and prevention of cancer: A global perspective.** Washington: American Institute for Cancer Research; 1997. p. 35-71, 508-540.

WYLLIE, A. H. **Apoptosis, cell death and cell proliferation.** 3° Ed. Roche Applied Science Manual, 2008.

YANG, Y-W.; WU, C-A; MORROW, W. J. W. The apoptotic and necrotic effects os tomatine adjuvants. **Vaccine**, v. 22, p. 2316 – 2327, 2004.

ZUCCO, F. et al. Toxicology investigations with cell culture systems: 20 years after. **Toxicol. in vitro**, v. 18 , p. 153 –163, 2004.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da α -tomatina na citotoxicidade, cinética de proliferação celular, indução de apoptose e expressão gênica em células de adenocarcinoma intestinal humano HT29.

2.2 Objetivos Específicos

Avaliar a citotoxicidade da α -tomatina nas células, por meio do ensaio do MTT;

Averiguar o efeito da α -tomatina na proliferação celular;

Analisar a atuação da α -tomatina na indução apoptótica;

Avaliar o padrão de expressão dos genes *APC*, *β -Catenina*, e *Ciclina A2* envolvidos no controle do ciclo celular, *BAK*, *BAX*, *BCL-XL* e *CASP9* envolvidos na apoptose, após o tratamento com a α -tomatina utilizando da técnica de PCR em Tempo Real.

3. RESULTADOS

Os resultados estão sendo apresentados sob a forma de um artigo submetido para a publicação no periódico *Toxicology in vitro*.

Efeitos da α -tomatina na proliferação celular, apoptose e expressão de RNAm dos genes *APC*, *Ciclina A2*, *Catenina*, *CASP9*, *BAK*, *BAX* e *BCL-XL* em células HT29

Efeitos da α -tomatina na proliferação celular, apoptose e expressão de RNAm dos genes *APC*, *Ciclina A2*, *Catenina*, *CASP9*, *BAK*, *BAX* e *BCL-XL* em células HT29.

Priscila Lumi Ishii¹, Mariana de Oliveira Mauro¹, Daniele Sartori², Sandra Lepri², Mário Sérgio Mantovani², Lúcia Regina Ribeiro^{1*}.

(1) Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular), Instituto de Biociências – UNESP- Rio Claro (SP), Brasil.

(2) Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina (UEL). Londrina (PR), Brasil.

*To whom correspondence should be addressed:

Priscila Lumi Ishii

Phone +55 (41) 9974-1452

e-mail: pri_ishii@hotmail.com

RESUMO

A α -tomatina é um glicoalcalóide esteróide encontrado principalmente em tomates verdes imaturos (*Lycopersicon esculentum*) com funções biológicas importantes, destacando-se a inibição do crescimento de células cancerosas e o efeito antimetastático. O presente estudo teve como objetivo avaliar a citotoxicidade da α -tomatina, os efeitos na proliferação celular, na indução da apoptose morfológica e na expressão de RNAm dos genes *APC*, *Ciclina A2*, *Catenina*, *CASP9*, *BAK*, *BAX* e *BCL-XL* em células HT29 por meio da técnica do qPCR em tempo real. As células HT29 foram tratadas com três concentrações de α -tomatina (0,1, 1 e 10 $\mu\text{g/mL}$), sendo que para a avaliação da expressão gênica utilizou-se apenas a concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$ de α -tomatina. A análise estatística foi realizada por ANOVA/Tukey para o ensaio do MTT. Para o ensaio de cinética de proliferação celular, viabilidade celular e da indução de apoptose utilizou-se ANOVA/Dunnet. Por meio do Software Rest©, foi realizada a análise de expressão gênica. Os resultados dos estudos experimentais indicaram que a α -tomatina foi citotóxica apenas na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$. Na avaliação da proliferação celular houve diferença significativa apenas no tratamento com α -tomatina na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ em que a proliferação celular foi inibida desde as primeiras 24 horas de tratamento. Na análise de apoptose morfológica não houve diferenças significativas em nenhum dos tratamentos avaliados. Com relação aos resultados de expressão gênica, apenas o gene *APC* teve sua expressão alterada, de modo significativo, pelo tratamento com a α -tomatina. Com base nos nossos resultados, podemos sugerir que a α -tomatina possui atividade antiproliferativa nas primeiras 24h de tratamento, não induz a apoptose nessa linhagem celular utilizada e provoca o rompimento das membranas celulares, consequentemente, aumentando a expressão do gene *APC* relacionado ao ciclo celular.

Palavras-chave: α -tomatina; expressão gênica; *APC*, *Ciclina A2*, β -*catenina*, *Caspase-9*, *BAK*, *BAX* e *BCL-XL*.

1. Introdução

Em 2010, estima-se a ocorrência de 487.270 novos casos de câncer, sendo que até o ano de 2008 foram registrados 12,4 milhões de casos e 7,6 milhões de óbitos no mundo, de acordo com a *World Cancer Research Fund* (1997) e o Instituto Nacional do Câncer (2010). No Brasil, o câncer colorretal ocupa o terceiro tipo mais comum, equivalendo a 9,4%, consistindo em 1 milhão de novos casos nos países desenvolvidos (INCA 2010).

A exposição nutricional desde a primeira infância é um determinante importante na expressão fenotípica durante a vida adulta do indivíduo e é provável que afete a vulnerabilidade a doenças crônicas, incluindo o câncer. Estima-se que a dieta influencia de 30 a 40% de todos os casos de cânceres. Por meio da dieta é possível alterar o risco do desenvolvimento da doença, pela modulação dos múltiplos processos envolvidos com o início, incidência, progressão e/ou na severidade. Considera-se também que os componentes dietéticos podem atuar, direta ou indiretamente, na proteção nos diversos estágios do processo do câncer, no genoma humano, alterando a expressão dos genes e seus produtos. Os compostos bioativos dos alimentos podem modificar, simultaneamente, mais de um processo do câncer, incluindo diversos eventos, tais como o metabolismo carcinogênico, balanço hormonal, sinalização celular, controle do ciclo celular, apoptose e angiogênese. Estes componentes bioativos encontrados nos alimentos incluem os nutrientes essenciais (cálcio, zinco, selênio, folato, vitaminas C, D e E), assim como os componentes não-essenciais (carotenoides, flavonoides, indoles, ácidos linoleicos conjugados, e ácidos graxos ω -3) (DAVIS & MILNER, 2004; TRUJILLO *et. al.*, 2006; ARDEKANI & JABBARI, 2009)

Os glicoalcaloides consistem em uma estrutura composta por seis anéis de esteroide (aglicona) com uma molécula de açúcar anexada à posição três do primeiro anel, e um átomo de nitrogênio no final do sexto anel da molécula. Dentre os glicoalcaloides mais conhecidos destacam-se a α -solanina e a α -chaconina da batata e, também a α -tomatina do tomate. O glicoalcaloide encontrado no tomate é o glicoalcaloide esteroidal α -tomatina, que consiste em um tetrassacarídeo ramificado, β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)-[β -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 3)]- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-D-galctose, ligado ao O-3 da aglicona esteroidal, tomatidina. Esse glicoalcaloide é encontrado principalmente em tomates imaturos, contendo uma média de 4 – 7 mg α -tomatina/100 g do fruto fresco, sendo parcialmente degradado de acordo com os níveis de

amadurecimento do fruto. O conteúdo de α -tomatina em tomates maduros varia entre 0,03 – 0,6 mg α -tomatina/100 g do fruto fresco (FRIEDMAN *et al.*, 1994; KEUKENS *et al.*, 1995; BLANKEMEYER *et al.*, 1997; KOZUKUE & FRIEDMAN, 2003; JONES *et al.*, 2005).

