



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

GLÁUCIA FERNANDA ROCHA D'EPIRO

**“EFEITO DA CLOROFILINA NA EXPRESSÃO DE GENES  
ENVOLVIDOS NA APOPTOSE E CICLO CELULAR EM  
CÉLULAS DE MAMA NÃO TUMORAIS (HB4A)”**

---

Londrina  
2012

GLÁUCIA FERNANDA ROCHA D'EPIRO

**“EFEITO DA CLOROFILINA NA EXPRESSÃO DE GENES  
ENVOLVIDOS NA APOPTOSE E CICLO CELULAR EM  
CÉLULAS DE MAMA NÃO TUMORAIS (HB4A)”**

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

Orientador: Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani

Londrina  
2012

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

**Dados Internacionais De Catalogação-Na-Publicação (Cip)**

D419e D'Epiro, Gláucia Fernanda Rocha.  
Efeito da clorofilina na expressão de genes envolvidos na  
apoptose e ciclo celular em células de mama não tumorais  
(HB4a) / Gláucia Fernanda Rocha D'Epiro. – Londrina,  
2012. 101 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, 2012.

Inclui bibliografia.

1. Clorofilina – Efeito citotóxico – Teses. 2. Genética – Expressão – Teses. 3. Apoptose  
– Teses. 4. Ciclo celular – Teses. I. Mantovani, Mário Sérgio. II. Universidade Estadual  
de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e  
Biologia Molecular. III. Instituto Agrônomo do Paraná. IV. EMBRAPA. V. Título.

CDU 576.312.32

GLÁUCIA FERNANDA ROCHA D'EIPIRO

**“EFEITO DA CLOROFILINA NA EXPRESSÃO DE GENES  
ENVOLVIDOS NA APOPTOSE E CICLO CELULAR EM CÉLULAS DE  
MAMA NÃO TUMORAIS (HB4A)”**

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Prof. Dr. Rodrigo Juliano Oliveira  
UFMS – Mato Grosso do Sul - MS

---

Profa. Dra. Gislayne Vilas Boas  
UEL – Londrina - PR

Londrina, 29 de fevereiro de 2012.

Dedico à minha família que não mediu esforços  
para que eu chegasse até aqui e ao meu  
companheiro Marcos pelo amor,  
confiança e grande apoio.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao orientador, Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani por ter me aceito em seu laboratório, pela oportunidade e pelos ensinamentos.

À minha família Enzo, Zenaide e Graziela, por todo incentivo, carinho e compreensão. O apoio de vocês sempre foi fundamental, sem ele não teria chegado até aqui.

Ao Marcos, por todo apoio, amor e principalmente pela paciência, e que haja muita paciência, afinal teremos mais quatro anos pela frente!

Aos amigos do laboratório Zane, Pathe, Sandra, Marcela, Rodrigo, Lilian, Giuliana, Eliane e Tati, obrigada por toda ajuda, pelo carinho e por terem me recebido tão bem no laboratório!

Simone, Andressa e Juliana, muito obrigada por estarem sempre dispostas a me ajudar com tanta dedicação, sem vocês jamais teria consigo realizar esse trabalho! Vocês são incríveis!

Natália e Diogo, grandes amigos que fiz durante o mestrado, vocês fazem falta.

À Profa. Dra. Daniele Sartori, pela grande ajuda, amizade e contribuição como banca na qualificação.

À comissão examinadora, Prof. Dr. Rodrigo Juliano Oliveira e Profa. Dra. Gislayne Vilas Boas por terem aceitado o convite, pelas correções e contribuições.

Aos Docentes do programa pelos ensinamentos e dedicação.

À dedicada Sueli, por nos atender com prontidão e simpatia.

À coordenação do Programa em Genética e Biologia Molecular pelos esforços e dedicação despendidos em benefício do curso.

**Meus sinceros agradecimentos!!!**

D'EPIRO, Gláucia Fernanda Rocha. **Efeito da clorofilina na expressão de genes envolvidos na apoptose e ciclo celular em células de mama não tumorais (HB4a)**. 2012. 101 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

## RESUMO

A molécula de clorofilina é muito estudada pela comunidade científica por apresentar, entre outras, propriedades quimiopreventiva, antimutagênica e anticarcinogênica. No entanto, os mecanismos moleculares de ação desse composto ainda não estão esclarecidos. Dessa maneira, o estudo de genes envolvidos na apoptose e no ciclo celular em células não tumorais tratadas com clorofilina pode fornecer informações importantes sobre os mecanismos que protegem ou desencadeiam toxicidade às células, auxiliando na compreensão e no desenvolvimento de terapias. Neste contexto, nós avaliamos o potencial citotóxico da clorofilina e o seu efeito na expressão de genes envolvidos na apoptose (anti e pró-apoptóticos: *BCL-2*, *BCL-XL*, *BAX* e *BAK*; da família das Caspases: *CASP3*, *CASP7*, *CASP 8* e *CASP9*) e de ciclo celular (*BIRC5*, *TP53*, *APC*, *CiclinaA2* e  *$\beta$ -catenina*) em cultura de células de mama não tumorais (HB4a). No ensaio de citotoxicidade a clorofilina apresentou potencial citotóxico em 48 e 72 h em todas as concentrações utilizadas (100, 200 e 400  $\mu\text{g/mL}$ ) quando comparadas ao controle. O estudo da expressão gênica foi realizado por meio do ensaio de qRT-PCR em tempo real. As células HB4a foram expostas à 100 e 200  $\mu\text{g/mL}$  de clorofilina nos tempos de 24, 48 e 72 h. A redução dos níveis de *BIRC5*, relacionado aos processos de apoptose e ciclo celular foi dose dependente, o gene foi menos expresso no tratamento com 200  $\mu\text{g/mL}$  de clorofilina em 24, 48 e 72 h. O gene *CCNA2* foi menos expresso com 24, 48 e 72 h de exposição à 200  $\mu\text{g/mL}$  de clorofilina, e com 72 h de exposição à 100  $\mu\text{g/mL}$ . Em relação aos genes pró-apoptóticos, foi observado aumento significativo na expressão de *BAX* em 24, 48 e 72 h de exposição à 200  $\mu\text{g/mL}$  de clorofilina, e em 72 h de exposição à 100  $\mu\text{g/mL}$ . Não houve alteração significativa de *BAK* quando comparado ao controle. Também foi observado aumento de expressão dos anti-apoptóticos *BCL-2* e *BCL-XL*. O gene *BCL-XL* apresentou aumento de expressão nos três tempos testados com 200  $\mu\text{g/mL}$  de clorofilina, e a exposição à 100  $\mu\text{g/mL}$  levou ao aumento de expressão somente em 24 h. Já o gene *BCL-2* obteve aumento de expressão apenas em 72 h com 200  $\mu\text{g/mL}$  de clorofilina. Os demais genes analisados não apresentaram alteração significativa. A inibição da expressão dos genes envolvidos no ciclo celular sugere um efeito decorrente da citotoxicidade da clorofilina, bem como o aumento da expressão dos genes pró-apoptóticos, enquanto que o aumento da expressão dos genes anti-apoptóticos sugere inibição da apoptose como proteção da morte celular induzida pela clorofilina.

**Palavras-chave:** Clorofilina. Ciclo celular. Apoptose. Expressão gênica.

D'EPIRO, Gláucia Fernanda Rocha. **Chlorophyllin effects in expression (mRNA) of apoptotic and cell cycle genes in non-tumor breast cells (HB4a)**. 2012. 101 f. Dissertation (Master's Degree in Genetics and Molecular Biology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

#### ABSTRACT

The molecule of chlorophyllin has been the subject of the scientific community by presenting, among others, chemopreventive, antimutagenic and anticarcinogenic properties. However, the molecular mechanisms of action of this compound remain unclear. Thus, the study of genes involved in apoptosis and cell cycle in non-tumor cells treated with chlorophyllin can provide important information about the mechanisms that protect or trigger damaging processes in these cells, aiding in the development of therapies and treatments. In this context, we evaluated the effect of cytotoxic potential of chlorophyllin and its effect on the expression of genes involved in apoptosis (anti and pro-apoptotic: *BCL-2*, *BCL-XL*, *BAX* and *BAK*, the family of Caspases: *CASP3*, *CASP7*, *CASP8* and *CASP9*) and cell cycle (*BIRC5*, *TP53*, *APC*,  $\beta$ -*catenin* and *CCNA2*) on cultured non-tumor breast cells (HB4a). In the cytotoxicity assay chlorophyllin was cytotoxic 48 and 72 h at all concentrations (100, 200 and 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) used when compared to control. The study of gene expression was performed by qRT-PCR assay. HB4a cells were exposed to 100 and 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of chlorophyllin at 24, 48 and 72 h. The reduced levels of *BIRC5* related to the processes of apoptosis and cell cycle was dose dependent, the gene was downregulated with 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of chlorophyllin at 24, 48 and 72 h. The *CCNA2* gene was downregulated at 24, 48 and 72 h with 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of chlorophyllin, and at 72 h with 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of exposure. In relation to the pro-apoptotic genes, it was observed a significant increase in expression of *BAX* at 24, 48 and 72 h of exposure at 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of chlorophyllin, and 72 h of exposure at 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . *BAK* was not significant change when compared with control. It was also observed increased expression of anti-apoptotic *BCL-2* and *Bcl-XL*. The gene *BCL-XL* showed increased expression in three times tested with 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of chlorophyllin, and exposure to 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  led to increased expression in 24 h. Since the *BCL-2* gene had an increase of expression only in 72 hours with 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of chlorophyllin. The other genes analyzed did not show significant change. Inhibition on the genes expression involved in cell cycle suggests an effect due to the cytotoxicity of chlorophyllin, and the increased expression of pro-apoptotic genes, while the increased expression of anti-apoptotic genes suggests inhibiting apoptosis and protection from death induced cellular chlorophyllin.

**Keywords:** Chlorophyllin. Cell cycle. Apoptosis. Gene expression.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Comparação entre as estruturas químicas da clorofila (a) e da clorofilina (b).....	14
--	----

### ARTIGO

<b>Figura 1</b> – Absorbância das células tratadas com diferentes concentrações de clorofilina nos períodos de: a) 24; b) 48 e c) 72 h. As barras representam as médias $\pm$ desvio padrão obtidos em três experimentos independentes .....	40
<b>Figura 2</b> – Células HB4a tratadas com clorofilina: a) Controle; b) 100 $\mu\text{g/mL}$ ; c) 200 $\mu\text{g/mL}$ e d) 400 $\mu\text{g/mL}$ .....	41
<b>Figura 3</b> – Expressão relativa dos genes envolvidos na apoptose e ciclo celular nas células HB4a tratadas com 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$ , nos períodos de: a) 24 horas; b) 48 horas e c) 72 horas .....	42
<b>Figura 4</b> – Expressão relativa dos genes envolvidos na apoptose nas células HB4a tratadas com 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$ , nos períodos de: a) 24 horas; b) 48 horas e c) 72 horas .....	43
<b>Figura 5</b> – Efeito da clorofilina em células HB4a expostas à clorofila. O aumento da expressão de Bcl-2 e Bcl-XL inibe as proteínas pró-apoptóticas e a liberação de citocromo c e impedem a ativação da cascata das caspases .....	47

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>APC</b>	adenomatous polyposis coli
<b>BAK</b>	BCL2-antagonist/killer
<b>BCL2</b>	B-cell lymphoma 2
<b>BCL-XL</b>	B-cell lymphoma-extra large
<b>BIRC5</b>	baculoviral IAP repeat containing 5
<b>CASP3</b>	cysteine aspartic acid proteases 3
<b>CASP7</b>	cysteine aspartic acid proteases 7
<b>CASP8</b>	cysteine aspartic acid proteases 8
<b>CASP9</b>	cysteine aspartic acid proteases 9
<b>CCNA2</b>	cyclin A2
<b>Chl</b>	Clorofilina
<b>ERK</b>	Extracellular signal-regulated kinases
<b>FADD</b>	Fas-Associated protein with Death Domain
<b>GAPDH</b>	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
<b>MAPK</b>	Mitogen-activated protein kinase
<b>MTT</b>	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium brometo
<b>qRT-PCR</b>	Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction
<b>ROS</b>	espécies reativas de oxigênio
<b>TP53</b>	Tumor Protein p53
<b>TNF</b>	Tumor necrosis factor
<b>rTNF</b>	Receptor de TNF

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	14
2.1 CLOROFILINA: PROPRIEDADES QUIMIOPREVENTIVAS E TERAPÊUTICAS .....	14
2.2 PROLIFERAÇÃO CELULAR .....	17
2.2.1 Ciclina A2: Principais Funções na Progressão do Ciclo Celular .....	19
2.2.2 O Genes APC e $\beta$ -catenina e as Principais Funções de suas Proteínas .....	21
2.3 APOPTOSE .....	23
2.3.1 Família das Caspases e as Principais vias de Ativação da Apoptose .....	23
2.3.2 Survivina: Proteína Inibidora da Apoptose e seu Papel no Ciclo Celular .....	26
2.3.3 TP53 .....	28
2.3.4 Membros da Família Bcl-2 .....	29
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	31
3.1 OBJETIVO GERAL.....	31
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
<b>4 ARTIGO</b> .....	32
<b>Resumo</b> .....	33
4.1 INTRODUÇÃO .....	34
4.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	36
4.2.1 Agentes Químicos.....	36
4.2.2 Linhagem Celular.....	36
4.2.3 Ensaio de Citotoxicidade .....	36
4.2.4 Análise da Expressão Gênica.....	37
4.2.5 Análise Estatística.....	38
4.3 RESULTADOS.....	40
4.3.1 Ensaio de Citotoxicidade (MTT).....	40
4.3.2 Expressão Gênica.....	41
4.4 DISCUSSÃO .....	43

<b>REFERÊNCIAS</b> .....	49
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	52
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	53
<b>ANEXOS</b> .....	61

## 1 INTRODUÇÃO

O aumento do consumo de frutas e vegetais está associado à redução do risco de desenvolvimento de doenças, intensificando, assim, o interesse em fitoquímicos como agentes com potencial fisiologicamente ativo (STEINMETZ, 1996). A clorofila e seus derivados possuem longa e bem estabelecida história de uso na medicina tradicional para fins terapêuticos (KEPHART, 1955).

Tanto a clorofila natural como seus derivados comerciais, dentre eles a clorofilina cúprica, são amplamente investigados por possuírem atividades biológicas benéficas, tais como propriedades anti-inflamatórias e cicatrizantes (LARATO; PFAU, 1970), controle do oxalato de sódio para o tratamento de cálculos renais (TAWASHI et al., 1980) e controle de odores corporais internos (YOUNG; BEREGE, 1980). Além disso, o seu potencial na prevenção do câncer tem atraído grande atenção da comunidade científica.

A clorofilina possui propriedades quimiopreventiva, antimutagênica e anticarcinogênica (EGNER et al., 2001), apresenta atividade antioxidante, pode atuar como interceptador de mutágenos e nas vias de regulação de detoxificação, além de levar células tumorais à morte por apoptose (DIAZ et al., 2003; CHIU et al., 2005). Assim, são necessários esforços na identificação do potencial dessa substância para a prevenção de doenças. Por esse motivo, novas pesquisas *in vivo* e *in vitro* têm sido realizadas para avaliar os mecanismos pelos quais esse composto atua.

O estudo de genes envolvidos na progressão do ciclo celular e na apoptose de células normais pode fornecer informações importantes acerca dos mecanismos que protegem ou desencadeiam processos prejudiciais nas células e, por sua vez, ser utilizado para auxiliar no desenvolvimento de terapias. Inúmeros genes e proteínas estão envolvidos no processo apoptótico, neste estudo, optou-se pelo estudo dos genes: *CASP8* e *CASP9*, os quais estão envolvidos, respectivamente na fase iniciadora das via extrínseca e intrínseca; *CASP3* e *CASP7*, genes da fase efetora (RUPNARAIN et al., 2004); dos pró-apoptóticos *BAK* e *BAX* e dos genes anti-apoptóticos *BCL-XL* e *BCL-2* (YOULE; STRASSER, 2008). Além disso, foram avaliados alguns genes relacionados ao ciclo celular: *Ciclina A2* (*CCNA2*), necessário para o início da síntese de DNA e entrada na mitose (GELEY et al., 2001); *APC* e  *$\beta$ -Catenina*, os quais desempenham uma importante atividade

nas vias de regulação do ciclo celular (WANG et al., 2006); *TP53*, que tem papel ativo nos pontos de verificação do ciclo celular (LEVINE, 1997) e *BIRC5*, essencial na regulação da progressão da mitose e inibição da apoptose (ALTIERE, 2008).

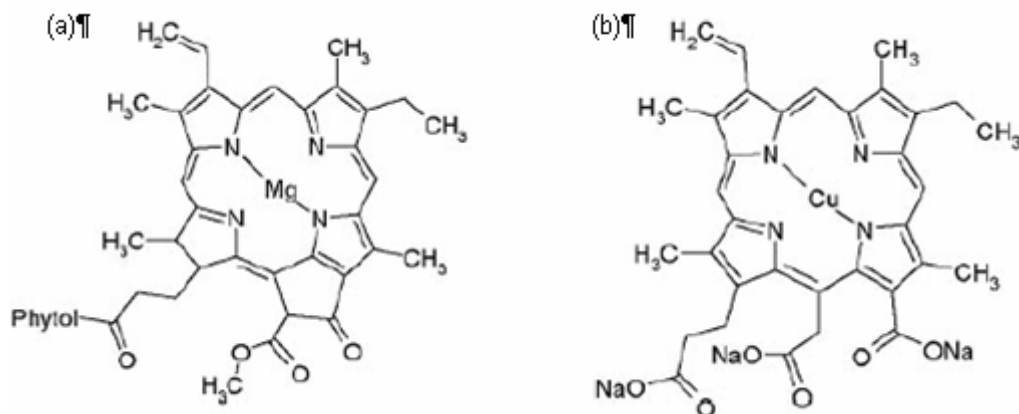
Estudos sugerem que a clorofilina possui potencial indutor de apoptose e capacidade de inibir a proliferação em células tumorais. No entanto, pouco se sabe sobre os efeitos desse pigmento em células não tumorais, podendo a clorofilina apresentar resultados controversos àqueles encontrados em células tumorais. Sendo assim, optou-se pelo estudo da linhagem celular não tumoral de mama HB4a para o estudo do efeito da clorofilina na regulação dos genes de apoptose e ciclo celular.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 CLOROFILINA: PROPRIEDADES QUIMIOPREVENTIVAS E TERAPÊUTICAS

As clorofilas são moléculas formadas por complexos derivados da porfirina, tendo como átomo central o magnésio ( $Mg^{2+}$ ). Esse composto possui uma estrutura macrocíclica assimétrica totalmente insaturada constituída por quatro anéis de pirrol e um quinto anel isocíclico, como pode ser observado na figura 1(a) (SCHOEFS, 2002). No quarto anel pirrólico, o ácido propiônico é esterificado por um álcool acíclico de cadeia longa, geralmente o fitol, conferindo à clorofila um caráter hidrofóbico (GROSS, 1991).

**Figura 1** – Comparação entre as estruturas químicas da clorofila (a) e da clorofilina (b) (CARTER et al., 2004).



Devido à coloração e suas propriedades físico-químicas, as clorofilas atraem a atenção da indústria alimentícia e são utilizadas como aditivos em produtos, geralmente, como corantes naturais e antioxidantes. No entanto, estes pigmentos são quimicamente instáveis e podem ser facilmente degradados ou ter sua estrutura modificada pela ação da luz, aquecimento, oxigênio ou reações químicas, alterando a percepção e a qualidade dos produtos (BRITTON, 1995; SCHOEFS, 2002).

Por esses motivos, as moléculas de tais pigmentos podem ter seu átomo central, o magnésio, substituído por outros átomos como, por exemplo, o cobre e o zinco (KEPHART, 1995).

A clorofilina cúprica é um derivado semi-sintético da clorofila, diferenciando-se pela substituição do átomo de  $Mg^+$  por um átomo de  $Cu^+$  (Figura 1(b)) e por não possuir o grupo fitol. Quimicamente a clorofilina é uma molécula bastante estável e hidrossolúvel, por esses motivos é comumente utilizada e aprovada em alguns países como aditivo de alimentos, aos quais confere coloração verde (SARKAR et al., 1995).

O fenômeno de formação de complexos espontâneos entre átomos metálicos e a clorofila e seus derivados durante o processamento é conhecido como reverdescimento e foi descoberto por Fischbach em 1943. O autor atribuiu o fenômeno à formação de um complexo com zinco ou com cobre que possuía uma cor verde brilhante e estável. A descoberta resultou na aprovação em alguns países, entre eles o Brasil, dos corantes comerciais conhecidos como clorofila e clorofilina cúpricas, na forma de sal de sódio, potássio ou amônio. Apesar da rapidez do cobre em formar complexos, os íons  $Cu^{2+}$  possuem natureza tóxica e por isso, o uso de complexos com zinco é preferível (LABORDE; VON ELBE, 1994).

As pesquisas relativas às atividades antioxidante e quimiopreventiva da clorofila e de seus derivados tiveram um grande avanço a partir da década de 80 (GOMES et al., 2003). Mas, foi durante a década de 90 que a pesquisa sobre a clorofilina progrediu. Esse impulso deve-se principalmente aos resultados obtidos por meio de experimentos iniciais *in vitro* que demonstraram propriedades antimutagênicas e antígenotóxicas desta molécula e também de estudos de anticarcinogenicidade em trutas, camundongos e ratos (FERRUZZI; BLAKESLEE, 2007).

Outros estudos revelaram o sucesso dos ensaios de quimioprevenção com pessoas expostas a aflatoxina B1 presentes na dieta (EGNER et al., 2003). Uma população na China, exposta a aflatoxinas em sua dieta e com alto risco de desenvolvimento subsequente de hepatocarcinoma foi submetida a um ensaio clínico. Nesse estudo, os indivíduos ingeriram clorofilina (100 mg/dia) durante 4 meses, e foi constatada uma redução de 55% de aflatoxina N7-guanina na urina, sugerindo que a clorofilina poderia ser usada contra os efeitos da AFB1 (EGNER et al., 2001). Estudos comprovam que este pigmento pode se ligar ao carcinógeno ou mutágeno e, deste modo, reduzir a sua biodisponibilidade (DASHWOOD et al., 1998).

Lanfer-Marquez (2003) sugere a hipótese de que o mecanismo inibidor de formação de adutos proporcionado pela clorofilina se baseia na complexação não covalente dessa molécula com a aflatoxina B1 (AFB1), numa estequiometria de aproximadamente 1:1, tornando a aflatoxina indisponível para formar aductos com o DNA, o que explicaria, então, a sua atividade anticarcinogênica.

Em sistemas *in vitro*, além de apresentar potencial antigenotóxico (BEZ et al., 2001) e antimutagênico (RAMPAZO et al., 2002), a clorofilina também pode atuar como agente protetor contra danos citogenéticos induzidos por radiações e químicos (como por exemplo) (KUMAR et al., 1999). Negraes et al. (2004) verificaram que a clorofilina não foi clastogênica e reduziu os danos causados pelo agente metilmetanosulfato (EMS) na linhagem CHO-K1.

O potencial protetor da clorofilina mostra-se além de agentes químicos e físicos, visto que Botelho et al. (2004) demonstraram que esse composto foi capaz de proteger células Hep-2 contra fragmentação nuclear induzida por polivírus.

Dentre outros aspectos positivos, a clorofilina possui a capacidade de eliminação direta de radicais livres, como foi mostrado por Kumar et al. (2001). No entanto, o composto apresentou atividade antioxidante, bem como pró-oxidante de maneira dose e tempo dependente (SANTOSH KUMAR et al., 2004).

Hoshina et al. (1998) demonstraram uma forte influência da porfirina na inibição da formação da lipoperoxidação. Ambos, a estrutura porfirínica, assim como a presença de metal, na clorofilina, são considerados importantes na atividade antioxidante (SUZUKI et al., 1995).

Os derivados da clorofila também podem modular o sistema de detoxificação de xenobióticos. Singh et al. (1996) demonstraram significativa elevação da atividade da glutathione-S-transferase depois da administração tópica e por gavagem da clorofilina em camundongos murinos e neonatos, enquanto que a atividade do citocromo (CYP) P450 manteve-se inalterada. A inibição inespecífica de várias CYPs P450 pela clorofilina foi observada em microsomos de fígado (YUN et al., 1995). A clorofilina minimizou a bioativação de pré-carcinógenos e acelerou a excreção de carcinógenos pela diminuição da atividade da CYP e estimulação da via de conjugação de fase II. Estudos com clorofilina demonstraram significativa indução

da enzima de fase II NADPH: quinona oxidoreductase 1 (NQO1) em células de hepatoma de murino (FAHEY et al., 2005).

Evidências mostraram que a clorofilina pode levar a indução da apoptose em células transformadas e cancerosas, revelando-se, assim, como um potencial agente terapêutico contra o câncer. A clorofilina demonstrou induzir apoptose em células de câncer de cólon (HCT 116) pelo provável mecanismo de ativação da via da caspase-8 resultando na condensação nuclear (DIAZ et al., 2003). A clorofilina também pode induzir apoptose regulando a ativação de MAPK como a ERK, em células de câncer de mama (MCF-7). Essa regulação ocorre por meio da inibição da ativação da proteína ERK, levando a eventos apoptóticos (CHIU et al., 2005). Neste mesmo trabalho, os autores demonstraram que a clorofilina inibe a proliferação celular na mesma linhagem, entretanto, os mecanismos pelo qual esse processo ocorre não foram totalmente esclarecidos. Sharma et al. (2007) por sua vez demonstraram que a clorofilina pode apresentar potencial inibitório da apoptose em linfócitos de camundongos. No estudo, a clorofilina aumentou os níveis de expressão de genes antiapoptóticos (*BCL-2* e *BCL-XL*) sugerindo inibição da apoptose nesse tipo celular.

Logo, estudos a respeito dos mecanismos de indução e inibição de apoptose em diferentes tipos celulares quando expostos à clorofilina têm grande relevância, pois podem auxiliar na investigação do potencial quimioprotetor e da segurança na utilização do composto para consumo alimentar ou terapêutico.

## 2. 2 PROLIFERAÇÃO CELULAR

Os processos moleculares que caracterizam os principais eventos do ciclo celular como a replicação do DNA e mitose, são similares em todas as células. No entanto, alguns detalhes do processo variam de acordo com o tipo celular, o organismo e as diferentes épocas de vida (PERES; CURI, 2005).

Para dar origem a duas células filhas geneticamente idênticas, o DNA deve ser fielmente replicado e os cromossomos segregados igualmente às novas células, assim cada célula deve conter uma cópia completa do genoma. A regulação do ciclo celular é de extrema importância para que um organismo se desenvolva normalmente. Conseqüentemente, a desregulação desse processo pode

levar a uma proliferação desnecessária e com isso trazer resultados indesejados como a formação de tumores (PERES; CURI, 2005).

A proliferação celular alterna mitose e intérfase. Esta última é composta pelas fases G1, S e G2. Na fase G1 ocorre a síntese de RNA e proteínas; em seguida ocorre a duplicação do DNA, na fase S e na fase G2 ocorre preparação das duas cromátides-irmãs para início da mitose (TESSEMA et al. 2004).

No ciclo celular existem os pontos de controle chamados *checkpoints*, que ocorrem de G1 para S (*restriction point*), dentro da fase S, e de G2 para M (início da mitose). Falhas nos *checkpoints* podem levar a perpetuação de danos no material genético e a formação de células com diferentes tipos de anormalidades, como células muito grandes com formações nucleares aberrantes derivadas de um processo denominado catástrofe mitótica (VANKIFAHMETOGLU et al., 2008).

Quando alterações são detectadas durante o ciclo celular, a célula pode ser encaminhada para apoptose, também conhecida como morte celular programada. Este mecanismo existe para extinguir células que sofreram alterações irreversíveis, principalmente em seu material genético ou como método de controle da renovação celular (SCHIMMER, 2004). A inibição desse processo e o aumento da sobrevivência celular, por exemplo, estão associadas ao desenvolvimento de doenças auto-imunes, inflamatórias, infecções virais e o câncer (MELNIKOVA; GOLDEN, 2004). Já o excesso de eventos apoptóticos está relacionado com doenças como a AIDS, hematológicas, desordens neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson, atrofia muscular espinhal e esclerose amiotrófica lateral (NIKITATIS et al., 2004).

Nos organismos saudáveis, a proliferação celular é controlada por genes que codificam proteínas ativas neste processo e que podem ser subdivididos em: protooncogenes, genes supressores de tumor e genes reguladores da apoptose. Nas células neoplásicas existe a perda do controle da proliferação celular (TESSEMA et al. 2004).

As funções de alguns dos principais genes envolvidos na regulação da apoptose e do ciclo celular e de suas proteínas são descritos a seguir.

### 2.2.1 Ciclina A2: Principais Funções na Progressão do Ciclo Celular

A mitose é iniciada por mudanças abruptas na atividade dos complexos cíclicos dependentes de quinases (complexo ciclina-CDK). Em suas formas simples, esses complexos são heterodímeros compostos de uma subunidade reguladora, as ciclinas, e uma subunidade catalítica, as quinases (CDKs). Em humanos, múltiplas CDKs estão envolvidas na mitose, existem aproximadamente 30 genes de ciclina e 21 genes CDK. Onze das ciclinas humanas (A1-2, B1-3, D1-3, E1-2 e H) e cinco das CDKs (CDK1, 2, 4, 6 e 7) têm sido bem estabelecidas como reguladores do ciclo celular. Muitas das ciclinas e CDKs remanescentes parecem ser reguladoras da transcrição (MORGAN, 2007).

A maneira como muitas ciclinas regulam a mitose ainda permanece incerta. Assim, algumas questões tais como: se diferentes ciclinas são dedicadas a diferentes eventos mitóticos; quanto de redundância existe entre ciclinas e CDKs; e como as funções ciclinas-CDKs são coordenadas, ainda não estão bem esclarecidas. Mas, evidências suportam a hipótese de que as ciclinas A e B são as principais ciclinas mitóticas em animais (MORGAN, 2007), com uma terceira classe (B3) sendo importante em algumas espécies (JACOBS et al., 1998).

