



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

RODRIGO CÉSAR DOS SANTOS VIDA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CITOTÓXICOS E
ANTIPROLIFERATIVOS DA α -TOMATINA EM CÉLULAS
TUMORAIS NÃO-PEQUENAS DE PULMÃO**

Londrina
2011

RODRIGO CÉSAR DOS SANTOS VIDA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CITOTÓXICOS E
ANTIPROLIFERATIVOS DA α -TOMATINA EM CÉLULAS
TUMORAIS NÃO-PEQUENAS DE PULMÃO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani.

Londrina
2011

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

V648A Vida, Rodrigo César dos Santos.
Avaliação dos efeitos citotóxico e antiproliferativos da α -tomatina em células tumorais não-pequenas de pulmão / Rodrigo César dos Santos Vida. - Londrina. - Londrina, 2011.
63 f. : il.

Orientador: Mário Sérgio Mantovani.
Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2011.
Inclui bibliografia.

1. Pulmões - Câncer – Teses. 2. Células cancerosas Efeito citotóxico – Teses. 3. Células cancerosas – Proliferação – Teses. 4. Apoptose – Indução – Teses. 5. Tomate – Aspectos biológicos – Teses. I. Mantovani, Mário Sérgio. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

CDU 616-006.6

RODRIGO CÉSAR DOS SANTOS VIDA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CITOTÓXICOS E
ANTIPROLIFERATIVOS DA α -TOMATINA EM CÉLULAS
TUMORAIS NÃO-PEQUENAS DE PULMÃO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani
UEL – Londrina – PR

Prof. Dr. Rodrigo Cabral Luiz
UEL – Londrina – PR

Profa. Dra. Danielle Palma de Oliveira
USP – SP

Londrina, 14 de Março de 2011.

DEDICATÓRIA

**Dedico esse trabalho a meus pais,
pelo apoio ao longo de toda minha
jornada.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pois sem Ele nada seria possível.

A meus pais, Júlio Cezar e Glaucenir, pelo apoio, hoje e sempre. A meus irmãos, Júlio e Vanessa, pelo companheirismo e vivência.

A meu orientador, professor Dr. Mário Sérgio Mantovani, por acreditar em mim e na possibilidade de realização desse trabalho.

Aos professores Rodrigo Cabral Luiz, André Luiz Martinez de Oliveira, Waldiceu Verri Júnior e Maria Angélica Ehara Watanabe, pelo apoio, estímulo e por todas as valiosas contribuições.

Aos amigos Aline Francisca, Ana Elisa Stefanini, Rodrigo Colombo, Luiz Roberto, Paulo Hideki, Paulo Bonilha, Renata Rossieri e Daniele Fortunato, pela amizade, discussões e felicidades compartilhadas ao longo de todos esses anos de convivência.

A Sérgio Luiz, pelo companheirismo e dedicação na leitura desse trabalho, bem como pelas valiosas sugestões.

A Marcela Tsuboy, Leonardo Zanelato, Juliana Marcarini, Patrícia Benites, Natália Aparecida, Sandra Lepri, Diogo Campos e Eliane Barroso, companheiros de laboratório, pelo apoio dentro e fora do ambiente de pesquisa.

A todo o departamento de Patologia e aos alunos dos programas de Mestrado e Doutorado do programa de Pós-graduação em Patologia Experimental.

“É necessário abrir os olhos e perceber que as coisas boas estão dentro de nós, onde os sentimentos não precisam de motivos nem os desejos de razão. O importante é aproveitar o momento e aprender sua duração, pois a vida está nos olhos de quem sabe ver”

Gabriel García Márquez

VIDA, Rodrigo César dos Santos. **Avaliação dos efeitos citotóxicos e antiproliferativos da α -tomatina em células tumorais de câncer de pulmão.** 2011. 63 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

RESUMO

A α -tomatina é um glicoalcalóide encontrado em diferentes partes do tomateiro (*Lycopersicon esculentum*), presente em maior quantidade nos tomates quando ainda estão verdes. Diversas propriedades biológicas são atribuídas a esse composto, como atividades antitumoral, antiinflamatória, imunorreguladora, fungicida e bactericida. O câncer de pulmão é o primeiro em número de casos e o segundo em mortalidade. Trata-se de uma neoplasia bastante agressiva cujos tratamentos pós-diagnóstico – ressecção cirúrgica e quimioterapia – nem sempre são efetivos. O estudo das propriedades quimioprotetora e quimioterápica de substâncias de origem natural apresentam novos potenciais tratamentos no controle do crescimento tumoral através da inibição da proliferação celular e indução de apoptose. Esse trabalho tem por objetivo avaliar os efeitos da α -tomatina sobre a proliferação celular, apoptose, genotoxicidade e regulação gênica de células tumorais não-pequenas de pulmão humano. Para isso utilizaremos cultura *in vitro* de células da linhagem NCI-H460 sob diferentes concentrações de α -tomatina. A α -tomatina inibiu a sobrevivência celular em 25,2% quando utilizada na concentração de 2 μ g/mL durante 24 horas, e inibiu completamente a proliferação celular em concentrações superiores a 5 μ g/mL. Nenhuma das concentrações de α -tomatina testadas induziu apoptose, assim como não foram genotóxicas. Nas concentrações de 0,1 e 2 μ g/mL não foram observadas alterações na expressão gênica do *CYP1A1*, *P53* e *GST*. Os dados sugerem que a α -tomatina não é um indutor das vias clássicas da apoptose, seus efeitos observados *in vitro* são provavelmente produto de sua ação na integridade da membrana plasmática e na lise das células tumorais. Diversos estudos apontam as propriedades da α -tomatina e seus benefícios como promissor composto antitumoral. Nosso trabalho contribui com as mais recentes pesquisas e sugere novos estudos para elucidar seus mecanismos bioquímicos.

Palavras-chave: α -tomatina. Proliferação. NCI-H460. Lise celular.

VIDA, Rodrigo César dos Santos Vida. **Evaluating of cytotoxic and antiproliferative effects of the glycoalkaloid α -tomatine against human lung tumor cells.** 2011. 66 f. Dissertation (Master's Degree in Experimental Pathology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

ABSTRACT

α -Tomatine is a glycoalkaloid present in different parts of the tomato plant (*Lycopersicon esculentum*), found in great amounts in the unripen fruits. Many different biological properties have been described for this compound such as antimutagenic, antiinflammatory, immunoregulator, fungicide and bactericide properties. Lung cancer is a deathly disease; its mortality is related to the after-diagnosis procedures such as surgical resection and non-responsive chemotherapy. This work aims evaluating α -tomatine effects on inhibition of cellular growing, apoptosis-triggering and gene regulation in non-small lung tumor cells. To achieve this goal we will use *in vitro* NCI-H460 cells. Our results showed that α -tomatine inhibited cell growing successfully at 2 μ g/mL at the first 24 hours by 25%, inhibiting it completely at 5 μ g/mL or above. α -Tomatine didn't show any apoptosis-triggering property or genotoxic effects. α -Tomatine didn't change *CYP1A1*, *P53* or *GST* gene expression rates at 0,1 and 2 μ g/mL. These results suggest that α -tomatine doesn't trigger apoptosis through the classical pathways already described, and its *in vitro* inhibitory effect on tumor cells is likely due to its interaction with cell membrane following lysis. Many works have already shown α -tomatine as a potent antitumor compound. Our work contributes to the newest researches and suggests new works aiming to elucidate α -tomatine biochemical pathways.

Keywords: α -tomatine. Cell growth. NCI-H460. Lysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Molécula da α -tomatina	14
Figura 2 – Modelo proposto para a atuação dos glicocalcóides no rompimento de membranas plasmáticas	21
Figura 3 – Mecanismo proposto da apoptose independente de caspases.....	25
Figura 4 – Mecanismo de conjugação da Glutathiona-S-Transferase	29

ARTIGO

Figura 1 – Porcentagem de sobrevivência celular.....	46
Figura 2 – Cinética de proliferação celular	47
Figura 3 – <i>Doubling time</i>	48
Figura 4 – Porcentagem de Viabilidade Celular	48
Figura 5 – Número médio de células apoptóticas	49
Figura 6 – <i>Score</i> de cometas	50
Figura 7 – Avaliação da expressão relativa dos genes.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS

Ah	Receptor aril-hidrocarboneto
AhRE	Elementos regulatórios do receptor aril-hidrocarboneto
AIF	Fator indutor de apoptose
ALBD	Domínio ligado ao indutor do receptor aril-hidrocarboneto
AP-1	Proteína ativadora 1
ARNT	Transportador nuclear para o receptor aril-hidrocarboneto
CTL	Linfócito T citotóxico CD8 ⁺
CYP1A1	Citocromo P-450 1A1
DBP	dibenzo[a]pireno
DMSO	Dimetilsulfóxido
ERO	Espécies reativas do oxigênio
GSH	Glutathiona reduzida
GST	Glutathiona-S-transferase
HDL	Lipoproteína de alta densidade
LDH	Lactato desidrogenase
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
MAPK	Proteína quinase ativadora de mitógeno
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromide
P53	Proteína 53
PAR	Poli(ADP-ribose)
PARP	Poli(ADP-ribose) polimerase
PI3K	Fosfoinositol-3-quinase
qRT-PCR	Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction
SBF	Soro bovino fetal

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 CÂNCER E QUIMIOPREVENÇÃO	11
1.2 TOMATINA	13
1.2.1 Propriedades Biológicas	15
1.2.2 Atividade Antitumoral	17
1.2.3. Mecanismos de Ação	19
1.2.3.1 Atividade sobre membranas celulares	19
1.2.3.2 Indução de apoptose	21
1.2.3.3 Interação com outras moléculas	22
1.2.3.4 Ativação de vias sinalizadoras	23
1.3 APOPTOSE INDEPENDENTE DE CASPASES	24
1.4 METABOLISMO DE XENOBIÓTICOS	26
1.4.1 Citocromo P-450	27
1.4.2 Glutathione-S-Transferase	28
1.5 CONSIDERAÇÕES SOBRE P53	29
2 JUSTIFICATIVA	31
3 OBJETIVOS	32
3.1 OBJETIVOS GERAIS	32
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
REFERÊNCIAS	33
ARTIGO – AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CITOTÓXICOS E ANTIPROLIFERATIVOS DA α-TOMATINA EM CÉLULAS TUMORAIS NÃO-PEQUENAS DE PULMÃO	37
ANEXOS	60
ANEXO A – TABELAS	61

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER E QUIMIOPREVENÇÃO

Câncer é o nome dado a uma complexa família de doenças caracterizadas pelo crescimento anormal de células, causado por alterações na expressão de diversos genes que levam a um desregulado balanço entre proliferação e morte celular. Muitos cânceres têm por característica a capacidade de se espalhar pelo corpo do hospedeiro – metástases –, muitas vezes levando a morte. Por essas razões, o câncer é listado como a segunda maior causa de mortes não-acidentais em todo o planeta, vitimando cerca de sete milhões de indivíduos anualmente com um aumento de 1,1% no número de casos (RUDDON, 2007).

Com relação à mortalidade podemos citar o câncer de pulmão, que independentemente de gênero ou faixa etária, é o tipo de neoplasia que mais mata no mundo todo, sendo o segundo tipo em número de casos. Estima-se que a cada dez mortes causadas por algum tipo de câncer, três sejam devido ao câncer de pulmão. A impossibilidade de um procedimento cirúrgico é relatada em muitos casos, mas o principal fator causal das mortes é o diagnóstico tardio, aliado à rápida evolução e agressividade desse tipo de tumor (ROCHA, 2004).

Os processos que visam a prevenção ao surgimento de um câncer, bem como seu desenvolvimento, dependem principalmente da redução da exposição a fatores de risco evitando, por exemplo, o contato com hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (produtos da queima de substâncias orgânicas, como combustíveis e tabaco), a exposição a raios UV e outras irradiações potencialmente danosas (KIM et al., 2005). No caso de indivíduos já expostos a essas situações, a intervenção com agentes inibitórios que atuem em conjunto com o sistema imunológico deve ser observada para impedir os processos de iniciação do câncer – a quimioprevenção (WOGAN et al., 2004).

Quimioprevenção é o processo pelo qual são utilizados compostos químicos para impedir ou retardar o processo de desenvolvimento de uma neoplasia já estabelecida ou em processo de iniciação (WOGAN et al., 2004). A determinação da propriedade quimioprotetora de um dado composto depende dos estudos de sua atividade sobre diferentes constituintes celulares, onde os processos de sua interação com membranas, sua atividade sobre o metabolismo celular e sobre a expressão gênica, dentre outros, são avaliados. Diversos eventos biológicos, como os mecanismos de controle do ciclo celular, a angiogênese

e as etapas da diferenciação celular são cruciais para o desenvolvimento de uma neoplasia, e constituem os principais alvos de uma substância quimioterápica no retardo da carcinogênese (KELLOFF et al., 2000).

Uma droga com excelente atividade quimioprotetora contra o câncer é aquela que produz efeitos deletérios em células tumorais enquanto não atua, ou pouco o faz, sobre células normais. Sabe-se, por exemplo, que alguns compostos quimioterápicos apresentam ampla atividade pró-apoptótica e genotóxica. Essa atividade é danosa não somente às células neoplásicas, como também o é às células normais. Sendo assim, é necessário que antes da aplicação clínica de um composto quimioterápico qualquer que estudos de toxicidade e de dose-eficácia sejam realizados, a fim de se obter um composto de alta atividade quimioterápica capaz de atuar diretamente e preferencialmente apenas sobre o câncer (KELLOFF et al., 1994).

Uma excelente maneira de prevenir a população é através da orientação nutricional. Sabe-se que uma menor ingestão de substância com potencial pró-carcinogênico como conservantes e corantes combinada a alimentos funcionais ricos em compostos como vitaminas, carotenóides, terpenóides, metionina e outros antioxidantes são capazes de diminuir a incidência de diferentes tipos de câncer, atuando na iniciação e na prevenção de seu surgimento (CHUANG et al., 2000; KELLOFF et al., 2000). Muitos produtos naturais e sintéticos podem ser utilizados para impedir o desenvolvimento de células tumorais através de suplementação alimentar. Muitas espécies vegetais, como frutas, leguminosas, folhas e raízes apresentam substâncias anticarcinogênicas (SLATTERY et al., 2000).

Muitas dessas classes de substâncias, como polifenóis, isoflavonas, cafeína e ácidos salicílicos, vêm sendo estudadas nos últimos anos com resultados favoráveis a sua atividade quimioprotetora e antitumoral. As substâncias de atividade antitumoral podem ser enquadradas em dois grandes grupos: aquelas cuja efetividade se dá quando ingerida antes ou conjuntamente com a substância cancerígena (agentes bloqueadores) e aquelas cuja atividade é notória após os processos de iniciação da carcinogênese (agentes supressores). Algumas substâncias, no entanto, apresentam efeitos de proteção dupla, atuando tanto antes como depois dos processos de carcinogênese (ZHANG & TALALAI, 1994; RUDDON, 2007). Os antioxidantes constituem o principal grupo de agentes bloqueadores, impedindo a interação de radicais e outras substâncias diretamente com macromoléculas da maquinaria celular, como proteínas, lipídios e ácidos nucleicos. Os agentes supressores atuam diretamente sobre eventos celulares de proliferação e desenvolvimento, impedindo a malignização de células iniciadas por reparo ou indução a apoptose (MORSE & STONER, 1993).

1.2 TOMATINA

Glicoalcalóides são espécies químicas sintetizadas naturalmente por diferentes espécies vegetais, caracterizadas pela presença de nitrogênio em uma estrutura esteroidal e uma cadeia lateral de carboidratos na posição 3-OH. As espécies do gênero *Solanum*, conhecidas por produzirem diferentes glicoalcalóides em abundância durante seus ciclos de vida, incluem batatas, berinjelas e tomates entre seus membros mais consumidos em todo o planeta (BARCELOUX et al., 2008)

Constituindo uma das principais fontes de alimento para seres humanos e outros animais, os tomates (*Lycopersicon esculentum*) estão entre as vinte espécies vegetais mais consumidas em todo o planeta. As diferentes espécies e subespécies desse gênero produzem frutos ricos em componentes nutricionais importantes e uma variedade de metabólitos secundários (BAER-DUBOWSKA et al., 2006).

Dentre os glicoalcalóides produzidos por essa espécie podemos destacar a α -tomatina, a tomatidina e a desidrotomatina. A tomatidina é um alcalóide bastante freqüente em tomates, e sua estrutura é compartilhada pela α -tomatina e parcialmente pela desidrotomatina, onde também é denominado radical aglicona. α -Tomatina e desidrotomatina apresentam a mesma cadeia lateral de carboidratos, denominada β -licotetraose, que caracteriza essa espécie química. A única diferença estrutural entre esses glicoalcalóides é a presença de uma dupla ligação no anel esteroidal B da aglicona na molécula de desidrotomatina (RODDICK, 1973). Apesar de estruturalmente aparentadas, α -tomatina e desidrotomatina são compostos químicos diferentes, essencialmente quanto sua função biológica e dinâmica de biossíntese. Esses dois compostos compõem os glicoalcalóides mais abundantes encontrados nas diferentes variedades de tomate (KOZUKUE et al., 2004).

A α -tomatina, que também pode ser denominada A-tomatina, licopersicina ou simplesmente tomatina, é o glicoalcalóide mais abundante em tomates. Em pesquisa realizada com diferentes tipologias de tomates a concentração média de α -tomatina em frutos verdes foi estimada em aproximadamente 16mg por grama do fruto, cerca de dez vezes a concentração encontrada de desidrotomatina sob as mesmas condições (KOZUKUE et al., 2004).