A α -tomatina possui propriedades biológicas importantes como antifúngica, antibactericida, antiviral, antimetastático, capacidade de rompimento da membrana celular, redução significativa do colesterol LDL, imunoestimulador e, principalmente, atividade antiproliferativa (BLANKEMEYER *et al.*, 1997; FRIEDMAN *et al.*, 2000; FRIEDMAN, 2002; ITO *et al.*, 2007; LEE *et al.*, 2004; MORROW, 2004; WALKER *et al.*, 2008; FRIEDMAN *et al.*, 2009; SHIH *et al.*, 2009; HEAL & TAYLOR-ROBINSON, 2010).

A apoptose consiste em um evento importante durante o processo de desenvolvimento dos organismos. No entanto, quando não está regulada corretamente pode resultar em doenças como anormalidades no desenvolvimento, doenças autoimunes, neurodegenerativas e câncer (ELMORE, 2007). A morte celular (apoptose) está envolvida no ciclo normal de desenvolvimento e maturação das células, sendo um componente de muitas respostas dos tecidos vivos aos agentes xenobióticos e às modulações endógenas, como inflamação e distúrbios com o suprimento sanguíneo. A apoptose também apresenta papel importante no desenvolvimento, prevenção e terapia do câncer (KANDUC *et al.*, 2002). A manutenção do balanço entre proliferação celular e apoptose é de fundamental importância para a função celular normal. Uma perturbação nesse balanço é a causa primária de tumores (JOHNSTONE *et al.*, 2002).

Considerando os efeitos benéficos da α -tomatina, o presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade antiproliferativa, a capacidade de indução apoptótica e a expressão dos genes relacionados ao controle do ciclo celular *APC*, *β -catenina*, *Ciclina A2* e à apoptose *BAK*, *BAX*, *BCL-XL*, e *caspase-9*, em cultura de células epiteliais de adenocarcinoma intestinal, tratadas com α -tomatina.

2. Materiais e métodos

2.1 Linhagem celular e condições de cultivo

A linhagem de célula intestinal (célula de carcinoma intestinal HT-29) foi adquirida no Banco de Células da Universidade Federal do Rio de Janeiro. As células foram cultivadas em frasco de cultura 25 cm², com meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco)) suplementado com 10% de soro bovino fetal (Gibco), em estufa de CO₂ (5%), ambiente umidificado e a 37°C.

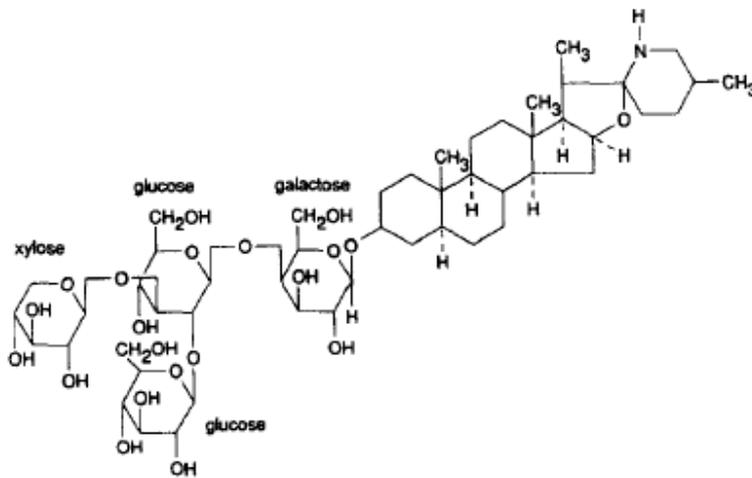
2.2 Agente indutor de danos

Como agente indutor de danos, utilizou-se a Doxorrubicina (CAS: 23214928; Rubex®), um potente agente cancerígeno, preparada em Dimetilsulfóxido (DMSO). A concentração de Doxorrubicina utilizada para o tratamento das células HT 29 foi de 2 µg/mL, definidos previamente em experimentos piloto.

2.3 α -tomatina

A α -tomatina (CAS 17406-45-0) foi utilizada na forma sintética, sendo diluída em Dimetilsulfóxido (DMSO). Foi obtida da *Sigma Chemical Co.*, St. Louis, MO e utilizada em três concentrações (0,1, 1 e 10µg/mL) de tratamento para cada teste, previamente definidas em experimentos piloto.

Figura 2. Fórmula molecular da α -tomatina ($C_{50}H_{83}NO_{21}$)



Fonte: Keukens *et al.*, 1995.

2.4 Ensaio de Citotoxicidade (MTT)

O ensaio de citotoxicidade MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromide] foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Mossman (1983). As células HT 29 foram semeadas em placa de cultivo celular de 96 poços com densidade de $2,0 \times 10^4$ células/poço expostas ao tratamento durante 24h com diferentes concentrações de α -tomatina (0,1 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$ e 10 $\mu\text{g/mL}$), doxorrubicina (2 $\mu\text{g/mL}$) e com PBS e DMSO como veículos controle. Ao final do período de 24h, os tratamentos foram descartados e as células foram lavadas com PBS. Em seguida, as células foram incubadas a 37°C durante 4h com MTT (CAS 298-93-1; Sigma Aldrich; 0,005 g de MTT; 5 mL de PBS; 10 mL de meio de cultura sem soro). Após este período, o meio de cultura foi removido, acrescentou-se DMSO e foi realizada a leitura em Leitor Elisa com filtro de 550 nm. O experimento foi realizado em triplicata.

2.5 Análise da Cinética de Proliferação Celular

Para este ensaio foram semeadas $2,0 \times 10^4$ células em frascos de cultura. As células foram tratadas utilizando indutor de danos (Doxorrubicina $2 \mu\text{g/mL}$), Controle (1% de DMSO), α -tomatina ($0,1 \mu\text{g/mL}$, $1 \mu\text{g/mL}$ e $10 \mu\text{g/mL}$). Esse procedimento foi realizado em quatro tempos (24, 72, 48 e 96h), nos quais as células foram coletadas e contadas na câmara de *Neubauer*. Após a análise, foi possível obter uma curva de proliferação celular. Os experimentos foram realizados em triplicata.

2.6 Análise da Viabilidade Celular pela Técnica de Exclusão de Azul de Tripán

Após a colheita das células nos frascos de cultura e centrifugação, foram obtidos $20 \mu\text{L}$ de suspensão celular no qual foram acrescentados $20 \mu\text{L}$ de Azul de Tripán, obtendo-se o fator de diluição 1:1.

A mistura foi pipetada em câmara de *Neubauer*, analisada com a utilização do microscópio, obtendo-se a porcentagem de viabilidade celular, pela proporção entre o número de células viáveis e células não-viáveis, a qual deveria ser maior ou igual a 80%.

O ensaio foi realizado em triplicata concomitantemente ao ensaio de cinética de proliferação celular.

2.7 Ensaio para Detecção de Apoptose “in situ”

A identificação das células apoptóticas foi realizada pela análise do padrão de fragmentação do DNA nuclear após coloração com alaranjado de acridina. O tratamento das células foi realizado após estabilização em cultura (24h), com as concentrações testadas ($0,1 \mu\text{g/mL}$, $1 \mu\text{g/mL}$ e $2 \mu\text{g/mL}$). A concentração de $2 \mu\text{g/mL}$ foi biologicamente aceita após novos testes com concentrações menores, pois a concentração de $10 \mu\text{g/mL}$ foi considerada letal para

esse ensaio. Após as 24h de tratamento, a colheita foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Rovozzo & Burke (1973).

Após lavagem com PBS, a lamínula foi retirada do tubo de cultura e fixada em fixador de Carnoy por 5 min. mergulhada rapidamente em cada uma das placas contendo concentrações decrescentes de etanol (95% a 25%), seguida pela lavagem com Tampão McIlvaine por 5 min, coloração com alaranjado de acridina (0,01%, 5 min) e nova lavagem com o tampão.

Os experimentos foram realizados em três repetições e 1.500 células foram analisadas por tratamento em microscópio de fluorescência (filtro de excitação de 420-490 nm e filtro de barreira de 520 nm).