A ciclina A é um componente necessário para o início da síntese de DNA durante a fase S e para a entrada na mitose. Existem dois subtipos de ciclina A: a ciclina A1, sua expressão está restrita a poucos tecidos, como por exemplo, aos testículos e linhagens leucêmicas; e a ciclina A2, que é expressa em quase todos os tecidos (YANG et al., 1997).

Em linhagens celulares de mamíferos, a ciclina A2 é detectada durante a fase S e é degradada durante a prometáfase, ela promove tanto a transição G1/S como a transição G2/M. A proteína Ciclina A2 se desloca dinamicamente entre o núcleo e o citoplasma e sua concentração no estado estacionário favorece o núcleo (JACKMAN et al., 2002).

As CDK1 e CDK2 se associam com as ciclinas A, B e B3. A ciclina tipo A pode se ligar as CDK1 (ou CDC2) e CDK2, já a ciclina tipo B se liga somente a CDK1 e a ciclina B3 associa-se apenas com CDK2.

Evidências indicam que a desregulação da ciclina A2 está fortemente associada a instabilidade cromossômica, transformação neoplásica e proliferação tumoral (NGUYEN et al., 2002). As células tumorais são caracterizadas pela

desregulação dos *checkpoints* do ciclo celular, levando a uma divisão e proliferação celular descontroladas. Isso pode ser causado pelo aumento de expressão das ciclinas ou ativação anormal das CDKs. Os níveis das ciclinas variam de maneira cíclica durante o ciclo celular para ativar as CDKs específicas exigidas para a progressão adequada do ciclo celular (HARTWELL; KASTAN, 1994).

A ciclina A2 é superexpressa em uma variedade de cânceres humanos se comparada com células ou tecidos normais. A expressão desregulada de ciclina A2 parece estar associada a eventos iniciais na transformação tumoral (BUI et al., 1993). Além disso, o seu nível de expressão em diversos tipos de câncer parece ser de valor prognóstico, tais como previsão de sobrevivência, agressividade ou recidiva precoce (VOLM et al., 1997).

A deleção de ciclina A2 em camundongos nocauteados está associada à letalidade em embriões (MURPHY, 1997). Além disso, a ciclina A2 e/ou o complexo ciclina A2-CDK2, mas não CDK2, é um alvo promissor anti-câncer com um alto potencial terapêutico (CHEN et al., 2004). Portanto, inibidores de CDK2 podem não ser apropriados para a terapia anti-câncer e mais esforços são focados na inibição da atividade de ciclina A2 e/ou do complexo ciclinaA2-CDK2. Wang et al., (2008), tem demonstrado que a redução de ciclina A2 em células humanas de leucemia mielóide crônica K562 usando siRNA ,inibe significativamente a proliferação celular, suportando melhor a idéia de que a ciclina A2 pode ter grande potencial como novo alvo terapêutico.

Alguns autores têm demonstrado potencial antiproliferativo da clorofilina pela inibição de ciclinas. Chimpoy et al. (2009) investigaram a expressão de reguladores chave do ciclo celular e verificaram redução na expressão das proteínas ciclina E, ciclina A e ciclina B em células HCT116 tratadas com clorofilina. Chiu et al. (2003) demonstraram que a clorofilina inibiu a proliferação celular nas linhagens HL-60 (leucemia promielocítica), K-16 562 (leucemia mielogênica), MCF-7 (carcinoma de mama) e na linhagem murina S-18017 (sarcoma). Para elucidar o mecanismo de inibição foram investigados os níveis protéicos de ciclina D1 e de ciclina E em células MCF-7 tratadas com 200 e 400 µg/mL de clorofilina durante 72 horas e observaram uma redução nos níveis de ambas. Os autores também verificaram um aumento no número de células na fase G2/M quando tratadas com 400 µg/mL clorofilina. Mais tarde Chiu et al. (2005) constataram o efeito anti-

proliferativo por meio da depleção da proteína ciclina D1 em células MCF-7 tratadas com 400 µg/mL de clorofilina.

### 2.2.2 O genes *APC* e *β-catenina* e as Principais Funções de suas Proteínas

O gene *APC* é expresso em uma grande variedade de tecidos epiteliais fetais e adultos. Existem muitas formas da proteína APC devido a modificações pós-transcricionais, *splicing* alternativo e degradação. As várias formas são expressas diferencialmente em determinados tecidos e tipos celulares. A APC nuclear, por exemplo, tem sido encontrada em muitos tecidos, como nos epitélios de mama e colorretal. A função de algumas variantes ainda é desconhecida (MIDGLEY et al., 1997).

A proteína APC regula a divisão celular por meio de sua capacidade de se ligar a  $\beta$ -catenina e levá-la a degradação mediada por proteassomo (WANG et al., 2006). A  $\beta$ -catenina naturalmente se liga e ativa outras proteínas, incluindo alguns fatores de transcrição que estimulam a expressão de genes cujos produtos protéicos (ciclina D1, c-myc e c-jun) promovem divisão celular (OLOUMI et al., 2004).

O aumento de expressão de APC em fibroblastos resulta no bloqueio da progressão do ciclo celular de G0/G1 para a fase S. Apesar de controverso, o bloqueio do ciclo celular pode ser resultado da inibição da atividade de CDK2. Embora sejam necessárias maiores investigações acerca da participação da APC na progressão do ciclo celular, sabe-se que a APC truncada pode influenciar a regulação do ciclo celular e assim contribuir para a formação de tumores (MORIN et al., 1996)

A proteína APC desempenha uma importante atividade na via de sinalização Wnt. Uma grande quantidade de dados bioquímicos e genéticos mostra que a característica central dessa via de sinalização, que desempenha uma atividade altamente conservada na diferenciação e proliferação celular, é a regulação da via Wnt mediada pela estabilidade do *pool* intracelular de  $\beta$ -catenina. Logo, a via de sinalização Wnt/  $\beta$ -catenina é essencial no início do desenvolvimento embrionário e em outros diversos processos fisiológicos (VAN ES et al., 2001).

As Wnts são uma ampla família de proteínas que participam de uma gama de processos biológicos celulares, como embriogênese, organogênese e

formação tumoral. Estas proteínas se ligam a complexos de receptor de membrana *frizzled* (Fz) acoplados a proteína G e outros co-receptores, formando grupos moleculares que iniciam três diferentes cascatas sinalizadoras intracelulares, levando a geração de fatores de transcrição que regulam vários eventos celulares, resultando em diferenciação celular seletiva, redução ou inibição dos mecanismos apoptóticos ou alterações no comportamento biológico de várias linhagens celulares (WANG et al., 2008).

O mau funcionamento da via de sinalização Wnt está relacionado a diversos tipos de câncer. A primeira ligação entre a via de sinalização Wnt e câncer foi observada quando a expressão ectópica de Wnt-1 promoveu a formação de tumores mamários em camundongos (NUSSE; VARMUS, 1982).

Mutações no gene *APC* são encontradas principalmente no câncer colorretal e em diferentes níveis, já as mutações no gene  *$\beta$ -catenina* têm sido encontrados em uma grande variedade de tumores, incluindo hepatocelular (de La Coste et al., 1998), uterino (FUKUCHI et al., 1998) e protático (VOELLER et al., 1998).

Em resumo, APC está envolvida na regulação do acúmulo de  $\beta$ -catenina no núcleo e, conseqüentemente, participa na *upregulation* de genes implicados em processos como ciclo, progressão e diferenciação celular.

Além de ser um importante componente da via de sinalização Wnt, a  $\beta$ -catenina tem participação crucial na adesão celular. Essa proteína liga-se às caderinas, auxiliando na união dos seus domínios citoplasmáticos à actina do citoesqueleto. As moléculas de adesão, em tecidos normais, promovem a coesão das células entre si com a matriz celular, além de estarem envolvidas com o movimento e a proliferação celular. Quando essas células sofrem algum tipo de mutação que comprometa direta ou indiretamente o funcionamento da adesão celular e os processos de proliferação celular, as células alteradas podem passar a utilizar esses efeitos como meios para a progressão tumoral (KUDO et al., 2004).

## 2.3 APOPTOSE

Em 1964, foi proposto o termo "morte celular programada" para designar um tipo de morte celular que ocorre de forma não acidental. Em 1972, Kerr, Wyllie e Currie sugeriram o termo apoptose para indicar esse tipo de morte celular.

A apoptose pode ser reconhecida por características morfológicas muito marcantes e coordenadas. Essas características incluem o encolhimento e perda de contato com as células vizinhas, formação de vacúolos citoplasmáticos, formação de *blebs* na membrana plasmática e nuclear, condensação da cromatina, fragmentação celular em corpúsculos que são fagocitados pelas células vizinhas e exposição do resíduo de fosfatidilserina na superfície externa da membrana plasmática (PLENCHETTE et al., 2004). Um fator importante na morte celular por apoptose é a possibilidade de ser distinguida facilmente da morte celular por necrose devido às suas características marcantes (WYLLIE et al., 1980).

Por meio da sequência programada de eventos para a eliminação de células sem prejudicar outras células ou tecidos, é mantida a saúde das células pela eliminação daquelas não saudáveis, em excesso ou anormais. Quando as células danificadas não sofrem apoptose podem se tornar cancerosas.

A apoptose é um processo ativo que pode ser desencadeado por diversos estímulos, tanto intra como extracelulares. Esse processo é controlado por genes específicos que podem participar, dentre outros, de cinco passos sequenciais e distintos, tais como: a "decisão" da célula morrer ou viver; a ativação dos mecanismos de morte celular; a execução do processo de morte celular; a eliminação por fagocitose e a degradação da célula morta. Os genes que atuam no primeiro passo afetam somente células específicas. Por outro lado, genes que atuam nos passos seguintes, afetam todas as células em processo de morte (WU; XUE, 2003).

### 2.3.1 Família das Caspases e as Principais vias de Ativação da Apoptose

Praticamente todos os estímulos desencadeiam a apoptose via ação das caspases, um grupo de enzimas proteolíticas sintetizadas como pró-enzimas inativas (MURPHY et al, 2003). Quando as células recebem um sinal de morte as caspases são ativadas por clivagem proteolítica. A interação entre essas enzimas

com os receptores de membrana ou moléculas adaptadoras acontece pela presença dos domínios de morte (*death domain*) (BOATRIGHT; SALVESEN, 2003).

As caspases possuem a capacidade de reconhecer e clivar substratos que possuam resíduos de aspartato, dessa maneira, elas sinalizam para a apoptose e clivam esses substratos, levando à condensação e fragmentação nuclear, externalização de fosfolipídios de membrana que irão sinalizar para estas células serem fagocitadas por macrófagos (BOATRIGHT; SALVESEN, 2003), por isso, o nome caspase, que deriva dessa função (*cysteine-aspartic-acid-proteases*).

As caspases podem ser divididas funcionalmente em três grupos: as iniciadoras ou desencadeantes representadas pelas caspases 2, 8, 9 e 10, que ativam outras caspases. Um segundo grupo inclui as efetoras ou executoras, ativadas pelas iniciadoras, que clivam as proteínas-chave que processam a apoptose, essas compreendem as caspases 3, 6 e 7. O terceiro grupo possui função inflamatória, pois estão envolvidas na maturação de citocinas, no qual estão incluídas as caspases 1, 4, 5, 11, 12, 13 e 14. O papel desse último grupo no processo apoptótico ainda não está bem esclarecido (CHANG; YANG, 2000).

As caspases também podem ser classificadas estruturalmente de acordo com seu pró-domínio e por sua função na apoptose. Caspases iniciadoras possuem pró-domínios longos, envolvidas na iniciação da cascata proteolítica. Caspases efetoras apresentam pró-domínios curtos ou inexistentes, responsáveis pela clivagem de substratos (RUPNARAIN et al., 2004). Entre os diversos substratos das caspases pode-se citar a mdm-2 (*murine double minute*), uma proteína que se liga à p53, mantendo-a no citoplasma. Ao ser clivada pelas caspases, essa proteína libera a p53 que se transloca para o núcleo, ativando a transcrição de genes pró-apoptóticos como o BAX (SCHULER; MAURER; GOLDSTEIN, 2003).

A ativação e o controle da cascata das caspases são essenciais para os diversos processos celulares envolvidos na homeostasia e diferenciação celular. Conseqüentemente, o controle da atividade das caspases apresenta grande potencial terapêutico.

Em mamíferos, a morte celular programada apresenta duas vias, a via extrínseca ou via do receptor da morte (caspase-8) e a intrínseca ou via mitocondrial (caspase-9) (YIN et al., 2003). Ambas apresentam três fases: iniciação, decisão e degradação (FERRI; KROEMER, 2001).

De maneira simplificada, a via extrínseca é desencadeada pela ativação de caspases associadas à via de sinalização dos receptores de morte. Os receptores da morte pertencem à família das proteínas dos fatores de necrose tumoral (rTNF) e estão localizados na superfície celular, sendo caracterizados como domínios extracelulares ricos em cisteína. Esses receptores transmitem sinais apoptóticos iniciados por ligantes de morte específicos (SHI, 2003).

Esta ligação é capaz de ativar a cascata das caspases. Por meio do subdomínio extracelular rico em cisteína que os rTNF reconhecem seus ligantes, o que resulta na trimerização e consequente ativação dos receptores de morte específicos. A sinalização a seguir é mediada pela porção citoplasmática desses receptores que contém uma sequência de 65 aminoácidos chamada "domínio de morte" sendo, por isso, chamados de "receptores de morte celular" (NAISMITH; SPRANG, 1998). Quando os receptores de morte celular reconhecem um ligante específico, os seus domínios de morte interagem com moléculas conhecidas como FADD/MORT-1. Essas moléculas têm a capacidade de recrutar a caspase-8 que irá ativar a caspase-3, executando a morte por apoptose (DANIEL et al., 2001).

A via intrínseca é ativada por vários agentes físicos, químicos ou biológicos, que podem convergir para a mitocôndria e disparar a fase de iniciação. Durante a apoptose a permeabilidade das membranas mitocondriais sofre um grande aumento, mas a maneira como o processo ocorre ainda não está bem esclarecida. Uma das teorias propõe que a indução da abertura de um grande poro na mitocôndria, o Poro de Transição de Permeabilidade Mitocondrial, é responsável pelo disparo do processo. Logo, agentes que geram estresse intracelular ou extracelular como a deprivação de fatores de crescimento, danos no DNA, hipóxia ou ativação de oncogenes, entre outros, induzem a abertura do poro (FERRI; KROEMER, 2001).

Os sinais que são traduzidos em resposta a estes insultos convergem principalmente para a mitocôndria (HENGARTNER, 200). Inúmeros estudos sobre apoptose apontam a mitocôndria como o principal mediador desse tipo de morte. Essa organela integra os estímulos de morte celular, induzindo a permeabilização mitocondrial e consequente liberação de moléculas pró-apoptóticas nela presentes (DESAGHER et al., 200).

Os sinais de morte chegam até a mitocôndria, levando ao colapso do potencial da membrana mitocondrial interna ( $\Delta\psi$ ) e a uma transição da

permeabilidade mitocondrial (TPM). Concomitantemente, a água do espaço entre membranas passa para a matriz mitocondrial, o que leva à ruptura da organela e consequente liberação de proteínas pró-apoptóticas para o citoplasma (GUPTA, 2003). Além da liberação de moléculas pela mitocôndria, a indução do  $\Delta\psi$  e TPM levam à perda da homeostasia celular, interrompendo a síntese de ATP e aumentando a produção de espécies reativas do oxigênio (EROS) (KROEMER; REED, 2000). O aumento nos níveis de EROS leva à oxidação de lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, aumentando o colapso do  $\Delta\psi$  (GREEN; KROEMER, 2004). A resposta da mitocôndria ao dano oxidativo é, portanto, uma via importante no início da apoptose. Além disso, é sabido que as EROS induzem a ativação das caspases-9 e 3 (GOTTLIEB; HEIDEN; THOMPSON, 2000).

Os diferentes sinais indutores de apoptose são detectados pela mitocôndria, fazendo com que ocorra um desacoplamento da cadeia respiratória e consequente liberação de citocromo c e proteínas ativadoras da apoptose para o citosol (GUPTA, 2003). Quando no citosol, o citocromo c forma um complexo com a APAF-1 e a caspase-9, o chamado apoptossomo, que promove a clivagem da pró-caspase-9, liberando a caspase-9 ativa (BUDIARDJO et al, 1999). Uma vez ativada, a caspase-9 ativa a caspase-3 ocasionando a apoptose (RUPNARAIN et al., 2004).

### 2.3.2 Survivina: Proteína Inibidora da Apoptose e seu Papel no Ciclo celular

As proteínas inibidoras da apoptose ou IAP (*Inhibitor of Apoptosis Protein*) são proteínas celulares que atuam regulando a cascata das caspases. As IAPs inibem as caspases iniciadoras e efetoras e influenciam a morte celular, sendo os únicos reguladores endógenos conhecidos da atividade dessas proteínas. O processo de apoptose é influenciado tanto por proteínas pró como anti-apoptóticas nos seus diversos passos. O equilíbrio entre a cascata das caspases, indutoras da morte celular e as proteínas, inibidoras da apoptose constituem ponto fundamental neste processo.

A survivina, também denominada BIRC5 ou AP14, pertencente à classe III da família das IAPs é codificada por gene localizado no cromossomo 17q25 e tem peso molecular de 16,5 Kd. Esta família é constituída por proteínas cujas moléculas anti-apoptóticas são caracterizadas pela presença de um a três

domínios BIR (*baculoviral repeats*), de uma terminação COOH, de um domínio *ring finger* e de um domínio para recrutamento de caspases (cisteíno-aspartases). A família IAP inclui as seguintes proteínas: X-IAP (proteína inibidora da apoptose ligada ao X), a IAP2 (IAP *like* 2), a cIAP1, a cIAP2, a MLIAP (proteína inibidora da apoptose do melanoma), a NIAP (neuro-proteína inibidora da apoptose), a Bruce e a survivina, entre outras (SON et al., 2005).

A expressão do gene *BIRC5* é controlada por mecanismos de transcrição, *splicing* alternativo e extensas modificações pós-transcricionais. Em nível transcricional, a survivina pode ser regulada pela  $\beta$ -catenina, pelos fatores de transcrição Sp1, Stat3, HIF-1 $\alpha$  e pelo p53 que pode reprimir de maneira transcricional sua expressão (ALTIERI, 2003).

Um grande número de evidências indica que a survivina é uma proteína essencial na regulação da progressão da mitose, inibição da apoptose e resistência à radioterapia e à quimioterapia em diversos tipos de câncer (LI; LING, 2006) e também possui atividade importante sobre a angiogênese (O'CONNOR et al., 2000), devido à sua capacidade de inibir apoptose em células endoteliais (DUFFY et al. 2007). Dessa maneira, as IAPs têm sido avaliadas como potencial alvo terapêutico em uma ampla gama de doenças (LISTON et al. 2003). A survivina foi descrita, primeiramente, por Ambrosini et al. em 1997 em estudo de carcinomas e linfomas, constatando a proteína em carcinomas de pulmão, pâncreas, cólon e mama.

Além da sua importante atividade na regulação da apoptose, a survivina também atua na proliferação celular, pois possui atividade na fase G2/M do ciclo celular. Ela é componente de um complexo protéico cromossômico temporário, que é essencial para alinhamento do cromossomo durante a mitose e citocinese (DUBREZ-DALOZ et al., 2008). Durante a fase G2 a survivina concentra-se próxima aos centrômeros, está difusa nos braços cromossômicos e no interior dos centrômeros durante a prófase e prometáfase. Na anáfase ela se reposiciona próxima ao fuso e na citocinese é encontrada no ponto de união entre as duas células em formação e, posteriormente, é expulsa durante a separação das células-filhas (MITA et al., 2008).

O mecanismo pelo qual se dá tal regulação ainda não se encontra perfeitamente estabelecido. No entanto, admite-se que essa proteína, ao associar-se à enzima aurora B quinase e às moléculas reguladoras da citocinese, atue na

estabilidade dos microtúbulos e na formação do sulco de clivagem na telófase (FORTUGNO et al., 2002).

Segundo De Maria et al. (2008) existem cinco isoformas de survivina (survivina, survivina-2, survivina-2B, survivina-3B, e survivina-Ex3). Segundo Qui et al. (2010) a survivina nuclear é uma subunidade do complexo cromossômico de passagem para regulação da divisão celular, enquanto a survivina citoplasmática é cito-protetora, interferindo na ação das caspases.

A expressão da survivina em tecidos diferenciados normais é rara, ocorrendo apenas em células embrionárias, do timo e epiteliais da camada basal. No entanto, é altamente expressa em neoplasias e tecidos pré-neoplásicos e pode estar relacionada ao maior potencial de transformação neoplásica e prognóstico ruim (FREIER et al., 2006). Entretanto, um crescente número de estudos tem demonstrado a expressão da survivina em tecidos adultos e células normais (LECHLER; WU; BERNHARDT, 2007).

### 2.3.3 TP53

O *TP53* é o gene supressor de tumor mais bem estudado em tumores humanos. Este gene codifica uma fosfoproteína nuclear (p53) que tem papel ativo na parada do ciclo celular e na indução da expressão de genes de reparo de DNA lesado. Quando há uma lesão no DNA, o nível de p53 na célula aumenta e, após o reparo o nível diminui. Dependendo da intensidade do agravo, p53 pode induzir a morte das células geneticamente alteradas via indução do gene pró-apoptótico *BAX* (NAKAMURA; GOMYO; ROTH, 2002).

O gene é ativado em resposta aos sinais de dano celular. Seu fator de transcrição interage com pelo menos outros seis genes. Por exemplo, liga-se ao promotor do gene *p21*, cujo produto protéico é um inibidor de quinase dependente de ciclina que bloqueia a inativação de pRb por CDK4. Esta atividade promove a parada do ciclo celular na fase G1, portanto, antes de ocorrer a duplicação do DNA (fase S), permitindo o reparo do DNA danificado. Uma alternativa de atuação da p53 a danos não reparados, caso a via com a proteína pRb não esteja intacta, é a indução da apoptose. Além disso, *p53* também promove um *checkpoint* de S para G2, que depende da integridade do domínio C-terminal do gene. Portanto, quando *p53* sofre mutações, as células com danos no DNA, que por um processo de

seleção natural favorável podem desencadear a transformação maligna, escapam do reparo destes danos e de sua destruição, podendo iniciar um clone maligno (NAKAMURA; GOMYO; ROTH, 2002).

Embora seja considerado um gene supressor de tumor, porque a maioria das mutações leva à perda de função, *TP53* quando sofre alguns tipos de mutações pode exercer um efeito negativo dominante, ou seja, o produto do único alelo mutado interage e inativa o alelo normal, induzindo o câncer e atuando, portanto, como um oncogene (LEVINE, 1997).

#### 2.3.4 Membros da Família Bcl-2

Os membros da família Bcl-2 têm sido agrupados em três classes distintas ou subfamílias (YOULE; STRASSER, 2008), os quais são distinguidos estruturalmente pela quantidade de regiões de homologia Bcl-2 que totalizam quatro. Essas regiões são conhecidas como domínios BH (sequências conservadas nas proteínas e compartilhadas entre elas). Uma das subfamílias inclui os inibidores de apoptose: *BCL-2*, *BCL-XL*, *BCL-W*, *MCL1*, *BCL-B* (também conhecido como *BCL-2L10*) e *A1* (também conhecido como *BCL-2A1*). Os integrantes dessa classe possuem multidomínios, sendo eles BH1, 2, 3 e 4. Em uma segunda classe, estão os promotores de apoptose ou pró-apoptóticos: *BAX*, *BAK*, *BOK* (também conhecido como *MTD*) e *BCL RAMBO*, os quais possuem os domínios BH1, 2 e 3. Por fim, em uma classe distinta, estão incluídas as proteínas *BH3 only*: *BAD*, *BIK* (também conhecida como *BLK* ou *NBK*), *BID*, *HRK* (também conhecida *DP5*), *BIM* (conhecida também como *BOD*), *BMF*, *NOXA* e *PUMA* ou *BBC3* (FERRI; KROEMER, 2001). As proteínas dessa terceira classe possuem um único domínio conservado BH3, são ligantes que podem regular a atividade dos membros *BCL-2* anti e pró-apoptóticos para promover ou inibir a apoptose (YOULE, 2007).

Os membros pró-apoptóticos *BAX* e *BAK* parecem ser cruciais para induzir a permeabilização da membrana mitocondrial externa e a subsequente liberação das moléculas apoptogênicas, como o citocromo *c* e *SMAC/DIABLO*, a qual leva a ativação das caspases. Os membros da família das anti-apoptóticas, como *BCL-2* e *BCL-XL*, inibem *BAX* e *BAK*. Evidências recentes mostram que as proteínas *BH3 only* ativam *Bax* e *Bak* por ligação direta e inibição de *BCL-2* e outros membros da família anti-apoptótica (WILLIS *et al.*, 2007). Em contraste, o modelo de

Youle (2007) propõe a ativação direta de *BAX* e *BAK* por algumas *BH3-only*, especificamente BIM, tBID and PUMA.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da clorofilina na citotoxicidade e na expressão de genes envolvidos na apoptose e ciclo celular em células de mama não tumorais (HB4a).

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar o potencial citotóxico da clorofilina em diferentes concentrações e períodos de tratamento;
- Analisar o efeito da clorofilina na expressão gênica dos principais genes da família Bcl-2: os anti-apoptóticos *BCL-2* e *BCL-XL*, e os pró-apoptóticos *BAX* e *BAK*;
- Analisar o efeito da clorofilina na expressão gênica dos genes da família das caspases: *CASP3*, *CASP7*, *CASP8* e *CASP9*;
- Analisar o efeito da clorofilina na expressão dos genes *APC*,  $\beta$ -*Catenina*, *BIRC5* e *Ciclina A2* envolvidos no controle do ciclo celular.
- Avaliar o efeito de diferentes concentrações e períodos de exposição à clorofilina na expressão dos genes escolhidos.

**4 ARTIGO**

**EFEITO DA CLOROFILINA NA EXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS NA  
APOPTOSE E NO CICLO CELULAR EM CÉLULAS DE MAMA NÃO TUMORAIS  
(HB4A).**

**Gláucia Fernanda Rocha D'Epiro; Simone Cristine Semprebon; Andressa  
Megumi Niwa; Juliana Cristina Marcarini; Mário Sérigo Mantovani\***

Artigo a ser submetido ao periódico Cytotechnology

## EFEITO DA CLOROFILINA NA EXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS NA APOPTOSE E NO CICLO CELULAR EM CÉLULAS DE MAMA NÃO TUMORAIS (HB4A).

Gláucia Fernanda Rocha D´Epiro<sup>1</sup>; Simone Cristine Semprebon<sup>a</sup>; Andressa Megumi Niwa<sup>a</sup>; Juliana Cristina Marcarini<sup>2</sup>; Mário Sérgio Mantovani<sup>a,\*</sup>

### Resumo

A molécula de clorofilina é muito estudada pela comunidade científica por apresentar, entre outras, propriedades quimiopreventiva, antimutagênica e anticarcinogênica. No entanto, os mecanismos moleculares de ação desse composto ainda não estão esclarecidos. Dessa maneira, o estudo de genes envolvidos na apoptose e no ciclo celular em células não tumorais tratadas com clorofilina pode fornecer informações importantes sobre os mecanismos que protegem ou desencadeiam toxicidade às células, auxiliando na compreensão e no desenvolvimento de terapias. Neste contexto, nós avaliamos o potencial citotóxico da clorofilina e o seu efeito na expressão de genes envolvidos na apoptose (anti e pró-apoptóticos: *BCL-2*, *BCL-XL*, *BAX* E *BAK*; da família das Caspases: *CASP3*, *CASP7*, *CASP 8* e *CASP9*) e de ciclo celular (*BIRC5*, *TP53*, *APC*, *CiclinaA2* e  $\beta$ -*catenina*) em cultura de células de mama não tumorais (HB4a). No ensaio de citotoxicidade a clorofilina apresentou potencial citotóxico em 48 e 72 h em todas as concentrações utilizadas (100, 200 e 400  $\mu\text{g/mL}$ ) quando comparadas ao controle. O estudo da expressão gênica foi realizado por meio do ensaio de qRT-PCR em tempo real. As células HB4a foram expostas à 100 e 200  $\mu\text{g/mL}$  de clorofilina nos tempos de 24, 48 e 72 h. A redução dos níveis de *BIRC5*, relacionado aos processos de apoptose e ciclo celular foi dose dependente, o gene foi menos expresso no tratamento com 200  $\mu\text{g/mL}$  de clorofilina em 24, 48 e 72 h. O gene *CCNA2* foi menos expresso com 24, 48 e 72 h de exposição à 200  $\mu\text{g/mL}$  de clorofilina, e com 72 h de exposição à 100  $\mu\text{g/mL}$ . Em relação aos genes pró-apoptóticos, foi observado aumento significativo na expressão de *BAX* em 24, 48 e 72 h de exposição à 200  $\mu\text{g/mL}$  de clorofilina, e em 72 h de exposição à 100  $\mu\text{g/mL}$ . Não houve alteração significativa de *BAK* quando comparado ao controle. Também foi observado aumento de expressão dos anti-apoptóticos *BCL-2* e *BCL-XL*. O gene *BCL-XL* apresentou aumento de expressão nos três tempos testados com 200  $\mu\text{g/mL}$  de clorofilina, e a exposição à 100  $\mu\text{g/mL}$  levou ao aumento de expressão somente em 24 h. Já o gene *BCL-2* obteve aumento de expressão apenas em 72 h com 200  $\mu\text{g/mL}$  de clorofilina. Os demais genes analisados não apresentaram alteração significativa. A inibição da expressão dos genes envolvidos no ciclo celular sugere um efeito decorrente da citotoxicidade da clorofilina, bem como o aumento da expressão dos genes pró-apoptóticos, enquanto que o aumento da expressão dos genes anti-apoptóticos sugere inibição da apoptose como proteção da morte celular induzida pela clorofilina.