A molécula da α -tomatina é constituída por uma estrutura esteroidal fortemente ligada a cadeia lateral de carboidratos – o radical β -licotetraose (Figura 1). Esse radical é localizado no carbono 3 do primeiro anel da estrutura esteroidal, e é composto por

quatro monossacarídeos de três tipos diferentes – as hexoses D-galactose, D-glicose e a pentose D-xilose, onde a D-glicose aparece duas vezes. Sua fórmula geral é $C_{50}H_{83}NO_{21}$ e seu peso estimado em 1034,22 Da (RODDICK, 1973; MORROW et al., 2004; IKEDA et al., 2006).

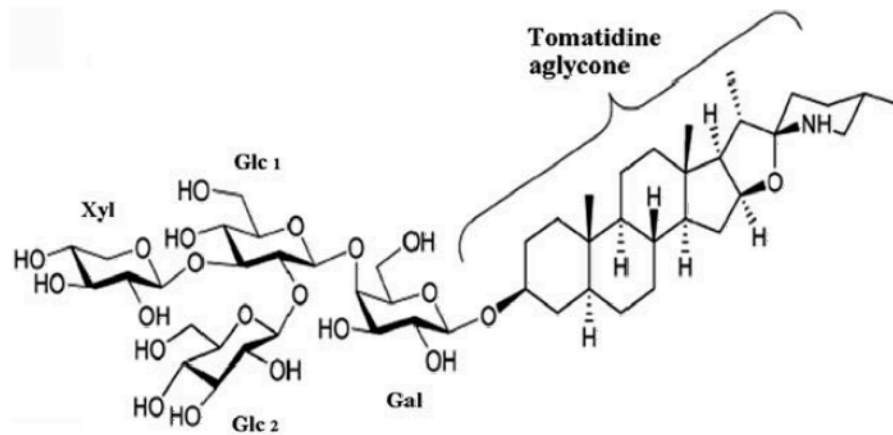


Figura 1 – Molécula da α -tomatina.
Fonte: Friedman *et al.* (1995).

Através da hidrólise ácida da licotetraose é possível formar subprodutos da α -tomatina, classificados de acordo com o número de monossacarídeos no radical. Os procedimentos para hidrólise deste glicoalcalóide foram descritos por Friedman e colaboradores (1998) na descrição das funcionalidades da α -tomatina. Sabe-se, no entanto, que a hidrólise dessa molécula não ocorre *in vivo*, pois se faz necessária a incubação com ácidos fortes a uma temperatura superior a $100^{\circ}C$.

A α -tomatina é capaz de atravessar o trato digestivo e atingir a corrente sanguínea sem sofrer transformações devido à acidez estomacal. A incubação com HCL 1M a $37^{\circ}C$ durante uma hora revelou não ser suficiente para separar os radicais aglicona e licotetraose, tampouco para hidrolisar os açúcares da cadeia lateral da molécula (FRIEDMAN et al., 1995). Isso é importante se considerarmos que pequenas alterações na molécula de α -tomatina são capazes de influir sobre suas propriedades biológicas. Mesmo a remoção de um dos açúcares do radical licotetraose altera as funções exercidas pela molécula intacta, em geral diminuindo suas atividades (MORROW et al., 2004).

Apesar das conhecidas propriedades tóxicas de alguns glicoalcalóides produzidos por representantes do gênero *Solanum*, pouco efeito tóxico foi demonstrado pelos glicoalcalóides provenientes de tomates (RODDICK, 1973). A toxicidade oral da α -tomatina

é considerada baixa quando comparada a outros glicoalcalóides, presumivelmente devido sua afinidade com a molécula de colesterol e posterior eliminação (BARCELOUX, 2009). De acordo com Wilson e colaboradores (1961), a α -tomatina apresenta elevada toxicidade oral somente quando administrada em concentrações superiores a 500mg/kg.

A concentração de α -tomatina é reduzida significativamente conforme procede o amadurecimento do fruto, chegando a níveis indetectáveis no fruto maduro. A concentração de α -tomatina encontrada em outras partes da planta permanece constante com exceção das raízes, onde só são detectados traços desse composto durante toda a vida do vegetal (KOZUKUE et al., 2004). A concentração de α -tomatina também varia dependendo da tipologia de fruto analisado, sendo mais abundante nas variedades "alongada" e "salada", amplamente utilizadas para consumo humano (LEONARDI, 2000). Há ainda perda de quantidades significativas de α -tomatina se o fruto for exposto a temperaturas superiores a 170°C. Diferentes processos de preparo do tomate para alimentação, como fritura e cozimento, mantém elevadas as quantidades de α -tomatina, suas atividades não são de maneira alguma perdidas, garantindo assim que a administração oral mantenha suas propriedades originais e seja absorvida no trato digestivo (LEONARDI, 2000).

1.2.1 Propriedades Biológicas

Os primeiros estudos com a α -tomatina datam da metade do século XX (IRVING, FONTAINE & DOOLITTLE, 1945), e desde então várias interessantes propriedades biológicas têm sido atribuídas a esse composto.

A presença da α -tomatina em diferentes partes do vegetal, e especialmente no fruto imaturo, está diretamente envolvida na defesa da planta contra fitopatógenos. Sabe-se que a α -tomatina exerce atividade antifúngica e bactericida, além de impedir o desenvolvimento de diversas larvas de moscas e alguns nematóides possivelmente danosos a folhas e frutos (FRIEDMAN et al., 2005; SIMONS et al., 2006). Isso explica porque sua concentração nos frutos é mais elevada durante o período de pré-maturação – um interessante mecanismo de proteção que permite o desenvolvimento do tomate, e das sementes que ele contém, livres da interferência de microorganismos e outros organismos potencialmente patogênicos. Sua atividade antipatogênica foi estendida aos vírus, onde se demonstrou que a

α -tomatina eficientemente inativa *Herpes simplex* e *Herpes zoster* em humanos (CHATAING et al., 1997).

Já foi demonstrado que há um aumento na produção de espécies reativas do oxigênio (ERO) na presença de α -tomatina quando concentrada a 2 μ g/mL ou mais, e esse é um possível mecanismo pelo qual a α -tomatina seja capaz de eliminar patógenos (SIMONS et al., 2006).

A α -tomatina é capaz de interagir fortemente com a molécula de colesterol, mais especificamente a lipoproteína de baixa densidade (LDL) e promover sua eliminação. Estudos confirmaram que a α -tomatina forma um complexo forte e insolúvel com o LDL quando em meio aquoso, sem envolver a lipoproteína de alta densidade (HDL, dito colesterol “bom”) (RODICK, 1979; MICICH, 1993). Essa afinidade molecular está intimamente relacionada com a cadeia de carboidratos que compõe o radical licotetraose da α -tomatina, uma vez que subprodutos da hidrólise da α -tomatina, resultantes da remoção de um, dois ou três carboidratos da cadeia lateral, não foram capazes de estabelecer uma ligação forte (KEUKENS et al., 1995). A obtenção do complexo α -tomatina-LDL tem aplicação em ensaios para precipitação e quantificação de colesterol.

Em experimento conduzido com hamsters, Friedman e colaboradores (2000) demonstraram que a α -tomatina é capaz de formar complexos insolúveis com LDL também *in vivo*. Uma vez formados esses complexos são excretados, diminuindo assim a disponibilidade de LDL no plasma sanguíneo. Friedman demonstrou que a ingestão diária de α -tomatina reduz os níveis de LDL enquanto os níveis de HDL permaneceram significativamente inalterados. Os hamsters foram submetidos a uma dieta rica em colesterol e suplementados durante 21 dias com 0,2% de α -tomatina, e ao término apresentaram redução média de 41% nos níveis de LDL. Esses trabalhos sugerem que a ingestão diária de α -tomatina pode ser capaz de reduzir o colesterol “ruim” sem impactar os níveis do colesterol “bom”.

Uma propriedade interessante atribuída a α -tomatina relaciona essa molécula com a resposta imune inflamatória. Já foi demonstrado que a α -tomatina é capaz de atuar sobre histamina e bradicinina no processo de contração do músculo liso, um efeito duradouro, porém reversível (WAKKARY et al., 1967). Filderman & Kovacs (1969) demonstraram sucessivamente que a administração, tanto intramuscular como oral, de α -tomatina é capaz de reduzir o edema inflamatório em ratos. Os animais receberam injeção de carragenina na pata traseira e posteriormente foram desafiados com diferentes concentrações de α -tomatina e outras drogas antiinflamatórias. O estudo apontou que a administração

intramuscular de α -tomatina 5mg/kg foi capaz de reduzir o edema de pata em 31,6%, resultados comparáveis aos obtidos com hidrocortisona. A α -tomatina exerceu ainda efeitos similares quando administrada oralmente (36,3% de inibição de edema) e reduziu significativamente a formação de tecido de granulação. Um efeito protetor da α -tomatina também foi observado quando os animais foram desafiados com carragenina algumas horas após administração do glicoalcalóide, e esse efeito permaneceu significativo até 48hs depois do desafio. Filderman & Kovacs (1969) demonstraram que a α -tomatina apresenta atividade antiinflamatória, concluindo através do teste de permeabilidade capilar peritoneal de *Northover* que a α -tomatina, curiosamente, se comporta como uma droga não-esteroidal durante o processo inflamatório assistido.

Outra de suas propriedades em relação ao sistema imune é a capacidade da α -tomatina de atuar como adjuvante de vacinas que visam estimular linfócitos T citotóxicos ($CD8^+$ CTL) (MORROW et al., 2004). A α -tomatina apresentou-se bastante imunestimuladora, sendo capaz de gerar resposta humoral anti-ovalbumina em camundongos imunizados uma única vez (RAJANANTHANAN et al., 1999), bem como uma forte resposta citotóxica por parte dos $CD8^+$ CTL quando os camundongos foram imunizados com α -tomatina formulada com proteína solúvel. O perfil de citocinas apresentada por camundongos imunizados com α -tomatina inicialmente é caracterizado por citocinas da resposta Th1 (como IFN- γ) e posteriormente por citocinas da resposta Th2 (IL-4). Esses achados colocam a α -tomatina no pequeno grupo de substâncias adjuvantes capazes de produzir uma resposta $CD8^+$ CTL (MORROW et al., 2004). Os detalhes de como a α -tomatina é capaz de estimular resposta imune citotóxica não estão totalmente esclarecidos, sabendo-se apenas de que o mecanismo pelo qual esse glicoalcalóide exerce sua função adjuvante é dependente de CD80 e CD86.

1.2.2 Atividade Antitumoral

Os estudos envolvendo as propriedades antitumorais da α -tomatina são relativamente recentes, datando desde meados da primeira década de 2.000. Diversos trabalhos apontam para suas propriedades contra a proliferação de células tumorais, dispersão e iniciação.

A α -tomatina parece ser o único glicoalcalóide proveniente de tomates a apresentar propriedades antitumorais. Desidrotomatina, tomatidenol e tomatidina exercem

efeito antiproliferativo muito discreto, quando o fazem (FRIEDMAN et al., 2009). Essa propriedade parece estar diretamente relacionada com o radical licotetraose, embora a estabilidade molecular do radical aglicona também pareça importante para esse efeito.

Friedman e colaboradores (2007), em seu experimento com trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) demonstraram que a α -tomatina é capaz de exercer efeito protetor contra câncer de fígado e estômago induzido por dibenzo[a]pireno (DBP) sem induzir mortalidade, apresentar toxicidade ou mesmo alterar o peso total e dos órgãos analisados. Esses resultados apresentam notória similaridade com os obtidos por outras drogas comprovadamente antitumorígenicas, como clorofilina e indol-3-carbinol.

Em trabalho subsequente, Friedman e colaboradores (2009) constataram a capacidade antiproliferativa da α -tomatina em diferentes tipos de células tumorais *in vitro*, observando que o potencial de seus efeitos inibitórios varia conforme o tipo celular avaliado. As linhagens celulares de câncer de mama (MCF-7), câncer de cólon (HT-29), câncer gástrico (AGS) e hepatoma (HepG2) apresentaram inibição do crescimento celular a 50% com baixas concentrações de α -tomatina (5,07; 0,03; 0,03 e 43 μ g/mL, respectivamente). Outras linhagens celulares também foram testadas, e os resultados confirmam uma potencial propriedade antiproliferativa da α -tomatina, mesmo em baixas concentrações, sobre células leucêmicas (HL60 e K562) e células tumorais de pulmão (A549 e NCI-H460) (CHAO et al., 2010; SHIEH et al., 2011). As concentrações onde esses efeitos foram observados nunca foram maiores do que os níveis considerados por Wilson e colaboradores (1961) como tóxicas.

Os efeitos da α -tomatina, no entanto, não parecem restritos apenas a células tumorais. Nos ensaios realizados por Lee e colaboradores (2004) foi observado que apesar de reduzir a proliferação das células tumorais o glicoalcalóide também reduziu a proliferação de células normais de fígado (linhagem HeLa). O mesmo efeito sobre células normais foi descrito posteriormente por Friedman e colaboradores (2009). Dessa forma demonstrou-se a não-seletividade da α -tomatina quanto ao seu potencial antitumoral, visto que suas propriedades são efetivas sobre células tumorais e não-tumorais.

Em comparação com doxorrubicina e camptotecina, duas drogas amplamente utilizadas no tratamento anticâncer, a atividade da α -tomatina foi maior. Células da linhagem HepG2 foram cultivadas com 1 μ g/mL de doxorrubicina, camptotecina e α -tomatina, resultando na inibição de 46,8; 61 e 87% das células, respectivamente (LEE et al., 2004; FRIEDMAN et al., 2009).

Os estudos de Shii e colaboradores (2009) e Shieh e colaboradores (2011) demonstraram com sucesso o papel da α -tomatina como agente anti-metastásico. Além de impedir a proliferação de células de adenocarcinoma (linhagem A549) e células tumorais não pequenas de pulmão (linhagem NCI-H460), a α -tomatina foi capaz de controlar o processo metastásico desse tipo celular inibindo a atividade de metaloproteinases (MMP-2 e MMP-9), levando a uma redução total no número de células e de seu potencial dispersivo.

1.2.3 Mecanismos de Ação

Os diversos estudos envolvendo a α -tomatina ampliaram os conhecimentos acerca de seus mecanismos de ação. As diferentes propriedades da α -tomatina estão relacionadas a sua capacidade de interagir com membranas celulares, induzir apoptose, ativar vias de sinalização intracelular e de interagir diretamente com biomoléculas.

1.2.3.1 Atividade sobre membranas celulares

Diferentes estudos demonstraram que a α -tomatina é capaz de interagir com membranas citoplasmáticas. Essa propriedade foi demonstrada analisando o potencial de despolarização e mudanças na permeabilidade de membranas em embriões de rãs (BLANKEMEYER et al., 1997). Estudos similares foram realizados por GEE e colaboradores (1996) utilizando células intestinais de mamíferos. Foi observado que a α -tomatina modula a permeabilidade das membranas, atuando principalmente sobre os mecanismos de entrada de íons como o sódio com alta eficácia quando concentrada a 1mg/l. Sabe-se que essa propriedade depende diretamente do radical licotetraose da α -tomatina, uma vez que os mesmos experimentos não obtiveram os mesmos resultados quando tomatidina isolada foi utilizada (BLANKEMEYER et al., 1997; GEE et al., 1996). Quando íntegro esse radical é capaz de interagir diretamente com a membrana, através dos receptores e das moléculas de colesterol presas a ela, passando a participar dos processos de modulação de permeabilidade,

despolarização de membrana e citólise (GEE et al., 1996). Esse é possivelmente outro mecanismo através do qual a α -tomatina consiga atuar sobre fitopatógenos.

Através do ensaio de mensuração de lactato desidrogenase (LDH) foi demonstrado que parte da mortalidade celular está associada à lise da membrana celular. A análise de células EL4 (linfoma murino) incubadas com $3\mu\text{M}$ de α -tomatina apresentou lise em 85% das células (YANG et al., 2004). O aumento da permeabilidade celular e o conseqüente controle da entrada e saída de íons e água da célula podem levar a incursão de outras moléculas para o meio intracelular e à modificação da dinâmica de outras vias de sinalização, mas estudos apontam a lise como um dos principais mecanismos pelo qual a α -tomatina reduz o número de células tumorais *in vitro*.

Keukens e colaboradores (1995) apresentaram um modelo através do qual glicoalcalóides são capazes de interagir, modificar e finalmente romper a membrana plasmática. Esse modelo foi idealizado após estudos minuciosos da estrutura de diferentes glicoalcalóides produzidos pelo gênero *Solanum*, sendo que a α -tomatina apresentou a maior potência dentre os compostos analisados (KEUKENS et al., 1992).

Em contato com membranas plasmáticas a porção esteroidal da molécula que compõe os glicoalcalóides tende a interagir com as moléculas de colesterol presentes na membrana. Essa ligação é resistente e duradoura, permitindo que o conjunto glicoalcalóide-colesterol não se separe, fixando o glicoalcalóide na membrana. Os radicais oligossacarídeos (β -licotetraoses) ficam expostos na face externa da membrana, e a proximidade desses radicais permite reações de interação molecular entre si. Essas reações permitem que os glicoalcalóides formem uma matriz adjacente fortemente ligada à membrana. O aumento da inserção de glicoalcalóides na membrana e de suas interações com moléculas de colesterol leva a um deslocamento de fosfolipídios na parte interna da membrana, que se aproximam uns dos outros e permitem que a matriz mude de conformação. As forças apolares das moléculas envolvidas tendem a curvar a matriz, e essa força por fim cliva a membrana, liberando uma estrutura cilíndrica formada pelos glicoalcalóides anexados à membrana (KEUKENS et al., 1995).

