



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

AMANDA PASSUELLO DE AGUIAR

**EFEITOS ANTIPROLIFERATIVOS DA α -TOMATINA EM
CULTURA 3D E AVALIAÇÃO NA MIGRAÇÃO CELULAR EM
CÉLULAS HT-29**

AMANDA PASSUELLO DE AGUIAR

**EFEITOS ANTIPROLIFERATIVOS DA α -TOMATINA EM
CULTURA 3D E AVALIAÇÃO NA MIGRAÇÃO CELULAR EM
CÉLULAS HT-29**

Trabalho de Dissertação apresentado ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani.

Londrina
2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

de Aguiar, Amanda Passuelo.
Efeitos antiproliferativos da alfa-tomatina em cultura 3D e avaliação na migração celular em células HT-29 / Amanda Passuelo de Aguiar. - Londrina, 2022.
81 f. : il.

Orientador: Mário Sérgio Mantovani.
Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2022.
Inclui bibliografia.

1. Genética - Tese. 2. Câncer - Tese. 3. alfa-tomatina - Tese. 4. Cultura 3D - Tese. I. Mantovani, Mário Sérgio. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. III. Título.

CDU 575.1

AMANDA PASSUELLO DE AGUIAR

**EFEITOS ANTIPROLIFERATIVOS DA α -TOMATINA EM
CULTURA 3D E AVALIAÇÃO NA MIGRAÇÃO CELULAR EM
CÉLULAS HT-29**

Trabalho de Dissertação apresentado ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Edson Luis Maistro
Universidade Estadual Paulista - UNESP

Prof. Dr. Rodrigo Juliano Oliveira
Universidade Federal do Mato Grosso do Sul –
UFMS

Londrina, 18 de março de 2022.

Este trabalho é dedicado aos meus pais, cujo esforço e devoção me trouxeram até aqui.

Em especial, dedico essa pesquisa a minha querida tia e amiga Ana (*in memoriam*) que sempre se orgulhou de mim.

AGRADECIMENTOS

A Deus por nunca me deixar sozinha e me guiar em todos os caminhos. Sem ele nada seria possível!

Aos meus pais, Nelcino e Viviane, que nunca mediram esforços a favor da minha felicidade e sempre me apoiaram ao longo da vida.

A toda a minha família. Avós, irmão, tios e primos por serem a minha fortaleza, com quem sempre posso contar.

Ao meu orientador Prof.^o Dr. Mário Sérgio Mantovani, pela oportunidade de realizar esse trabalho e a confiança depositada em mim.

Aos professores que contribuíram ao longo de toda a minha vida. Principalmente a Prof^a. Dra. Márcia Regina Royer, por me ajudar a chegar aqui.

Aos membros da banca, Prof. Dr. Edson Luis Maistro, Prof. Dr. Rodrigo Juliano Oliveira, Prof. Dr. Phelipe Oliveira Favaron e Prof^a. Dra. Sandra Regina Lepri que tão gentilmente aceitaram participar e contribuir com essa dissertação.

Ao professor Dr. Rogério Fernandes de Souza por ter disponibilizado as suas aulas para que eu pudesse realizar o meu estágio em docência.

Aos meus colegas de laboratório, Nayane de Oliveira, Liana Martins e Matheus Felipe que me auxiliaram em todas as etapas dessa pesquisa e se tornaram bons amigos. Em especial, ao Luan Vitor Alves, cuja paciência e auxílio foram imprescindíveis.

A todos os meus amigos por todo apoio e compreensão.

A Universidade Estadual de Londrina e ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular.

A todos que de alguma forma contribuíram para a conclusão desse ciclo, o meu sincero agradecimento.

“O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada. Caminhando e semeando, no fim terás o que colher.” -
Cora Coralina

AGUIAR, Amanda Passuello de. **Efeitos antiproliferativos da α -tomatina em cultura 3D e avaliação na migração celular em células HT-29.** 2022. 81 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

RESUMO

A α -tomatina é um metabólito secundário extraído do tomate (*Solanum lycopersicum*) que possui propriedade antitumoral, anti-inflamatória, fungicida, imunoreguladora e bactericida. No presente trabalho foram realizados testes *in vitro*, com o intuito de avaliar a atividade antiproliferativa da α -tomatina, principalmente em esferoides de células da linhagem HT-29. Em monocamada avaliamos a citotoxicidade da α -tomatina e sua capacidade de inibir migração celular. Já nos ensaios em esferoides (3D), avaliamos a capacidade antiproliferativa (alterações no volume de esferoides, formação de colônias, alterações no ciclo celular e indução de morte celular por apoptose) e genotóxica da α -tomatina. Para compreender esses efeitos, analisamos a expressão de mRNA de genes envolvidos nos processos de morte celular, estresse oxidativo e de retículo, danos no DNA, autofagia e regulação do ciclo celular. A α -tomatina foi citotóxica para as células HT-29, apresentando um IC50 calculado em 17,19 μ M. O composto foi capaz de inibir a migração celular e a formação de novas colônias, além de atrasar o crescimento dos esferoides em 24 horas. No entanto, não foram observadas alterações no ciclo celular, tampouco na indução de danos no DNA e morte celular apoptótica. A α -tomatina foi capaz de alterar a expressão de mRNA dos genes *CDKN1A* (7,81x), *C-MYC* (4,36x), *BBC3* (4,5x), *CASP8* (6,53x), *TP53* (2,28x), *BIRC5* (4,14x), *PARP1* (7,69x), *BECN1* (9,43x) e *H2AFX* (83,33x). Assim, nossos achados revelam que a utilização do sistema de cultura 3D como metodologia é uma ferramenta importante no desenvolvimento de novas drogas e que a α -tomatina atua em vias moleculares importantes, podendo ser considerada uma candidata no desenvolvimento de novos quimioterápicos.

Palavras-chave: α -tomatina; câncer; esferoide; fitoquímico; cultura 3D.

AGUIAR, Amanda Passuello de. **Antiproliferative effects of α -tomatine in 3D culture and assessment of cell migration in HT-29 cells**. 2022. 81 p. Dissertation (Master's degree in Genetic and Molecular Biology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

ABSTRACT

α -Tomatine is a secondary metabolite extracted from tomato (*Solanum lycopersicum*) that has antitumor, anti-inflammatory, fungicidal, immunoregulatory and bactericidal properties. In the present work, *in vitro* tests were executed with the aim of evaluating the antiproliferative activity of α -tomatine, mainly in spheroids of the cell line HT-29. In monolayer we evaluated the cytotoxicity of α -tomatine and its ability to inhibit cell migration. In the spheroid assays (3D), we evaluated the antiproliferative capacity (changes in spheroid volume, colony formation, cell cycle changes and induction of cell death by apoptosis) and genotoxicity of α -tomatine. To understand these effects, we analyzed the mRNA expression of genes involved in the processes of cell death, oxidative and reticulum stress, DNA damage, autophagy and cell cycle regulation. α -tomatine was cytotoxic to HT-29 cells, presenting an IC₅₀ calculated at 17.19 μ M. Furthermore, the compound was able to inhibit cell migration and the formation of new colonies, in addition to delaying the growth of spheroids by 24 hours. However, no changes were observed in the cell cycle, nor in the induction of DNA damage and apoptotic cell death. α -tomatine was able to alter the mRNA expression of the genes *CDKN1A* (7.81x), *C-MYC* (4.36x), *BBC3* (4.5x), *CASP8* (6.53x), *TP53* (2.28x), *BIRC5* (4.14x), *PARP1* (7.69x), *BECN1* (9.43x) and *H2AFX* (83.33x). Thus, our findings reveal that the use of the 3D culture system as a methodology is an important tool in the development of new drugs and that α -tomatine acts in important molecular pathways and can be considered a candidate in the development of new chemotherapeutics.

Key words: α -tomatine; cancer; spheroid; phytochemical; 3D culture.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Processos envolvidos na carcinogênese	19
Figura 2 -	Características das células cancerosas	20
Figura 3 -	Representação espacial das taxas de incidência por 100 mil homens, estimadas para o ano de 2020, segundo Unidade da Federação (neoplasia maligna do cólon e reto)	23
Figura 4 -	Representação espacial das taxas de incidência por 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2020, segundo Unidade da Federação (neoplasia maligna do cólon e reto)	23
Figura 5 -	Distribuição global das taxas estimadas de incidência e mortalidade padronizadas por idade (Mundial) por 100.000 para câncer colorretal em homens e mulheres	25
Figura 6 -	Fotomicrografia de um esferoide da linhagem HT-29	30
Figura 7 -	Diagrama esquemático da cultura de células em monocamada bidimensional e tridimensional	31
Figura 8 -	Implementação de ensaios de cultura 3D	32
Figura 9 -	Estrutura química da α -Tomatina	35
Figura 10 -	Efeito disruptivo da membrana.....	37
Figura 11 -	Média percentual de viabilidade celular na linhagem tumoral HT29	45
Figura 12 -	Perfil de migração celular de células HT-29 avaliado por meio do ensaio de cicatrização de feridas	46
Figura 13 -	Fotomicrografias dos esferoides de células HT-29	48
Figura 14 -	Média do crescimento dos esferoides de células HT-29 tratadas com 17,19 μ M de α -tomatina (TOM), DMSO (CV) ou doxorrubicina nos tempos de 0, 24, 48 e 72 horas	49
Figura 15 -	Análises de morte celular por apoptose e ciclo celular em células HT-29 por meio de citometria de fluxo	50
Figura 16 -	Avaliação da atividade antitumoral da α -tomatina no desenvolvimento de colônias celulares e genotoxicidade em células HT-29	51
Figura 17 -	Análise quantitativa por RT-PCR dos padrões de expressão gênica relativa em células HT-29 tratadas com α -tomatina	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
<i>B-ACTIN</i>	Beta actina
ANOVA	Análise de variância
<i>BBC3</i>	componente 3 de ligação a <i>BCL-2</i>
<i>BCL2</i>	Regulador de apoptose
<i>BECN1</i>	Beclin 1
<i>BIRC5</i>	inibidor baculoviral da repetição de apoptose contendo 5
<i>CASP3</i>	Caspase 3
<i>CASP8</i>	Caspase 8
<i>CASP9</i>	Caspase 9
<i>CDKN1A</i>	inibidor de quinase dependente de ciclina 1A
<i>cDNA</i>	DNA complementar
<i>C-MYC</i>	MYC Proto-oncogene
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOX	Doxorrubicina
<i>ERN1</i>	Sinalização do Retículo Endoplasmático ao Núcleo 1
<i>EROs</i>	Espécies Reativas de Oxigênio
<i>GADD45A</i>	Proteína de parada de crescimento e induzível a danos no DNA
<i>GAPDH</i>	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
<i>GPX1</i>	glutathione peroxidase 1
<i>H2AFX</i>	H2A.X variante histona
IARC	Agência Internacional de Pesquisa em Câncer
IC ₅₀	Concentração inibitória em 50%
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
mRNA	RNA mensageiro
<i>M-TOR</i>	Alvo mecanístico da rapamicina quinase
NCBI	Centro Nacional de Informação Biotecnológica
<i>NF-κβ</i>	Fator Nuclear kappa B subunidade 1
<i>PARP1</i>	Poli (ADP-ribose) polimerase 1
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase

RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real
SBF	Soro Bovino Fetal
<i>TP53</i>	Proteína tumoral p53
UEL	Universidade Estadual de Londrina

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	15
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
1.1 ASPECTOS GERAIS DO CÂNCER	17
1.2 CÂNCER COLORRETAL	22
1.3 CULTURA DE CÉLULAS 3D COMO MODELO EXPERIMENTAL	29
1.4 FITOQUÍMICOS	32
1.5 A-TOMATINA	34
2 OBJETIVO	38
2.1 OBJETIVO GERAL	38
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
3 MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1 LINHAGEM CELULAR, CONDIÇÕES DE CULTURA E AGENTES QUÍMICOS	39
3.2 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE (RESAZURINA)	39
3.3 ENSAIO DE FECHAMENTO DE FERIDAS (MIGRAÇÃO)	40
3.4 CULTIVO CELULAR TRIDIMENSIONAL (3D)	40
3.5 ENSAIO DE VOLUME	41
3.6 ENSAIO DE CICLO CELULAR E APOPTOSE POR CITOMETRIA DE FLUXO	41
3.7 ENSAIO CLONOGÊNICO	42
3.8 ENSAIO DE COMETA	42
3.9 EXPRESSÃO GÊNICA RELATIVA (MRNA) EM TEMPO REAL	43
3.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	44
4 RESULTADOS	45
4.1 CITOTOXICIDADE	45
4.2 FECHAMENTO DE FERIDAS	45
4.3 CRESCIMENTO DOS ESFEROIDES	47
4.4 APOPTOSE E ALTERAÇÕES NO CICLO CELULAR	49
4.5 FORMAÇÃO DE COLÔNIAS E GENOTOXICIDADE	50
4.6 EXPRESSÃO DE MRNA	51

5	DISCUSSÃO	53
6	BIBLIOGRAFIA.....	60
8	CONCLUSÃO GERAL	77
9	APÊNDICES.....	78

INTRODUÇÃO

Segundo Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC), o câncer pode ser classificado como um dos maiores problemas de saúde pública no mundo (IARC, 2018; FERLAY *et al.*, 2020). O câncer colorretal foi o terceiro mais comumente diagnosticado e a segunda causa de morte por câncer no mundo, com um número aproximado de 935 mil mortes no ano de 2020 (SUNG *et al.*, 2021). Alguns pesquisadores acreditam que em alguns anos essa doença se tornará a principal causa de mortalidade em alguns países, isso devido à escassez de medicamentos anticâncer de sucesso (CAGAN; MEYER, 2017).

Atualmente, as principais estratégias utilizadas no tratamento do câncer apresentam uma gama de limitações, como a resistência aos medicamentos e recorrência da doença, que podem prejudicar a qualidade de vida do paciente (CHOUDARI *et al.*, 2020). Sendo assim, faz-se necessário a busca de novos tratamentos quimioterápicos que apresentem os efeitos colaterais minimizados, em busca de maior eficácia dos procedimentos e bem-estar do paciente (CAGAN; MEYER, 2017).

Os ensaios *in vitro* são realizados nos estágios iniciais do processo de desenvolvimento de novos fármacos. Por meio destes ensaios são estabelecidas as interações da substância candidata em relação ao alvo terapêutico desejado. Empregando os ensaios *in vitro*, é possível acompanhar as respostas desencadeadas pela substância, tal como a indução de morte celular. A cultura celular bidimensional (2D), também conhecida como cultura em monocamada, é uma ferramenta importante para a descoberta e desenvolvimento de drogas. Entretanto, apresenta desvantagens quando comparada a cultura tridimensional (3D) (ANDRADE *et al.*, 2016). A cultura de células 3D é mais complexa e mantém diversas funções do tecido do qual a célula foi originada. Os esferoides, um tipo de cultivo celular tridimensional, são capazes de mimetizar várias propriedades de tumores sólidos humanos, tais como a formação de um ambiente tridimensional microestruturado. Essas propriedades influenciam o efeito terapêutico de várias drogas e outras moléculas farmacológicas, tornando essa metodologia mais satisfatória (NUNES *et al.*, 2018).

Os compostos naturais derivados de fontes vegetais são conhecidos por desempenhar um papel fundamental na prevenção e tratamento de diversas doenças, uma vez que possuem propriedades antioxidantes, anticancerígenas, potenciadoras

da imunidade e atividades neurofarmacológicas (SINGH, 2020). Neste sentido, os extratos vegetais são vitais para o desenvolvimento de tratamentos empregados na quimioterapia, pois estes compostos, além de apresentarem baixo custo e maior disponibilidade, causam poucos efeitos colaterais (TRENDOWSKI, 2015; KUMAR *et al.*, 2015).

No tomateiro, as folhas, raízes, caules e frutos contêm metabólitos secundários, como os glicoalcalóides, que o protegem contra os predadores (NGUENANG; NTYAM; KUETE, 2020). A α -Tomatina, um dos glicoalcalóides encontrados no tomate (*Lycopersicon esculentum*), oferece ao fruto proteção contra bactérias, fungos e vírus (RODDICK, 1974). Várias pesquisas buscam compreender qual a eficácia deste fitoquímico no combate ao câncer de próstata (LEE *et al.*, 2013a; LEE *et al.*, 2013b; HUANG *et al.*, 2015b); fígado (LEE *et al.*, 2004; FRIEDMAN *et al.*, 2009); estômago (FRIEDMAN *et al.*, 2009); mama (FRIEDMAN *et al.*, 2009; SUCHA *et al.*, 2013; TOMSIK *et al.*, 2013); ovário (WU *et al.*, 2021); colón e reto (LEE *et al.*, 2004; FRIEDMAN *et al.*, 2009; ISHII *et al.*, 2011); pulmão (SHIH *et al.*, 2009) e leucemia (CHAO *et al.*, 2012; KÖDELOVÁ *et al.*, 2013; HUANG *et al.*, 2015a).

Até o presente, não existe na literatura trabalhos realizados *in vitro*, utilizando o modelo de cultura de células tridimensional (3D) de formação de esferoides, que relacionem o potencial quimioterápico da α -tomatina em células da linhagem HT- 29. Com base no exposto, o presente estudo teve como objetivo investigar a interferência da α -tomatina nos processos de parada de ciclo, morte celular, migração, proliferação, formação de novas colônias, genotoxicidade e citotoxicidade em células de câncer colorretal, correlacionando com a expressão de mRNA de genes-chave relacionados a esses processos para compreender melhor seu mecanismo de ação e potencial terapêutico.

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Aspectos Gerais do Câncer

O câncer causa milhões de mortes em todo o mundo. As estimativas mais recentes, realizadas no ano de 2020, apontam que a doença teria levado a óbito quase 10 milhões de pessoas no mundo naquele ano. Estatisticamente, os dados apontam que em 2020 surgiram cerca de 19.3 milhões de novos casos da doença (SUNG *et al.*, 2021). Estima-se que a mortalidade por câncer aumentará em até 13 milhões em 2030, juntamente com 21,7 milhões de novos casos dessa doença (JEMAL *et al.*, 2019).

A definição científica de câncer está relacionada ao termo neoplasia maligna, ele é uma das doenças mais letais e abrange um amplo grupo de síndromes que envolvem o crescimento desregulado de uma população de células (OUYANG *et al.*, 2014). Existem mais de 200 tipos conhecidos de câncer, esses correspondem aos vários tipos de tecidos presentes no corpo (ALMEIDA *et al.*, 2005).

Os fatores de risco para desenvolvimento do câncer podem ser extrínsecos (fatores ambientais) ou intrínsecos (hereditários) (ALMEIDA *et al.*, 2005). Acredita-se que 90% dos casos da doença poderiam ser evitados, pois estes estão relacionados diretamente ao meio ambiente, onde se é possível encontrar muitos dos fatores de risco, como o estilo de vida (fumaça de cigarro, consumo de álcool, alimentação), poluição ambiental e exposição à luz solar (AGGARWAL *et al.*, 2008).

O alto número de incidência da doença pode ser explicado devido a maior exposição dos indivíduos aos agentes cancerígenos, como os padrões de vida adotados pelas pessoas, as circunstâncias de trabalho, a nutrição, o consumo de industrializados, entre outros. Além do mais, a redução das taxas de mortalidade, o prolongamento da expectativa de vida e o envelhecimento populacional, levam ao aumento da incidência de doenças crônico-degenerativas, como o câncer (INCA, 2006). Portanto, as mudanças que o homem causa no meio ambiente, os hábitos e estilos de vida praticados pelos cidadãos, podem determinar diferentes tipos de neoplasias (ALMEIDA *et al.*, 2005).

É possível relacionar a incidência de certos tipos de cânceres com o nível socioeconômico da população. Como por exemplo, algumas neoplasias ocorrem mais frequentemente quando relacionadas a um melhor nível socioeconômico como o

câncer de mama, próstata, cólon e reto. Em contrapartida, alguns tipos de câncer, como o câncer de colo do útero, pênis, estômago e cavidade oral podem ser associados a pobreza. Estes dados são resultados das diferentes condições de vida, que variam de acordo com as desigualdades sociais e a exposição diferenciada a fatores ambientais relacionados ao processo de industrialização, como agentes químicos, físicos e biológicos (INCA, 2006).

Entre todas as mortes por câncer que ocorrem no mundo, cerca de 60% ocorrem em países em desenvolvimento (JEMAL *et al.*, 2019). A maioria dos estudos sobre prevenção da doença foram realizados em países desenvolvidos. Portanto, as estratégias de tratamento disponíveis são o resultado de pesquisas realizadas nesses territórios (KUMAR *et al.*, 2015).

O corpo humano é formado por células que se organizam em tecidos e órgãos. As células normais crescem, se dividem, e morrem, renovando-se a cada ciclo. Os cânceres surgem de uma série de mutações ou alterações genômicas que fornecem a essas células uma extensa capacidade de evadir os sinais pró-apoptóticos e inibidores do crescimento e de ser autossuficiente em sinais de crescimento (BAJAJ *et al.*, 2019). Se falham os sistemas de reparo e imunológico na tarefa de destruir e limitar essas células anormais, novas células vão surgindo, clones das células alteradas, que eventualmente poderão se transformar em células tumorais (INCA, 2020b). As alterações genéticas que ocorrem nessas células são capazes de progredir até que ocorra angiogênese, invasão de tecidos e/ou metástases (HANAHAN; WEINBERG, 2000; 2011).

Os proto-oncogenes são genes presentes nas células que as auxiliam no seu processo de crescimento (NIH, 2017). Esses genes podem sofrer alterações transformando-se em oncogenes, que podem transformar as células em células tumorais (ALMEIDA *et al.*, 2005). Outros genes que também podem ser responsáveis pela formação de células malignas são os genes supressores de tumor. Estes são responsáveis por reparar o DNA, desacelerar a divisão celular e sinalizar quando a morte celular é necessária. Quando tais genes não funcionam corretamente, as células podem passar a se desenvolver fora de controle (ONCOGUIA, 2017). Para manter a integridade de seus genomas, as células desenvolveram mecanismos para restaurar o DNA danificado, esses mecanismos são desempenhados por genes chamados de genes de reparo de DNA (COOPER, 2000). Tais são responsáveis por corrigir imediatamente qualquer dano gerado no DNA. Mas, se alguma mutação

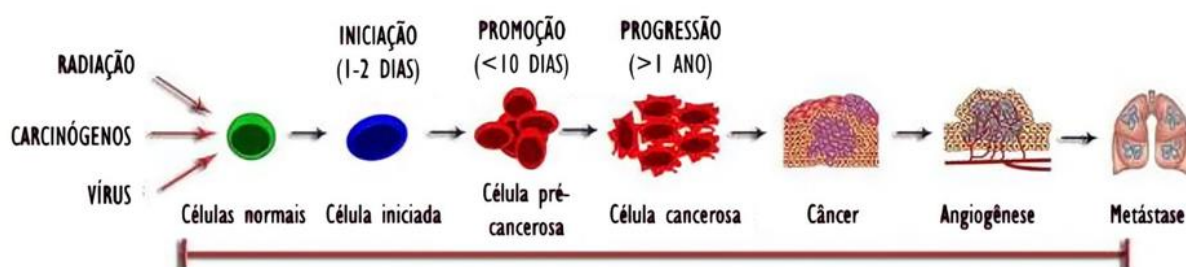
ocorre em um desses genes, os erros podem se acumular e contribuir para o desenvolvimento de células cancerosas.