**Palavras-chave:** Clorofilina. Ciclo celular. Apoptose. Expressão gênica.

<sup>1</sup> Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.

<sup>2</sup> Departamento de Biologia Celular, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, São Paulo, Brasil.

## 4 1 INTRODUÇÃO

O aumento do consumo de frutas e vegetais é associado à redução do risco de desenvolvimento de doenças, intensificando, assim, o interesse em fitoquímicos como agentes com potencial fisiologicamente ativo (STEINMETZ, 1996). A clorofila e seus derivados possuem longa e bem estabelecida história de uso na medicina tradicional para fins terapêuticos (KEPHART, 1955).

A clorofilina cúprica é um derivado semi-sintético da clorofila, diferenciando-se pela substituição do átomo central de magnésio por um átomo de cobre e por não possuir o grupo fitol. Quimicamente a clorofilina é uma molécula bastante estável e hidrossolúvel e por esses motivos é comumente utilizada e aprovada em alguns países como aditivo nos alimentos, aos quais confere coloração verde (SARKAR et al., 1995).

Tanto a clorofila natural como seus derivados comerciais, como a clorofilina cúprica, têm sido amplamente investigados por possuírem uma série de propriedades biológicas benéficas, bem como anti-inflamatórias e cicatrizantes (LARATO; PFAU, 1970), além de atuar no controle do oxalato de sódio no tratamento de cálculos renais (TAWASHI et al., 1980) e de odores corporais internos (YOUNG; BEREGE, 1980). Registra-se também, o seu potencial na prevenção do câncer que tem atraído grande atenção da comunidade científica. Por isso, são necessários novos esforços na identificação do potencial dessas substâncias na prevenção de doenças bem como na investigação dos seus mecanismos de ação para garantir a segurança no consumo.

A quimioprevenção pode ser conseguida por meio de uma suplementação na dieta com quimioprotetores derivados de produtos naturais ou sintéticos. Muitos estudos demonstram o potencial quimioprotetor da clorofilina, que é atribuído principalmente às suas atividades antimutagênica, anticarcinogênica (EGNER et al., 2001) e antioxidante (KUMAR et al., 2004), podendo atuar como interceptador de mutágenos e nas vias de regulação de detoxificação (SINGH et al., 1996).

Além disso, a clorofilina é descrita, como um agente terapêutico em potencial contra o câncer, pois apresenta potencial indutor de apoptose e capacidade de inibir a proliferação de células tumorais (DIAZ et al., 2003; CHIU et al., 2005).

A clorofilina demonstrou induzir apoptose em células de câncer de cólon (HCT 116) pelo provável mecanismo de ativação da via da caspase-8 resultando na condensação nuclear (DIAZ et al., 2003). Entretanto, Sharma et al. (2007) demonstraram que a clorofilina pode apresentar potencial inibitório da apoptose em linfócitos de camundongos. No estudo a clorofilina aumentou os níveis de expressão de genes antiapoptóticos, *BCL-2* e *BCL-XL*.

O potencial antiproliferativo da clorofilina tem sido relacionado por alguns autores com a inibição de importantes reguladores do ciclo celular, entre eles as ciclinas (CHIMPLOY et al., 2009; CHIU et al., 2003).

O estudo de genes envolvidos na progressão do ciclo celular e na apoptose de células normais pode fornecer informações importantes acerca dos mecanismos que protegem ou desencadeiam processos prejudiciais nas células e, por sua vez, ser utilizado para auxiliar no desenvolvimento de terapias.

Inúmeros genes e proteínas estão envolvidos no processo apoptótico, neste estudo, optou-se pelo estudo dos genes: *CASP8* e *CASP9*, os quais estão envolvidos, respectivamente na fase iniciadora das vias extrínseca e intrínseca da apoptose; *CASP3* e *CASP7*, genes da fase efetora; dos genes pró-apoptóticos *BAK* e *BAX*; e dos genes anti-apoptóticos *BCL-XL* e *BCL-2*. Alguns dos principais genes relacionados ao ciclo celular também foram avaliados, tais como: *Ciclina A2*, necessário para o início da síntese de DNA e entrada na mitose; *APC* e  *$\beta$ -Catenina*, os quais desempenham uma importante atividade nas vias de regulação do ciclo celular; *TP53*, que tem papel ativo nos pontos de checagem do ciclo celular e *BIRC5*, essencial na regulação da progressão da mitose e inibição da apoptose (YOULE; STRASSER, 2008).

O potencial indutor de apoptose da clorofilina e a sua capacidade em inibir a proliferação em células tumorais têm sido fortemente evidenciados (CHIU et al., 2005; CHIU et al., 2003; DIAZ et al., 2003), no entanto, pouco se sabe sobre os efeitos desse pigmento em células não tumorais, podendo a clorofilina apresentar resultados controversos àqueles encontrados em células tumorais (SHARMA et al., 2007). Também escassas são as informações sobre os efeitos da clorofilina na expressão gênica de células não tumorais, sendo que, muitos eventos celulares sobre a sobrevivência, crescimento e diferenciação são refletidos nos padrões alterados da expressão gênica (ZAMORANO et al., 1996). Por isso, a capacidade de

quantificar os níveis de transcrição de genes específicos é essencial na pesquisa de substâncias com potencial quimiopreventivo e/ou terapêutico.

Neste contexto, o estudo teve como objetivo investigar o potencial citotóxico da clorofilina e seu efeito na expressão dos genes envolvidos no mecanismo apoptótico e no ciclo celular na linhagem não tumoral HB4a, sendo que para isso, foram utilizadas diferentes concentrações e períodos de exposição.

## 4. 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 4. 2. 1 Agentes Químicos

A clorofilina foi adquirida comercialmente (Chlorophyllin sodium copper salt-Sigma Aldrich<sup>®</sup>) e as concentrações utilizadas foram definidas no Ensaio de Citotoxicidade - MTT. A clorofilina foi dissolvida em meio de cultura D-MEM (Gibco<sup>®</sup>) e esterilizada por filtração (Millex<sup>®</sup> - Millipore 0,22  $\mu\text{m}$ ). Para o Ensaio de Citotoxicidade a Doxorubicina (CAS 25316-40-9, Adriblastina<sup>®</sup> - Pharmacia) foi utilizada como controle positivo na concentração final de 10  $\mu\text{g/mL}$ .

### 4. 2. 2 Linhagem Celular

A linhagem de células HB4a (linhagem epitelial de mama não tumoral), utilizada neste estudo foi cedida pelo Hospital AC Camargo. Estas foram cultivadas em frascos de cultura de 25  $\text{cm}^2$  contendo meio D-MEM suplementado com 10% de soro bovino fetal (Gibco<sup>®</sup>), 5  $\mu\text{g/mL}$  de insulina (Gibco<sup>®</sup>) e 5  $\mu\text{g/mL}$  de hidrocortisona (Pharma Nostra<sup>®</sup>), acrescida de solução antibiótica-antimicótica (Gibco<sup>®</sup>) e encubadas em  $\text{CO}_2$  (5%) a 37°C. Nestas condições, o ciclo celular é de 24 horas.

### 4. 2. 3 Ensaio de Citotoxicidade

A citotoxicidade foi avaliada por meio do Ensaio do MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide) (Invitrogen<sup>®</sup>) descrito por Mossmann (1983) com modificações. Foram utilizadas placas de cultura de 24 poços, com  $4 \times 10^4$  células, com exceção dos poços branco (controle da leitura). As

células foram incubadas por 24 h para estabilização e após este período o meio de cultura foi descartado e adicionado meio novo sob as seguintes condições: células sem tratamento; células expostas a 10 µg/mL de doxorubicina; células expostas a clorofilina (100, 200 e 400 µg/mL), por 24, 48 e 72 h.

Após o término de cada período, os tratamentos foram retirados e uma solução de MTT (0,000167 µg/mL) foi adicionada. As placas foram incubadas por 4 h em CO<sub>2</sub> (5%) a 37°C. Depois disso, a solução de MTT foi removida, os cristais de formazan foram dissolvidos em 500 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) e as placas foram lidas em espectrofotômetro (Uniscience) a 540 nm. O ensaio foi realizado em quatro replicatas e três experimentos independentes.

Para o cálculo da taxa de sobrevivência, foi utilizada a seguinte fórmula: % de sobrevivência =  $(AT-AB)/(AC-AB)$ , onde AT= Absorbância média do tratamento; AB= Absorbância média do branco e AC= Absorbância média do controle.

#### 4. 2. 4 Análise da Expressão Gênica

A expressão gênica foi analisada por meio da técnica de qRT-PCR. Cerca de  $1,5 \times 10^6$  células foram cultivadas em frascos de cultura de 75 cm<sup>2</sup>. Após 24 h de estabilização o experimento foi delineado da seguinte forma: células HB4a sem tratamento; e células HB4a expostas a 100 e 200 µg/mL de clorofilina por 24, 48 e 72 h. Os três experimento foram realizados simultaneamente. Foram analisados os transcritos dos genes relacionados com a apoptose e ciclo celular: *CASP3*, *CASP7*, *CASP9*, *CASP8*, *BAK*, *BAX*, *BCL-2*, *BCL-XL*, *BIRC5*, *TP53*, *APC*, *CCNA2* e β-catenina. A relação dos *primers* utilizados neste estudo pode ser observada na Tabela 1.

O RNA total foi isolado usando o reagente Trizol-LS (Invitrogen®), de acordo com o protocolo do reagente. A integridade do RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 1%, observando-se a presença e a intensidade de bandas correspondentes às frações 28S e 18S dos RNA ribossomais. Para avaliar a pureza e quantificar as amostras de RNA, foi realizada leitura espectrofotométrica a 260 nm e 280 nm. As amostras aceitas para o prosseguimento do experimento foram aquelas onde a razão estava compreendida entre 1,9 e 2,1.

A síntese do cDNA foi feita utilizando-se 200 unidades de transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen®) e 1 µg de RNA total, com o *primer* oligo(dT), de acordo com o protocolo da enzima. Para a validação dos experimentos de qTR-PCR foram feitas reações utilizando o gene normalizador (GAPDH) antes de serem testados os genes de interesse, as amostras dos tratamentos deveriam apresentar os valores de Cts e eficiências próximas.

As reações de PCR em tempo real foram realizadas no termociclador PTC 200 DNA Engine Cycler, usando o sistema de detecção Chromo 4 (MJ Research- BIO RAD®). A detecção da amplificação foi feita por fluorescência emitida pelo fluoróforo SYBR Green (Platinum SYBR Green qPCR Supermix-UDG - Invitrogen®) ao se ligar à dupla fita de DNA. As condições da PCR no termociclador foram as seguintes: um passo inicial a 50°C por 1 min, seguido de 95° por 3 min., 35 ciclos a 95°C por 20 seg., 60°C por 30 seg., 72°C por 20 seg., seguidos de 95°C por 10 seg. e 40°C por 1 min. A análise da curva de *melting* foi realizada com temperatura de 50°C até 95°C a cada 0,5°C por 5 seg. Os dados foram normalizados com *primers* para *gliceraldeído-3-fosfatodesidrogenase (GAPDH)* amplificados em cada conjunto de experimentos de PCRs.

#### 4. 2. 5 Análise Estatística

Os valores de absorbância obtidos por meio do ensaio de citotoxicidade foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA), seguida de Teste de Dunnett ( $p < 0,001$ ).

A análise dos valores relativos de expressão dos genes e normalização pelo gene normalizador *GAPDH* foram realizadas pelo cálculo de Pfaffl et al. (2001). Foram considerados significativos os níveis de expressão relativa com razão igual ou superior a 2.

**Tabela 1** – Relação dos *primers* utilizados na análise da expressão gênica.

<b>Gene</b>	<b>Primers</b>	<b>Referência</b>
<i>CCNA2</i>	F: 5' GACCCTGCATTTGGCTGTG 3' R: 5' ACAAACCTCTGCTACTTCTGG 3'	Hsieh, 2006
<i>APC</i>	F: 5'AAAGCGCCATGATATTGCACGGTC 3' R: 5'TGTTTGCTGTGCTCACGTTTCCAG 3'	Mauro et al., 2011
<i>β-catenina</i>	F: 5'CCTATGCAGGGGTGGTCAAC3' R: 5'CGACCTGGAAAACGCCATCA3'	Presente estudo *
<i>CASP3</i>	F: 5' GTGCTACAATGCCCTGGAT 3' R: 5' GCCCATTCAATTTATTGCTTTC C 3'	Presente estudo*
<i>CASP7</i>	F: 5' TCACCATGCGATCCATCAAGACCA 3' R: 5' TTTGTCTGTTCCGTTTTCGAACGCC 3'	Presente estudo*
<i>CASP8</i>	F: 5' GCAAAGCACGGGAGAAAGT 3' R: 5' TGCATCCAAGTGTGTTCCATT3'	Castañeda; Rosin-Steiner, 2006
<i>CASP9</i>	F: 5' GCTCTTCCTTTGTTTCATCTCC 3' R: 5' GTTTTCTAGGGTTGGCTTCG 3'	Mauro et al., 2011
<i>BAK</i>	F: 5' CAAGAT TGCCACCAGCCTGTT TGA 3' R: 5' ATGCAGTGATGCAGCATGAAGTCG 3'	Presente estudo *
<i>BAX</i>	F: 5' TTTCTGACGGCAACTTCAACTGGG 3' R: 5' TGTCCAGCCCATGATGGTTCTGAT 3'	Presente estudo*
<i>BCL-2</i>	F: 5'CCTCGTCCAAGAATGCAAAGCACA 3' R: 5'ATCTCCCGTTATCGTACCCTGTT 3'	Presente estudo *
<i>BCL-XL</i>	F: 5' TGGGCTCACTCTTCAGTCGGAAAT 3' R: 5' ATGTAGTGGTTCTCCTGGTGGCAA3'	Mauro et al., 2011
<i>BIRC5</i>	F: 5' AGCCCTTTCTCAAGGACCAC 3' R:5'TGGCTCGTTCTCAGTGGGGCA GT3'	Presente estudo*
<i>TP53</i>	F: 5' TCACACCATCCACTACAAC 3' R: 5 'GACAGGCACAAACACGCAC 3'	Presente estudo *
<i>GAPDH</i>	F: 5' GAAGGTGAAGGTCGGAGTC 3' R: 5' GGAAGATGGTGATGGGATTT 3'	Sugaya, 2005

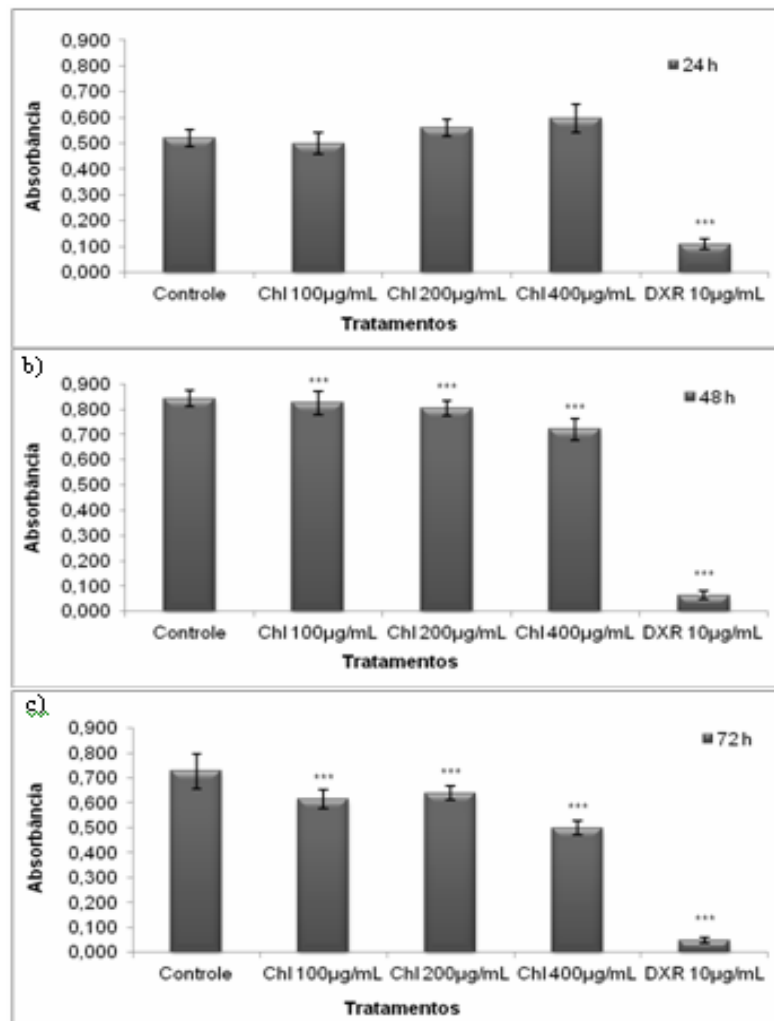
\*Sequências dos *primers* construídos para o presente estudo através do programa disponível no site do fornecedor ([www.idtdna.com/Scitools/Applications/Primerquest/](http://www.idtdna.com/Scitools/Applications/Primerquest/)).

### 4.3 RESULTADOS

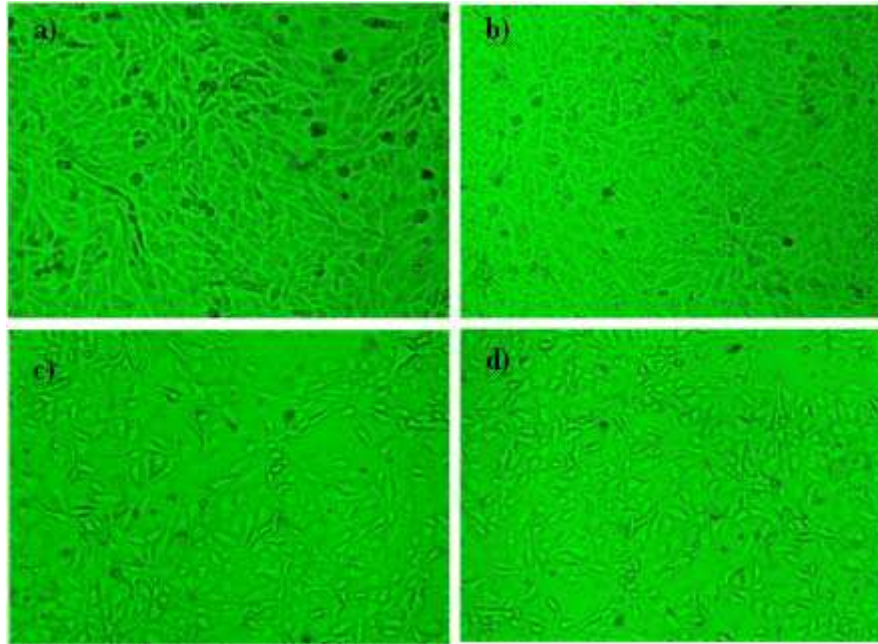
#### 4.3.1 Ensaio de Citotoxicidade (MTT)

Por meio do ensaio de citotoxicidade foi possível observar que a clorofilina não apresentou potencial citotóxico no tempo de 24 horas (Figura 1. a). Já em 48 e 72 horas todas as concentrações (100, 200 e 400 µg/mL) foram citotóxicas em relação ao controle como pode ser observado na Figura 1. b) e c). O valor mínimo de sobrevivência celular encontrado foi de 68% na maior concentração testada (400 µg/mL) após 48 horas de tratamento. Na Figura 2 são apresentadas as células HB4a tratadas com as diferentes concentrações de clorofilina.

**Figura 1** – Absorbância das células tratadas com diferentes concentrações de clorofilina nos períodos de: a) 24; b) 48 e c) 72 h. As barras representam as médias  $\pm$  desvio padrão obtidos em três experimentos independentes. Diferença estatística: \*\*\* ( $p < 0,001$ ).



**Figura 2** – Células HB4a tratadas com clorofilina por 48 h: a) Controle; b) 100 µg/mL; c) 200 µg/mL e d) 400 µg/mL. Aumento de 40 X.

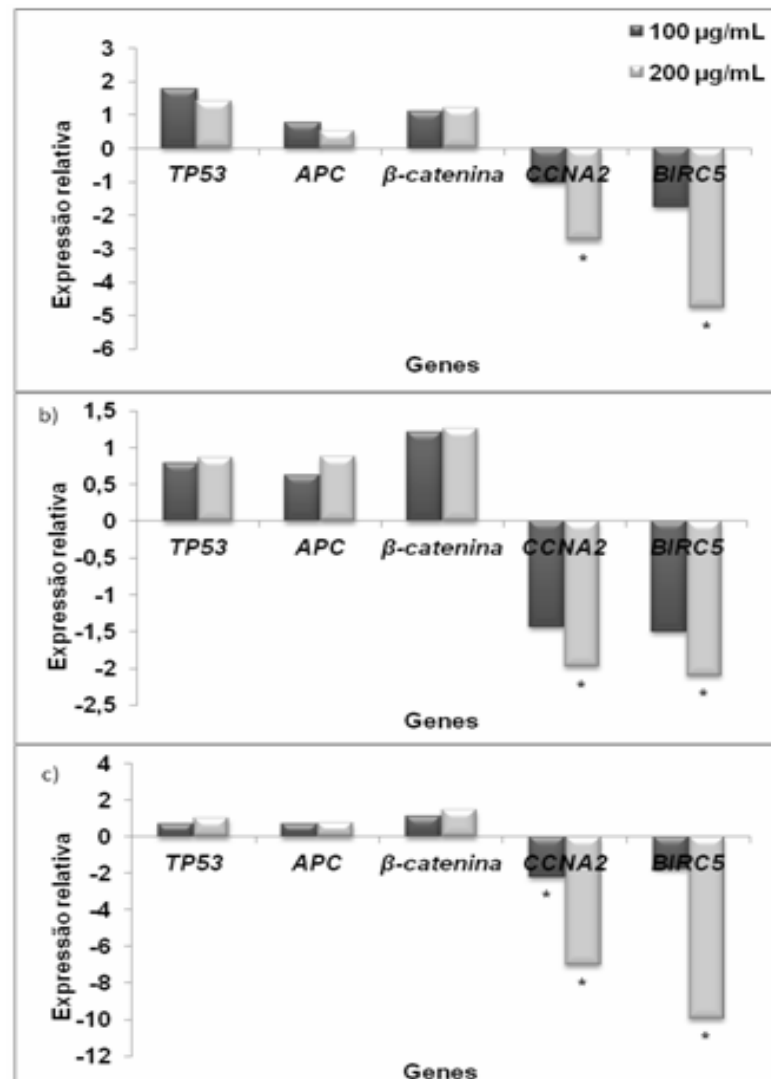


#### 4. 3. 2 Expressão Gênica

As concentrações escolhidas para serem testadas no Ensaio de qRT-PCR em tempo real foram de 100 e 200 µg/mL. A concentração de 400 µg/mL foi eliminada por apresentar uma importante redução na taxa de sobrevivência (<80%) podendo interferir diretamente no experimento de expressão gênica.

Em relação aos genes envolvidos no ciclo celular analisados, foi observada uma redução significativa nos níveis de expressão do gene *BIRC5* na concentração de 200 µg/mL, sendo este gene 4,76; 2,10 e 9,95 vezes menos expresso nos períodos de 24, 48 e 72 horas respectivamente. O gene *CCNA2* foi 2,76 vezes menos expresso em 24 horas no tratamento com 200 µg/mL, em 48 horas foi 1,98 vezes menos expresso na concentração de 200 µg/mL, em 72 horas sua expressão foi reduzida 2,21 vezes na concentração de 100 µg/mL e 7,0 vezes na concentração de 200 µg/mL. Não houve alteração significativa nos níveis de expressão dos genes *TP53*, *APC*, e *β-catenina* (Figura 3).

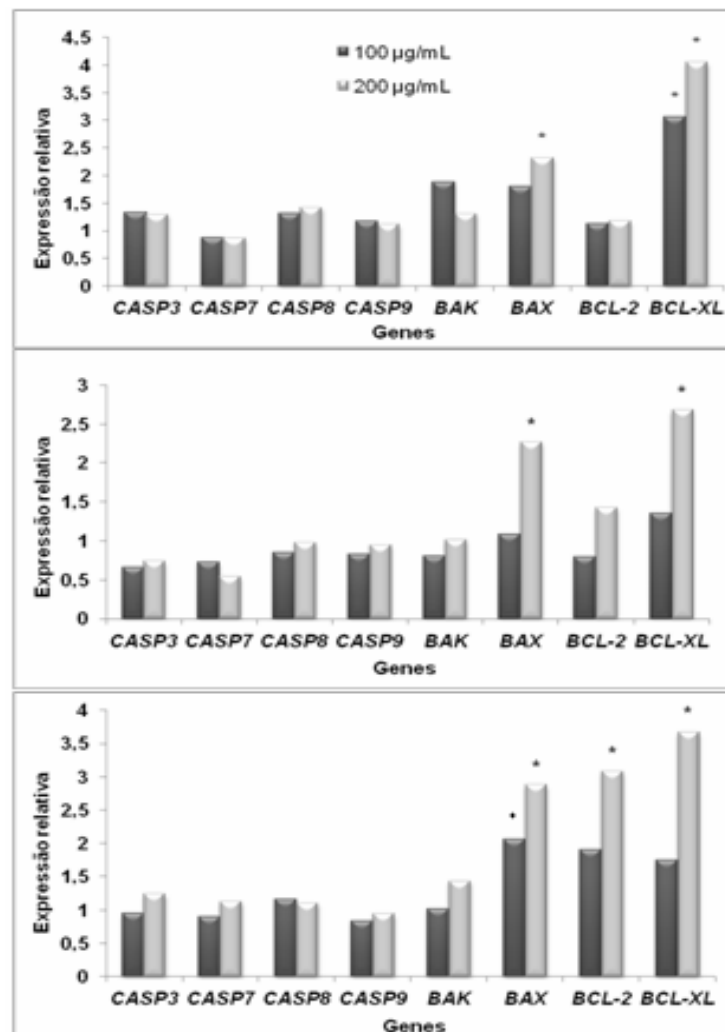
**Figura 3** – Expressão relativa dos genes envolvidos na apoptose e ciclo celular nas células HB4a tratadas com 100 e 200µg/mL, nos períodos de: a) 24 horas; b) 48 horas e c) 72 horas. \* Razão≥2.



Houve alteração nos níveis de expressão relativa dos genes pró e anti-apoptóticos nos tratamentos com clorofilina. Foi observado um aumento significativo na expressão de *BAX* de 2,33; 2,26 e 2,88 vezes com 24, 48 e 72 h respectivamente de exposição à 200 µg/mL de clorofilina, e 2,06 em 72 h de exposição à 100 µg/mL. Houve também um aumento significativo da expressão do gene *BCL-XL* de 4,06 vezes em 24 horas, 2,67 vezes em 48 horas e 3,67 vezes em 72 horas com 200 µg/mL de clorofilina. O tratamento com a concentração de 100µg/mL resultou no aumento dos níveis de expressão do gene *BCL-XL* em 3,07 vezes apenas no período de 24 horas. O gene *BCL-2* foi 3,1 vezes mais expresso apenas em 72 horas de exposição à concentração de 200 µg/mL. Os demais genes

apoptóticos analisados não apresentaram alteração significativa nos seus níveis de expressão (*CASP3*, *CASP7*, *CASP9*, *CASP8* e *BAK*) (Figura 4. a), b) e c)).

**Figura 4** – Expressão relativa dos genes envolvidos na apoptose nas células HB4a tratadas com 100 e 200µg/mL, nos períodos de: a) 24 horas; b) 48 horas e c) 72 horas. \*Razão ≥ 2.



#### 4. 4 DISCUSSÃO

O potencial terapêutico da clorofilina tem sido atribuído principalmente às suas atividades antiproliferativa e pró-apoptótica em linhagens tumorais, como verificado por Chiu et al. (2005; 2003). Entretanto, o mecanismo de ação desta molécula ainda não está completamente elucidado e, assim, estudos a respeito dos efeitos da clorofilina na regulação da expressão gênica são necessários. Além disso, poucos trabalhos investigaram a ação da clorofilina em

linhagens celulares não tumorais, o que é de grande importância, já que a maioria das substâncias que são utilizadas atualmente no tratamento do câncer tem alvos que são comuns às células tumorais e normais. Logo, é relevante a busca por substâncias com potencial terapêutico que sejam menos agressivas às células não tumorais, pois podem resultar em maior eficácia e menor toxicidade do tratamento ao paciente.

No presente estudo, a clorofilina apresentou efeito citotóxico na linhagem HB4a, verificado pelo ensaio do MTT, provavelmente por inibir a progressão do ciclo celular, por meio da redução da expressão de genes envolvidos neste processo. Esse resultado é corroborado por estudos que indicam o potencial citotóxico desta molécula em diferentes linhagens celulares (TOMANKOVA, et al., 2011; BOTELHO, et al., 2004). Logo, o presente estudo também demonstra este potencial pela redução da taxa de sobrevivência celular na linhagem HB4a em todas as concentrações testadas (100, 200 e 400µg/mL) após 48 e 72 horas de exposição. Soma-se a estas conclusões o estudo de Vesenick (2010) que observou que em células HT29 a citotoxicidade da clorofilina ocorre a partir de 500 µg/mL em 24 horas, e 100µg/mL a partir de 48 horas. O autor atribuiu este resultado à inibição da proliferação e não à morte celular por apoptose. Faz-de necessário ainda relatar que no presente estudo como observado por Vesenick (2010) a exposição à clorofilina não determinou alteração na expressão dos genes *CASP8* e *CASP9*. Mas, diferente do observado por ele na linhagem HT29 a exposição à clorofilina não reduziu a expressão de *APC* e *β-catenina* quando avaliados em HB4a.

Carter et al. (2004) também não observaram alteração nos níveis de RNAm do gene *β-catenina*, (AUMENTO DA PROTEÍNA) mas verificaram aumento de expressão do gene *E-caderina* e de sua proteína em células de câncer de cólon HCT116 ao investigar os efeitos da clorofilina no mecanismo de diferenciação celular.