2.8 PCR em Tempo Real

As células foram semeadas em frascos de cultura de 25 cm², em uma densidade de 2,0 x 10⁴ células/frasco e incubadas para o crescimento celular durante 24h. Então, foram tratadas durante 12 horas nos seguintes grupos experimentais: (1) controle negativo; (2) α -tomatina 1 μ g/mL.

Em seguida, o RNA total foi extraído com Trizol LS (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Posteriormente, foi realizada a quantificação e análise de integridade do RNA através da eletroforese em gel de agarose 0,8%.

A síntese de cDNA foi realizada pela etapa de transcrição reversa utilizando-se *primer* oligo (dT) (10 pmol/ μ L Prodimol) e transcriptase reversa (M-MLV *reverse transcriptase* – Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante, e então, armazenado a -80°C.

As amostras de cDNA foram quantificadas através do espectrofotômetro (260 nm e 280 nm). Diluiu-se 1 μ L da amostra em 99 μ L de Tampão TE (Tris HCl 0,01M, EDTA 1mM, pH=8,0).

Após a quantificação, foi adicionada em um único microtubo a triplicata da amostra, homogeneizada e redistribuída em três novos microtubos. Esses foram mantidos no freezer -80°C até a realização do PCR em tempo real.

As reações foram montadas em placas de propileno com 96 poços. O ciclo de PCR ocorreu de acordo com o seguinte protocolo: pré-aquecimento em 50°C por 1 min, desnaturação

do cDNA a 95°C por 3 min e 35 ciclos, compostos de 95°C por 20 segundos; anelamento dos *primers* a 60°C durante 30 segundos, e extensão a 72°C, por 20 segundos. As curvas de dissociação foram estabelecidas da seguinte forma: 95°C por 15 segundos, 60°C por 20 segundos e 95°C por 15 segundos. A análise da curva de *melting* foi realizada no final da reação com temperatura que variou de 50°C a 95°C a cada 0,5°C por 5 segundos.

Os tratamentos foram avaliados em duplicata e as reações foram realizadas no termociclador *PTC 200 DNA Engine Cycler*, usando o sistema de detecção Chromo4 (*MJ Research*), utilizando conjuntos de *primers* (*APC*, *Ciclina A2*, *β -catenina*, *CASP9*, *BAK*, *BAX* e *BCL-XL*) e o gene normalizador *primers* para gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (*GAPDH*) amplificados em cada conjunto de experimentos de PCRs, descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Sequência de primers utilizados na reação de PCR em Tempo Real

Gene	Primers
<i>GAPDH</i>	F: 5' GAA GGT GAA GGT CGG AGT C 3' R: 5' GGA AGA TGG TGA TGG GAT TT 3'
<i>APC</i>	F: 5' AAA GCG CCA TGA TAT TGC ACG GCT 3' R: 5' TGT TTG CTG TGC TCA CGT TTC CAG 3'
<i>β- Catenina</i>	F: 5' CCT ATG CAG GGG TGG TCA AC 3' R: 5' CGA CCT GGA AAA CGC CAT CA 3'
<i>BAK</i>	F: 5' CAA GAT TGC CAC CAG CCT GTT TGA 3' R: 5' ATG CAG TGA TGC AGC ATG AAG TCG 3'
<i>BAX</i>	F: 5' TTT CTG ACG GCA ACT TCA ACT GGG 3' R: 5' TGT CCA GCC CAT GAT GGT TCT GAT 3'
<i>BCL-XL</i>	F: 5' TGG GCT CAC TCT TCA GTC GGA AAT 3' R: 5' ATG TAG TGG TTC TCC TGG TGG CAA3'

<i>CASP9</i>	F: 5' GCT CTT CCT TTG TTC ATC TCC3'
	R: 5' GTT TTC TAG GGT TGG CTT CG3'
<i>Ciclina A2</i>	F: 5' GAC CCT GCA TTT GGC TGT G 3'
	R: 5' ACA AAC TCT GCT ACT TCT GG 3'

2.9 Análise Estatística

A análise estatística do ensaio do MTT foi realizada pela análise de variância (ANOVA), seguida do teste de *Tukey* ($\alpha=0,05$), pelo Programa *GraphPad Instat*.

Os dados obtidos no ensaio de cinética de proliferação celular, viabilidade celular e avaliação da indução de apoptose foram analisados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA), seguida do teste de *Dunnet* ($\alpha=0,05$), pelo Programa *GraphPad Instat*.

Os níveis de expressão dos genes em estudo foram analisados pelo *Software Rest* (PFAFLL *et al.*, 2002), através do cálculo estimado pelo método $\Delta\Delta C_t$ (PFAFLL, 2001).

3. Resultados

3.1 Ensaio do MTT

Na Figura 3 estão apresentados os valores de absorbância (média \pm desvio-padrão) obtidos pelo ensaio do MTT após tratamento com a α -tomatina a várias concentrações (0,1, 1 e 10 $\mu\text{g/mL}$) em células HT29 por 24h. Os valores apresentados pelo tratamento com a α -tomatina na concentração de 0,1 $\mu\text{g/mL}$, não apresentou diferenças significativas em relação ao controle. Já na concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$, observa-se que houve diferença significativa em relação ao controle. Quando as células foram tratadas com 10 $\mu\text{g/mL}$, houve morte celular, indicando que a

α -tomatina nessa concentração é citotóxica. Pode-se verificar que com o aumento da concentração da α -tomatina há efeito inibitório das células.

3.2 Ensaio de Proliferação Celular

A Figura 4 apresenta a cinética de proliferação celular de cada tratamento, nos tempos de 24, 48, 72 e 96h. Nos tratamentos com o agente indutor e nas concentrações de 0,1, 1 e 10 $\mu\text{g/mL}$ de α -tomatina houve diferenças significativas entre os tratamentos no tempo de 24h em relação ao controle. Na maior concentração avaliada (10 $\mu\text{g/mL}$) não houve aumento da proliferação celular nas primeiras 24h de tratamento. Após 48h de tratamento não houve nenhum aumento significativo na proliferação das células. Após 72h de tratamento, notou-se diminuição na proliferação celular das células tratadas com o agente indutor de danos, quando comparadas ao controle. Nas concentrações de 0,1 e 1 $\mu\text{g/mL}$ de α -tomatina houve aumento da proliferação celular sem diferenças significativas em relação ao controle. No tratamento de 96h, houve diferenças significativas quando comparamos a taxa de proliferação do controle com a das células tratadas com a maior concentração de α -tomatina e o agente indutor doxorrubicina. Nas concentrações de 0,1 e 1 $\mu\text{g/mL}$ de α -tomatina houve aumento da proliferação celular, porém sem diferença significativa em relação ao controle.

3.3 Viabilidade Celular

A viabilidade celular das células tratadas nas concentrações 0,1 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$ de α -tomatina apresentou-se superior a 80% em todos os tempos de tratamento. No entanto, na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ as células apresentaram viabilidade celular de 0% em todos os tempos de tratamento. As células que foram tratadas com o agente doxorrubicina apresentaram viabilidade celular abaixo de 80% apenas no tempo de 96h. Esses dados são ilustrados na Tabela 2.

3.4 Apoptose

Na Figura 5, estão apresentadas as porcentagens de células apoptóticas e não apoptóticas. Observa-se que não houve alteração da taxa apoptótica em nenhum dos tratamentos com α -tomatina (concentrações de 0,1, 1, 2 $\mu\text{g/mL}$), quando comparados ao controle. Apenas o agente indutor apresentou aumento significativo em relação ao grupo controle.

3.5 PCR em Tempo Real (PCR-RT)

3.5.1 Expressão do Gene APC

Na Figura 6 está apresentada a expressão relativa do gene *APC*. De acordo com a análise estatística, fazendo-se a normalização pelo gene constitutivo, encontrou-se que no tratamento com α -tomatina houve aumento de 2,26 vezes da expressão do gene *APC* em relação ao controle, sendo significativo estatisticamente.