Essa capacidade em romper membranas está diretamente associada à interação dos glicoalcalóides com a hidroxila 3 (grupo $3\beta\text{-OH}$) e um anel planar em sua estrutura. A presença de duplas ligações nos anéis da aglicona também parece inferir diretamente com a capacidade dos glicoalcalóides de interagir eficientemente com as moléculas de colesterol da membrana e promover sua lise, que segundo o modelo proposto depende da quantidade disponível de glicoalcalóides interagindo com a membrana (KEUKENS et al., 1995).

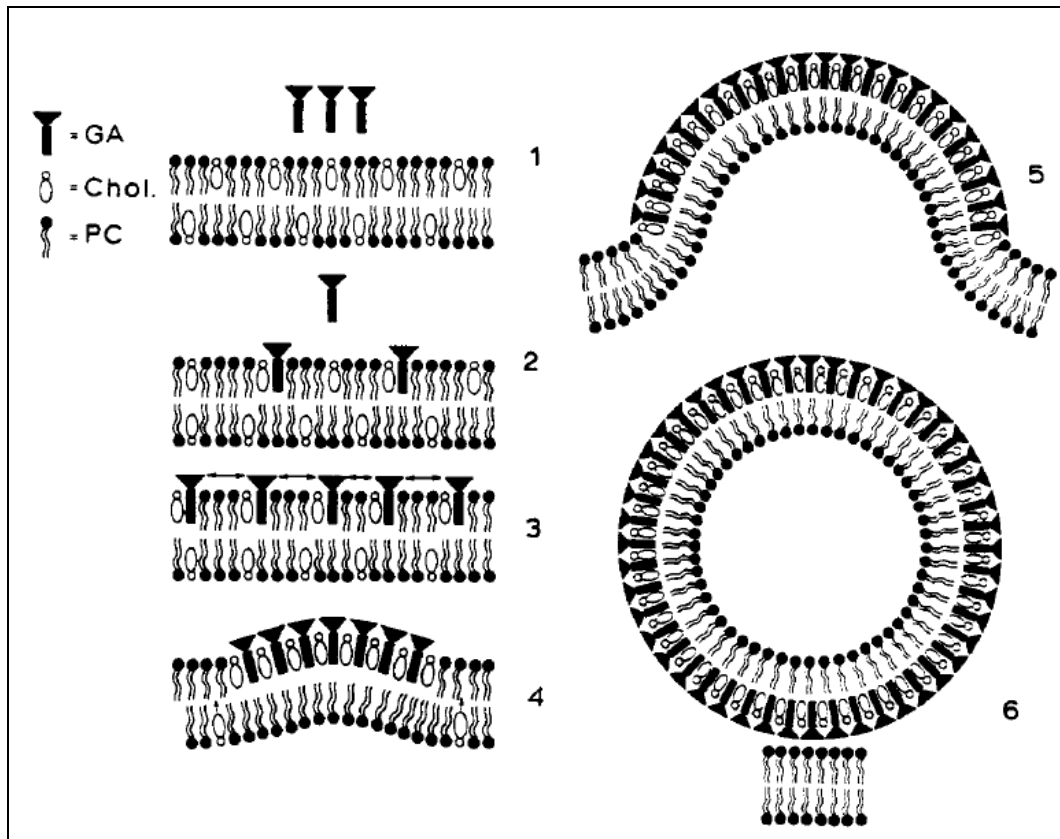


Figura 2 – Modelo proposto para a atuação dos glicoalcalóides no rompimento de membranas plasmáticas. (1-2) glicoalcalóides interagem com moléculas de colesterol da membrana; (3) interação entre as cadeias laterais de carboidratos e formação da matriz; (4-5) aumento da interação, deslocamento dos fosfolípídios e mudança na conformação da matriz; (6) rompimento da estrutura e lise da membrana. GA – Glicoalcalóide; Chol. – Colesterol; PC – Cadeia de fosfolípídios.

Fonte: Keukens *et al.* (1995).

1.2.3.2 Indução de apoptose

Yang e colaboradores (2004) avaliaram as etapas do ciclo celular (linhagem EL4, linfoma murino) durante incubação com α -tomatina. Com uso da concentração de $10\mu\text{g/mL}$ foi-se observado que 67,2% das células apresentavam núcleos hipodiplóides (Sub-G1), além de evidente fragmentação do DNA. Resultados similares foram obtidos por Shieh e colaboradores (2011), evidenciando uma maior frequência de células em Sub-G1. Yang e colaboradores (2004) concluíram que, além do efeito lítico já caracterizado por Keukens e colaboradores (1995), a α -tomatina também é capaz de induzir apoptose quando em concentrações elevadas. A citólise foi observada principalmente em concentrações mais baixas de α -tomatina.

A partir da constatação da sua capacidade de se ligar e modular membranas, foi sugerido que a α -tomatina fosse capaz de adentrar a célula e interagir diretamente com a membrana mitocondrial, alterando sua permeabilidade ou mesmo rompendo-a de modo análogo ao da membrana citoplasmática, iniciando a cascata de caspases que culminariam em apoptose através da via intrínseca do processo (MORROW et al., 2004). Yang e colaboradores (2004) incubaram células EL4 com α -tomatina após tratá-las com um inibidor geral de caspases denominado benziloxycarbonil-Val-Ala-(dl)-Aspfluoromethylcetona (zVAD-fmk). O uso desse inibidor, no entanto, não foi capaz de impedir a morte celular apoptótica, excluindo assim a apoptose dependente de caspases dos mecanismos de atuação da α -tomatina.

De acordo com Chao e colaboradores (2010) a α -tomatina induz a via apoptótica independente de caspases de maneira dose-dependente, sendo uma forte indutora em concentrações entre 1,5 e 2 μ M. Seus estudos demonstraram que a capacidade da α -tomatina de reagir e desestabilizar membranas também é observada em mitocôndrias, um requisito importante na ativação dessa via apoptótica. A modulação da permeabilidade da membrana mitocondrial permite a saída de proteínas específicas que são encaminhadas ao núcleo, onde promovem a clivagem do material genético, a desorganização da célula e a observação dos eventos citológicos típicos de uma apoptose (HONG et al., 2004). Esse mecanismo parece atuar concomitantemente à lise, promovendo assim a eliminação das células tumorais.

1.2.3.3 Interação com outras moléculas

A interação da α -tomatina com o colesterol leva a formação de complexos insolúveis, especialmente com LDL, promovendo a eliminação e a menor disponibilidade plasmática dessa molécula (FRIEDMAN et al., 2000). Sabe-se que essa capacidade de interação é produto de sua configuração molecular, sendo o complexo α -tomatina-colesterol unido por uma ligação forte e estável (KEUKENS et al., 1995). Essa propriedade sugeriu que a α -tomatina, a exemplo do mecanismo de ação de outras drogas antitumorais como a clorofilina, seria capaz de interagir com substâncias cancerígenas e promover sua eliminação.

O efeito protetor da α -tomatina contra os danos induzidos por DBP ampararam essa hipótese (FRIEDMAN et al., 2007). Essa interação, no entanto, se existente, jamais foi comprovada.

A capacidade da α -tomatina de mediar a transdução de sinais intracelulares está envolvida com sua capacidade de ligação com fatores de transcrição nuclear, importantes também durante o processo inflamatório. Estudos envolvendo o fator nuclear κ B (NF- κ B) demonstraram que a disponibilidade e a capacidade desse fator de transcrição de interagir com o núcleo é diminuída na presença de α -tomatina 2 μ M. Sabe-se que a α -tomatina é capaz de interagir com a molécula inibitória de NF- κ B, denominada I κ B, impedindo sua dissociação e conseqüentemente reduzindo sua atividade (SHII et al., 2009; SHIEH et al., 2011).

1.2.3.4 Ativação de vias sinalizadoras

Diferentes mecanismos de atuação sobre vias sinalizadoras foram reportadas com relação à α -tomatina. Ito e colaboradores (2007) demonstraram que os efeitos da α -tomatina durante infecção com o fungo *Fusarium oxysporum* envolvem a ativação das vias sinalizadoras da fosfotirosina-quinase e proteína-G, levando a elevação de Ca^{2+} e ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio.

Recentemente Shii e colaboradores (2009) e Shieh e colaboradores (2011) demonstraram os efeitos da α -tomatina sobre as vias de sinalização celular PI3K/AKT e ERK1/2. A fosfoinositol-3-quinase (PI3K) regula importantes funções celulares em resposta a sinais externos. A ativação da via de serina-treonina-quinase (AKT) em resposta a PI3K representa uma via de transdução de sinal que leva a fosforilação e ativação/repressão de várias outras moléculas, como quinases regulatórias e fatores de transcrição, em sua maioria moléculas envolvidas no controle do crescimento e da proliferação celular. A via das “quinases reguladas por sinais extracelulares” (ERK1/2) representam o principal mecanismo pelo qual sinais extracelulares chegam ao núcleo. As quinases relacionadas com proteínas ativadas por mitógeno (MAPK, MAP quinases) estão intimamente relacionadas com ERK1/2 (KALDIS, 2010). Ambas vias de transdução de sinais são inibidas na presença de α -tomatina, que atua inibindo a atividade da PI3K. Dessa forma a α -tomatina é capaz de intervir em processos de migração, crescimento e proliferação celular, alterando principalmente a expressão de metaloproteinases e outras proteínas relacionadas à metástase.

Outra atividade observada da α -tomatina é sua capacidade de inibir os fatores de transcrição NF- κ B, proteína ativadora 1 (AP-1) e Janus quinase (JNK), diminuindo significativamente suas disponibilidades e capacidade de integração com o material nucléico (SHII et al., 2009), modulando dessa forma a condução de sinais que levam a intrincados controles sobre morte e migração celular. Foi-se observado durante processo inflamatório experimental que a α -tomatina é capaz de atuar como molécula antiinflamatória inibindo a via de sinalização dessas moléculas – posteriormente modificando as expressões de iNOS e COX-2 (SHEN et al., 2008). Os mecanismos através do qual a α -tomatina exerce seus efeitos sobre essas moléculas não está completamente elucidado, mas possivelmente a interação desse glicocalcóide com o I κ B, molécula inibidora do fator de transcrição NF- κ B, tem relação direta com sua depleção (SHIEH et al., 2011).

1.3 APOPTOSE INDEPENDENTE DE CASPASES

As vias intrínseca e extrínseca da apoptose envolvem a ativação de uma família de proteínas catalíticas denominadas caspases (KALDIS, 2010). No entanto, mais recentemente têm-se relatado a observação de apoptose independente da ativação dessas enzimas. Esse modelo de morte programada denominada “apoptose independente de caspases” envolve a ativação proteínas mitocondriais e danos diretos ao DNA.

Esse mecanismo de morte celular parece ser deflagrado através da poli-ADP-ribose (PAR) polimerase I (PARP-1, também denominada PAR sintetase ou transferase) (HONG et al., 2004). Trata-se de uma proteína nuclear abundante, envolvida no processo de reparo no DNA. Em resposta ao dano no material genético, PARP-1 se torna rapidamente mais expresso e se liga à fita de DNA, promovendo reparo. A eficiência e rapidez de ativação de PARP-1 é um fator chave que regula se as células sobrevivem ou morrem após danos no DNA através da proteína p53 (CROCKER & MURRAY, 2003).

Foi observado que em condições de estresse, ou quando os danos ao DNA são extensos, a hiper-indução PARP-1 pode levar a uma diminuição nos níveis de NAD⁺ e ATP, sinalizando o dano nuclear. Essa sinalização faz com que a mitocôndria libere a flavoproteína Fator Indutor de Apoptose (AIF). Essa proteína induz a condensação da cromatina e a clivagem do DNA, atuando diretamente sobre ele e reduzindo-o a fragmentos

de 50kb. Dessa forma o processo de morte induzido por AIF dependentemente de PARP-1 não leva a ativação de caspases, ao mesmo tempo em que apresenta todas as características citológicas de morte apoptótica, como exposição dos resíduos de fosfatidilserina e condensação do núcleo (HONG et al., 2004).

A perda da integridade e a transição da permeabilidade da membrana mitocondrial parecem ser os principais mecanismos de liberação de AIF, que dessa forma induz a célula à morte apoptótica. A translocação de AIF até o núcleo acontece mais rapidamente do que a liberação do citocromo c – que caracteriza a via intrínseca da apoptose, com ativação da caspase 9 e formação do apoptossomo. Apesar de não comprovada sua participação, a endonuclease G (endoG) parece atuar juntamente com AIF na promoção dessa via apoptótica (HONG et al., 2004).

A liberação de AIF também se dá quando há fissuras na membrana mitocondrial. Sabe-se que há liberação de AIF mesmo durante a via intrínseca da apoptose, especialmente durante lise da membrana da organela. No entanto, AIF sozinha demonstrou ser capaz de induzir a morte celular apoptótica. A não intervenção de caspases nesse processo é suportada por experimentos conduzidos na presença de inibidores de caspases (YANG et al., 2004). A possibilidade da atuação de outras moléculas na permeabilidade da membrana mitocondrial não está descartada. A liberação de AIF e sua translocação ao núcleo são reflexo de sinalizações como o recrutamento de PAR segundo ativação de PARP-1 e ainda a atividade de substâncias diretamente sobre a membrana mitocondrial (HONG et al., 2004).

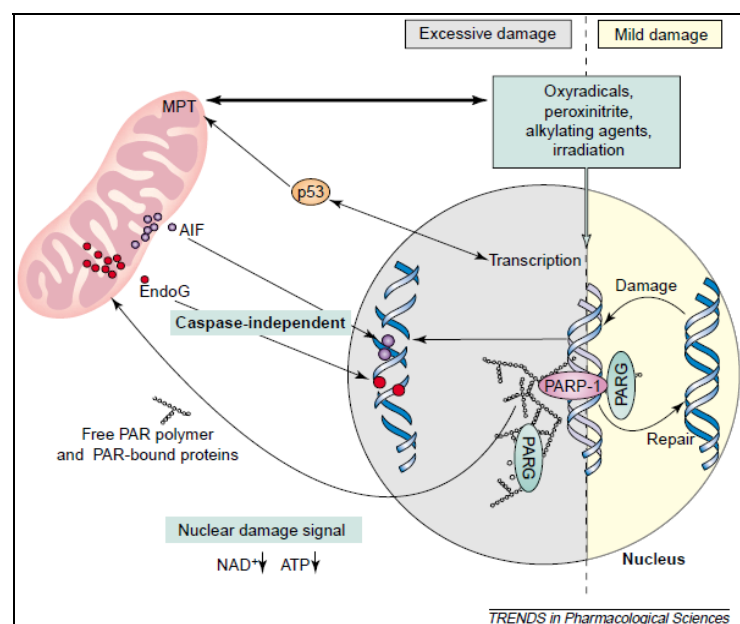


Figura 3 – Mecanismo proposto da apoptose independente de caspases.
Fonte: Hong *et al* (2004).

Já foi demonstrado que a α -tomatina é, de fato, capaz de modular a permeabilidade da membrana mitocondrial e promover a liberação de AIF. Esse fato suporta a hipótese da α -tomatina como um possível indutor dessa via de ativação da apoptose (SHIEH et al., 2011). Apesar de não totalmente elucidada quanto a seus mecanismos, essa nova via de ativação da apoptose sugere novos alvos terapêuticos no controle de mortes celulares envolvendo câncer e outras situações patológicas. A eficácia de novas drogas no encaminhamento de células tumorais à morte apoptótica introduz uma gama de interessantes eventos biológicos que podem ser utilizados combate a proliferação e crescimento da massa tumoral.

1.4 METABOLISMO DE XENOBIÓTICOS

Para assegurar a sobrevivência frente a todas as ocorrências causadas por substâncias endógenas, os organismos desenvolveram mecanismos de defesa para proteção de suas células. Estes mecanismos incluem bombas de influxo de drogas, seqüestro das drogas, seu metabolismo e reparo dos sítios alvos das mesmas. Pelo fato de que todos esses mecanismos envolvem uma numerosa variedade de estruturas químicas, suas reações são processos bastante versáteis que, em seu conjunto, constituem o metabolismo dos xenobióticos (MANAHAN, 2003).

A biotransformação de xenobióticos geralmente envolve dois estágios distintos, referidos como reações da fase I e da fase II. A fase I envolve reações de transformação por oxidação, redução ou hidrólise, representadas principalmente pelas enzimas da superfamília do citocromo P-450. A fase II, por sua vez representada pelas enaimas glutational-S-transferases, é caracterizada pela conjugação de moléculas a fim de promover sua eliminação (DERELANKO & HOLLINGER, 2002).

1.4.1 Citocromo P-450

A superfamília do citocromo P-450 é representada por proteínas catalíticas que constituem um dos principais sistemas de enzimas que atua na biotransformação e eliminação de xenobióticos na fase I.

O sistema de monooxigenação dependente de citocromo P-450 é o principal sistema enzimático envolvido na catálise de reações de oxidação do metabolismo de drogas. Nas células, numerosas enzimas deste sistema encontram-se nas biomembranas do retículo endoplasmático liso, da mitocôndria e do núcleo. Os citocromos P-450 estão ligados aos fosfolípidios da membrana por interação de um ou dois segmentos de porções peptídicas de sua estrutura, tendo seu sítio ativo voltado para o citoplasma. A existência de dois canais de acesso para os substratos confere ao citocromo P-450 a habilidade de metabolizar uma variedade de compostos hidrofílicos e hidrofóbicos (ANDERSSON & GOKSØYR, 1994).