As células cancerosas se dividem mais rapidamente do que as normais e geralmente são desorganizadas. Com o tempo, podem se empilhar umas sobre as outras, formando uma massa de tecido chamada tumor (INCA, 2006). Este processo é denominado de carcinogênese, ou seja, formação do câncer. Em geral, dá-se lentamente, podendo levar vários anos para que uma célula cancerosa origine um tumor detectável (ALMEIDA *et al.*, 2005).

O câncer é uma condição fisiopatológica que consiste resumidamente em três fases distintas (Figura 1): iniciação, promoção e progressão (KUMAR *et al.*, 2015). No primeiro estágio, denominado de iniciação, as células sofrem modificações em seus genes devido a exposição a um agente carcinogênico. Esta fase é caracterizada por células geneticamente alteradas, onde ainda não se é possível detectar um tumor clinicamente (ALMEIDA *et al.*, 2005).

O segundo estágio é o estágio de promoção. Nesta fase as células se tornam malignas de forma lenta e gradual devido ao efeito dos agentes cancerígenos classificados como oncopromotores (ALMEIDA *et al.*, 2005). A progressão tumoral caracteriza a fase em que a célula adquire características cada vez mais agressivas devido às mutações sofridas. Neste estágio ocorre uma multiplicação descontrolada e irreversível da célula. Nesta fase já é possível observar as primeiras manifestações clínicas da doença, considerando que o câncer já está instalado (INCA, 2021).

Figura 1: Processos envolvidos na carcinogênese.

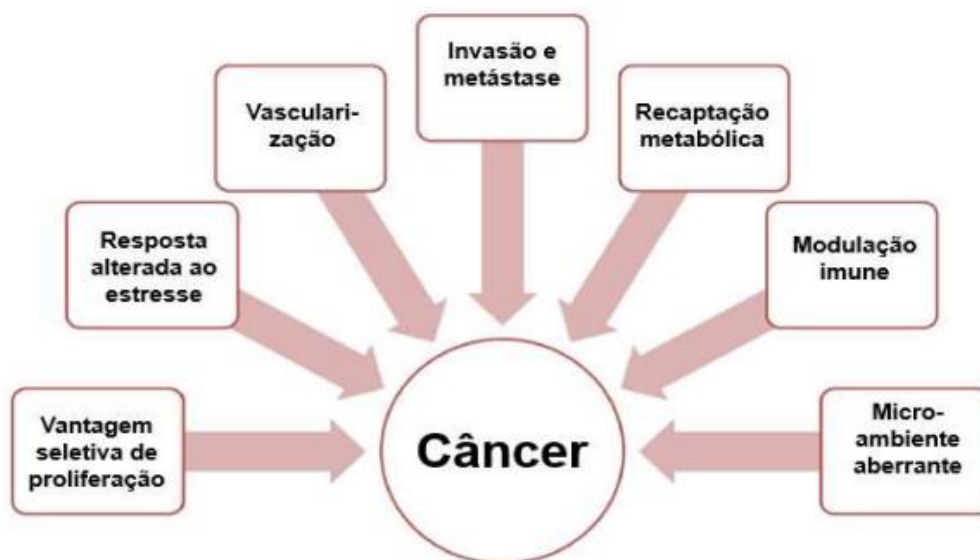


Fonte: Adaptado de Pratheeshkumar *et al.*, 2012.

As células que eventualmente se tornam tumorais sofrem uma sucessão de alterações nas suas características que as permitem tal efeito (Figura 2). Essas

características foram descritas por Hanahan e Weinberg (2000; 2011) e revisadas por Fouad (2017). Essas propriedades são classificadas como: crescimento seletivo e vantagem proliferativa, resposta alterada ao estresse, vascularização, invasão e metástase, recaptção metabólica, modulação imune e microambiente alterado (FOUAD; AANEI, 2017).

Figura 2: Características das células cancerosas.



Fonte: Silva, 2019.

A primeira característica é o crescimento seletivo e a vantagem proliferativa, estes se referem ao fato de as células tumorais possuírem uma vantagem de sobrevivência obtida por meio da ativação de oncogenes e falta de resposta a inibição do crescimento (SILVA, 2019). As células tumorais sofrem muitos estresses, como a sinalização excessiva, danos ao DNA, escassez de nutrientes e hipóxia, as células adotam uma variedade de respostas para se adaptarem a esses estresses, caracterizando a segunda propriedade, a resposta alterada ao estresse (FOUAD; AANEI, 2017).

A terceira característica é a vascularização. O principal processo que ocorre durante a vascularização é a angiogênese, termo utilizado para se referir à geração de novos vasos sanguíneos capilares (FOLKMAN, 1984). Com a constante multiplicação celular, há a necessidade de que novos vasos sanguíneos sejam formados para que haja a nutrição das células cancerosas (ALMEIDA *et al.*, 2005). A invasão e a metástase, quarta característica, atribuem a capacidade de invadir o tecido adjacente e migrar para locais distantes para a formação de tumores

secundários. O câncer metastático é responsável por aproximadamente 90% das mortes por câncer (FOUAD; AANEI, 2017).

A quinta característica é a recaptção metabólica que confere uma vantagem seletiva durante os processos de iniciação e progressão dos tumores. A sexta característica refere-se as fases denominadas de eliminação, equilíbrio e fuga, que constituem a modulação imunológica. Nesta fase há a intenção de eliminar ou modular a doença (SILVA, 2019). Por fim, o microambiente alterado é o termo utilizado para descrever o microambiente tumoral rico e dinâmico que é formado durante a carcinogênese (FOUAD; AANEI, 2017).

A prevenção do câncer pode ser classificada em prevenção primária, secundária e terciária. A prevenção primária tem como objetivo prevenir a ocorrência do câncer, a prevenção secundária se destina a diagnosticar a doença no seu início, para assim tentar reduzir o sofrimento causado pelo tumor durante o desenvolvimento, bem como reduzir as taxas de mortalidade. Por outro lado, a prevenção terciária visa prevenir a recorrência do câncer (RANJAN *et al.*, 2019).

Como constatado até aqui, o câncer é umas das doenças mais letais do mundo, e apesar de inúmeros estudos, a incidência e a mortalidade estão cada vez maiores. Nos últimos anos, surgiram evidências que apontam que produtos naturais de plantas possuem papéis-chave no combate ao câncer. Há uma crescente exploração dos compostos naturais originados de plantas. Estes são amplamente utilizados como candidatos a agentes antitumorais. Alguns até mesmo foram posteriormente utilizados em terapias pré-clínicas e clínicas contra câncer (ZHANG *et al.*, 2012).

A quimioprevenção refere-se ao uso de agentes que têm potencial para inibir, reverter ou retardar a tumorigênese (SURH, 2003). Os produtos naturais de origem vegetal são cada vez mais utilizados como estratégia quimiopreventiva (KUMAR *et al.*, 2015). Além disso, estima-se que 35% das mortes por câncer podem estar relacionadas à dieta e a fatores dietéticos. Na quimioprevenção, vários biofatores dietéticos, fitoquímicos e até extratos de plantas inteiras são usados para prevenir o câncer (KUMAR *et al.*, 2015).

Existem atualmente várias terapias utilizadas no tratamento do câncer, as principais são a radioterapia, a imunossupressão, a quimioterapia e a cirurgia. Porém, todas essas estratégias possuem desvantagens (KUMAR *et al.*, 2015). A quimioterapia por exemplo, pode ser responsável pela indução de náuseas e vômitos,

lesão no esôfago, fraturas, má nutrição, desequilíbrio hidro-eletrolítico e acido-básico (SAWADA *et al.*, 2009).

São múltiplas as complicações que ocorrem em pacientes que recebem terapia de radiação. A radiodermatite é a predominante, causando dor, desconforto, irritação, coceira e queimação (SILVEIRA *et al.*, 2016). As cirurgias podem resultar em algumas complicações físicas, no caso do câncer de mama, por exemplo, pode originar infecção, necrose de pele, seroma, aderência e deiscência cicatriciais, limitação da amplitude de movimento (ADM) do ombro, cordão axilar, dor, alteração sensorial, lesão de nervos motor e/ou sensitivo, fraqueza muscular e linfedema (NASCIMENTO *et al.*, 2012).

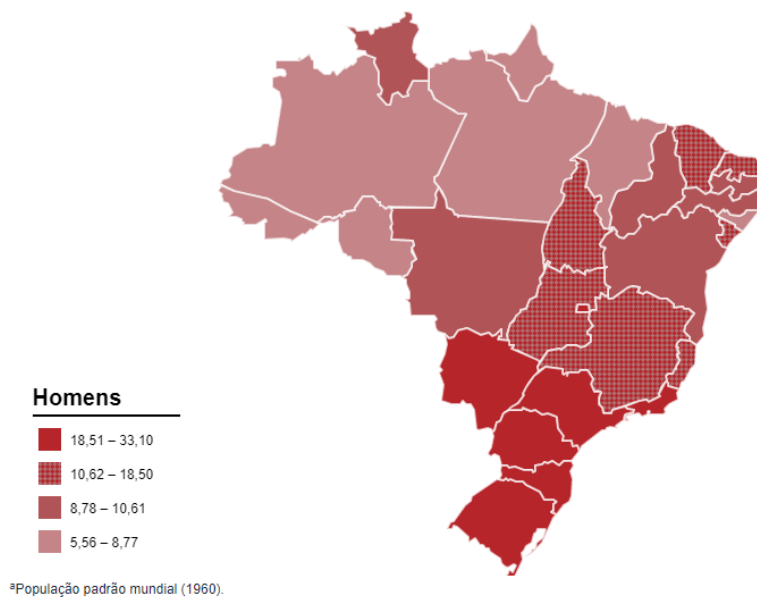
Dessa maneira, a descoberta de novos compostos naturais e mais estudos dos já conhecidos pode representar uma melhor esperança para a terapêutica do câncer (ZHANG *et al.*, 2012).

1.2 Câncer Colorretal

As terminologias câncer colorretal ou câncer de cólon e reto são utilizadas para se referir aos cânceres que atingem o cólon, junção retossigmóide e/ou reto (IARC, 2019). De acordo com o Instituto Nacional De Câncer (INCA, 2021), as estimativas do ano de 2020 apontam que no Brasil, teriam surgido 20.540 novos casos de câncer colorretal em homens e 20.470 em mulheres, sendo este o segundo tipo de câncer mais comum em ambos os sexos. Com relação à mortalidade, avalia-se que a doença tenha levado a óbito 10.191 homens e 10.385 mulheres, sendo este o terceiro tipo de câncer mais letal para ambos.

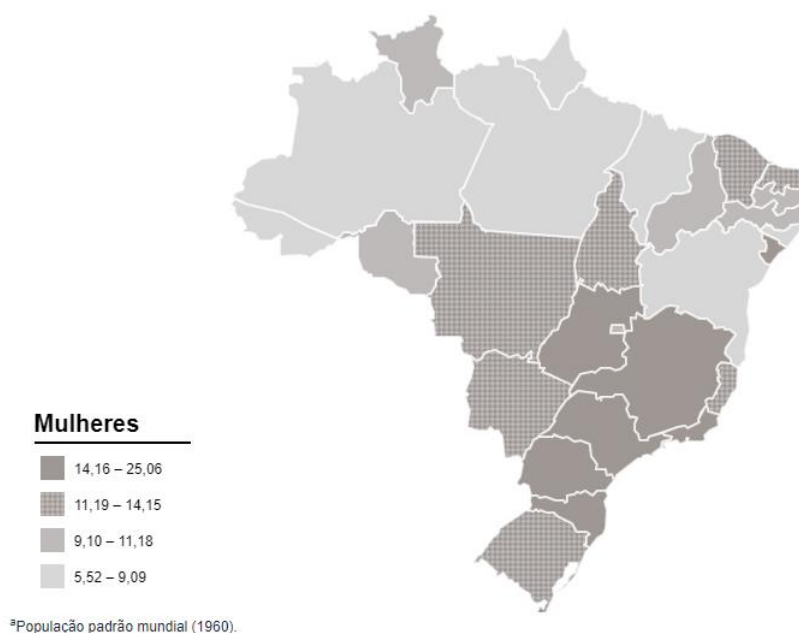
No Brasil estima-se que a região sul do país apresente maior índice da doença em homens, além dos estados do Rio de Janeiro, Mato Grosso do Sul e São Paulo. Este último possui os maiores índices do país, com uma taxa estimada de 33,10 casos para cada 100.000 homens (Figura 3). Já em mulheres é possível observar a maior incidência nos estados de Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e Goiás. O estado de Santa Catarina possui as maiores taxas, estimadas em 25,06 casos para cada 100.000 mulheres (Figura 4) (INCA, 2021).

Figura 3: Representação espacial das taxas de incidência por 100 mil homens, estimadas para o ano de 2020, segundo Unidade da Federação (neoplasia maligna do cólon e reto).



Fonte: INCA, 2021.

Figura 4: Representação espacial das taxas de incidência por 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2020, segundo Unidade da Federação (neoplasia maligna do cólon e reto).



Fonte: INCA, 2021.

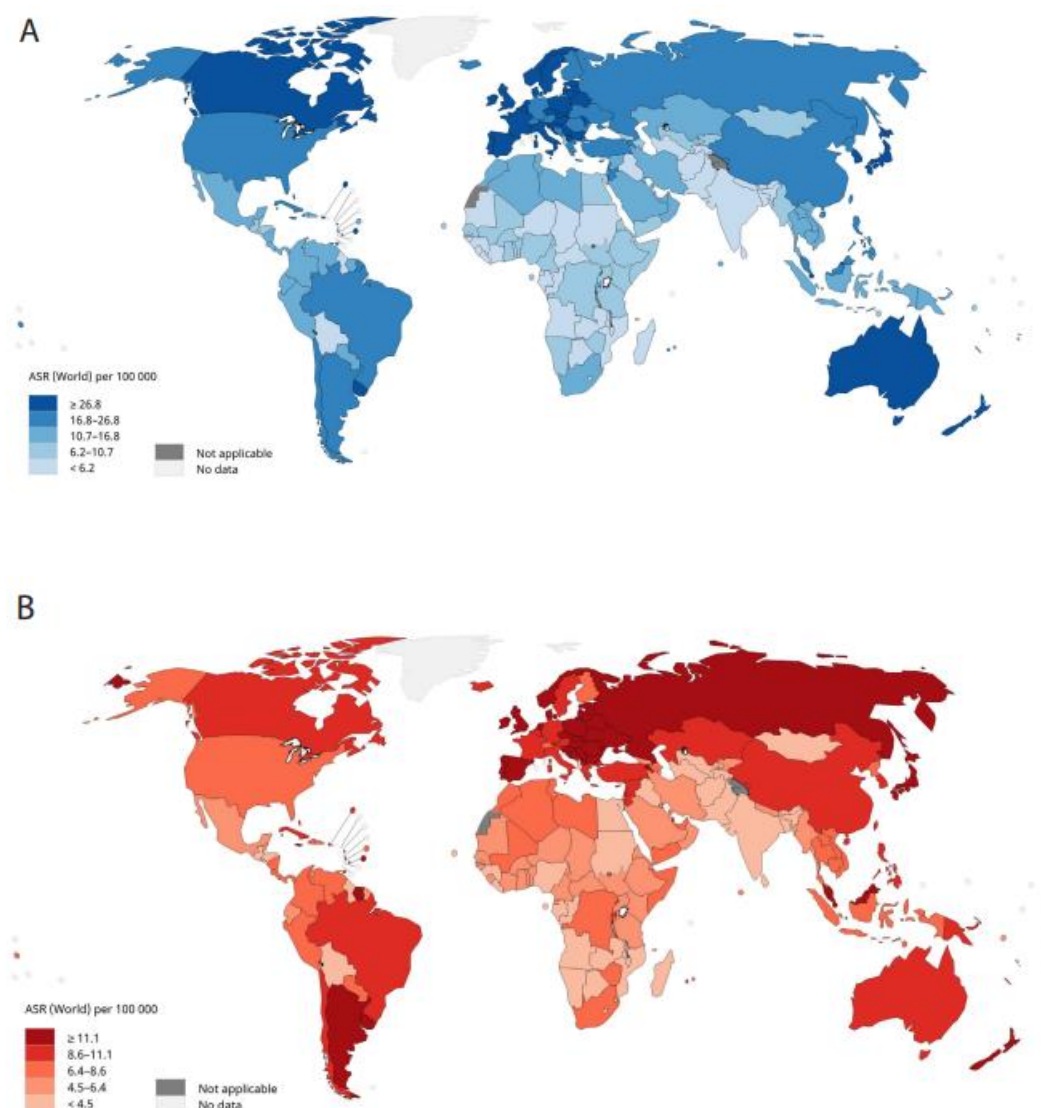
Em todo o mundo, a incidência do câncer colorretal é maior em homens do que em mulheres. Esta diferença provavelmente está relacionada a exposição aos fatores de risco, como o estilo de vida, dieta, tabagismo e obesidade. Alguns outros fatores também podem explicar essas disparidades, como as interações entre a exposição ao estrogênio, a distribuição da gordura corporal e as bases biológicas dos tumores colorretais (IARC, 2019).

Em 2018, 1.8 milhões de novos casos de câncer colorretal surgiram no mundo, sendo essa doença o terceiro tipo de câncer mais incidente (OPAS, 2020). Estimativas mais recentes, referentes ao ano de 2020, apontam que o câncer de cólon e reto seria o segundo principal causador de morte por câncer, representando 9,4% dos casos, ficando atrás apenas do câncer de pulmão em homens e câncer de mama em mulheres (SUNG *et al.*, 2021).

Assim como na maioria dos cânceres, as taxas de incidência e mortalidade do câncer colorretal aumentam de acordo com a idade. A maioria dos casos tendem a aparecer após os 50 anos. Estima-se que em 2018 apenas 10% dos casos ocorreram em pessoas abaixo dos 50, 59% dos casos em pessoas que possuíam entre 50 e 74 anos e 31% em indivíduos com 75 anos ou mais (IARC, 2019).

É possível observar que a Austrália e Nova Zelândia, Europa, Leste Asiático e América do Norte possuem as maiores taxas de incidência da doença (Figura 5a). Com relação as taxas de mortalidade, os índices mais altos são observados na Europa Central e Oriental (Figura 5b).

Figura 5: Distribuição global das taxas estimadas de incidência (A) e mortalidade (B) padronizadas por idade (Mundial) por 100.000 para câncer colorretal em homens e mulheres.



Fonte: IARC, 2018.

A prevenção primária para o câncer colorretal é feita quando reduzida a exposição a alguns fatores de risco evitáveis, como o sobrepeso, consumo de bebidas alcoólicas e tabagismo, bons hábitos alimentares e a prática de atividade física (IARC, 2019).

Estudos comprovam que os hábitos alimentares desempenham um importante papel tanto na prevenção quanto na causa do câncer colorretal. O consumo de bebidas alcoólicas deve ser evitado, bem como o consumo em excesso de carne vermelha e embutidos (IARC, 2019). A ingestão de bebidas alcoólicas está associada

ao aumento do risco para câncer de intestino quando a dose diária ingerida é superior a 30 gramas de etanol. Estimativas indicam que para cada porção de 50 gramas de carne processada consumidas diariamente, as chances de desenvolvimento de câncer colorretal aumentam em 18% (INCA, 2021). Existem evidências sugestivas de que o consumo de alimentos contendo ferro-heme aumentam o risco de câncer de cólon e reto (IARC, 2019). As carnes vermelhas, apesar de serem uma importante fonte de nutrientes, são ricas neste composto.

Os bons hábitos alimentares que podem ser relacionados à prevenção do câncer são o consumo de alimentos contendo fibra e cereais integrais e de produtos lácteos. As fibras induzem a fermentação, que podem reduzir a proliferação celular e induzir apoptose (INCA, 2021). Os laticínios são fonte de cálcio e evidências apontam que o mineral possui um efeito preventivo (IARC, 2019). Outros costumes alimentares foram associados a diminuição da incidência do câncer colorretal, são eles uma dieta rica em frutas, vegetais, folato, vitamina D, vitamina B6, ingestão de magnésio e o consumo de alguns alimentos como peixe e alho (THANIKACHALAM; KHAN, 2019).

Há evidências suficientes de risco aumentado de câncer colorretal com o aumento da gordura corporal e da gordura abdominal (IARC, 2019). Em contrapartida, manter a gordura corporal nos níveis normais, reduz as chances de desenvolvimento para este tipo de câncer (INCA, 2021).

Com relação a prática de atividade física, esta foi associada a um menor risco de câncer de cólon (MORRIS *et al.*, 2018). Em contraste, a prática não está relacionada ao risco de desenvolver câncer retal (IARC, 2019). Praticar exercícios não só promove o equilíbrio hormonal, mas também reduz os marcadores inflamatórios e o tempo de trânsito gastrointestinal, bem como o fortalecimento da imunidade (INCA, 2021).

Os estudos de dose-resposta também demonstram claramente que o risco de câncer colorretal aumenta com o aumento da intensidade e da duração do tabagismo. O risco é consistentemente maior para câncer retal do que para câncer de cólon (LIANG *et al.*, 2009).

Existem também evidências que correlacionam a altura do indivíduo com as chances do desenvolvimento de câncer. Estes dados provavelmente estão relacionados a nutrição durante o início da vida, perfis hormonais e maturação sexual. A associação entre a altura atingida no adulto e o risco de desenvolvimento da doença

é mais forte para as mulheres do que para os homens e é mais forte para o câncer de cólon do que para o câncer retal (IARC, 2019).

Outros fatores relacionados as maiores chances de desenvolvimento da doença são genéticos (INCA, 2021). Algumas síndromes como a Síndrome de Lynch (câncer colorretal hereditário não polipose), Polipose adenomatosa familiar (FAP), polipose associada a MUTYH (MAP) são síndromes de câncer colorretal hereditário. A síndrome de Lynch e a polipose adenomatosa familiar contribuem para a grande maioria da síndrome do câncer colorretal hereditário, que responde por apenas cerca de 5% de toda a incidência de câncer colorretal. A presença de história familiar de câncer de cólon em parentes de primeiro grau, aumenta o risco de desenvolvimento de câncer colorretal em cerca de 20% dos casos (THANIKACHALAM; KHAN, 2019).