3.5.2 Expressão do Gene β -catenina

A Figura 6 representa o dado de expressão relativa do gene *β -catenina*. Analisando-se os valores relativos da expressão deste gene e fazendo-se a normalização pelo gene constitutivo, observou-se que o tratamento com α -tomatina levou ao aumento de 1,64 vezes na expressão, em relação ao controle, não sendo considerado significativo estatisticamente.

3.5.3 Expressão do Gene BAK

Na Figura 6, está apresentada a expressão relativa do gene *BAK*. Analisando-se o valor relativo do gene e fazendo-se a normalização pelo gene constitutivo, que no tratamento com α -

tomatina comparado ao controle, o tratamento com α -tomatina aumentou 1,71 vezes a expressão do gene *BAK*. No entanto esse aumento não foi significativo estatisticamente.

3.5.4 Expressão do Gene *BAX*

A Figura 6 mostra a expressão relativa do gene *BAX*. Analisando-se o valor relativo da expressão do gene e fazendo-se a normalização pelo gene constitutivo, observou-se que no tratamento com α -tomatina houve aumento de 1,11 da expressão do gene *BAX*, porém esse aumento não foi significativo estatisticamente.

3.5.5 Expressão do Gene *BCL-XL*

Na Figura 6 está apresentada a expressão relativa do gene *BCL-XL*. Analisando-se o valor relativo de expressão e fazendo-se a normalização pelo gene constitutivo *GPDH*, encontrou-se que no tratamento com α -tomatina houve diminuição 0,94 vezes da expressão do gene, no entanto esta inibição não foi significativa estatisticamente.

3.5.6 Expressão do Gene *caspase-9*

A Figura 6 representa a expressão relativa do gene *caspase-9*. A análise dos valores relativos da expressão deste gene e a normalização pelo gene constitutivo indicam que o tratamento com α -tomatina levou ao aumento de 1,42 vezes na expressão em relação ao controle, sendo considerado não significativo estatisticamente

3.5.7 Expressão do Gene *ciclina A2*

A expressão relativa do gene *ciclina A2* está representado na Figura 6. De acordo com a análise estatística e fazendo-se a normalização pelo gene constitutivo encontrou-se que o

tratamento com α -tomatina reprimiu 0,90. Contudo este valor não foi considerado significativo estatisticamente.

4. Discussão

Os glicoalcaloides são compostos que consistem de um nitrogênio esteroidal contendo aglicona. A α -tomatina, um dos principais glicoalcaloides do tomate (*Lycopersicon esculentum*), tem sido descrita por exercer diversos efeitos benéficos, tanto biológicos, como nutricionais e farmacológicos. Dentre as principais atividades da α -tomatina destacam-se a sua ação como adjuvante imunológico, atividade antifúngica e antibactericida, efeito anticolesterolêmico, precursor para síntese de vários hormônios esteroides, e, principalmente, o potencial anticarcinogênico, atividade antimetastática e citostática em diferentes linhagens celulares de câncer (FRIEDMAN, 2002; LEE *et al.*, 2004; MORROW *et al.*, 2004; HANSON, 2006; SIMONS *et al.*, 2006; ITO *et al.*, 2007).

Atualmente tem se dado grande importância na atenção da segurança alimentar de compostos químicos, por meio de avaliação, identificação e controle do conteúdo dos alcaloides dos alimentos, os quais, em certas quantidades, podem ser considerados tóxicos.

No entanto, apesar da α -tomatina apresentar grande potencial no rompimento de membranas celulares, este glicoalcaloide não se mostrou tóxico por consumo via oral, em ratos (FRIEDMAN *et al.*, 2000). Esse fato pode ser explicado pela fraca absorção no trato digestivo para a corrente sanguínea, na formação de um complexo insolúvel entre a α -tomatina e o colesterol endógeno, que logo em seguida é eliminado pelas fezes. Roddick (1979) demonstrou que tanto a mistura dos glicoalcaloides esteroides da batata como a α -tomatina possuem a capacidade de formarem complexos com esteróis como o colesterol, sitosterol, estigmaesterol campesterol e ergosterol.

No presente estudo, a citotoxicidade da α -tomatina foi avaliada utilizando-se três diferentes concentrações (0,1, 1 e 10 μ g/mL) em células HT29, através do Ensaio do MTT em 24h de tratamento. Observou-se que a concentração do agente indutor de danos utilizada no presente estudo apresentou citotoxicidade. Os resultados, apresentados na Figura 3, permitem observar que o tratamento com a concentração de 0,1 μ g/mL de α -tomatina não foi citotóxico. No entanto,

os tratamentos nos quais foram utilizadas as concentrações de 1 µg/mL e 10 µg/mL de α -tomatina apresentaram diferenças estatisticamente significativas, com relação à toxicidade, quando comparados ao tratamento controle. Em contrapartida, os ensaios de proliferação celular mostraram que, embora nas primeiras 24h de tratamento houvesse um efeito inibitório da proliferação celular para os tratamentos com 0,1 e 1 µg/mL, nos tempos de 48, 72 e 96h houve aumento da proliferação celular, corroborando os resultados de viabilidade celular apresentados posteriormente.

Na concentração de 10 µg/mL as células semeadas sofreram morte e não proliferaram desde o início do período de tratamento permanecendo até o final dessa forma.

No ensaio de viabilidade celular, realizado em conjunto com o ensaio acima mencionado, os resultados mostraram que, para as concentrações de 0,1 e 1 µg/mL, mais de 80% das células foram viáveis, confirmando assim que não ocorreu morte celular, mas inibição da proliferação celular. De forma contrária, na concentração de 10 µg/mL, as células não foram viáveis desde as primeiras 24h de tratamento.

Lee *et al.* (2004) realizaram um estudo para avaliar a atividade antiproliferativa dos glicoalcaloides α -chaconina, α -solanina e α -tomatina em várias linhagens celulares, em três tempos diferentes (4h, 24h e 48h). A α -tomatina foi testada em cinco concentrações diferentes (0,1, 0,5, 1, 5 e 10 µg/mL) e os autores observaram que a α -tomatina inibiu de 60,6% a 86,9% a proliferação das células HT 29 em 24h de tratamento. No entanto, de forma contrária a este presente estudo, no tempo de 48h os autores observaram que houve inibição de 65,6% a 86,5% de proliferação das células HepG2. Já em células da linhagem HT29, a mesma utilizada no presente estudo, os autores observaram inibição do crescimento celular de 38%, na concentração de 0,1 µg/mL, 59,9% na concentração de 1 µg/mL e 81,5% na concentração de 10 µg/mL, em 4h de tratamento com a α -tomatina.

Em outro estudo, realizado por Friedman *et al.* (2009), a α -tomatina inibiu a proliferação das linhagens celulares do câncer de mama (MCF-7), de cólon (HT-29), de adenocarcinoma gástrico (AGS), e de hepatoma (HepG2), mostrando-se mais efetiva que a tomatidina, o tomatidenol e a dehidrotomatina, apesar da α -tomatina apresentar similaridade com a estrutura da dehidrotomatina.

Um estudo recente (SHIH *et al.*, 2009), realizado em células de adenocarcinoma de pulmão A549, mostrou que a α -tomatina tem o potencial de inibir a habilidade metastática destas

células, pela redução das atividades da metaloproteinase de matriz-2 (MMP-2), metaloproteinase de matriz-9 (MMP-9) e ativados de plasminogênio tipo uroquinase (u-PA); pela supressão do fosfoinositídeo 3-quinase/Akt (PI3K/Akt) ou a via de sinalização ERK1/2 e pela inibição da NF- κ B ou AP1 (SHIH *et al.*, 2009).

Com o objetivo de compreender melhor os mecanismos quimiopreventivos da α -tomatina considera-se que vários eventos moleculares são responsáveis, incluindo a formação do complexo com o colesterol e destruição direta de células cancerosas pelo rompimento das membranas celulares (BLANKENMEYER *et al.*, 1997; FRIEDMAN *et al.*, 2000).