A capacidade que o citocromo P-450 tem de realizar reações com um grande número de substratos é decorrente da variedade de isoenzimas citocromo P-450 e da não especificidade de cada uma das isoenzimas para um substrato único. Esta pouca especificidade provê importante flexibilidade ao metabolismo de xenobióticos. Essas enzimas atuam principalmente nos processos de oxidação, redução e hidrólise de substâncias potencialmente danosas a fim de torná-las mais polares, portanto hidrossolúveis, promovendo sua excreção ou permitindo a continuidade de sua biotransformação a agentes menos tóxicos (MANAHAN, 2003).

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos são indutores efetivos de CYP1A1 e CYP1A2, enzimas envolvidas nos processos de detoxificação sob os mesmos controles regulatórios. A indução da CYP1A1 envolve a interação do indutor com um receptor citosólico hidrofóbico denominado de receptor Ah (hidrocarboneto aromático) e a translocação do complexo indutor-receptor Ah para o núcleo da célula (MANAHAN, 2003).

O gene *CYP1A1* possui uma região de controle gênico denominado elementos regulatórios do receptor Ah (AhRE). O receptor Ah, na sua forma ativa, consiste de um heterodímero composto por um domínio ligado ao indutor (ALBD) e um transportador nuclear para o receptor Ah (ARNT). Na ausência de um indutor, o ALBD fica associado a uma proteína denominada HSP-90 (*heat shock protein*). O agente indutor penetra no citoplasma celular, desloca a HSP-90 de seu sítio de ligação e se liga ao ALBD. Isto permite ao ARNT se associar com ALBD para formar o complexo indutor-receptor Ah. A

translocação deste complexo para o núcleo permite que ele se ligue ao AhRE do gene *CYP1A1* levando ao aumento da taxa de transcrição do gene (MANAHAN, 2003).

1.4.2 Glutathione-S-Transferase

As glutathione-S-transferases (GST) são enzimas detoxificadoras que catalisam a conjugação de uma variedade de moléculas orgânicas endógenas e exógenas com o substrato endógeno, a glutathione reduzida (GSH). O conjugado é excretado na bile ou transformado até ácido mercaptúrico, que é excretado na urina (MANAHAN, 2003).

A indução de GST por xenobióticos é altamente complexa e envolve tanto o metabolismo (ativação e desativação) do agente indutor, como também o controle de funcionamento de regiões laterais dos genes que codificam isoformas diferentes de GST. Algumas glutathione S-transferases de mamíferos, assim como os citocromos P-450, são reguladas através do AhR, ao qual o xenobiótico se liga (ANDERSSON & GOKSØYR, 1994).

Os substratos de GST devem ter um átomo eletrofílico e serem capazes de reagir não enzimaticamente com a glutathione reduzida. Em geral, qualquer composto que possua essas características básicas, seja praguicida, fármaco ou substância endógena, serve de substrato para conjugar-se com o GSH, um tripeptídeo formado por resíduos de glicina, cisteína e ácido gama-glutâmico. A glutathione representa uma das principais formas de eliminação de espécies reativas do oxigênio (ERO). Os conjugados do GSH são moléculas menos tóxicas, mais solúveis e, portanto, mais facilmente excretáveis que os compostos originais (ANDERSSON & GOKSØYR, 1994).

Dentre as glutathione-S-transferases de mamíferos, cerca de 95% são predominantemente enzimas de fração citosólica e 5% pertencem à fração microsomal (retículo endoplasmático) e mitocondrial (DERELANKO & HOLLINGER, 2002).

Diferentes GST exibem diferentes atividades quando induzidas por um composto específico ou por um metabólito formado de um composto particular. A ação conjunta de várias isoenzimas de GST pode compor como que uma rede de defesa do organismo contra as substâncias tóxicas. Desta forma, quando células absorvem xenobióticos, pode ocorrer aumento de uma dada classe ou isoforma específica de GST. (DERELANKO & HOLLINGER, 2002).

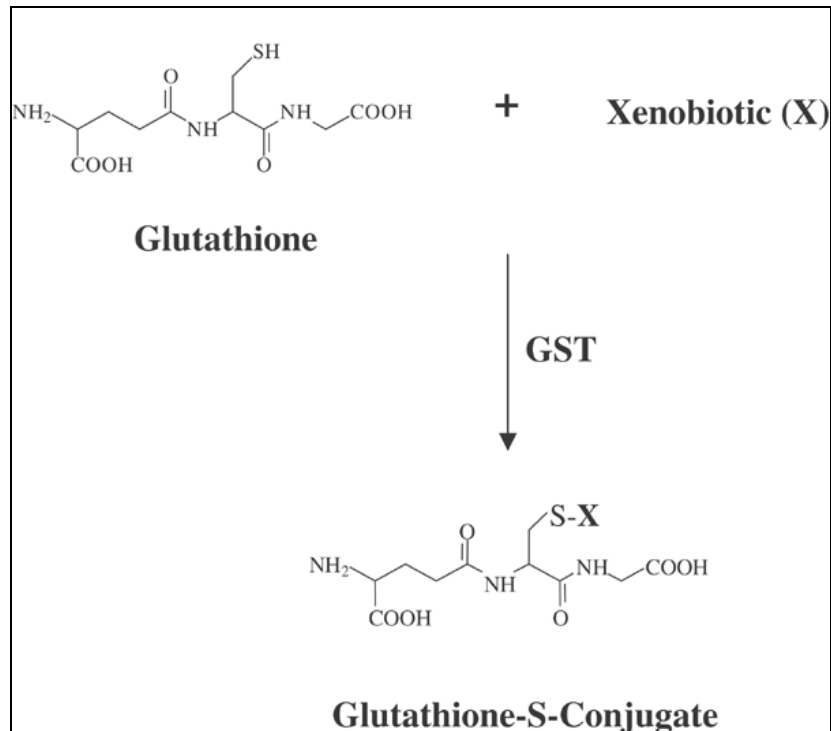


Figura 4 – Mecanismo de conjugação da Glutathione-S-Transferase.
Fonte: Derelanko & Hollinger (2002).

Em concentrações superiores a $3\mu\text{g/mL}$ a α -tomatina apresentou capacidade de diminuir os níveis de GSH (SHIEH et al., 2011). Esse fato é concomitante ao aumento nos níveis de ERO na presença desse glicoalcalóide. Os efeitos da α -tomatina sobre a regulação e atividade de enzimas envolvidas nos processos de biotransformação de xenobióticos ainda é desconhecido, sendo reconhecida apenas sua natureza esteroideal como potencialmente danosa a alguns organismos.

1.5 CONSIDERAÇÕES SOBRE P53

Diversas moléculas estão envolvidas nos processos de controle do ciclo celular, e dentre elas podemos destacar a proteína 53 (p53). Essa proteína de 53 kDa é codificada pelo gene *P53*, cuja atividade está intimamente relacionada a integridade do material genético. P53 é uma proteína citoplasmática fosforilada com propriedades de ligação ao DNA, ela age como um fator de transcrição e interage com vários outros genes, por exemplo, o gene WAF1 (também chamado p21), cujo produto protéico para o ciclo celular na

fase G1, antes que ocorra a replicação do DNA. Se o *P53* estiver mutado, as células podem replicar o DNA danificado. Além disso, a p53 está envolvida na sinalização de morte apoptótica de células anormais ou danificadas. Por esse motivo a p53 também é denominada molécula "guardiã" do DNA (KALDIS, 2010).

A principal função da p53 é a manutenção da integridade do código genético, ou seja, a manutenção da mesma seqüência de nucleotídeos ao longo de toda a molécula de DNA, cuja estrutura deve ser constante em todas as células do nosso corpo.

Durante o ciclo de divisão celular, a proteína p53 faz uma verificação quanto à eventual ocorrência de uma mutação na seqüência do código genético como consequência de um erro ocorrido na replicação do DNA. Caso seja verificada a existência de um erro a p53 desencadeia um conjunto de reações que levam a ativação de proteínas de reparação, que visam o DNA ao seu estado normal (KAHLENBERG et al., 2000). No caso de o DNA se encontrar já demasiado danificado cabe à proteína p53 impedir que a célula em questão entre em mitose e complete a divisão celular. Para tal a p53 pode induzir a morte da célula através da apoptose ou impedir que esta se multiplique definitivamente, provocando senescência celular (BÉNADE et al., 2003).

As mutações somáticas no gene supressor tumoral *P53* são encontradas em aproximadamente 50% de todos os tumores humanos, fazendo dele o gene mais alterado nessa condição patológica. As mutações no gene *P53* ocorrem em mais de 50 tipos diferentes de tumores, incluindo os de bexiga, cérebro, mama, cólon, fígado, pulmão, ovário, próstata e estômago (BÉNADE et al., 2003). A integridade de p53 e suas diferentes funções no controle do ciclo celular dão a essa molécula título de supressora de tumores, uma vez que sua ausência está diretamente associada a síndrome de Li-Fraumeni – uma síndrome hereditária cujos portadores são susceptíveis ao aparecimento de diversos tipos de tumores (KAHLENBERG et al., 2000).

2 JUSTIFICATIVA

A exposição do homem a agentes mutagênicos tem aumentado consideravelmente desde a revolução industrial, seja pelo aumento de poluentes lançados no meio ambiente, seja pela modificação dos hábitos alimentares ou mesmo pelo aumento na expectativa de vida. A interação desses agentes aliada à suscetibilidade genética de cada indivíduo apresenta-se como um fator importante de desenvolvimento de mutações no DNA, podendo gerar assim processos cancerígenos. Uma prova disso é o crescente número de casos de câncer relatados nos últimos anos.

O câncer de pulmão é o segundo em mortalidade e o primeiro em número de casos. Apesar de já ter sido estudada frente tantas patologias, pouco se sabe acerca dos eventos bioquímicos e genéticos regulados pela α -tomatina. Mesmo já tendo sido testada contra diferentes tipos de tumor as propriedades desse glicoalcalóide ainda não foram suficientemente testadas em células tumorais de pulmão.

Dessa forma se evidencia a importância de compreender melhor as propriedades da α -tomatina em células tumorais de pulmão a fim de se provar seus efeitos antiproliferativos e de indução da apoptose nessas células, contribuindo com as pesquisas por substâncias naturais com atividade antitumoral e ampliando os conhecimentos acerca dos fenômenos bioquímicos inerentes a seus processos. Estas pesquisas poderão levar ao descobrimento de novas terapias que salvam vidas ou que determinam uma melhor qualidade de vida ao indivíduo, no desenvolvimento de fitomedicamentos e tratamentos quimioterápicos para os diversos tipos de câncer e outras patologias.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Estudar os efeitos de diferentes concentrações de α -tomatina em células tumorais de pulmão humano da linhagem NCI-H460, avaliando citotoxicidade, proliferação celular, indução de apoptose, genotoxicidade e alterações na expressão de genes de interesse.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a citotoxicidade da α -tomatina em cultura de células NCI-H460 através de ensaio de citotoxicidade (MTT).
- Avaliar os efeitos da α -tomatina na cinética de proliferação e viabilidade celular através de contagem em hemocitômetro com adição do corante azul de Trypan.
- Identificar o potencial de indução de apoptose através do ensaio citomorfológico *in situ* com o corante laranja de acridina.
- Estudar os possíveis efeitos genotóxicos dessa substância através do Ensaio do Cometa.
- Através de RT-PCR quantitativa avaliar a expressão dos genes da glutathione-S-transferase P1 (*GST*); citocromo P-450 1A1 (*CYP1A1*) e proteína 53 (*P53*), genes relacionados aos processos de detoxificação de xenobióticos e ao ciclo celular.

REFERÊNCIAS

- ANDERSSON, T.; GOKSØYR, A. Distribution and induction of cytochrome P-450 1A1 in the rainbow trout brain. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 13, p. 335-342, 1994.
- BAER-DUBOWSKA, W.; BARTOSZEK, A.; MALEJKA-GIGANTI, D. **Carcinogenic and anticarcinogenic food components**. Boca Raton: CRC Press, 2006.
- BARCELOUX, D. G. Potatoes, Tomatoes, and Solanine Toxicity (*Solanum tuberosum* L., *Solanum lycopersicum* L.). **Medical Toxicology of nature substances**, v. 55, p. 77-83, 2008.
- BÉNARD, J.; DOUC-RASY, S.; AHOMADEGBE, J. TP53 family members and human cancers. **Human Mutation**, v. 21, p. 182-191, 2003.
- BLANKEMEYER, J. T.; WHITE, J. B.; STRINGER, B. K.; FRIEDMAN, M. Effect of c, Tomatine and Tomatidine on Membrane Potential of Frog Embryos and Active Transport of Ions in Frog Skin. **Food and Chemical Toxicology**, v. 35, p. 639-646, 1997.
- CHAO, M. a-Tomatine-mediated anti-cancer effect on leukemia cell lines. **Dept. of Pharmacology and Graduate Institute of Pharmacology**. Disponibilizado por NTU Institutional Repository – Dissertations and Theses em <<http://140.112.114.62/handle/246246/180543>>. Acesso em: 03 mar. 2010.
- CHATAING, B.; CONCEPCION, J.L.; DE CRISTANCHO, N.B.; USUBILLAGA, A. Estudio clinico de la efectividad de extractos alcaloides obtenidos de los frutos Del *Solanum americanum* Miller sobre el Herpes simplex, Herpes Zoster y Herpes genitalis. **Revista de la Facultad de Farmacia**, v. 32, p. 18-25, 1997.
- CHUANG, S. E.; KUO, M. L.; HSU, C. H.; CHEN, C. R.; LIN, J. K.; LAI, G. M.; HSIEH, C. Y.; CHENG, A. L. Curcumin-containing diet inhibits diethylnitrosamine-induced murine hepatocarcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 21, p. 331-335, 2000.
- CROCKER, J.; MURRAY, P. G. **Molecular Biology in Cellular Pathology**. Chichester: John Wiley & Sons, 2003.
- DERELANKO, M. J.; HOLLINGER M. A.; **Handbook of Toxicology**. 2 Ed. Morristown: Taylor and Francis, 2002.
- FILDERMAN, R. B.; KOVACS, B. A. Anti-inflammatory activity of the steroid alkaloid glycoside, tomatine. **British Journal of Pharmacology**, v. 37, p. 748-755, 1969.
- FRIEDMAN, M.; MCQUISTAN, T.; HENDRICKS, J. D.; PEREIRA, C.; BAILEY, G. S. Protective effect of dietary tomatine against dibenzo[a,l]pyrene (DBP)-induced liver and stomach tumors in rainbow trout. **Molecular Nutrition Food Research**, v. 51, p. 1485-1491, 2007.
- FRIEDMAN, M. Tomato glycoalkaloids: role in the plant and in the diet. **J. Agric. Food Chem**, v. 50, p. 5751-5780, 2002.

FRIEDMAN, M.; FITCH, T. E.; YOKOYAMA, W. E. Lowering of Plasma LDL Cholesterol in Hamsters by the Tomato Glycoalkaloid Tomatine. **Food and chemical toxicology**, v. 38, p. 549-553, 2000.

FRIEDMAN, M.; HENIKA, P. R.; MACKEY, B. E. Feeding of Potato, Tomato and Eggplant Alkaloids Affects Food Consumption and Body and Liver Weights in Mice. **The Journal of Nutrition**, v. 96, p. 989-999, 1995.

FRIEDMAN, M.; KOZUKUE, N.; HARDEN, L. A. Preparation and Characterization of Acid Hydrolysis Products of the Tomato Glycoalkaloid α -Tomatine. **J. Agric. Food Chem**, v. 46, p. 2096-2101, 1998.

FRIEDMAN, M.; LEVIN, C. E.; LEE, S.; KIM, H.; LEE, I.; BYUN, J.; KOZUKUE, N. Tomatine-Containing Green Tomato Extracts Inhibit Growth of Human Breast, Colon, Liver, and Stomach Cancer Cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 5727-5733, 2009.

GEE, J. M.; WORTLEY, G. M.; JOHNSON, I. T.; PRICE, K. R.; RUTTEN, A. A. J. J. L.; HOUBEN, G. F.; PENNINKS, A. H. Effects of Saponins and Glycoalkaloids on the Permeability and Viability of Mammalian Intestinal Cells and on the Integrity of Tissue Preparations *In Vitro*. **Toxicology in vitro**, v. 10, p. 117-128, 1996.

HONG, S. J.; DAWSON, T. M.; DAWSON, V. L. Nuclear and mitochondrial conversations in cell death: PARP-1 and AIF signaling. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 25, p. 259-264, 2004.

IKEDA, T.; YAMAUCHI, K.; NAKANO, D.; NAKANISHI, K.; MIYASHITA, H.; ITO, S.; NOHARA, T. Chemical trans-glycosylation of bioactive glycolinkage: synthesis of an a-lycotetraosyl cholesterol. **Tetrahedron Letters**, v. 47, p. 4355-4359, 2006.

IRVING, G. W.; JR., FONTAINE, T. D.; DOOLITTLE, S. P. Partial antibiotic spectrum of tomatine, an antibiotic agent from the tomato plant. **J. Bact.**, v. 52, p. 601-607, 1945.