No que diz respeito à prevenção secundária, esta está relacionada ao fornecimento de opções adicionais importantes para o controle do câncer. O objetivo é realizar a conscientização e educar as pessoas sobre os sinais e sintomas do câncer colorretal e a importância de buscar o diagnóstico e tratamento precoces (IARC, 2019). O diagnóstico precoce das lesões pré-malignas e dos estágios iniciais do câncer colorretal permite que seu tratamento seja potencialmente curativo (DINIZ; LACERDA-FILHO, 2003).

Existem diversas estratégias de rastreamento disponíveis para o câncer colorretal (IARC, 2019). A detecção precoce pode ser realizada por meio de exames clínicos, laboratoriais, endoscópicos e/ou radiológicos em pessoas sintomáticas (presença de sangue nas fezes, massa e dor abdominais, perda de peso e anemia e mudança de hábito intestinal) ou assintomáticas pertencentes a um grupo com maior risco de desenvolvimento da doença (INCA, 2021).

Os principais exames utilizados no rastreamento do câncer colorretal são as endoscopias (colonoscopia ou retossigmoidoscopia) e pesquisas de sangue oculto nas fezes. Os exames endoscópicos permitem a realização de biopsia e retirada da lesão pré-maligna caso existente (INCA, 2021). Já a pesquisa de sangue oculto nas fezes se baseia no fato de que pólipos grandes podem apresentar pequenos sangramentos em sua evolução que podem ser detectados neste teste (DINIZ; LACERDA-FILHO, 2003).

De modo geral, o câncer de colón e reto é uma doença tratável e com grandes chances de cura. Os principais tratamentos envolvem a retirada da parte afetada e radioterapia, associada ou não, a quimioterapia para evitar o retorno do tumor. Os

métodos a serem utilizados são decididos baseado no tamanho, localização e extensão do tumor (INCA, 2021).

A grande maioria dos cânceres colorretais se originam de pólipos adenomatosos. No geral, os adenomas permanecem como lesões benignas. No entanto, algumas dessas lesões podem evoluir para a malignidade (TANAKA, 2009). Sendo assim, indivíduos que apresentam esses pólipos tem maiores chances de desenvolvimento da doença, em especial, em pessoas com menos de 60 anos (IARC, 2019). O potencial de malignidade dos adenomas depende muito de seu tipo histológico, grau de displasia e tamanho (TANAKA, 2009).

Quando um pólipo benigno evolui, este pode progredir para a formação de um câncer invasivo, que é curável. Mas, se não tratado pode se espalhar para os linfonodos e originar metástases. Os tumores em estágio I e II, normalmente, são curáveis por meio de cirurgia, aqueles que se encontram em estágio III são tratados normalmente por cirurgia aliada à quimioterapia. Já os tumores em estágio IV, classificados como aqueles que metastizam para locais distantes, geralmente, são incuráveis (MARKOWITZ; BERTAGNOLLI, 2009). Na maioria dos casos, essa progressão leva pelo menos 10 anos (NELSON; THORSON, 2009).

O câncer colorretal é classificado de acordo com os subtipos histológicos definidos pela OMS (WHO, 2019). O subtipo mais comumente observado é o adenocarcinoma, responsável por aproximadamente 85% dos casos em todo o mundo. Os outros tipos mais frequentes são o carcinoma mucinoso e o carcinoma medular, responsáveis por aproximadamente 5 a 20% dos casos e 4% dos casos, respectivamente. Os carcinomas de células em anel de sinete são raros, observados em uma frequência menor que 2% (IARC, 2019).

A instabilidade genômica pode levar ao surgimento do câncer colorretal. Nesta doença, as principais instabilidades observadas são a instabilidade cromossômica, defeitos de reparo de DNA e metilação aberrante de DNA. O tipo mais comum é a instabilidade cromossômica, responsável por causar alterações no número e na estrutura das cópias cromossômicas. É possível observar também a inativação de genes de reparo de incompatibilidade e silenciamento epigenético de genes, mediado pela metilação aberrante do DNA (MARKOWITZ; BERTAGNOLLI, 2009).

Outro fator que pode levar ao surgimento do câncer em questão, é a inativação mutacional de genes supressores de tumor. A mutação mais comum é responsável por inativar o gene que codifica a proteína APC, na ausência da APC ocorre a ativação

da via de sinalização Wnt, considerada o evento inicial do câncer colorretal. Essas mutações dão origem a polipose adenomatosa familiar (MARKOWITZ; BERTAGNOLLI, 2009).

Outra inativação que é responsável por causar o câncer colorretal é a inativação da via do p53 pela mutação do *TP53*. A via p53 permeia a parada do ciclo celular e um *checkpoint* de morte celular. Além disso, a inativação mutacional da sinalização de TGF- β resulta na transição do adenoma (tumor benigno) para o carcinoma (tumor maligno) (MARKOWITZ; BERTAGNOLLI, 2009).

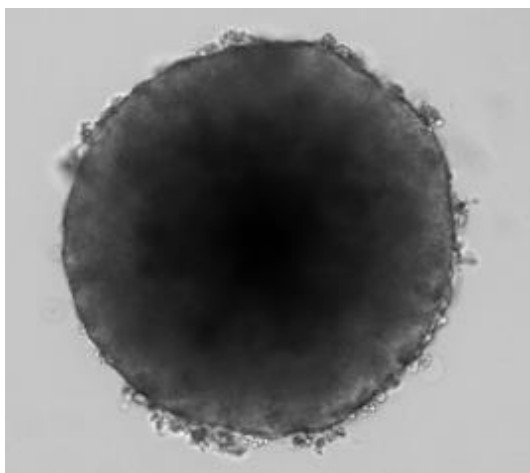
Alguns oncogenes também são responsáveis pela promoção do câncer colorretal. As mutações que ocorrem nos genes *RAS* e *BRAF* são observadas em 37% e 13% dos cânceres colorretais, respectivamente. Um terço dos cânceres colorretais apresentam mutações que ativam *PI3KCA*, que codifica a subunidade catalítica da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) (MARKOWITZ; BERTAGNOLLI, 2009).

1.3 Cultura de células 3D como modelo experimental

O modelo de cultura celular bidimensional é simples e tradicional. No entanto, é um ambiente artificial que não consegue reproduzir precisamente algumas características e traços observados em organismos vivos (CESARZ; TAMAMA, 2016; LANGHANS, 2018). O conhecimento deste fato levou a novos estudos com o objetivo de elaborar um modelo celular mais apropriado para melhor representar as propriedades observadas *in vivo* (MITTLER *et al.*, 2017).

O modelo de cultura celular 3D é caracterizado por garantir às células a capacidade de crescer em formato de esferoides (Figura 6), formando um ambiente tridimensional microestruturado heterogêneo (CESARZ; TAMAMA, 2016; PEIRSMAN *et al.*, 2021). Os esferoides são utilizados em ensaios *in vitro* para estudar alguns mecanismos importantes biologicamente, eles podem ser gerados a partir de uma variedade de culturas de células de tecidos saudáveis e/ou patológicos, incluindo o câncer (PEIRSMAN *et al.*, 2021).

Figura 6 – Fotomicrografia de um esferoide de linhagem HT-29.



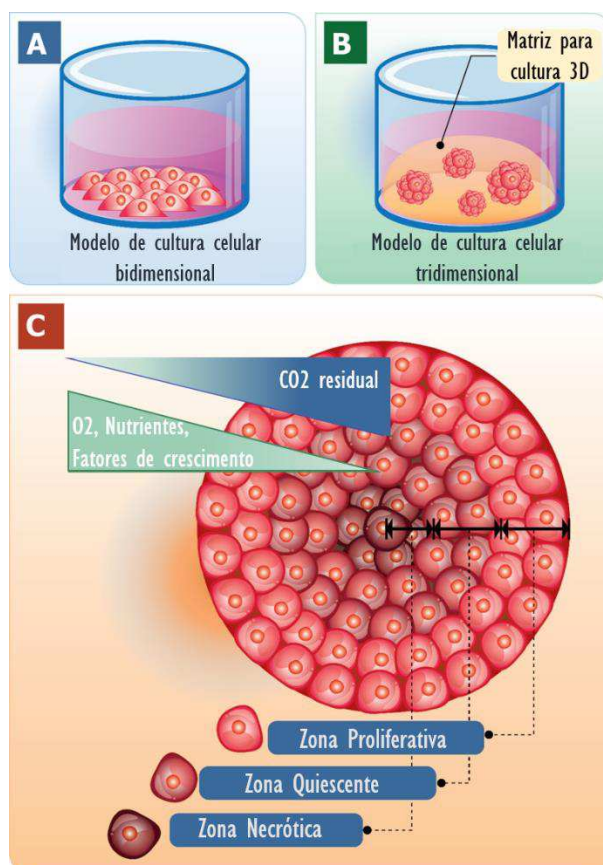
Fonte: Arquivo pessoal – Laboratório de Genética Toxicológica.

O sistema 3D pode ser formado por células de uma mesma linhagem, classificando os esferoides homotípicos, ou por células de duas ou mais linhagens diferentes, denominados heterotípicos (WEISWALD; BELLET; DANGLES-MARIE, 2015).

Esses esferoides são submetidos a uma exposição heterogênea de oxigênio e nutrientes, bem como a estresses físicos e químicos, o que justifica a heterogeneidade espacial na proliferação, quiescência, necrose e diferenciação. Esta distribuição não é mimetizada em cultura de monocamada (WEISWALD; BELLET; DANGLES-MARIE, 2015; PEIRSMAN *et al.*, 2021). Deste modo, a metodologia 3D tornou-se mais relevante, visto que espelha melhor as características presentes em organismos vivos (CESARZ; TAMAMA, 2016).

Os esferoides são formados por um núcleo necrótico, uma camada intermediária de células quiescentes, causada pela distribuição limitada de oxigênio, e uma camada mais externa onde as células apresentam maior atividade e divisão celular (ZANONI *et al.*, 2016). Essa heterogeneidade das células tumorais se dá devido à privação do fator de crescimento, gradientes de nutrientes e oxigênio e acúmulo de catabólitos (WEISWALD; BELLET; DANGLES-MARIE, 2015). É este microambiente formado na cultura celular tridimensional (Figura 7) que confere maior similaridade às interações biofísicas e bioquímicas observadas *in vivo* (LUCKERT *et al.*, 2016).

Figura 7 - Diagrama esquemático da cultura de células em monocamada bidimensional e tridimensional. A: Cultura de células em monocamada bidimensional; B: Cultura de células tridimensional; C: A estrutura do esferoide tridimensional com diferentes zonas de células com os modelos de oxigenação, nutrição e remoção de gás carbônico. As regiões são zona necrótica (mais interna), zona de células viáveis quiescentes (meio) e zona de proliferação (mais externa).



Fonte: Adaptado de Chaicharoenaudomrung; Kunhorm; Noisa, 2019.

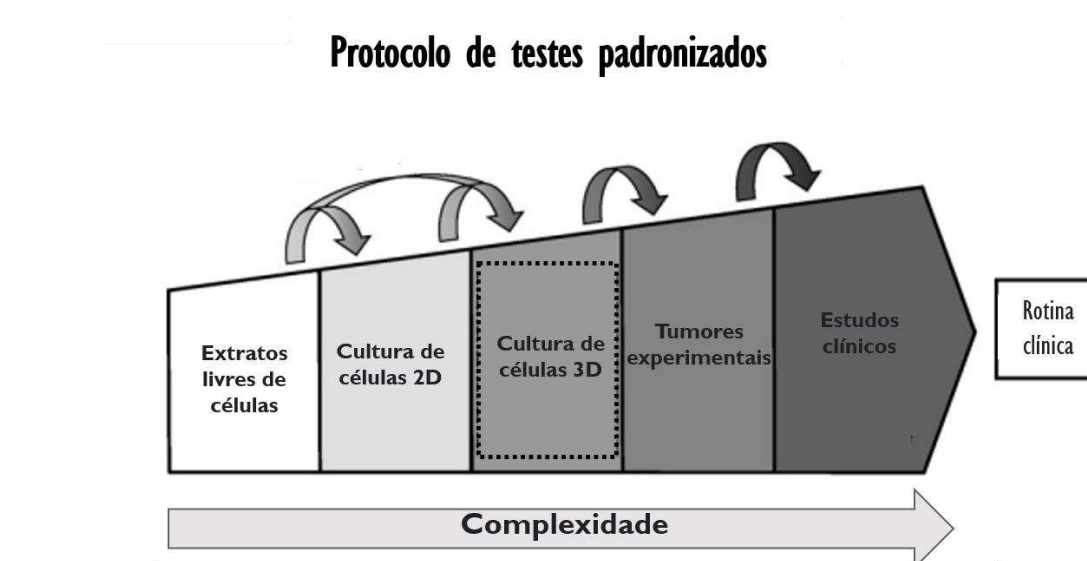
Como consequência às suas vantagens, esta metodologia tem despertado o interesse acadêmico e industrial, com o intuito de estudar respostas a medicamentos ou até mesmo, na biofabricação de tecidos e órgãos funcionais 3D (PEIRSMAN *et al.*, 2021). Estatisticamente, nos últimos anos, observou-se um declínio na descoberta de novos medicamentos. Possivelmente, uma das causas que levaram a este dado está relacionada a falha dos ensaios pré-clínicos, sendo o mais comum destes o uso de linhagens celulares cultivadas em um ambiente 2D (MITTLER *et al.*, 2017).

O desenvolvimento e utilização de novos fármacos envolve um processo longo e complexo, que depende de vários estágios e procedimentos para garantir a

segurança e eficácia do medicamento antes deste ser aprovado para utilização clínica (LANGHANS, 2018).

O custo para formular novos fármacos é alto e aumenta exponencialmente no estágio *in vivo* e, principalmente, no estágio clínico. Com isso, a indústria farmacêutica visa selecionar os candidatos promissores em estágios anteriores, como acontece nos ensaios *in vitro*. Uma das vantagens da utilização do modelo esferoidal na triagem de drogas anticâncer é que a configuração 3D permite uma identificação mais eficiente de fármacos promissores que poderiam falhar em ensaios clássicos de monocamada (Figura 8). Além disso, podem contribuir para a eliminação de drogas com baixo potencial ou até mesmo possivelmente perigosas para as células normais no estágio pré-clínico (HIRSCHHAEUSER *et al.*, 2010; MITTLER *et al.*, 2017).

Figura 8 - Implementação de ensaios de cultura 3D como ferramenta de seleção negativa e positiva no processo de desenvolvimento de medicamentos.



Fonte: Adaptado de Hirschhaeuser *et al.*, 2010.

1.4 Fitoquímicos

O termo fitoquímico tem origem na palavra grega *phyton*, que significa planta. Deste modo, a expressão fitoquímico é utilizada para representar um grupo de compostos químicos naturais de origem vegetal encontrados em grãos, sementes,

frutas e vegetais, que conferem à planta mecanismos de defesa contra vírus, bactérias e fungos (OUYANG *et al.*, 2014).

Com o desenvolvimento da tecnologia, cada vez mais extratos de plantas se tornam úteis para a medicina. Mais de dez mil fitoquímicos já foram identificados e acredita-se que muitos ainda não tenham sido descobertos (MOOSAVI *et al.*, 2018).

As plantas medicinais são historicamente consideradas como uma fonte rica de potenciais agentes terapêuticos, conseqüentemente, são usadas tradicionalmente em todo o mundo para o tratamento e prevenção de várias doenças, inclusive o câncer (ZHANG *et al.*, 2012; KUMAR *et al.*, 2015; MOOSAVI *et al.*, 2018).

Os tipos mais comuns de tratamentos para o câncer são a quimioterapia, radioterapia e cirurgia. Tratamentos esses que muitas vezes são limitados e apresentam uma toxicidade excessiva. A progressão da doença levou ao desenvolvimento de muitas drogas sintéticas anticâncer. No entanto, os dados demonstram que o uso isolado e generalizado desses compostos não melhorou significativamente a taxa de sobrevivência dos pacientes. Desde então, pesquisadores de todo o mundo buscam uma abordagem alternativa que otimize a eficácia dos medicamentos e minimize seus efeitos colaterais (ZANONI *et al.*, 2016; RANJAN *et al.*, 2019; CHOUDHARI *et al.*, 2020).

Devido à sua competência, os fitoquímicos são constantemente utilizados no desenvolvimento de novos fármacos (TAO XIE *et al.*, 2015). No início do século XIX, a morfina foi isolada do ópio, dando início a uma nova era na utilização das plantas medicinais (BALUNAS; KINGHORN, 2005).

Estima-se que entre os anos 1940 e 2014, 50% dos medicamentos anticâncer aprovados originaram-se de produtos naturais ou derivados (CHOUDHARI *et al.*, 2020). Alguns dos medicamentos mais promissores utilizados no tratamento da doença são derivados de fontes vegetais, destacam-se os taxóides, tais como a camptotecina, a combrestatina, a epipodofilotoxina e os alcalóides da vinca (OUYANG *et al.*, 2014).

A vantagem da utilização de fitoquímicos como fármacos está no fato de estarem facilmente acessíveis, apresentarem baixa toxicidade e poucos efeitos adversos (WU *et al.*, 2021).

Há uma grande diversidade de compostos naturais derivados de fontes vegetais, conseqüentemente, estes possuem uma variedade de mecanismos que podem ser úteis como agentes anticancerígenos. Alguns exemplos são a capacidade

de suprimir a invasão e angiogênese tumoral, bem como a resistência e proliferação de células malignas e eliminar radicais livres (ZHANG *et al.*, 2012; OUYANG *et al.*, 2014; CHOUDHARI *et al.*, 2020).

Mais especificamente, os fitoquímicos agem por meio da desregulação de processos envolvidos na carcinogênese, eles podem, por exemplo, fortalecer a capacidade antioxidante, induzir morte celular apoptótica ou autofágica e parada do ciclo celular, regular o sistema imunológico, além da eficácia inativação de agentes carcinógenos (KUMAR *et al.*, 2015; CHOUDHARI *et al.*, 2020)

Frente ao exposto, faz se necessário mais estudos para compreender os mecanismos de ação dos fitoquímicos no combate ao câncer e assim, possivelmente, favorecer a criação de novas moléculas quimiopreventivas. Pois além de apresentarem menos efeitos colaterais, são mais baratos e acessíveis em comparação com as drogas sintéticas (KUMAR *et al.*, 2015).

1.5 α -tomatina

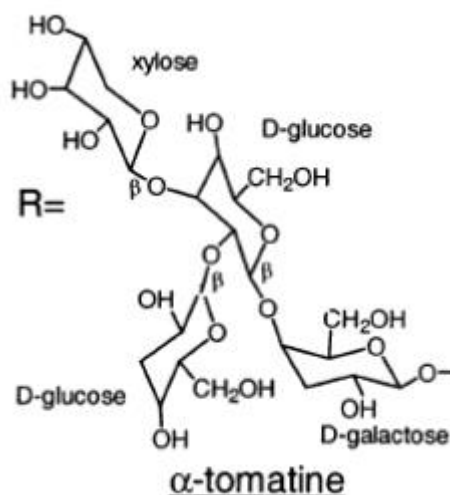
O tomate (*Lycopersicon esculentum*) é uma dicotiledônea pertencente à família Solanacea. O fruto acumula uma variedade de metabolitos secundários (como compostos fenólicos, fitoalexinas, inibidores de protease e glicoalcalóides) que protegem a planta de predadores (FRIEDMAN, 2002). O vegetal é muito consumido pelo homem e é considerado uma importante fonte de ingredientes que promovem a saúde (PALOMO *et al.*, 2010).

Há na literatura, uma variedade de estudos que comprovam a eficiência do tomate em diversas áreas da saúde humana (BLUM *et al.*, 2005; BHOWMIK *et al.*, 2012). Destacam-se os modos pelos quais este fruto pode prevenir o câncer, foram descritos os seguintes recursos: antioxidante, ativação de apoptose, diminuição da proliferação celular, diminuição da angiogênese e metástase (PALOMO *et al.*, 2010).

A α -tomatina é um dos principais glicoalcalóides encontrados naturalmente nas raízes, caules, folhas e frutos do tomate. Quando ainda verde, o tomate pode conter até 500 mg de α -tomatina por kg da fruta fresca. Conforme o fruto amadurece, o composto é parcialmente degradado até que os níveis sejam de cerca de 5 mg por kg da fruta fresca (CHAO *et al.*, 2012; KÖDELOVÁ *et al.*, 2013; HUANG *et al.*, 2015b).

A molécula da α -tomatina consiste em um tetrassacarídeo ramificado (Figura 9), β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)-[β -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 3)]- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-D-galactose, ligado ao O-3 da aglicona esteroidal, tomatidina (ISHII *et al.*, 2011).

Figura 9 - Estrutura química da α -tomatina.



Fonte: Lee *et al.*, 2004.

Com a descoberta da α -tomatina e a ampliação de estudos ao seu respeito, foi descoberto que a molécula fornece a planta atividades antimicrobiana, antifúngica, anti-inflamatória e imunopotenciadora (LEE *et al.*, 2011; HUANG *et al.*, 2015b). Estes estudos sugerem que este composto possui propriedades antibióticas contra patógenos humanos e pode ser utilizado farmacologicamente como uma droga anticâncer em potencial (CHAO *et al.*, 2012; KŔDELOVÁ *et al.*, 2013).

Alguns trabalhos demonstraram que a α -tomatina possui propriedades anticarcinogênicas. Em relação a citotoxicidade, alguns autores observaram que o fitoquímico foi capaz de diminuir a viabilidade de células das linhagens MCF-7 (SUCHA *et al.*, 2013), MOLT-4 (KŔDELOVÁ *et al.*, 2013) CT-26 (KIM, NAM, FRIEDMAN, 2015), HBL, hmel-1 e M3, (SERRATÌ *et al.*, 2020), HL60 e K562 (CHAO *et al.*, 2012).

No que diz respeito a morte celular, estudos realizados *in vitro* e *in vivo* indicam que o composto é capaz de causar apoptose em células das linhagens HBL, hmel-1 e M3 (SERRATÌ *et al.*, 2020), CT-26 (KIM, NAM, FRIEDMAN 2015), HL-60, K-562 (CHAO *et al.*, 2012; HUANG *et al.*, 2015a), Skov3 (WU *et al.*, 2021), LNCap, VCap e

PC-3 (LEE *et al.*, 2011; HUANG *et al.*, 2015b). Em contrapartida, alguns autores encontraram resultados que apontam que o composto não induz morte celular apoptótica em células da linhagem HT-29 e MCF-7 (ISHII *et al.*, 2011; SUCHA *et al.*, 2013).

