



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

DIOGO CAMPOS VESENICK

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA CLOROFILINA NA INDUÇÃO  
DE APOPTOSE, INIBIÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR  
E EXPRESSÃO DE RNAm DOS GENES CASP8, CASP9, APC  
E  $\beta$ -catenina**

DIOGO CAMPOS VESENICK

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DA CLOROFILINA NA INDUÇÃO  
DE APOPTOSE, INIBIÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR  
E EXPRESSÃO DE RNAm DOS GENES CASP8, CASP9, APC  
E  $\beta$ -catenina**

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

Orientador: Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani

Londrina  
2010

**Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

V575a Vesenick, Diogo Campos.

Avaliação do efeito da clorofilina na indução de apoptose, inibição da proliferação celular e expressão de RNAm dos genes CASP8, CASP9, APC e  $\beta$ -catenina / Diogo Campos Vesenick. – Londrina, 2010. 55f. Inclui bibliografia

Orientador: Mário Sérgio Mantovani.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, 2010.

1. Clorofilina. 2. Proliferação. 3. HT-29. 4.  $\beta$ -catenina. 5. CTNNB1. I. Mantovani, Mário Sérgio. II. Universidade Estadual de Londrina. III. Título.

CDU 576.385.5

DIOGO CAMPOS VESENICK

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DA CLOROFILINA NA INDUÇÃO DE  
APOPTOSE, INIBIÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR E  
EXPRESSÃO DE RNAm DOS GENES *CASP8*, *CASP9*, *APC* E  $\beta$ -catenina**

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

Orientador: Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Angélica Ehara Watanabe  
UEL – Londrina - PR

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Veronica Elisa Pimenta Vicentini  
UEM – Maringá - PR

Londrina, 15 de dezembro de 2010.

*Dedico a Deus, nosso Pai e a Jesus Cristo,  
meu Senhor e Salvador, por terem sido minha  
força e auxílio nessa trajetória e aos meus  
pais pelo amor e incentivo dispensados a mim*

*Nem olhos viram , nem ouvidos ouviram, nem jamais  
penetrou em coração humano o que Deus tem  
preparado para aqueles que O amam  
( I Coríntios 2.9 - Bíblia )*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao orientador, Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani por toda a dedicação, paciência, apoio e incentivo a mim ofertados. Obrigado por abrir as portas do laboratório e ter possibilitado a realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, pela oportunidade oferecida.

A todos os Docentes e Discentes do programa, que muito contribuíram para meu crescimento profissional. Agradeço pela atenção, pelos ensinamentos e apoio durante o processo de Mestrado.

Às minhas grandes amigas Natália e Andressa, obrigado por todos esses anos que passamos juntos, pelo companheirismo e amizade, por se tornarem parte da minha família em Londrina e principalmente pelos momentos de felicidade e risadas que pudemos desfrutar nessa longa trajetória. Vocês contribuíram para que todos esses anos em que passamos juntos fossem os melhores anos da minha vida, dos quais nunca mais vou me esquecer.

Às minhas grandes amigas Simone, Juliana, Marcela e Gláucia, obrigado pela ajuda e conselhos, pela atenção, por todos os momentos de alegria e acima de tudo, pela amizade. Vocês fizeram do laboratório um lugar muito mais agradável para se trabalhar.

Às minhas amigas de laboratório Eliane, Sandra e Daniela, obrigado pelo carinho, conselhos, ensinamentos e ajuda nos experimentos e por muito terem contribuído para o meu crescimento e aprendizado ao longo desses anos

E por fim, a todos aqueles que, direta e indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Meus Sinceros Agradecimentos.

VESENICK, Diogo Campos. **Avaliação do papel da clorofilina na indução de apoptose, inibição da proliferação e expressão de RNAm dos genes *CASP8*, *CASP9*, *APC* e  $\beta$ -catenina**. 53f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR, 2010.

## RESUMO

A Clorofilina é um derivado semi-sintético da clorofila com propriedades antioxidante, antimutagênica, moduladora das enzimas metabolizadoras de xenobióticos e indutoras de apoptose em linhagens de células de câncer. O presente trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos da clorofilina na indução de apoptose, inibição da proliferação celular e expressão gênica em células de adenocarcinoma de cólon retal humano HT29. A Clorofilina na concentração de 100 $\mu$ g/mL reduziu significativamente a sobrevivência celular após 48 horas e as concentrações de 500 e 1000 $\mu$ g/mL após 24 horas, tanto no Ensaio de Citotoxicidade – MTT como na Cinética de Proliferação Celular. O efeito foi dose-dependente. Na avaliação da indução de apoptose nenhuma concentração de clorofilina após 24 horas de tratamento induziu apoptose. Na expressão gênica foi observado redução significativa da expressão de genes do ciclo celular *APC* e  $\beta$ -catenina (*CTNNB1*), mas não houve variação na expressão dos genes iniciadores de apoptose tanto pela via extrínseca *CASP8* como pela via intrínseca *CASP9*. Os dados sugerem que a ação de inibição do crescimento celular produzido pela Clorofilina nas concentrações estudadas está ligado diretamente à regulação da expressão gênica da  $\beta$ -catenina e não do *APC*, uma vez que este está mutado e inativo. Em relação a apoptose, as concentrações estudadas não demonstraram potencial indutor apoptótico, seja através da análise nas mudanças morfológicas das células ou através da modificação da expressão dos genes das caspases estudados.

**Palavras-chave:** Clorofilina. Proliferação. HT-29.  $\beta$ -catenina. CTNNB1.

VESENICK, Diogo Campos. **Evaluating the role of chlorophyllin in the induction of apoptosis, inhibition of proliferation and mRNA expression of genes CASP8, CASP9, APC and  $\beta$ -catenin.** 53f. Dissertation (Master's degree in Experimental Pathology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR, 2010.

### ABSTRACT

Chlorophyllin is a semi-synthetic derivative of chlorophyll that possesses antioxidant and antimutagenic properties. It also modulates enzymes that metabolizes xenobiotics and induces apoptosis in cell cancer lineages. This study aims to evaluate the effects of chlorophyllin on apoptosis, cell proliferation and gene expression in cells of human colorectal adenocarcinoma HT29. Chlorophyllin at 100 $\mu$ g/mL significantly reduced cell survival after 48 hours, and concentrations of 500 e 1000 $\mu$ g/mL after 24 hours, both cytotoxicity test (MTT) and cell proliferation kinetics in a dose-dependent manner. In the evaluation of apoptosis induction, none of the concentrations of chlorophyllin induced apoptosis after 24 hours of treatment. Gene expression analysis resulted in significant reduction in the expression of cell cycle genes *APC* and  *$\beta$ -catenin* (CTNNB1), but there was no change in expression of initiators genes of apoptosis, both in extrinsic (*CASP8*) and intrinsic pathway (*CASP9*). The data suggest that the inhibitory effect of the tested concentrations of chlorophyllin is related to the regulation of gene expression of  $\beta$ -catenin rather than *APC*, since it is mutated and inactive. Regarding apoptosis, tested concentrations demonstrated no potential of apoptosis induction, as seen through the analysis of morphological changes of cells or by modification of caspases gene expression.

**Keyword:** Chlorophyllin. Proliferation. HT-29.  $\beta$ -catenin. CTNNB1.

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>APC</b>	<i>Adenomatous polyposis coli</i> / polipose adenomatosa do cólon
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>CYP</b>	citocromo
<b>DMBA</b>	7,12 dimetilbenzilantraceno
<b>DMH</b>	1,2-dimetilhidrazina
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico
<b>ERK</b>	<i>Extracellular signal-regulated kinases</i> / quinases reguladoras de sinais extracelulares
<b>EROS</b>	espécies reativas de oxigênio
<b>FADD</b>	<i>Fas-Associated protein with Death Domain</i> / domínio de morte associado com a proteína Faz
<b>FAP</b>	<i>Familial adenomatous polyposis</i> / polipose adenomatosa familiar
<b>IQ</b>	2-amino-3-metilimidazo[4,5-f]quinoline
<b>PhIP</b>	2-amino-1-metil-6-fenilimidazol [4,5-b] piridina
<b>MAPK</b>	<i>Mitogen-activated protein kinase</i> / proteína quinase ativadora de mitógeno
<b>MTT</b>	3,4,5-Dimetiltiazol-2-il -2,5-difenil tetrazolium brometo)
<b>NQO1</b>	NADPH: quinona oxidoreductase 1
<b>PM</b>	Pemeabilidade da membrana
<b>qRT-PCR</b>	Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction
<b>TNF</b>	<i>Tumor necrosis factor</i> / Fator de necrose tumoral
<b>TRAIL</b>	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i> / Ligante inductor de apoptose relacionado ao TNF
<b>rTNF</b>	Receptor de TNF

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	10
1.1 QUIMIOPREVENÇÃO DO CÂNCER .....	10
1.2 CLOROFILINA .....	13
1.2.1 Clorofilina e Prevenção de Câncer .....	15
1.2.2 Potenciais Mecanismos de Ação da Clorofilina Na prevenção do Câncer.....	17
1.2.2.1 Atividade antioxidante.....	17
1.2.2.2 Interceptador de mutágeno .....	18
1.2.2.3 Regulação das vias de detoxificação .....	18
1.2.2.4 Indução de apoptose em células de câncer .....	19
1.3 APOPTOSE.....	19
1.3.1 Vias de Ativação da Apoptose.....	21
1.3.2 Apoptose e Câncer.....	22
1.4 CONSIDERAÇÕES SOBRE O GENE <i>APC</i> E $\beta$ -CATENINA .....	23
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	25
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	26
3.1 OBJETIVO GERAL .....	26
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	26
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	27
<b>ARTIGO – AVALIAÇÃO DO PAPEL DA CLOROFILINA NA INDUÇÃO DE APOPTOSE, INIBIÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR E EXPRESSÃO DE RNAm DOS GENES <i>CASP8</i>, <i>CASP9</i>, <i>APC</i> e <math>\beta</math>-catenina</b> .....	33

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 QUIMIOPREVENÇÃO DO CÂNCER

A quimioprevenção do câncer pode ser definida como a utilização de compostos químicos específicos, naturais ou sintéticos, com a finalidade de prevenir, retardar ou reverter o processo de carcinogênese, ou seja, o desenvolvimento de neoplasias. Vários estudos pré-clínicos, clínicos e de mecanismos de ação são necessários para se identificar e confirmar a atividade quimiopreventiva de um determinado composto químico. Levando-se em consideração que muitas alterações em genes e outros constituintes celulares têm sido relacionados com a formação e crescimento de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas, possíveis mecanismos de ação para a quimioprevenção devem envolver estudos detalhados nas formas de se intervir em vias intrínsecas específicas envolvidas na evolução do processo carcinogênico (KELLOFF et al., 2000).