Para uma melhor compreensão dos efeitos da α -tomatina, relacionados ao ciclo celular, investigamos o mecanismo de ação desta molécula por meio do estudo da expressão relativa dos genes *APC* (Adematosis polyposis coli), *β -catenina* e *ciclina A2*.

As mutações somáticas são comumente encontradas na maioria dos tumores colorretais, e o gene *APC* é geralmente expresso no câncer de cólon avançado, apresentando múltiplas funções celulares como o envolvimento na via de sinalização Wnt e adesão intercelular. A proteína APC está envolvida no ciclo celular, atuando como regulador negativo dos níveis de β -catenina, na transformação das células epiteliais do cólon e na progressão do melanoma. As vias de sinalização Wnt regulam um complexo composto pela axina, APC, β -catenina, e glicogênio sintase quinase-3 β (GSK3 β). A axina liga-se formando um complexo com o APC, β -catenina e GSK3 β para promover a fosforilação da β -catenina e subsequente ligação com β -TRCP, que faz a mediação da ubiquitinação e degradação da β -catenina no proteossomo. O GSK3 β regula este processo pela fosforilação da β -catenina, APC e complexo axina; e a ativação das vias de sinalização Wnt inibe o GSK3 β estabilizando β -catenina (SIEBER *et al.*, 2000; FEARNHEAD *et al.*, 2001; NARAYAN & ROY, 2003; KAPITANOVIC *et al.*, 2006; JAISWAL & NARAYAN, 2008).

Por outro lado, a APC também é reportada por estar envolvida na integridade do citoesqueleto, na adesão intercelular e na migração celular. Com o desequilíbrio da integridade do citoesqueleto da actina, podem ocorrer a perturbações nas junções entre células e na migração celular. O papel da proteína APC na manutenção do citoesqueleto da actina está relacionado à sua interação com a β -catenina que estabelece uma ligação entre o APC e a actina (SU *et al.*, 1993; BEHRENS *et al.*, 1998; IKEDA *et al.*, 1998).

Narayan & Roy (2003) relatam que o domínio terminal C da E-caderina interage com a β e γ -catenina, que se associa com a α -catenina e forma um complexo envolvendo a E-caderina com a actina do citoesqueleto, que mantém a adesão intercelular estável. Se a via Wnt e as vias dos receptores de fator de crescimento epidérmico (EGFR) ou c-Met são ativadas ao mesmo tempo, a degradação da β -catenina pode ser inibida e a mesma pode translocar-se para o núcleo. Desse modo, essas interações podem resultar na redução da E-caderina que faz mediação nas junções intercelulares e na migração das células. O deslocamento da β -catenina para o núcleo ocorre naturalmente, mediante sinais externos para promover a proliferação. No entanto, quando ocorre mutação do gene *APC*, esta acarreta a perda do controle da β -catenina, levando ao aumento exacerbado da sua concentração no citoplasma e seu deslocamento aumentado para o núcleo. Na maioria dos cânceres de cólon intestinal, como é no caso da HT29, a mutação do gene *APC* é encontrada, ou seja, o produto proteico desse gene não é funcional, o que causa o descontrole da proliferação celular (CAVALARO *et al.*, 2002; GILES *et al.*, 2003).

Tomando como base os resultados observados no estudo realizado por nós, observa-se que houve aumento da expressão do gene *APC*, bem como do gene da β -catenina, em culturas tratadas com α -tomatina. Supõe-se que a atuação deste glicoalcaloide possa estar envolvida no rompimento das membranas celulares, provocando a alteração da expressão dos genes envolvidos no ciclo celular e, conseqüentemente, levando à diminuição do número de células durante este período de tratamento (12h). Dessa forma, os resultados de proliferação celular nas primeiras 24h de tratamento corroboram os resultados relacionados à expressão gênica. Ademais, o aumento da expressão do gene β -catenina, embora não seja significativo, possivelmente, seja pelo aumento da demanda, pelo aumento da expressão do gene *APC*.

Como já se sabe, células tumorais apresentam como característica principal a desregulação do ciclo celular, levando à divisão celular descontrolada e ao aumento da proliferação. As ciclinas são pertencentes a uma grande família de proteínas que atuam diretamente em vários níveis na regulação do ciclo celular. A ciclina A2, por sua vez, desempenha papel fundamental na iniciação e progressão da replicação do DNA, bem como na progressão do ciclo celular na transição da fase G1/S e G2/M (PAGANO *et al.*, 1992). No presente estudo, o tratamento com 1 μ g/mL de α -tomatina suprimiu a expressão da *ciclina A2* em células HT29, embora não sendo considerado significativo.

Wang *et al.* (2009) sugerem que a desregulação da expressão da *ciclina A2* está intimamente ligada aos eventos precoces na transformação do tumor, e a supressão desta é considerada natural em vários tipos de cânceres humanos, em relação às células e aos tecidos normais. No entanto, os nossos resultados mostram que a α -tomatina não interferiu na expressão do gene *ciclina A2*.

Como parte dos nossos objetivos, analisamos também, a apoptose, pela análise em microscopia de fluorescência e pela análise da expressão dos genes *BAK*, *BAX*, *BCL-XL* e *caspase-9*. Os resultados experimentais obtidos nesse estudo demonstraram que não houve indução da apoptose, seja pela análise nas mudanças fisiológicas das células apoptóticas como condensação da cromatina, formação de corpos apoptóticos, fragmentação do DNA nuclear, ou pelo aumento da expressão dos genes avaliados. Duas importantes vias de sinalização controlam a iniciação da apoptose em mamíferos, a via extrínseca, que consiste no comprometimento dos receptores da superfície das células por ligantes pertencentes ao fator de necrose tumoral (TNF); e a via intrínseca que envolve o rompimento das membranas mitocondriais. As proteínas da família Bcl-2 desempenham o papel como reguladores centrais da apoptose, sendo divididos em proteínas antiapoptóticas (Bcl-2, Bcl-xl e Bcl-w, Mcl-1 e A1/Bfl-1) e pró-apoptóticas (Bax, Bak, Bok, Bik, Bad, Bid, Bim/Bod e Hrk). Assim como as proteínas Bcl-2 e Bcl-xl representam importantes inibidores da apoptose, as proteínas Bak e Bax induzem à morte celular programada. Dentre os membros da família Bcl-2, o Bax é sugerido por ser o principal regulador da maquinaria apoptótica, transcricionalmente ativados por moléculas, como os supressores de tumor p53 (KIM *et al.*, 2004; NEHLS *et al.*, 2007).

Assim como a Bak, a proteína pró-apoptótica Bax pode inserir-se na membrana mitocondrial externa, ligando a caspase-2 ativa com a mitocôndria, dessa forma permeabilizando a membrana e desencadeando a liberação de fatores apoptóticos como o citocromo C e a ativação da caspase-9. A superexpressão desta proteína, também leva à morte celular (ERMAK *et al.*, 2008).

Em contrapartida, alguns autores propuseram que a regulação do programa de suicídio da célula em resposta ao estresse depende da interação dinâmica entre as proteínas Bcl-2 e Bax. Se há aumento relativo dos níveis de Bax, o resultado é a morte celular, enquanto que níveis relativos mais elevados do Bcl-2 podem inibir este programa em relação aos estresses genotóxicos, possivelmente pela célula adquirir resistência à morte celular induzida pela

disfunção mitocondrial e do retículo endoplasmático (MURAKAMI *et al.*, 2007; NEHLS *et al.*, 2007).