KAHLENBERG, M.S.; STOLER, D. L.; RODRIGUEZ-BIGAS, M. A. ; WEBER, T. K.; DRISCOLL, D. L.; ANDERSON, G. R.; PETRELLI, N. J. p53 tumor suppressor gene mutations predict decreased survival of patients with sporadic colorectal carcinoma. **Cancer**, v. 88, p. 1814-1819, 2000

ITO, S.; IHARA, T.; TAMURA, H.; TANAKA, S., α -tomatine, the major saponin in tomato, induces programmed cell death mediated by reactive oxygen species in the fungal pathogen *Fusarium oxysporum*, **FEBS Lett**, v. 581, p. 3217-3222, 2007.

KALDIS, P. **Cell Cycle Regulation (Results and Problems in Cell Differentiation)**. New York: Springer, 2010.

KELLOFF, G. J.; BOONE, C. W.; STEELE, V. E.; FAY, J. R.; LUBET, R. A., CROWELL, J. A.; SIGMAN, C.C. Mechanistic considerations in chemopreventive drug development. **J. Cell Biochem.**, v. 20, p. 1-24, 1994.

- KELLOFF, G. J.; CROWELL, J. A.; STEELE, V. E.; LUBET, R. A.; MALONE, W. A.; BOONE, C. W.; KOPELOVICH, L.; HAWK, E. T.; LIEBERMAN, R.; LAWRENCEE, J. A.; ALI, L.; VINER, J. L.; SIGMAN, C. C. Progress in Cancer Chemoprevention: Development of Diet-Derived Chemopreventive Agents. **J. Nutr.**, v. 130, p. 467-471, 2000.
- KEUKENS E. A. J.; VRIJE T.; VAN DEN BOOM C.; DE WAARD P.; PLASMA W. H. H.; THIEL F.; CHUPIN V.; JONGEN D. M. F.; KRUIJFF B. Molecular basis of glycoalkaloid induced membrane disruption. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1240, p. 216-228, 1995.
- KEUKENS, E. A. J.; VRIJE, T.; FABRIE, C. H. J. P.; DEMEL, R. A.; JONGEN, W. M. F.; KRUIJFF, B. Dual specificity of sterol-mediated glycoalkaloid induced membrane disruption. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1110, p. 127-136, 1992.
- KIM, K. S.; RHEE, K. H.; YOON, J. H.; LEE, J. G.; LEE, J. H.; YOO, J. B. *Ginkgo biloba* extract(EGb 761) induces apoptosis by the activation of caspase-3 in oral cavity cancer cells. **Oral Oncol.**, v. 41, p. 383-389, 2005.
- KOZUKUE, N.; HAN, J.; LEE, K.; FRIEDMAN, M. Dehydrotomatine and α -Tomatine Content in Tomato Fruits and Vegetative Plant Tissues. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 2079-2083, 2004.
- LEE, K. R.; KOZUKUE, N.; HAN, J. S.; PARK, J. H., Glycoalkaloids and metabolites inhibit the growth of human colon (HT29) and liver (HepG2) cancer cells, **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, p. 2832-2839, 2004.
- LEONARDI, C.; AMBROSINO, P.; ESPOSITO, F.; FOGLIANO, V. Antioxidative Activity and Carotenoid and Tomatine Contents in Different Typologies of Fresh Consumption Tomatoes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 4723-4727, 2000.
- MANAHAN, S. E. **Toxicological Chemistry and Biochemistry**. New York: Lewis Publishers, 2003.
- MICICH T. J. Behavior of polymer-supported tomatine toward cholesterol in the presence and absence of butter oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 39, p. 1610-1613, 1993.
- MORROW, W. J. W.; YANG, Y.; SHEIK, N. A. Immunobiology of the Tomatine adjuvant. **Vaccine**, v. 22, p. 2380-2384, 2004.
- MORSE, M. A.; STONER, G. D. Cancer chemoprevention: principles and prospects. **Carcinogenesis**, v. 14, p. 1737-1746, 1993.
- RAJANANTHANAN P.; SHEIKH, N. A.; ATTARD, G. S.; MORROW, W. J. W. Evaluation of novel aggregate structures as adjuvants: composition, toxicity studies and humoral responses. **Vaccine**, v. 17, p. 715-730, 1999.
- ROCHA, J. C. C.; FERREIRA, C. G. **Oncologia Molecular**. Rio de Janeiro: Atheneu, 2004.
- RODDICK, J. G. The steroidal glycoalkaloid α -tomatine. **Phytochemistry**, v. 13, p. 9-25, 1973.

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

RUDDON, R. W. **Cancer Biology**. 4. ed. New York: Oxford University Press, 2007.

SHEN, Y. C.; CHEN, S. L.; ZHUANG, S. R.; WANG, C. K. Contribution of tomato phenolics to suppression of COX-2 expression in κ B cells. **J. Food Sci.**, v. 73, p. 1-10, 2008.

SHIEH, J.; CHENG, T.; SHI, M.; WU, P.; CHEN, Y.; KO, S.; SHIH, Y. α -Tomatine Suppresses Invasion and Migration of Human Non-Small Cell Lung Cancer NCI-H460 Cells Through Inactivating FAK/PI3K/Akt Signaling Pathway and Reducing Binding Activity of NF- κ B. **Cell Biochem Biophys**. Disponibilizado pela PubMed em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21264526>>. Acesso em: 03 mar. 2011

SHIH, Y.; SHIEH, J.; WU, P.; LEE, Y.; CHEN, Y.; CHIANG, T. α -Tomatine inactivates PI3K/Akt and ERK signaling pathways in human lung adenocarcinoma A549 cells: Effect on metastasis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p 1985-1995, 2009.

SIMONS, V.; MORRISSEY, J. P.; LATIJNHOUWERS, M.; CSUKAI, M.; CLEAVER, A.; YARROW, C.; OSBOURN, A. Dual effects of plant steroidal alkaloids on *Saccharomyces cerevisiae*. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 50, p. 2732-2740, 2006.

SLATTERY, M. L. Diet, lifestyle, and colon cancer. Diet, lifestyle, and colon cancer. **Semin. Gastrointest. Dis.**, v. 11, p. 142-6, 2000.

WAKKARY, J. A.; KOVACS, B. A.; GOODFRIEND, L.; ROSE, B. Isolation of antihistaminelike substances from crown gall of tomato. **Excerpta Med. int. Congr.**, v. 144, p. 4., 1967.

WILSON, R. H.; POLEY, G. W.; DeEDS, F. Some pharmacologic and toxicologic properties of tomatine and its derivatives. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 3, p. 39-48, 1961.

WOGAN, G. N.; HECHT, S.S.; FELTON, J.S.; CONNEY, A.H.; LOEBE, L.A. Environmental and chemical carcinogenesis. **Sem. Cancer Biol.**, v. 14, p. 473 86, 2004.

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

ZHANG, Y.; TALALAY, P. Anticarcinogenic Activities of Organic Isothiocyanates: Chemistry and Mechanisms. **Cancer Res.**, v. 54, p. 19768, 1994.

ARTIGO¹**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CITOTÓXICOS E ANTIPROLIFERATIVOS DA
 α -TOMATINA EM CÉLULAS TUMORAIS NÃO-PEQUENAS DE PULMÃO**

Rodrigo César dos Santos Vida, Mário Sérgio Mantovani*

Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina

* Dr. M. S. Mantovani

Departamento de Biologia Geral – CCB

Universidade Estadual de Londrina – Campus Universitário

P.O. Box 6001, Londrina, Paraná, Brazil.

CEP: 86051-990

e-mail: biomsm@uel.br

Phone: 55 43 3371-4977

Fax: 55 43 3371-4207

¹ Artigo a ser submetido ao periódico *Toxicology in vitro*.

RESUMO

A α -tomatina é um glicoalcalóide encontrado em diferentes partes do tomateiro (*Lycopersicon esculentum*), presente em maior quantidade nos tomates quando ainda estão verdes. Diversas propriedades biológicas são atribuídas a esse composto, como atividades antitumoral, antiinflamatória, imunorreguladora, fungicida e bactericida. O câncer de pulmão é o primeiro em número de casos e o segundo em mortalidade. Trata-se de uma neoplasia bastante agressiva cujos tratamentos pós-diagnóstico – ressecção cirúrgica e quimioterapia – nem sempre são efetivos. O estudo das propriedades quimioprotetora e quimioterápica de substâncias de origem natural apresentam novos potenciais tratamentos no controle do crescimento tumoral através da inibição da proliferação celular e indução de apoptose. Esse trabalho tem por objetivo avaliar os efeitos da α -tomatina sobre a proliferação celular, apoptose, genotoxicidade e regulação gênica de células tumorais não-pequenas de pulmão humano. Para isso utilizaremos cultura *in vitro* de células da linhagem NCI-H460 sob diferentes concentrações de α -tomatina. A α -tomatina inibiu a sobrevivência celular em 25,2% quando utilizada na concentração de 2 μ g/mL durante 24 horas, e inibiu completamente a proliferação celular em concentrações superiores a 5 μ g/mL. Nenhuma das concentrações de α -tomatina testadas induziu apoptose, assim como não foram genotóxicas. Nas concentrações de 0,1 e 2 μ g/mL não foram observadas alterações na expressão gênica do *CYP1A1*, *P53* e *GST*. Os dados sugerem que a α -tomatina não é um indutor das vias clássicas da apoptose, seus efeitos observados *in vitro* são provavelmente produto de sua ação na integridade da membrana plasmática e na lise das células tumorais. Diversos estudos apontam as propriedades da α -tomatina e seus benefícios como promissor composto antitumoral. Nosso trabalho contribui com as mais recentes pesquisas e sugere novos estudos para elucidar seus mecanismos bioquímicos.

Palavras-chave: α -tomatina. Proliferação. NCI-H460. Citólise.

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas as extensas pesquisas à procura de substâncias naturais ativas contra o câncer levaram à descoberta de dezenas de substâncias químicas com essa propriedade (CHUANG et al., 2000). Dentre elas destacamos a α -tomatina, presente em grande quantidade em tomates verdes. Trata-se de um glicoalcalóide formado por uma estrutura esteroidal (aglicona) ligada a um radical de quatro carboidratos (β -Licotetraose) (KOZUKUE et al., 2004). As propriedades biológicas da α -tomatina são discutidas desde a década de 1940 quando seu potencial antiinflamatório foi revelado (IRVING et al., 1945), e nos últimos anos suas propriedades antitumorais têm sido investigadas.

A α -tomatina apresenta efetivas propriedades imunorregulatórias, sendo capaz de induzir uma resposta T citotóxica e ampliar a duração de anestésicos (RAJANANTHANAN et al., 1999; MORROW et al., 2004), além de atuar como antiinflamatório no modelo de inflamação induzida por carragenina em pata de camundongo (FRIEDMAN et al., 2000). A α -tomatina também é capaz de interagir diretamente com a molécula de colesterol, promovendo sua eliminação e reduzindo a disponibilidade dessa molécula no plasma sanguíneo (MICICH, 1993). Essa capacidade de interação com o colesterol, aliada a presença da cadeia lateral de carboidratos, permite a α -tomatina se ligar eficientemente a membranas, onde passa a modular os processos de permeabilidade e despolarização, podendo levar a lise de células (KEUKENS et al., 1995; GEE et al., 1996; BLANKEMEYER et al., 1997).

A presença da α -tomatina em tomates verdes reflete outra de suas propriedades: sua capacidade antifúngica e bactericida. Esse glicoalcalóide é capaz de impedir a proliferação desses microorganismos (FRIEDMAN et al., 2002), bem como de algumas larvas, nematelmintos (SIMONS et al., 2006) e vírus (CHATAING et al., 1997), danosos também à saúde humana.

Quanto a sua capacidade antitumoral, diversos estudos apontam para um efeito antiproliferativo sobre células de diferentes tipos de câncer. Linhagens celulares de câncer de mama (MCF-7), câncer de cólon (HT-29), câncer gástrico (AGS) e hepatoma (HepG2), bem como linhagens de adenocarcinoma de pulmão (A549, NCI-H460) e fígado (HeLa) apresentaram significativa redução de proliferação (LEE et al., 2004; FRIEDMAN et al., 2009; SHII et al., 2009). Foi-se ainda constatado um potencial efeito protetor *in vivo* (FRIEDMAN et al., 2007) e a capacidade de limitar a dispersão metastásica (SHII et al.,

2009; SHIEH et al., 2011) através da regulação da expressão de metaloproteinases e fatores de transcrição nuclear.

Apesar de amplamente testada, os mecanismos de ação da α -tomatina não são totalmente compreendidos. Sua atividade antiproliferativa parece estar diretamente relacionada a indução de apoptose e a lise de membranas celulares, além da modificação de vias de transdução de sinal. A linhagem NCI-H460, células tumorais não-pequenas de pulmão humano, foi testada frente a expressão de metaloproteinases e outras moléculas relacionadas a metástases (SHIEH et al., 2011), mas pouco se sabe sobre os efeitos da α -tomatina sobre a proliferação, genotoxicidade e expressão gênica nesse tipo celular.

Visando o desenvolvimento de novos agentes farmacológicos para a quimioprevenção do câncer, fazem-se necessárias as pesquisas com compostos de origem natural cujos efeitos são promissores frente essa doença. No presente estudo avaliamos as propriedades pró-apoptóticas e antiproliferativas da α -tomatina em células NCI-H460, além de sua influência na expressão de genes envolvidos nos processos de proliferação celular (*P53*) e detoxificação de xenobióticos (*GST* e *CYP1A1*) e seus efeitos genotóxicos, objetivando compreender melhor seus mecanismos de atuação e estender os conhecimentos científicos acerca de suas propriedades antitumorais.

MATERIAIS E MÉTODOS

Agentes Químicos

A α -tomatina foi adquirida comercialmente em sua forma purificada liofilizada (CAS 17406-45-0, TCI America). A substância foi dissolvida em dimetilsulfóxido (DMSO) estéril e armazenada sob refrigeração (-20°C). Os agentes utilizados como controle positivo nos experimentos foram a Doxorubicina (CAS 25316-40-9, Adriblastina - Pharmacia) nos Ensaios de Citotoxicidade, Cinética de Proliferação, Viabilidade Celular e Cometa (10 μ g/mL). A Camptotecina (CAS 7689-03-4, Acros Organics) foi utilizada como controle positivo no Ensaio para Avaliação da Indução de Apoptose *in situ* (10 μ g/mL).

Cultura de Células

A linhagem de células tumorais não-pequenas de pulmão humano (NCI-460) utilizada neste estudo foi adquirida no Banco de células do Rio de Janeiro. Estas células foram cultivadas em frascos de cultura de 25cm² contendo meio DMEM (Gibco) suplementado a 10% de soro bovino fetal (SBF - Gibco) e antibiótico/antimicótico (0,1% - Gibco), em estufa biológica a 37°C com atmosfera controlada 5% de CO₂.

Ensaio de Citotoxicidade (MTT)

O Ensaio do MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromide) foi realizado de acordo com o protocolo sugerido por Mossmann (1983) com modificações. Foram utilizadas placas de cultura celular de 24 poços, onde em cada poço foram semeadas 2x10⁴ células, com exceção dos poços controle sem células (branco). As células foram cultivadas durante 24 horas em meio DMEM suplementado 10% SBF. Após este período o meio de cultura da placa foi descartado e adicionado meio novo com os respectivos tratamentos: doxorubicina na concentração de 10 µg/mL; α-tomatina nas concentrações 0,1; 1; 2; 3; 5 e 10µg/mL. A alguns poços ainda foi adicionado apenas meio de cultivo (controle negativo e branco). As células foram incubadas durante por 24 horas, e após esse tempo o meio de cultura foi substituído por meio de cultivo novo com MTT na concentração de 0,167 mg/mL. A placa foi incubada por 4 horas e depois este período foi o meio de cultura contendo MTT foi retirado e aos poços foi adicionado DMSO para diluir os cristais formados. A leitura foi realizada em leitor de microplacas a 550nm. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Ensaio de Cinética de Proliferação Celular

Para a avaliação da cinética de proliferação 10⁵ células foram semeadas em poços de superfície 10cm² (placas de 6 poços). Às placas foram adicionados os seguintes

tratamentos: controle (meio de cultura suplementado 10% SBF); agente antiproliferativo (Doxorrubicina 10 μ g/mL); tratamentos com α -tomatina em diferentes concentrações (1; 2; 2,5 e 5 μ g/mL). Após cada tempo de tratamento (24, 48, 72 e 96 horas) as células foram colhidas e quantificadas segundo o seguinte protocolo: o meio de cultura foi reservado e os poços lavados duas vezes com 2 mL de PBS. As células foram destacadas (incubação com tripsina 0,01% por 5 minutos), inativadas com o meio reservado e centrifugadas (5 minutos, 1080rpm). Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o pellet de células restaurado em 0,5 mL de meio de cultivo. A contagem das células Foi realizada em hemocitômetro tipo câmara de Neubauer. Os valores quantificados forma plotados segundo um eixo cartesiano de tempo por volume para a obtenção da curva de proliferação e os dados usados para calcular a regressão exponencial (através do método dos mínimos quadrados). O experimento foi realizado em triplicata.

Ensaio de Viabilidade Celular com Azul de Trypan

O ensaio para avaliação da viabilidade celular foi realizado paralelamente ao Ensaio de Cinética de Proliferação Celular. Após a obtenção do pellet celular por centrifugação e sua re-suspensão em 0,5mL de meio de cultivo uma alíquota da suspensão celular (20 μ L) foi homogeneizada com o corante Azul de Trypan na proporção 1:1. As células foram quantificadas em hemocitômetro tipo câmara de Neubauer e expressas em porcentagem O ensaio foi realizado em triplicata.