Retardar o desenvolvimento de uma neoplasia é um processo que exige muitos estudos minuciosos em cada uma das etapas da carcinogênese em análise. O controle do ciclo celular (equilíbrio entre proliferação e morte celular); diferenciação celular e angiogênese são fenômenos críticos à formação tumoral e, portanto, são os principais alvos dos estudos nessa área. Uma droga capaz de inibir a formação de novos vasos ou a atividade de metaloproteinases de matriz, de induzir apoptose ou diferenciação celular e/ou bloquear a proliferação celular certamente teria efeitos deletérios para as células tumorais erradicando-as ou impedindo a sua multiplicação, invasão local e formação de metástases (KIM et al., 2005; VANSAUN et al., 2006). Entretanto, esses efeitos desejáveis para uma substância quimiopreventiva não devem interferir com a atividade das células normais do organismo, por isso vários estudos para a comprovação da relação dose-eficácia-toxicidade de substâncias químicas que suprimiriam o aparecimento de neoplasias devem ser desenvolvidos (WATTENBERG, 1992).

A prevenção do câncer tem impacto importante sobre a saúde humana com consequências em nível familiar, social e econômico. Combinações de substâncias com comprovada eficácia anti-tumoral poderiam ser administradas oralmente na forma de cápsulas ou como suplementos alimentares. Entretanto, inúmeros testes de eficácia e testes toxicológicos são necessários para averiguar os possíveis riscos potenciais do uso crônico

desses medicamentos e suas prováveis interações medicamentosas antes de sua comercialização (CROWEL, 2005).

O primeiro passo para a quimioprevenção do câncer no homem é tentar reduzir a exposição a fatores de risco conhecidos como o cigarro, álcool, poluentes ambientais, dietas ricas em gorduras, etc. (WOGAN et al., 2004). Entretanto, a maioria dos fatores de risco está diretamente relacionada ao estilo de vida, nível de desenvolvimento sócio-econômico ou fazem parte do dia a dia das pessoas como os poluentes ambientais (exposição ambiental, acidental ou ocupacional) e os raios UV. Nestes casos, a formação de células iniciadas é inevitável e a intervenção deve ser realizada pela orientação na redução dos níveis de exposição, aplicação de agentes inibitórios que sejam capazes de impedir, conjuntamente com a atividade imunológica, a evolução das células iniciadas para as etapas posteriores do desenvolvimento neoplásico. A administração dos agentes inibitórios geralmente é realizada por via oral, em suplementação dietética.

Diversos agentes quimiopreventivos em potencial possuem mais de um mecanismo de ação anticarcinogênico. A interação entre esses mecanismos pode resultar em uma ação sinérgica da substância em questão (KELLOFF et al., 1994). Desta forma, a administração simultânea ou sequencial de diferentes compostos poderia ser capaz de aumentar a eficácia e reduzir a toxicidade do tratamento antineoplásico.

Uma das formas mais simples de prevenção do câncer para a população em geral é a orientação nutricional sobre o controle na qualidade da ingestão de alimentos. A menor ingestão de produtos sintéticos comprovadamente cancerígenos em roedores como conservantes, corantes, pesticidas agrícolas, álcool, combinada com uma dieta rica em alimentos funcionais como vitaminas do complexo B, folato, metionina, fenóis, indóis, terpenóides e outros agentes antioxidantes poderia ser considerada uma das melhores formas de evitar o desenvolvimento de neoplasias (SLATTERY et al., 2000; BOFFETTA; HASHIBE, 2006). Muitos produtos naturais e alguns sintéticos podem ser utilizados com o objetivo de bloquear o desenvolvimento de neoplasias na forma de suplementação alimentar (WATTENBERG, 1990). Em geral, pela segurança e por não serem enquadrados como medicamentos, o desenvolvimento de agentes quimiopreventivos derivados de produtos naturais tem mercado crescente.

Existem alguns vegetais como raízes, legumes e frutas que possuem naturalmente agentes que previnem a carcinogênese (WATTENBERG et al., 1992; KELLOFF et al., 2000). Muitas substâncias quimiopreventivas potenciais estão presentes na dieta como polifenóis, isoflavonas, curcumina, fenetil isoocianato, sulforafano, licopeno,

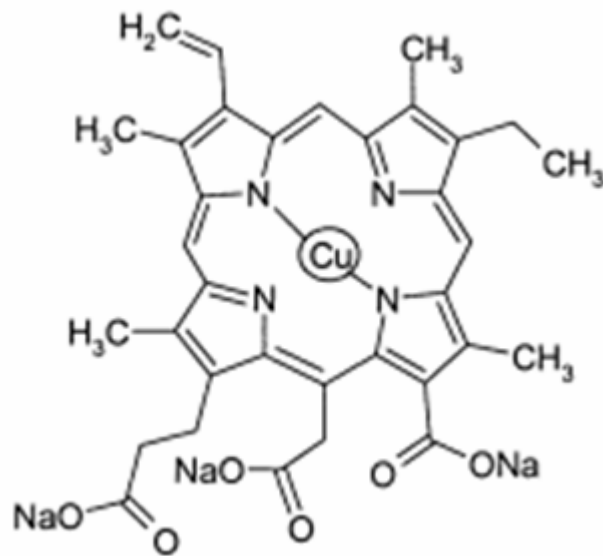
indol 3-carbinol, álcool perilil, ácidos salicílicos, cafeína entre outras (CHUANG et al., 2000; KELLOFF et al., 2000).

Um dos mais impressionantes achados no campo da quimioprevenção é o grande número de compostos químicos que apresentam atividade anti-tumoral. Atualmente, mais de 20 classes diferentes de substâncias têm demonstrado efeitos dessa amplitude. A fim de melhorar a compreensão da forma de atuação dos elementos quimiopreventivos, estes foram classificados em grupos de acordo com a etapa da carcinogênese química sobre a qual são eficazes. Duas categorias principais foram definidas: os agentes bloqueadores e os agentes supressores. Os agentes bloqueadores devem modular os processos de absorção intestinal, biotransformação/bioativação microsomal, excreção renal e interação com o material genético de substâncias cancerígenas, impedindo, dessa maneira, a formação de células iniciadas. Os agentes bloqueadores mais conhecidos são os compostos antioxidantes cuja eficácia está diretamente relacionada à captura das formas reativas dos cancerígenos, impedindo sua interação com o DNA e outras moléculas celulares (lipídeos, proteínas e carboidratos). Os agentes supressores interferem em alguns eventos celulares críticos à promoção e progressão da carcinogênese e, conseqüentemente, previnem a evolução das células iniciadas à malignidade (MORSE; STONER, 1993). Desta forma, os agentes quimiopreventivos podem ser classificados nessas duas categorias considerando-se o fato de os bloqueadores serem efetivos quando administrados antes ou simultaneamente ao cancerígeno, enquanto que os supressores, após a etapa de iniciação da carcinogênese.

Durante os estudos de inibidores da carcinogênese, ficou claro que alguns agentes inibidores agem em mais de um ponto-chave da carcinogênese. Esses agentes possuem atividades tanto bloqueadoras como supressoras tumorais. Alguns constituintes específicos de hortaliças, como o benzil isotiocianato, possuem essas características de inibição dupla (ZHANG; TALALAI, 1994). Os sucos de frutas cítricas apresentam os mesmos efeitos sobre a carcinogênese experimental. Em experimento de Wattenberg em 1992, o suco de laranja mostrou atividade bloqueadora e supressora da tumorigênese induzida pelo 7,12 dimetilbenzilantraceno (DMBA). Além da atividade dupla de alguns já citados, os extratos de alguns vegetais específicos podem conter mais de um elemento quimiopreventivo resultando em uma série de combinações de atividades bloqueadoras e supressoras que interagem sinergicamente, potencializando o efeito quimiopreventivo final do substrato. Isso os torna uns dos inibidores naturais de carcinogênese mais completos em modelos experimentais e humanos.



Já a Clorofilina (Figura 2), que será o foco de estudo neste trabalho, é um derivado semi-sintético da clorofila onde o núcleo central de magnésio é substituído por um outro metal como cobre, ferro ou cobalto e onde os grupos éster de fitil são substituído por sódio ou potássio (SARKAR et al., 1994), tornado-se solúvel em água. Por isso, a Clorofilina é uma forma mais estável que a clorofila (SARKAR et al., 1995), sendo mais resistente à luz e ao calor, por isso é mundialmente usada como aditivo alimentar, na medicina gastrointestinal; em feridas, por suas propriedades anti-inflamatórias e cicatrizadoras (BOWERS, 1947; LARATO; PFAU, 1970), no tratamento de cálculo renal devido ao controle do oxalato de sódio (TAWASHI et al., 1980) e no controle de odores corporal, fecal e urinário em pacientes geriátricos (YOUNG; BEREGE, 1980). Embora essas aplicações ilustrem o potencial de aplicabilidade médica da Clorofilina, o que tem atraído maior atenção recentemente é o papel desse pigmento na prevenção de cânceres.



**Figura 2** – Molécula de Clorofilina (BLUM et al., 2003).

A Clorofilina tem demonstrado significantes atividades biológicas *in vitro* e *in vivo*, consistente com a prevenção de câncer incluindo atividade antioxidante, antimugênica, moduladora das enzimas metabolizadoras de xenobióticos, e indutoras de apoptose em linhagens de células de câncer. Esses resultados levaram a investigação dos efeitos quimiopreventivos em humanos (EGNER et al., 2001; EGNER et al., 2003).

### 1.2.1 Clorofilina e Prevenção de Câncer

Considerando a baixa toxicidade, esse pigmento tem sido considerado um atraente quimiopreventivo do câncer e um potencial agente terapêutico. Efeitos preventivos do câncer pela clorofilina têm sido estudados, com particular ênfase na sua atividade antimutagênica, *in vitro*, contra mutágenos ambientais e da dieta.

Em geral, a Clorofilina, tem demonstrado a habilidade, *in vitro*, de proteger contra atividade mutagênica de agentes diretos e indiretos da dieta e mutágenos ambientais tais como: aminas heterocíclicas 3-amino-1-metil-5H-pirido-[4,3-*b*]indole e 2-amino-3-metillimidazo[4,5-*f*]quinoline (IQ) (DASHWOOD et al.,1991), óxido de cromo (VI) (OLVERA et al., 1993), aflatoxina B1 (DASHWOOD et al.,1991), benzo[*a*]pireno (ARIMOTO et al., 1993; FERRUZZI, et al., 2002), benzo[*a*]pireno-7,8-dihidrodiol-9-10-epoxido (SURH, 1998), 3-metilcloroantraceno (CHERNOMORSKY et al., 1997) e 7,12-dimetilbenzo[*a*]antraceno (CHUNG et al., 1999).

A atividade antimutagênica da Clorofilina, bem como de extratos vegetais (nos quais a clorofila está presente), também tem sido demonstrada em diferentes sistemas-teste: microrganismos (*Salmonella typhimurium*) (BRONZETTI et al., 1990), *Drosophila* (NEGISHI et al.,1989; HAYATSU et al., 1993) e cultura de células de mamíferos (NEGRAES et al., 2003). E ela tem sido bastante estudada por seu potencial antígenotóxico, anticlastogênico, antimutagênico e anticarcinogênico em vários sistemas-testes (EDENHARDER et al., 1995; RAMPAZO et al., 2002).