Outro gene envolvido na proliferação celular é o *Ciclina A2 (CCNA2)*, sua proteína atua no início da replicação, transcrição e regulação do ciclo celular, promovendo as transições G1/S e G2/M (JACKMAN et al., 2002). A redução da expressão do gene *CCNA2* verificada nos três períodos de exposição sugere que a clorofilina possa inibir a proliferação celular da linhagem HB4a. Outros relatos como o de Chimploy et al. (2009) e Chiu et al. (2003) demonstraram inibição de ciclinas e consequente redução da proliferação celular em células HCT116 e MCF-7,

respectivamente expostas a clorofilina (360 µg/ml, 200 e 400 µg/ml). Estes resultados sugerem um possível mecanismo molecular de controle da proliferação celular através da inibição de diferentes ciclinas e, portanto, reforçam a hipótese de que a redução na expressão do gene *CCNA2* pode ser um dos fatores responsáveis por inibir a proliferação na linhagem HB4a.

O efeito anti-proliferativo causado por exposição à clorofilina também pode ser explicado pelo seu potencial em reduzir a expressão do gene *BIRC5*, o qual codifica a formação da proteína survivina. Esta proteína pode atuar na célula como inibidora da apoptose e reguladora da divisão celular (ALTIERE, 2008).

Estudos demonstram que o aumento na expressão da survivina não aumenta a proliferação ou interfere na distribuição do ciclo celular, enquanto que a sua supressão inibe o ciclo celular em G2/M, como descrito por Rödel et al. (2005). Os autores observaram que a transfecção por siRNA survivina-específico reduziu os níveis de RNA de *BIRC5* e da proteína em células colorretais SW480 e HCT-15, resultando na redução da viabilidade celular.

Lechler et al. (2011) observaram que o *knock-down* do gene da survivina também reduziu a proliferação e inibiu a progressão do ciclo celular em células de condrossarcoma SW1353 e Hs819.T. Dessa maneira, a redução ou inibição da survivina pode ser correlacionada à parada de ciclo em diferentes linhagens.

A repressão de *BIRC5* e a inibição ou redução dos níveis da proteína estão relacionados à indução de apoptose em diversas linhagens tumorais (ALTIERE, 2008). Em nível transcricional, a survivina pode ser regulada pela  $\beta$ -catenina e p53 (ALTIERI, 2003). A regulação complexa da transcrição da survivina pode envolver o aumento de  $\beta$ -catenina e a repressão por p53. A indução de p53 regula a survivina negativamente, tanto em níveis de RNA quanto de proteína, pois é capaz de se ligar ao promotor do gene *BIRC5* e reprimir sua expressão (HOFFMAN et al 2002). No entanto, no presente estudo a análise da expressão gênica de *TP53* e de  *$\beta$ -catenina* não apresentou alterações significativas. Resultado similar foi encontrado por Chang et al., (2010), ao observarem inibição da survivina independente de  $\beta$ -catenina, em células de câncer de esôfago TE7. Portanto, é possível que a repressão de *BIRC5* induzida pela clorofilina não dependa da expressão de *TP53* e  *$\beta$ -catenina*.

Em muitos casos a inibição de proliferação celular pode estar relacionada a eventos apoptóticos. Um dos mecanismos mais discutidos que implica na ativação da apoptose, reflete uma sequência de eventos bioquímicos realizados por um grupo de proteases citosólicas, denominadas caspases (MURPHY et al, 2003). No presente estudo, não foram observadas alterações significativas nos níveis de RNAm dos genes *CASP3*, *CASP7*, *CASP8* e *CASP9*. Em contraste, Díaz et al. (2003) verificaram que a exposição à clorofilina levou a um aumento da expressão da proteína caspase-8 e indução de apoptose na linhagem tumoral HTC 116 (câncer de cólon), sugerindo ativação da via extrínseca da apoptose nesse tipo celular.

Alterações nos níveis de expressão de genes da família Bcl-2 podem indicar ativação de vias da apoptose. Os genes *BAX* e *BAK* promovem a morte celular por apoptose (YOULE; STRASSER, 2008). O ensaio de qRT-PCR em tempo real, revelou um aumento significativo na expressão de *BAX* enquanto que, não houve alteração significativa de *BAK* quando comparado ao controle. No entanto, também foi observado aumento de expressão dos anti-apoptóticos *BCL-2* e *BCL-XL*, suas proteínas previnem a liberação de citocromo c impedindo a formação do apoptossomo e, conseqüentemente, a ativação da cascata das caspases (YOULE; STRASSER, 2008).

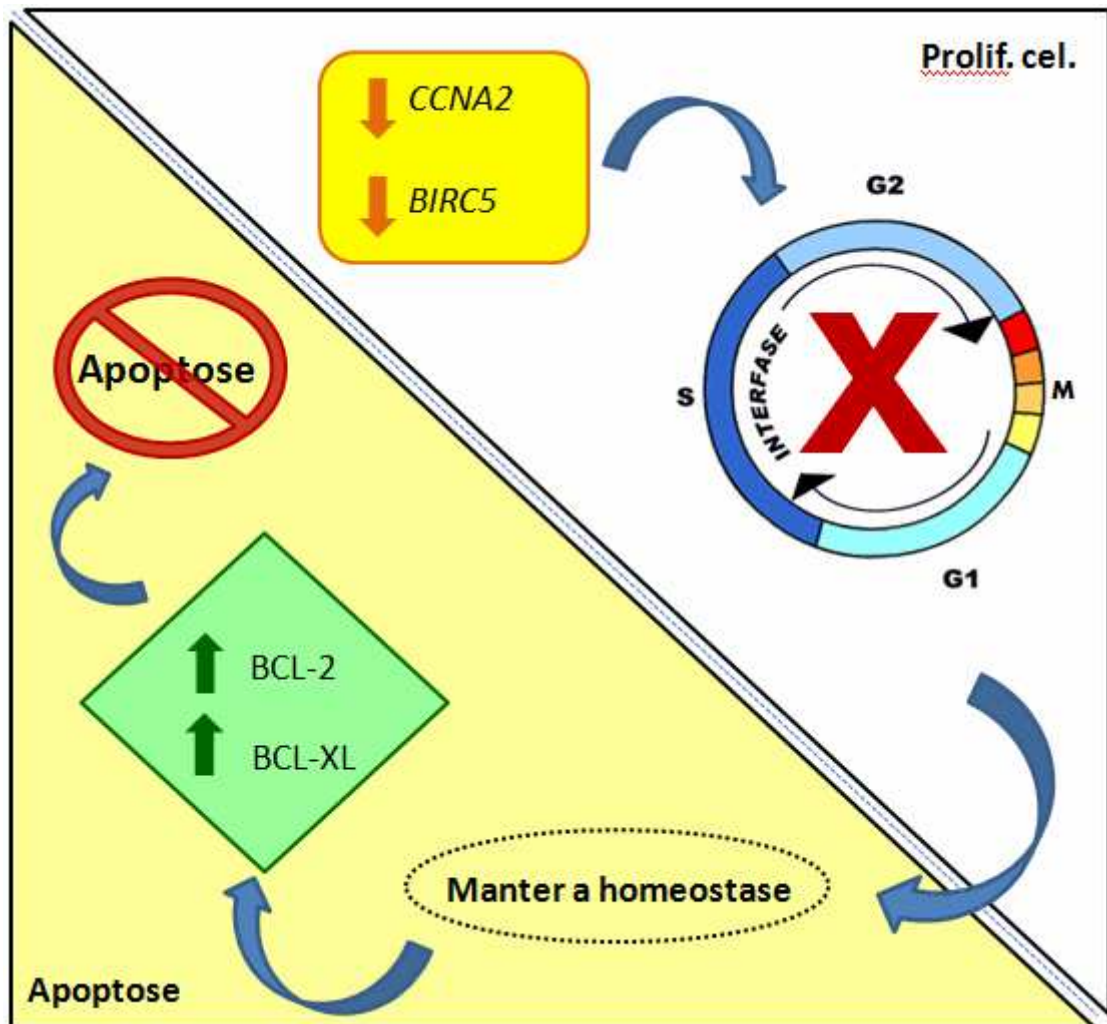
O aumento nos níveis de RNAm de *BCL-2* e *BCL-XL* pode refletir um efeito compensatório da célula em resposta à citotoxicidade causada pela clorofilina, como sugerido por Sharma et al. (2007), os autores observaram que a exposição à clorofilina inibiu a proliferação em linfócitos de camundongo e levou ao aumento na expressão dos genes *BCL-2* e *BCL-XL*.

Knudson e Korsmeyer (1997) demonstraram que a expressão da proteína Bcl-2 protegeu timócitos da morte induzida por irradiação na presença ou ausência de Bax. Além disso, Linette et al. (1996) mostraram que a expressão de *BCL-2* também pode estar envolvida com a progressão do ciclo celular, e que o aumento de *BCL-2* suprimiria o crescimento e acúmulo de células resistentes a morte. Assim, a inter-relação da célula entre morte e ciclo celular teria uma regulação mais estável para garantir o equilíbrio homeostático (LINETTE et al., 1996).

Dessa maneira, para manter o equilíbrio entre divisão e morte celular na linhagem não tumoral HB4a é possível que a citotoxicidade, provavelmente

causadora da redução da proliferação celular, já que houve inibição dos genes *CCNA2* e *BIRC5*, poderia ser compensada pela prevenção da morte celular (Figura 5).

**Figura 5** – Efeito da clorofilina em células HB4a expostas à clorofilina. O aumento da expressão de Bcl-2 e Bcl-XL inibe as proteínas pró-apoptóticas e a liberação de citocromo c e impedem a ativação da cascata das caspases.



Sabe-se também que muitas células tumorais e não tumorais, tais como linhagens neuronais e hematopoiéticas (KANE et al., 1993), possuem níveis altos dos membros anti-apoptóticos como um mecanismo de proteção à morte celular programada. Além disso, *BCL-XL* protege as células dos mecanismos de ruptura e conseqüente perda do potencial de membrana, dependente e independente de caspases.

O grande número de genes e proteínas envolvidos nas vias apoptóticas a tornam um processo complexo. Os antiapoptóticos *BCL-2* e *BCL-XL* e pró-apoptóticos *BAX* e *BAK* regulam a apoptose em direções opostas, agindo uns sobre os outros, bem como influenciando outras moléculas, de modo que o equilíbrio entre eles é um determinante para a ocorrência ou não da apoptose (TSUJIMOTO et al., 2003).

É possível notar as divergências entre os resultados de diferentes estudos sobre o efeito da clorofilina na apoptose e no ciclo celular, o que provavelmente está relacionado ao uso de linhagens celulares distintas, mostrando que diferentes tecidos e órgãos não respondem do mesmo modo à exposição a este composto.

Frente ao exposto considera-se que a clorofilina é citotóxica e alterara a expressão de genes envolvidos no ciclo celular (*CCNA2* e *BIRC5*) e no processo de apoptose (genes pró *BAX* e anti-apoptóticos *BCL-2* e *BCL-XL*) sendo que tais alterações são dependentes da concentração e períodos de tratamento, o que sugere que apesar desse composto apresentar potencial terapêutico contra o câncer (DIAZ et al., 2003; CHIU et al., 2005) e protetor contra agentes tóxicos (BEZ et al., 2001; RAMPAZO et al., 2002; NEGRAES et al., 2004 ), seus efeitos em linhagens celulares normais podem ser indesejáveis, o que sugere maiores investigações a fim de esclarecer os mecanismos de ação da clorofilina.

## REFERÊNCIAS

- ALTIERI, D. C. New wirings in the survivin networks. **Oncogene**, v. 27, p. 6276–6284, 2008.
- ALTIERI, D. C. Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. **Oncogene**, v. 22, p.8581–8589, 2003.
- BEZ, G. C.; JORDÃO, B. Q.; VICENTINI, V. E. P.; MANTOVANI, M. S. Investigation of genotoxic and antigenotoxic activities of chlorophylls and chlorophyllin in cultured V79 cells. **Mutation Res.**, v. 497, p. 139–145, 2001.
- BOTELHO, M. V. J.; ORLANDI, J. M.; de MELO, F. L.; MANTOVANI, M. S.; Linhares, R. E. C. Nozawa, C. Chlorophyllin protects HEp-2 cells from nuclear fragmentation induced by poliovirus. **Lett Appl Microbiol**, v.39, p.174-7, 2004.
- CASTAÑEDA, F; ROSIN-STEINER, S. Low concentration of ethanol induce apoptosis in HepG2 cells: role of various signal transduction pathways. **Int J Med Sci**, v. 3, p. 160-167, 2006.
- CARTER, O.; BAILEY, G. S.; DASHWOOD, R. H. The Dietary Phytochemical Chlorophyllin Alters E-Cadherin and B-Catenin Expression in Human Colon Cancer Cells. **J. Nutr.** v.134, p. 3441S–3444S, 2004.
- CHANG, E.; DONAHUE, J.; SMITH, A.; HORNICK, J.; RAO, J. N.; WANG, J. Y.; BATTAFARANO, R. J. Loss of p53, rather than beta-catenin overexpression, induces survivin-mediated resistance to apoptosis in an esophageal cancer cell line. **J Thorac Cardiovasc Surg**, v. 140, P. 225-232, 2010.
- CHEN, X. Y.; LIU, J.; XU, K. S. Apoptosis of human hepatocellular carcinoma cell (HepG2) induced by cardiotoxin III through S-phase arrest. **Exp. Toxicol. Pathol.**, v. 61, p. 307–315, 2009.
- CHIMPLOY, K.; DÍAZ, D. G.; LI, Q.; CARTER, O.; DASHWOOD, W. M.; MATHEWS, C. K.; WILLIAMS, D. E.; BAILEY, G. S.; DASHWOOD, R. H. E2F4 and ribonucleotide reductase mediate S-phase arrest in colon cancer cells treated with chlorophyllin, **Int J Cancer**, v. 125, p. 2086–2094, 2009.
- CHIU, L. C.; KONG, C. K.; OOI, V. E. The chlorophyllin-induced cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells is associated with ERK deactivation and cyclin D1 depletion. **Int J Mol Med**, v. 16, p. 735 –740, 2005.
- CHIU, L. C.; KONG, C. K. L.; OOI, V. E. C. Antiproliferative effect of chlorophyllin derived from a traditional Chinese medicine *Bombyx mori* excreta on human breast cancer MCF-7 cells. **Int J Oncology**, v.23, p.729-735, 2003
- DIAZ, G. D.; LI, Q.; DASHWOOD, R. H. Caspase-8 and apoptosis-inducing factor mediate a cytochrome c-independent pathway of apoptosis in human colon cancer cells induced by the dietary phytochemical chlorophyllin. **Cancer Res.**, v. 63, p. 1254 - 1261, 2003.
- EGNER, P. A.; WANG, J. B.; ZHU, Y. R.; ZHANG, B. C.; WU, Y.; ZHANG, Q. N. Chlorophyllin intervention reduces aflatoxin-DNA adducts in individuals at high risk for liver cancer. **Proc Natl Acad Sci**, v.25, p.14601- 14606, 2001.

HOFFMAN, W. H.; BIADÉ, S.; ZILFOU, J. T.; CHEN, J.; MURPHY, M. Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53. **J. Biol. Chem**, v. 277, p. 3247–3257, 2002.

HSIEH, W. T.; HUANG, K. Y.; LIN, H. Y.; CHUNG, J. G. Physalis angulata induced G2/M phase arrest in human breast cancer cells. **Food Chem Toxicol**, v. 44, p. 974-983, 2006.

JACKMAN, M.; KUBOTA, Y.; DEN ELZEN, N.; HAGTING, A.; PINES, J. Cyclin A- and cyclin E-Cdk complexes shuttle between the nucleus and the cytoplasm. **Mol Biol Cell**, v.13, p.1030–1045, 2002.

KEPHART, J. C. Chlorophyll derivatives: their chemistry, commercial preparations and uses. **Econ Bot**, v.9, p.3 – 38, 1955.

KANE, D. J.; SARAFIAN, T. A.; ANTON, R.; HAHN, HEJIN.; GRALLA, E. B.; VALENTINE, J. S.; ORD, T.; BREDESENT, D. E. Bcl-2 Inhibition of Neural Death: decreased generation of reactive oxygen species. **Science**, v. 262, p. 1274-76, 1993.

KUMAR, S. S.; SHANKAR, B.; SAINIS, K. B. Effect of chlorophyllin against oxidative stress in spleen cells in vitro and in vivo. **Biochim et Biophys Acta**, v.1672, p.100–111, 2004.

KNUDSON, C. M.; KORSMEYER, STANLEY J. *Bcl-2* and *Bax* function independently to regulate cell death, **Nature Genetics**, v.16, p.358 – 363, 1997.

LARATO, D. C.; PFAU, F. R. Effects of water soluble chlorophyllin ointment on gingival inflammation. **NY Dent J**, v. 36, p. 291- 3, 1970.

LECHLER, P.; RENKAWITZ, T.; CAMPEAN, V.; BALAKRISHNAN, S.; TINGART, M.; GRIFKA, J.; SCHAUMBURGER, J. The antiapoptotic gene survivin is highly expressed in human chondrosarcoma and promotes drug resistance in chondrosarcoma cells in vitro. **BMC Cancer**, 11:120, 2011.

LINETTE, G. P.; LI, Y.; ROTH, K.; KORSMEYERT, S. J. Cross talk between cell death and cell cycle progression: BCL-2 regulates NFAT-mediated activation. **Cell Biology**, v. 93, p. 9545-9552, 1996.

MAURO, M. O.; SARTORI, D.; OLIVEIRA, R. J.; ISHII, P. L.; MANTOVANI, M. S.; RIBEIRO, L. R. Activity of selenium on cell proliferation, cytotoxicity, and apoptosis and on the expression of CASP9, BCL-XL and APC in intestinal adenocarcinoma cells. **Mutation Res.**, v.715, p.7– 12, 2011.

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

MURPHY, B. M.; MARTIM, S. J. Caspases. In: YIN, X. M.; DONG, Z., editors. Essentials of apoptosis. New Jersey: **Humana Press Inc.**; 2003. p. 3-12.

NEGRAES, P. D; JORDÃO, B.Q.; VICENTINI, V. E. P.; MANTOVANI, M. S. The mutagenic potentiator effect of chlorophyllin by the HGPRT assay. **Toxicol In Vitro**, v. 18, p.147-149, 2003.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative in quantification real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**. v. 29, p. 2002-7, 2001.

RAMPAZO, L. G. L.; JORDÃO, B. Q.; VICENTINI, V. E. P; MANTOVANI, M. S. Chlorophyllin antimutagenic mechanism under different treatment conditions in the micronucleus assay in V79 cells. **Cytologia**, v. 67, p. 323-327, 2002.

RÖDEL, F.; HOFFMANN, J.; DISTEL, L.; HERRMANN, M.; NOISTERNIG, T.; PAPADOPOULOS, T.; SAUER, R.; RÖDEL, C. Survivin as a radioresistance factor, and prognostic and therapeutic target for radiotherapy in rectal cancer. **Cancer Res.**, v. 65, p. 4881-7, 2005,

SARKAR, D.; SHARMA, A.; TALUKDER, G. Comparison of the effects of crude extract of spinach-beet leaves and equivalent amounts of chlorophyll and chlorophyllin in modifying the clastogenic activity of chromium(VI) oxide in mice in vivo. **Phytother Re**, v. 9, p.199–202, 1995.

SHARMA , D. SANTOSH K., S.; SAINIS, K. B. Antiapoptotic and immunomodulatory effects of chlorophyllin. *Molecular Immunology*, v. 44, p. 347–359, 2007.

STEINMETZ, K. A.; POTTER, J. D. Vegetables, fruit and cancer prevention: a review. **J Am Diet Assoc**, v.96, p.1027- 1039, 1996.

SUGAYA, S; NAKANISHI, H; TANZAWA, H. Down-regulation of SMT3A gene expression in association with DNA synthesis induction after X-ray irradiation in nevoid basal cell carcinoma syndrome (NBCCS) cells. **Mutation Res.**, v. 578, p. 327–332, 2005.

TAWASHI, R.; COUSINEAU, M.; SHARKAWI, M.; Effect of sodium copper chlorophyllin on the formation of calcium oxalate crystals in rat kidney. **Invest Urol**, v. 18, p. 90- 92, 1980.

TSUJIMOTO, Y .; SHIMIZU, S.; EGUCHI, Y.; KAMIKE, W.; MATSUDA, H. Bcl-2 and Bcl-xl block apoptosis as well as necrosis: possible involvement of common mediators in apoptotic and necrotic signal transduction pathways, **Leukemia**, v.3, p. 380-2.

TORRES, V. A.; TAPIA, J. C.; RODRIGUEZ, D. A.; PARRAGA, M.; LISBOA, P.; MONTOYA, M.; LEYTON, L.; QUEST, A. F. Caveolin-1 controls cell proliferation and cell death by suppressing expression of the inhibitor of apoptosis protein survivin. **J. Cell Sci.** v.119, p.1812-1823, 2006.

TOMANKOVA, K.; KEJLOVA, K.; BINDER, S.; DASKOVA, A.; ZAPLETALOVA, J.; BENDOVA, H.; KOLAROVA, H.; JIROVA, D. In vitro cytotoxicity and phototoxicity study of cosmetics colorants. **Toxicol In Vitro**, p.1242-50, 2011.

YOUNG, R. W., BEREGI, J. S. Use of chlorophyllin in the care of geriatric patients. **J Am Geriatr Soc**, v. 28, p. 46–47, 1980.

YOULE, R. J.; STRASSER, A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 9, p. 47-59, 2008.

ZAMORANO, P. L.; MAHESH, V. B.; BRANN, D. W. Quantitative RT-PCR for neuroendocrine studies. **Neuroendocrinology**, v.63, p.397–407, 1996.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo demonstrou que a exposição da linhagem HB4a à clorofilina altera a expressão de genes pró e anti-apoptótico, bem como dos genes envolvidos na progressão do ciclo celular.

O potencial citotóxico da clorofilina se deve possivelmente à repressão dos genes *BIRC5* e *CCNA2*, o que poderia levar à parada de ciclo na fase G2/M, impedindo a progressão do ciclo celular, sugerindo portanto, inibição da proliferação em células HB4a.

O aumento nos níveis de RNAm anti-apotóticos dos genes *BCL-2* e *BCL-XL* sugerem inibição da apoptose, o que pode estar relacionado a um mecanismo de proteção contra a morte celular.

## REFERÊNCIAS

- ALTIERI, D. C. New wirings in the survivin networks. **Oncogene**, v. 27, p. 6276–6284, 2008.
- ALTIERI, D. C. Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. **Oncogene**, v. 22, p.8581–8589, 2003.
- AMBROSINI, G.; ADIDA, C.; ALTIERI, D. C. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. **Nat Med**, v.8, p.917-921, 1997.
- BEZ, G. C.; JORDÃO, B. Q.; VICENTINI, V. E. P.; MANTOVANI, M. S. Investigation of genotoxic and antigenotoxic activities of chlorophylls and chlorophyllin in cultured V79 cells. **Mutation Res.**, v. 497, p. 139–145, 2001.
- BOATRRIGHT, K. M; SALVESEN, G. S. Mechanisms of caspases activation. **Curr Opin Cell Biol.** v.15, p.725-31, 2003.
- BOTELHO, M. V. J.; ORLANDI, J. M.; de MELO, F. L.; MANTOVANI, M. S.; Linhares, R. E. C. Nozawa, C. Chlorophyllin protects HEP-2 cells from nuclear fragmentation induced by poliovirus. **Lett Appl Microbiol**, v.39, p.174-7, 2004.
- BUDIHARDJO, I.; OLIVER, H.; LUTTER, M.; LUO, X.; WANG, X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 15, p.269-290, 1999.
- BUI, K. C.; WU, F.; BUCKLEY, S.; WU, L.; WILLIAMS, R.; et al. Cyclin A expression in normal and transformed alveolar epithelial cells. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v.9, p.115–125, 1993.
- BRITTON, G. UV/ visible spectroscopy. In: BRITTON, G. et al. (Eds). **Carotenoids, spectroscopy**. Birkhauser, 1995. v.1, p.13-62.
- CHANG, E.; DONAHUE, J.; SMITH, A.; HORNICK, J.; RAO, J. N.; WANG, J. Y.; BATTAFARANO, R. J. Loss of p53, rather than beta-catenin overexpression, induces survivin-mediated resistance to apoptosis in an esophageal cancer cell line. *J Thorac Cardiovasc Surg*, v. 140, P. 225-232, 2010.
- CHANG, H. Y., YANG, X. Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** v. 64, p. 821– 846. 2000.
- CHEN, W.; LEE, J.; CHO, S.Y.; FINE, H.A. Proteasome-mediated destruction of the cyclin a/cyclin-dependent kinase 2 complex suppresses tumor cell growth in vitro and in vivo. **Cancer Res.** v. 64, p. 3949–3957, 2004.
- CHEN, X. Y.; LIU, J.; XU, K. S. Apoptosis of human hepatocellular carcinoma cell (HepG2) induced by cardiotoxin III through S-phase arrest. **Exp. Toxicol. Pathol.**, v. 61, p. 307–315, 2009.
- CHIU, L. C.; KONG, C. K.; OOI, V. E. The chlorophyllin-induced cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells is associated with ERK deactivation and cyclin D1 depletion. **Int J Mol Med**, v. 16, p. 735 –740, 2005.

CHIU, L. C.; KONG, C. K. L.; OOI, V. E. C. Antiproliferative effect of chlorophyllin derived from a traditional Chinese medicine *Bombyx mori* excreta on human breast cancer MCF-7 cells. **Int J Oncology**, v.23, p.729-735, 2003

CHIMPLOY, K.; DÍAZ, D. G.; LI, Q.; CARTER, O.; DASHWOOD, W. M.; MATHEWS, C. K.; WILLIAMS, D. E.; BAILEY, G. S.; DASHWOOD, R. H. E2F4 and ribonucleotide reductase mediate S-phase arrest in colon cancer cells treated with chlorophyllin, **Int J Cancer**, v. 125, p. 2086–2094, 2009.

DANIEL, P. T.; WIEDER, T.; STURM, I.; SCHULZE-OSTHOFF, K. The kiss of death: promises and failures of death receptors and ligands in cancer therapy. **Leukemia**, v.7, p. 1022-32, 2001.

DASHWOOD, R.; NEGISHI, T.; HAYATSU, H.; BREINHOLT, V.; HENDRICKS, J.; BAILEY, G. Chemopreventive properties of chlorophylls toward aflatoxin B1: a review of the antimutagenicity and anticarcinogenicity data in rainbow trout. **Mutat Res**; v.399, p. 245 – 253, 1998.

de LA COSTE, A.; ROMAGNOLO, B.; BILLUART, P.; RENARD, C. A.; BUENDIA, M. A.; SOUBRANE, O.; FABRE, M.; CHELLY, J.; BELDJORD, C.; KAHN, A.; et al. Somatic mutations of the betacatenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v.95, p. 8847–8851, 1998.

De MARIA, S.; PANNONE, G.; BUFO, P.; SANTORO, A.; SERPICO, R.; METAFORA, S.; et al. Survivin gene-expression and splicing isoforms in oral squamous cell carcinoma. **J Cancer Res Clin Oncol.** v.135, p. 107-116, 2009.

DESAGHER, S.; MARTINOU, J. C. Mitochondrial as the central control point of apoptosis. **Trends Cell Biol**, v. 10, p. 369-376, 2000.

DIAZ, G. D.; LI, Q.; DASHWOOD, R. H. Caspase-8 and apoptosis-inducing factor mediate a cytochrome c-independent pathway of apoptosis in human colon cancer cells induced by the dietary phytochemical chlorophyllin. **Cancer Res.**, v. 63, p. 1254 - 1261, 2003.

DUBREZ-DALOZ, L.; DUPOUX, A.; CARTIER, J. IAPs: More than just inhibitors of apoptosis proteins. **Cell cycle**, v. 7, p. 1036-46, 2008.

DUFFY, M. J.; O'DONOVAN, N.; BRENNAND, D.; GALLAGHER, W. M.; RYAN, B.M. Survivin: A promising tumor biomarker. **Cancer Letters**, 249, p. 49–60, 2007.

EGNER, P. A.; MUNOZ, A.; KENSLER, T. W. Chemoprevention with chlorophyllin in individuals exposed to dietary aflatoxin. **Mutat Res**, v. 209, p. 523-524, 2003.

EGNER, P. A.; WANG, J. B.; ZHU, Y. R.; ZHANG, B. C.; WU, Y.; ZHANG, Q. N. Chlorophyllin intervention reduces aflatoxin-DNA adducts in individuals at high risk for liver cancer. **Proc Natl Acad Sci**, v.25, p.14601- 14606, 2001.

FAHEY, J. W.; STEPHENSON, K. K.; DINKOVA-KOSTOVA, A. T.; EGNER, P. A.; KENSLER, T. W.; TALALAY, P. Chlorophyll, chlorophyllin and related tetrapyrroles are significant inducers of mammalian phase 2 cytoprotective genes. **Carcinogenesis**, v. 26, p. 1247- 1255, 2005.

FERRI, K. F.; KROEMER, G. Organelle-specific initiation of cell death pathways. **Nature Cell Biol.** v.11, p. 255-263, 2001.

FERRUZZI, M. G; BLAKESLEEB, J. Digestion, absorption, and cancer preventative activity of dietary chlorophyll derivatives. **Nutrition Res.**, v. 27. p. 1-12, 2007.

FISCHBACH H. Microdeterminations for organically combined metal in pigment of okra. **J Assoc Off Agric Chem**, v.26, p.139- 143, 1943.

FORTUGNO, P.; WALL, N. R.; GIODINI, A.; O'CONNOR, D. S.; PLESCIA, J.; et al. Survivin exists in immunochemically distinct subcellular pools and is involved in spindle microtubule function. **J Cell Sci**, v.115, p.575-585, 2002.

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

FREIER, K.; PUNGS, S.; STICHT, C.; FLECHTENMACHER, C.; LICHTER, P.; JOOS, S.; et al. High survivin expression is associated with favorable outcome in advanced primary oral squamous cell carcinoma after radiation therapy. **In J Cancer**, v.120, p. 942-946, 2006.