Ensaio para Avaliação da Indução de Apoptose *in situ*

Em uma placa de 6 poços, 1x10⁵ células foram incubadas em meio DMEM suplementado 10% SBF sobre uma lamínula (18x18mm). Após o tempo de 24h de estabilização o meio foi substituído pelos seguintes tratamentos: controle negativo (meio de cultura); indutor de apoptose (Camptotecina 10 μ g/mL) e três concentrações de α -tomatina (0,1; 1 e 2 μ g/mL). As células foram colhidas de acordo com a metodologia descrita por Rovozzo *et al.* (1973): As células foram lavadas com PBS, as lamínulas retiradas da placa de

cultura e fixadas em fixador de Carnoy por 5 minutos. A lamínula é tratada com passagens em concentrações decrescentes de etanol (95% a 25%), e a seguir são lavadas com Tampão McIlvaine por 5 minutos. As lamínulas são então coradas com acridina orange (0,01%, 5 minutos) ao abrigo de luz, seguida de outra lavagem com tampão McIlvaine. Para a montagem da lâmina a lamínula foi invertida sobre ela, adicionada de uma gota de tampão McIlvaine e selada com esmalte cosmético simples. A análise da lâmina foi feita em microscópio de fluorescência (filtro de excitação de 420-490 nm e filtro de barreira de 520nm). Os experimentos foram feitos em triplicata e 1500 células foram analisadas por tratamento. A identificação das células apoptóticas foi realizada por análise nas mudanças morfológicas das células como condensação da cromatina, formação de corpos apoptóticos ou fragmentação do DNA nuclear após coloração com laranja de acridina.

Ensaio de Avaliação de Genotoxicidade (Cometa)

Foram cultivadas 10^6 células em frascos de cultura 25cm^2 e incubadas em meio de cultivo suplementado 10% SBF durante 24 horas para estabilização. Após esse período o meio de cultivo foi substituído pelos seguintes tratamentos: controle (apenas meio de cultivo), α -tomatina (0,1; 1 e $10\mu\text{g/mL}$) e indutor de danos (Doxorrubicina $10\mu\text{g/mL}$). Os cultivos foram incubados durante três horas em estufa a 37°C 5% CO_2 . As células então foram lavadas duas vezes com PBS (2mL) e destacadas com tripsina, inativadas e centrifugadas (5 minutos a 1080 RPM). O sobrenadante foi desprezado e as células resuspendidas em 0,5mL de meio de cultivo. As etapas seguintes do preparo das células foram realizadas de acordo com Singh e colaboradores (1997). As células foram homogeneizadas em agarose de baixo ponto de fusão (LMP 36°C) na proporção 1:6 e distribuídas sobre lâminas cobertas com agarose normal. As lâminas foram cobertas com uma lamínula estéril e deixadas sob refrigeração por vinte minutos. Depois disso as lâminas foram imersas em solução de lise alcalina para o rompimento das membranas e exposição do núcleo (processo de denaturação de membranas) durante uma hora e meia. As lâminas foram submetidas à eletroforese em tampão alcalino (25V a 300mA durante 20 minutos), neutralizadas, desidratadas e armazenadas em geladeira ($0-5^\circ\text{C}$). As lâminas foram coradas com brometo de etídio 0,01% e analisadas em microscópio de fluorescência (filtro de excitação de 420-490nm e filtro de barreira de 520nm).

Os danos ao material genético foram avaliados com base na extensão dos rastros do fragmento (*scores*) e classificados de acordo com a seguinte magnitude: grau zero, nenhum dano; grau um, poucos danos; grau dois, danos medianos e grau três, danos severos. As magnitudes se baseiam no tamanho do rastro deixado pelos fragmentos de DNA em relação ao diâmetro do núcleo. O experimento foi realizado em triplicata, baseando-se na leitura de 100 cometas por lâmina. Os *scores* foram obtidos com base na multiplicação do número de células contadas pelo seu valor de *score* correspondente.

RT-PCR em Tempo Real

O experimento de qRT-PCR foi realizado de acordo com as especificações de Bustin e colaboradores (2009): em frascos de cultura de 25 cm² foram semeadas 10⁶ células e deixadas por 24 horas para estabilização. Depois desse período o meio de cultivo foi substituído pelos seguintes tratamentos, realizados em frascos duplicados: controle (apenas meio de cultivo), α -tomatina (0,1 e 2 μ g/mL). As células permaneceram incubadas durante 12 horas. Após esse período as células foram obtidas e o RNA total foi extraído com uso do reagente Trizol-LS (Invitrogen) de acordo com o fabricante. As extrações foram validadas através da razão das absorbâncias espectrofotométricas (A260/A280, tendo como limites 1,9 e 2,1) e a integridade do material definida pela resolução em gel de agarose 0,8% (visualização de duas bandas nítidas). A partir do RNA íntegro foi-se procedido a síntese de DNA complementar (cDNA). Para tal, utilizamos 2 μ L de DNTP (Invitrogen - 10mM), 1 μ L de oligo(dT) (Invitrogen - 10pmol/ μ L), 500ng de RNA total e o volume foi completado com 14,9 μ L de água DEPC (1%). Esse mix foi incubado durante 5 minutos em termociclador (TECHNE TC 412) a 65°C e depois transferido rapidamente para o gelo, adicionado de 4 μ L de tampão da MLv 5x (Invitrogen); 0,1 μ L de inibidor de ribonuclease (RNase out - Invitrogen) e 1 μ L de transcriptase reversa (M-MLv-RT - Invitrogen), totalizando um volume final de 20 μ L. Esse mix foi levado ao termociclador a 37°C por 50 minutos, seguido de 15 minutos a 70°C. O cDNA foi acondicionado em *freezer* -80°C.

As reações de PCR em tempo real foram realizadas no termociclador PTC 200 DNA Engine Cycler, usando o sistema de detecção Chromo 4 (MJ Research- BIO RAD). A detecção da amplificação foi feita por mensuração da fluorescência emitida pelo corante SYBR Green (Platinum SYBR Green qPCR Supermix-UDG - Invitrogen) ao se ligar à dupla

fita de DNA. As condições da PCR no termociclador foram as seguintes: desnaturação do cDNA a 50°C por 1 minuto, seguido de 95° por 3 minutos, 35 ciclos a 95°C por 20 segundos; anelamento do *primer* a 60°C por 30 segundos; e extensão a 72°C por 20 segundos, seguidos de 95°C por 10 segundos e 40°C por 1 minuto. A análise da curva de *melting* foi realizada no final da reação com temperatura de 50°C até 95°C em uma progressão de 0,5°C durante 5 segundos. Os dados foram normalizados com primers para gliceraldeído-3-fosfatodesidrogenase (*GAPDH*) amplificados em cada conjunto de experimentos de PCRs. Foram utilizados primers específicos para avaliar a expressão dos seguintes genes: glutational-S-transferase P1 (*GST*), proteína 53 (*P53*) e citocromo P-450 subunidade 1A1 (*CYP1A1*). O desenho dos *primers* utilizados para as reações de PCR em tempo real estão apresentados na Tabela 1.

Todos os experimentos foram realizados com duas culturas independentes, e cada amostra de cDNA foi analisada em três repetições para cada par de primer.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos no Ensaio de Citotoxicidade – MTT e Cometa foram submetidos à análise de variância (*one-way* ANOVA) seguido do Teste de t-Student ($\alpha = 0,05$), pelo programa SPSS v2.0. Os dados obtidos nos ensaios de Cinética de Proliferação Celular, Viabilidade Celular e Avaliação da Indução de Apoptose foram submetidos à análise de variância (*one-way* ANOVA) seguidos de Teste de Dunnet ($\alpha = 0,05$), pelo programa SPSS v2.0. Os valores do *doubling time* foram estimados de acordo com Kim (2005) realizado em Excel v2007. Os níveis de expressão dos genes em estudo foram determinados pelo método de Pfaffl e colaboradores (2002), com análise estatística realizada através do Software REST-384.

RESULTADOS

Análise da Citotoxicidade

O ensaio de citotoxicidade revelou que a α -tomatina atua sobre a sobrevivência celular de maneira dose-dependente. Foi observada significativa redução nos índices de sobrevivência quando as células foram tratadas com α -tomatina na concentração de 2 μ g/mL ou maior (Figura 1). Quando os tratamentos foram de 5 ou 10 μ g/mL a α -tomatina inibiu a sobrevivência celular de 97% das células nas primeiras 24 horas de incubação, os mesmos resultados obtidos com incubação das células com doxorubicina. A dosagem de 2,5 μ g/mL foi estimada, através de regressão linear, como sendo inibitória a 50% da sobrevivência celular. Dessa forma as concentrações de 1; 2; 2,5 e 5 μ g/mL foram selecionadas para os estudos subseqüentes.

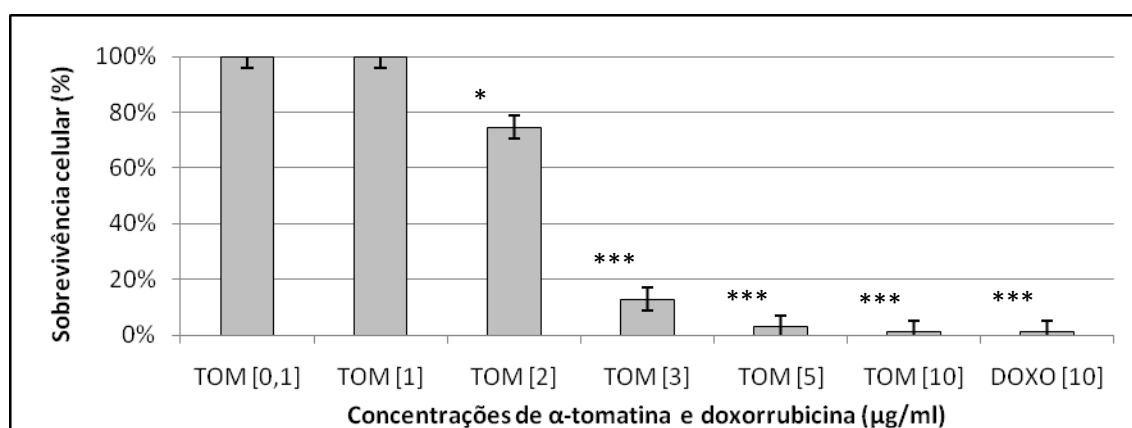


Figura 1 – Porcentagem de sobrevivência celular. Cálculo realizado a partir dos valores de absorbância obtidos através do Ensaio do MTT após tratamento de 24 horas em células NCI-H460 tratadas com α -tomatina. As barras representam as Médias \pm Desvio Padrão obtidos em três experimentos independentes. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; diferença significativa em relação ao controle.

Para entendermos melhor a ação citotóxica da α -tomatina submetemos as células ao ensaio de cinética de proliferação celular, a fim de avaliarmos a dinâmica de seu crescimento e proliferação. Observamos que a α -tomatina inibiu significativamente o número de células nas concentrações de 2,5 e 5 μ g/mL nas primeiras 48 horas de ensaio. A concentração de 1 μ g/mL não diferiu significativamente do tratamento controle em nenhum

dos tempos avaliados, tal como a concentração de 5 μ g/mL não diferiu do tratamento com doxorrubicina (Figura 2). Não houve diferença entre os tratamentos de 2 e 2,5 μ g/mL. O tratamento com 2 μ g/mL apresentou diferença significativa perante o controle a partir de 72 horas de tratamento. Os tratamentos com 2 e 2,5 μ g/mL de α -tomatina apresentaram redução de 54,8 e 71,9% no número total de células, respectivamente. Os tratamentos com 5 μ g/mL de α -tomatina e 10 μ g/mL de doxorrubicina reduziram o número total de células em aproximadamente vinte vezes.

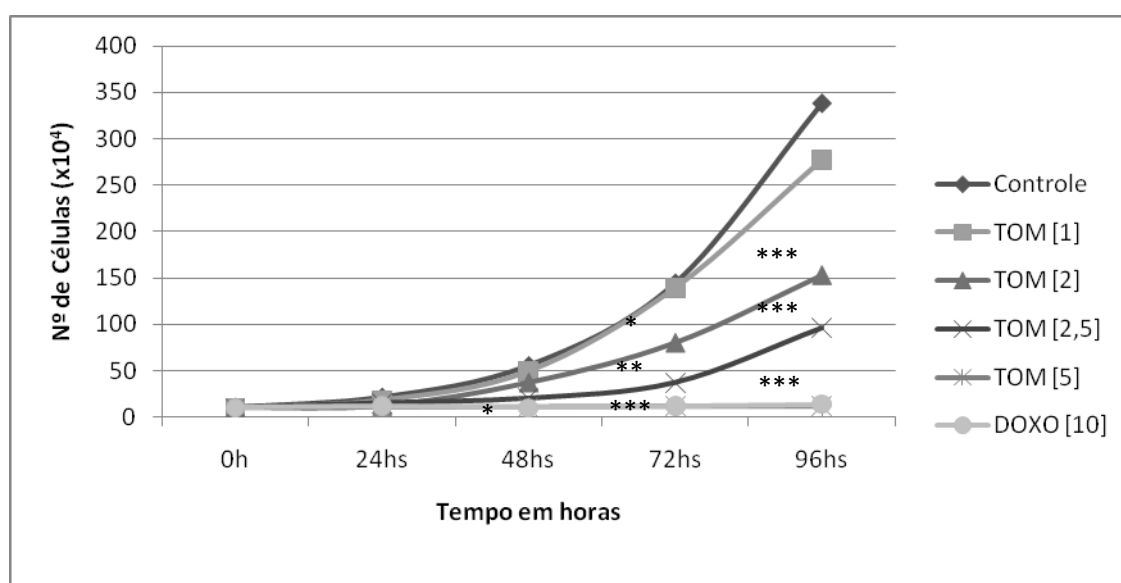


Figura 2 – Cinética de proliferação celular. Número total de células obtida através de contagem em câmara de Neubauer após 24, 48, 72 e 96 horas de tratamento com α -tomatina em células NCI-H460; Concentrações em μ g/ml; Doxorrubicina = 10 μ g/ml. * p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001; diferença significativa em relação ao controle.

O *doubling time*, tempo que a cultura de células leva para dobrar seu volume em número, apresentou-se drasticamente modificado na concentração de 5 μ g/mL em relação ao controle, subindo de 18,5 para 332,5 horas (Figura 3). Valores significativos de redução também foram observados nas concentrações de 2 e 2,5 μ g/mL.

A fim de determinarmos se a redução do número de células é decorrente de parada celular ou morte procedemos ao teste de viabilidade celular com o uso do corante azul de Trypan. Enquanto os tratamentos controle e 1 μ g/mL de α -tomatina apresentaram mais de 90% de células viáveis durante todo o experimento, o teste revelou que nas primeiras 24 horas de incubação com os tratamentos 2 e 2,5 μ g/mL a α -tomatina foram capazes de inibir

significativamente a viabilidade celular em 33 e 67% respectivamente. Posteriormente nessas mesmas concentrações foi observado um gradativo aumento no número de células viáveis, chegando a níveis normais (com referência ao controle) com 48 e 96 horas de experimento. Quando concentrada a 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a α -tomatina inibiu a viabilidade celular completamente nas primeiras 24 horas, impedindo um aumento significativo no número de células viáveis nas 72 horas seguintes, que tal como observado no tratamento com doxorrubicina, nunca foi superior a 20% do total de células (Figura 4).

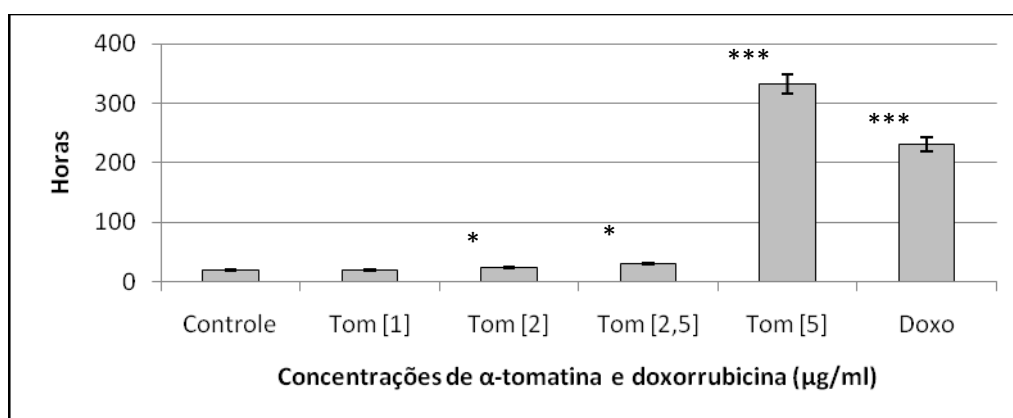


Figura 3 – Doubling time de células NCI-H460 tratadas com α -tomatina por período total de 96 horas; * $p < 0,05$ *** $p < 0,001$; Doxorubicina = 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$; diferença significativa em relação ao controle.