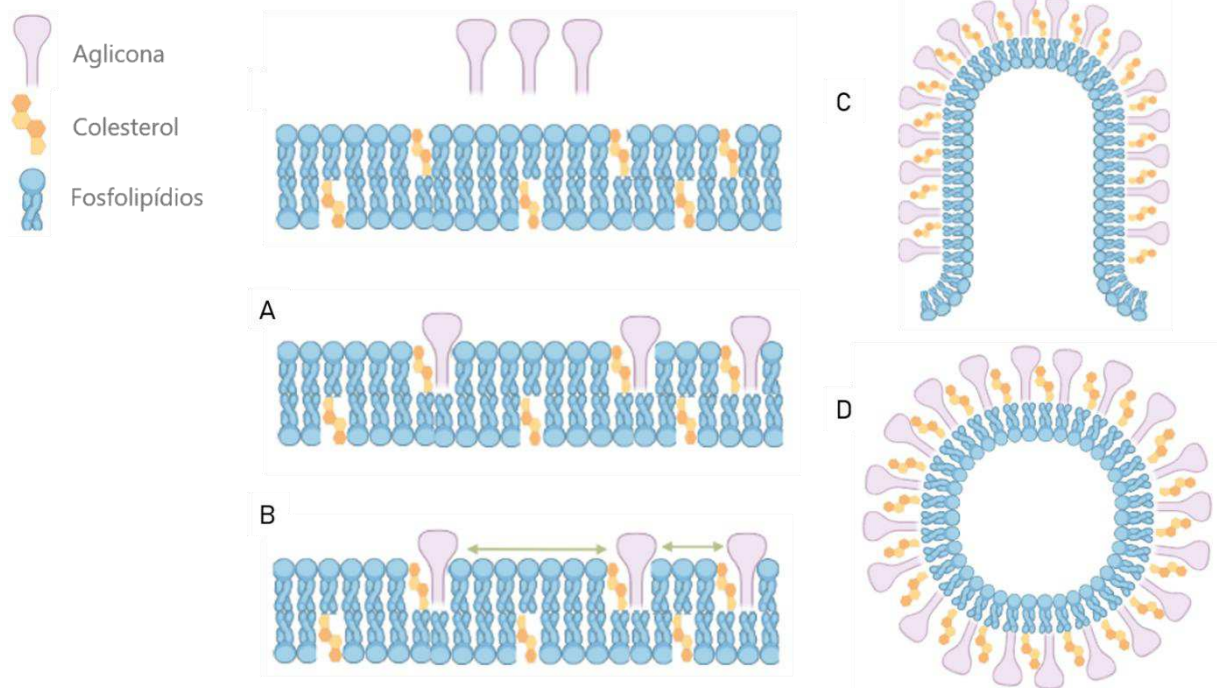
Alguns autores encontraram resultados significativos com relação a inibição da proliferação nas linhagens celulares AGS, HepG2, HT-29, MCF-7 (LEE *et al.*, 2004; FRIEDMAN *et al.*, 2009; ISHII *et al.*, 2011; SUCHA *et al.*, 2013), MOLT-4 (KÖDELOVÁ *et al.*, 2013), HL-60, K-562 (CHAO *et al.*, 2012; HUANG *et al.*, 2015a), Skov3 (WU *et al.*, 2021), LNCap, VCap e PC-3 (LEE *et al.*, 2013b; HUANG *et al.*, 2015b) e do crescimento tumoral (FRIEDMAN *et al.*, 2007; TOMSIK *et al.*, 2013; LEE *et al.*, 2013a)

Alguns autores também observaram que o composto foi capaz de suprimir a angiogênese, adesão, invasão e migração em células das linhagens HBL, hmel-1, M3, A549 e NCI-H460 (SHIH *et al.*, 2009; SHIEH *et al.*, 2011; SERRATÌ *et al.*, 2020).

Assim como alguns glicoalcalóides esteroidais, a α -tomatina forma complexos com o colesterol presente nas membranas celulares (SUCHA *et al.*, 2013), conferindo ao composto um efeito disruptivo das membranas (figura 10). O componente aglicona da α -tomatina liga-se, reversivelmente, ao colesterol presente na membrana (figura 10a). Em certo momento, os resíduos glicosídicos da molécula passam a interagir entre si por meio de interações eletrostáticas (figura 10b). Essas interações formam uma matriz irreversível de complexos entre os glicoalcalóides e o colesterol, o que resultará em um brotamento da membrana celular (figura 10c). Estruturas tubulares são formadas, causando uma ruptura da membrana (figura 10d), ocasionando morte celular (KEUKENS *et al.*, 1995; CÁRDENAS *et al.*, 2015).

Apesar da crescente descoberta dos modos de ação da α -tomatina e do seu intenso potencial como agente antineoplásico, mais pesquisas são necessárias para se compreender o seu funcionamento em diferentes linhagens celulares. Deste modo, o composto pode vir a ser proposto e utilizado para a composição de uma nova molécula com capacidade de auxiliar no combate ao desenvolvimento e progressão das neoplasias.

Figura 10 - Efeito disruptivo da membrana.



Fonte: Adaptado de Keukens *et al.*, 1995.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Estudar os efeitos do fitoquímico α -tomatina em cultura de células de adenocarcinoma de cólon (HT-29), envolvidas em diversos processos moleculares, principalmente no modelo de cultura em três dimensões (3D).

2.2 Objetivos específicos

- Analisar os efeitos citotóxicos da α -tomatina por meio do ensaio de citotoxicidade;
- Avaliar o efeito da α -tomatina no processo de migração celular utilizando o ensaio de fechamento de feridas;
- Averiguar os efeitos antiproliferativos da α -tomatina em diferentes tempos de tratamento por meio do ensaio de volume;
- Investigar as alterações induzidas pelo tratamento com α -tomatina no ciclo celular e apoptose por meio da técnica de citometria de fluxo;
- Estudar a influência da α -tomatina na formação de novas colônias celulares fazendo uso do ensaio clonogênico;
- Examinar o potencial genotóxico da α -tomatina empregando o ensaio de cometa;
- Compreender os efeitos da α -tomatina na expressão de mRNA de genes de controle de ciclo celular, apoptose, danos no DNA, estresse de retículo endoplasmático e estresse oxidativo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Linhagem celular, condições de cultura e agentes químicos

A linhagem celular de adenocarcinoma colorretal HT-29, livre de micoplasma, foi obtida no Banco de Células do Rio de Janeiro. As células foram cultivadas em meio de cultura McCoy's 5A modificado com L-glutamina (Sigma-Aldrich, Cat. Nº: M4892) suplementado com 1% de antibiótico e antimicótico (GIBCO, cod: 15240-062) e 10% de soro bovino fetal (GIBCO, cod:12657-029). As células foram mantidas em estufa úmida contendo 5% de CO₂. a 37 °C.

A α -tomatina (C₅₀H₈₃NO₂₁), foi adquirida na Sigma Aldrich® (Cat. Nº: PHL89905), PM = 1034.19, dissolvida em dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich, Cat. Nº: 472301). Para o controle positivo foi usado camptotecina (Sigma-Aldrich®, cat. Nº C9911) ou doxorrubicina 20 μ M (DXR, Doxolem, Zodiac). O controle de veículo foi preparado com 0,017% DMSO; este valor corresponde à concentração de DMSO presente na maior concentração de α -tomatina testada.

Para todos os experimentos, a viabilidade celular foi previamente verificada com azul de tripan 0,4% (Invitrogen, Cat. Nº T10282) em contador de células automatizado Countess II FL (Life Technologies), sendo aceita apenas viabilidade acima de 90%. Culturas com viabilidade menor foram descartadas.

3.2 Ensaio de citotoxicidade (resazurina)

O efeito citotóxico da α -tomatina nas células HT-29 foi avaliado por meio do corante resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona-10-óxido), que é reduzido em resofurina, uma molécula emissora de fluorescência, em resposta à atividade metabólica das células viáveis (O'BRIEN *et al.*, 2000). Para a realização deste ensaio, foram semeadas 5x10⁴ células/poço em uma placa de 48 poços e levadas à estufa por 24 horas para garantir o processo de estabilização. Após este período as células receberam os tratamentos com α -tomatina, DMSO e controle positivo doxorrubicina (20 μ M), que foram diluídos em meio McCoy's 5A com SBF. As concentrações utilizadas de α -tomatina foram definidas com base na literatura em 4 μ M, 8 μ M, 12 μ M, 16 μ M e 20 μ M (SUCHA *et al.*, 2013; WANG; DAI; LIU, 2017).

Após 24 horas de tratamento, a resazurina (60 μ M) previamente diluída em meio de cultura McCoy's 5A sem SBF, foi adicionada aos poços. Feita a adição do corante, a placa foi mantida na estufa de cultura durante 4 horas e em seguida foi realizada a leitura. A fluorescência foi medida em espectrofotômetro Glomax®, ajustado para 520 nm de excitação e 580-640 nm de emissão). A viabilidade celular foi estimada pela fórmula: viabilidade percentual = $[(A_{\text{tratamento}} - A_{\text{branco}}) / (A_{\text{controle}} - A_{\text{branco}}) \times 100]$, onde A representa o valor da fluorescência. A concentração citotóxica necessária para reduzir a viabilidade celular em 50% (IC₅₀) foi calculada no software GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software, San Diego, California, USA, www.graphpad.com). Para cada tratamento foi feita a leitura de 6 poços, com duas repetições experimentais.

3.3 Ensaio de fechamento de feridas (migração)

O ensaio de fechamento de feridas foi realizado seguindo o protocolo descrito por Justus *et al.* (2014). Em uma placa de cultura de 12 poços foram semeadas 5x10⁵ células/poço que foram cultivadas até atingirem 100% de confluência. Em um ambiente estéril foi realizado um risco na monocamada de células, utilizando uma ponteira de 20 μ L. O meio de cultura e os restos celulares foram retirados cuidadosamente e o poço foi lavado duas vezes com PBS. Por fim, em cada poço foram adicionados 2.000 μ L de meio de cultura contendo os tratamentos com DMSO ou α -tomatina (17,19 μ M). Nos tempos de 0h, 24h, 48h e 72h foram feitas capturas de imagens para verificar o fechamento da ferida por meio do microscópio EVOS® FL Auto Imaging System usando uma objetiva de 10x. A área e a largura da ferida foram obtidas a partir das imagens capturadas utilizando o software ImageJ® e o plugin Wound Healing Size Tool (SUAREZ-ARNEDO *et al.*, 2020).

3.4 Cultivo celular tridimensional (3D)

As culturas tridimensionais de esferoides foram realizadas com o preparo de uma superfície não aderente com agarose *Low Melting* 1,5% em meio McCoy's 5A sem SBF em placas de 96 poços de acordo com a metodologia descrita por Friedrich *et al.* (2009).

Após a solidificação da agarose, foram semeadas 5x10³ células em um volume de 150 μ L/poço de meio de cultura suplementado com SBF. Após esta etapa, a placa

foi submetida à centrifugação a 1000 rpm por 8 min, para que as células se concentrassem no fundo do poço, e acondicionada em estufa durante 6 dias, período necessário para que ocorra a esferoidização.

3.5 Ensaio de volume

Para realização deste ensaio, os esferoides receberam 50 µL de meio de cultura suplementado com SBF contendo os tratamentos com α -tomatina 17,19 µM, DMSO ou doxorubicina.

O volume de cada esferoide e a renderização dos gráficos 3D foram obtidos utilizando os *softwares* AnaSP e ReViSP (PICCININI, 2015; PICCININI *et al.*, 2015) e expressos em milímetros cúbicos (mm³) médios após captura de microfotografias obtidas pelo microscópio EVOSTM FL Auto Imaging System (ThermoFisher Scientific, EUA) utilizando a objetiva de 10x, após 24, 48 e 72 horas de tratamento. Foram analisados seis esferoides por tratamento e três repetições.

Além disso, os esferoides foram marcados com corantes fluorescentes Rhodamina123 e Hoechst33342, para observar a atividade mitocondrial e o conteúdo de DNA de células periféricas, respectivamente.

3.6 Ensaio de ciclo celular e apoptose por citometria de fluxo

Após as 72 horas de tratamento com α -tomatina 17,19µM e DMSO, foram selecionados 10 esferoides de cada tratamento para a realização dos ensaios. Os esferoides foram lavados com PBS e tripsinizados (tripsina 0,025%) para que houvesse a dissociação das células. O sobrenadante foi removido e as células foram ressuspensas em 200µL de PBS. Para ambos os ensaios, a intensidade de fluorescência de cada marcador foi quantificada por meio de um citômetro MilliporeSigma Muse® flow, analisando 5.000 eventos/amostra para ciclo celular e 2.000 eventos/amostra para apoptose. Para cada ensaio foram realizadas três repetições experimentais.

Para investigar se a α -tomatina induz morte celular por apoptose foi utilizado o kit PE Annexin Apoptosis Detection (BD Pharmigen, Cat. Nº: 559763). Avaliando-se o perfil de externalização de fosfatidilserina por meio da interação com anexina,

mostrando assim a porcentagem de células viáveis, em apoptose inicial, apoptose tardia e mortas.

Para analisar o conteúdo de DNA e inferir o perfil percentual relativo das fases do ciclo celular (G1, S e G2/M) as células foram permeabilizadas com 100µL de uma solução de citrato/triton (0,1% de citrato de sódio/0,1% de Triton X-100) e o DNA corado com 5µL de iodeto de propídio (50µg/ml).

3.7 Ensaio clonogênico

Para investigar se a α -tomatina interfere na capacidade de formar novas colônias na linhagem HT-29, foi utilizado o protocolo descrito por Franken *et al.* (2006). Para tanto, após 72 horas de tratamento com α -tomatina (17,19µM), DMSO ou doxorubicina foram coletados 5 esferoides de cada tratamento e realizadas 3 replicatas.

Os esferoides coletados foram lavados com PBS e tripsinizados (tripsina 0,025%) para que houvesse a dissociação das células. Semeou-se 500 células/poço em uma placa de 24 poços com meio de cultura sem tratamento. Após 14 dias, o total de colônias/tratamento foram incubadas com resazurina (60µM) por 3 horas e a intensidade de fluorescência foi quantificada em espectrofotômetro Glomax® (520 nm de excitação e 580 nm 2 de emissão). Posteriormente, as colônias foram fixadas em solução de metanol + ácido acético (3:1) por 5 minutos e coradas com cristal violeta (0,5%) por 15 minutos.

3.8 Ensaio de cometa

Para avaliar se a α -tomatina induz danos no DNA, utilizou-se o ensaio do cometa, de acordo com Collins *et al.* (2008). Para tal, após 24 horas de tratamento com α -tomatina (17,19µM), DMSO ou doxorubicina, 5 esferoides foram coletados de cada tratamento. O experimento foi realizado em triplicata.

Os esferoides coletados foram lavados com PBS e tripsinizados (tripsina 0,025%) para que houvesse a dissociação das células. Então 40µL da amostra foram ressuspensos em agarose *Low Melting* (0,85%) e distribuídos em lâminas pré-gelatinizadas com agarose comum (1,5%). Após a solidificação, as lâminas foram submetidas a um tratamento de lise química (2,25 M NaCl, 89 mM EDTA, 8,9 mM Tris-

HCL, 10% controle e 1% Triton X-17 100 em pH 10 ajustado com NaOH) por uma hora a 4 °C. Depois a um tratamento com solução alcalina (1 mM EDTA-Titriplex e 0,3 N NaOH) por 20 minutos. A eletroforese de lâminas foi realizada em tampão alcalino (pH>13), 25 V e 300 mA durante 20 minutos, seguida de neutralização 3x (Tris 0,4 N a pH 7,5) e por fim, fixação em álcool absoluto e armazenadas a 4 °C. Para análises, as lâminas foram coradas com brometo de etídio (2 µg/mL) e um total de 100 células/tratamento foram avaliadas. As fotomicrografias foram obtidas usando um microscópio EVOS® FL Auto Cell Imaging System (Thermo Fisher) com ampliação de 20X. Para cada imagem, a porcentagem de DNA na cauda dos cometas e o momento da cauda (comprimento da cauda vezes a porcentagem de DNA na cauda) de 100 cometas (MOZAFFARIEH *et al.*, 2008) foram avaliados usando o *software* CometeScore®.

3.9 Expressão gênica relativa (mRNA) em tempo real

O ensaio de expressão gênica em tempo real (RT-qPCR) foi utilizado para observar as alterações relativas na expressão de mRNA de genes relacionados às vias moleculares de morte celular (*BBC3*, *BIRC5*, *CASP3*, *CASP8*, *CASP9*, *PARP1* e *BCL2*), estresse oxidativo (*GPX1*), estresse de retículo (*ERN1*), danos ao DNA (*GADD45A* e *H2AFX*), regulação do ciclo celular (*CDKN1A*, *M-TOR*, *NF-KB*, *C-MYC* e *TP53*) e autofagia (*BECN1*) em esferoides de células HT-29 tratados com α -tomatina. *GAPDH* e *B-ACTIN* foram utilizados como genes de referência. Foram considerados 3 repetições experimentais.

Para isso, após 72 horas de tratamento com α -tomatina 17,19µM ou DMSO, 10 esferoides foram selecionados/experimento, estes foram lavados com PBS e tripsinizados para que houvesse a dissociação das células. Em seguida, foi realizada a extração do RNA total com o MiniKit RNeasy® (Qiagen), seguindo as recomendações do fabricante. A pureza e a quantificação de RNA total foram observadas em espectrofotômetro BioDrop µLite, baseada na razão das absorvâncias (A260/280nm) e apenas amostras com razão entre 1,9 e 2 foram validadas. A verificação da integridade do material foi realizada em gel de agarose 1,0%.

A síntese de cDNA foi realizada em um termociclador T100TM Thermal Cycler (BIO-RAD), sendo duas reações/tratamento/replicata, cada uma contendo 500ng de RNA total diluído em 12,4µL de água DEPC, 1µL de oligo dT (20 pm/mL, Invitrogen,

Cat. Nº: 18418012) e 2µL de dNTPs (10mM, Invitrogen, Cat. Nº: 10297018), sendo mantidas a 60°C por 15 minutos. Em seguida, 0,1µL de RNase OUT (Invitrogen, Cat. Nº: 10777019), 4µL de 5x *first-strand buffer* (Invitrogen, Cat. Nº: Y02321) e 0,5 µL de M-MLV-RT (Invitrogen, Cat. Nº: 28025-013) foram adicionados aos tubos de reação e as amostras mantidas a 37°C por 2 minutos, 50°C por 45 minutos e 70°C por 15 minutos.

A reação PCR em tempo real foi feita utilizando o termociclador CFX96™ Real-Time PCR Detection System (BIO-RAD) em configurações definidas. 95°C por 5 minutos e 35 ciclos de 95°C por 20 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos. Cada reação RT-qPCR teve 11 µL de volume final, contendo 5 µL de cDNA (1:10), 0,5 µL de cada iniciador (forward e reverse) e 5 µL de SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix 2x (BIO-RAD). A curva de *melting* foi analisada ao final da reação de 50°C a 90°C, a cada 0,5°C/20". Os dados de Ct foram analisados em $\Delta\Delta Ct$ (ARYA *et al.*, 2005).

3.10 Análises estatísticas

Os dados numéricos foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para verificação da normalidade. Dados paramétricos do ensaio de citotoxicidade foram submetidos à Análise de Variância (one-way ANOVA) e teste post-hoc Dunnett. Os dados paramétricos dos ensaios de apoptose, ciclo celular, foram submetidos ao teste t não pareado. Para o ensaio de volume, os dados foram submetidos à Análise de Variância (two-way ANOVA de medida repetidas) e teste post-hoc Tukey de múltiplas comparações. Os dados não paramétricos obtidos pelos ensaios de fechamento de feridas, cometa e clonogênico foram submetidos a teste T não pareado e o ensaio de cometa foi posteriormente submetido ao teste de Mann-Whitney.

Para as análises estatísticas foi utilizado o *software GraphPad Prism 9.0* (GraphPad Software, San Diego, California, USA, www.graphpad.com) e os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão, com nível de significância de 5%. Para a análise de expressão gênica relativa, foi utilizado o método Pairwise Fixed Reallocation Randomization Test inserido no programa Rest 2009 (PFAFFL; HORGAN; DEMPFLER, 2002) e consideradas como significativas as expressões com fold-change ≥ 2 e ≤ -2 .

4. RESULTADOS

4.1 Citotoxicidade

Após 24 horas de tratamento, foi possível constatar que os tratamentos com α -tomatina nas concentrações de 16 μ M e 20 μ M foram citotóxicos ($p \leq 0,05$). Com base nas concentrações testadas, determinou-se que a concentração de α -tomatina que inibe 50% da viabilidade celular (IC_{50}) é 17,19 μ M (Figura 11).

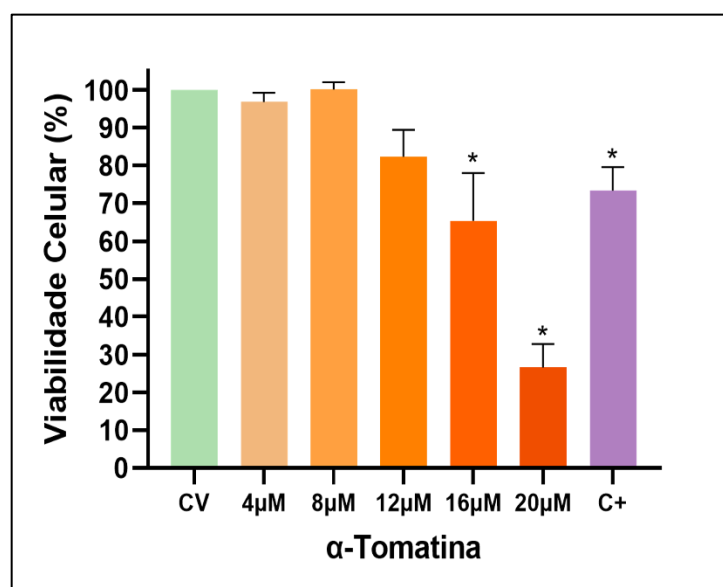


Figura 11 –Média percentual de viabilidade celular na linhagem tumoral HT-29. Ensaio de citotoxicidade realizado por 24 horas com α -tomatina (4, 8, 12, 16 e 20 μ M). DMSO foi utilizado como controle de veículo (CV) e doxorrubicina (20 μ M) foi utilizada como controle positivo (C+). (*) representa os valores com nível de significância inferior a 5% ($p \leq 0,05$) em relação ao controle, obtidos a partir de 3 replicatas pelo teste ANOVA seguido do teste de Dunnett. Valores expressos como média \pm desvio padrão.