A Clorofilina é forte inibidora da formação de adutos de substâncias carcinogênicas (aflatoxina B1 e dibenzo[*a,l*]pireno) com o DNA, em testes *in vitro*. A formação de complexos com o DNA representa o primeiro passo para a alteração da molécula do DNA. O mecanismo de inibição proposto para a clorofilina se baseia na complexação não covalente dessa molécula com a aflatoxina B1, numa estequiometria de aproximadamente 1:1, tornando a aflatoxina indisponível para formar aductos com o DNA, o que explicaria, então, a sua atividade anticarcinogênica (LANFER-MARQUEZ, 2003).

Os resultados *in vitro*, da antimutagenicidade embasaram subsequentes investigações do potencial preventivo do câncer, *in vivo*, em que diversos modelos animais foram usados, incluindo camundongos, ratos, truta arco-íris, e em células de câncer de pele, fígado e cólon retal (FERRUZZI; BLAKESLEE, 2007).

A Clorofilina reduziu a hepatocarcinogenicidade da aflatoxina em truta arco-íris, devido à ligação entre essas moléculas, levando assim a diminuição da biodisponibilidade da aflatoxina (BREINHOLT et al., 1995). O consumo de clorofilina reduziu significativamente o número médio de neoplasma no fígado e a proliferação, mas não na incidência de células totais do fígado no modelo de hepatocarcinogênese com o dietilnitroamino-fenobarbital (SUGIE et al., 1996). Hartting e Bailey (1998) relataram que a clorofila natural de espinafre inibiu a formação de aductos de dibenzo[*a,l*]pireno-DNA no fígado de truta arco-íris e que a clorofila-*a* protegeu contra a formação de aductos no DNA quando embriões de trutas foram co-injetados com clorofila e aflatoxina B1. Porém, a clorofilina ofereceu melhor proteção contra a formação de aductos, sugerindo uma melhor distribuição pelo fato dela ser solúvel em água, sendo mais eficaz. Contudo, foi observado que a proteção contra a hepatocarcinogênese não pode ser atribuída exclusivamente à inibição da formação de aductos; a incubação de clorofilina com aflatoxina foi responsável por apenas 40-50% da redução da resposta tumoral. Assim, outros mecanismos celulares parecem contribuir com a atividade protetora dessa molécula.

A Clorofilina tem sido moderadamente efetiva em modelo animal de câncer de pele. Esse pigmento reduziu a indução de carcinogênese de pele por benzo[*a*]pireno e benzo[*a*]pireno-7,8dihidrodiol-9,10-epóxido em camundongos. Chung et al. (1999) relataram que a administração de clorofilina oralmente inibiu a promoção e a progressão de papilomas pela 7,12-dimetilbenz[*a*]antraceno e 12-*O*-tetradecanoil-forbol-13-acetato, que são agentes indutores de neoplasias de pele em camundongos.

Recentemente, evidências epidemiológicas têm relacionado dietas ricas em Clorofilina com a redução do risco de câncer de cólon em humanos (BALDER et al., 2006). Porém, foi observado que dieta com clorofilina agiu como promotor da carcinogênese do cólon em ratos tratados com dimetilhidrazina (NELSON, 1992). De modo interessante, foi relatado que a Clorofilina tem atividade promotora ou supressora (de acordo com baixas e altas doses respectivamente) na pós-iniciação com as substâncias 2-amino-3-metilimidazol [4,5-*f*] quinolona (IQ) e 1,2-dimetilhidrazina (DMH), as quais são indutoras de tumores de cólon em ratos. Em alguns relatos, a clorofila, mas não a Clorofilina suprime a pós-iniciação, produzidas com as substâncias azoximetano e IQ, que são indutoras de focos de criptas aberrantes em ratos (BLUM et al., 2003).

Dados positivos de estudos *in vitro* e *in vivo* têm aumentado o interesse no potencial de utilização da Clorofilina como um agente preventivo para seres humanos. A baixa toxicidade da Clorofilina, combinada com fortes evidências da habilidade da Clorofilina

agir como interceptor de moléculas reduzindo a biodisponibilidade de mutágenos na dieta, levou o planejamento e execução de um estudo randomizado, duplo cego, controlado com placebo em Qidong, na China (EGNER et al., 2001). Moradores de Qidong possuem risco elevado de hepatocarcinoma devido a longo tempo de exposição à aflatoxina B1 pela alimentação. Neste estudo, participantes consumiram três suplementos contendo 100mg de Clorofilina diariamente durante 4 meses (EGNER et al., 2003). Os resultados indicaram redução de 55% dos níveis de aflatoxina-N7-guanina, na urina. Esses achados sustentam a idéia de que a intervenção da Clorofilina pode reduzir a biodisponibilidade e/ou atividade da aflatoxina B1 em seres humanos.

## 1.2.2 Potenciais Mecanismos de Ação da Clorofilina Na prevenção do Câncer

### 1.2.2.1 Atividade antioxidante

Clorofilina demonstrou apreciável atividade antioxidante *in vivo* e *ex vivo*. A inibição da lipoperoxidação dependente da concentração foi notada em microsomo de fígado de rato (SATO et al., 1983), enquanto que a administração intraperitoneal e endovenosa protegeu a mitocôndria e microsomo da lipoperoxidação e também da injúria por tetracloreto de carbono do fígado de ratos (SATO et al., 1986). Cahyana et al. (1993) e 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). Derivados de níquel, cobre e magnésio suprimem a oxidação do ácido linoléico pelo ânion superóxido. Foi mostrado que a clorofila-*a* e -*b* possuem menor atividade antioxidante que a clorofilina (FERRUZZI et al., 2002).

### 1.2.2.2 Interceptador de mutágeno

O sequestro de mutágenos e carcinógenos da dieta por moléculas interceptadoras é um conceito aplicado a inúmeros compostos incluindo a clorofilina (HARTMAN; SHANKEL, 1990). *In vivo*, a biodisponibilidade de mutágenos e carcinógenos da dieta é reduzida pela ligação da clorofilina não absorvida pelo epitélio intestinal. *In vitro*, a formação de complexo entre a Clorofilina e mutágenos com conformação planar policíclica hidrofóbica foi primeiro relatado por Arimoto et al. (1993). A limitada absorção e transporte de vários componentes da dieta e mutágenos ambientais incluindo aflatoxina B1, 2-amino-1-metil-6-fenilimidazol [4,5-b] piridina (PhIP) e dibenzopireno pela clorofilina em modelo de célula intestinal humana Caco-2 demonstrando a habilidade desses pigmentos influenciar a bioacessibilidade de carcinógenos pela formação de complexos (NATSUME et al., 2004; VERSANTVOORT et al., 2005). Modelos animais têm também demonstrado que a formação de complexo clorofilina-aflatoxina contribui para reduzir a biodisponibilidade da aflatoxina e também a mutagenicidade/carcinogenicidade (HAYASHI et al., 1999).

### 1.2.2.3 Regulação das vias de detoxificação

Os derivados da clorofila também podem modular o sistema de detoxificação de xenobióticos. Singh et al. (1996) demonstraram significativa elevação da atividade da glutationa-s-transferase depois da administração tópica e por gavagem da Clorofilina em murinos e camundongos neonatos, enquanto que a atividade do citocromo (CYP) P450 manteve-se inalterada. A inibição inespecífica de várias CYPs P450 pela clorofilina tem sido observada em microsossomos 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). *In vivo*, há evidências modestas, porém, significativa da indução de NQO1 hepática pela Clorofilina.

#### 1.2.2.4 Indução de apoptose em células de câncer

Mais recentemente, foram feitas evidências que a Clorofilina pode levar a indução da apoptose em células transformada e cancerosas, revelando assim um potencial agente terapêutico contra o câncer. A investigação desse potencial foi um dos principais aspectos abordado neste trabalho. 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 através da inibição da ativação da proteína ERK, levando à eventos de apoptose (CHIU et al., 2005). Embora já tenha alguns estudos, mais pesquisas ainda são necessárias para compreender as implicações *in vivo* e *in vitro*, pois esta área representa um potencial campo para o conhecimento dos mecanismos quimioprotetores da clorofilina.

### 1.3 APOPTOSE

A apoptose é uma forma de morte celular na qual uma seqüência de eventos leva a eliminação de células sem a liberação de substâncias nocivas na área circundante. O termo apoptose que se refere à morte celular programada, ou morte celular fisiológica, foi introduzido em 1972 por Kerr e colaboradores e hoje é um dos processos mais vigorosamente investigados devido à sua correlação com a carcinogênese e respostas a terapia anticâncer (KERR et al., 1972)

O termo “apoptose” vem do grego, onde o prefixo “*apo*” significa separação e o sufixo “*ptose*” pode ser traduzido como queda, sendo associado com a queda das folhas de uma árvore ou pétalas de flores. Esse termo é uma alusão à liberação de pequenos corpos revestidos por membrana, resultantes da fragmentação da célula apoptótica, denominados corpos apóptóticos (DUQUE-PARRA, 2005).

A morte celular programada é importante para evitar a ocorrência de cânceres. Se uma célula com capacidade anormal de se replicar é morta, ela não pode multiplicar-se para formar um tumor potencialmente perigoso. Assim, a morte celular

programada é uma verificação importante contra células renegadas que de outro modo poderiam proliferar descontroladamente em um organismo (SNUSTAD; SIMMONS, 2008).

Os eventos que ativam a morte celular são apenas parcialmente conhecidos, entretanto, os eventos de morte são conhecidos em algum detalhe. Uma família de enzimas proteolíticas chamadas caspases desempenha um papel crucial no fenômeno de morte celular. Elas são um grupo de enzimas proteases com um resíduo de cisteína capazes de clivar outras proteínas depois de um resíduo de ácido aspártico, uma especificidade incomum entre proteases. O nome “*caspase*” é derivado dessa função molecular característica: *cysteine-aspartic-acid-proteases*. Elas são essenciais na apoptose celular que ocorre durante o desenvolvimento e em outras fases da vida adulta. Algumas caspases também são necessárias no sistema imune, para a maturação das citocinas (PERES; CURI, 2005). As caspases atacam muitos tipos diferentes de proteínas, incluindo as lâminas, que constituem o revestimento interno do envoltório nuclear, e vários componentes do citoesqueletos. O impacto coletivo dessa clivagem proteolítica é que células nas quais ela ocorre perdem sua integridade; sua cromatina torna-se fragmentada, formam-se bolhas de citoplasma em sua superfície e elas começam a encolher. Se o mecanismo apoptótico foi prejudicado ou inativado, uma célula que de outro modo seria morta pode sobreviver e proliferar. Tal célula tem potencial de formar um clone que pode tornar-se canceroso se obtiver a capacidade de se dividir descontroladamente (SNUSTAD; SIMMONS, 2008).