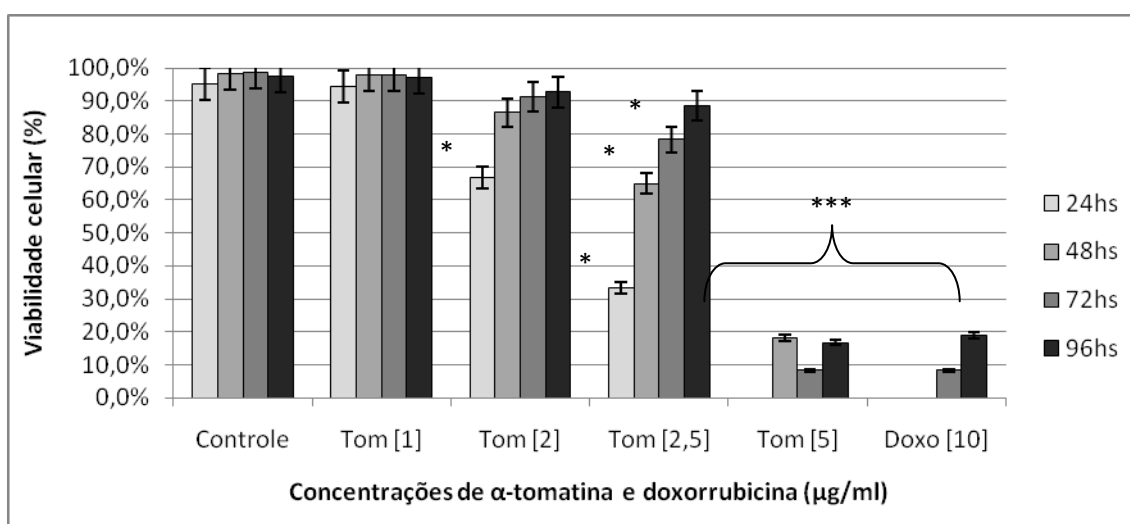


Figura 4 – Porcentagem de Viabilidade Celular em células NCI-H460 tratadas com α -tomatina nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas. As barras representam as Médias \pm Desvio Padrão obtidos em três experimentos independentes. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; diferença significativa em relação ao controle.

Análise da Indução de Apoptose *in situ*

Podemos observar através do gráfico da Figura 5 que nenhum efeito apoptótico foi reportado nas concentrações de α -tomatina testadas, onde todos os resultados foram significativamente semelhantes ao controle. O controle positivo com camptotecina resultou em amplos efeitos apoptóticos.

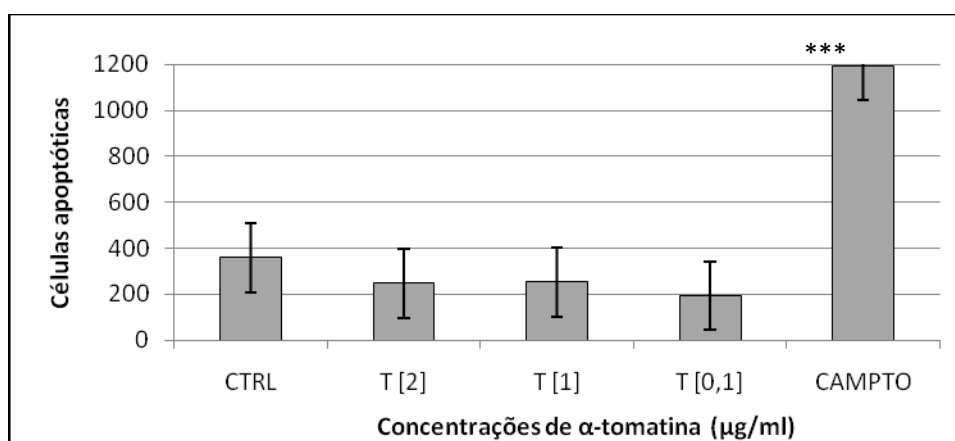


Figura 5 – Número médio de células apoptóticas obtidas através de coloração por Laranja de Acridina em células NCI-H460 tratadas com α -tomatina por 24 horas; Camptotecina = 10 $\mu\text{g/ml}$. *** $p < 0,001$; diferença significativa em relação ao controle.

Análise da Genotoxicidade

Nenhum efeito genotóxico foi observado nos diferentes tratamentos com α -tomatina. Diferente dos resultados encontrados com o tratamento com doxorrubicina, os tratamentos com α -tomatina não resultaram na formação de cometas em número significativo a diferenci-los do tratamento controle (Figura 6).

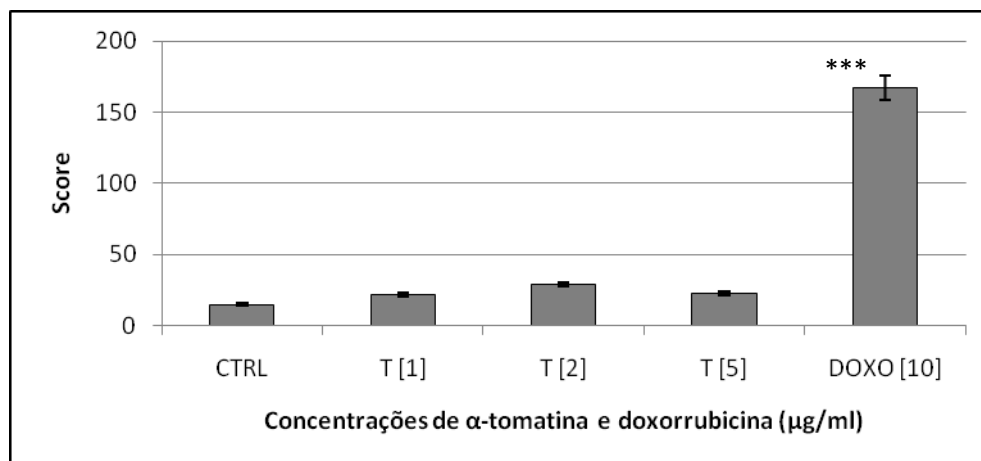


Figura 6 – *Score* de cometas observados em células NCI-H460 tratadas com α -tomatina por 3 horas; *** $p < 0,001$; diferença significativa em relação ao controle.

Análise da Expressão Gênica

Não houve alterações na expressão dos genes que codificam a glutathione-S-transferase (*GST*), proteína p53 (*P53*) e citocromo P-450 1A1 (*CYP1A1*). Em ambos os tratamentos com α -tomatina, seus níveis foram similares àqueles encontrados no tratamento controle (Figura 7).

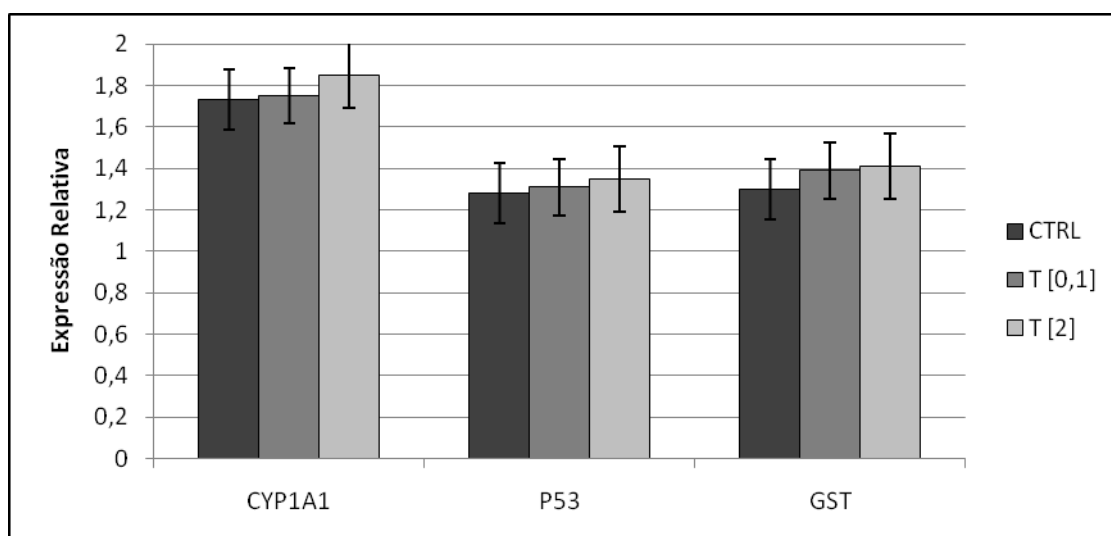


Figura 7 – Avaliação da expressão relativa dos genes *CYP1A1*, *P53* e *GST* por RT-PCR em tempo real após 12 horas de tratamento com α -tomatina nas concentrações de 0,1 e 2 $\mu\text{g/mL}$ em células NCI-H460. (Análise estatística feita pelo Software REST-384).

DISCUSSÃO

A α -tomatina é um composto natural cujas propriedades biológicas são conhecidas como antiinflamatório e imunomodulador (MORROW et al., 2004). As propriedades antiproliferativas da α -tomatina já foram reportadas em trabalhos anteriores em diferentes tipos celulares (FRIEDMAN et al., 2009), embora nem todos os processos de seus mecanismos de ação estejam completamente elucidados. Nossos dados em células NCI-H460 demonstram os efeitos consideráveis da α -tomatina, corroborando com seu potencial antiproliferativo em pesquisas prévias com a mesma substância.

O Ensaio de Citotoxicidade através de MTT é empregado para verificar a citotoxicidade de diferentes substâncias, sendo um dos métodos mais usados e mais sensíveis para detecção de citotoxicidade *in vitro* (FOTAKIS & TIMBRELL, 2006). Porém esse ensaio, que é comumente chamado de citotoxicidade, não apenas avalia a morte celular, mas também pode indicar a inibição de crescimento celular, ou seja, o efeito citostático.

No presente estudo foi observado que a α -tomatina exerce efeito citotóxico sobre células NCI-H460 quando concentrada a partir de $2\mu\text{g/mL}$. Em outros tipos celulares a α -tomatina foi capaz de reduzir a sobrevivência celular em células MCF-7 e HT-29 à metade quando concentrada a $5,07$ e $0,03\mu\text{g/mL}$ respectivamente (FRIEDMAN et al., 2009). Em células NCI-H460 a α -tomatina já havia demonstrado efeitos redutores da sobrevivência celular quando concentrada acima de $3,5\mu\text{g/mL}$ (SHIEH et al., 2011). Os resultados apresentados pelo presente trabalho corroboram com pesquisas anteriormente realizadas que apontam o potencial redutor da sobrevivência de células incubadas com α -tomatina.

As concentrações necessárias de α -tomatina para que seus efeitos inibitórios sejam observados são sempre inferiores às necessárias de doxorrubicina para se obter o mesmo nível de inibição (BARCELOUX et al., 2008). Nossos resultados demonstram esse quando concentrada a $5\mu\text{g/mL}$ a α -tomatina é capaz de inibir a sobrevivência de células NCI-H460 tal qual a doxorrubicina quando concentrada a $10\mu\text{g/mL}$. Nessas concentrações a α -tomatina não apresenta toxicidade oral a curto ou médio prazo (LEE et al., 2004; FRIEDMAN et al., 2007).

Os dados obtidos pela avaliação da cinética de proliferação celular em que analisamos a curva de crescimento celular em diferentes tempos de tratamentos corroboram com os resultados do ensaio do MTT. A partir dessa análise, foi confirmado que a α -tomatina

diminuiu significativamente a proliferação celular a partir do tempo de 24 horas de exposição. Na maior concentração, o crescimento celular foi inibido a partir de 24 horas com um número estável de células durante os quatro tempos analisados, sendo predominante a presença de células inviáveis. Observou-se ainda que quando concentrada a 2 e 2,5µg/mL a α -tomatina reduz a proliferação celular a partir de 48 horas de incubação, sendo constatada uma diminuição superior a 50% no número de células a 96 horas do experimento. Conclui-se assim que a propriedade antiproliferativa da α -tomatina em relação às células NCI-H460 em concentrações de 2µg/mL ou superiores.

Os dados de proliferação revelam que de fato houve diminuição do crescimento celular de modo dose-dependente, e através da análise da viabilidade pode ser demonstrado que processos celulares são responsáveis por essa inibição. O Ensaio de Viabilidade Celular demonstrou um aumento significativo no número de células inviáveis nas primeiras 24 horas de tratamento com α -tomatina (2 e 2,5µg/mL) com posterior recuperação no número de células. Esse ensaio demonstrou que os efeitos da α -tomatina sobre a viabilidade celular parecem ser mais efetivos nas primeiras 24 horas de incubação. Testes *in vitro* realizados com células HepG2 e HeLa demonstraram níveis reduzidos de células nas primeiras 24 horas de tratamento, sendo o número total de células considerado baixo no decorrer do experimento (FRIEDMAN et al., 2009). O tempo de dobramento da cultura, representado pelo *doubling time* obtido através da análise da curva de crescimento, demonstrou que a α -tomatina retarda significativamente a proliferação celular. Mesmo após a recuperação do número de células viáveis nos tratamentos com 2 e 2,5µg/mL de α -tomatina o tempo de dobramento da cultura aumenta significativamente, demonstrando que esse glicoalcalóide é capaz de modificar a dinâmica de crescimento e proliferação celular. Diversos mecanismos são descritos para explicar esse efeito inibidor, sendo a capacidade da α -tomatina de romper membranas e promover lise, e sua mais recente propriedade de induzir apoptose através da não ativação de caspases as propriedades mais discutidas.

Diferentemente de outras drogas antiproliferativas como a doxorrubicina, a α -tomatina não apresentou efeitos genotóxicos após incubação de três horas com 1, 2 e 5µg/mL da substância. Dessa forma a α -tomatina demonstra não ter potencial de clivar o material genético, e assim sua propriedade antiproliferativa não pode atribuída a um potencial efeito genotóxico.

Com o objetivo de esclarecer o mecanismo pelo qual a α -tomatina deprecia o número de células viáveis em uma cultura empregamos o teste de apoptose com o uso do

corante laranja de acridina. A acridina é um composto excitável por fluorescência que permite a avaliação citomorfológica que caracteriza os estágios finais da apoptose (ROVOZZO et al., 1973), como condensação da cromatina, fragmentação do DNA e formação dos corpos apoptóticos. Nenhum desses eventos foi observado nas culturas incubadas com 0,1; 1 e 2 µg/mL de α -tomatina, demonstrando, em um primeiro momento, que esse glicoalcalóide não é capaz de induzir esse tipo de morte celular. Apesar de estudos prévios terem reportado a propriedade pró-apoptótica da α -tomatina (MORROW et al., 2004) estudos mais recentes apontam a indução de apoptose independente de caspases como o mecanismo pelo qual a α -tomatina exerce essa propriedade (YANG et al., 2004; CHAO et al., 2010). Essa via de morte celular é precoce às vias de apoptose já descritas, envolvendo liberação de proteínas mitocondriais que, independentemente da ativação de caspases, são capazes de chegar ao núcleo e fragmentar o DNA (HONG *et al.*, 2004). A detecção dessa via de apoptose depende de técnicas mais sensíveis, e não é possível comprová-la através do ensaio citomorfológico *in situ*, onde apenas a redução do número de células foi observada. A não observância do padrão apoptótico em células NCI-H460, após 24 horas de tratamento através do ensaio citomorfológico com laranja de acridina, reforça as informações anteriores de que as vias apoptóticas intrínseca e extrínseca não são ativadas no processo de indução de morte na presença de α -tomatina.

A partir desses resultados passamos a investigar o efeito da α -tomatina na regulação da expressão gênica, tendo como alvo genes que codificam proteínas do ciclo celular e biotransformação de xenobióticos. P53 é uma proteína envolvida nos processos de controle do ciclo celular cujo aumento da expressão está relacionado a reparo do DNA ou indução de morte celular (KALDIS, 2010); citocromo P-450 1A1 (CYP1A1) é uma enzima envolvida nos processos de detoxificação de xenobióticos, especialmente hidrocarbonetos, na fase I da biotransformação; e Glutathione-S-Transferase é uma enzima responsável pela conjugação de glutathione (GSH) à xenobióticos, facilitando sua eliminação durante o processo conhecido como biotransformação de fase II (DERELANKO & HOLLINGER, 2002; KALDIS, 2010). Poucos estudos demonstram os efeitos da α -tomatina sobre a expressão de qualquer gene, mesmo já tendo sido demonstradas suas propriedades na regulação da expressão de metaloproteinases (SHII et al., 2009; SHIEH et al., 2011). Faz-se importante, portanto, conhecer os efeitos desse glicoalcalóide sobre a expressão de moléculas relacionadas ao ciclo celular e a biotransformação de xenobióticos, a fim de ampliar os conhecimentos sobre a bioquímica e os mecanismos de ação desse composto.

O presente trabalho demonstrou que as expressões de *CYP1A1*, *GST* e *P53* permaneceram inalteradas durante exposição de doze horas a 0,1 e 2µg/mL de α-tomatina. De acordo com Shieh e colaboradores (2011) a α-tomatina eleva a produção de ERO intracelular e conseqüente depleção nos níveis de GSH quando concentrada a 2µg/mL, mas seus efeitos mais significativos na redução da biodisponibilidade dessa molécula são detectados nas concentrações de 3µg/mL e superiores. Uma maior expressão de GST está intimamente relacionada aos níveis de GSH. A expressão invariada dessa enzima pode estar relacionada à concentração e ao tempo total do ensaio e a concentração máxima testada.

A regulação da expressão de *CYP1A1* depende de um sensível receptor citosólico denominado Ah (aril hidrocarboneto), que uma vez ativado inicia o processo de expressão de *CYP1A1* (MANAHAN, 2003). O aumento nos níveis de expressão do mRNA de *CYP1A1* é resultado da interação de seu receptor citosólico com moléculas visando a eliminação de compostos possivelmente danosos. A toxicidade da α-tomatina é considerada baixa, e a reação de tecidos e células especializadas durante a biotransformação de xenobióticos é variada. Apesar da natureza alcalóide minimamente tóxica da α-tomatina seus efeitos não são suficientes para deflagrar uma resposta através do aumento da expressão de *CYP1A1*. A não variação da expressão do gene *P53* sugere que a α-tomatina não é capaz de regular a expressão de proteínas relacionadas com o ciclo celular, não sendo comprovados, portanto, os efeitos citostáticos desse glicoalcalóide.