4.2 Fechamento de feridas

Os resultados do ensaio de fechamento de feridas demonstraram que as células HT-29 tratadas com 17,19 μ M de α -tomatina (IC_{50}) tiveram sua migração inibida (Figura 12a). Observamos que a área da ferida (μ m²) inicial (0 hora) das células tratadas com α -tomatina (9099 \pm 453) não diferiu das células tratadas com DMSO (9251 \pm 509). No tempo seguinte (24 horas) a ferida das células que receberam o tratamento com α -tomatina (8935 \pm 393), permaneceu com a área estatisticamente igual a das células tratadas com DMSO (7609 \pm 776). No entanto, houve diferenças significativas ($p \leq 0,05$) nos tempos seguintes, onde a área da ferida das células do

grupo controle (7022 ± 405 e 5238 ± 247) diminuiu 19,01% e 33,49% em relação as células tratadas com α -tomatina (8671 ± 606 e 7876 ± 122) em 48 e 72 horas, respectivamente (Figura 12b).

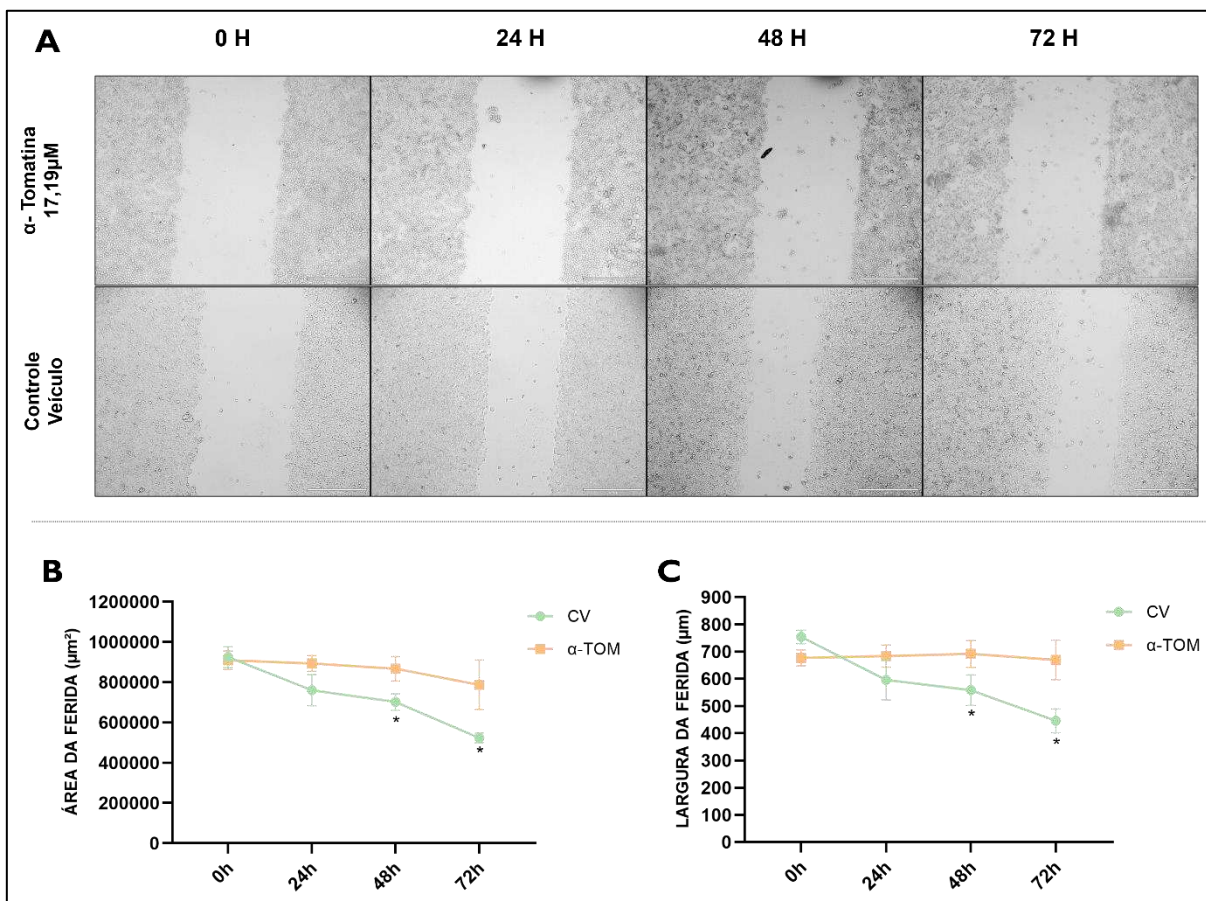


Figura 12 – Perfil de migração celular de células HT-29 avaliado por meio do ensaio de cicatrização de feridas. (A) Fotomicrografias das células HT-29 nos tempos de 0, 24, 48 e 72 horas tratadas com α -tomatina ($17,19\mu\text{M}$) durante o ensaio de cicatrização de feridas. DMSO foi utilizado como controle de veículo. Barras de escala $400\mu\text{m}$. **(B)** Área da ferida (μm^2) nas células HT-29 tratadas com $17,19\mu\text{M}$ de α -tomatina (α -TOM) nos tempos de 0, 24, 48 e 72 horas. DMSO foi utilizado como controle de veículo (CV). **(C)** Largura da ferida (μm) nas células HT-29 tratadas com $17,19\mu\text{M}$ de α -tomatina (α -TOM) nos tempos de 0, 24, 48 e 72 horas. DMSO foi utilizado como controle de veículo (CV). (*) representa os valores com nível de significância inferior a 5% ($p \leq 0,05$) em relação ao controle, obtidos a partir de 3 replicatas por teste T não pareado.

Com relação a largura da ferida (μm), esta não diferiu entre as células tratadas com α -tomatina ($677 \pm 29,3$ e $683 \pm 40,6$) e as células tratadas com DMSO ($753 \pm 24,2$ e $596 \pm 73,7$) nos tempos de 0 e 24 horas, respectivamente. Em contrapartida, nos tempos de 48 e 72 horas, a largura da ferida das células tratadas com DMSO ($558 \pm 56,2$ e $445 \pm 43,8$) diminuiu significativamente ($p \leq 0,05$) em 19,24% e 33,48% em comparação com as células tratadas com α -tomatina (691 ± 49 e $669 \pm 72,9$),

respectivamente (Figura 12c). Além disso, ambos os parâmetros área e largura da ferida não diferiram de tamanho nos tempos de 0, 24, 48 e 72 horas entre as células tratadas com α -tomatina.

4.3 Crescimento dos esferoides

A coloração utilizando o corante Rodamina 123 permite visualizar que a zona mais externa dos esferoides tratados com 17,19 μ M (IC₅₀) de α -tomatina não foi corada, representando uma camada de células mortas. Enquanto o corante Hoechst 33342 marcou mais forte os esferoides tratados com α -tomatina pela presença dos núcleos apoptóticos (picnóticos). Já os esferoides sem tratamento apresentaram coloração com rodamina em todas as zonas e com Hoechst mais difusa, principalmente na zona proliferativa (Figura 13a).

Os esferoides de células HT-29, observados nos tempos de 0, 24, 48 e 72 horas, tratados com α -tomatina, assim como os tratados com DMSO (controle de veículo) apresentaram aumento gradativo do seu volume, enquanto os esferoides tratados com doxorrubicina (controle positivo), apresentam diminuição do volume e perda de estrutura de zonas características da cultura 3D, como a zona proliferativa (Figura 13b).

Com relação ao volume dos esferoides (mm³) de cada grupo (tratados, controle de veículo e controle positivo) nos tempos de 24, 48 e 72 horas, em relação ao tempo 0 (Figura 14b), observamos que no grupo controle de veículo, os aumentos no volume foram de 23,88% (0,1919 \pm 0,0124), 39,25% (0,2157 \pm 0,0128) e 53,06% (0,2371 \pm 0,0050) ($p \leq 0,05$), nos tempos de 24, 48 e 72 horas, respectivamente, em relação ao tempo 0 (0,1549 \pm 0,0085). Esferoides tratados com α -tomatina mostraram aumentos ($p \leq 0,05$) no volume de 3,52% (0,1644 \pm 0,0089), 14,73% (0,1892 \pm 0,0115) e 35,57% (0,2153 \pm 0,0121), nos tempos de 24, 48 e 72 horas, respectivamente, em relação ao tempo 0 (0,1588 \pm 0,0042).

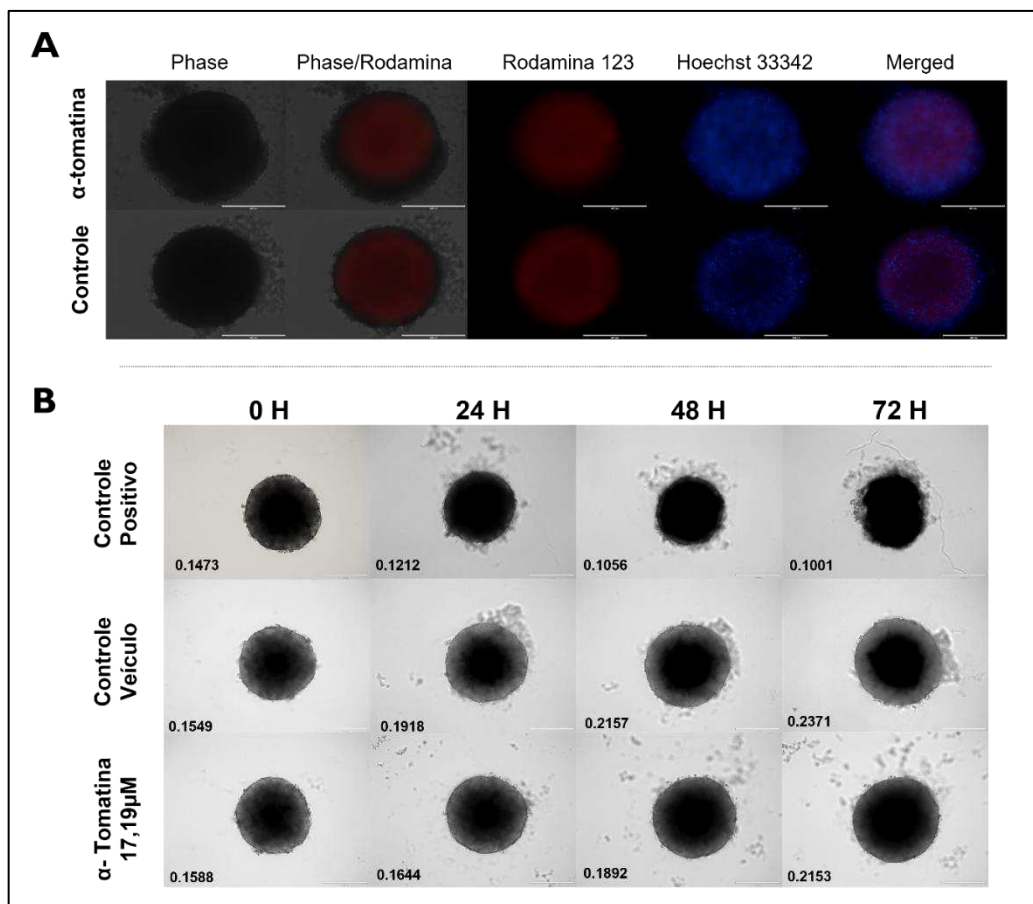


Figura 13 – Fotomicrografias dos esferoides de células HT-29. (A) Esferoides de células HT-29 tratados com DMSO (controle) e 17,19 μ M de α -tomatina por 72 horas e corados com Hoechst 33342 e Rodamina 123. **(B)** Média do volume dos esferoides tratados com α -tomatina (17,19 μ M) nos tempos de 0, 24, 48 e 72 horas. DMSO foi utilizado como controle de veículo e doxorrubicina (20 μ M) utilizada como controle positivo. Barras de escala 400 μ m.

Além de avaliar as mudanças no volume médio de esferoides pertencentes aos mesmos grupos, as diferenças entre os grupos (tratados com α -tomatina, controle de veículo e controle positivo) também foram analisadas (Figura 14a). Em relação ao tempo 0 hora, os grupos não apresentaram diferenças significativas. Em 24 horas, o volume médio dos esferoides tratados com α -tomatina foi igual ao tempo 0 hora, mostrando que houve um retardo no crescimento dos esferoides em relação ao controle. Em 48 horas, o volume médio dos esferoides tratados com α -tomatina foi igual ao volume médio dos esferoides controle de veículo às 24 horas, apresentando, novamente, um atraso no crescimento de 24 horas. Esse padrão também se repetiu no tempo de 72 horas, pois os esferoides tratados com α -tomatina apresentaram volume médio igual ao volume médio dos esferoides controle em 48 horas. Esses resultados indicam que a α -tomatina tem potencial antiproliferativo, retardando o crescimento dos esferoides em 24 horas.

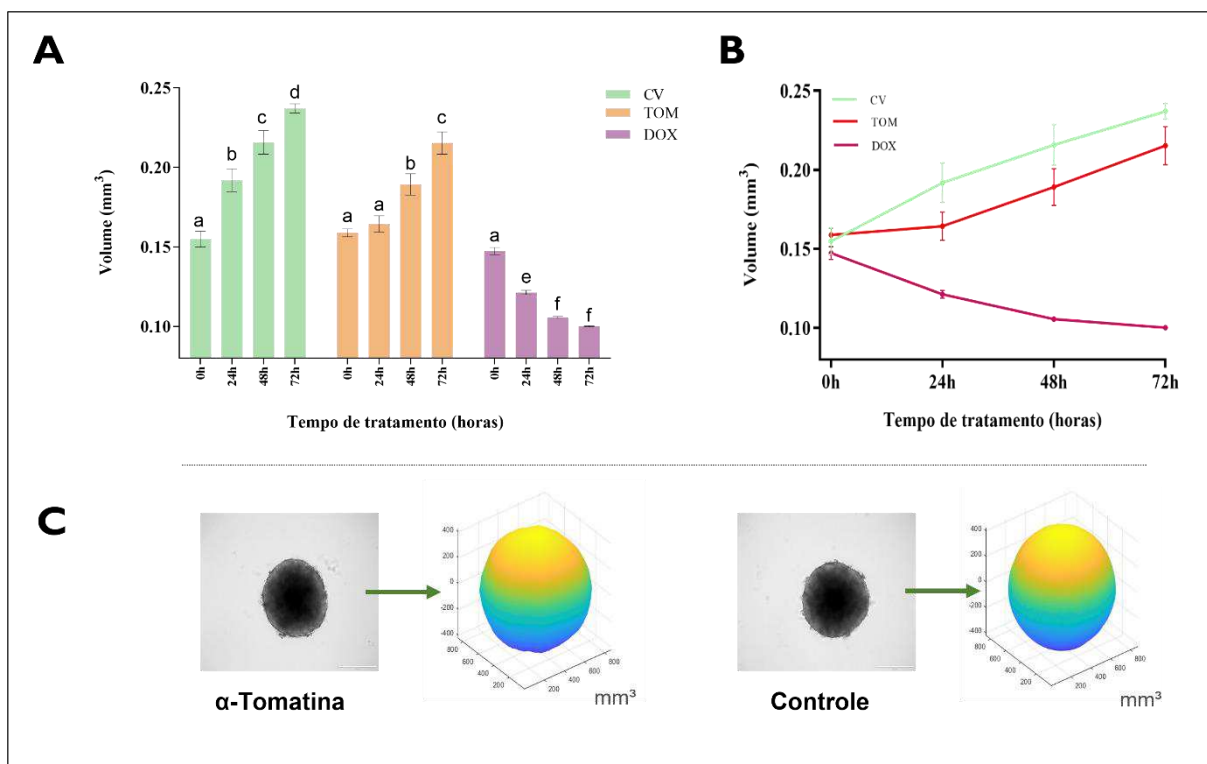


Figura 14 – Média do crescimento dos esferoides de células HT-29 tratados com 17,19 μ M de α -tomatina (TOM), DMSO (CV) ou doxorrubicina (DOX) nos tempos de 0, 24, 48 e 72 horas. (A) Aumento no volume médio dos esferoides. As letras (a, b, c, d, e e f) indicam médias estatisticamente iguais pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). (B) Curva de aumento no volume médio dos esferoides. Resultados obtidos pela análise de variância (2 way ANOVA) e teste de comparação múltipla post-hoc de Tukey a partir de 3 replicatas. (C) Renderização gráfica do volume dos esferoides após 72 horas de tratamento com α -tomatina e DMSO (controle) realizada utilizando o software ReViSP. Barra de escala 400 μ m.

4.4 Apoptose e alterações no ciclo celular

Os resultados da análise por citometria de fluxo (Figura 15a) mostram que a α -tomatina não induz apoptose após 24 horas de tratamento, visto que os esferoides tratados com o composto não apresentaram alterações significativas ($p \leq 0,05$) na porcentagem de células vivas ($67,13 \pm 7,06$) e apoptóticas ($29,03 \pm 7,33$) em relação ao grupo controle ($73,97 \pm 0,90$) e ($23,90 \pm 1,24$), respectivamente. No entanto, as células que receberam o tratamento com α -tomatina apresentaram mais morte celular ($3,86 \pm 0,55$) em comparação com o grupo controle ($2,06 \pm 0,55$) ($p \leq 0,05$).

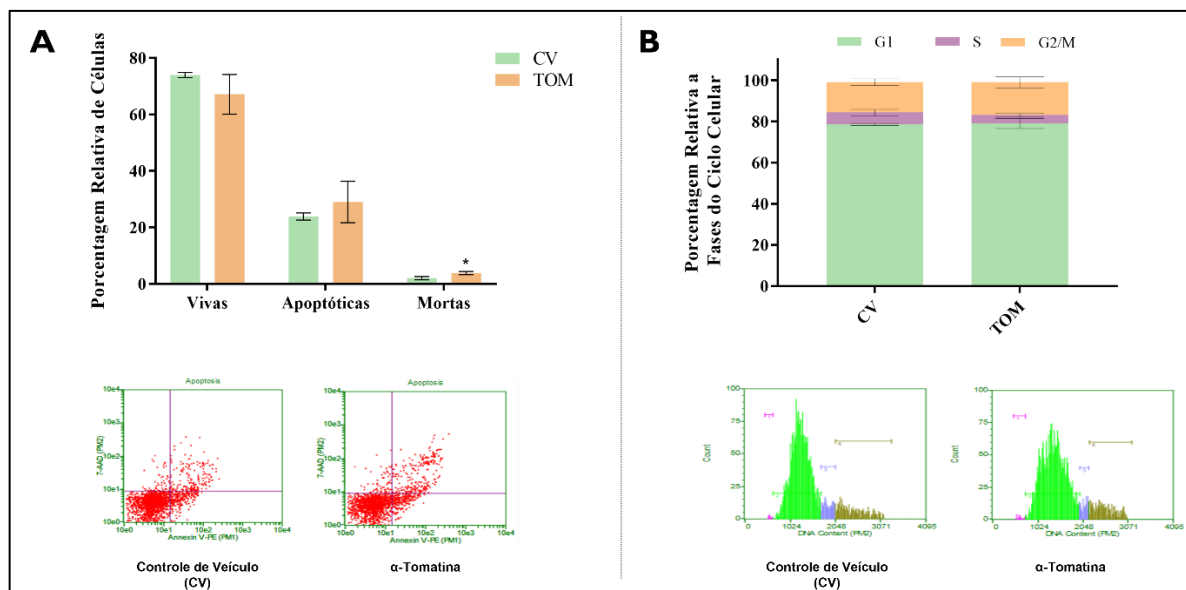


Figura 15 – Análises de morte celular por apoptose e ciclo celular em células HT-29 por meio de citometria de fluxo. (A) Média da porcentagem relativa de células vivas, apoptóticas e mortas após 24 horas de tratamento com 17,19 μ M de α -tomatina (TOM). DMSO foi utilizado como controle de veículo (CV). As células foram marcadas com Anexina V e 7-AAD e analisadas em citômetro de fluxo. (*) representa os valores com nível de significância inferior a 5% ($p \leq 0,05$) em relação ao controle. **(B)** Média da porcentagem de células em diferentes fases do ciclo celular (G1, S e G2/M) após 24 horas de tratamento com 17,19 μ M de α -tomatina (TOM). DMSO foi utilizado como controle de veículo (CV). O conteúdo de DNA foi analisado por meio da marcação com iodeto de propídio em citômetro de fluxo. Resultados obtidos por Teste T não pareado a partir de 3 replicatas.

Após 24 horas de tratamento com α -tomatina (17,19 μ M) não houve alteração significativa na porcentagem das células nas fases G1 [(79,03 \pm 2,40) $p \leq 0,05$], S [(4,10 \pm 1,01) $p \leq 0,05$] e G2 / M [(15,93 \pm 2,66) $p \leq 0,05$] em comparação com o grupo controle (78,53 \pm 0,49), (5,80 \pm 1,51) e (14,77 \pm 1,61), respectivamente (Figura 15b).

4.5 Formação de colônias e genotoxicidade

O tratamento com α -tomatina por 24 horas não demonstrou ser genotóxico na concentração de 17,19 μ M para os esferoides de células HT-29 (Figura 16a). Para o parâmetro momento de cauda (Figura 16a1), não foram observadas alterações significativas nos esferoides tratados com α -tomatina (0,08 \pm 0,012) em relação aos esferoides do grupo controle (0,12 \pm 0,003). Da mesma maneira, o parâmetro porcentagem de DNA na cauda (Figura 16a2) não apresentou alteração significativa, já que os esferoides tratados com α -tomatina (3,63 \pm 0,49) não diferiram dos esferoides controles (4,44 \pm 0,54).