Existem dois tipos de caspases: caspases iniciadoras e caspases efetoras. Caspases iniciadoras (por exemplo caspase-8, caspase-9) clivam pró-formas inativas de caspases efetoras, ativando-as; caspases efetoras (por exemplo caspase-3, caspase-7) por sua vez clivam outros substratos protéicos da célula resultando no processo apoptótico. A iniciação da reação em cascata é regulada por inibidores de caspases.

A cascata das caspases pode ser ativada pela granzima B liberada por linfócitos T citotóxicos que ativam caspases-3 e -7; receptores de morte (como o ligante FAS, o TRAIL e o TNF) que podem ativar caspases-8 e -10; e o apoptossomo, regulado pelo citocromo c e a família bcl-2, que ativa a caspase-9. Uma vez que a cascata é ativada, uma resposta retroalimentadora positiva garante que a célula inevitavelmente entre em apoptose: por exemplo a caspase-9, codificada pelo gene *CASP9*, ativada pelo apoptossomo cliva e ativa a caspase-3, esta por sua vez além de clivar suas proteínas-alvo irá também clivar mais caspase-9, que ativará mais caspase-3 (PERES; CURI, 2005).

### 1.3.1 Vias de Ativação da Apoptose

Diversos são os fatores que podem desencadear a apoptose, entre eles: ligação de moléculas a receptores de membrana, agentes quimioterápicos, radiação ionizante, danos no DNA, choque térmico, deprivação de fatores de crescimento, baixa quantidade de nutrientes e níveis aumentados de espécies reativas do oxigênio (HENGARTNER, 2000). A ativação da apoptose pode ser iniciada de duas diferentes maneiras: pela via extrínseca (caspase-8) ou pela via intrínseca (caspase-9).

A via extrínseca é desencadeada pela ligação de ligantes específicos a um grupo de receptores de membrana da superfamília dos receptores de fatores de necrose tumoral (rTNF). Esta ligação é capaz de ativar a cascata das caspases (BUDIARDJO, 1999).

Todos os membros da família rTNF possuem um subdomínio extracelular rico em cisteína, o qual permite que eles reconheçam seus ligantes. Tal fato resulta na trimerização e conseqüente ativação dos receptores de morte específicos. A sinalização a seguir é mediada pela porção citoplasmática desses receptores que contém uma seqüência de 65 aminoácidos chamada "domínio de morte" sendo, por isso, chamados de "receptores de morte celular" (NAISMITH, 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 recrutarem a caspase-8 que irá ativar a caspase-3, executando a morte por apoptose (DANIEL, 2001).

A via intrínseca é ativada por estresse intracelular ou extracelular como a deprivação de fatores de crescimento, danos no DNA, hipóxia ou ativação de oncogenes. Os sinais que são transduzidos em resposta a estes insultos convergem principalmente para a mitocôndria (HENGARTNER, 2000). 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 conseqüente liberação de moléculas pró-apoptóticas nela presentes (DESAGHER, 2000).

Quando sinais de morte alcançam a mitocôndria, levam ao colapso do potencial da membrana mitocondrial interna, bem como a uma transição da permeabilidade mitocondrial (PM). Ao mesmo tempo, a água do espaço entre membranas passa para a matriz mitocondrial, levando à ruptura da organela e conseqüente liberação de proteínas pró-apoptóticas para o citoplasma (GUPTA, 2003). Além da liberação de moléculas pela

mitocôndria, a indução do potencial de membrana mitocondrial interna e PM levam à perda da homeostasia celular, interrompendo a síntese de ATP e aumentando a produção de espécies reativas do oxigênio (EROS) (KROEMER et al., 2000). O aumento nos níveis de EROS leva à oxidação de lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, aumentando o colapso do potencial de membrana (GREEN et al., 2004). A resposta da mitocôndria ao dano oxidativo é uma via importante no início da apoptose. Além disso, é sabido que as EROS induzem a ativação das caspases -9 e -3 (GOTTLIEB et al., 2000).

Alguns estudos indicam que durante a apoptose ocorre a formação de um megaporo que contém diversas proteínas e abrange as membranas interna e externa da mitocôndria (WETZEL et al., 1990). Através desse poro ocorre a liberação do citocromo *c* para o citoplasma onde participa da ativação da apoptose. Os diferentes sinais indutores de apoptose são detectados pela mitocôndria, fazendo com que ocorra um desacoplamento da cadeia respiratória e conseqüente 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. Uma vez ativada, a caspase-9 ativa a caspase-3 que vai ocasionar a apoptose (DENAULT; SALVESEN, 2002).

### 1.3.2 Apoptose e Câncer

Embora o câncer exiba características muito heterogêneas, todos os tumores malignos adquiriram a propriedade de crescer além dos limites impostos às células normais. A expansão clonal de uma célula transformada depende de um descontrole da sua capacidade proliferativa e de uma crescente incapacidade de morrer por apoptose. Portanto, apesar da enorme variabilidade do câncer, evidências demonstram que a resistência à apoptose é uma das características mais marcantes da maioria dos tumores malignos (OKADA; MAK, 2004). De fato, a análise do processo de tumorigênese revela que a capacidade de resistir à morte pode ser adquirida por diferentes mecanismos e acontecer em vários momentos do desenvolvimento tumoral. Entre estes, a resistência à morte por apoptose em células que escaparam do controle do crescimento e da diferenciação normais exercidos por fatores solúveis ou por contatos célula-célula ou célula-matriz extracelular até aquela induzida por lesões no DNA, por hipóxia ou por espécies reativas do oxigênio (ZORNIG et al., 2004).

A apoptose na prática clínica é alvo para um potencial uso terapêutico da morte celular programada ou para a compreensão dos mecanismos de resistência à radioterapia e à quimioterapia (DEBATIN et al., 2004). A elucidação de alguns dos mecanismos moleculares da apoptose abriram perspectivas de modulação desses processos. As estratégias se baseiam em induzir a morte nas células tumorais através do bloqueio de genes com oligonucleotídeos *antisense* e drogas convencionais, ou ainda a substituição de função desses genes com o uso de moléculas recombinantes (NICHOLSON, 2000).

A demonstração de que a apoptose é um mecanismo inato de defesa antineoplásica e que vários agentes quimioterápicos agem através da indução desse tipo de morte celular levou a uma intensa investigação dos mecanismos moleculares da apoptose e sua aplicação no tratamento do câncer.

#### 1.4 CONSIDERAÇÕES SOBRE O GENE *APC* E $\beta$ -CATENINA

O gene APC dá origem a proteína pAPC que foi descoberta através do estudo de polipose adenomatosa do cólon uma condição herdada que geralmente resulta em um câncer colorretal. Essa proteína desempenha um papel importante na regulação da renovação de células no revestimento, ou epitélio, do intestino grosso. Embora os mecanismos que regulam este processo não sejam totalmente compreendidos, informações atuais sugerem que pAPC controla a proliferação e a diferenciação de células no epitélio do intestino. Quando a função de pAPC é perdida, as células que geram as projeções digitiformes do epitélio intestinal permanecem em um estado indiferenciado. À medida que tais células continuam a se dividir, elas produzem mais de seu tipo, e o aumento do número de células causa a formação de muitos pequenos tumores benignos no epitélio intestinal. Esses tumores são chamados *pólipos* ou *adenomas*, e a predisposição a formá-los é herdada como uma condição autossômica dominante rara chamada polipose adenomatosa familiar (FAP). Nos países ocidentais, sua frequência populacional é de cerca de 1 em 7000. Pacientes com FAP desenvolvem múltiplos adenomas durante a adolescência e o início da segunda década de vida. Embora os adenomas sejam inicialmente benignos, há uma grande probabilidade de que pelo menos um deles se torne um tumor maligno (SNUSTAD; SIMMONS, 2008).

A proteína pAPC regula a divisão celular por meio de sua capacidade de ligar a  $\beta$ -catenina, uma proteína que está presente dentro das células e levar sua 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). As células com mutações no *APC*, como é o caso da linhagem HT29 (MORIN et al., 1996), perdem sua capacidade de controlar os níveis de  $\beta$ -catenina. Com isso, a proteólise da  $\beta$ -catenina não ocorre levando o seu acúmulo no citoplasma, podendo posteriormente alcançar o núcleo. No núcleo, a  $\beta$ -catenina pode modular a expressão de vários genes alvos que favorecem a carcinogênese. Assim, a partir de um epitélio normal, dá-se início a proliferação celular, passando pela etapa de adenoma até carcinoma invasor (YANG et al., 2006; HUANG et al., 2008). Assim, moléculas normais de pAPC têm um papel importante em suprimir a formação de tumores no intestino.

## 2 JUSTIFICATIVA

A exposição do homem a agentes danosos a saúde têm aumentado consideravelmente desde a revolução industrial, seja pelo aumento de poluentes lançados no meio ambiente, seja pela modificação dos hábitos alimentares ou mesmo pelo aumento na expectativa de vida, que contribui para o aumento da incidência de câncer. Ultimamente vários estudos têm indicado que a ingestão de fatores moduladores dos mecanismos de defesa de um organismo, assim como a não exposição a agentes carcinogênicos tem colaborado para a prevenção do câncer.

Esta estratégia preventiva é referida como quimioprevenção e pode ser conseguida através de uma suplementação da dieta com quimioprotetores derivados da agricultura ou através de agentes farmacológicos. Nos últimos anos, tem sido investigado o papel quimioprotetor da Clorofilina e dentre os efeitos quimiopreventivos, destacamos a ação antioxidante, antimutagênica, moduladora de enzimas metabolizadoras de xenobióticos e indutora de apoptose em linhagens de células de câncer, o que tem despertado a atenção de pesquisadores quanto ao uso terapêutico dessa molécula.

Recentemente, têm sido investigados os mecanismos pelos quais esse fitoquímico atua na apoptose e na proliferação celular. Considerando que há poucos trabalhos relatando a capacidade da Clorofilina em induzir apoptose e inibir a proliferação celular, se faz necessário a realização de mais estudos para compreensão do mecanismo de ação dessa molécula nesses processos, visando o desenvolvimento de novos agentes farmacológicos para a quimioprevenção do câncer.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem por objetivo avaliar os efeitos da clorofilina na apoptose, proliferação celular e expressão gênica em sistema de cultura de células humanas HT-29 (adenocarcinoma de cólon retal).

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a citotoxicidade através do Ensaio de Citotoxicidade – MTT nos tempos de 24, 48 e 72 horas;
- Verificar alterações no ciclo celular através do Ensaio de Cinética de Proliferação Celular e Viabilidade Celular nos tempos de 24, 48 e 72 horas;
- Avaliar a influência no processo de apoptose através da análise morfológica pelo Ensaio para Avaliação da Indução de Apoptose em tratamentos de 24 horas;
- Analisar os transcritos no Ensaio de Expressão Gênica por qRT-PCR em tempo real para os genes *APC*,  $\beta$ -catenina (*CTNNB1*), *CASP8* e *CASP9* após 12 horas de tratamento.