Vários estímulos apoptóticos induzem à liberação do citocromo C para mitocôndria, sendo controlado pelas proteínas da família Bcl-2. A formação do apoptossomo (controla a via intrínseca da apoptose) é induzida pela liberação do citocromo C no citosol que associa-se ao Apaf-1, e, dessa forma, promove sua oligomerização e recrutamento da caspase-9. A caspase-9 ativada dá início a uma cascata de ativação das caspases pela clivagem e ativação de caspases efetoras, como a caspase-3, que são responsáveis pela demolição da célula (FERGUSON *et al.*, 2003; HE *et al.*, 2004; VOHRA *et al.*, 2004; BRADY *et al.*, 2005).

Estudos recentes revelaram que os aumentos da expressão dos genes *BAK* e *BAX* causam apoptose em células cancerosas (SUYAMA *et al.*, 2002). No caso do presente estudo, houve aumento da expressão do gene *BAK*, *BAX* e *caspase-9*, e supressão do gene *BCL-XL*, sugerindo que o aumento ou diminuição na expressão gênica considerada não significativa, não tenha sido suficiente para que houvesse alterações nas células e, conseqüentemente, não levando a célula à apoptose, corroborando os dados obtidos na análise morfológica.

As variações de resultados obtidos nos estudos aqui apresentados em relação às bibliografias encontradas podem ser justificadas pelo uso de diferentes linhagens celulares, mostrando que diferentes tecidos e órgãos não respondem do mesmo modo ao tratamento com a α -tomatina, e que alguns tipos de câncer são mais resistentes à morte celular por apoptose.

Frente a estes dados, a presente pesquisa auxilia na compreensão e abre novas perspectivas para estudos de nutrigenômica que permitirão melhor entendimento dos mecanismos de ação da α -tomatina.

REFERÊNCIAS

ARDEKANI, A. L.; JABBARI, S. Nutrigenomics and cancer. **Avicenna J. Med. Biotech.**, v. 1, n. 1, p. 9 – 17, 2009.

BEHRENS, J. et al. Functional interaction of an axin homolog, conductin, with β -catenin, APC and GSK3 β . **Science**, v. 280, n. 5363, p. 596 – 599, 1998.

BLANKEMEYER, J. T. et al. Effect of α -tomatine and tomatidine on membrane potential of frog embryos and active transport of ions in frog skin. **Food Chem. Toxicol.**, v. 35, n. 7, p.639 – 646, 1997.

BRADY, S. C.; ALLAN, L. A.; CLARKE, P. R. Regulation of Caspase 9 through Phosphorylation by Protein Kinase C Zeta in Response to Hyperosmotic Stress. **Mol. and Cell. Bio.**, v. 25, n. 23, p. 10543 – 10555, 2005.

CAVALARO, U.; SCHAFHAUSER, B.; CHRISTOFORI, G. Cadherins and the tumour progression: is it all in a switch? **Cancer Lett.**, v. 176, n. 2, p. 123 – 128, 2002.

DAVIS, C. D.; MILNER, J. Frontiers in nutrigenomics, proteomics, metabolomics and cancer prevention. **Mutat. Res.**, v. 551, n. 1-2, p. 51 – 64, 2004.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicol. Pathol.**, v. 35, n. 4, p.495 – 516, 2007

ERMAK, N. et al. Role of reactive oxygen species and Bax in oxidized low density lipoprotein-induced apoptosis of human monocytes. **Atherosclerosis**, v. 200, n. 2, p. 247 – 256, 2008.

FEARNHEAD. N. S.; BRITTON, M. P.; BODMER, W. F. The ABC of APC. **Hum. Mol. Genet.**, v. 10, n. 7, p. 721 – 733, 2001.

FERGUSON, H. A.; MARIETTA, P. M.; VAN DEN BERG, C. L. UV-induced Apoptosis Is Mediated Independent of Caspase-9 in MCF-7 Cells. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 14, p. 45793 – 45800, 2003.

FRIEDMAN, M.; LEVIN, C. E.; MCDONALD, G. M. α -tomatine determination in tomatoes by HPLC using pulsed amperometric detection. **J. Agric. Food Chem.**, v. 42, n. 9, p.1959 – 1964, 1994.

FRIEDMAN, M.; FITH, T. E.; YOKOYAMA, W. H. Lowering of plasma LDL cholesterol in hamsters by the tomato glycoalkaloid tomatine. **Food Chem. Toxicol.**, v. 38, p. 549 – 553, 2000.

FRIEDMAN, M. Tomato glycoalkaloids: Role in the plant and in the diet. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, n. 21, p. 5751 – 5780, 2002.

FRIEDMAN, M. et al. Tomatine-containing green tomato extracts inhibit growth of human breast, colon, liver, and stomach cancer cells. **J. Agric. Food Chem.**, v. 57, n.13, p. 5727 – 5733, 2009.

GILES, R. H.; van ES, J. H.; CLEVERS, H. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 1653, n. 1, p. 1 – 24, 2003.

HANSON, J. R. Steroids: partial synthesis in medicinal chemistry. **Nat. Prod. Rep.**, v. 23, p. 886 – 892, 2006.

HE, Q.; HUANG, Y.; SHEIKH, S. Bax deficiency affects caspase-2 activation during ultraviolet radiation-induced apoptosis. **Oncogene**, v. 23, p. 1321–1325, 2004.

HEAL, K.; TAYLOR-ROBINSON, A. W. Tomatine adjuvantation of protective immunity to a major pre-erythrocytic vaccine candidate of malaria is mediated via CD8⁺ T cell release of IFN- γ . **J. Biomed. Biotech.**, v. 2010, p. 1 – 7, 2010.

IKEDA, S. et al. Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3 β and β -catenin and promotes GSK-3 β - dependent phosphorylation of β -catenin. **EMBO J.**, v. 17, p. 1371 – 1384, 1998.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **Estimativa, 2010**. Disponível em: http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/index.asp?link=conteudo_view.asp&ID=5. Acesso em: 15 de janeiro de 2011.

ITO, S. et al. α -Tomatine, the major saponin in tomato, induces programmed cell death mediated by reactive oxygen species in the fungal pathogen *Fusarium oxysporum*. **FEBS Letters**, v. 581, p. 3217 – 3222, 2007.

JAISWAL, A. S.; NARAYAN, S. A novel function of adenomatous polyposis coli (APC) in regulating DNA repair. **Cancer Lett.**, v. 271, n. 2, p. 272 – 280, 2008.

JOHNSTONE, R. W. et al. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. **Cell**, v.108, p.153-64, 2002.

JONES, N. A.; NEPOGODIEV, S. A.; FIELD, R. A. Efficient synthesis of methyl lycotetraoside, the tetrasaccharide constituent of the tomato defence glycoalkaloid α -tomatine. **Org. Biomol. Chem.**, v. 3, p. 3201 – 3206, 2005.

KANDUC, D. et al. Cell death: apoptosis versus necrosis (review). **Int J Oncol**, v.21, p. 165-70, 2002.

KAPITANOVIC, S. et al. Effect of indomethacin on E-cadherin and b-catenin expression in HT-29 colon cancer cells. **Exp. Mol. Pathol.**, v. 80, n.1, p. 91 – 96, 2006.

KAPUT, J. Nutrigenomics, 2006 update. **Clin. Chem. Lab. Med.**, v. 45, p. 279 – 287, 2007.

KEUKENS, E. A. J. et al. Molecular basis of glycoalkaloid induced membrane disruption. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1240, p. 216–228, 1995.

KIM, J. K. et al. Enhanced apoptosis by a novel gene, Bak-like, that lacks the BH3 domain. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 316, p. 18 – 23, 2004.

KOZUKUE, N; FRIEDMAN, M. Tomatine, chlorophyll, β -carotene and lycopene content in tomatoes during growth and maturations. **J. Sci. Food Agric.**, v. 83, p. 195 – 200, 2003.

LEE, K-R. et al. Glycoalkaloids and metabolites inhibit the growth of human (HT29) and liver (HepG2) cancer cells. **J. Agric. Food. Chem.**, v. 52, n. 10, p. 2832 – 2839, 2004.