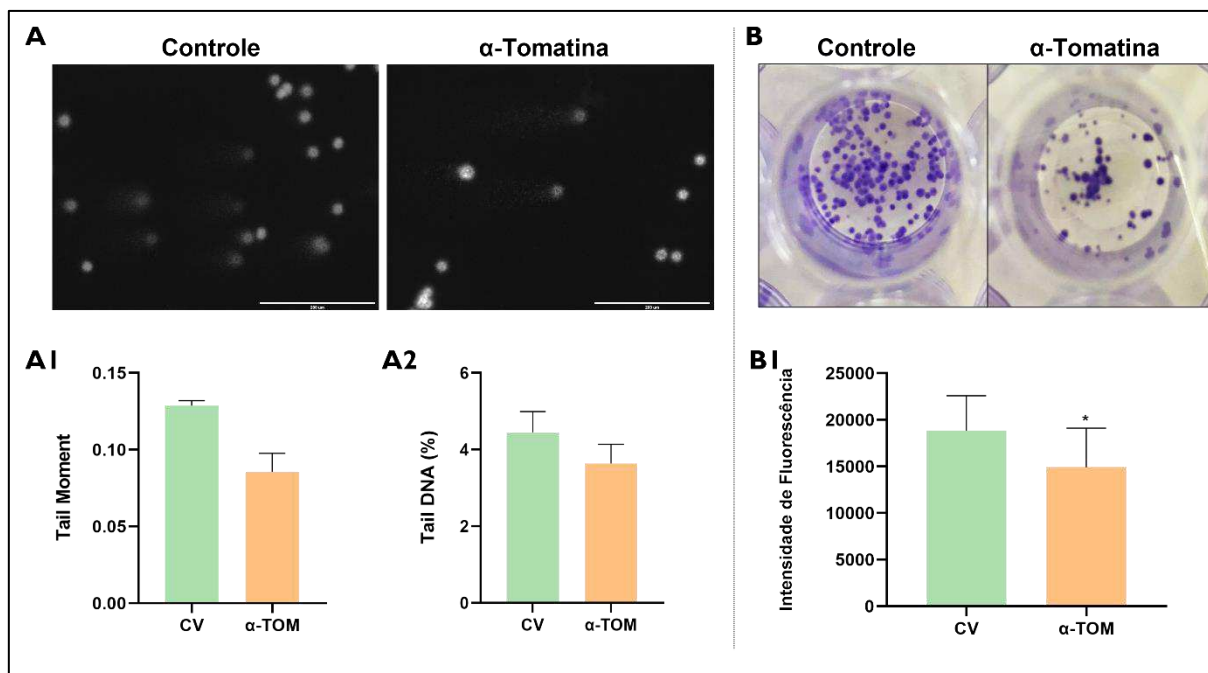


Figura 16 – Avaliação da atividade antitumoral da α -tomatina no desenvolvimento de colônias celulares e na genotoxicidade em células HT-29. (A) Ensaio de cometa realizado em células HT-29 tratadas com 17,19 μ M de α -tomatina por 24 horas. DMSO foi utilizado como controle de veículo (CV). Barra de escala 200 μ m. **(A1)** Gráfico referente ao parâmetro momento de cauda obtido por meio do ensaio de cometa. **(A2)** Porcentagem de DNA na cauda dos cometas. Resultados obtidos a partir de 3 replicatas por teste T não pareado seguido pelo teste de Mann-Whitney. **(B)** Ensaio clonogênico realizado em células HT-29 tratadas com α -tomatina 17,19 μ M por 72 horas. DMSO foi utilizado como controle de veículo (CV). **(B1)** Análise clonogênica das células HT-29 tratadas com α -tomatina. (*) representa os valores com nível de significância inferior a 0,05% ($p \leq 0,05$) em relação ao controle, obtidos a partir de triplicata pelo Teste T não pareado. Valores expressos como média \pm desvio padrão.

No ensaio de formação de colônias, observou-se que após 14 dias da remoção do tratamento, houve uma diminuição significativa ($p \leq 0,05$) no aparecimento de novas colônias (Figura 16b) em 20,80% em células tratadas com 17,19 μ M de α -tomatina por 72 horas (14935 \pm 3726), em comparação com o grupo controle (18858 \pm 4169) (Figura 16b1).

4.6 Expressão de mRNA

A análise realizada por meio de RT-qPCR indica que a α -tomatina após 72 h de tratamento (Figura 17) não aumentou significativamente a expressão de mRNA de nenhum dos genes testados. Em contrapartida, observou-se diminuição da expressão nos genes *CDKN1A* (7,81x), *C-MYC* (4,36x), *BBC3* (4,5x), *CASP8* (6,53x), *TP53* (2,28x), *BIRC5* (4,14x), *PARP1* (7,69x), *BECN1* (9,43x) e *H2AFX* (83,33x) após 72

horas de tratamento. Os genes *M-TOR*, *GPX1*, *ERN1*, *NF-KB*, *CASP-3* e *-9* e *GADD45A* não apresentaram alterações na expressão gênica.

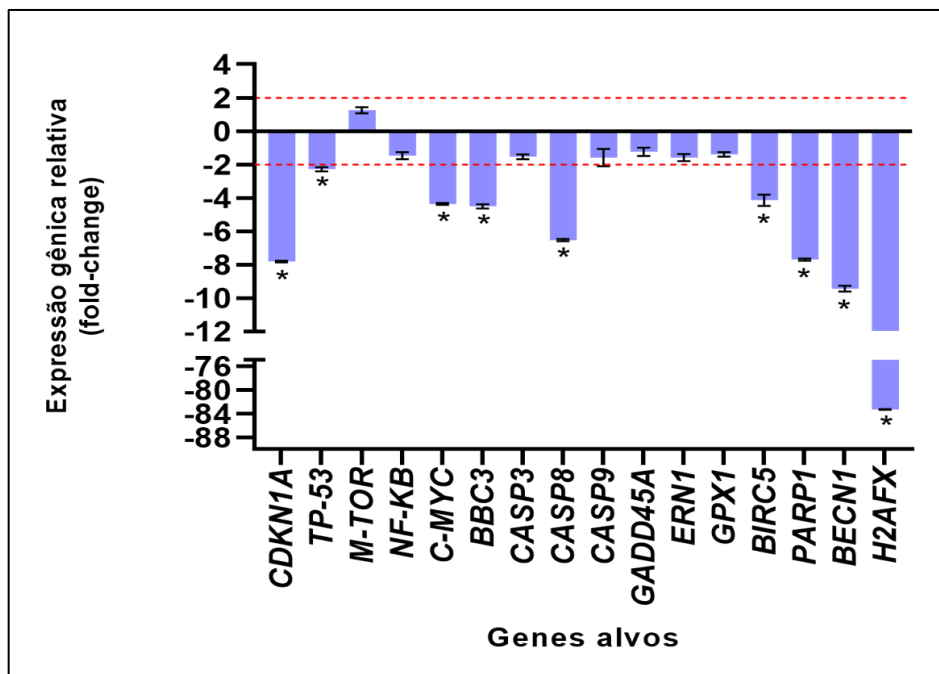


Figura 17 – Análise quantitativa por RT-PCR dos padrões de expressão gênica relativa em células HT-29 tratadas com α -tomatina. Após 72 horas de tratamento, a α -tomatina diminuiu a expressão de mRNA dos genes *CDKN1A* (7,81x), *C-MYC* (4,36x), *BBC3* (4,5x), *CASP8* (6,53x), *TP53* (2,28x), *BIRC5* (4,14x), *PARP1* (7,69x), *BECN1* (9,43x) e *H2AFX* (83,33x). (*) representa os valores com nível de significância inferior a 5% ($p \leq 0,05$) em relação ao controle, pelo Teste de Randomização de Realocação Fixa Pairwise e fold-change ≥ 2 e ≤ -2 .

5. DISCUSSÃO

Os glicoalcalóides são metabólitos secundários encontrados naturalmente em plantas da família Solanácea, como o tomateiro (*Solanum lycopersicum*) (VENTRELLA *et al.*, 2016). A α -tomatina, um dos glicoalcalóides encontrados nesta planta, oferece a ela proteção contra bactérias, fungos e vírus (RODDICK, 1974). Diante de suas propriedades, busca-se uma melhor compreensão sobre os seus mecanismos quimiopreventivos.

A α -tomatina interferiu na viabilidade celular ao induzir citotoxicidade em células da linhagem HT-29. No presente estudo, a droga foi responsável por induzir citotoxicidade dentro de 24 horas de tratamento. Os nossos resultados estão de acordo com Lee *et al.* (2011), Sucha *et al.* (2013) e Wu *et al.* (2021), que da mesma forma concluíram que a α -tomatina é citotóxica. No entanto, o nosso IC₅₀, concentração na qual a droga exerce metade de seu efeito inibitório máximo, foi avaliado em 17,19 μ M, concentração mais alta do que a relatada em estudos anteriores (LEE *et al.*, 2004; ISHII *et al.*, 2011) que variou de 1 a 10 μ M. Acreditamos que este aumento tenha ocorrido devido à utilização do modelo de cultura 3D com formação de esferoides, que mimetiza mais fielmente características presentes em organismos vivos.

Além disso, foi possível constatar que a α -tomatina retardou o crescimento dos esferoides de células HT-29. Em 24 horas, os esferoides controles apresentaram um aumento no volume médio de 23,88%, enquanto os esferoides que receberam o tratamento com α -tomatina apresentaram um aumento de apenas 3,52%. Nossos achados vão ao encontro com estudos realizados anteriormente (ISHII *et al.*, 2011; SUCHA *et al.*, 2013). No entanto, tais estudos observaram que nos tempos seguintes de análise (48 e 72 horas) ocorreu uma recuperação das células tratadas. Esses resultados não foram encontrados no presente trabalho, visto que o composto continuou a retardar o crescimento dos esferoides após 48 e 72 horas. Este resultado pode relacionar-se ao fato de que a concentração de α -tomatina utilizada no presente estudo foi maior do que nos citados (9 μ M e 10 μ M, respectivamente). Destacou-se também que Shih *et al.* (2009), Shieh *et al.* (2011) Chao *et al.* (2012), Kõdelová *et al.* (2013) Lee *et al.* (2013b) Yu *et al.* (2021) e Wu *et al.* (2021) também não observaram a recuperação de células de linhagens distintas a utilizada no presente estudo ao serem tratadas com α -tomatina.

Alguns pesquisadores buscaram compreender a atividade inibitória da α -tomatina em células da linhagem HT-29 por meio da contagem do número de células em câmara de Neubauer (ISHII *et al.*, 2011) ou por meio do ensaio de MTT (LEE *et al.*, 2004; FRIEDMAN *et al.*, 2009). Todos os autores encontraram resultados semelhantes aos obtidos no presente trabalho, indicando que o composto retarda o crescimento nesta linhagem celular. Em estudos realizados *in vivo* (LEE *et al.*, 2011; HUANG *et al.*, 2015; KIM; NAM; FRIEDMAN, 2015), em modelos murinos, além de constatarem a inibição do crescimento dos tumores estudados, os pesquisadores observaram que o composto não foi tóxico, visto que não causou diminuição do peso corporal dos animais estudados.

Conjuntamente, o ensaio de cicatrização de feridas, por arranhadura, nos permitiu observar alterações na migração e proliferação celular. Fazendo uso deste experimento, constatamos que a α -tomatina inibiu a capacidade de migração das células em comparação com o grupo controle. Além disso, a área e a largura da ferida das células tratadas com α -tomatina não diferiram entre si em nenhum tempo de tratamento, demonstrando que o composto inibiu a capacidade de migração celular desde o tempo 0 hora. Da mesma maneira, os resultados obtidos por meio do ensaio clonogênico, nos permitiram observar a capacidade da α -tomatina de inibir significativamente a formação de colônias nas células HT-29. Esses dados corroboram com os resultados observados até então, evidenciando que a α -tomatina atua como um agente antiproliferativo.

Nossos achados em monocamada e em esferoides (3D) se somam a outros achados, realizados utilizando o sistema 2D, contribuindo para a ideia da atividade antiproliferativa da α -tomatina em células de câncer colorretal. De acordo com os resultados obtidos podemos observar que a droga possui um perfil de retardador do crescimento, responsável por atrasar o aumento do volume médio dos esferoides em 24 horas e inibir a migração e formação de novas colônias celulares. Somado a essa avaliação, em 3D observamos uma ruptura no padrão de expressão de mRNA de alguns genes.

O gene *C-MYC* é um proto-oncogene expresso normalmente durante o desenvolvimento embrionário. No entanto, a amplificação desse gene desempenha um papel importante na progressão do ciclo celular (RYE *et al.*, 2016). *BIRC5*, um gene que codifica survivina, um potente inibidor de apoptose, também promove proliferação celular (XU *et al.*, 2021). A amplificação de *BIRC5*, assim como de *C-*

MYC, é frequentemente observada em vários cânceres humanos. Em nossos estudos, observamos que a α -tomatina foi responsável por inibir a expressão gênica de *C-MYC* e *BIRC5*, estes resultados estão relacionados aos dados apresentados anteriormente, onde evidenciamos o efeito antiproliferativo ocasionado pela α -tomatina.

No trabalho atual, observamos um alto nível de inibição do gene *H2AFX*, que codifica uma proteína histona da família H2A. Economopoulou *et al.* (2009) ao implantarem células de carcinoma de pulmão de Lewis em camundongos, observaram que a taxa de crescimento e peso do tumor, assim como a neovascularização, foram significativamente reduzidos em camundongos deficientes em *H2AFX*, sugerindo que a inibição do gene leva à angiogênese tumoral reduzida. Concomitantemente, Serrati *et al.* (2020), observaram uma redução substancial da neoangiogênese em diferentes linhagens de melanoma metastático (Hmel-1, M3, HBL) tratadas com α -tomatina. Ao relacionar esses resultados, podemos sugerir que a inibição de *H2AFX*, causada pelo tratamento com α -tomatina, inibe a formação de novos vasos sanguíneos, processo esse que facilita o crescimento dos tumores, indicando, mais uma vez, o efeito antiproliferativo da droga em questão.

O ciclo celular consiste em uma série ordenada de eventos que envolvem a divisão celular (RYE *et al.*, 2016). As células se dividem para possibilitar crescimento, substituir células mortas ou em situações patológicas. Para que as células avancem as fases do ciclo, elas passam por pontos de verificação (*checkpoints*). Os *checkpoints* são pontos de parada, onde ocorre análise da estrutura do material genético, caso um erro seja detectado, caso não seja passível de reparo, a célula provavelmente entrará em apoptose (NUSSBAUM; MCINNES; WILLARD, 2008; RYE *et al.*, 2016). O ensaio realizado por meio da citometria de fluxo permitiu avaliar a porcentagem relativa de células nas diferentes fases do ciclo celular (G1, S e G2 / M). Como se sabe, células tumorais apresentam como uma das suas características principais a desregulação do ciclo celular, podendo dar origem a uma divisão descontrolada e ao aumento da proliferação das células (INCA, 2021).

Em seus estudos, Shieh *et al.* (2011) relatam que o tratamento com 1,5 μ M de α -tomatina não teve efeito na distribuição do ciclo celular. No entanto, em concentrações mais altas o composto causou acúmulo de células na fase sub-G1. O mesmo foi observado por Lee *et al.* (2011) e Yang; Wu; Morrow (2004), que relatam o aparecimento da fase sub-G1 em células PC-3 e EL4, respectivamente; tratadas com α -tomatina. Isso indica que o composto pode causar mudanças na distribuição do ciclo

celular. Contudo, outros pesquisadores também observaram os efeitos da α -tomatina na distribuição do ciclo celular e não encontraram alterações significativas ocasionadas pelo composto (CHAO *et al.*, 2012; KŔDELOVÁ *et al.*, 2013; SUCHA *et al.*, 2013). Da mesma forma, demonstramos que a α -tomatina não induziu alterações significativas no ciclo celular de esferoides formados a partir de células HT-29.

O gene *TP53* age como um supressor tumoral, ele codifica uma proteína que responde ao estresse celular podendo induzir apoptose, senescência, reparo de DNA ou parada de ciclo. O gene *CDKN1A* também age como um supressor tumoral, sua expressão é controlada pela proteína p53, por meio da qual essa proteína induz parada da fase G1 do ciclo celular (NCBI, 2021). Em nossos estudos, observamos resultados que indicam que esses genes sofreram inibição. Diante das informações aqui apresentadas, podemos concluir que a alteração da expressão desses genes vai ao encontro com nossos achados por meio da citometria de fluxo.

A apoptose é um mecanismo de morte celular muito importante. A indução desta pode relacionar-se a ativação de proteases baseadas em cisteína denominadas caspases (THORNBERRY; LAZEBNIK, 1998). Dentre essas, a ativação das *caspase-3*, *-8* e *-9* são consideradas um mecanismo importante na indução dessa via (KIM; NAM; FRIEDMAN, 2015). Estudos realizados por Lee *et al.* (2011), Wang; Dai; Liu (2017) e Wu *et al.* (2021) demonstraram que a α -tomatina foi um eficaz indutor desses genes causando, conseqüentemente, morte celular por apoptose. No entanto, o presente trabalho não constatou alterações consideráveis nos níveis de expressão das *caspases -3* e *-9*, além de uma inibição significativa nos níveis de expressão da *caspase-8* (6,53x). Nossos dados vão ao acordo com estudos anteriores que não encontraram alterações na expressão das caspases (YANG; WU; MORROW, 2004; ISHII *et al.*, 2011; CHAO *et al.*, 2012; KŔDELOVÁ *et al.*, 2013; SUCHA *et al.*, 2013; KIM; NAM; FRIEDMAN, 2015; HUANG *et al.*, 2015a) em células tratadas com α -tomatina.

O fator de transcrição nuclear-KB (*NF-KB*) regula a transcrição de vários genes envolvidos na proliferação, adesão e sobrevivência celular. Portanto, desempenha um papel importante no desenvolvimento e progressão do câncer por meio de sua influência na apoptose (ROSS *et al.*, 2004). Alguns pesquisadores encontraram resultados que indicam que a α -tomatina induziu apoptose por meio da inibição de *NF-KB* (SHIH *et al.*, 2009; SHIEH *et al.*, 2011; LEE *et al.*, 2013b; HUANG *et al.*, 2015b; WANG; DAI; LIU, 2017; YU *et al.*, 2021). Todavia, em nosso trabalho os níveis de

expressão do gene em questão não apresentaram diferenças significativas entre o grupo tratado com α -tomatina e o grupo controle.

A autofagia é um processo em que o conteúdo citosólico é capturado por lisossomos para degradação, em resposta a várias condições de estresse (D'ARCY, 2019). No processo de ocorrência e desenvolvimento do tumor, a autofagia desempenha um papel duplo, podendo inibir a ocorrência do tumor, bem como promover seu desenvolvimento. Alguns estudos demonstraram que a autofagia, pode atuar como um mecanismo de autoproteção do tumor, promovendo a progressão tumoral e resistência à apoptose (KATAYAMA *et al.*, 2006; REBECCA; AMARAVADI, 2015). O gene *BECN1* desempenha um papel importante na indução de autofagia (LU *et al.*, 2019). WU *et al.* (2021) observaram que a α -tomatina reduziu os níveis de expressão do gene em questão, sugerindo que o composto induziu apoptose por meio da inibição da autofagia. No entanto, nossos estudos corroboram com a inibição da expressão gênica de *BECN1* (9,43x). Contudo, não observamos indução de morte celular por apoptose.

Outros genes relacionados a vias de morte celular estudados neste trabalho foram *PARP1* e *BBC3* os resultados obtidos pela PCR em tempo real indicam que o composto inibiu a expressão de *PARP1* em 7,69 vezes e *BBC3* em 4,5 vezes. Esses dados vão ao encontro dos resultados obtidos por meio do ensaio de citometria de fluxo, que demonstrou que a porcentagem de células vivas e em apoptose inicial ou tardia do grupo tratado com α -tomatina não diferiu do grupo controle. Esses resultados indicam que o composto não induziu apoptose. Assim como relatado por Ishii *et al.* (2011) e Sucha *et al.* (2013) em células HT-29 e MCF-7. Esses fatos sugerem que a diminuição da viabilidade e inibição da proliferação das células HT-29 pela α -tomatina não se deve à indução de apoptose. Assim, outros distintos meios de morte celular como, por exemplo, necrose, necroptose e ferroptose podem estar envolvidos no papel antiproliferativo da α -tomatina (Galluzi *et al.*, 2018).

Os pesquisadores Sucha *et al.* (2013), ao constatarem que a α -tomatina não causou apoptose em células da linhagem MCF-7, realizaram uma análise por microscopia eletrônica de transmissão de células tratadas com o fitoquímico. As células apresentavam inchaço e desintegração das membranas nuclear e plasmática, o que sugere uma necrose rápida. Mas, sem sinais morfológicos típicos de apoptose, como encolhimento celular e a formação de corpos apoptóticos. Enquanto a necroptose é um tipo de morte celular regulada que se assemelha a necrose em sua

morfologia, além disso, ambas apresentarem ruptura da membrana plasmática e extravasamento do conteúdo citoplasmático (D'ARCY, 2019).

A ferroptose é definida como uma forma de morte celular regulada dependente de ferro que ocorre por meio do acúmulo letal de EROs causado pelo desequilíbrio entre vias celulares geradoras e sequestradoras de radicais, levando ao estresse oxidativo que resulta em morte celular. Alguns estudos demonstraram que o microambiente rico em ferro, que com frequência caracteriza as malignidades, suporta a rápida proliferação, contribuindo assim para a carcinogênese (TOYOKUNI, 2009; TOYOKUNI *et al.*, 2017). Isso coloca os tumores sob estresse oxidativo constante, o que muitas vezes leva à dependência de genes e vias que o protegem da morte ferroptótica, proporcionando vantagem de crescimento e contribuindo para a quimiorresistência. No entanto, os eventos moleculares específicos que ocorrem na morte celular ferroptótica não são claros. Há necessidade de identificar marcadores moleculares que classifiquem as células submetidas a esse processo antes da morte, assim como a ativação de caspase para apoptose. Até então, a confirmação experimental do processo ferroptótico depende principalmente da observação do aumento de EROs (HIRSCHHORN; STOCKWELL, 2019).

Por meio do ensaio do cometa, observamos que a α -tomatina não induziu danos ao DNA. Nossos achados corroboram com os encontrados por Kõdelová *et al.* (2013) e Sucha *et al.* (2013), que não detectaram quantidades significativas de quebras de fitas de DNA simples ou dupla em células tratadas com α -tomatina. A expressão de genes da família *GADD45A* é estimulada por uma série de eventos genotóxicos (PINTO, 2015). Na ocorrência de danos ao DNA o gene *GADD45A* pode atuar na parada do ciclo celular nas fases G1 ou G2/M, de forma a permitir o reparo do dano, ou encaminhar a célula para apoptose (ZHANG *et al.*, 2010). No presente trabalho, não observamos alterações significativas nos níveis de expressão do gene *GADD45A*. Dessa forma, supomos que a manutenção dos níveis normais da expressão de *GADD45A*, após o tratamento com α -tomatina, está relacionada à ausência de danos no DNA, bem como à ausência de alterações no ciclo celular e apoptose.

Os glicoalcalóides esteroidais formam complexos com 3β -hidroxi esteróis livres, como o colesterol, presente nas membranas mitocondriais externas das células eucarióticas (SUCHA *et al.*, 2013). Keukens *et al.* (1995) demonstraram que a α -

tomatina, assim como outros glicoalcalóides, interage com o colesterol. Essa interação pode gerar um rompimento das membranas celulares, suprimindo o transporte ativo de sódio e possivelmente de outros íons (BLANKEMEYER *et al.*, 1997). Sugerimos que o efeito quimioterápico da α -tomatina pode ser o resultado de vários eventos moleculares, incluindo a formação de complexos com o colesterol e a destruição direta de células tumorais por meio do efeito disruptivo nas membranas celulares (FRIEDMAN *et al.*, 2000; FRIEDMAN *et al.*, 2007; FRIEDMAN *et al.*, 2009).