## REFERÊNCIAS

- ADZERSEN, K. H. et al. Raw and cooked vegetables, fruits, selected micronutrients, and breast cancer risk: a case-control study in Germany. **Nutr. Cancer**, v. 46, p. 131-137, 2003.
- ARIMOTO, S. et al. Binding of polycyclic planar mutagens to chlorophyllin resulting in inhibition of the mutagenic activity. **Mutation Res.**, v. 287, p. 293-305, 1993.
- BALDER, H. F. et al. Heme and chlorophyll intake and risk of colorectal cancer in the Netherlands cohort study. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v. 15, p. 717-725, 2006.
- BEZ, G. C. et al. Investigation of genotoxic and antigenotoxic activities of chlorophylls and chlorophyllin in cultured V79 cells. **Mutat. Res.**, v. 497, p. 139-145, 2001.
- BLUM, C. A. et al. Promotion versus suppression of rat colon carcinogenesis by chlorophyllin and chlorophyll: modulation of apoptosis, cell proliferation, and beta-catenin/Tcf signaling. **Mutat. Res.**, v. 523-524, p. 217-223, 2003.
- BOFFETTA, P., HASHIBE, M. Alcohol and cancer. **Lancet. Oncol.**, v. 7, p.149-156, 2006.
- BOWERS, W. F.; Chlorophyll in wound healing and suppurative disease. **Am. J. Surg.**, v. 73, p. 49-55, 1947.
- BREINHOLT, V. et al. Dietary chlorophyllin is a potent inhibitor of aflatoxin B1 hepatocarcinogenesis in rainbow trout. **Cancer Res.**, v. 55, p. 57-62, 1995.
- BRONZETTI, G.; GALLI, A.; DELLA, C. Antimutagenic effects of chlorophyllin. **Basic Life Sci.**, v. 52, p. 463-468, 1990.
- BUDIARDJO, I. et al. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. **Annu Rev. Cell Dev. Biol.**, v. 15, p. 269-90, 1999.
- CAHYANA, H.; SHUTO, Y.; KINOSHITA, Y. Antioxidative activity of porphyrin derivatives. **Biosci. Biotechnol Biochem.**, v. 57, p. 680-681, 1993.
- CHERNOMORSKY, S. A. et al. Antimutagenicity, cytotoxicity and composition of chlorophyllin copper complex. **Cancer Letter**, v. 120, p. 141-147, 1997.
- 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.
- CHUANG, S. E. et al. Curcumin-containing diet inhibits diethylnitrosamineinduced murine hepatocarcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 21, p. 331-335, 2000.
- CHUNG, W. Y. et al. Inhibitory effects of chlorophyllin on 7,12-dimethylbenzo[a]anthracene– induced bacterial mutagenesis and mouse skin carcinogenesis. **Cancer Letter**, v. 145, p. 57-64, 1999.

- CROWEL, J. A. The chemopreventive agent development research program in the Division of Cancer Prevention of the US National Cancer Institute: An overview. **European Journal of Cancer**, v. 41, p. 1889-1910, 2005.
- DANIEL, P. T. et al. The kiss of death: promises and failures of death receptors and ligands in cancer therapy. **Leukemia**, v. 15, p. 1022-1032, 2001.
- DASHWOOD, R. H.; BREINHOLT, V.; BAILEY, G. S. Chemopreventive properties of chlorophyllin: inhibition of aflatoxin B1 (AFB1)–DNA binding in vivo and antimutagenic activity against AFB1 and two heterocyclic amines in the Salmonella mutagenicity assay. **Carcinogenesis**, v. 12, p. 939-942, 1991.
- DEBATIN, K. M. Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy. **Cancer Immunol. Immunother.**, v. 53, p. 153-59, 2004.
- DENAULT, J. B.; SALVESEN, G. S. Caspases: keys in the ignition of cell death. **Chem. Rev.**, v. 102, p. 4489-4500, 2002.
- DESAGHER, S.; MARTINOU, J. C. Mitochondrial as the central control point of apoptosis. **Trends Cell Biol.**, v. 10, p. 369-76, 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.
- DUQUE-PARRA, J. E. Note on the origin and history of the term “apoptosis”. **The Anatomical Record**, v. 283, p. 2-4, 2005.
- EDENHARDER, R.; LEOPOLD, C. H.; KRIES, M. Modifying actions of solvent extracts from fruit and vegetable residues on 2-amino-3-methylimidazo[4,5]quinoline (IQ) and 2-amino-3, 4-dimethylimidazo[4,5]quinoxaline (MeIQx) induced mutagenesis in *Salmonella typhimurium* TA 98. **Mutation Res.**, v. 341, p. 302-318, 1995.
- EGNER, P. A. et al. Chlorophyllin intervention reduces aflatoxin-DNA adducts in individuals at high risk for liver cancer. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 98, p. 14601-14606, 2001.
- EGNER P. A.; MUNOZ, A.; KENSLER, T. W. Chemoprevention with chlorophyllin in individuals exposed to dietary aflatoxin. **Mutation Res.**, v. 523, p. 209-216, 2003.
- FAHEY, J. W. et al. Chlorophyll, chlorophyllin and related tetrapyrroles are significant inducers of mammalian phase 2 cytoprotective genes. **Carcinogenesis**, v. 26, p. 1247-1255, 2005.
- FERRUZZI, M. G. et al. Antioxidant and antimutagenic activity of dietary chlorophyll derivatives determined by radical scavenging and bacterial reverse mutagenesis assays. **J. Food Sci.**, v. 67, p. 2589-2595, 2002.
- FERRUZZI, M. G.; BLAKESLEEB, J. Digestion, absorption, and cancer preventative activity of dietary chlorophyll derivatives. **Nutrition Res.**, v. 27, p. 1-12, 2007.
- GAUTHIER-JAQUES, A. et al. Improved method to track chlorophyll degradation. **J. Agric. Food Chem.**, v. 49, p. 1117-1122, 2001.

- GREEN, D. R.; KROEMER, G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. **Science**, v. 305, p. 626-629, 2004.
- 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.
- HARTMAN, P.; SHANKEL, D. Antimutagens and anticarcinogens: a survey of punitive interceptor molecules. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 5, p. 145-182, 1990.
- HARTTIG, U.; BAILEY, G. S. Chemoprevention by natural chlorophylls in vivo: inhibition of dibenzo[a,l]pyrene-DNA adducts in rainbow trout liver. **Carcinogenesis**, v. 19, p. 1323-1326, 1998.
- HAYASHI, T.; SCHIMERLIK, M.; BAILY, G. Mechanism of chlorophyllin anticarcinogenesis: dose-response inhibition of aflatoxin uptake and biodistribution following oral co-administration in rainbow trout. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 158, p. 132-40, 1999.
- HAYATSU, H. et al. Porphyrins as potential inhibitors against exposure to carcinogens and mutagens. **Mutation. Res.**, v. 290, p. 79-85, 1993.
- HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, p. 770-76, 2000.
- HOSHINA, C.; TOMITA, K.; SHIOI, Y. Antioxidant activity of chlorophylls: its structure-activity relationship. **Photosynthesis: mechanisms and effects**, v. 4, p. 3281-3284, 1998.
- HUANG, D.; DU, X. Crosstalk between tumor cells and microenvironment via Wnt pathway in colorectal cancer dissemination. **World J. Gastroenterol.**, v.14, p.1823-1827, 2008.
- KHACHIK, F.; BEECHER, G. R.; WHITTAKER, N. F. Separation, identification and quantification of the major carotenoid and chlorophyll constituents in extracts of several green vegetables by liquid chromatography. **J. Agric. Food Chem.**, v. 34, p. 603-616, 1986.
- KELLOFF, G. J. et al. Mechanistic considerations in chemopreventive drug development. **J. Cell Biochem.**, v. 20, p. 1-24, 1994.
- KELLOFF, G. J. et al. Progress in Cancer Chemoprevention: Development of Diet-Derived Chemopreventive Agents. **J. Nutr.**, v. 130, p. 467-471, 2000.
- KERR, L. F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissues kinetics. **British Journal of Cancer.**, v. 26, p. 239, 1972.
- KIM, K. S. et al. *Ginkgo biloba* extract(EGb 761) induces apoptosis by the activation of caspase-3 in oral cavity cancer cells. **Oral Oncol.**, v. 41, p. 383-389, 2005.
- KROEMER, G.; REED, J. C. Mitochondrial control of cell death. **Nat. Med.**, v. 6, p. 513-516, 2000.

- LANFER-MARQUEZ, U. M. O papel da clorofila na alimentação humana: uma revisão. **Rev. Bras. Ci. Farm.**, v. 39, p. 274-242, 2003.
- LARATO, D. C.; PFAU, F. R. Effects of water soluble chlorophyllin ointment on gingival inflammation. **N.Y. Dent. J.**, v. 36, p. 291- 3, 1970.
- MICHELS, K. B. et al. Fruit and vegetable consumption and colorectal adenomas in the Nurses' Health Study. **Cancer Res.**, v. 66, p. 3942-3953, 2006.
- MORIN, P. J.; VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K. W. Apoptosis and APC in colorectal tumorigenesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.93, p.7950-7954, 1996.
- MORSE, M. A.; STONER, G. D. Cancer chemoprevention: principles and prospects. **Carcinogenesis**, v. 14, p. 1737-1746, 1993.
- NAISMITH, J. H.; SPRANG, S. R. Modularity in the TNF-receptor family. **Trends Biochem. Sci.**, v. 23, p. 74-79, 1998.
- NATSUME, Y. et al. Assessment system for dioxin absorption in the small intestine and prevention of its absorption by food factors. **Biofactors**, v. 21, p. 375-377, 2004.
- NEGISHI, T. et al. Inhibition of the genotoxicity of 3-amino-1 methyl-5H-pyrido [4,3-b] Indole (trp-P-2-) in *Drosophila* by chlorophyllin. **Carcinogenesis**, v. 10, p. 145-149, 1989.
- NEGRAES, P. D. et al. The mutagenic potentiator effect of chlorophyllin by the HGPRT assay. **Toxicol. In Vitro**, v. 18, p. 147-149, 2003.
- NELSON, R. L. Chlorophyllin, an antimutagen, acts as a tumor promoter in the rat-dimethylhydrazine colon carcinogenesis model. **Anticancer Res.**, v. 12, p. 737-739, 1992.
- NICHOLSON, D. W. From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. **Nature**, v. 407, p. 810-816, 2000.
- OKADA, H.; MAK, T. W. Pathways of apoptotic and nonapoptotic death in tumour cells. **Nat. Rev. Cancer**, v. 4, p. 592-603, 2004.
- 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.
- OLVERA, O. et al. The protective effects of chlorophyllin in treatment with chromium (VI) oxide in somatic cells of *Drosophila*. **Mutation Res.**, v. 301, p. 201-204, 1993.
- PERES, C.M.; CURI, R. **Como cultivar células**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.
- RAMPAZO, L. G. L. et al. Chlorophyllin antimutagenesis mechanisms under different treatment conditions in the micronucleus assay in V79 cells. **Cytologia**, v. 67, p. 323-327, 2002.
- SATO, M. et al. Effect of sodium copper chlorophyllin on lipid peroxidation. V. Effect on peroxidative damage of rat liver lysosomes. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 31, p. 3665-3670, 1983.