MORROW, W. J. W.; YANG, Y-W.; SHEIKH, N. A. Immunobiology of the tomatine adjuvant. **Vaccine**, v. 22, n. 19, p. 2316 – 2327, 2004.

MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation cytotoxic assays. **J. Immunol. Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55 – 63, 1983.

MURAKAMI, Y. et al. Suppression of endoplasmic reticulum stress-induced caspase activation and cell death by the overexpression of Bcl-xL or Bcl-2. **J. Biochem.**, v. 141, n. 3, p. 401 – 410, 2007.

NARAYAN, S.; ROY, D. Role of APC and DNA mismatch repair genes in the development of colorectal cancers. **Mol. Cancer**, v. 2, n. 41, p.1 – 15, 2003.

NEHLS, O. et al. Studies on p53, BAX and Bcl-2 protein expression and microsatellite instability in stage III (UICC) colon cancer treated by adjuvant chemotherapy: major prognostic impact of proapoptotic BAX. **Br. J. Cancer**, v. 96, n. 9, p. 1409 – 1418, 2007.

PAGANO, M. et al. Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. **EMBO J.**, v. 11, n. 3, p. 961 – 971, 1992.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res.**, v. 29, n. 9, 2001.

PFAFFL, M. W.; HORGAN, G. W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Res.**, v. 30, n. 9, 2002.

RODDICK, J. G. Complex formation between solanaceous steroidal glycoalkaloids and free sterols in vitro. **Phytochemistry**, v. 18, p. 1467 – 1470, 1979

ROVOZZO, G. C; BURKE, C. N. **A manual of basic virological techniques**. New Jersey: Prentice Hall, 1973. p. 159.

SHIH, Y. W. et al. Alpha-tomatine inactivates PI3K/ Akt and ERK signaling pathways in human lung adenocarcinoma A549 cells: effect on metastasis. **Food Chem. Toxicol.**, v. 47, n. 8, p. 1985 – 1995, 2009.

SIEBER, O. M.; TOMLINSON, I. P.; LAMLUM, H. The adenomatous polyposis coli (APC) tumour suppressor – genetics, function and disease. **Mol. Med. Today**, v. 6, n. 12, p. 462 – 469, 2000.

SIMONS, V. et al. Dual effects of plant steroidal alkaloids on *Saccharomyces cerevisiae*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 50, n. 8, p. 2732 – 2740, 2006.

SU, L. K.; VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K. W. Association of the APC tumor suppressor protein with catenins. **Science**, v. 262, n. 5140, p. 1734 – 1737, 1993.

SUYAMA, E.; KAWASAKI, H.; TAIRA, K. Identification of caspase 3-independent role of pro-apoptotic factor Bak in TNF- κ -induced apoptosis. **FEBS Letters**, v. 528, p. 63 – 69, 2002.

TRUJILLO, E.; DAVIS, C.; MILNER, J. Nutrigenomics, Proteomics, Metabolomics, and the Practice of Dietetics. **J. Am. Diet Assoc.**, v. 106, n. 3, p. 403 – 413, 2006.

VOHRA, B. P. S. et al. Focal caspase activation underlies the endplate myopathy in slow channel syndrome. **Ann. Neurol.**, v. 55, p. 347 – 352, 2004.

WALKER, B. W.; MANHANKE, N.; STINE, K. J. Comparison of the interaction of tomatine with mixed monolayers containing phospholipid, egg sphingomyelin and sterols. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 1778, n. 10, p. 2244 – 2257, 2008.

WANG, X. et al. Knocking-Down Cyclin A₂ by siRNA suppresses apoptosis and switches differentiation pathways in K562 cells upon administration with doxorubicin. **Plos One**, v. 4, n. 8, p. 1– 10, 2009.

World Cancer Research Fund. **Food, nutrition and prevention of cancer: A global perspective**. Washington: American Institute for Cancer Research; 1997. p. 35 – 71, 508 – 540.

Tabela 2. Médias da porcentagem de viabilidade celular e desvio padrão de células HT29 tratada por três diferentes concentrações de α -tomatina nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas.

Tratamento	Tempo de tratamento			
	24h	48h	72h	96h
Controle	96,75 \pm 0,999	97,59 \pm 2,853	90,89 \pm 14,41	98,00 \pm 2,828
Doxorrubicina	88,53 \pm 4,676	97,22 \pm 4,815	93,33 \pm 11,54	66,66 \pm 57,73
α -tomatina 0,1 μ g/mL	99,20 \pm 1,380	97,11 \pm 2,670	100,00 \pm 0,00	100,00 \pm 0,00
α -tomatina 1 μ g/mL	100,00 \pm 0,00	97,13 \pm 3,432	98,43 \pm 2,213	97,56 \pm 0,00
α -tomatina 10 μ g/mL	00,00 \pm 0,00	00,00 \pm 0,000	00,00 \pm 0,00	00,00 \pm 0,00

Legenda: Controle – 0,1% DMSO; Doxorrubicina – 2 μ g/mL.

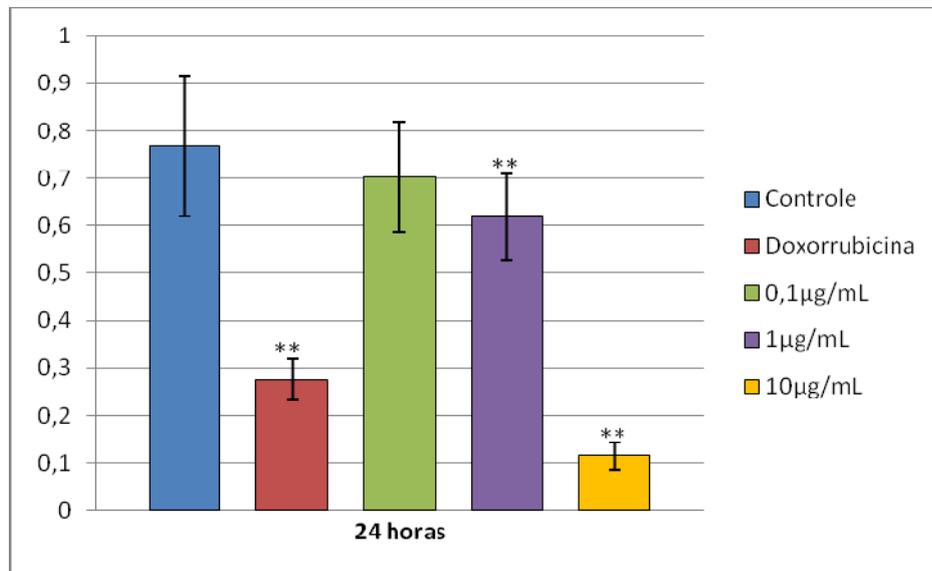


Figura 3. Valores das absorbâncias encontrados no Ensaio do MTT após 24 horas de tratamento com α -tomatina em células HT29. Legenda: Controle – 0,1% DMSO; Doxorrubicina – 2µg/mL. **p<0,01; diferença significativa em relação ao controle (Teste ANOVA/Dunnet).