FUKUCHI, T.; SAKAMOTO, M.; TSUDA, H.; MARUYAMA, K.; NOZAWA, S.; HIROHASHI, S. Beta-catenin mutation in carcinoma of the uterine endometrium. **Cancer Res.** v.58, p.3526–3528, 1998.

GELEY, S., KRAMER, E., GIEFFERS, C., GANNON, J., PETERS, J. M., HUNT, T. Anaphase-promoting complex/cyclosome-dependent proteolysis of human cyclin A starts at the beginning of mitosis and is not subject to the spindle assembly checkpoint. **J. Cell Biol.** v.153, p. 137–148. 2001.

GREEN, D. R.; KROEMER, G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. **Science**, v.305, p. 626-629, 2004.

GOMES, M. S. O.; SINNECKER, P.; TANAKA, R.T.; LANFER-MARQUEZ, U.M. Effect of harvesting and drying conditions on chlorophyll levels of soybean (*Glycine max* L. Merr). **J Agric Food Chem**, v.51, p.1634-1639, 2003.

GOTTLIEB, E.; VANDER HEIDEN, M. G.; THOMPSON, C. B. Bcl-XL prevents the initial decrease in mitochondrial membrane potential and subsequent reactive oxygen species production during tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. **Mol Cell Biol.** v. 20, p. 5680-5689, 2000.

GUPTA, S. Molecular signaling in death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis. **Int J Oncol**, v. 22, p.15-20, 2003.

GROSS, J. Pigments in vegetables, chlorophylls and carotenoids. New York: Van Nostrand Reinhold, 1991. 351p.

HARTWELL, L. H.; KASTAN, M. B. Cell cycle control and cancer. **Science**, v. 266, p.1821–1828, 1994.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, p. 770-76, 2000.

HSIEH, W. T.; HUANG, K.Y.; LIN, H.Y.; CHUNG, J. G. *Physalis angulata* induced G2/M phase arrest in human breast cancer cells. **Food Chem Toxicol**, v. 44, p. 974-983, 2006.

HOFFMAN, W. H.; BIADÉ, S.; ZILFOU, J. T.; CHEN, J.; MURPHY, M. Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53. **J. Biol. Chem**, v. 277, p. 3247–3257, 2002.

HOSHINA, C.; TOMITA, K.; SHIOI, Y. Antioxidant activity of chlorophylls: its structure activity relationship. **Photosynthesis: mechanisms and effects**, v. 4, p. 3281-3284, 1998.

JACOBS, H. W.; KNOBLICH, J. A.; LEHNER, C. F. Drosophila Cyclin B3 is required for female fertility and is dispensable for mitosis like Cyclin B. **Genes Dev**. v.12, p.3741–3751, 1998.

JACKMAN, M.; KUBOTA, Y.; DEN ELZEN, N.; HAGTING, A.; PINES, J. Cyclin A- and cyclin E-Cdk complexes shuttle between the nucleus and the cytoplasm. **Mol Biol Cell**, v.13, p.1030–1045, 2002.

KEPHART, J. C. Chlorophyll derivatives: their chemistry, commercial preparations and uses. **Econ Bot**, v.9, p.3 – 38, 1955.

KUDO ,Y.; GUARDAVACCARO, D.; SANTAMARIA, P.G.; KOYAMA-NASU, R.; LATRES, E.; BRONSON, R.; YAMASAKI, L.; PAGANO, M. Role of F-Box Protein  $\beta$ Trcp1 in Mammary Gland Development and Tumorigenesis. **Mol Cell Biol**, v.24, p. 8184-94, 2004.

KUMAR, S. S.; SHANKAR, B.; SAINIS, K. B. Effect of chlorophyllin against oxidative stress in spleen cells in vitro and in vivo. **Biochim et Biophys Acta**, v.1672, p.100–111, 2004.

KUMAR, S. S.; DEVASAGAYAM, T. P. A., BHUSHAN, B., VERMA, N. C. Scavenging of reactive oxygen species by chlorophyllin: an ESR study. **Free Radic Res**, v.35, p.563–574, 2001.

KROEMER, G.; REED, J. C. Mitochondrial control of cell death. **Nat Med**, v. 6, p. 513-16, 2000.

LANFER-MARQUEZ, U. M. O papel da clorofila na alimentação humana: uma revisão. **Rev. Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, p. 274-242, 2003.

LABORDE, L. F.; VON ELBE, J. H. Chlorophyll degradation and zinc complex formation with chlorophyll derivatives in heated green vegetables. **J. Agric. Food Chem.**, v.42, p.1100-1103, 1994.

LARATO, D. C.; PFAU, F. R. Effects of water soluble chlorophyllin ointment on gingival inflammation. **NY Dent J**, v. 36, p. 291- 3, 1970.

LECHLER, P.; RENKAWITZ, T.; CAMPEAN, V.; BALAKRISHNAN, S.; TINGART, M'; GRIFKA, J.; SCHAUMBURGER, J. The antiapoptotic gene survivin is highly expressed in human chondrosarcoma and promotes drug resistance in chondrosarcoma cells in vitro. **BMC Cancer**, 11:120, 2011.

LECHLER, P.; WU, X.; BERNHARDT, W. The tumor gene survivin is highly expressed in adult renal tubular cells: implications for a pathophysiological role in the kidney. **Am J Pathol** v. 171, p.1483–1498, 2007.

LEVINE, A. J. P53, the cellular geterkeeper for growth and division. **Cell**, v. 88, p. 323-331, 1997.

LISTON, P.; FONG, W. G.; KORNELUK, R. G. The inhibitors of apoptosis: there is more life than Bcl2. **Oncog**, v. 22, p. 8568-80, 2003.

MELNIKOVA, I.; GOLDEN, J. Apoptosis-targeting therapies. **Nat Rev Drug Discov**, v.3, p.905-906, 2004.

MORGAN, D. O. The Cell Cycle: Principles of Control. New Science Press, London, UK, 2007.

MORIN, P. J.; VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K. W. Apoptosis and APC in colorectal tumorigenesis. **Proc Natl Acad Sci**, v.93, p.7950–7954, 1996.

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

MURPHY, B. M.; MARTIM, S. J. Caspases. In: YIN, X. M.; DONG, Z., editors. Essentials of apoptosis. New Jersey: **Humana Press Inc.**; 2003. p. 3-12.

MURPHY, M.; STINNAKRE, M. G.; SENAMAUD-BEAUFORT, C.; WINSTON, N. J.; SWEENEY C, et al. Delayed early embryonic lethality following disruption of the murine cyclin A2 gene. **Nat Genet**, v.15, p.83–86, 1997.

MIDGLEY, C. A.; WHITE, S.; HOWITT, R.; SAVE, V.; DUNLOP, M. G.; HALL, P. A.; LANE, D. P.; WYLLIE, A. H.; AND BUBB, V. J. APC expression in normal human tissues. **J Pathol**, v.181, p.426–433, 1997.

NAKAMURA, S.; GOMYO, Y.; ROTH, J. A. C-terminus of p53 is required for G(2) arrest. **Oncogene**, v.27, p. 2102-2107, 2002.

NAISMITH, J. H.; Sprang, S. R. Modularity in the TNF-receptor family. **Trends Biochem Sci**, v. 23, p.74-79, 1998.

NEGRAES, P. D; JORDÃO, B.Q.; VICENTINI, V. E. P.; MANTOVANI, M. S. The mutagenic potentiator effect of chlorophyllin by the HGPRT assay. **Toxicol In Vitro**, v. 18, p. 147-149, 2003.

NGUYEN, T. B.; MANOVA, K.; CAPODIECI, P.; LINDON, C.; BOTTEGA, S.; WANG, X. Y.; REFIK-ROGERS, J.; PINES, J.; WOLGEMUTH, D. J.; KOFF, A.

Characterization and expression of mammalian cyclin b3, a prepachytene meiotic cyclin. **J Biol Chem**, v.277, p. 41960–41969, 2002.

NUSSE, R.; VARMUS, H. E. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. **Cell**, v.31, p.99–109, 1982.

O' CONNOR, D. S.; SCHECHNER, J. S.; ADIDA, C.; MESRI, M.; ROTHERMEL A. L.; LI, F.; et al. Control of apoptosis during angiogenesis by survivin expression in endothelial cells. **Am J Pathol**, v. 156, p. 393-398, 2000.

OLOUMI, A.; MCPHEE, T.; DEDHAR, S. Regulation of E-cadherin expression and b - catenin/Tcf transcriptional activity by the integrin-linked kinase. **Biochim Biophys Acta**, v.1691, p. 1-15, 2004.

PERES, C. M.; CURI, R. **Como cultivar células**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005, p.25.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative in quantification real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**. v. 29, p. 2002-7, 2001.

PLENCHETTE, S.; CATHELIN, S.; RÉBÉ, C.; LAUNAY, S.; LADOIRE, S.; et al.; Translocation of the inhibitor of apoptosis protein c-IAP1 from the nucleus to the Golgi in hematopoietic cells undergoing differentiation: a nuclear export signal-mediated event. **Blood**, v. 104, p. 2035-43, 2004.

QUI, G.; KUDO, Y.; ANDO, T.; TSUNEMATSU, T.; SHIMIZU, N.; SIRIWARDENA, S.B.S.M.; et al. Nuclear survivin expression is correlated with malignant behaviors of head and neck cancer together with Aurora-B. **Oral Oncol**. v. 46, p. 263-70, 2010.

RÖDEL, F.; HOFFMANN, J.; DISTEL, L.; HERRMANN, M.; NOISTERNIG, T.; PAPADOPOULOS, T.; SAUER, R.; RÖDEL, C. Survivin as a radioresistance factor, and prognostic and therapeutic target for radiotherapy in rectal cancer. **Cancer Res.**, v. 65, p. 4881-7, 2005,

RAMPAZO, L. G. L.; JORDÃO, B. Q.; VICENTINI, V. E. P; MANTOVANI, M. S.Chlorophyllin antimutagenis mechanism under different treatment conditions in the micronucleus assay in V79 cells. **Cytologia**, v. 67, p. 323-327, 2002.

RUPNARAIN, C.; DLAMINI, Z.; NAICKER, S.; BHOOLA, K. Colon cancer: genetics and apoptotic events. **Biol Chem**. v. 385, p. 449-64, 2004.

SARKAR, D.; SHARMA, A.; TALUKDER, G. Comparison of the effects of crude extract of spinach-beet leaves and equivalent amounts of chlorophyll and chlorophyllin in modifying the clastogenic activity of chromium(VI) oxide in mice in vivo. **Phytother Re**, v. 9, p.199–202, 1995.

SCHULER, M.; MAURER, U.; GOLDSTEIN, J. C. p53 triggers apoptosis in oncogene-expressing fibroblasts by the induction of Noxa and mitochondrial Bax translocation. **Cell Death Differ**, v.10, p. 451-460, 2003.

SCHIMMER, A. D. Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice. **Cancer Res**, v. 20, p.7183-90, 2004.

SCHOEFS B. Chlorophyll and carotenoid analysis in food products. Properties of the pigments and methods of analysis. **Trends Food Sci Technol**, v.13, p.361-371, 2002.

SHARMA , D. SANTOSH K., S.; SAINIS, K. B. Antiapoptotic and immunomodulatory effects of chlorophyllin. *Molecular Immunology*, v. 44, p. 347–359, 2007.

SHI, Y. Structural biology of programmed cell death. In: YIN, X. M.; DONG, Z., editors. *Essentials of apoptosis*. New Jersey: **Humana Press Inc.**; 2003. p. 47-65.

SINGH, A.; SINGH, S. P.; BAMEZAI, R. Modulatory influence of chlorophyllin on the mouse skin papillomagenesis and xenobiotic detoxification system. **Carcinogenesis**, v. 17, p.1459- 1463, 1996.

SON, B. H.; CHOI, J. S.; LEE, J. H. Prognostic values of KAI1 and survivin expression in an infiltrating ductal carcinoma of the breast. **Pathology**, v. 37, p. 131-136, 2005.

STEINMETZ, K. A.; POTTER, J. D. Vegetables, fruit and cancer prevention: a review. **J Am Diet Assoc**, v.96, p.1027- 1039, 1996.

SUZUKI, N.; HATATE, H.; KANAMORI, N.; NOMOTO, T.; NAMIKI, M.; YODA. B. Antioxidant activity of chlorophyll derivatives, oxygen stress relievers, to superoxide measured by using Cypridina luciferin analogues. **Fish Sci.**, v. 61, p. 65- 67, 1995.

TAWASHI, R.; COUSINEAU, M.; SHARKAWI, M.; Effect of sodium copper chlorophyllin on the formation of calcium oxalate crystals in rat kidney. **Invest Urol**, v. 18, p. 90- 92, 1980.

TESSEMA, M.; LEHMANN, U.; KREIPE, H. Cell cycle and no end. **Virchows Arch**, v. 4, p.313-323, 2004

TORRES, V. A.; TAPIA, J. C.; RODRIGUEZ, D. A.; PARRAGA, M.; LISBOA, P.; MONTOYA, M.; LEYTON, L.; QUEST, A. F. Caveolin-1 controls cell proliferation and cell death by suppressing expression of the inhibitor of apoptosis protein survivin. **J. Cell Sci.** v.119, p.1812-1823, 2006.

VANKIFAHMETOGLU, H.; OLSSON, M.; ZHIVOTOVSKY, B. Death trough a tragedy: mitotic catastrophe. **Cell Death Differ**, v.7. p. 1153–1162, 2008.

van Es, J .H.; GILES, R. H.; CLEVERS, H. C. The Many Faces of the Tumor Suppressor Gene APC, **Exp Cell Res**, v.264, p. 26–134, 2001.

VOELLER, H. J.; TRUICA, C. I.; GELMANN, E. P. Betacatenin mutations in human prostate cancer. **Cancer Res**. v.58, p.2520–2523, 1998.

VOLM, M.; KOOMAG. I, R.; MATTERN, J.; STAMMLER, G. Cyclin A is associated with an unfavourable outcome in patients with non-small-cell lung carcinomas. **Br J Cancer**, v. 75, p.1774–1778, 1997.

WANG, X.; REN, J.; QU, X. Targeted RNA interference of cyclin A2 mediated by functionalized single-walled carbon nanotubes induces proliferation arrest and apoptosis in chronic myelogenous leukemia K562 cells. **Chem Med Chem**, v. 3, p.940–945, 2008.

WANG, R.; DASHWOOD, W. M.; BAILEY, G. S.; WILLIAMS, D. E.; DASHWOOD, R. H. Tumors from rats given 1,2-dimethylhydrazine plus chlorophyllin or indole-3-carbinol contain transcriptional changes in  $\beta$ -catenin that are independent of  $\beta$ -catenin mutation status. **Mutation Res.**, v. 601, p. 11–18, 2006.

WILLIS, S. N.; FLETCHER, J. I.; KAUFMANN, T.; van DELFT, M.F.; et al. Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. **Science**, v.315, p. 856–859, 2007.

WU, Y.C.; XUE, D. Programed ceel death in *C. elegans*. In: YIN, X. M.; DONG, Z., editors. Essentials of apoptosis. New Jersey: **Humana Press** Inc.; 2003. p.135-44.

WYLLIE, A. H. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. **Nature**, v.284, p.555–556, 1980.

YANG, R.; MOROSETTI, R.; KOEFFLER, H. P. Characterization of a second human cyclin A that is highly expressed in testis and in several leukemic cell lines. **Cancer Res**, v.5, p. 913–20, 1997.

YIN, X. M.; DING, W. X.; ZHAO, Y. Bcl-2 family proteins. In: YIN, X. M.; DONG, Z., editors. Essentials of apoptosis. New Jersey: Humana Press Inc.; 2003. p. 13-27.

YOUNG, R. W., BEREGI, J. S. Use of chlorophyllin in the care of geriatric patients. **J Am Geriatr Soc**, v. 28, p. 46–47, 1980.

YOULE, R. J. Cell biology. Cellular demolition and the rules of engagement. **Science** v.315, p. 776–777, 2007.

YOULE, R. J.; STRASSER, A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 9, p. 47-59, 2008.

YUN, C. H.; JEONG, H. G.; JHOUN, J. W.; GUENGERICH, F. P. Non-specific inhibition of cytochrome P450 activities by chlorophyllin in human and rat liver microsomes. **Carcinogenesis**, v. 16, p. 1437- 1440, 1995.

ZAMORANO, P.L.; MAHESH, V.B.; BRANN, D. W. Quantitative RT-PCR for neuroendocrine studies. **Neuroendocrinology**, v.63, p.397–407, 1996.

**ANEXOS**

**Tabela 1** – Valores médios  $\pm$  desvio padrão da absorbância obtida no teste de citotoxicidade MTT, após 24, 48 e 72 horas de exposição à clorofilina.

Tratamentos	Médias $\pm$ Desvio padrão		
	24 h	48 h	72 h
Controle	0,521 $\pm$ 0,033	0,842 $\pm$ 0,032	0,727 $\pm$ 0,069
Controle positivo (Doxorrubicina)	0,109 $\pm$ 0,041***	0,064 $\pm$ 0,046***	0,0471 $\pm$ 0,038***
Chl 100 $\mu$ g/mL	0,5 $\pm$ 0,033	0,826 $\pm$ 0,030***	0,614 $\pm$ 0,028***
Chl 200 $\mu$ g/mL	0,56 $\pm$ 0,054	0,804 $\pm$ 0,042***	0,639 $\pm$ 0,028***
Chl 400 $\mu$ g/mL	0,598 $\pm$ 0,021	0,721 $\pm$ 0,016***	0,498 $\pm$ 0,011***

Dados analisados por ANOVA seguida de teste de Dunnett.

\*\*\* Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo ( $p < 0.001$ )

**Tabela 2** – Valores percentuais médios das taxas de sobrevivência celular  $\pm$  Desvio Padrão calculados a partir do Ensaio do MTT, após 24, 48 e 72 horas de exposição à clorofilina.

Tratamentos	Médias $\pm$ Desvio padrão		
	24 h	48 h	7 2h
Controle	100 $\pm$ 0,00	100 $\pm$ 0,00	100 $\pm$ 0,00
Chl 100 $\mu$ g/mL	100,39 $\pm$ 1,99	98,05 $\pm$ 3,38	84,45 $\pm$ 5,09
Chl 200 $\mu$ g/mL	105,14 $\pm$ 2,91	95,40 $\pm$ 1,94	87,86 $\pm$ 8,86
Chl 400 $\mu$ g/mL	110,88 $\pm$ 9,98	85,48 $\pm$ 4,63	68,44 $\pm$ 7,02

Resultados do qRT-PCR do gene *CASP3* em células HB4a expostas a 100 e 200 µg/mL por 24 h. Os valores representam a quantificação da expressão relativa pelo método de Pfaffl (2001).

Controle X Clorofilina 100 µg/mL: 24 h - R1							
		Controle	Chl 100 µg/mL	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta Ct}$	Razão
<i>CASP3</i>	Eficiência	1,87	1,79	1,83			
	Ct	24,07	23,73		0,34	1,228099	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,83	1,75	1,79			1,158639
	Ct	17,05	16,95		0,1	1,05995	

Controle X Clorofilina 100 µg/mL: 24 h - R2							
		Controle	Chl 100 µg/mL	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta Ct}$	Razão
<i>CASP3</i>	Eficiência	1,72	1,78	1,75			
	Ct	24,83	22,78		2,05	3,149401	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,87	1,84	1,855			1,436915
	Ct	16,68	15,41		1,27	2,191779	

Controle X Clorofilina 100 µg/mL: 24 h - R3							
		Controle	Chl 100 µg/mL	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta Ct}$	Razão
<i>CASP3</i>	Eficiência	1,87	1,84	1,855			
	Ct	24,33	23,87		0,46	1,328734	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,77	1,91	1,84			1,412277
	Ct	16,54	16,64		-0,1	0,940845	

Controle X Clorofilina 100 µg/mL: 24 h - R1							
		Controle	Chl 200 µg/mL	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta Ct}$	Razão
<i>CASP3</i>	Eficiência	1,87	1,84	1,855			
	Ct	24,07	22,82		1,25	2,16486	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,83	1,82	1,825			0,846954
	Ct	17,05	15,49		1,56	2,556054	

Controle X Clorofilina 200 µg/mL: 24 h - R2							
		Controle	Chl 200 µg/mL	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta Ct}$	Razão
<i>CASP3</i>	Eficiência	1,72	2,14	1,93			
	Ct	24,83	23		1,83	3,330964	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,87	1,78	1,825			1,718623
	Ct	16,68	15,58		1,1	1,938158	

Controle X Clorofilina 200 µg/mL: 24 h - R3							
		Controle	Chl 200 µg/mL	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta Ct}$	Razão
<i>CASP3</i>	Eficiência	1,87	1,65	1,76			
	Ct	24,33	22,65		1,68	2,585004	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,77	1,83	1,8			1,330465
	Ct	16,54	15,41		1,13	1,942933	

Resultados do qRT-PCR do gene *CASP7* em células HB4a expostas a 100 e 200 µg/mL por 24 h. Os valores representam a quantificação da expressão relativa pelo método de Pfaffl (2001).

Controle X Clorofilina 100 µg/mL: 24 h - R1							
		Controle	Chl 100 µg/mL	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta Ct}$	Razão
<i>CASP7</i>	Eficiência	1,76	1,83	1,81			
	Ct	26,05	27,32		-1,27	0,470704	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,83	1,75	1,79			0,444082
	Ct	17,05	16,95		0,1	1,05995	

Controle X Clorofilina 100 µg/mL: 24 h - R2							
		Controle	Chl 100 µg/mL	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta Ct}$	Razão
<i>CASP7</i>	Eficiência	1,87	1,87	1,87			
	Ct	26,77	25,33		1,44	2,462929	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,87	1,84	1,855			1,123712
	Ct	16,68	15,41		1,27	2,191779	

Controle X Clorofilina 100 µg/mL: 24 h - R3							
		Controle	Chl 100 µg/mL	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta Ct}$	Razão
<i>CASP7</i>	Eficiência	1,93	1,82	1,81			
	Ct	26,89	26,87		0,02	1,011937	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,77	1,91	1,84			1,075562
	Ct	16,54	16,64		-0,1	0,940845	

Controle X Clorofilina 200 µg/mL: 24 h - R1							
		Controle	Chl 200 µg/mL	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta Ct}$	Razão
<i>CASP7</i>	Eficiência	1,76	1,87	1,81			
	Ct	26,05	25,64		0,41	1,275405	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,83	1,82	1,825			0,498974
	Ct	17,05	15,49		1,56	2,556054	

Controle X Clorofilina 200 µg/mL: 24 h - R2							
		Controle	Chl 200 µg/mL	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta Ct}$	Razão
<i>CASP7</i>	Eficiência	1,87	1,94	1,905			
	Ct	26,77	25,79		0,98	1,880603	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,87	1,78	1,825			0,970304
	Ct	16,68	15,58		1,1	1,938158	

Controle X Clorofilina 200 µg/mL: 24 h - R3							
		Controle	Chl 200 µg/mL	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta Ct}$	Razão
<i>CASP7</i>	Eficiência	1,93	1,81	1,81			
	Ct	26,89	25,5		1,39	2,281252	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,77	1,83	1,8			1,174128
	Ct	16,54	15,41		1,13	1,942933	

Resultados do qRT-PCR do gene *CASP8* em células HB4a expostas a 100 e 200  $\mu\text{g/mL}$  por 24 h . Os valores representam a quantificação da expressão relativa pelo método de Pfaffl (2001).

Controle X Clorofilina 100 $\mu\text{g/mL}$ : 24 h - R1							
		Controle	Chl 100 $\mu\text{g/mL}$	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta\text{Ct}}$	Razão
<i>CASP8</i>	Eficiência	1,88	1,85	1,81			
	Ct	26,74	27,69		-0,95	0,569122	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,83	1,75	1,79			0,536933
	Ct	17,05	16,95		0,1	1,05995	

Controle X Clorofilina 100 $\mu\text{g/mL}$ : 24 h - R2							
		Controle	Chl 100 $\mu\text{g/mL}$	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta\text{Ct}}$	Razão
<i>CASP8</i>	Eficiência	1,75	1,87	1,81			
	Ct	26,92	25,12		1,8	2,909521	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,87	1,84	1,855			1,32747
	Ct	16,68	15,41		1,27	2,191779	

Controle X Clorofilina 100 $\mu\text{g/mL}$ : 24 h - R3							
		Controle	Chl 100 $\mu\text{g/mL}$	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta\text{Ct}}$	Razão
<i>CASP8</i>	Eficiência	1,77	1,97	1,81			
	Ct	27,87	26,75		1,12	1,943569	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,77	1,91	1,84			2,065769
	Ct	16,54	16,64		-0,1	0,940845	

Controle X Clorofilina 200 $\mu\text{g/mL}$ : 24 h - R1							
		Controle	Chl 200 $\mu\text{g/mL}$	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta\text{Ct}}$	Razão
<i>CASP8</i>	Eficiência	1,88	1,81	1,81			
	Ct	26,74	25,39		1,35	2,227748	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,83	1,82	1,825			0,871557
	Ct	17,05	15,49		1,56	2,556054	

Controle X Clorofilina 200 $\mu\text{g/mL}$ : 24 h - R2							
		Controle	Chl 200 $\mu\text{g/mL}$	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta\text{Ct}}$	Razão
<i>CASP8</i>	Eficiência	1,75	1,84	1,795			
	Ct	26,92	25,27		1,65	2,625466	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,87	1,78	1,825			1,354619
	Ct	16,68	15,58		1,1	1,938158	

Controle X Clorofilina 200 $\mu\text{g/mL}$ : 24 h - R3							
		Controle	Chl 200 $\mu\text{g/mL}$	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta\text{Ct}}$	Razão
<i>CASP8</i>	Eficiência	1,77	1,78	1,81			
	Ct	27,87	25,51		2,36	4,056219	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,77	1,83	1,8			2,087678
	Ct	16,54	15,41		1,13	1,942933	

Resultados do qRT-PCR do gene *CASP9* em células HB4a expostas a 100 e 200  $\mu\text{g/mL}$  por 24 h. Os valores representam a quantificação da expressão relativa pelo método de Pfaffl (2001).

Controle X Clorofilina 100 $\mu\text{g/mL}$ : 24 h - R1							
		Controle	Chl 100 $\mu\text{g/mL}$	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta\text{Ct}}$	Razão
<i>CASP9</i>	Eficiência	1,71	1,76	1,81			
	Ct	27,1	28,76		-1,66	0,373468	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,83	1,75	1,79			0,352345
	Ct	17,05	16,95		0,1	1,05995	

Controle X Clorofilina 100 $\mu\text{g/mL}$ : 24 h - R2							
		Controle	Chl 100 $\mu\text{g/mL}$	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta\text{Ct}}$	Razão
<i>CASP9</i>	Eficiência	1,78	1,73	1,755			
	Ct	27,53	25,58		1,95	2,994611	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,87	1,84	1,855			1,366292
	Ct	16,68	15,41		1,27	2,191779	

Controle X Clorofilina 100 $\mu\text{g/mL}$ : 24 h - R3							
		Controle	Chl 100 $\mu\text{g/mL}$	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta\text{Ct}}$	Razão
<i>CASP9</i>	Eficiência	1,8	1,8	1,81			
	Ct	28,19	27,32		0,87	1,675639	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,77	1,91	1,84			1,780993
	Ct	16,54	16,64		-0,1	0,940845	

Controle X Clorofilina 200 $\mu\text{g/mL}$ : 24 h - R1							
		Controle	Chl 200 $\mu\text{g/mL}$	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta\text{Ct}}$	Razão
<i>CASP9</i>	Eficiência	1,71	1,75	1,81			
	Ct	27,1	26,2		0,9	1,705732	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,83	1,82	1,825			0,66733
	Ct	17,05	15,49		1,56	2,556054	

Controle X Clorofilina 200 $\mu\text{g/mL}$ : 24 h - R2							
		Controle	Chl 200 $\mu\text{g/mL}$	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta\text{Ct}}$	Razão
<i>CASP9</i>	Eficiência	1,78	1,71	1,745			
	Ct	27,53	26,07		1,46	2,25435	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,87	1,78	1,825			1,16314
	Ct	16,68	15,58		1,1	1,938158	

Controle X Clorofilina 200 $\mu\text{g/mL}$ : 24 h - R3							
		Controle	Chl 200 $\mu\text{g/mL}$	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta\text{Ct}}$	Razão
<i>CASP9</i>	Eficiência	1,8	1,79	1,81			
	Ct	28,19	26,33		1,86	3,014964	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,77	1,83	1,8			1,551759
	Ct	16,54	15,41		1,13	1,942933	

Resultados do qRT-PCR do gene *BAK* em células HB4a expostas a 100 e 200 µg/mL por 24 h. Os valores representam a quantificação da expressão relativa pelo método de Pfaffl (2001).

Controle X Clorofilina 100 µg/mL: 24 h - R1							
		Controle	Chl 100 µg/mL	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta Ct}$	Razão
<i>BAK</i>	Eficiência	1,78	1,79	1,785			
	Ct	24,62	23,63		0,99	1,774687	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,86	2,04	1,95			2,967895
	Ct	17,23	18		-0,77	0,597962	

Controle X Clorofilina 100 µg/mL: 24 h - R2							
		Controle	Chl 100 µg/mL	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta Ct}$	Razão
<i>BAK</i>	Eficiência	1,81	1,87	1,84			
	Ct	25,21	22,67		2,54	4,705841	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,84	1,83	1,835			1,485008
	Ct	17,19	15,29		1,9	3,1689	

Controle X Clorofilina 100 µg/mL: 24 h - R3							
		Controle	Chl 100 µg/mL	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta Ct}$	Razão
<i>BAK</i>	Eficiência	1,65	1,71	1,68			
	Ct	26,28	24,59		1,69	2,403105	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,87	1,91	1,89			1,208353
	Ct	17,84	16,76		1,08	1,988743	

Controle X Clorofilina 200 µg/mL: 24 h - R1							
		Controle	Chl 200 µg/mL	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta Ct}$	Razão
<i>BAK</i>	Eficiência	1,78	1,7	1,74			
	Ct	24,62	22,61		2,01	3,044416	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,86	1,7	1,78			1,047676
	Ct	17,23	15,38		1,85	2,905876	

Controle X Clorofilina 200 µg/mL: 24 h - R2							
		Controle	Chl 200 µg/mL	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta Ct}$	Razão
<i>BAK</i>	Eficiência	1,81	1,7	1,755			
	Ct	25,21	22,44		2,77	4,749497	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,84	1,74	1,79			1,535015
	Ct	17,19	15,25		1,94	3,094104	

Controle X Clorofilina 200 µg/mL: 24 h - R3							
		Controle	Chl 200 µg/mL	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta Ct}$	Razão
<i>BAK</i>	Eficiência	1,65	1,7	1,675			
	Ct	26,28	22,78		3,5	6,082076	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,87	1,87	1,87			1,405861
	Ct	17,84	15,5		2,34	4,326228	

Resultados do qRT-PCR do gene *BAX* em células HB4a expostas a 100 e 200 µg/mL por 24 h . Os valores representam a quantificação da expressão relativa pelo método de Pfaffl (2001).