Huang *et al.* (2015a) sugere que a formação de complexos de α -tomatina e colesterol modulam a capacidade de resposta dos receptores da membrana celular aos estímulos de crescimento e, assim, diminuem o crescimento das células. Ishii *et al.* (2011) propõe que o rompimento das membranas celulares pode provocar a alteração da expressão de mRNA de variados genes e levar a diminuição do número de células viáveis. Além disso, desintegração da membrana por vários outros agentes mostrou induzir necrose (DONG *et al.*, 1997; DO *et al.*, 2003).

Em estudos realizados anteriormente, foi demonstrado que a remoção de uma, duas ou três moléculas de açúcar da α -tomatina resulta em uma diminuição da sua atividade antitumoral (LEE *et al.*, 2004; FRIEDMAN *et al.*, 2009; HUANG *et al.*, 2015a). A sua aglicona, tomatidina, teve pouco efeito na inibição do crescimento e na apoptose, além de não induzir rupturas na membrana celular de fungos e leveduras. Esses achados indicam que o componente glicona é importante para mediar os efeitos quimiopreventivos da α -tomatina em células tumorais.

Ao averiguar todos os resultados apresentados no presente trabalho, podemos sugerir que as discrepâncias com a literatura podem ser esclarecidas pela utilização de diferentes metodologias e linhagens celulares. Assim sugere-se que células de diferentes tecidos e órgãos não respondem do mesmo modo aos tratamentos recebidos, inclusive com a α -tomatina, e que alguns tipos de câncer podem ser mais resistentes do que outros.

6. BIBLIOGRAFIA

AGGARWAL, Bharat *et al.* Potential of Spice-Derived Phytochemicals for Cancer Prevention. **Planta Medica**, v. 74, n. 13, p. 1560-1569, 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.1055/s-2008-1074578>

ALMEIDA, Vera Lúcia de *et al.* CÂNCER E AGENTES ANTINEOPLÁSICOS CICLO-CELULAR ESPECÍFICOS E CICLO-CELULAR NÃO ESPECÍFICOS QUE INTERAGEM COM O DNA: UMA INTRODUÇÃO. **Química Nova**, Belo Horizonte, v. 28, p. 118-129, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422005000100021>

ANDRADE, E.L. *et al.*, Non-clinical studies required for new drug development - Part I: early *in silico* and *in vitro* studies, new target discovery and validation, proof of principles and robustness of animal studies. **Brazilian Journal Of Medical And Biological Research**, v. 49, n. 11, 2016. FapUNIFESP (SciELO). DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1414-431x20165644>.

ARNOLD, Melina *et al.* Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. **Gut**, v. 66, n. 4, p. 683-691, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1136/gutjnl-2015-310912>.

ARYA, Manit *et al.* Basic principles of real-time quantitative PCR. **Expert review of34 molecular diagnostics**, v. 5, n. 2, p. 209-219, 2005. DOI: 10.1586/14737159.5.2.209

BAJAJ, Jeevisha; DIAZ, Emily; REYA, Tannishtha. Stem cells in cancer initiation and progression. **Journal of Cell Biology**, v. 219, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.201911053>.

BALUNAS, Marcy J.; KINGHORN, A. Douglas. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v. 78, n. 5, p. 431-441, 2005. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2005.09.012>.

BHOWMIK, Debjit *et al.* Tomato - A Natural Medicine and Its Health Benefits. **Journal of Pharmacognosy And Phytochemistry**. p. 24-36. 2012.

BLANKEMEYER, J. *et al.* Effect of α -tomatine and tomatidine on membrane potential of frog embryos and active transport of ions in frog skin. **Food And Chemical Toxicology**, v. 35, n. 7, p. 639-646, 1997. Elsevier BV. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/s0278-6915\(97\)00038-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0278-6915(97)00038-0).

BLUM, Arnon *et al.* The beneficial effects of tomatoes. **European Journal of Internal Medicine**, v. 16, n. 6, p. 402-404, 2005. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejim.2005.02.017>.

BRENNER, Hermann *et al.* Risk of progression of advanced adenomas to colorectal cancer by age and sex: estimates based on 840,149 screening colonoscopies. **Gut**, v.56, 2007. DOI: [doi:10.1136/gut.2007.122739](https://doi.org/10.1136/gut.2007.122739) PMID:17591622

CAGAN, Ross; MEYER, Pablo. Rethinking cancer: current challenges and opportunities in cancer research. **Disease Models & Mechanisms**, v. 10, n. 4, p. 349-352, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1242/dmm.030007>.

Câncer. **OPAS** – Organização Pan-Americana da Saúde, 2020. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/topicos/cancer>. Acesso em: 6 ago. de 2021.

CESARZ, Zoe; TAMAMA, Kenichi. Spheroid Culture of Mesenchymal Stem Cells. **Stem Cells International**, v. 2016, p. 1-11, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2016/9176357>.

CÁRDENAS, P.D. *et al.* The bitter side of the nightshades: genomics drives discovery in solanaceae steroidal alkaloid metabolism. **Phytochemistry**, v. 113, p. 24-32, 2015. Elsevier BV. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.12.010>.

CHAICHAROENAUDOMRUNG, Nipha; KUNHORM, Phongsakorn; NOISA, Parinya. Three-dimensional cell culture systems as an *in vitro* platform for cancer and stem cell modeling. **World Journal of Stem Cells**, v. 11, n. 12, p. 1065-1083, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.4252/wjsc.v11.i12.1065>.

CHAO, Min-Wu *et al.* α -Tomatine-Mediated Anti-Cancer Activity *In Vitro* and *In Vivo* through Cell Cycle- and Caspase-Independent Pathways. **Plos One**, v. 7, n. 9, 2012. Public Library of Science (PLoS). DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0044093>.

CHOUDHARI, Amit S. *et al.* Phytochemicals in Cancer Treatment: from preclinical studies to clinical practice. **Frontiers in Pharmacology**, v. 101, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2019.01614>.

COLLINS, Andrew R. *et al.* The comet assay: topical issues. **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 143-151, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1093/mutage/gem051>

COLLINS, Andrew R. The comet assay for DNA damage and repair. **Molecular biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 249-261, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1385/MB:26:3:249>

D'ARCY, Mark. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. **Cell Biology International**, v. 43, n. 6, p. 582-592, 2019. Wiley. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/cbin.11137>.

Cooper GM. **The Cell: A Molecular Approach**. 2. ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2000.

DINIZ, Breno Satler de Oliveira; LACERDA-FILHO, Antônio. Prevenção secundária do câncer colorretal em indivíduos assintomáticos de baixo risco. **Revista Médica de Minas Gerais**, Belo Horizonte, v. 14, 2003.

DO, Tamara N *et al.* Preferential induction of necrosis in human breast cancer cells by a p53 peptide derived from the MDM2 binding site. **Oncogene**, v. 22, n. 10, p. 1431-1444, 2003. Springer Science and Business Media LLC. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1206258>.

DONG Z. *et al.* Internucleosomal DNA cleavage triggered by plasma membrane damage during necrotic cell death. Involvement of serine but not cysteine proteases. **The American Journal Of Pathology**, v. 151, n. 5, p. 1205-1213, 1997.

ECONOMOPOULOU, Matina *et al.* Histone H2AX is integral to hypoxia-driven neovascularization. **Nature Medicine**, v. 15, n. 5, p. 553-558, 2009. Springer Science and Business Media LLC. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/nm.1947>.

FANG, Jiansong *et al.* Quantitative and Systems Pharmacology. 1. *In Silico* Prediction of Drug–Target Interactions of Natural Products Enables New Targeted Cancer Therapy. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 57, n. 11, p. 2657-2671, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jcim.7b00216>.

FERLAY J. *et al.* Global Cancer Observatory: Cancer Today. **Lyon**: International Agency for Research on Cancer; 2020. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today>. Acesso em: 20 de out. de 2021.

FOLKMAN, Judah. Angiogenesis. **Developments in Cardiovascular Medicine**, p. 412-428, 1984. DOI: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4613-2825-4_42.

FOUAD, Yousef; AANEI Carmen. Revisiting the hallmarks of cancer. **American Journal of Cancer Research**, n. 7, v. 5, p. 1016-1036, 2017.

FRANKEN, Nicolaas AP *et al.* Clonogenic assay of cells *in vitro*. Nature protocols, v. 1, n. 5, p. 2315-2319, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.339>

FRIEDMAN, Mendel *et al.* 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, n. 12, p. 1485-1491, 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/mnfr.200700176>.

FRIEDMAN, Mendel *et al.* Tomatine-Containing Green Tomato Extracts Inhibit Growth of Human Breast, Colon, Liver, and Stomach Cancer Cells. **Journal of Agricultural**

and Food Chemistry, v. 57, n. 13, p. 5727-5733, 2009. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/jf900364j>.

FRIEDMAN, Mendel. Tomato Glycoalkaloids: role in the plant and in the diet. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 21, p. 5751-5780, 2002. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/jf020560c>.

FRIEDMAN, Mendel *et al.* Lowering of plasma LDL cholesterol in hamsters by the tomato glycoalkaloid tomatine. **Food and Chemical Toxicology**, v. 38, n. 7, p. 549-553, 2000. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/s0278-6915\(00\)00050-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0278-6915(00)00050-8).

FRIEDRICH, Juergen *et al.* Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. **Nature protocols**, v. 4, n. 3, p. 309, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.226>

GALLUZZI, L. *et al.* Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. **Cell Death Differ**, v. 25, p. 486–541, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>

GRADA A. *et al.* Research Techniques Made Simple: Analysis of Collective Cell Migration Using the Wound Healing Assay. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 137, p. 6-11, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jid.2016.11.020>

HANAHAH, Douglas; WEINBERG, Robert. Hallmarks of Cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.

HANAHAH, Douglas; WEINBERG, Robert. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81683-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81683-9).

HIRSCHHAEUSER, Franziska *et al.* Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again. **Journal of Biotechnology**, v. 148, p. 3-15, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.01.012>.

HIRSCHHORN, Tal; STOCKWELL, Brent R. The development of the concept of ferroptosis. **Free Radical Biology And Medicine**, v. 133, p. 130-143, 2019. Elsevier BV. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.09.043>.

HUANG, Huarong *et al.* Combination of α -Tomatine and Curcumin Inhibits Growth and Induces Apoptosis in Human Prostate Cancer Cells. **Plos One**, v. 10, n. 12, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0144293>. B

HUANG, Huarong *et al.* α -tomatine inhibits growth and induces apoptosis in HL-60 human myeloid leukemia cells. **Molecular Medicine Reports**, v. 11, n. 6, p. 4573-4578, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.3892/mmr.2015.3238>. A

HUSSAIN, Munawar *et al.* Phytochemicals: key to effective anticancer drugs.: **Mini-reviews in Organic Chemistry**, v. 16, n. 2, p. 141-158, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.2174/1570193x15666180626113026>.

IARC (2018). Cancer today. **GLOBOCAN**. Disponível em: <https://publications.iarc.fr/Databases/larc-Cancerbases/Cancer-Today-Powered-By-GLOBOCAN-2018--2018>. Acesso em: 6 ago. de 2021.

IARC (2019). Colorectal cancer screening. Handbooks of Cancer Prevention. **American Cancer Society**, v. 17, p. 1-300. Disponível em: <https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/larc-Handbooks-Of-Cancer-Prevention/Colorectal-Cancer-Screening-2019>.

INCA - INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **A situação do câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2006.

INCA - INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2020**. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2020. A

INCA - INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **O que é câncer?** Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2020. B

INCA - INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Neoplasia maligna de cólon e reto (taxas ajustadas)**. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2021.

ISHII, Priscila Lumi *et al.* Evaluation of *Agaricus blazei in vivo* for antigenotoxic, anticarcinogenic, phagocytic and immunomodulatory activities. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 59, n. 3, p. 412-422, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yrtph.2011.01.004>.

JEMAL A *et al.* The Cancer Atlas. **American Cancer Society**, v 3, 2019. Disponível em: www.cancer.org/canceratlas.

JUSTUS, Calvin R *et al.* *In vitro* cell migration and invasion assays. **Journal of Visualized Experiments: JoVE**, v. 88, 2014. DOI: 10.3791/51046

KATAYAMA, M *et al.* DNA damaging agent-induced autophagy produces a cytoprotective adenosine triphosphate surge in malignant glioma cells. **Cell Death & Differentiation**, v. 14, n. 3, p. 548-558, 2006. Springer Science and Business Media LLC. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.cdd.4402030>.

KEUKENS, Erik *et al.* Molecular basis of glycoalkaloid induced membrane disruption. **Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Biomembranes**, v. 1240, n. 2, p. 216-228, 1995. Elsevier BV. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0005-2736\(95\)00186-7](http://dx.doi.org/10.1016/0005-2736(95)00186-7).

KIM, Sung Phil; NAM, Seok Hyun; FRIEDMAN, Mendel. The Tomato Glycoalkaloid α -Tomatine Induces Caspase-Independent Cell Death in Mouse Colon Cancer CT-26 Cells and Transplanted Tumors in Mice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 4, p. 1142-1150, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/jf5040288>.

KÖDELOVÁ, Jana *et al.* Alpha-tomatine activates cell cycle checkpoints in the absence of DNA damage in human leukemic MOLT-4 cells. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 11, n. 2, p. 93-103, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.2478/v10136-012-0033-8>.

KUMAR, Manish *et al.* Phytoconstituents as apoptosis inducing agents: strategy to combat cancer. **Cytotechnology**, v. 68, n. 4, p. 531-563, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10616-015-9897-2>.

LANGHANS, Sigrid A. Three-Dimensional *in Vitro* Cell Culture Models in Drug Discovery and Drug Repositioning. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2018.00006>.

LEE, Kap-Rang *et al.* Glycoalkaloids and Metabolites Inhibit the Growth of Human Colon (HT29) and Liver (HepG2) Cancer Cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 10, p. 2832-2839, 2004. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/jf030526d>.

LEE, Sui-Ting *et al.* Alpha-Tomatine Attenuation of *In Vivo* Growth of Subcutaneous and Orthotopic Xenograft Tumors of Human Prostate Carcinoma PC-3 Cells Is Accompanied by Inactivation of Nuclear Factor-Kappa B Signaling. **Plos One**, v. 8, n. 2, 2013b. DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0057708>.

LEE, Sui-Ting *et al.* Alpha-Tomatine Induces Apoptosis and Inhibits Nuclear Factor-Kappa B Activation on Human Prostatic Adenocarcinoma PC-3 Cells. **Plos One**, v. 6, n. 4, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0018915>.

LEE, Sui-Ting *et al.* Alpha-tomatine synergizes with paclitaxel to enhance apoptosis of androgen-independent human prostate cancer PC-3 cells *in vitro* and *in vivo*. **Phytomedicine**, v. 20, n. 14, p. 1297-1305, 2013a. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2013.07.002>.

LIANG, Peter S.; CHEN, Ting-Yi; GIOVANNUCCI, Edward. Cigarette smoking and colorectal cancer incidence and mortality: systematic review and meta-analysis. **International Journal of Cancer**, v. 124, n. 10, p. 2406-2415, 2009. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.24191>.

LU, Guang *et al.* Suppression of autophagy during mitosis via CUL4-RING ubiquitin ligases-mediated WIPI2 polyubiquitination and proteasomal degradation. **Autophagy**, v. 15, n. 11, p. 1917-1934, 2019. DOI: 10.1080/15548627.2019.1596484

LUCKERT, Claudia *et al.* Comparative analysis of 3D culture methods on human HepG2 cells. **Archives of Toxicology**, v. 91, n. 1, p. 393-406, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00204-016-1677-z>.

MARKOWITZ, Sanford D.; BERTAGNOLLI, Monica M. Molecular Basis of Colorectal Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 361, n. 25, p. 2449-2460, 2009. DOI: <http://dx.doi.org/10.1056/nejmra0804588>.

MITTLER, Frédérique *et al.* High-Content Monitoring of Drug Effects in a 3D Spheroid Model. **Frontiers in Oncology**, v. 7, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fonc.2017.00293>.

MOOSAVI, Mohammad Amin *et al.* Phytochemicals as potent modulators of autophagy for cancer therapy. **Cancer Letters**, v. 424, p. 46-69, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2018.02.030>.

MORRIS, Jessica *et al.* Physical activity, sedentary behavior and colorectal cancer risk in the UK Biobank. **British Journal of Cancer**, v. 118, n. 6, p. 920-929, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2017.496>.

MORROW, W.J.W.; YANG, Y.-W.; SHEIKH, N.A. Immunobiology of the Tomatine adjuvant. **Vaccine**, v. 22, n. 19, p. 2380-2384, 2004. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.03.022>.

MOZAFFARIEH, Maneli. *et al.* Comet assay analysis of single-stranded DNA breaks in circulating leukocytes of glaucoma patients. **Molecular Vision: Biology and Genetics in Vision Research**, v. 14, p. 1584-1588, 2008.

NASCIMENTO, Simony Lira do *et al.* Complicações e condutas fisioterapêuticas após cirurgia por câncer de mama: estudo retrospectivo. **Fisioterapia e Pesquisa**, v. 19, n. 3, p. 248-255, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/s1809-29502012000300010>.

National Center for Biotechnology Information. PubChem Gene Summary for Gene 7157, *TP53* - tumor protein *p53* (human). <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/gene/TP53/human>. Accessed Dec. 3, 2021.

NELSON, R. Scott; THORSON, Alan G. Colorectal cancer screening. **Current Oncology Reports**, v. 11, n. 6, p. 482-489, 2009. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11912-009-0065-8>.

NGUENANG, Gaëlle S.; NTYAM, Arsène S. M.; KUETE, Victor. Acute and Subacute Toxicity Profiles of the Methanol Extract of *Lycopersicon esculentum* L. Leaves (Tomato), a Botanical with Promising *In Vitro* Anticancer Potential. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2020, p. 1-10, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2020/8935897>.

NUNES, Ana *et al.* 3D tumor spheroids as *in vitro* models to mimic *in vivo* human solid tumors resistance to therapeutic drugs. **Biotechnology And Bioengineering**, v. 116, n. 1, p. 206-226, 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.26845>.

NUSSBAUM, Robert L; MCINNES, Roderick R; WILLARD, Huntington. **Genética Médica**: thompson & thompson. 7. ed. N: Elsevier, 2008. 640 p.

O'BRIEN, John; WILSON, Ian; ORTON, Terry; POGNAN, François. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal Of Biochemistry**, v. 267, n. 17, p. 5421-5426, 2000. Wiley. DOI: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01606.x>

O câncer. **Oncoguia**, 2017. Disponível em: <http://www.oncoguia.org.br/conteudo/cancer/12/1/>. Acesso em: 12 de ago. de 2021.

OUYANG, Liang *et al.* Plant natural products: from traditional compounds to new emerging drugs in cancer therapy. **Cell Proliferation**, v. 47, n. 6, p. 506-515, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/cpr.12143>.

PALOMO, Iván *et al.* El consumo de tomates previene el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y cáncer: antecedentes epidemiológicos y mecanismos de acción. **Idesia (arica)**, v. 28, n. 3, p. 121-129, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/s0718-34292010000300016>.

PEIRSMAN, Arne *et al.* MISpheroid: a knowledgebase and transparency tool for minimum information in spheroid identity. **Nature Methods**, v. 18, n. 11, p. 1294-1303, 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41592-021-01291-4>.

PFAFFL, Michael W.; HORGAN, Graham W.; DEMPFLER, Leo. 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, n. 9, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/30.9.e36>

PICCININI, Filippo. AnaSP: a software suite for automatic image analysis of multicellular spheroids. **Computer methods and programs in biomedicine**, v. 119, n. 1, p. 43-52, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cmpb.2015.02.006>

PICCININI, Filippo *et al.* Cancer multicellular spheroids: volume assessment from a single 2D projection. **Computer methods and programs in biomedicine**, v. 118, n. 2, p. 95-106, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cmpb.2014.12.003>

PINTO, Bárbara *et al.* Three-Dimensional Spheroids as *In Vitro* Preclinical Models for Cancer Research. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 12, p. 1186, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics12121186>.

PINTO, FÁBIO HENRIQUE VILLA. **AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA CÚRCUMINA SOBRE A HEPATOTOXICIDADE INDUZIDA PELO MERCÚRIO EM CÉLULAS**

HUMAS HepG2. 73 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Toxicologia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

PRATHEESHKUMAR, Poyil *et al.* Cancer Prevention with Promising Natural Products: mechanisms of action and molecular targets. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 10, p. 1159-1184, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.2174/187152012803833035>.

RANJAN, Alok *et al.* Role of Phytochemicals in Cancer Prevention. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 20, p. 4981, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20204981>.

RASIA, Maira Antonello *et al.* Efeitos colaterais da terapia imunossupressora na percepção de pacientes oncológicos. **Revista de Enfermagem Ufpe**, v. 8, n. 4, p. 850-856, 2014. DOI: 10.5205/reuol.5829-50065-1-ED-1.0804201408

REBECCA, V W; AMARAVADI, R K. Emerging strategies to effectively target autophagy in cancer. **Oncogene**, v. 35, n. 1, p. 1-11, 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2015.99>.

RODDICK, J.G. The steroidal glycoalkaloid α -tomatine. **Phytochemistry**, v. 13, n. 1, p. 9-25, 1974. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/s0031-9422\(00\)91261-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0031-9422(00)91261-5).

ROPER, Sophie *et al.* 3D spheroid models of paediatric SHH medulloblastoma mimic tumour biology, drug response and metastatic dissemination. **Scientific Reports**, v. 11, 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-021-83809-6>.

ROSS, Jeffrey S.; KALLAKURY, Bhaskar V. S.; SHEEHAN, Christine E.; FISHER, Hugh A. G.; KAUFMAN, Ronald P.; KAUR, Prabhjot; GRAY, Karen; STRINGER, Bradley. Expression of Nuclear Factor- κ B and I κ B α Proteins in Prostatic Adenocarcinomas. **Clinical Cancer Research**, v. 10, n. 7, p. 2466-2472, 2004. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-0543-3>.

RYE, Connie *et al.* **Biology**. Houston, Texas: Openstax, 2016. Disponível em: <https://openstax.org/books/biology/pages/1-introduction>. Acesso em: 30 nov. 2021.

SANTOS, Marcell de Oliveira. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 64, p. 119-120, 30 mar. 2018. Revista Brasileira De Cancerologia (RBC). DOI: <http://dx.doi.org/10.32635/2176-9745.rbc.2018v64n1.115>.