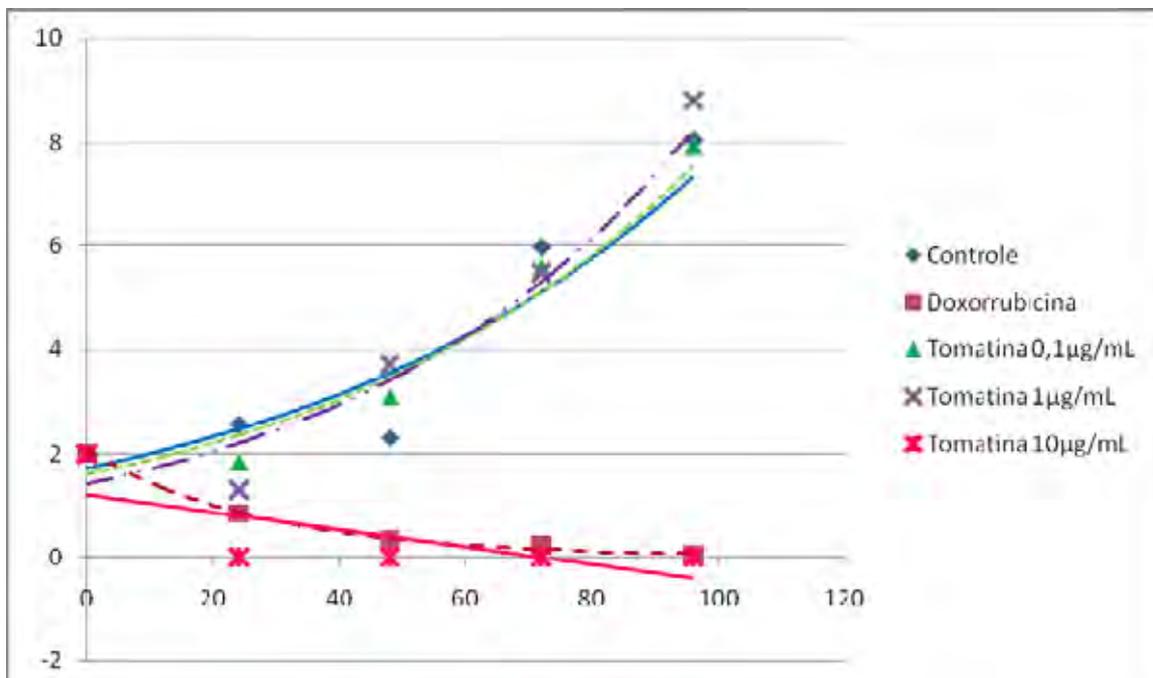


Figura 4. Cinética de proliferação celular observada nos tratamentos de α -tomatina em três concentrações nos tempos de 24, 48, 72 e 96h em células HT-29 (Nº de células x 10⁴). Legenda: Controle – 0,1% DMSO; Doxorrubicina – 2µg/mL; Tomatina 0,1 – 0,1µg/mL; Tomatina 1 – 1µg/mL; Tomatina 10 – 10µg/mL. **p<0,01; diferença significativa em relação ao controle (Teste ANOVA/Dunnet).

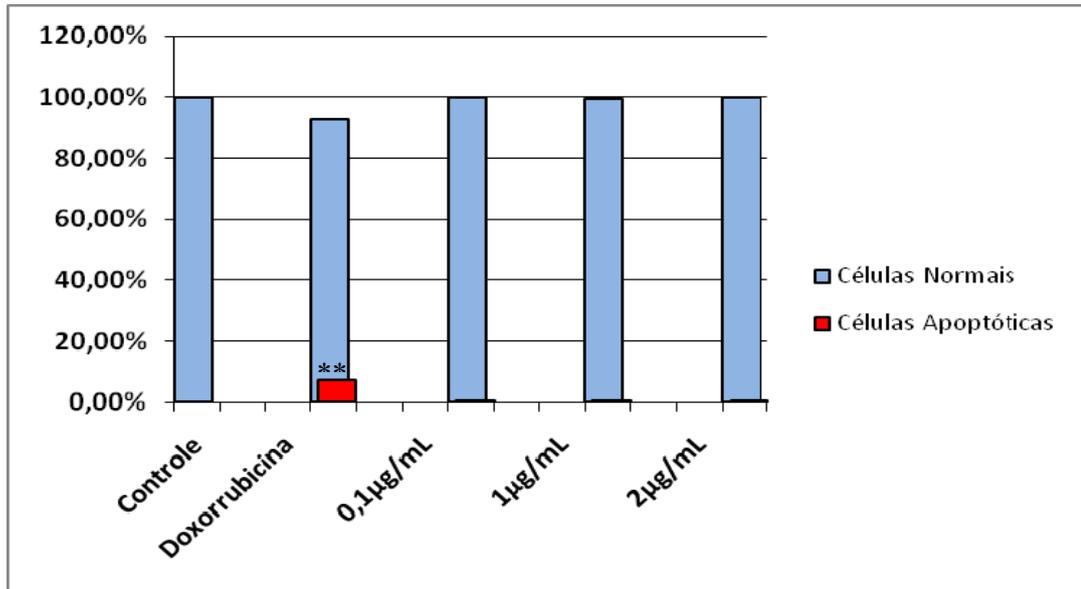


Figura 5. Frequência média de células apoptóticas observadas em células HT29, tratadas com α -tomatina. Legenda: Controle – 0,1% DMSO; Doxorubicina – 2 μ g/mL; Tomatina 0,1 – 0,1 μ g/mL; Tomatina 1 – 1 μ g/mL; Tomatina 10 – 10 μ g/mL. ** $p < 0,01$; diferença significativa em relação ao controle (Teste ANOVA/Dunnet).

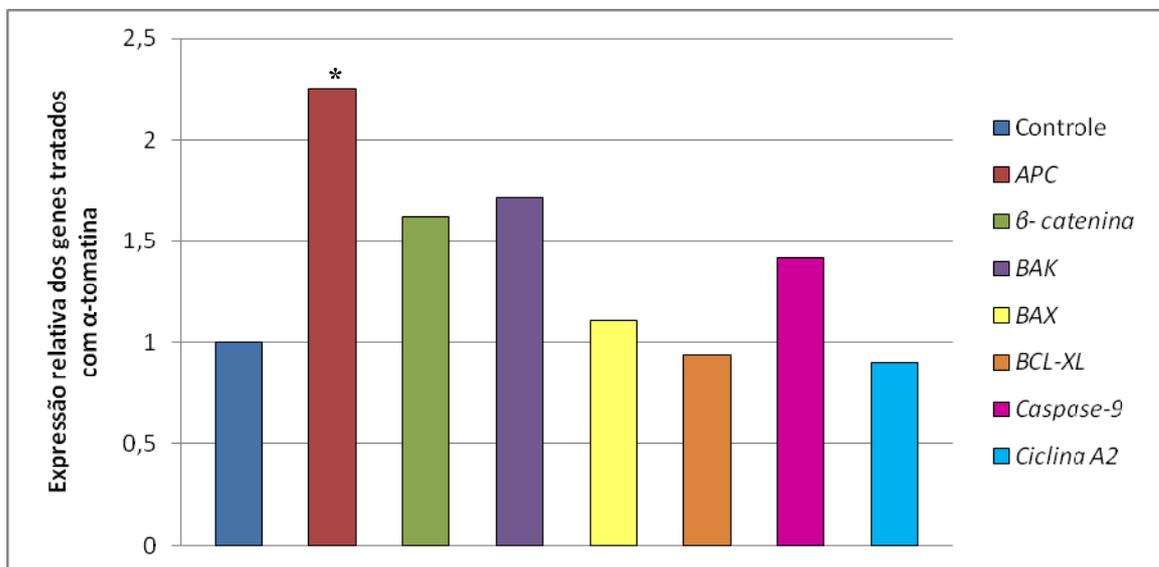


Figura 6. Expressão relativa dos gene *APC*, *β -catenina*, *BAK*, *BAX*, *BCL-XL*, *Caspase-9* e *Ciclina A2* com tratamento de 1 μ g/mL de α -tomatina. * indica diferença estatisticamente significativa.

4. CONCLUSÕES

Com base nos nossos resultados, podemos sugerir que a α -tomatina possui atividade antiproliferativa nas primeiras 24h de tratamento, não induz a apoptose nessa linhagem celular e provoca o rompimento das membranas celulares, conseqüentemente aumentando a expressão do gene *APC* relacionado ao ciclo celular. Assim sendo, podemos sugerir que a α -tomatina possui atividade antiproliferativa nas primeiras 24h de tratamento, não induz a apoptose nessa linhagem celular utilizada e provoca o rompimento das membranas celulares, conseqüentemente, aumentando a expressão do gene *APC* relacionado ao ciclo celular.