Controle X Clorofilina 100 µg/mL: 24h - R1							
		Controle	Chl 100 µg/mL	Média E	DeltaCt	E <sup>ΔCt</sup>	Razão
<i>BAX</i>	Eficiência	1,7	1,8	1,75			
	Ct	22,99	24,14		-1,15	0,52542	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,83	1,75	1,79			0,495702
	Ct	17,05	16,95		0,1	1,05995	

Controle X Clorofilina 100 µg/mL: 24h – R2							
		Controle	Chl 100 µg/mL	Média E	DeltaCt	E <sup>ΔCt</sup>	Razão
<i>BAX</i>	Eficiência	1,82	1,76	1,79			
	Ct	23,57	21		2,57	4,465111	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,87	1,84	1,855			2,037209
	Ct	16,68	15,41		1,27	2,191779	

Controle X Clorofilina 100 µg/mL: 24h – R3							
		Controle	Chl 100 µg/mL	Média E	DeltaCt	E <sup>ΔCt</sup>	Razão
<i>BAX</i>	Eficiência	1,87	1,7	1,785			
	Ct	24,61	22,89		1,72	2,709054	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,77	1,91	1,84			2,879384
	Ct	16,54	16,64		-0,1	0,940845	

Controle X Clorofilina 200 µg/mL: 24h - R1							
		Controle	Chl 100 µg/mL	Média E	DeltaCt	E <sup>ΔCt</sup>	Razão
<i>BAX</i>	Eficiência	1,7	1,9	1,8			
	Ct	22,99	21,16		1,83	2,931897	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,83	1,82	1,825			1,14704
	Ct	17,05	15,49		1,56	2,556054	

Controle X Clorofilina 200 µg/mL: 24h – R2							
		Controle	Chl 100 µg/mL	Média E	DeltaCt	E <sup>ΔCt</sup>	Razão
<i>BAX</i>	Eficiência	1,82	1,83	1,825			
	Ct	23,57	20,95		2,62	4,83625	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,87	1,78	1,825			2,495282
	Ct	16,68	15,58		1,1	1,938158	

Controle X Clorofilina 200 µg/mL: 24h – R3							
		Controle	Chl 100 µg/mL	Média E	DeltaCt	E <sup>ΔCt</sup>	Razão
<i>BAX</i>	Eficiência	1,87	1,7	1,785			
	Ct	24,61	21,38		3,23	6,498176	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,77	1,83	1,8			3,344518
	Ct	16,54	15,41		1,13	1,942933	

Resultados do qRT-PCR do gene *BCL-2* em células HB4a expostas a 100 e 200 µg/mL por 24 h. Os valores representam a quantificação da expressão relativa pelo método de Pfaffl (2001).

Controle X Clorofilina 100 µg/mL: 24 h - R1							
		Controle	Chl 100 µg/mL	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta Ct}$	Razão
<i>BCL-2</i>	Eficiência	1,75	1,71	1,73			
	Ct	31,88	31,47		0,41	1,251984	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,83	1,75	1,79			1,181173
	Ct	17,05	16,95		0,1	1,05995	

Controle X Clorofilina 100 µg/mL: 24 h - R2							
		Controle	Chl 100 µg/mL	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta Ct}$	Razão
<i>BCL-2</i>	Eficiência	1,71	1,71	1,71			
	Ct	32,44	30,5		1,94	2,831473	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,87	1,84	1,855			1,291861
	Ct	16,68	15,41		1,27	2,191779	

Controle X Clorofilina 100 µg/mL: 24 h - R3							
		Controle	Chl 100 µg/mL	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta Ct}$	Razão
<i>BCL-2</i>	Eficiência	1,75	1,71	1,73			
	Ct	32,16	32,44		-0,28	0,857723	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,77	1,91	1,84			0,911652
	Ct	16,54	16,64		-0,1	0,940845	

Controle X Clorofilina 200 µg/mL: 24 h - R1							
		Controle	Chl 200 µg/mL	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta Ct}$	Razão
<i>BCL-2</i>	Eficiência	1,75	1,695	1,7225			
	Ct	31,88	30,495		1,385	2,123638	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,83	1,82	1,825			0,830827
	Ct	17,05	15,49		1,56	2,556054	

Controle X Clorofilina 200 µg/mL: 24 h - R2							
		Controle	Chl 200 µg/mL	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta Ct}$	Razão
<i>BCL-2</i>	Eficiência	1,71	1,69	1,7			
	Ct	32,44	30,35		2,09	3,031365	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,87	1,78	1,825			1,564044
	Ct	16,68	15,58		1,1	1,938158	

Controle X Clorofilina 200 µg/mL: 24 h - R3							
		Controle	Chl 200 µg/mL	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta Ct}$	Razão
<i>BCL-2</i>	Eficiência	1,75	1,7	1,725			
	Ct	32,16	30,64		1,52	2,290443	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,77	1,83	1,8			1,178858
	Ct	16,54	15,41		1,13	1,942933	

Resultados do qRT-PCR do gene *BCL-XL* em células HB4a expostas a 100 e 200 µg/mL por 24 h . Os valores representam a quantificação da expressão relativa pelo método de Pfaffl (2001).

Controle X Clorofilina 100 µg/mL: 24 h - R1							
		Controle	Chl 100 µg/mL	Média E	DeltaCt	E <sup>ΔCt</sup>	Razão
<i>BCL-XL</i>	Eficiência	1,85	1,77	1,81			
	Ct	24,42	22,1		2,32	3,961086	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,83	1,75	1,79			3,737051
	Ct	17,05	16,95		0,1	1,05995	

Controle X Clorofilina 100 µg/mL: 24 h - R2							
		Controle	Chl 100 µg/mL	Média E	DeltaCt	E <sup>ΔCt</sup>	Razão
<i>BCL-XL</i>	Eficiência	1,75	1,7	1,725			
	Ct	24,3	21		3,3	6,045107	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,87	1,84	1,855			2,758083
	Ct	16,68	15,41		1,27	2,191779	

Controle X Clorofilina 100 µg/mL: 24 h - R3							
		Controle	Chl 100 µg/mL	Média E	DeltaCt	E <sup>ΔCt</sup>	Razão
<i>BCL-XL</i>	Eficiência	1,7	1,76	1,73			
	Ct	26,01	23,21		2,8	4,640119	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,77	1,91	1,84			4,931861
	Ct	16,54	16,64		-0,1	0,940845	

Controle X Clorofilina 200 µg/mL: 24 h- R1							
		Controle	Chl 200 µg/mL	Média E	DeltaCt	E <sup>ΔCt</sup>	Razão
<i>BCL-XL</i>	Eficiência	1,85	1,83	1,84			
	Ct	24,42	21,34		3,08	6,540921	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,83	1,82	1,825			2,558991
	Ct	17,05	15,49		1,56	2,556054	

Controle X Clorofilina 200 µg/mL: 24 h- R2							
		Controle	Chl 200 µg/mL	Média E	DeltaCt	E <sup>ΔCt</sup>	Razão
<i>BCL-XL</i>	Eficiência	1,75	1,75	1,75			
	Ct	24,3	20,87		3,43	6,817427	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,87	1,78	1,825			3,517478
	Ct	16,68	15,58		1,1	1,938158	

Controle X Clorofilina 200 µg/mL: 24 h- R3							
		Controle	Chl 200 µg/mL	Média E	DeltaCt	E <sup>ΔCt</sup>	Razão
<i>BCL-XL</i>	Eficiência	1,7	1,92	1,81			
	Ct	26,01	21,81		4,2	12,08509	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,77	1,83	1,8			6,220024
	Ct	16,54	15,41		1,13	1,942933	

Resultados do qRT-PCR do gene *BIRC5* em células HB4a expostas a 100 e 200 µg/mL por 24 h. Os valores representam a quantificação da expressão relativa pelo método de Pfaffl (2001).

Controle X Clorofilina 100 µg/mL: 24 h - R1							
		Controle	Chl 100 µg/mL	Média E	DeltaCt	E <sup>ΔCt</sup>	Razão
<i>BIRC5</i>	Eficiência	1,75	1,8	1,775			
	Ct	23,43	25,19		-1,76	0,36426	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,86	2,04	1,95			0,609169
	Ct	17,23	18		-0,77	0,597962	

Controle X Clorofilina 100 µg/mL: 24 h - R2							
		Controle	Chl 100 µg/mL	Média E	DeltaCt	E <sup>ΔCt</sup>	Razão
<i>BIRC5</i>	Eficiência	1,95	1,8	1,875			
	Ct	23,55	22,72		0,83	1,684966	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,84	1,83	1,835			0,531719
	Ct	17,19	15,29		1,9	3,1689	

Controle X Clorofilina 100 µg/mL: 24 h - R3							
		Controle	Chl 100 µg/mL	Média E	DeltaCt	E <sup>ΔCt</sup>	Razão
<i>BIRC5</i>	Eficiência	1,93	1,93	1,93			
	Ct	23,86	23,67		0,19	1,133068	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,87	1,91	1,89			0,569741
	Ct	17,84	16,76		1,08	1,988743	

Controle X Clorofilina 200 µg/mL: 24 h- R1							
		Controle	Chl 200 µg/mL	Média E	DeltaCt	E <sup>ΔCt</sup>	Razão
<i>BIRC5</i>	Eficiência	1,75	1,87	1,81			
	Ct	23,43	24,21		-0,78	0,629522	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,86	1,7	1,78			0,216638
	Ct	17,23	15,38		1,85	2,905876	

Controle X Clorofilina 200 µg/mL: 24 h- R2							
		Controle	Chl 200 µg/mL	Média E	DeltaCt	E <sup>ΔCt</sup>	Razão
<i>BIRC5</i>	Eficiência	1,95	1,83	1,89			
	Ct	23,55	23,86		-0,31	0,820912	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,84	1,74	1,79			0,265315
	Ct	17,19	15,25		1,94	3,094104	

Controle X Clorofilina 200 µg/mL: 24 h- R3							
		Controle	Chl 200 µg/mL	Média E	DeltaCt	E <sup>ΔCt</sup>	Razão
<i>BIRC5</i>	Eficiência	1,93	1,88	1,905			
	Ct	23,86	24,55		-0,69	0,641021	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,87	1,87	1,87			0,148171
	Ct	17,84	15,5		2,34	4,326228	

Resultados do qRT-PCR do gene *B-catenina* em células HB4a expostas a 100 e 200  $\mu\text{g/mL}$  por 24 h. Os valores representam a quantificação da expressão relativa pelo método de Pfaffl (2001).

Controle X Clorofilina 100 $\mu\text{g/mL}$ : 24 h - R1							
		Controle	Chl 100 $\mu\text{g/mL}$	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta\text{Ct}}$	Razão
<i><math>\beta</math>-catenina</i>	Eficiência	1,83	1,7	1,765			
	Ct	26,72	27,46		-0,74	0,656763	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,86	2,04	1,95			1,098337
	Ct	17,23	18		-0,77	0,597962	

Controle X Clorofilina 100 $\mu\text{g/mL}$ : 24 h - R2							
		Controle	Chl 100 $\mu\text{g/mL}$	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta\text{Ct}}$	Razão
<i><math>\beta</math>-catenina</i>	Eficiência	1,7	1,7	1,7			
	Ct	26,23	24,15		2,08	3,015322	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,84	1,83	1,835			0,951536
	Ct	17,19	15,29		1,9	3,1689	

Controle X Clorofilina 100 $\mu\text{g/mL}$ : 24 h - R3							
		Controle	Chl 100 $\mu\text{g/mL}$	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta\text{Ct}}$	Razão
<i><math>\beta</math>-catenina</i>	Eficiência	1,7	1,66	1,68			
	Ct	27,53	25,72		1,81	2,557466	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,87	1,91	1,89			1,285971
	Ct	17,84	16,76		1,08	1,988743	

Controle X Clorofilina 200 $\mu\text{g/mL}$ : 24 h- R1							
		Controle	Chl 200 $\mu\text{g/mL}$	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta\text{Ct}}$	Razão
<i><math>\beta</math>-catenina</i>	Eficiência	1,83	1,72	1,775			
	Ct	26,72	24,26		2,46	4,102305	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,86	1,7	1,78			1,411728
	Ct	17,23	15,38		1,85	2,905876	

Controle X Clorofilina 200 $\mu\text{g/mL}$ : 24 h- R2							
		Controle	Chl 200 $\mu\text{g/mL}$	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta\text{Ct}}$	Razão
<i><math>\beta</math>-catenina</i>	Eficiência	1,7	1,77	1,735			
	Ct	26,23	24,27		1,96	2,944605	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,84	1,74	1,79			0,951683
	Ct	17,19	15,25		1,94	3,094104	

Controle X Clorofilina 200 $\mu\text{g/mL}$ : 24 h- R3							
		Controle	Chl 200 $\mu\text{g/mL}$	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta\text{Ct}}$	Razão
<i><math>\beta</math>-catenina</i>	Eficiência	1,7	1,67	1,685			
	Ct	27,53	24,25		3,28	5,536658	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,87	1,87	1,87			1,279789
	Ct	17,84	15,5		2,34	4,326228	

Resultados do qRT-PCR do gene *CCNA2* em células HB4a expostas a 100 e 200 µg/mL por 24 h . Os valores representam a quantificação da expressão relativa pelo método de Pfaffl (2001).

Controle X Clorofilina 100 µg/mL: 24 h - R1							
		Controle	Chl 100 µg/mL	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta Ct}$	Razão
<i>CCNA2</i>	Eficiência	1,73	1,76	1,745			
	Ct	23,14	24,1		-0,96	0,585971	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,86	2,04	1,95			0,979948
	Ct	17,23	18		-0,77	0,597962	

Controle X Clorofilina 100 µg/mL: 24 h - R2							
		Controle	Chl 100 µg/mL	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta Ct}$	Razão
<i>CCNA2</i>	Eficiência	1,7	1,93	1,815			
	Ct	24,14	21,95		2,19	3,689265	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,84	1,83	1,835			1,16421
	Ct	17,19	15,29		1,9	3,1689	

Controle X Clorofilina 100 µg/mL: 24 h - R3							
		Controle	Chl 100 µg/mL	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta Ct}$	Razão
<i>CCNA2</i>	Eficiência	1,73	1,92	1,825			
	Ct	23,47	22,8		0,67	1,496395	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,87	1,91	1,89			0,752432
	Ct	17,84	16,76		1,08	1,988743	

Controle X Clorofilina 200 µg/mL: 24 h- R1							
		Controle	Chl 200 µg/mL	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta Ct}$	Razão
<i>CCNA2</i>	Eficiência	1,73	1,82	1,775			
	Ct	23,14	23,31		-0,17	0,907061	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,86	1,7	1,78			0,312147
	Ct	17,23	15,38		1,85	2,905876	

Controle X Clorofilina 200 µg/mL: 24 h- R2							
		Controle	Chl 200 µg/mL	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta Ct}$	Razão
<i>CCNA2</i>	Eficiência	1,7	1,86	1,78			
	Ct	24,14	23,3		0,84	1,623128	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,84	1,74	1,79			0,524587
	Ct	17,19	15,25		1,94	3,094104	

Controle X Clorofilina 200 µg/mL: 24 h- R3							
		Controle	Chl 200 µg/mL	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta Ct}$	Razão
<i>CCNA2</i>	Eficiência	1,73	1,78	1,755			
	Ct	23,47	23,32		0,15	1,088032	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,87	1,87	1,87			0,251497
	Ct	17,84	15,5		2,34	4,326228	

Resultados do qRT-PCR do gene *TP53* em células HB4a expostas a 100 e 200  $\mu\text{g/mL}$  por 24 h . Os valores representam a quantificação da expressão relativa pelo método de Pfaffl (2001).

Controle X Clorofilina 100 $\mu\text{g/mL}$ : 24 h - R1							
		Controle	Chl 100 $\mu\text{g/mL}$	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta\text{Ct}}$	Razão
<i>TP53</i>	Eficiência	1,76	1,76	1,76			
	Ct	22,42	21,48		0,94	1,701304	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,83	1,75	1,79			1,60508
	Ct	17,05	16,95		0,1	1,05995	

Controle X Clorofilina 100 $\mu\text{g/mL}$ : 24 h - R2							
		Controle	Chl 100 $\mu\text{g/mL}$	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta\text{Ct}}$	Razão
<i>TP53</i>	Eficiência	1,79	1,77	1,78			
	Ct	22,69	20,55		2,14	3,434779	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,87	1,84	1,855			1,567119
	Ct	16,68	15,41		1,27	2,191779	

Controle X Clorofilina 100 $\mu\text{g/mL}$ : 24 h - R3							
		Controle	Chl 100 $\mu\text{g/mL}$	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta\text{Ct}}$	Razão
<i>TP53</i>	Eficiência	1,8	1,64	1,72			
	Ct	23,7	22,41		1,29	2,012944	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,77	1,91	1,84			2,139506
	Ct	16,54	16,64		-0,1	0,940845	

Controle X Clorofilina 200 $\mu\text{g/mL}$ : 24 h- R1							
		Controle	Chl 200 $\mu\text{g/mL}$	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta\text{Ct}}$	Razão
<i>TP53</i>	Eficiência	1,76	1,71	1,735			
	Ct	22,42	21,13		1,29	2,035618	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,83	1,82	1,825			0,796391
	Ct	17,05	15,49		1,56	2,556054	

Controle X Clorofilina 200 $\mu\text{g/mL}$ : 24 h- R2							
		Controle	Chl 200 $\mu\text{g/mL}$	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta\text{Ct}}$	Razão
<i>TP53</i>	Eficiência	1,79	1,65	1,72			
	Ct	22,69	21,06		1,63	2,420535	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,87	1,78	1,825			1,248884
	Ct	16,68	15,58		1,1	1,938158	

Controle X Clorofilina 200 $\mu\text{g/mL}$ : 24 h- R3							
		Controle	Chl 200 $\mu\text{g/mL}$	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta\text{Ct}}$	Razão
<i>TP53</i>	Eficiência	1,8	1,77	1,785			
	Ct	23,7	21,2		2,5	4,256921	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,77	1,83	1,8			2,190976
	Ct	16,54	15,41		1,13	1,942933	

Resultados do qRT-PCR do gene *APC* em células HB4a expostas a 100 e 200  $\mu\text{g/mL}$  por 24 h. Os valores representam a quantificação da expressão relativa pelo método de Pfaffl (2001).

Controle X Clorofilina 100 $\mu\text{g/mL}$ : 24 h - R1							
		Controle	Chl 100 $\mu\text{g/mL}$	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta\text{Ct}}$	Razão
<i>APC</i>	Eficiência	1,85	1,79	1,82			
	Ct	25,71	26,67		-0,96	0,562771	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,86	2,04	1,95			0,941148
	Ct	17,23	18		-0,77	0,597962	

Controle X Clorofilina 100 $\mu\text{g/mL}$ : 24 h - R2							
		Controle	Chl 100 $\mu\text{g/mL}$	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta\text{Ct}}$	Razão
<i>APC</i>	Eficiência	1,85	1,74	1,795			
	Ct	25,66	24,58		1,08	1,881004	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,84	1,83	1,835			0,593582
	Ct	17,19	15,29		1,9	3,1689	

Controle X Clorofilina 100 $\mu\text{g/mL}$ : 24 h - R3							
		Controle	Chl 100 $\mu\text{g/mL}$	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta\text{Ct}}$	Razão
<i>APC</i>	Eficiência	1,76	1,81	1,785			
	Ct	26,26	25,5		0,76	1,553263	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,87	1,91	1,89			0,781027
	Ct	17,84	16,76		1,08	1,988743	

Controle X Clorofilina 200 $\mu\text{g/mL}$ : 24 h- R1							
		Controle	Chl 200 $\mu\text{g/mL}$	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta\text{Ct}}$	Razão
<i>APC</i>	Eficiência	1,85	1,88	1,865			
	Ct	25,71	25		0,71	1,556618	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,86	1,7	1,78			0,535679
	Ct	17,23	15,38		1,85	2,905876	

Controle X Clorofilina 200 $\mu\text{g/mL}$ : 24 h- R2							
		Controle	Chl 200 $\mu\text{g/mL}$	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta\text{Ct}}$	Razão
<i>APC</i>	Eficiência	1,85	1,88	1,865			
	Ct	25,66	24,87		0,79	1,6362	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,84	1,74	1,79			0,528812
	Ct	17,19	15,25		1,94	3,094104	

Controle X Clorofilina 200 $\mu\text{g/mL}$ : 24 h- R3							
		Controle	Chl 200 $\mu\text{g/mL}$	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta\text{Ct}}$	Razão
<i>APC</i>	Eficiência	1,76	1,81	1,785			
	Ct	26,26	25,06		1,2	2,004314	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,87	1,87	1,87			0,463294
	Ct	17,84	15,5		2,34	4,326228	

Resultados do qRT-PCR do gene *CASP3* em células HB4a expostas a 100 e 200 µg/mL por 48 h . Os valores representam a quantificação da expressão relativa pelo método de Pfaffl (2001).

Controle X Clorofilina 100 µg/mL: 48 h - R1							
		Controle	Chl 100 µg/mL	Média E	DeltaCt	E $\Delta$ Ct	Razão
<i>CASP3</i>	Eficiência	2,04	2,01	2,025			
	Ct	21,51	21,53		-0,02	0,985988	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,97	1,91	1,94			0,501549
	Ct	15,57	14,55		1,02	1,965883	

Controle X Clorofilina 100 µg/mL: 48 h - R2							
		Controle	Chl 100 µg/mL	Media E	DeltaCt	E $\Delta$ Ct	Razão
<i>CASP3</i>	Eficiência	1,89	1,87	1,88			
	Ct	21,36	21,62		-0,26	0,848631	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,85	1,99	1,92			0,821398
	Ct	15,02	14,97		0,05	1,033154	

Controle X Clorofilina 100 µg/mL: 48 h - R3							
		Controle	Chl 100 µg/mL	Media E	DeltaCt	E $\Delta$ Ct	Razão
<i>CASP3</i>	Eficiência	1,88	1,92	1,9			
	Ct	21,43	22,52		-1,09	0,496774	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,83	1,8	1,815			0,665286
	Ct	15,16	15,65		-0,49	0,746707	

Controle X Clorofilina 200 µg/mL: 48 h - R1							
		Controle	Chl 200 µg/mL	Média E	DeltaCt	E $\Delta$ Ct	Razão
<i>CASP3</i>	Eficiência	2,04	1,83	1,935			
	Ct	21,51	22,24		-0,73	0,617622	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,97	1,9	1,935			0,523664
	Ct	15,57	15,32		0,25	1,179425	

Controle X Clorofilina 200 µg/mL: 48 h - R2							
		Controle	Chl 200 µg/mL	Média E	DeltaCt	E $\Delta$ Ct	Razão
<i>CASP3</i>	Eficiência	1,89	1,86	1,875			
	Ct	21,36	22,63		-1,27	0,450079	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,85	1,89	1,87			0,76622
	Ct	15,02	15,87		-0,85	0,587401	

Controle X Clorofilina 200 µg/mL: 48 h - R3							
		Controle	Chl 200 µg/mL	Média E	DeltaCt	E $\Delta$ Ct	Razão
<i>CASP3</i>	Eficiência	1,88	1,89	1,885			
	Ct	21,43	22,42		-0,99	0,533878	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,83	2,12	1,975			0,932839
	Ct	15,16	15,98		-0,82	0,572315	

Resultados do qRT-PCR do gene *CASP7* em células HB4a expostas a 100 e 200  $\mu\text{g/mL}$  por 48 h. Os valores representam a quantificação da expressão relativa pelo método de Pfaffl (2001).

Controle X Clorofilina 100 $\mu\text{g/mL}$ : 48 h - R1							
		Controle	Chl 100 $\mu\text{g/mL}$	Media E	DeltaCt	E $\Delta$ Ct	Razão
<i>CASP7</i>	Eficiência	1,78	1,85	1,815			
	Ct	24,7	24,12		0,58	1,41302	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,79	1,95	1,87			0,573715
	Ct	15,76	14,32		1,44	2,462929	

Controle X Clorofilina 100 $\mu\text{g/mL}$ : 48 h - R2							
		Controle	Chl 100 $\mu\text{g/mL}$	Media E	DeltaCt	E $\Delta$ Ct	Razão
<i>CASP7</i>	Eficiência	1,89	1,88	1,885			
	Ct	23,8	23,9		-0,1	0,938575	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,94	1,84	1,89			0,914977
	Ct	14,76	14,72		0,04	1,02579	

Controle X Clorofilina 100 $\mu\text{g/mL}$ : 48 h - R3							
		Controle	Chl 100 $\mu\text{g/mL}$	Media E	DeltaCt	E $\Delta$ Ct	Razão
<i>CASP7</i>	Eficiência	1,98	2,01	1,995			
	Ct	23,73	24,89		-1,16	0,448814	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,85	1,82	1,835			0,690634
	Ct	14,4	15,11		-0,71	0,649858	

Controle X Clorofilina 200 $\mu\text{g/mL}$ : 48 h - R1							
		Controle	Chl 200 $\mu\text{g/mL}$	Media E	DeltaCt	E $\Delta$ Ct	Razão
<i>CASP7</i>	Eficiência	1,78	1,82	1,8			
	Ct	24,7	24,56		0,14	1,085771	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,79	1,75	1,77			0,599578
	Ct	15,76	14,72		1,04	1,810891	

Controle X Clorofilina 200 $\mu\text{g/mL}$ : 48 h - R2							
		Controle	Chl 200 $\mu\text{g/mL}$	Média E	DeltaCt	E $\Delta$ Ct	Razão
<i>CASP7</i>	Eficiência	1,89	1,83	1,86			
	Ct	23,8	25,74		-1,94	0,300016	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,94	1,93	1,935			0,50206
	Ct	14,76	15,54		-0,78	0,59757	

Controle X Clorofilina 200 $\mu\text{g/mL}$ : 48 h - R3							
		Controle	Chl 200 $\mu\text{g/mL}$	Média E	DeltaCt	E $\Delta$ Ct	Razão
<i>CASP7</i>	Eficiência	1,98	2,01	1,995			
	Ct	23,73	25,49		-1,76	0,296552	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,85	1,86	1,855			0,536674
	Ct	14,4	15,36		-0,96	0,552573	

Resultados do qRT-PCR do gene *CASP8* em células HB4a expostas a 100 e 200 µg/mL por 48 h . Os valores representam a quantificação da expressão relativa pelo método de Pfaffl (2001).

Controle X Clorofilina 100 µg/mL: 48 h - R1							
		Controle	Chl 100 µg/mL	Média E	DeltaCt	EΔCt	Razão
<i>CASP8</i>	Eficiência	1,77	1,95	1,86			
	Ct	23,66	23,57		0,09	1,057441	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,79	1,95	1,87			0,429343
	Ct	15,76	14,32		1,44	2,462929	

Controle X Clorofilina 100 µg/mL: 48 h - R2							
		Controle	Chl 100 µg/mL	Media E	DeltaCt	EΔCt	Razão
<i>CASP8</i>	Eficiência	1,92	1,88	1,9			
	Ct	23,77	23,64		0,13	1,087021	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,94	1,84	1,89			1,059692
	Ct	14,76	14,72		0,04	1,02579	

Controle X Clorofilina 100 µg/mL: 48 h - R3							
		Controle	Chl 100 µg/mL	Media E	DeltaCt	EΔCt	Razão
<i>CASP8</i>	Eficiência	1,84	1,97	1,905			
	Ct	23,91	24,49		-0,58	0,688115	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,85	1,82	1,835			1,05887
	Ct	14,4	15,11		-0,71	0,649858	

Controle X Clorofilina 200 µg/mL: 48 h - R1							
		Controle	Chl 200 µg/mL	Media E	DeltaCt	EΔCt	Razão
<i>CASP8</i>	Eficiência	1,77	1,81	1,79			
	Ct	23,66	23,8		-0,14	0,921723	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,79	1,75	1,77			0,508989
	Ct	15,76	14,72		1,04	1,810891	

Controle X Clorofilina 200 µg/mL: 48 h - R2							
		Controle	Chl 200 µg/mL	Média E	DeltaCt	EΔCt	Razão
<i>CASP8</i>	Eficiência	1,92	1,71	1,815			
	Ct	23,77	24,44		-0,67	0,670738	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,94	1,93	1,935			1,122442
	Ct	14,76	15,54		-0,78	0,59757	

Controle X Clorofilina 200 µg/mL: 48 h - R3							
		Controle	Chl 200 µg/mL	Média E	DeltaCt	EΔCt	Razão
<i>CASP8</i>	Eficiência	1,84	1,86	1,85			
	Ct	23,91	24,43		-0,52	0,726224	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,85	1,86	1,855			1,314259
	Ct	14,4	15,36		-0,96	0,552573	

Resultados do qRT-PCR do gene *CASP9* em células HB4a expostas a 100 e 200 µg/mL por 48 h . Os valores representam a quantificação da expressão relativa pelo método de Pfaffl (2001).