\_\_\_\_\_. Effect of sodium copper chlorophyllin on lipid peroxidation. IX. On the antioxidative components in commercial preparations of sodium copper chlorophyllin. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 34, p. 2428-2434, 1986.

SARKAR, D.; SHARMA, A.; TALUKDER, G. Chlorophyll and chlorophyllin as modifiers of genotoxic effects. **Mutation Res.**, v. 318, p. 239-247, 1994.

\_\_\_\_\_. 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. Res.**, v. 9, p.199-202, 1995.

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

SCHWARTZ, S. J.; LORENZO, T.V. Chlorophyll in foods. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, Fort Lauderdale, v. 29, p. 1-17, 1990.

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.

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

SNUSTAD, D. P.; SIMMONS, M.J. **Fundamentos de genética**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

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

SUGIE, S. et al. Inhibitory effect of chlorophyllin on diethylnitrosamine and phenobarbital-induced hepatocarcinogenesis in male F344 rats. **Jpn. J. Cancer Res.**, v. 87, p. 1045-1051, 1996.

SURH, Y. J. Inhibition by chlorophyllin of forward and reverse bacterial mutagenicity of benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol-9-10-epoxide. **Phytother. Res.**, v. 12, p. 580-583, 1998.

SUZUKI, N. et al. 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.

VANSAUN, M. N.; MATRISIAN, L.M. Matrix metalloproteinases and cellular motility in development and disease. **Birth Defects Res. C. Embryo. Today**, v. 78, p. 69-79, 2006.

VERSANTVOORT, C. H. M. et al. Applicability of an in vitro digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food. **Food Chem. Toxicol.**, v. 43, p. 31-40, 2005.

WANG, R. et al. 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.

WATTENBERG, L. W. Inhibition of carcinogenesis by minor a nutrients constituents of the diet. **Proc. Nutr. Society**, v. 49, p. 173-83, 1990.

\_\_\_\_\_. Inhibition of carcinogenesis by minor dietary constituents. **Cancer Res.**, v. 52, p. 2085-2091, 1992.

WETZEL, E. B.; GREEN, D.R. Apoptosis: chekpoint at the mitochondria frontier. **Mutation Res.** v. 434, p. 243-251, 1999.

WOGAN, G. N. et al. Environmental and chemical carcinogênesis. **Sem. Cancer Biol.**, v. 14, p. 473 86, 2004.

YANG, J. et al. Adenomatous Polyposis Coli (APC) differentially regulates  $\beta$ -catenin phosphorylation and ubiquitination in colon. **J. Biol. Chem.**, v. 26, p. 17751-17757, 2006.

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.

YUN, C. H. et al. Non-specific inhibition of cytochrome P450 activities by chlorophyllin in human and rat liver microsomes. **Carcinogenesis**, v. 16, p. 1437-1440, 1995.

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

ZORNIG, M. et al. Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1551, p. 1-37, 2001.

**ARTIGO<sup>1</sup>****Avaliação do papel da Clorofilina na indução de apoptose, inibição da proliferação celular e expressão de RNAm dos genes *CASP8*, *CASP9*, *APC* e  $\beta$ -catenina**Diogo Campos Vesenick, Mário Sérgio Mantovani<sup>2</sup>*Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina.***RESUMO**

A Clorofilina é um derivado semi-sintético da clorofila com propriedades antioxidante, antimutagênica, moduladora das enzimas metabolizadoras de xenobióticos e indutoras de apoptose. O presente trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos da clorofilina na indução de apoptose, inibição da proliferação celular e expressão gênica em células de adenocarcinoma de cólon retal humano HT29. A Clorofilina na concentração de 100 $\mu$ g/mL reduziu significativamente a sobrevivência celular após 48 horas e as concentrações de 500 e 1000 $\mu$ g/mL após 24 horas, tanto no Ensaio de Citotoxicidade – MTT como na Cinética de Proliferação Celular. O efeito foi dose-dependente. Na avaliação da indução de apoptose nenhuma concentração de clorofilina após 24 horas de tratamento induziu apoptose. Na expressão gênica foi observado redução significativa da expressão de genes do ciclo celular *APC* e  $\beta$ -catenina (*CTNNB1*), mas não houve variação na expressão dos genes iniciadores de apoptose tanto pela via extrínseca *CASP8* como pela via intrínseca *CASP9*. Os dados sugerem que a ação de inibição do crescimento celular produzido pela Clorofilina nas concentrações estudadas está ligado diretamente à regulação da expressão gênica da  $\beta$ -catenina e não do *APC*, uma vez que este está mutado e inativo. Em relação a apoptose, as concentrações estudadas não demonstraram potencial indutor apoptótico, seja através da análise nas mudanças morfológicas das células ou através da modificação da expressão dos genes das caspases estudados.

**Palavras-chave:** Clorofilina. Proliferação. HT-29.  $\beta$ -catenina. *CTNNB1*.

---

<sup>1</sup> A ser submetido ao periódico *Toxicology in vitro*.

<sup>2</sup> Departamento de Biologia Geral – CCB -Universidade Estadual de Londrina – Campus Universitário P.O. Box 6001, Londrina, Paraná, Brazil. CEP: 86051-990 - e-mail: bioms@uel.br  
Phone: 55 43 3371-4977 - Fax: 55 43 3371-4207

## **AGRADECIMENTOS**

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

## Introdução

Há alguns anos tem havido um crescente interesse na identificação de componentes alimentares e seus derivados que podem prevenir o câncer. Entre esses componentes destaca-se a clorofilina que tem um longo histórico de uso na medicina tradicional e para fins terapêuticos. A Clorofilina é um derivado semi-sintético da clorofila onde o núcleo central de magnésio é substituído por cobre e onde os grupos ésteres de fitil são substituídos por sódio, tornando-se solúvel em água (SARKAR et al., 1994). Por isso, a Clorofilina é mais estável que a clorofila (SARKAR et al., 1995), sendo mais resistente à luz e ao calor, por isso é mundialmente usada como corante alimentar.

Ela têm sido amplamente investigada devido a uma série de atividades biológicas benéficas, incluindo a cicatrização de feridas (EDWARDS, 1954), propriedades anti-inflamatórias (LARATO; PFAU, 1970), tratamento do cálculo renal devido ao controle de cristais de oxalato de cálcio (TAWASHI et al., 1980) e desodorização interna (YOUNG; BEREGI, 1980). Embora essas aplicações ilustrem o potencial uso da Clorofilina na prática clínica, o que mais tem chamado a atenção é o papel quimiopreventivo do câncer dessa molécula. Esse pigmento tem demonstrado significantes atividades biológicas tanto *in vitro* como *in vivo* consistente com a prevenção do câncer como atividade antimutagênica, antioxidante, reguladora das vias de detoxificação e indutora de apoptose (FERRUZZI; BLAKESLEE, 2007).

A atividade antimutagênica e a ausência de efeito tóxico significativos em seres humanos e animais (ONG et al., 1986) fazem da Clorofilina um composto ideal como agente quimiopreventivo. Essa molécula tem demonstrado, *in vitro*, a habilidade de proteger contra atividade mutagênica de agentes diretos e indiretos da dieta e mutágenos ambientais tais como: aminas heterocíclicas (DASHWOOD et al., 1991), benzo[a]pireno (ARIMOTO et al., 1993; FERRUZZI, et al. 2002), aflatoxina (DASHWOOD et al., 1991), metais pesados (OLVERA et al., 1993) e radiação ionizante (ABRAHAM et al., 1994; MADRIGAL-BUJAIÐAR et al., 1997; SANTOSH KUMAR et al., 1999). A atividade antimutagênica da Clorofilina, bem como de extratos vegetais têm sido demonstrada em diferentes sistemas-testes: microrganismos (*Salmonella typhimurium*) (BRONZETTI et al., 1990), *Drosophila* (NEGISHI et al., 1989; HAYATSU et al., 1993) e cultura de células de mamíferos (BEZ, 2001; RAMPAZZO et al., 2002; NEGRAES et al., 2004).

Estudos anteriores tem mostrado que a Clorofilina inibe a carcinogênese em truta, ratos e camundongos através da formação de complexos com diferentes agentes mutagênicos da dieta (DASHWOOD, 1997). Egner et al. (2001) relataram que em populações

da China, o consumo de clorofilina reduziu os níveis de aductos de aflatoxina-DNA na urina, o que pode refletir num reduzido risco de desenvolvimento de câncer de fígado em humanos.

Além de ser relatado como um agente bloqueador eficaz na carcinogênese, estudos mais recentes têm demonstrado a capacidade da Clorofilina em induzir apoptose e inibir a proliferação celular. Em células de câncer de cólon humano HCT116 a Clorofilina induziu apoptose via ativação da caspase-8 (DIAZ et al., 2003). Também foi relatado a indução de apoptose e a inibição da proliferação em células MCF-7, porém os mecanismos ainda não foram totalmente elucidados (CHIU et al., 2005).

Nos últimos anos, tem sido investigado o papel quimioprotetor da Clorofilina e os mecanismos de ação desse fitoquímico na apoptose e na proliferação celular, visando o desenvolvimento de novos agentes farmacológicos para a quimioprevenção do câncer. Por isso, no presente estudo foi avaliado o papel da Clorofilina na indução de apoptose e na inibição da proliferação celular e os possíveis mecanismos envolvidos nesses processos celulares através da expressão de genes relacionados a apoptose como *CASP8* e *CASP9* e a proliferação celular como *APC* e  $\beta$ -catenina (*CTNNB1*).

## **Materiais e Métodos**

### *Agentes Químicos*

A Clorofilina foi adquirida comercialmente (Sigma Aldrich). Ela foi dissolvida em meio de cultura D-MEM (Gibco) e esterilizada por filtração (Millex<sup>®</sup> - Millipore 0,22  $\mu$ m). Os agentes utilizados como controle positivo nos experimentos foram a Doxorubicina (CAS 25316-40-9, Adriblastina<sup>®</sup> - Pharmacia) no Ensaio e Citotoxicidade – MTT (10  $\mu$ g/mL), Cisplatina (CAS 15663-27-1, Sigma Aldrich) no Ensaio de Cinética de Proliferação e Viabilidade Celular (1 $\mu$ g/mL) e Camptotecina (CAS 7689-03-4, Acros Organics) no Ensaio para Avaliação da Indução de Apoptose (10  $\mu$ g/mL).