Experimentos prévios apontaram a liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH) ao meio de cultivo na presença de α-tomatina (YANG et al., 2004). Essa enzima, confinada no interior das células, não é liberada ao meio senão durante processo lítico das células, e a mensuração de sua liberação também pode ser utilizada para avaliar o potencial citotóxico de uma substância (FOTAKIS & TIMBRELL, 2006). A reatividade da α-tomatina em membranas sugere que seus efeitos antiproliferativos e indutores de morte celular são resultado de sua interação com a membrana citoplasmática e conseqüente rompimento. Sabe-se que glicoalcalóides produzidos por espécies do gênero *Solanum*, como a α-tomatina, são capazes de promover esse evento através da interação com a molécula de colesterol presente nas membranas (KEUKENS et al., 1995). Dessa forma não são observadas evidências do processo apoptótico tampouco variação em proteínas reguladoras do ciclo celular. Podemos assim sugerir que a detecção da citotoxicidade pelo ensaio do MTT e a diminuição da proliferação e viabilidade celulares se deve pela morte celular lítica, através da atividade da α-tomatina a membrana celular. Friedman e colaboradores (2007) apontam que

os efeitos observados da α -tomatina na redução de tumores *in vivo* são resultado de suas propriedades em conjunto, como a potencialização da resposta imune, especialmente com linfócitos T citotóxicos, além da interação da α -tomatina com membranas e a modulação de sua permeabilidade.

Concluimos com esse trabalho que a α -tomatina, nas concentrações estudadas, apresenta efeito inibitório da proliferação em células NCI-H460, possivelmente como resultado de sua interação com a membrana dessas células e sua atividade lítica. Os efeitos pró-apoptóticos da α -tomatina, se presentes, não puderam ser detectados pelo método citomorfológico. A α -tomatina não apresenta efeitos genotóxicos tampouco é capaz de regular a expressão de genes relacionados aos controles do ciclo celular. Nossos estudos contribuem com as mais recentes pesquisas de substâncias naturais com propriedades antiproliferativas frente o crescimento tumoral, e sugere mais estudos sobre os mecanismos envolvidos e as possíveis aplicações da α -tomatina quanto seu potencial terapêutico em relação ao câncer.

AGRADECIMENTOS

Este estudo contou com o suporte financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação Araucária Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná.

REFERÊNCIAS

- BARCELOUX, D. G. Potatoes, Tomatoes, and Solanine Toxicity (*Solanum tuberosum* L., *Solanum lycopersicum* L.). **Medical Toxicology of nature substances**, v. 55, p. 77-83, 2008.
- BLANKEMEYER, J. T.; WHITE, J. B.; STRINGER, B. K.; FRIEDMAN, M. Effect of c, Tomatine and Tomatidine on Membrane Potential of Frog Embryos and Active Transport of Ions in Frog Skin. **Food and Chemical Toxicology**. V. 35, p. 639-646. 1997. **Carcinogenesis**, v. 14, p. 1737–1746, 1993.
- BUSTIN, S. A. MIQE Guidelines: The Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chem.**, v. 55, p. 611–622, 2009.
- CHAO, M. a-Tomatine-mediated anti-cancer effect on leukemia cell lines. **Dept. of Pharmacology and Graduate Institute of Pharmacology**. Disponibilizado por NTU Institutional Repository – Dissertations and Theses em <<http://140.112.114.62/handle/246246/180543>>. Acesso em: 03 mar. 2011
- CHATAING, B.; CONCEPCION, J.L.; DE CRISTANCHO, N.B.; USUBILLAGA, A., Estudio clinico de la efectividad de extractos alcaloides obtenidos de los frutos Del *Solanum americanum* Miller sobre el Herpes simplex, Herpes Zoster y Herpes genitalis. **Revista de la Facultad de Farmacia**, v. 32, p. 18–25, 1997.
- CHUANG, S. E.; KUO, M. L.; HSU, C. H.; CHEN, C. R.; LIN, J. K.; LAI, G. M.; HSIEH, C. Y.; CHENG, A. L. Curcumin-containing diet inhibits diethylnitrosamine-induced murine hepatocarcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 21, p. 331-335, 2000.
- DERELANKO, M. J.; HOLLINGER M. A. **Handbook of Toxicology**. 2 Ed. Morristown: Taylor and Francis, 2002.
- 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. **Toxicology Letters**, v. 160, p. 171-177, 2006.
- FRIEDMAN, M.; MCQUISTAN, T.; HENDRICKS, J. D.; PEREIRA, C.; BAILEY, G. S. Protective effect of dietary tomatine against dibenzo[a,l]pyrene (DBP)-induced liver and stomach tumors in rainbow trout. **Molecular Nutrition Food Research**, v. 51, p. 1485-1491, 2007.
- FRIEDMAN, M. Tomato glycoalkaloids: role in the plant and in the diet. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, p. 5751-5780, 2002.
- FRIEDMAN, M.; FITCH, T. E.; YOKOYAMA, W. E. Lowering of Plasma LDL Cholesterol in Hamsters by the Tomato Glycoalkaloid Tomatine. **Food and chemical toxicology**, v. 38, p. 549-553, 2000.

FRIEDMAN, M.; LEVIN, C. E.; LEE, S.; KIM, H.; LEE, I.; BYUN, J.; KOZUKUE, N. Tomatine-Containing Green Tomato Extracts Inhibit Growth of Human Breast, Colon, Liver, and Stomach Cancer Cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 5727-5733, 2009.

GEE, J. M.; WORTLEY, G. M.; JOHNSON, I. T.; PRICE, K. R.; RUTTEN, A. A. J. J. L.; HOUBEN, G. F.; PENNINKS, A. H. Effects of Saponins and Glycoalkaloids on the Permeability and Viability of Mammalian Intestinal Cells and on the Integrity of Tissue Preparations *In Vitro*. **Toxicology in vitro**, v. 10, p. 117-128, 1996.

HONG, S. J.; DAWSON, T. M.; DAWSON, V. L. Nuclear and mitochondrial conversations in cell death: PARP-1 and AIF signaling. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 25, p. 259-264, 2004.

IRVING, G. W.; JR., FONTAINE, T. D.; DOOLITTLE, S. P. Partial antibiotic spectrum of tomatine, an antibiotic agent from the tomato plant. **J. Bact.**, v. 52, p. 601-607. 1945.

KALDIS, P. **Cell Cycle Regulation (Results and Problems in Cell Differentiation)**. New York: Springer, 2010.

KIM, D. K. Estimating doubling time of cells in vitro. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal**, v. 31, p. 419-420, 1995.

KOZUKUE, N.; HAN, J.; LEE, K.; FRIEDMAN, M. Dehydrotomatine and α -Tomatine Content in Tomato Fruits and Vegetative Plant Tissues. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 2079-2083, 2004.

LEE, K. R.; KOZUKUE, N.; HAN, J. S.; PARK, J. H., Glycoalkaloids and metabolites inhibit the growth of human colon (HT29) and liver (HepG2) cancer cells, **J. Agric. Food Chem**, v. 52, p. 2832-2839, 2004.

MANAHAN, S. E. **Toxicological Chemistry and Biochemistry**. New York: Lewis Publishers, 2003.

MICICH T. J. Behavior of polymer-supported tomatine toward cholesterol in the presence and absence of butter oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 39, p. 1610-1613, 1993.

MORROW, W. J. W.; YANG, Y.; SHEIK, N. A. Immunobiology of the Tomatine adjuvant. **Vaccine**, v. 22, p. 2380-2384, 2004.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immun. Meth.**, v. 65. p. 55-56, 1983.

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 Research**, v. 30, p. 1-10, 2002.

RAJANANTHANAN, P.; SHEIKH, N. A.; ATTARD, G. S.; MORROW, W. J. W. Evaluation of novel aggregate structures as adjuvants: composition, toxicity studies and humoral responses. **Vaccine**, v. 17, p. 715-730, 1999.

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

SHIEH, J.; CHENG, T.; SHI, M.; WU, P.; CHEN, Y.; KO, S.; SHIH, Y. α -Tomatine Suppresses Invasion and Migration of Human Non-Small Cell Lung Cancer NCI-H460 Cells Through Inactivating FAK/PI3K/Akt Signaling Pathway and Reducing Binding Activity of NF- κ B. **Cell Biochem Biophys**. Disponibilizado pela PubMed em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21264526>>. Acesso em 03 mar. 2011

SHIH, Y.; SHIEH, J.; WU, P.; LEE, Y.; CHEN, Y.; CHIANG, T. α -Tomatine inactivates PI3K/Akt and ERK signaling pathways in human lung adenocarcinoma A549 cells: Effect on metastasis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p 1985-1995, 2009.

SIMONS, V.; MORRISSEY, J. P.; LATIJNHOUWERS, M.; CSUKAI, M.; CLEAVER, A.; YARROW, C.; OSBOURN, A. Dual effects of plant steroidal alkaloids on *Saccharomyces cerevisiae*. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 50, p. 2732-2740, 2006.

SINGH, N. P.; STEPHENS, R. E. Microgel eletroforesis: sensitivity, mechanisms and DNA eletrostretching. **Mutat. Res. DNA Repair**, v. 383, p. 167-175, 1997.

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

ANEXOS

ANEXO A – TABELAS

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

Gene	Primers	Referência / nº de acesso (NCBI)
<i>GAPDH</i>	F – 5' ACAAGATTGTGAAGG TCG GTG TCA 3' R – 5' AGCTTCCCATTCTCAGCCTTGACT 3'	SUGAYA <i>et al.</i> , 2005.
<i>CYP1A1</i>	F – 5' CTGGTTCTGGATACCCAGCTG 3' R – 5' CCTAGGGTTGGTTACCAGG 3'	TAYLOR <i>et al.</i> , 2009.
<i>GST P1</i>	F – 5' ATGGGCCTAGAGCTGTTTCT 3' R – 5' AGCCCAGGTACTIONCATGAACA 3'	BAIGI <i>et al.</i> , 2008.
<i>P53</i>	F – 5' ATCTGGACGACAGGCAGACT 3' R – 5' AGGCAGTGAAGGGACTAGCA 3'	KASAHARA <i>et al.</i> , 2005.

Tabela 2 – Valores médios e desvio padrão da absorbância obtida no teste de citotoxicidade MTT, após 24 horas de tratamento:

TRATAMENTO	Média ± Desvio padrão
Controle	0,914 ± 0,22
Tomatina 0,1 µg/mL	0,926 ± 0,24
Tomatina 1 µg/mL	0,950 ± 0,24
Tomatina 2 µg/mL	0,682 ± 0,16 *
Tomatina 3 µg/mL	0,117 ± 0,18 ***
Tomatina 5 µg/mL	0,014 ± 0,02 ***
Tomatina 10 µg/mL	0,017 ± 0,02 ***
Doxorrubicina 10 µg/mL	0,018 ± 0,01 ***

ANOVA seguido de Teste de Tukey; $\alpha = 0,05$ ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; diferença significativa em relação ao controle.

Tabela 3 – Frequência média e desvio padrão (em porcentagem) referente à Taxa de Sobrevivência Celular, do Ensaio de Citotoxicidade – MTT, em NCI-H460 após tratamento com α -tomatina no tempo de 24 horas.

TRATAMENTO	Média ± Desvio padrão
Controle	100 ± 0,00
Tomatina 0,1 µg/mL	100 ± 0,00
Tomatina 1 µg/mL	100 ± 0,00
Tomatina 2 µg/mL	74,8 ± 2,51 *
Tomatina 3 µg/mL	12,9 ± 1,27 ***
Tomatina 5 µg/mL	3,5 ± 1,91 ***
Tomatina 10 µg/mL	2,11 ± 1,11 ***
Doxorrubicina 10 µg/mL	2,03 ± 1,17 ***

ANOVA seguido de Teste de Tukey; $\alpha = 0,05$ ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; diferença significativa em relação ao controle.

Tabela 4 – Frequência média e desvio padrão (número de células x 10⁴/mL) referente ao Ensaio de Cinética de Proliferação Celular em células NCI-H460 após tratamento com α -tomatina nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas. Número de células viáveis:

Teste	Tempo de tratamento. Média \pm Desvio padrão			
	24hs	48hs	72hs	96hs
Controle	21 \pm 2,653	55 \pm 2,017	144 \pm 1,973	338 \pm 2,423
Tomatina 1 μ g/mL	18 \pm 1,747	49 \pm 2,480	139 \pm 3,111	277 \pm 2,501
Tomatina 2 μ g/mL	12 \pm 1,541	37 \pm 1,701	80 \pm 1,448 *	153 \pm 2,441 ***
Tomatina 2,5 μ g/mL	15 \pm 2,111	20 \pm 1,901 *	37 \pm 0,837 **	96 \pm 3,043 ***
Tomatina 5 μ g/mL	11 \pm 2,025	11 \pm 2,210 *	12 \pm 1,769 ***	12 \pm 3,739 ***
Doxo 10 μ g/mL	12 \pm 1,802	10 \pm 1,905 *	12 \pm 2,284 ***	14 \pm 4,910 ***

ANOVA seguida de Teste de Dunnet $\square=0,05$ * $p<0,05$; ** $p<0,01$, *** $p<0,001$; diferença significativa em relação ao controle.

Tabela 5 – Frequência média e desvio padrão (em porcentagem) referente ao Ensaio de Viabilidade Celular em células NCI-H460 após tratamento com α -tomatina nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas. Valores referentes ao número de células viáveis:

Teste	Tempo de tratamento. Média \pm Desvio padrão			
	24hs	48hs	72hs	96hs
Controle	95,2 \pm 1,17	98,2 \pm 1,44	98,6 \pm 2,14	97,6 \pm 2,17
Tomatina 1 μ g/mL	94,4 \pm 1,31	98,0 \pm 1,41	97,8 \pm 2,07	97,1 \pm 2,15
Tomatina 2 μ g/mL	66,7 \pm 1,14	86,5 \pm 1,37	91,3 \pm 1,84 *	92,8 \pm 2,44 ***
Tomatina 2,5 μ g/mL	33,3 \pm 1,09	65,0 \pm 1,36 *	78,4 \pm 1,71 **	88,5 \pm 2,66 ***
Tomatina 5 μ g/mL	0,0 \pm 0,00 *	18,2 \pm 1,38 *	8,3 \pm 1,72 ***	16,7 \pm 2,45 ***
Doxo 10 μ g/mL	0,0 \pm 0,00 *	0,0 \pm 0,00 *	8,3 \pm 2,65 ***	19,0 \pm 2,91 ***

ANOVA seguida de Teste de Dunnet $\square=0,05$ * $p<0,05$; ** $p<0,01$, *** $p<0,001$; diferença significativa em relação ao controle.

Tabela 6 – Valores médios e desvio padrão do valor do tempo de duplicação (*doubling time*) obtido após 96 horas de incubação com α -tomatina:

TRATAMENTO	Média \pm Desvio padrão
Controle	18,52 \pm 0,71
Tomatina 1 μ g/mL	19,18 \pm 0,84
Tomatina 2 μ g/mL	23,51 \pm 1,47 *
Tomatina 2,5 μ g/mL	30,41 \pm 2,90 *
Tomatina 5 μ g/mL	332,27 \pm 24,77 ***
Doxorrubicina 10 μ g/mL	230,44 \pm 12,51 ***

ANOVA seguido de Teste de Tukey; $\alpha = 0,05$ * $p<0,05$, *** $p<0,001$; diferença significativa em relação ao controle.

Tabela 7 – Avaliação da indução de apoptose após tratamento das células NCI-H460 por 24 horas com α -tomatina:

Teste	Média \pm Desvio Padrão	Frequência (%)
Controle	119,7 \pm 12,1	23,93
Tomatina 0,1 μ g/mL	82,7 \pm 10,4	16,53
Tomatina 1 μ g/mL	84,3 \pm 9,6	16,87
Tomatina 2 μ g/mL	64,3 \pm 10,1	12,87
Campto10 μ g/mL	398 \pm 34,1 ***	79,6

ANOVA seguida de Teste de Dunnet $\alpha=0,05$; *** $p<0,001$; diferença significativa em relação ao controle. Contagem total de 1500 células.

Tabela 8 – Avaliação da indução de danos genotóxicos após tratamento das células NCI-H460 com α -tomatina:

Teste	Magnitude dos danos. Média \pm Desvio padrão			
	0	1	2	3
Controle	89 \pm 2,1	8 \pm 1,6	2 \pm 0,3	1 \pm 0,8
Tomatina 1 μ g/mL	84 \pm 3,6	11 \pm 2,3	4 \pm 0,9	1 \pm 0,7
Tomatina 2 μ g/mL	79 \pm 2,4	11 \pm 2,1	9 \pm 1,3	0 \pm 0,0
Tomatina 5 μ g/mL	85 \pm 1,9	9 \pm 1,0	4 \pm 2,0	2 \pm 0,7
Doxo 10 μ g/mL	27 \pm 2,4 *	10 \pm 0,7	32 \pm 4,6 *	31 \pm 5,9 *

ANOVA seguido de Teste de Tukey; $\alpha = 0,05$ * $p<0,05$; diferença significativa em relação ao controle. Contagem de 100 nucleóides.