SAWADA, Namie Okino *et al.* Avaliação da qualidade de vida de pacientes com câncer submetidos à quimioterapia. **Revista da Escola de Enfermagem da Usp**, v. 43, n. 3, p. 581-587, 2009. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/s0080-62342009000300012>.

SERRATI, Simona *et al.* Tomatine Displays Antitumor Potential in *In Vitro* Models of Metastatic Melanoma. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 15, p. 5243, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21155243>.

SHI, Min-Der *et al.* Suppression of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced MCF-7 breast adenocarcinoma cells invasion/migration by α -tomatine through activating PKC α /ERK/NF- κ B-dependent MMP-2/MMP-9 expressions. **Cell Biochem Biophys**, v. 66, p. 161-174, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12013-012-9465-8>

SHIEH, Jiunn-Min *et al.* 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 Biochemistry and Biophysics**, v. 60, n. 3, p. 297-310, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12013-011-9152-1>.

SHIH, Yuan-Wei *et al.* α -Tomatine inactivates PI3K/Akt and ERK signaling pathways in human lung adenocarcinoma A549 cells: effect on metastasis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 8, p. 1985-1995, 2009. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2009.05.011>.

SIDDIQUE, Md Abu Bakar; BRUNTON, Nigel. Food Glycoalkaloids: distribution, structure, cytotoxicity, extraction, and biological activity. **Alkaloids - Their Importance in Nature and Human Life**, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.82780>.

SILVA, Suellen Laila Rocha. **ESTUDO DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO ENVOLVIDAS NA APOPTOSE INDUZIDA PELO COMPLEXO DE RUTÊNIO COM TIMINA EM CÉLULAS DE CARCINOMA DE CÓLON HUMANO HCT116**. 68 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2019.

SILVEIRA, Caroline Freitas *et al.* Quality of life and radiation toxicity in patients with gynecological and breast cancer. **Escola Anna Nery - Revista de Enfermagem**, v. 20, n. 4, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.5935/1414-8145.20160089>.

SINGH, Manoj Kumar *et al.* Phytochemicals. **Functional and Preservative Properties of Phytochemicals**, p. 363-375, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-818593-3.00012-9>.

SUAREZ-ARNEDO, Alejandra *et al.* An image J plugin for the high throughput image analysis of *in vitro* scratch wound healing assays. **Plos One**, v. 15, n. 7, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0232565>.

SUCHA, Lenka *et al.* The cytotoxic effect of α -tomatine in MCF-7 human adenocarcinoma breast cancer cells depends on its interaction with cholesterol in incubation media and does not involve apoptosis induction. **Oncology Reports**, v. 30, n. 6, p. 2593-2602, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.3892/or.2013.2778>.

SUNG, Hyuna *et al.* Global Cancer Statistics 2020: globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **Ca: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209-249, 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.3322/caac.21660>.

TAN, Wen *et al.* Anti-cancer natural products isolated from chinese medicinal herbs. **Chinese Medicine**, v. 6, n. 1, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1749-8546-6-27>.

TANAKA, Takuji. Colorectal carcinogenesis: review of human and experimental animal studies. **Journal of Carcinogenesis**, v. 8, n. 1, p. 5, 2009. DOI: <http://dx.doi.org/10.4103/1477-3163.49014>.

TAO, Xie *et al.* Review of natural product databases. **Cell Proliferation**, v. 48, n. 4, p. 398-404, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/cpr.12190>.

THANIKACHALAM, Kannan; KHAN, Gazala. Colorectal Cancer and Nutrition. **Nutrients**, v. 11, p. 164, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/nu11010164>.

The genetics of cancer. **NIH** – National Cancer Institute, 2017. Disponível em: <https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/genetics>. Acesso em: 12 de ago. de 2021.

THORNBERRY, Nancy A.; LAZEBNIK, Yuri. Caspases: enemies within. **Science**, v. 281, n. 5381, p. 1312-1316, 1998. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.281.5381.1312>.

THULASIDAS, J. *et al.* Cancer-Fighting Phytochemicals: Another Look. **J Nanomedicine Biotherapeutic Discov**, v. 9, n. 162, 2019. DOI:10.4172/2155-983X.1000162

TOMSIK, Pavel *et al.* **Biomedical Papers**, v. 157, n. 2, p. 153-161, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.5507/bp.2013.031>.

TOYOKUNI, Shinya. Role of iron in carcinogenesis: cancer as a ferrotoxic disease. **Cancer Science**, v. 100, n. 1, p. 9-16, 2009. Wiley. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1349-7006.2008.01001.x>.

TOYOKUNI, Shinya *et al.* Iron and thiol redox signaling in cancer: an exquisite balance to escape ferroptosis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 108, p. 610-626, 2017. Elsevier BV. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.04.024>.

TRENDOWSKI, Matthew. Recent Advances in the Development of Antineoplastic Agents Derived from Natural Products. **Drugs**, v. 75, n. 17, p. 1993-2016, 2015. Springer Science and Business Media LLC. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s40265-015-0489-4>.

VENTRELLA, Emanuela *et al.* Solanum tuberosum and Lycopersicon esculentum Leaf Extracts and Single Metabolites Affect Development and Reproduction of

Drosophila melanogaster. **Plos One**, v. 11, n. 5, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0155958>.

VERMA, Ashish S.; SINGH, Anchal. **Animal Biotechnology**. Academic Press, 2013. 668 p.

WANG, Fa-Zhao; DAI, Xue-Liang; LIU, Hong-Yi. Molecular mechanisms underlying the α -tomatine-directed apoptosis in human malignant glioblastoma cell lines A172 and U-118 MG. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 1, p. 1-11, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.3892/etm.2017.5294>.

WEISWALD, Louis-Bastien; BELLET, Dominique; DANGLES-MARIE, Virginie. Spherical Cancer Models in Tumor Biology. **Neoplasia**, v. 17, p. 1-15, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neo.2014.12.004>.

WHO - World Health Organization. **WHO Classification of Tumors: digestive system tumours**. 5. ed. World Health Organization, 2019. 635 p.

WU, Hailun *et al.* α -Tomatine, a novel early-stage autophagy inhibitor, inhibits autophagy to enhance apoptosis via Beclin-1 in Skov3 cells. **Fitoterapia**, v. 152, p. 104911, 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2021.104911>.

XU, Linlong *et al.* *BIRC5* is a prognostic biomarker associated with tumor immune cell infiltration. **Scientific Reports: Nature Research**, v. 11, p. 1-13, 2021.

YANG, Ya-Wun; WU, Ching-An; MORROW, W.J.W. The apoptotic and necrotic effects of tomatine adjuvant. **Vaccine**, v. 22, n. 17-18, p. 2316-2327, 2004. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2003.10.036>.

YU, Xiaolu *et al.* Tomatidine Suppresses the Destructive Behaviors of Fibroblast-Like Synoviocytes and Ameliorates Type II Collagen-Induced Arthritis in Rats. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2021.670707>.

ZANONI, Michele *et al.* 3D tumor spheroid models for *in vitro* therapeutic screening: a systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained. **Scientific Reports**, v. 6, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/srep19103>.

ZHANG, X. *et al.* Plant natural compounds: targeting pathways of autophagy as anti-cancer therapeutic agents. **Cell Proliferation**, v. 45, n. 5, p. 466-476, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2184.2012.00833.x>.

ZHANG, Wei *et al.* Semi-quantitative detection of GADD45-gamma methylation levels in gastric, colorectal and pancreatic cancers using methylation-sensitive high-resolution melting analysis. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v.8, p. 1267-1273, 2010. DOI: [10.1007/s00432-010-0777-z](https://doi.org/10.1007/s00432-010-0777-z)

CONCLUSÃO GERAL

Conclui-se que a α -tomatina, na concentração de 17,19 μ M, foi citotóxica e atrasou o crescimento dos esferoides de células da linhagem HT-29, além de atuar como um inibidor de migração e de formação de novas colônias celulares, o que sugere ser um potente agente antiproliferativo. Evidenciamos ainda que a α -tomatina não induz parada de ciclo celular, tampouco apoptose. O composto também não induziu genotoxicidade. Demonstramos também que a α -tomatina reduziu a expressão de genes envolvidos em diferentes vias moleculares. Assim, demonstramos que o sistema 3D traz novas abordagens e resultados no complexo caminho da busca por novos compostos antiproliferativos e seus mecanismos de ação. Ademais, os resultados do presente estudo indicam que a α -tomatina pode ser uma candidata para o desenvolvimento de novos quimioterápicos.

APÊNDICE

Tabela 1 - Média percentual da viabilidade celular na linhagem tumoral HT-29 obtida após 24 horas de tratamento com o composto α -tomatina.

<u>Tratamentos</u>	<u>Média (%) \pm D.P.</u>
Controle	100 \pm 0
4 μ M	96.83 \pm 2.41
8 μ M	100 \pm 1,94
12 μ M	82.33 \pm 7.13
16 μ M	65.38 \pm 12.62 **
20 μ M	26.57 \pm 6.24 ****
DOX	73.39 \pm 6.17 *

(*), (**) e (****) representam os valores com nível de significância menor que 1% (p-valor \leq 0,01) e 0,01% (p-valor \leq 0,0001) em relação ao controle, respectivamente, pelo teste ANOVA seguido de teste de Dunnett. Valores expressos em média \pm desvio padrão.

Tabela 2 – Média relativa da área da ferida nas células HT-29 após o tratamento com α -tomatina nos tempos de 0, 24, 48 e 72 horas.

<i>Tratamentos</i>	<u>Área da ferida (um²) \pm D.P.</u>			
	<i>Tempo após tratamento</i>			
	0 h	24 h	48 h	72 h
Controle	9251 \pm 509	7609 \pm 776	7022 \pm 405	5238 \pm 247
17,19 μ M	9099 \pm 453	8935 \pm 393	8671 \pm 606*	7876 \pm 122*

(*) representa os valores com nível de significância menor que 1% (p-valor \leq 0,01) e 0,01% (p-valor \leq 0,0001) em relação ao controle, respectivamente, pelo teste T não pareado. Valores expressos em média \pm desvio padrão.

Tabela 3 – Média relativa da largura da ferida nas células HT-29 após o tratamento com α -tomatina nos tempos de 0, 24, 48 e 72 horas.

<i>Tratamentos</i>	<u>Largura da ferida (um) \pm D.P.</u>			
	<i>Tempo após tratamento</i>			
	0 h	24 h	48 h	72 h
Controle	753 \pm 24.28	596 \pm 73.78	558 \pm 56.22	445 \pm 43.80
17,19 μ M	677 \pm 29.33	683 \pm 40.60	691 \pm 49.06*	669 \pm 72.99*

(*) representa os valores com nível de significância menor que 1% (p-valor \leq 0,01) e 0,01% (p-valor \leq 0,0001) em relação ao controle, respectivamente, pelo teste T não pareado. Valores expressos em média \pm desvio padrão.

Tabela 4 – Volume médio (mm³) de esferoides de células HT-29 após o tratamento com α -tomatina nos tempos de 0, 24, 48 e 72 horas.

<i>Tratamentos</i>	Volume médio (mm³) \pm EP			
	<i>Tempo após tratamento</i>			
	0 h	24 h	48 h	72 h
Controle	0.154 \pm 0.008 ^a	0.191 \pm 0.012 ^b	0.215 \pm 0.012 ^c	0.237 \pm 0.005 ^d
17,19 μ M	0.158 \pm 0.004 ^a	0.164 \pm 0.008 ^a	0.189 \pm 0.011 ^b	0.215 \pm 0.012 ^c
DOX	0.147 \pm 0.003 ^a	0.121 \pm 0.002 ^c	0.105 \pm 0.001 ^f	0.100 \pm 0.000 ^f

Resultados obtidos por Two-way ANOVA de medida repetidas e teste post-hoc Tukey de múltiplas comparações.

Tabela 5 – Média percentual relativa de células HT-29 nas diferentes fases do ciclo celular após 24 horas de tratamento com α -tomatina.

Fases do ciclo celular	Tratamentos	
	<i>Controle</i>	<i>17,19μM</i>
G1(%) \pm D.P.	78.53 \pm 0.49	79.03 \pm 2.40
S (%) \pm D.P.	5.80 \pm 1.51	4.10 \pm 1.01
G2/M(%) \pm D.P	14.77 \pm 1.61	15.93 \pm 2.66

Resultados obtidos por teste T não pareado. Valores expressos em média \pm desvio padrão

Tabela 6 – Média percentual relativa das células HT-29 vivas, apoptóticas e mortas após 24 horas de tratamento com α -tomatina.

Morte celular	Tratamentos	
	<i>Controle</i>	<i>17,19μM</i>
Células vivas (%) \pm D.P.	73.97 \pm 0.90	67.13 \pm 7.06
Células apoptóticas (%) \pm D.P.	23.90 \pm 1.24	29.03 \pm 7.33
Células mortas (%) \pm D.P	2.06 \pm 0.55	3.86 \pm 0.55*

(*) representa os valores com nível de significância menor que 0,01% (p-valor \leq 0,0001) em relação ao controle, pelo teste T não pareado. Valores expressos em média \pm desvio padrão.

Tabela 7 – Média percentual relativa de células HT-29 nas diferentes fases do ciclo celular após 72 horas de tratamento com 17,19 μ M de α -tomatina.

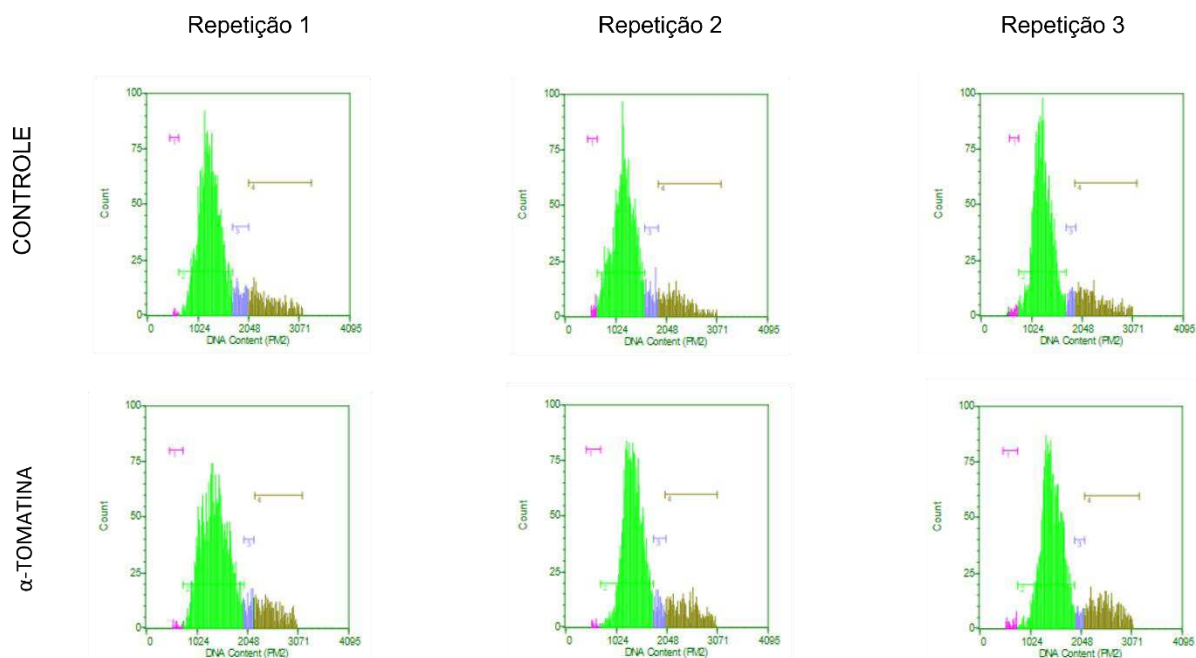


Tabela 8 – Percentual relativo de células HT-29 vivas, apoptóticas e mortas após 72 horas de tratamento com 17,19 μ M de α -tomatina.

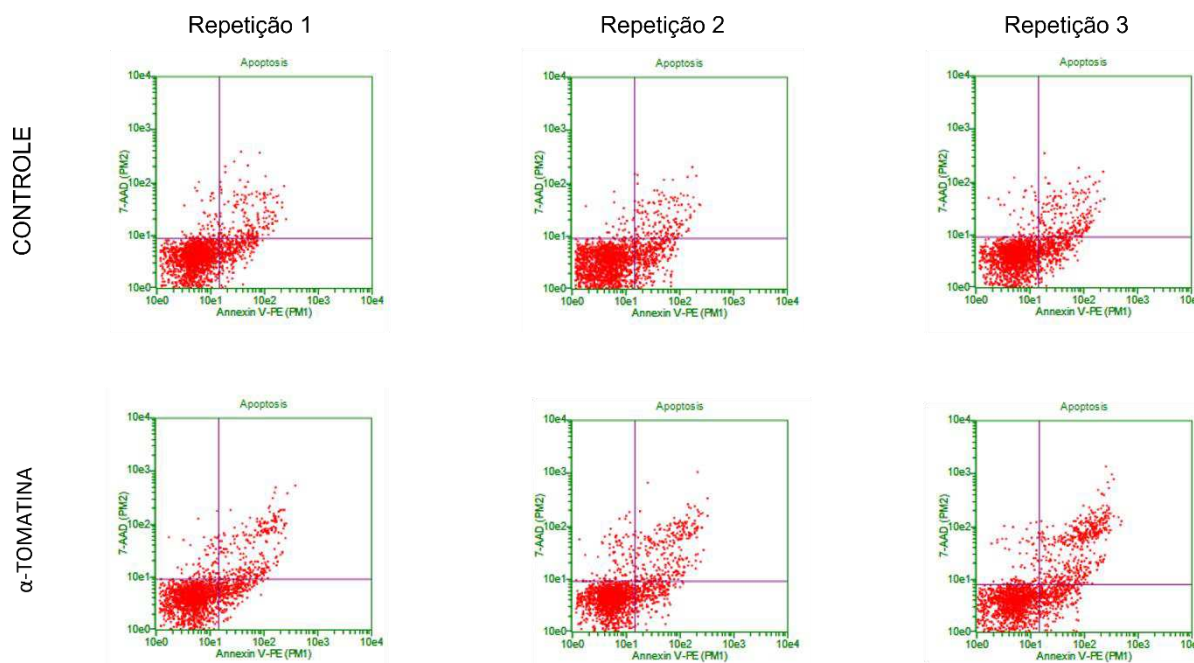


Tabela 9 – Média relativa da porcentagem de DNA na cauda de cometas de células HT-29 após 24 horas de tratamento com α -tomatina.

Tratamentos	Média (%) \pm D.P.
Controle	4.44 \pm 3.63
17,19 μ M	3.63 \pm 0.49

Resultados obtidos pelo teste T não pareado seguido de teste de Mann-Whitney. Valores expressos em média \pm desvio padrão.

Tabela 10 – Momento da cauda de cometas de células HT-29 após 24 horas de tratamento com α -tomatina.

Tratamentos	Média (%) \pm D.P.
Controle	0.12 \pm 0.003
17,19 μ M	0.08 \pm 0.012

Resultados obtidos pelo teste T não pareado seguido de teste de Mann-Whitney. Valores expressos em média \pm desvio padrão.

Tabela 11 – Média das unidades arbitrárias de fluorescência em células HT-29 marcadas com o corante resazurina após 14 dias do tratamento de 72 horas com 17,19 μ M de α -tomatina, para avaliar a formação de novas colônias celulares

Tratamentos	Média (%) \pm D.P.
Controle	1885 \pm 372
0.25 μ M	1493 \pm 416*

(*) representa os valores com nível de significância menor que 0,01% (p-valor \leq 0,0001) em relação ao controle, pelo teste T não pareado. Valores expressos em média \pm desvio padrão.

Tabela 12 – Sequências iniciadoras utilizadas na RT-qPCR

Gene	Forward	Reverse
<i>B-ACTIN</i>	5' GAC CGA CAT GGA GAA AAT CTG 3'	5' ATG ATC TGG GTC ATC TTC TC 3'
<i>GAPDH</i>	5' GGA AGA TGG TGA TGG GAT TT 3'	5' GAA GGT GAA GGT CGA GTC 3'
<i>TP53</i>	5' ACC TAT GGA AAC TAC TTC CTG 3'	5' ACC ATT GTT CAA TAT CGT CC 3'
<i>C-MYC</i>	5' TGA GGA GGA ACA AGA AGA TG 3'	5' ATC CAG ACT CTG ACC TTT TG 3'
<i>NF-KB</i>	5' GCA GCT CTT CTC AAA GCA GCA 3'	5' GCT CA AGT TCT CCA CCA GGG 3'
<i>M-TOR</i>	5' GGA GGA GAA ATT TGA TCA GG 3'	5' GGG CAA CAA ATT AAG GAT TG 3'
<i>CDKN1A</i>	5' CAG CAT GAC AGA TTT CTA CC 5'	5' CAG GGT ATG TAC ATG AGG AG 3'
<i>GADD45A</i>	5' TCA GCG CAC GAT CAC TGTC 3'	5' CCA GCA GGC ACA ACA CCA C 3'
<i>H2AFX</i>	5' AAT CCA AGC ACC TAG ATA CC 3'	5' CAG AAT TCC AGT TCA GAA GC 3'
<i>ERN1</i>	5' ACG GAC GTC AAG TTT GAT CC 3'	5' TTG GTA GAC GCA GAC AGT GG 3'
<i>BECN1</i>	5' CAT ATC AGA GAG AAT ACA GTG 3'	5' TGG AAG GTT GCA TTA AAG AC 3'
<i>GPX1</i>	5' CAA CCA GTT TGG GCA TCA G 3'	5' CGA TGT CAA TGG TCT GGA AG 3'
<i>BCL2</i>	5' AAC ATC ACA GAG GAA GTA GAC 3'	5' CAC TTG ATT CTG GTG TTT CC 3'
<i>BIRC5</i>	5' CAT CTC TAC ATT CAA GAA CTG G 3'	5' CCT TGA AGC AGA AGA AAC AC 3'
<i>BBC3</i>	5' GTA AGA TAC TGT ATA TGC GCT G 3'	5' TTT TCC ACT GTT CCA ATC TG 3'
<i>PARP1</i>	5' AAA AGG AGG TGG AAA AGA TG 3'	5' GCT AAG AAC AAC TCC TGA AG 3'
<i>CASP3</i>	5' AAA GCA CTG GAA TGA CAT C 3'	5' CGC ATC AAT TCC ACA ATT TC 3'
<i>CASP8</i>	5' CTA CAG GGT CAT GCT CTA TC 3'	5' ATT TGG AGA TTT CCT CTT GC 3'
<i>CASP9</i>	5' CTC TAC TTT CCC AGG TTT TG 3'	5' TTT CAC CGA AAC AGC ATT AG 3'