### *Cultura de Células*

A linhagem de células de adenocarcinoma de cólon retal humano (HT29) utilizada neste estudo foi adquirida no Banco de células do Rio de Janeiro. Estas células foram

cultivadas em frascos de cultura de 25cm<sup>2</sup> contendo meio D-MEM suplementadas com 10% de soro bovino fetal (SBF) (Gibco) e antibiótico/antimicótico (0,1%), a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

#### *Ensaio de Citotoxicidade (MTT)*

O Ensaio do MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromide) foi baseado no protocolo descrito pela primeira vez por Mossmann (1983). Foi utilizada uma placa de cultura celular com 24 poços, onde cada poço recebeu 3x10<sup>4</sup> células, com exceção dos poços controle sem células. As células permaneceram em cultura por 24 horas para estabilização. Após este período o meio de cultura da placa foi descartado e adicionado meio fresco com os respectivos tratamentos: controle (meio de cultura); doxorrubicina na concentração de 10 µg/mL; clorofilina nas concentrações 100, 500 e 1000 µg/mL, por 24, 48 e 72 horas.

Após o tempo de tratamento, o meio de cultura foi descartado e adicionado meio fresco com MTT na concentração de 0,167 mg/mL em cada poço. A placa foi incubada em estufa por 4 horas.

Após este tempo foi retirado o meio de cultura com MTT dos poços e foi adicionado DMSO (dimetilsulfóxido) para diluir os cristais formados e a leitura foi realizada em leitor de microplacas a 550nm. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Para o cálculo da porcentagem de sobrevivência celular, utilizamos a seguinte fórmula:

$$\% \text{ sobrevivência} = \frac{AT - AB}{AC - AB}$$

Legenda:

AT= Absorbância média do tratamento

AB= Absorbância média do branco

AC= Absorbância média do controle

Ensaio de Cinética de Proliferação Celular

Para a análise da cinética de proliferação foi semeado em cada tubo de cultura (10cm<sup>2</sup>) 1,3x10<sup>5</sup> células e seus respectivos tratamentos: controle (meio de cultura); agente anti-proliferativo (Cisplatina 1µg/mL); e tratamentos com Clorofilina em 2 concentrações (100 e 500 µg/mL). Após cada tempo de tratamento (24, 48 e 72 horas) o meio

de cultura foi reservado; assim como duas lavagens com 2,5 mL de PBS. Então as células foram tripsinizadas por aproximadamente 5 minutos, inativadas com o meio reservado e centrifugadas (5 minutos, 1080rpm). Em seguida, o sobrenadante foi descartado, deixando apenas 1 mL. A contagem das células após colheita por tripsinização foi feita na câmara de *Neubauer*. Foi realizada uma curva de cinética de proliferação nos tempos determinados. O experimento foi realizados em triplicata.

#### *Ensaio de Viabilidade Celular – Azul de Trypan*

Para análise de viabilidade celular, foram semeadas  $1,3 \times 10^5$  células por frasco de cultura experimental. Foi utilizada a técnica por contagem manual através da câmara de *Neubauer* e o método de exclusão com o reagente Azul de Trypan. Esse ensaio é realizado concomitantemente com o Ensaio de Cinética de Proliferação Celular. Após a obtenção de 1mL de suspensão celular pelo método de Cinética de Proliferação Celular, 20 $\mu$ L dessa suspensão celular foi misturada com igual volume de azul de Trypan. Dessa forma, o fator de diluição é igual a 2. A seguir, adicionou-se 20 $\mu$ L da suspensão com o Azul de Trypan na superfície da câmara e então, as células foram contados em microcópico óptico. Esse ensaio foi realizado em triplicata.

#### *Ensaio para Avaliação da Indução de Apoptose*

Em uma placa de 6 poços, contendo uma lamínula (18x18mm) em cada poço foi semeado  $1,6 \times 10^5$  células. Após o tempo de 24h de estabilização para as células se aderirem à lamínula, foi colocado os tratamentos: controle (meio de cultura); indutor de apoptose (Camptotecina 10 $\mu$ g/mL) e duas concentrações de Clorofilina (100 e 500  $\mu$ g/mL). Após os tratamentos, a colheita foi feita de acordo com a metodologia descrita por Rovozzo (1973): As células foram lavadas com PBS, as lamínulas retiradas da placa de cultura e fixada em fixador de Carnoy por 5 minutos. A lamínula é, então, mergulhada rapidamente em cada uma das placas contendo concentrações decrescentes de etanol (95% a 25%), seguida de lavagem com Tampão McIlvaine por 5 minutos, coloração com acridina orange (0,01%, 5 minutos) e outra lavagem com tampão. Para a montagem da lâmina, a lamínula foi invertida sobre ela contendo uma gota de tampão McIlvaine e selada com esmalte de unha. A análise da lâmina foi feita em microscópio de fluorescência (filtro de excitação de 420-490 nm e filtro de barreira de 520 nm). Os experimentos foram feitos em triplicata e 1500 células foram

analisadas por tratamento. A identificação das células apoptóticas foi realizada por análise nas mudanças morfológicas das células como condensação da cromatina, formação de corpos apoptóticos ou fragmentação do DNA nuclear após coloração com laranja de acridina.

### *RT-PCR em Tempo Real*

O experimento de qRT-PCR foi realizado seguindo orientações de MIQE Guidelines: The Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments (BUSTIN et al., 2009). Em frascos de cultura de 25 cm<sup>2</sup>, foram semeadas 10<sup>6</sup> células e incubadas para estabilização por 24 horas. Depois do período de incubação, foram feitos os tratamentos em duplicata (controle; Clorofilina) e após 12 horas de tratamento, o RNA total foi isolado usando o reagente Trizol-LS (Invitrogen), de acordo com as informações do fabricante. As amostras aceitas para o prosseguimento do experimento foram aquelas onde a razão entre as absorbâncias de 260 e 280 (A260/A280) estava compreendida entre 1,9 e 2,1.

O RNA genômico íntegro, definido em gel de agarose 0,8%, e em quantidade suficiente, foi utilizado para a síntese de cDNA. Para tanto, utilizou-se 2µL de DNTP (Invitrogen® – 10mM), 1µL de oligo(dT) (Invitrogen® - 10pmol/ µL), 500ng de RNA genômico e completou-se o volume de 14,9µL com água DEPC (1%). Incubou-se por 5 minutos, no termociclador (TECHNE® TC 412), a 65°C. Transferiu-se rapidamente para o gelo e, em seguida, acrescentou-se 4µL de tampão da Mlv 5x (Invitrogen®), 0,1µL inibidor de ribonuclease (RNase out –Invitrogen®) e 1µL de transcriptase reversa (M-Mlv-RT – Invitrogen ®). Desta forma, totalizou-se o volume final de 20µL. Incubou-se em termociclador a 37°C, por 50 minutos, e a 70°C, por 15 minutos. O cDNA foi acondicionado em *freezer* -80°C.

As reações de PCR em tempo real foram realizadas no termociclador PTC 200 DNA Engine Cycler, usando o sistema de detecção Chromo 4 (MJ Research- BIO RAD). A detecção da amplificação foi feita por mensuração da fluorescência emitida pelo corante SYBR Green (Platinum SYBR Green qPCR Supermix-UDG - Invitrogen) ao se ligar à dupla fita de DNA. As condições da PCR no termociclador foram as seguintes: desnaturação do cDNA a 95°C por 1 min, seguido de 95° por 3 minutos, 35 ciclos a 95°C por 20 segundos; anelamento do *primer* 60°C por 30 segundos; e extensão a 72°C por 20 segundos, seguidos de 95°C por 10 seg. e 40°C por 1 min. A análise da curva de melting foi realizada no final da reação 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. Os *primers* utilizados para as reações de PCR em tempo real estão apresentados na Tabela 1.

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

<b>Gene</b>	<b>Primers</b>	<b>Referências / No de acesso (NCBI)</b>
<i>GAPDH</i>	F:5'ACAAGATTGTGAAGG TCG GTG TCA 3' R:5'AGCTTCCCATTCTCAGCCTTGACT 3'	.SUGAYA et al., 2005
<i>CASP8</i>	F:5' GCAAAAGCACGGGAGAAAGT 3' R:5' TGCATCCAAGTGTGTTCCATT3'	CASTANEDA & ROSIN-STEINER, 2006
<i>CASP9</i>	F:5' GCTCTTCCTTTGTTTCATCTCC 3' R:5' GTTTTCTAGGGTTGGCTTCG 3'	CHEN et al., 2009
<i>APC</i>	F:5'AAAGCGCCATGATATTGCACGGTC 3' R:5'TGTTTGCTGTGCTCACGTTTCCAG 3'	Construído/ M 74088
$\beta$ -catenina	F:5'CCTATGCAGGGGTGGTCAAC3' R:5'CGACCTGGAAAACGCCATCA3'	Construído/NP_064633

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

### **Análise Estatística**

Os dados obtidos no Ensaio de Citotoxicidade – MTT foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguido do Teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ ), pelo programa GraphPad Prism5.

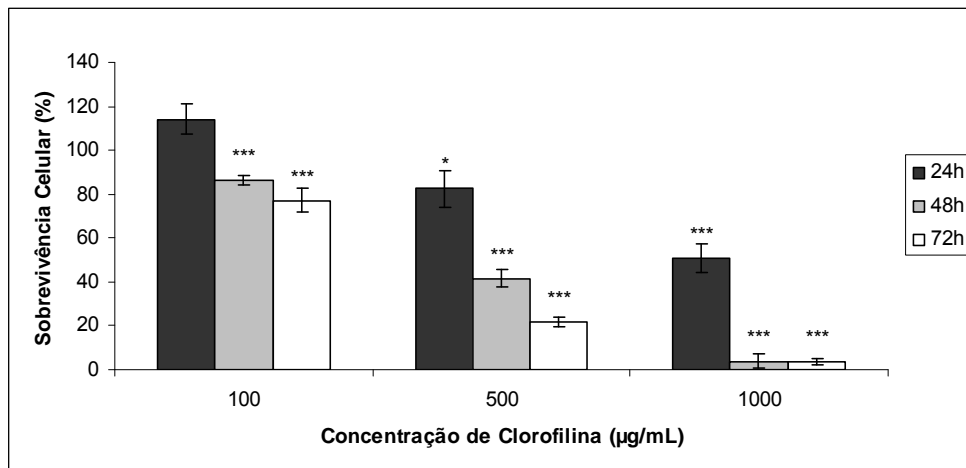
Os dados obtidos nos ensaios de Cinética de Proliferação Celular, Viabilidade Celular e Avaliação da Indução de Apoptose foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguidos de Teste de Dunnet ( $\alpha=0,05$ ), pelo programa GraphPad Prism5.

Os níveis de expressão dos genes em estudo foram determinados pelo método de Pfaffl et al. (2002), com análise estatística realizada através do Software REST-384.