Controle X Clorofilina 100 µg/mL: 48 h - R1							
		Controle	Chl 100 µg/mL	Média E	DeltaCt	EΔCt	Razão
<i>CASP9</i>	Eficiência	1,95	1,72	1,835			
	Ct	23,89	24,07		-0,18	0,89649	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,87	1,82	1,845			0,477056
	Ct	15,44	14,41		1,03	1,879214	

Controle X Clorofilina 100 µg/mL: 48 h - R2							
		Controle	Chl 100 µg/mL	Media E	DeltaCt	EΔCt	Razão
<i>CASP9</i>	Eficiência	1,84	1,83	1,835			
	Ct	23,98	24,38		-0,4	0,784414	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,97	1,78	1,875			0,947209
	Ct	14,87	15,17		-0,3	0,828132	

Controle X Clorofilina 100 µg/mL: 48 h - R3							
		Controle	Chl 100 µg/mL	Media E	DeltaCt	EΔCt	Razão
<i>CASP9</i>	Eficiência	1,72	1,8	1,76			
	Ct	24,04	24,95		-0,91	0,597838	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,9	1,97	1,935			1,068717
	Ct	15	15,88		-0,88	0,559398	

Controle X Clorofilina 200 µg/mL: 48 h - R1							
		Controle	Chl 200 µg/mL	Media E	DeltaCt	EΔCt	Razão
<i>CASP9</i>	Eficiência	1,95	1,85	1,9			
	Ct	23,89	24,48		-0,59	0,684755	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,87	1,81	1,84			0,745779
	Ct	15,44	15,58		-0,14	0,918175	

Controle X Clorofilina 200 µg/mL: 48 h - R2							
		Controle	Chl 200 µg/mL	Média E	DeltaCt	EΔCt	Razão
<i>CASP9</i>	Eficiência	1,84	1,76	1,8			
	Ct	23,98	25,18		-1,2	0,493939	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,97	1,82	1,895			1,364808
	Ct	14,87	16,46		-1,59	0,361911	

Controle X Clorofilina 200 µg/mL: 48 h - R3							
		Controle	Chl 200 µg/mL	Média E	DeltaCt	EΔCt	Razão
<i>CASP9</i>	Eficiência	1,72	1,77	1,745			
	Ct	24,04	25,51		-1,47	0,441124	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,9	1,84	1,87			0,741633
	Ct	15	15,83		-0,83	0,594801	

Resultados do qRT-PCR do gene *BAK* em células HB4a expostas a 100 e 200  $\mu\text{g/mL}$  por 48 h. Os valores representam a quantificação da expressão relativa pelo método de Pfaffl (2001).

Controle X Clorofilina 100 $\mu\text{g/mL}$ : 48 h - R1							
		Controle	Chl 100 $\mu\text{g/mL}$	Média E	DeltaCt	E $\Delta$ Ct	Razão
<i>BAK</i>	Eficiência	1,92	1,92	1,92			
	Ct	21,82	21,68		0,14	1,095626	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,97	1,91	1,94			0,55732
	Ct	15,57	14,55		1,02	1,965883	

Controle X Clorofilina 100 $\mu\text{g/mL}$ : 48 h - R2							
		Controle	Chl 100 $\mu\text{g/mL}$	Media E	DeltaCt	E $\Delta$ Ct	Razão
<i>BAK</i>	Eficiência	1,72	1,78	1,75			
	Ct	22,12	21,94		0,18	1,105979	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,85	1,99	1,92			1,070488
	Ct	15,02	14,97		0,05	1,033154	

Controle X Clorofilina 100 $\mu\text{g/mL}$ : 48 h - R3							
		Controle	Chl 100 $\mu\text{g/mL}$	Media E	DeltaCt	E $\Delta$ Ct	Razão
<i>BAK</i>	Eficiência	1,74	1,74	1,74			
	Ct	22,07	23,07		-1	0,574713	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,83	1,8	1,815			0,769662
	Ct	15,16	15,65		-0,49	0,746707	

Controle X Clorofilina 200 $\mu\text{g/mL}$ : 48 h - R1							
		Controle	Chl 200 $\mu\text{g/mL}$	Media E	DeltaCt	E $\Delta$ Ct	Razão
<i>BAK</i>	Eficiência	1,92	1,91	1,915			
	Ct	21,82	21,92		-0,1	0,937094	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,97	1,9	1,935			0,794535
	Ct	15,57	15,32		0,25	1,179425	

Controle X Clorofilina 200 $\mu\text{g/mL}$ : 48 h - R2							
		Controle	Chl 200 $\mu\text{g/mL}$	Média E	DeltaCt	E $\Delta$ Ct	Razão
<i>BAK</i>	Eficiência	1,72	2	1,86			
	Ct	22,12	22,82		-0,7	0,647651	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,85	1,89	1,87			1,10257
	Ct	15,02	15,87		-0,85	0,587401	

Controle X Clorofilina 200 $\mu\text{g/mL}$ : 48 h - R3							
		Controle	Chl 200 $\mu\text{g/mL}$	Média E	DeltaCt	E $\Delta$ Ct	Razão
<i>BAK</i>	Eficiência	1,74	1,94	1,84			
	Ct	22,07	22,77		-0,7	0,652571	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,83	2,12	1,975			1,14023
	Ct	15,16	15,98		-0,82	0,572315	

Resultados do qRT-PCR do gene *BAX* em células HB4a expostas a 100 e 200  $\mu\text{g/mL}$  por 48 h. Os valores representam a quantificação da expressão relativa pelo método de Pfaffl (2001).

Controle X Clorofilina 100 $\mu\text{g/mL}$ : 48 h - R1							
		Controle	Chl 100 $\mu\text{g/mL}$	Média E	DeltaCt	E $\Delta$ Ct	Razão
<i>BAX</i>	Eficiência	2,12	1,92	2,02			
	Ct	20,79	20,39		0,4	1,32477	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,97	1,91	1,94			0,67388
	Ct	15,57	14,55		1,02	1,965883	

Controle X Clorofilina 100 $\mu\text{g/mL}$ : 48 h - R2							
		Controle	Chl 100 $\mu\text{g/mL}$	Media E	DeltaCt	E $\Delta$ Ct	Razão
<i>BAX</i>	Eficiência	1,89	1,72	1,805			
	Ct	21,08	20,36		0,72	1,529902	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,85	1,99	1,92			1,480807
	Ct	15,02	14,97		0,05	1,033154	

Controle X Clorofilina 100 $\mu\text{g/mL}$ : 48 h - R3							
		Controle	Chl 100 $\mu\text{g/mL}$	Media E	DeltaCt	E $\Delta$ Ct	Razão
<i>BAX</i>	Eficiência	2,01	1,74	1,875			
	Ct	20,96	21,27		-0,31	0,822943	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,83	1,8	1,815			1,102095
	Ct	15,16	15,65		-0,49	0,746707	

Controle X Clorofilina 200 $\mu\text{g/mL}$ : 48 h - R1							
		Controle	Chl 200 $\mu\text{g/mL}$	Media E	DeltaCt	E $\Delta$ Ct	Razão
<i>BAX</i>	Eficiência	2,12	1,94	2,03			
	Ct	20,79	20,38		0,41	1,336821	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,97	1,9	1,935			1,133452
	Ct	15,57	15,32		0,25	1,179425	

Controle X Clorofilina 200 $\mu\text{g/mL}$ : 48 h - R2							
		Controle	Chl 200 $\mu\text{g/mL}$	Média E	DeltaCt	E $\Delta$ Ct	Razão
<i>BAX</i>	Eficiência	1,89	1,81	1,85			
	Ct	21,08	20,34		0,74	1,576548	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,85	1,89	1,87			2,683938
	Ct	15,02	15,87		-0,85	0,587401	

Controle X Clorofilina 200 $\mu\text{g/mL}$ : 48 h - R3							
		Controle	Chl 200 $\mu\text{g/mL}$	Média E	DeltaCt	E $\Delta$ Ct	Razão
<i>BAX</i>	Eficiência	2,01	1,82	1,915			
	Ct	20,96	20,14		0,82	1,703642	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,83	2,12	1,975			2,976757
	Ct	15,16	15,98		-0,82	0,572315	

Resultados do qRT-PCR do gene *BCL-2* em células HB4a expostas a 100 e 200 µg/mL por 48 h. Os valores representam a quantificação da expressão relativa pelo método de Pfaffl (2001).

Controle X Clorofilina 100 µg/mL: 48 h - R1							
		Controle	Chl 100 µg/mL	Média E	DeltaCt	E $\Delta$ Ct	Razão
<i>BCL-2</i>	Eficiência	1,71	1,74	1,725			
	Ct	29,05	29,41		-0,36	0,821781	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,97	1,91	1,94			0,418021
	Ct	15,57	14,55		1,02	1,965883	

Controle X Clorofilina 100 µg/mL: 48 h - R2							
		Controle	Chl 100 µg/mL	Media E	DeltaCt	E $\Delta$ Ct	Razão
<i>BCL-2</i>	Eficiência	1,85	1,73	1,79			
	Ct	29,78	29,77		0,01	1,005839	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,85	1,99	1,92			0,973562
	Ct	15,02	14,97		0,05	1,033154	

Controle X Clorofilina 100 µg/mL: 48 h - R3							
		Controle	Chl 100 µg/mL	Media E	DeltaCt	E $\Delta$ Ct	Razão
<i>BCL-2</i>	Eficiência	1,85	1,83	1,84			
	Ct	29,85	30,35		-0,5	0,73721	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,83	1,8	1,815			0,987281
	Ct	15,16	15,65		-0,49	0,746707	

Controle X Clorofilina 200 µg/mL: 48 h - R1							
		Controle	Chl 200 µg/mL	Media E	DeltaCt	E $\Delta$ Ct	Razão
<i>BCL-2</i>	Eficiência	1,71	1,91	1,81			
	Ct	29,05	28,87		0,18	1,11271	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,97	1,9	1,935			0,943435
	Ct	15,57	15,32		0,25	1,179425	

Controle X Clorofilina 200 µg/mL: 48 h - R2							
		Controle	Chl 200 µg/mL	Média E	DeltaCt	E $\Delta$ Ct	Razão
<i>BCL-2</i>	Eficiência	1,85	1,84	1,845			
	Ct	29,78	30,28		-0,5	0,73621	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,85	1,89	1,87			1,253335
	Ct	15,02	15,87		-0,85	0,587401	

Controle X Clorofilina 200 µg/mL: 48 h - R3							
		Controle	Chl 200 µg/mL	Média E	DeltaCt	E $\Delta$ Ct	Razão
<i>BCL-2</i>	Eficiência	1,85	1,73	1,79			
	Ct	29,85	29,55		0,3	1,190847	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,83	2,12	1,975			2,080755
	Ct	15,16	15,98		-0,82	0,572315	

Resultados do qRT-PCR do gene *BCL-XL* em células HB4a expostas a 100 e 200 µg/mL por 48 h. Os valores representam a quantificação da expressão relativa pelo método de Pfaffl (2001).

Controle X Clorofilina 100 µg/mL: 48 h - R1							
		Controle	Chl 100 µg/mL	Média E	DeltaCt	EΔCt	Razão
<i>BCL-XL</i>	Eficiência	1,77	1,9	1,835			
	Ct	20,71	19,7		1,01	1,846173	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,87	1,82	1,845			0,982418
	Ct	15,44	14,41		1,03	1,879214	

Controle X Clorofilina 100 µg/mL: 48 h - R2							
		Controle	Chl 100 µg/mL	Media E	DeltaCt	EΔCt	Razão
<i>BCL-XL</i>	Eficiência	1,79	1,79	1,79			
	Ct	21,12	20,56		0,56	1,385472	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,97	1,78	1,875			1,673008
	Ct	14,87	15,17		-0,3	0,828132	

Controle X Clorofilina 100 µg/mL: 48 h - R3							
		Controle	Chl 100 µg/mL	Media E	DeltaCt	EΔCt	Razão
<i>BCL-XL</i>	Eficiência	1,77	1,79	1,78			
	Ct	21,09	21,51		-0,42	0,784917	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,9	1,97	1,935			1,403146
	Ct	15	15,88		-0,88	0,559398	

Controle X Clorofilina 200 µg/mL: 48 h - R1							
		Controle	Chl 200 µg/mL	Media E	DeltaCt	EΔCt	Razão
<i>BCL-XL</i>	Eficiência	1,77	1,82	1,795			
	Ct	20,71	19,63		1,08	1,881004	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,87	1,81	1,84			2,048633
	Ct	15,44	15,58		-0,14	0,918175	

Controle X Clorofilina 200 µg/mL: 48 h - R2							
		Controle	Chl 200 µg/mL	Média E	DeltaCt	EΔCt	Razão
<i>BCL-XL</i>	Eficiência	1,79	1,8	1,795			
	Ct	21,12	20,73		0,39	1,256276	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,97	1,82	1,895			3,471233
	Ct	14,87	16,46		-1,59	0,361911	

Controle X Clorofilina 200 µg/mL: 48 h - R3							
		Controle	Chl 200 µg/mL	Média E	DeltaCt	EΔCt	Razão
<i>BCL-XL</i>	Eficiência	1,77	1,73	1,75			
	Ct	21,09	20,38		0,71	1,487843	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,9	1,84	1,87			2,501414
	Ct	15	15,83		-0,83	0,594801	

Resultados do qRT-PCR do gene *BIRC5* em células HB4a expostas a 100 e 200 µg/mL por 48 h. Os valores representam a quantificação da expressão relativa pelo método de Pfaffl (2001).

Controle X Clorofilina 100 µg/mL: 48 h - R1							
		Controle	Chl 100 µg/mL	Média E	DeltaCt	EΔCt	Razão
<i>BIRC5</i>	Eficiência	1,89	1,86	1,875			
	Ct	21,42	22,49		-1,07	0,510374	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,87	1,82	1,845			0,271589
	Ct	15,44	14,41		1,03	1,879214	

Controle X Clorofilina 100 µg/mL: 48 h - R2							
		Controle	Chl 100 µg/mL	Média E	DeltaCt	EΔCt	Razão
<i>BIRC5</i>	Eficiência	1,78	1,82	1,8			
	Ct	21,35	21,89		-0,54	0,728036	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,97	1,78	1,875			0,87913
	Ct	14,87	15,17		-0,3	0,828132	

Controle X Clorofilina 100 µg/mL: 48 h - R3							
		Controle	Chl 100 µg/mL	Média E	DeltaCt	EΔCt	Razão
<i>BIRC5</i>	Eficiência	1,71	1,87	1,79			
	Ct	21,16	22,43		-1,27	0,477394	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,9	1,97	1,935			0,853406
	Ct	15	15,88		-0,88	0,559398	

Controle X Clorofilina 200 µg/mL: 48 h - R1							
		Controle	Chl 200 µg/mL	Média E	DeltaCt	EΔCt	Razão
<i>BIRC5</i>	Eficiência	1,89	1,77	1,83			
	Ct	21,42	23,21		-1,79	0,33901	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,87	1,81	1,84			0,36922
	Ct	15,44	15,58		-0,14	0,918175	

Controle X Clorofilina 200 µg/mL: 48 h - R2							
		Controle	Chl 200 µg/mL	Média E	DeltaCt	EΔCt	Razão
<i>BIRC5</i>	Eficiência	1,78	1,73	1,755			
	Ct	21,35	23,71		-2,36	0,265159	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,97	1,82	1,895			0,73266
	Ct	14,87	16,46		-1,59	0,361911	

Controle X Clorofilina 200 µg/mL: 48 h - R3							
		Controle	Chl 200 µg/mL	Média E	DeltaCt	EΔCt	Razão
<i>BIRC5</i>	Eficiência	1,71	1,73	1,72			
	Ct	21,16	24,18		-3,02	0,194404	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,9	1,84	1,87			0,32684
	Ct	15	15,83		-0,83	0,594801	

Resultados do qRT-PCR do gene *B-catenina* em células HB4a expostas a 100 e 200 µg/mL por 48 h. Os valores representam a quantificação da expressão relativa pelo método de Pfaffl (2001).

Controle X Clorofilina 100 µg/mL: 48 h - R1							
		Controle	Chl 100 µg/mL	Média E	DeltaCt	EΔCt	Razão
<i>B-catenina</i>	Eficiência	1,71	1,81	1,76			
	Ct	24,22	23,19		1,03	1,790103	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,84	1,95	1,895			1,189072
	Ct	14,81	14,17		0,64	1,505462	

Controle X Clorofilina 100 µg/mL: 48 h - R2							
		Controle	Chl 100 µg/mL	Media E	DeltaCt	EΔCt	Razão
<i>B-catenina</i>	Eficiência	1,81	1,7	1,755			
	Ct	24,38	23,72		0,66	1,449516	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	2	1,96	1,98			1,118124
	Ct	14,69	14,31		0,38	1,296381	

Controle X Clorofilina 100 µg/mL: 48 h - R3							
		Controle	Chl 100 µg/mL	Media E	DeltaCt	EΔCt	Razão
<i>B-catenina</i>	Eficiência	1,84	1,74	1,79			
	Ct	23,99	24,68		-0,69	0,669162	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,94	1,95	1,945			1,318953
	Ct	14,19	15,21		-1,02	0,507343	

Controle X Clorofilina 200 µg/mL: 48 h - R1							
		Controle	Chl 200 µg/mL	Media E	DeltaCt	EΔCt	Razão
<i>B-catenina</i>	Eficiência	1,71	1,63	1,67			
	Ct	24,22	23,34		0,88	1,570328	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,84	1,78	1,81			1,174162
	Ct	14,81	14,32		0,49	1,337404	

Controle X Clorofilina 200 µg/mL: 48 h - R2							
		Controle	Chl 200 µg/mL	Media E	DeltaCt	EΔCt	Razão
<i>B-catenina</i>	Eficiência	1,81	1,7	1,755			
	Ct	24,38	23,41		0,97	1,725634	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	2	1,82	1,91			1,323504
	Ct	14,69	14,28		0,41	1,303838	

Controle X Clorofilina 200 µg/mL: 48 h - R3							
		Controle	Chl 200 µg/mL	Media E	DeltaCt	EΔCt	Razão
<i>B-catenina</i>	Eficiência	1,84	1,77	1,805			
	Ct	23,99	23,48		0,51	1,351461	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,94	1,94	1,94			1,273213
	Ct	14,19	14,1		0,09	1,061456	

Resultados do qRT-PCR do gene *CCNA2* em células HB4a expostas a 100 e 200 µg/mL por 48 h. Os valores representam a quantificação da expressão relativa pelo método de Pfaffl (2001).

Controle X Clorofilina 100 µg/mL: 48 h - R1							
		Controle	Chl 100 µg/mL	Média E	DeltaCt	EΔCt	Razão
<i>CCNA2</i>	Eficiência	1,83	1,81	1,82			
	Ct	20,57	21,38		-0,81	0,615662	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,87	1,82	1,845			0,327617
	Ct	15,44	14,41		1,03	1,879214	

Controle X Clorofilina 100 µg/mL: 48 h - R2							
		Controle	Chl 100 µg/mL	Media E	DeltaCt	EΔCt	Razão
<i>CCNA2</i>	Eficiência	1,77	1,83	1,8			
	Ct	20,95	21,08		-0,13	0,926434	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,97	1,78	1,875			1,118703
	Ct	14,87	15,17		-0,3	0,828132	

Controle X Clorofilina 100 µg/mL: 48 h - R3							
		Controle	Chl 100 µg/mL	Media E	DeltaCt	EΔCt	Razão
<i>CCNA2</i>	Eficiência	1,75	1,98	1,865			
	Ct	20,12	21,75		-1,63	0,362071	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,9	1,97	1,935			0,647251
	Ct	15	15,88		-0,88	0,559398	

Controle X Clorofilina 200 µg/mL: 48 h - R1							
		Controle	Chl 200 µg/mL	Media E	DeltaCt	EΔCt	Razão
<i>CCNA2</i>	Eficiência	1,83	1,86	1,845			
	Ct	20,57	22,63		-2,06	0,28317	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,87	1,81	1,84			0,308405
	Ct	15,44	15,58		-0,14	0,918175	

Controle X Clorofilina 200 µg/mL: 48 h - R2							
		Controle	Chl 200 µg/mL	Média E	DeltaCt	EΔCt	Razão
<i>CCNA2</i>	Eficiência	1,77	1,92	1,845			
	Ct	20,95	22,99		-2,04	0,28666	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,97	1,82	1,895			0,792075
	Ct	14,87	16,46		-1,59	0,361911	

Controle X Clorofilina 200 µg/mL: 48 h - R3							
		Controle	Chl 200 µg/mL	Média E	DeltaCt	EΔCt	Razão
<i>CCNA2</i>	Eficiência	1,75	1,72	1,735			
	Ct	20,12	22,65		-2,53	0,248069	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,9	1,84	1,87			0,417062
	Ct	15	15,83		-0,83	0,594801	

Resultados do qRT-PCR do gene *TP53* em células HB4a expostas a 100 e 200 µg/mL por 48 h. Os valores representam a quantificação da expressão relativa pelo método de Pfaffl (2001).

Controle X Clorofilina 100 µg/mL: 48 h - R1							
		Controle	Chl 100 µg/mL	Média E	DeltaCt	E $\Delta$ Ct	Razão
<i>TP53</i>	Eficiência	1,91	1,81	1,86			
	Ct	19,45	19,47		-0,02	0,987665	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,84	1,95	1,895			0,656054
	Ct	14,81	14,17		0,64	1,505462	

Controle X Clorofilina 100 µg/mL: 48 h - R2							
		Controle	Chl 100 µg/mL	Media E	DeltaCt	E $\Delta$ Ct	Razão
<i>TP53</i>	Eficiência	1,84	1,77	1,805			
	Ct	19,24	20		-0,76	0,638377	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	2	1,96	1,98			0,49243
	Ct	14,69	14,31		0,38	1,296381	

Controle X Clorofilina 100 µg/mL: 48 h - R3							
		Controle	Chl 100 µg/mL	Media E	DeltaCt	E $\Delta$ Ct	Razão
<i>TP53</i>	Eficiência	1,75	1,76	1,755			
	Ct	19,25	20,09		-0,84	0,623458	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,94	1,95	1,945			1,228868
	Ct	14,19	15,21		-1,02	0,507343	

Controle X Clorofilina 200 µg/mL: 48 h - R1							
		Controle	Chl 200 µg/mL	Media E	DeltaCt	E $\Delta$ Ct	Razão
<i>TP53</i>	Eficiência	1,91	1,72	1,815			
	Ct	19,45	19,51		-0,06	0,964867	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,84	1,78	1,81			0,721448
	Ct	14,81	14,32		0,49	1,337404	

Controle X Clorofilina 200 µg/mL: 48 h - R2							
		Controle	Chl 200 µg/mL	Média E	DeltaCt	E $\Delta$ Ct	Razão
<i>TP53</i>	Eficiência	1,84	1,79	1,815			
	Ct	19,24	20,37		-1,13	0,509882	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	2	1,82	1,91			0,746929
	Ct	14,69	15,28		-0,59	0,682638	

Controle X Clorofilina 200 µg/mL: 48 h - R3							
		Controle	Chl 200 µg/mL	Média E	DeltaCt	E $\Delta$ Ct	Razão
<i>TP53</i>	Eficiência	1,75	1,73	1,74			
	Ct	19,25	20,13		-0,88	0,61421	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,94	1,94	1,94			1,122577
	Ct	14,19	15,1		-0,91	0,547142	

Resultados do qRT-PCR do gene *APC* em células HB4a expostas a 100 e 200  $\mu\text{g/mL}$  por 48 h. Os valores representam a quantificação da expressão relativa pelo método de Pfaffl (2001).

Controle X Clorofilina 100 $\mu\text{g/mL}$ : 48 h - R1							
		Controle	Chl 100 $\mu\text{g/mL}$	Média E	DeltaCt	E $\Delta$ Ct	Razão
<i>APC</i>	Eficiência	1,83	1,8	1,815			
	Ct	23,3	23,98		-0,68	0,666751	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,85	1,96	1,905			0,388018
	Ct	15,39	14,55		0,84	1,718351	

Controle X Clorofilina 100 $\mu\text{g/mL}$ : 48 h - R2							
		Controle	Chl 100 $\mu\text{g/mL}$	Media E	DeltaCt	E $\Delta$ Ct	Razão
<i>APC</i>	Eficiência	1,84	1,89	1,865			
	Ct	23,59	23,69		-0,1	0,939576	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,81	1,91	1,86			0,728504
	Ct	15,04	14,63		0,41	1,289734	

Controle X Clorofilina 100 $\mu\text{g/mL}$ : 48 h - R3							
		Controle	Chl 100 $\mu\text{g/mL}$	Media E	DeltaCt	E $\Delta$ Ct	Razão
<i>APC</i>	Eficiência	1,82	1,76	1,79			
	Ct	23,06	24,65		-1,59	0,396245	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,84	2,07	1,955			0,764342
	Ct	14,74	15,72		-0,98	0,518413	

Controle X Clorofilina 200 $\mu\text{g/mL}$ : 48 h - R1							
		Controle	Chl 200 $\mu\text{g/mL}$	Media E	DeltaCt	E $\Delta$ Ct	Razão
<i>APC</i>	Eficiência	1,83	1,74	1,785			
	Ct	23,3	23,91		-0,61	0,702264	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,85	1,86	1,855			0,587058
	Ct	15,39	15,1		0,29	1,196244	

Controle X Clorofilina 200 $\mu\text{g/mL}$ : 48 h - R2							
		Controle	Chl 200 $\mu\text{g/mL}$	Média E	DeltaCt	E $\Delta$ Ct	Razão
<i>APC</i>	Eficiência	1,84	1,72	1,78			
	Ct	23,59	24,97		-1,38	0,451253	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,81	1,99	1,9			0,788744
	Ct	15,04	15,91		-0,87	0,572116	

Controle X Clorofilina 200 $\mu\text{g/mL}$ : 48 h - R3							
		Controle	Chl 200 $\mu\text{g/mL}$	Média E	DeltaCt	E $\Delta$ Ct	Razão
<i>APC</i>	Eficiência	1,82	1,76	1,79			
	Ct	23,06	24,13		-1,07	0,536349	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,84	1,84	1,84			1,236652
	Ct	14,74	16,11		-1,37	0,43371	

Resultados do qRT-PCR do gene *CASP3* em células HB4a expostas a 100 e 200  $\mu\text{g/mL}$  por 72 h. Os valores representam a quantificação da expressão relativa pelo método de Pfaffl (2001).

Controle X Clorofilina 100 $\mu\text{g/mL}$ : 72 h - R1							
		Controle	Chl 100 $\mu\text{g/mL}$	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta\text{Ct}}$	Razão
<i>CASP3</i>	Eficiência	1,92	1,88	1,9			
	Ct	22,34	21,02		1,32	2,333215	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,88	1,97	1,925			1,354806
	Ct	15,04	14,21		0,83	1,722176	

Controle X Clorofilina 100 $\mu\text{g/mL}$ : 72 h - R2							
		Controle	Chl 100 $\mu\text{g/mL}$	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta\text{Ct}}$	Razão
<i>CASP3</i>	Eficiência	1,89	1,87	1,88			
	Ct	21,1	21,15		-0,05	0,968929	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,97	1,93	1,95			0,761868
	Ct	14,41	14,05		0,36	1,271781	

Controle X Clorofilina 100 $\mu\text{g/mL}$ : 72 h - R3							
		Controle	Chl 100 $\mu\text{g/mL}$	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta\text{Ct}}$	Razão
<i>CASP3</i>	Eficiência	1,91	2	1,955			
	Ct	21,07	20,92		0,15	1,105788	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	2	1,96	1,985			0,748081
	Ct	13,89	13,32		0,57	1,478167	

Controle X Clorofilina 200 $\mu\text{g/mL}$ : 72 h - R1							
		Controle	Chl 200 $\mu\text{g/mL}$	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta\text{Ct}}$	Razão
<i>CASP3</i>	Eficiência	1,92	2,01	1,965			
	Ct	22,34	21,26		1,08	2,074109	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,88	1,9	1,89			1,262384
	Ct	15,04	14,26		0,78	1,64301	

Controle X Clorofilina 200 $\mu\text{g/mL}$ : 72 h - R2							
		Controle	Chl 200 $\mu\text{g/mL}$	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta\text{Ct}}$	Razão
<i>CASP3</i>	Eficiência	1,89	1,98	1,935			
	Ct	21,1	21,29		-0,19	0,882126	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,97	1,98	1,975			1,2064
	Ct	14,41	14,87		-0,46	0,731205	

Controle X Clorofilina 200 $\mu\text{g/mL}$ : 72 h - R3							
		Controle	Chl 200 $\mu\text{g/mL}$	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta\text{Ct}}$	Razão
<i>CASP3</i>	Eficiência	1,91	1,87	1,89			
	Ct	21,07	20,83		0,24	1,165067	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	2,01	1,95	1,98			1,273261
	Ct	13,89	14,02		-0,13	0,915026	

Resultados do qRT-PCR do gene *CASP7* em células HB4a expostas a 100 e 200 µg/mL por 72 h. Os valores representam a quantificação da expressão relativa pelo método de Pfaffl (2001).

Controle X Clorofilina 100 µg/mL: 72 h - R1							
		Controle	Chl 100 µg/mL	Média E	DeltaCt	E <sup>ΔCt</sup>	Razão
<i>CASP7</i>	Eficiência	1,88	1,9	1,89			
	Ct	24,56	23,91		0,65	1,512517	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,88	1,97	1,925			0,878259
	Ct	15,04	14,21		0,83	1,722176	

Controle X Clorofilina 100 µg/mL: 72 h - R2							
		Controle	Chl 100 µg/mL	Média E	DeltaCt	E <sup>ΔCt</sup>	Razão
<i>CASP7</i>	Eficiência	2,02	1,88	1,95			
	Ct	23,77	23,36		0,41	1,314965	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,97	1,93	1,95			1,033955
	Ct	14,41	14,05		0,36	1,271781	

Controle X Clorofilina 100 µg/mL: 72 h - R3							
		Controle	Chl 100 µg/mL	Média E	DeltaCt	E <sup>ΔCt</sup>	Razão
<i>CASP7</i>	Eficiência	1,86	1,89	1,875			
	Ct	23,49	23,23		0,26	1,177553	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	2,01	1,96	1,985			0,79663
	Ct	13,89	13,32		0,57	1,478167	

Controle X Clorofilina 200 µg/mL: 72 h - R1							
		Controle	Chl 200 µg/mL	Média E	DeltaCt	E <sup>ΔCt</sup>	Razão
<i>CASP7</i>	Eficiência	1,88	1,76	1,82			
	Ct	24,56	23,43		1,13	1,967346	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,88	1,9	1,89			1,197403
	Ct	15,04	14,26		0,78	1,64301	

Controle X Clorofilina 200 µg/mL: 72 h - R2							
		Controle	Chl 200 µg/mL	Média E	DeltaCt	E <sup>ΔCt</sup>	Razão
<i>CASP7</i>	Eficiência	2,02	1,86	1,94			
	Ct	23,77	24,02		-0,25	0,847324	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,97	1,98	1,975			1,158805
	Ct	14,41	14,87		-0,46	0,731205	

Controle X Clorofilina 200 µg/mL: 72 h - R3							
		Controle	Chl 200 µg/mL	Média E	DeltaCt	E <sup>ΔCt</sup>	Razão
<i>CASP7</i>	Eficiência	1,86	1,87	1,865			
	Ct	23,49	23,57		-0,08	0,951362	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	2,01	1,95	1,98			1,03971
	Ct	13,89	14,02		-0,13	0,915026	

Resultados do qRT-PCR do gene *CASP8* em células HB4a expostas a 100 e 200 µg/mL por 72 h. Os valores representam a quantificação da expressão relativa pelo método de Pfaffl (2001).

Controle X Clorofilina 100 µg/mL: 72 h - R1							
		Controle	Chl 100 µg/mL	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta Ct}$	Razão
<i>CASP8</i>	Eficiência	1,83	1,88	1,855			
	Ct	24,38	23,33		1,05	1,913203	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,88	1,97	1,925			1,110922
	Ct	15,04	14,21		0,83	1,722176	

Controle X Clorofilina 100 µg/mL: 72 h - R2							
		Controle	Chl 100 µg/mL	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta Ct}$	Razão
<i>CASP8</i>	Eficiência	1,84	1,82	1,83			
	Ct	23,73	22,9		0,83	1,651332	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,97	1,93	1,95			1,29844
	Ct	14,41	14,05		0,36	1,271781	

Controle X Clorofilina 100 µg/mL: 72 h - R3							
		Controle	Chl 100 µg/mL	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta Ct}$	Razão
<i>CASP8</i>	Eficiência	1,83	1,98	1,905			
	Ct	23,39	22,68		0,71	1,580249	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	2	1,96	1,98			1,070598
	Ct	13,89	13,32		0,57	1,476044	

Controle X Clorofilina 200 µg/mL: 72 h - R1							
		Controle	Chl 200 µg/mL	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta Ct}$	Razão
<i>CASP8</i>	Eficiência	1,83	2	1,915			
	Ct	24,38	23,95		0,43	1,322308	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,88	1,9	1,89			0,804808
	Ct	15,04	14,26		0,78	1,64301	

Controle X Clorofilina 200 µg/mL: 72 h - R2							
		Controle	Chl 200 µg/mL	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta Ct}$	Razão
<i>CASP8</i>	Eficiência	1,84	1,93	1,885			
	Ct	23,73	23,6		0,13	1,085902	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,97	1,98	1,975			1,485085
	Ct	14,41	14,87		-0,46	0,731205	

Controle X Clorofilina 200 µg/mL: 72 h - R3							
		Controle	Chl 200 µg/mL	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta Ct}$	Razão
<i>CASP8</i>	Eficiência	1,83	1,97	1,9			
	Ct	23,39	23,46		-0,07	0,956065	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	2	1,95	1,975			1,044506
	Ct	13,89	14,02		-0,13	0,915327	

Resultados do qRT-PCR do gene *CASP9* em células HB4a expostas a 100 e 200 µg/mL por 72 h. Os valores representam a quantificação da expressão relativa pelo método de Pfaffl (2001).

Controle X Clorofilina 100 µg/mL: 72 h - R1							
		Controle	Chl 100 µg/mL	Média E	DeltaCt	E <sup>ΔCt</sup>	Razão
<i>CASP9</i>	Eficiência	1,76	1,92	1,84			
	Ct	25,7	24,57		1,13	1,991793	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,88	1,97	1,925			1,156556
	Ct	15,04	14,21		0,83	1,722176	

Controle X Clorofilina 100 µg/mL: 72 h - R2							
		Controle	Chl 100 µg/mL	Média E	DeltaCt	E <sup>ΔCt</sup>	Razão
<i>CASP9</i>	Eficiência	1,93	1,85	1,89			
	Ct	24,97	24,36		0,61	1,47449	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,97	1,93	1,95			1,159389
	Ct	14,41	14,05		0,36	1,271781	

Controle X Clorofilina 100 µg/mL: 72 h - R3							
		Controle	Chl 100 µg/mL	Média E	DeltaCt	E <sup>ΔCt</sup>	Razão
<i>CASP9</i>	Eficiência	1,8	1,91	1,855			
	Ct	25,02	23,97		1,05	1,913203	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	2	1,96	1,98			1,29617
	Ct	13,89	13,32		0,57	1,476044	

Controle X Clorofilina 200 µg/mL: 72 h - R1							
		Controle	Chl 200 µg/mL	Média E	DeltaCt	E <sup>ΔCt</sup>	Razão
<i>CASP9</i>	Eficiência	1,76	1,95	1,855			
	Ct	25,7	25,28		0,42	1,296297	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,88	1,9	1,89			0,788977
	Ct	15,04	14,26		0,78	1,64301	

Controle X Clorofilina 200 µg/mL: 72 h - R2							
		Controle	Chl 200 µg/mL	Média E	DeltaCt	E <sup>ΔCt</sup>	Razão
<i>CASP9</i>	Eficiência	1,93	1,81	1,87			
	Ct	24,97	25,26		-0,29	0,834	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,97	1,98	1,975			1,140583
	Ct	14,41	14,87		-0,46	0,731205	

Controle X Clorofilina 200 µg/mL: 72 h - R3							
		Controle	Chl 200 µg/mL	Média E	DeltaCt	E <sup>ΔCt</sup>	Razão
<i>CASP9</i>	Eficiência	1,8	1,72	1,76			
	Ct	25,02	24,78		0,24	1,14531	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	2	1,95	1,975			1,251258
	Ct	13,89	14,02		-0,13	0,915327	

Resultados do qRT-PCR do gene *BAK* em células HB4a expostas a 100 e 200 µg/mL por 72 h. Os valores representam a quantificação da expressão relativa pelo método de Pfaffl (2001).

Controle X Clorofilina 100 µg/mL: 72 h - R1							
		Controle	Chl 100 µg/mL	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta Ct}$	Razão
<i>BAK</i>	Eficiência	1,87	1,99	1,93			
	Ct	23,95	22,56		1,39	2,494162	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,88	1,97	1,925			1,448262
	Ct	15,04	14,21		0,83	1,722176	

Controle X Clorofilina 100 µg/mL: 72 h - R2							
		Controle	Chl 100 µg/mL	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta Ct}$	Razão
<i>BAK</i>	Eficiência	1,87	1,97	1,92			
	Ct	23,07	22,7		0,37	1,27298	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,97	1,93	1,95			1,000942
	Ct	14,41	14,05		0,36	1,271781	

Controle X Clorofilina 100 µg/mL: 72 h - R3							
		Controle	Chl 100 µg/mL	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta Ct}$	Razão
<i>BAK</i>	Eficiência	1,86	1,83	1,845			
	Ct	22,97	23,16		-0,19	0,890145	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	2,01	1,96	1,985			0,602195
	Ct	13,89	13,32		0,57	1,478167	

Controle X Clorofilina 200 µg/mL: 72 h - R1							
		Controle	Chl 200 µg/mL	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta Ct}$	Razão
<i>BAK</i>	Eficiência	1,87	1,98	1,925			
	Ct	23,95	22,92		1,03	1,963196	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,88	1,9	1,89			1,194878
	Ct	15,04	14,26		0,78	1,64301	

Controle X Clorofilina 200 µg/mL: 72 h - R2							
		Controle	Chl 200 µg/mL	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta Ct}$	Razão
<i>BAK</i>	Eficiência	1,87	1,71	1,79			
	Ct	23,07	22,45		0,62	1,434726	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,97	1,98	1,975			1,962139
	Ct	14,41	14,87		-0,46	0,731205	

Controle X Clorofilina 200 µg/mL: 72 h - R3							
		Controle	Chl 200 µg/mL	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta Ct}$	Razão
<i>BAK</i>	Eficiência	1,86	1,84	1,85			
	Ct	22,97	22,86		0,11	1,070013	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	2,01	1,95	1,98			1,169379
	Ct	13,89	14,02		-0,13	0,915026	

Resultados do qRT-PCR do gene *BAX* em células HB4a expostas a 100 e 200  $\mu\text{g/mL}$  por 72 h. Os valores representam a quantificação da expressão relativa pelo método de Pfaffl (2001).

Controle X Clorofilina 100 $\mu\text{g/mL}$ : 72 h - R1							
		Controle	Chl 100 $\mu\text{g/mL}$	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta\text{Ct}}$	Razão
<i>BAX</i>	Eficiência	1,89	2,07	1,98			
	Ct	21,41	19,94		1,47	2,729593	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,88	1,97	1,925			1,584967
	Ct	15,04	14,21		0,83	1,722176	

Controle X Clorofilina 100 $\mu\text{g/mL}$ : 72 h - R2							
		Controle	Chl 100 $\mu\text{g/mL}$	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta\text{Ct}}$	Razão
<i>BAX</i>	Eficiência	1,91	1,87	1,89			
	Ct	20,56	18,94		1,62	2,804582	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,97	1,93	1,95			2,205239
	Ct	14,41	14,05		0,36	1,271781	

Controle X Clorofilina 100 $\mu\text{g/mL}$ : 72 h - R3							
		Controle	Chl 100 $\mu\text{g/mL}$	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta\text{Ct}}$	Razão
<i>BAX</i>	Eficiência	2,02	1,95	1,985			
	Ct	20,96	19,12		1,84	3,530851	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	2,01	1,96	1,985			2,388668
	Ct	13,89	13,32		0,57	1,478167	

Controle X Clorofilina 200 $\mu\text{g/mL}$ : 72 h - R1							
		Controle	Chl 200 $\mu\text{g/mL}$	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta\text{Ct}}$	Razão
<i>BAX</i>	Eficiência	1,89	1,95	1,92			
	Ct	21,41	19,42		1,99	3,662431	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,88	1,9	1,89			2,229098
	Ct	15,04	14,26		0,78	1,64301	

Controle X Clorofilina 200 $\mu\text{g/mL}$ : 72 h - R2							
		Controle	Chl 200 $\mu\text{g/mL}$	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta\text{Ct}}$	Razão
<i>BAX</i>	Eficiência	1,91	2,11	2,01			
	Ct	20,56	19,56		1	2,01	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,97	1,98	1,975			2,748887
	Ct	14,41	14,87		-0,46	0,731205	

Controle X Clorofilina 200 $\mu\text{g/mL}$ : 72 h - R3							
		Controle	Chl 200 $\mu\text{g/mL}$	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta\text{Ct}}$	Razão
<i>BAX</i>	Eficiência	2,02	1,87	1,945			
	Ct	20,96	19,14		1,82	3,356091	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	2,01	1,95	1,98			3,667754
	Ct	13,89	14,02		-0,13	0,915026	

Resultados do qRT-PCR do gene *BCL-2* em células HB4a expostas a 100 e 200  $\mu\text{g/mL}$  por 72 h. Os valores representam a quantificação da expressão relativa pelo método de Pfaffl (2001).

Controle X Clorofilina 100 $\mu\text{g/mL}$ : 72 h - R1							
		Controle	Chl 100 $\mu\text{g/mL}$	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta\text{Ct}}$	Razão
<i>BCL-2</i>	Eficiência	1,84	1,8	1,82			
	Ct	31,8	29,4		2,4	4,208926	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,88	1,97	1,925			2,443958
	Ct	15,04	14,21		0,83	1,722176	

Controle X Clorofilina 100 $\mu\text{g/mL}$ : 72 h - R2							
		Controle	Chl 100 $\mu\text{g/mL}$	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta\text{Ct}}$	Razão
<i>BCL-2</i>	Eficiência	1,75	1,78	1,765			
	Ct	30,06	29,19		0,87	1,639336	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,97	1,93	1,95			1,289007
	Ct	14,41	14,05		0,36	1,271781	

Controle X Clorofilina 100 $\mu\text{g/mL}$ : 72 h - R3							
		Controle	Chl 100 $\mu\text{g/mL}$	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta\text{Ct}}$	Razão
<i>BCL-2</i>	Eficiência	1,67	1,85	1,76			
	Ct	31,18	29,28		1,9	2,927346	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	2,01	1,96	1,985			1,980389
	Ct	13,89	13,32		0,57	1,478167	

Controle X Clorofilina 200 $\mu\text{g/mL}$ : 72 h - R1							
		Controle	Chl 200 $\mu\text{g/mL}$	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta\text{Ct}}$	Razão
<i>BCL-2</i>	Eficiência	1,84	1,81	1,825			
	Ct	31,8	29,76		2,04	3,411743	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,88	1,9	1,89			2,07652
	Ct	15,04	14,26		0,78	1,64301	

Controle X Clorofilina 200 $\mu\text{g/mL}$ : 72 h - R2							
		Controle	Chl 200 $\mu\text{g/mL}$	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta\text{Ct}}$	Razão
<i>BCL-2</i>	Eficiência	1,75	1,73	1,74			
	Ct	30,06	28,73		1,33	2,088962	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,97	1,98	1,975			2,856876
	Ct	14,41	14,87		-0,46	0,731205	

Controle X Clorofilina 200 $\mu\text{g/mL}$ : 72 h - R3							
		Controle	Chl 200 $\mu\text{g/mL}$	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta\text{Ct}}$	Razão
<i>BCL-2</i>	Eficiência	1,67	1,8	1,735			
	Ct	31,18	28,68		2,5	3,96505	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	2,01	1,95	1,98			4,333264
	Ct	13,89	14,02		-0,13	0,915026	

Resultados do qRT-PCR do gene *BCL-XL* em células HB4a expostas a 100 e 200 µg/mL por 72 h. Os valores representam a quantificação da expressão relativa pelo método de Pfaffl (2001).

Controle X Clorofilina 100 µg/mL: 72 h - R1							
		Controle	Chl 100 µg/mL	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta Ct}$	Razão
<i>BCL-XL</i>	Eficiência	1,94	1,81	1,875			
	Ct	21,84	19,67		2,17	3,912125	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,88	1,97	1,925			2,271618
	Ct	15,04	14,21		0,83	1,722176	

Controle X Clorofilina 100 µg/mL: 72 h - R2							
		Controle	Chl 100 µg/mL	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta Ct}$	Razão
<i>BCL-XL</i>	Eficiência	1,92	1,9	1,91			
	Ct	20,56	19,88		0,68	1,552754	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,97	1,93	1,95			1,220928
	Ct	14,41	14,05		0,36	1,271781	

Controle X Clorofilina 100 µg/mL: 72 h - R3							
		Controle	Chl 100 µg/mL	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta Ct}$	Razão
<i>BCL-XL</i>	Eficiência	2,11	1,97	2,04			
	Ct	20,93	19,61		1,32	2,562783	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	2,01	1,96	1,985			1,733757
	Ct	13,89	13,32		0,57	1,478167	

Controle X Clorofilina 200 µg/mL: 72 h - R1							
		Controle	Chl 200 µg/mL	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta Ct}$	Razão
<i>BCL-XL</i>	Eficiência	1,94	1,99	1,965			
	Ct	21,84	19,58		2,26	4,602559	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,88	1,9	1,89			2,801297
	Ct	15,04	14,26		0,78	1,64301	

Controle X Clorofilina 200 µg/mL: 72 h - R2							
		Controle	Chl 200 µg/mL	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta Ct}$	Razão
<i>BCL-XL</i>	Eficiência	1,92	1,91	1,915			
	Ct	20,56	19,07		1,49	2,632883	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,97	1,98	1,975			3,600745
	Ct	14,41	14,87		-0,46	0,731205	

Controle X Clorofilina 200 µg/mL: 72 h - R3							
		Controle	Chl 200 µg/mL	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta Ct}$	Razão
<i>BCL-XL</i>	Eficiência	2,11	2	2,055			
	Ct	20,93	18,93		2	4,223025	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	2,01	1,95	1,98			4,615196
	Ct	13,89	14,02		-0,13	0,915026	

Resultados do qRT-PCR do gene *BIRC5* em células HB4a expostas a 100 e 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  por 72 h. Os valores representam a quantificação da expressão relativa pelo método de Pfaffl (2001).

Controle X Clorofilina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ : 72 h - R1							
		Controle	Chl 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta\text{Ct}}$	Razão
<i>BIRC5</i>	Eficiência	1,93	2,03	1,98			
	Ct	23,3	22,63		0,67	1,580395	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,89	1,95	1,92			0,839389
	Ct	16,41	15,44		0,97	1,882791	

Controle X Clorofilina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ : 72 h - R2							
		Controle	Chl 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta\text{Ct}}$	Razão
<i>BIRC5</i>	Eficiência	1,94	1,83	1,885			
	Ct	21,87	22,37		-0,5	0,728357	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	2	1,87	1,935			0,559335
	Ct	15,66	15,26		0,4	1,302184	

Controle X Clorofilina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ : 72 h - R3							
		Controle	Chl 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta\text{Ct}}$	Razão
<i>BIRC5</i>	Eficiência	1,89	1,95	1,92			
	Ct	22,16	22,79		-0,63	0,66301	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	2	2	2			0,311457
	Ct	15,86	14,77		1,09	2,12874	

Controle X Clorofilina 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ : 72 h - R1							
		Controle	Chl 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta\text{Ct}}$	Razão
<i>BIRC5</i>	Eficiência	1,93	1,75	1,84			
	Ct	23,3	25,83		-2,53	0,213802	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,89	1,77	1,83			0,121145
	Ct	16,41	15,47		0,94	1,764835	

Controle X Clorofilina 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ : 72 h - R2							
		Controle	Chl 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta\text{Ct}}$	Razão
<i>BIRC5</i>	Eficiência	1,94	1,76	1,85			
	Ct	21,87	25,83		-3,96	0,087498	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	2	1,93	1,965			0,093613
	Ct	15,66	15,76		-0,1	0,934682	

Controle X Clorofilina 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ : 72 h - R3							
		Controle	Chl 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta\text{Ct}}$	Razão
<i>BIRC5</i>	Eficiência	1,89	1,92	1,905			
	Ct	22,16	25,59		-3,43	0,109638	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	2	2	2			0,087221
	Ct	15,86	15,53		0,33	1,257013	

Resultados do qRT-PCR do gene *B-catenina* em células HB4a expostas a 100 e 200  $\mu\text{g/mL}$  por 72 h. Os valores representam a quantificação da expressão relativa pelo método de Pfaffl (2001).

Controle X Clorofilina 100 $\mu\text{g/mL}$ : 72 h - R1							
		Controle	Chl 100 $\mu\text{g/mL}$	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta\text{Ct}}$	Razão
<i><math>\beta</math>-catenina</i>	Eficiência	1,71	1,77	1,74			
	Ct	26,08	24,7		1,38	2,147623	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,89	1,95	1,92			1,140659
	Ct	16,41	15,44		0,97	1,882791	

Controle X Clorofilina 100 $\mu\text{g/mL}$ : 72 h - R2							
		Controle	Chl 100 $\mu\text{g/mL}$	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta\text{Ct}}$	Razão
<i><math>\beta</math>-catenina</i>	Eficiência	1,73	1,7	1,715			
	Ct	24,81	24,14		0,67	1,435347	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	2	1,87	1,935			1,102261
	Ct	15,66	15,26		0,4	1,302184	

Controle X Clorofilina 100 $\mu\text{g/mL}$ : 72 h - R3							
		Controle	Chl 100 $\mu\text{g/mL}$	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta\text{Ct}}$	Razão
<i><math>\beta</math>-catenina</i>	Eficiência	1,72	1,71	1,715			
	Ct	24,89	23,12		1,77	2,59805	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	2,04	2,14	2,09			1,16329
	Ct	15,86	14,77		1,09	2,233364	

Controle X Clorofilina 200 $\mu\text{g/mL}$ : 72 h - R1							
		Controle	Chl 200 $\mu\text{g/mL}$	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta\text{Ct}}$	Razão
<i><math>\beta</math>-catenina</i>	Eficiência	1,71	1,75	1,73			
	Ct	26,08	24,81		1,27	2,005943	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,89	1,77	1,83			1,136618
	Ct	16,41	15,47		0,94	1,764835	

Controle X Clorofilina 200 $\mu\text{g/mL}$ : 72 h - R2							
		Controle	Chl 200 $\mu\text{g/mL}$	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta\text{Ct}}$	Razão
<i><math>\beta</math>-catenina</i>	Eficiência	1,73	1,7	1,715			
	Ct	24,81	24,04		0,77	1,514898	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	2	1,93	1,965			1,620763
	Ct	15,66	15,76		-0,1	0,934682	

Controle X Clorofilina 200 $\mu\text{g/mL}$ : 72 h - R3							
		Controle	Chl 200 $\mu\text{g/mL}$	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta\text{Ct}}$	Razão
<i><math>\beta</math>-catenina</i>	Eficiência	1,72	1,89	1,805			
	Ct	24,89	23,64		1,25	2,092168	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	2,04	2,04	2,04			1,653555
	Ct	15,86	15,53		0,33	1,265255	

Resultados do qRT-PCR do gene *CCNA2* em células HB4a expostas a 100 e 200  $\mu\text{g/mL}$  por 72 h. Os valores representam a quantificação da expressão relativa pelo método de Pfaffl (2001).

Controle X Clorofilina 100 $\mu\text{g/mL}$ : 72 h - R1							
		Controle	Chl 100 $\mu\text{g/mL}$	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta\text{Ct}}$	Razão
<i>CCNA2</i>	Eficiência	1,94	1,88	1,91			
	Ct	21,58	22,16		-0,58	0,687069	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,88	1,97	1,925			0,398954
	Ct	15,04	14,21		0,83	1,722176	

Controle X Clorofilina 100 $\mu\text{g/mL}$ : 72 h - R2							
		Controle	Chl 100 $\mu\text{g/mL}$	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta\text{Ct}}$	Razão
<i>CCNA2</i>	Eficiência	1,77	1,97	1,87			
	Ct	20,77	21,39		-0,62	0,678357	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,97	1,93	1,95			0,533391
	Ct	14,41	14,05		0,36	1,271781	

Controle X Clorofilina 100 $\mu\text{g/mL}$ : 72 h - R3							
		Controle	Chl 100 $\mu\text{g/mL}$	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta\text{Ct}}$	Razão
<i>CCNA2</i>	Eficiência	1,79	2	1,895			
	Ct	20,7	21,43		-0,73	0,627112	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	2,01	1,96	1,985			0,42425
	Ct	13,89	13,32		0,57	1,478167	

Controle X Clorofilina 200 $\mu\text{g/mL}$ : 72 h - R1							
		Controle	Chl 200 $\mu\text{g/mL}$	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta\text{Ct}}$	Razão
<i>CCNA2</i>	Eficiência	1,94	1,76	1,85			
	Ct	21,58	24,89		-3,31	0,130515	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,88	1,9	1,89			0,079437
	Ct	15,04	14,26		0,78	1,64301	

Controle X Clorofilina 200 $\mu\text{g/mL}$ : 72 h - R2							
		Controle	Chl 200 $\mu\text{g/mL}$	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta\text{Ct}}$	Razão
<i>CCNA2</i>	Eficiência	1,77	1,79	1,78			
	Ct	20,77	24,02		-3,25	0,153509	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,97	1,98	1,975			0,20994
	Ct	14,41	14,87		-0,46	0,731205	

Controle X Clorofilina 200 $\mu\text{g/mL}$ : 72 h - R3							
		Controle	Chl 200 $\mu\text{g/mL}$	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta\text{Ct}}$	Razão
<i>CCNA2</i>	Eficiência	1,79	1,73	1,76			
	Ct	20,7	23,5		-2,8	0,205383	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	2,01	1,96	1,985			0,138944
	Ct	13,89	13,32		0,57	1,478167	

Resultados do qRT-PCR do gene *TP53* em células HB4a expostas a 100 e 200  $\mu\text{g/mL}$  por 72 h. Os valores representam a quantificação da expressão relativa pelo método de Pfaffl (2001).

Controle X Clorofilina 100 $\mu\text{g/mL}$ : 72 h - R1							
		Controle	Chl 100 $\mu\text{g/mL}$	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta\text{Ct}}$	Razão
<i>TP53</i>	Eficiência	1,86	1,79	1,825			
	Ct	21,41	20,76		0,65	1,478498	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,89	1,95	1,92			0,785269
	Ct	16,41	15,44		0,97	1,882791	

Controle X Clorofilina 100 $\mu\text{g/mL}$ : 72 h - R2							
		Controle	Chl 100 $\mu\text{g/mL}$	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta\text{Ct}}$	Razão
<i>TP53</i>	Eficiência	1,87	1,76	1,815			
	Ct	20,04	20,03		0,01	1,005979	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	2	1,87	1,935			0,772532
	Ct	15,66	15,26		0,4	1,302184	

Controle X Clorofilina 100 $\mu\text{g/mL}$ : 72 h - R3							
		Controle	Chl 100 $\mu\text{g/mL}$	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta\text{Ct}}$	Razão
<i>TP53</i>	Eficiência	1,88	1,76	1,82			
	Ct	19,98	19,7		0,28	1,182551	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	2,04	2,14	2,09			0,529493
	Ct	15,86	14,77		1,09	2,233364	

Controle X Clorofilina 200 $\mu\text{g/mL}$ : 72 h - R1							
		Controle	Chl 100 $\mu\text{g/mL}$	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta\text{Ct}}$	Razão
<i>TP53</i>	Eficiência	1,86	1,96	1,91			
	Ct	21,41	20,59		0,82	1,699994	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,89	1,77	1,83			0,96326
	Ct	16,41	15,47		0,94	1,764835	

Controle X Clorofilina 200 $\mu\text{g/mL}$ : 72 h - R2							
		Controle	Chl 100 $\mu\text{g/mL}$	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta\text{Ct}}$	Razão
<i>TP53</i>	Eficiência	1,87	1,85	1,86			
	Ct	20,04	20,11		-0,07	0,95749	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	2	1,93	1,965			1,024402
	Ct	15,66	15,76		-0,1	0,934682	

Controle X Clorofilina 200 $\mu\text{g/mL}$ : 72 h - R3							
		Controle	Chl 100 $\mu\text{g/mL}$	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta\text{Ct}}$	Razão
<i>TP53</i>	Eficiência	1,88	1,9	1,89			
	Ct	19,98	19,37		0,61	1,47449	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	2	2,04	2,04			1,16537
	Ct	15,86	15,53		0,33	1,265255	

Resultados do qRT-PCR do gene *APC* em células HB4a expostas a 100 e 200  $\mu\text{g/mL}$  por 72 h. Os valores representam a quantificação da expressão relativa pelo método de Pfaffl (2001).

Controle X Clorofilina 100 $\mu\text{g/mL}$ : 72 h - R1							
		Controle	Chl 100 $\mu\text{g/mL}$	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta\text{Ct}}$	Razão
<i>APC</i>	Eficiência	1,87	1,91	1,89			
	Ct	24,58	23,84		0,74	1,601702	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,89	1,95	1,92			0,850706
	Ct	16,41	15,44		0,97	1,882791	

Controle X Clorofilina 100 $\mu\text{g/mL}$ : 72 h - R2							
		Controle	Chl 100 $\mu\text{g/mL}$	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta\text{Ct}}$	Razão
<i>APC</i>	Eficiência	1,79	1,91	1,85			
	Ct	23,38	23,79		-0,41	0,777069	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	2	1,87	1,935			0,596743
	Ct	15,66	15,26		0,4	1,302184	

Controle X Clorofilina 100 $\mu\text{g/mL}$ : 72 h - R3							
		Controle	Chl 100 $\mu\text{g/mL}$	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta\text{Ct}}$	Razão
<i>APC</i>	Eficiência	1,81	1,88	1,845			
	Ct	24,19	23,7		0,49	1,350014	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	2,04	2,14	2,09			0,604476
	Ct	15,86	14,77		1,09	2,233364	

Controle X Clorofilina 200 $\mu\text{g/mL}$ : 72 h - R1							
		Controle	Chl 200 $\mu\text{g/mL}$	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta\text{Ct}}$	Razão
<i>APC</i>	Eficiência	1,87	1,85	1,86			
	Ct	24,58	24,19		0,39	1,273826	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	1,89	1,77	1,83			0,721782
	Ct	16,41	15,47		0,94	1,764835	

Controle X Clorofilina 200 $\mu\text{g/mL}$ : 72 h - R2							
		Controle	Chl 200 $\mu\text{g/mL}$	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta\text{Ct}}$	Razão
<i>APC</i>	Eficiência	1,79	1,84	1,815			
	Ct	23,38	24,35		-0,97	0,560905	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	2	1,93	1,965			0,600103
	Ct	15,66	15,76		-0,1	0,934682	

Controle X Clorofilina 200 $\mu\text{g/mL}$ : 72 h - R3							
		Controle	Chl 200 $\mu\text{g/mL}$	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta\text{Ct}}$	Razão
<i>APC</i>	Eficiência	1,81	1,73	1,77			
	Ct	24,19	23,91		0,28	1,173363	
<i>GAPDH</i>	Eficiência	2,04	2,04	2,04			0,927373
	Ct	15,86	15,53		0,33	1,265255	