## Resultados

### *Análise da Citotoxicidade*

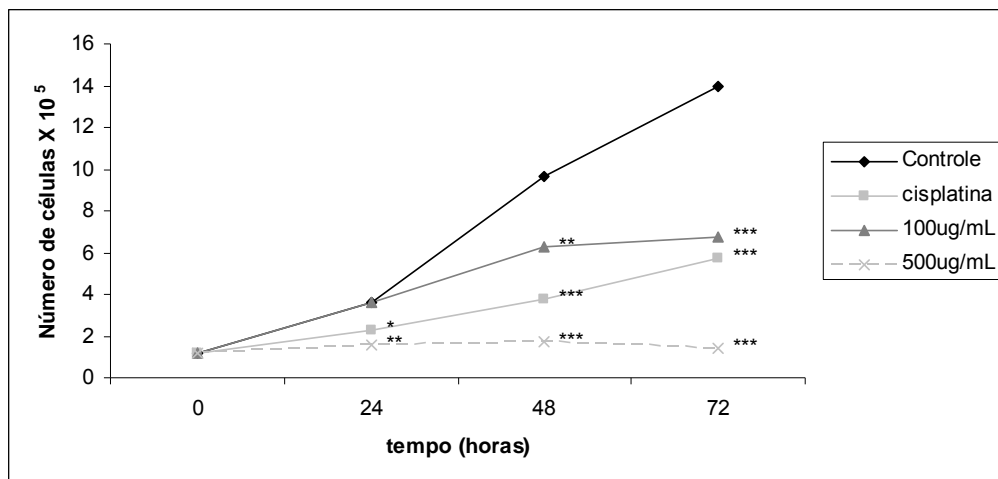
Como demonstrado através do Ensaio do MTT, a Clorofilina reduziu a sobrevivência celular de modo dose-dependente (Figura 1). Em 24 horas, somente a concentração de 100 µg/mL teve a porcentagem de sobrevivência celular equivalente com a do controle, ou seja, não foi citotóxica. Os tempos de 48 e 72 horas demonstraram que todas as concentrações (100, 500 e 1000 µg/mL) tiveram redução significativa da porcentagem de sobrevivência em relação ao controle, por isso, foram citotóxicas. A partir desses resultados foram escolhidas as concentrações de 100 e 500 µg/mL para os demais estudos.



**Figura 1** – Porcentagem de sobrevivência celular. Cálculo realizado a partir dos valores de absorbância obtidos através do Ensaio do MTT após tratamento de 24, 48, 72 horas em células HT-29 tratadas com Clorofilina. As barras representam as Médias ± Desvio Padrão obtidos em três experimentos independentes. \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; diferença significativa em relação ao controle.

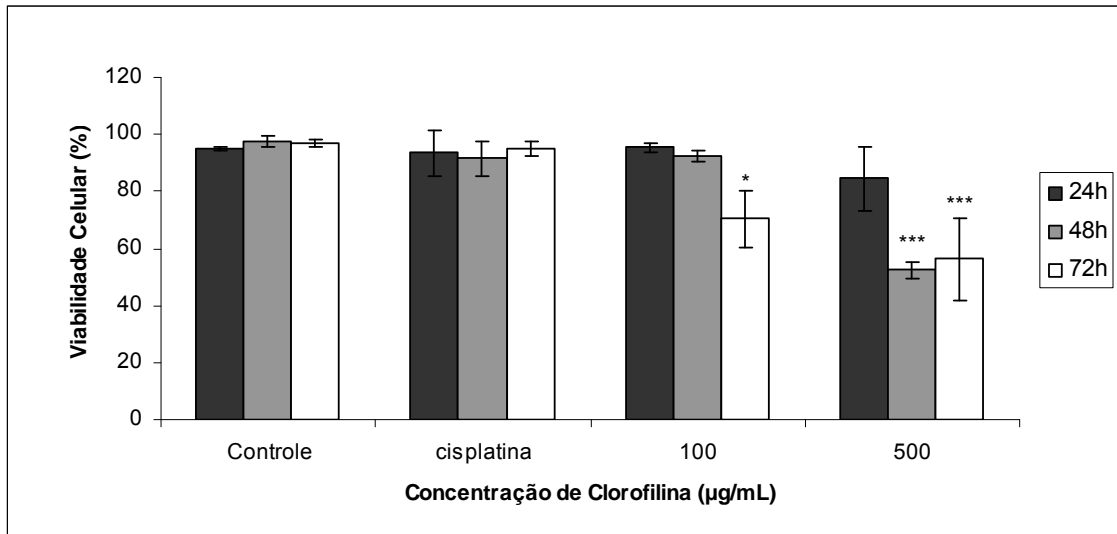
A fim de compreendermos melhor a ação citotóxica das concentrações escolhidas de Clorofilina (100 e 500 µg/mL) avaliamos a cinética de proliferação celular nos

tempos de 24, 48 e 72 horas. A Figura 2 demonstra que a concentração de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Clorofilina não alterou significativamente o crescimento das células HT29 apenas no tempo de 24 horas. Diferentemente, a concentração de 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  diminuiu significativamente a proliferação celular em todos os tempos de tratamento. Esta redução se deu de modo dose-dependente nas concentrações estudadas. O controle positivo (Cisplatina - 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) apresentou citotoxicidade significativa em relação ao controle após 24 horas de tratamento.



**Figura 2** – Cinética de proliferação celular. Número total de células obtida através de contagem em câmara de Neubauer após 24, 48 e 72 horas de tratamento com Clorofilina em células HT29; cisplatina= 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ . \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; diferença significativa em relação ao controle.

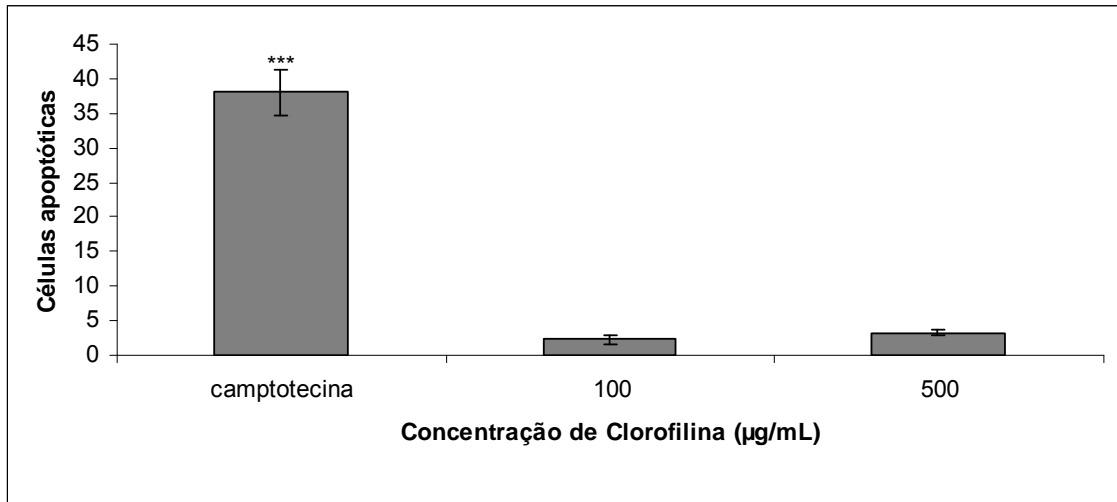
Para concluirmos se o efeito antiproliferativo observado no Ensaio de Cinética de Proliferação Celular foi devido à morte ou à diminuição da proliferação celular foi realizado a avaliação da viabilidade celular. Os resultados apresentados na figura 3 demonstraram que as concentrações de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  em 24 e 48 horas e 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  em 24 horas tiveram viabilidade superior a 80%, ou seja, os tratamentos apresentaram viabilidade celular semelhante ao controle. Porém, nos tempos de 48 e 72 horas a maior concentração apresentou viabilidade estatisticamente diferente do controle, assim como, a concentração de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  no tempo de 72 horas.



**Figura 3** – Porcentagem de Viabilidade Celular em células HT-29 tratadas com Clorofilina nos tempos de 24, 48 e 72 horas; cisplatina= 1 µg/mL. As barras representam as Médias ± Desvio Padrão obtidos em três experimentos independentes. \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; diferença significativa em relação ao controle.

#### *Análise da Indução de Apoptose*

A Figura 4 apresenta os resultados da avaliação da indução de apoptose após 24 horas de tratamento com as concentrações de 100 e 500 µg/mL de Clorofilina. Podemos observar que nenhuma concentração induziu apoptose, uma vez que os resultados foram semelhantes ao controle. Nenhuma célula apoptótica foi observada no controle. O controle positivo (Camptotecina – 10 µg/mL) induziu apoptose significativamente em relação ao controle após 24 horas de tratamento.

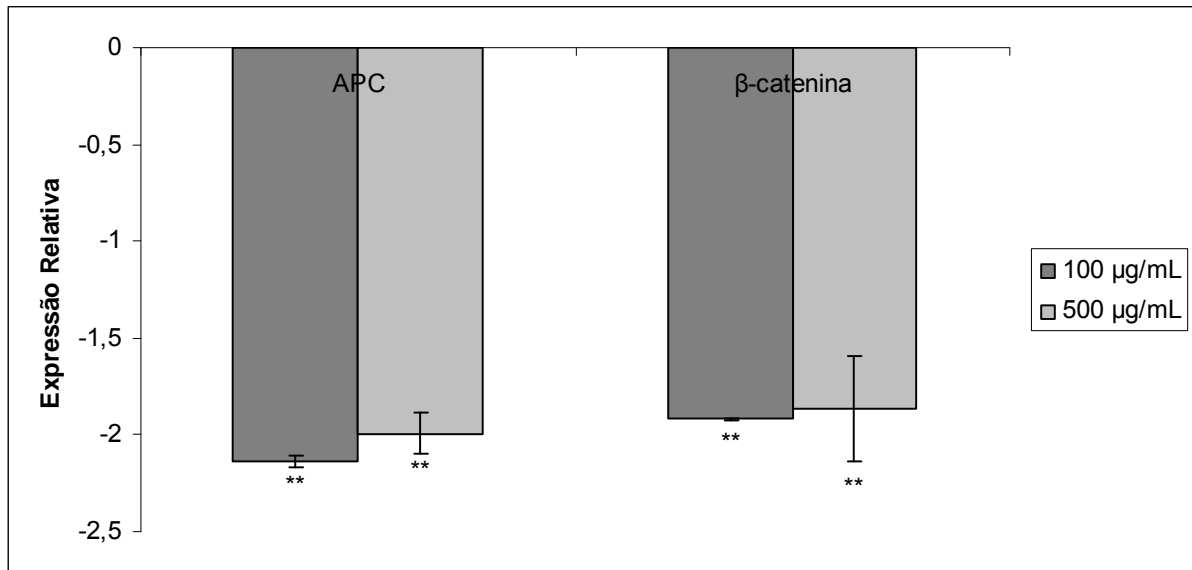


**Figura 4** – Número médio de células apoptóticas obtidas através de coloração por Laranja de Acridina em células HT2 tratadas com Clorofilina por 24 horas; camptotecina= 10µg/ml, \*\*\* $p < 0,001$ ; diferença significativa em relação ao controle.

### Expressão Gênica

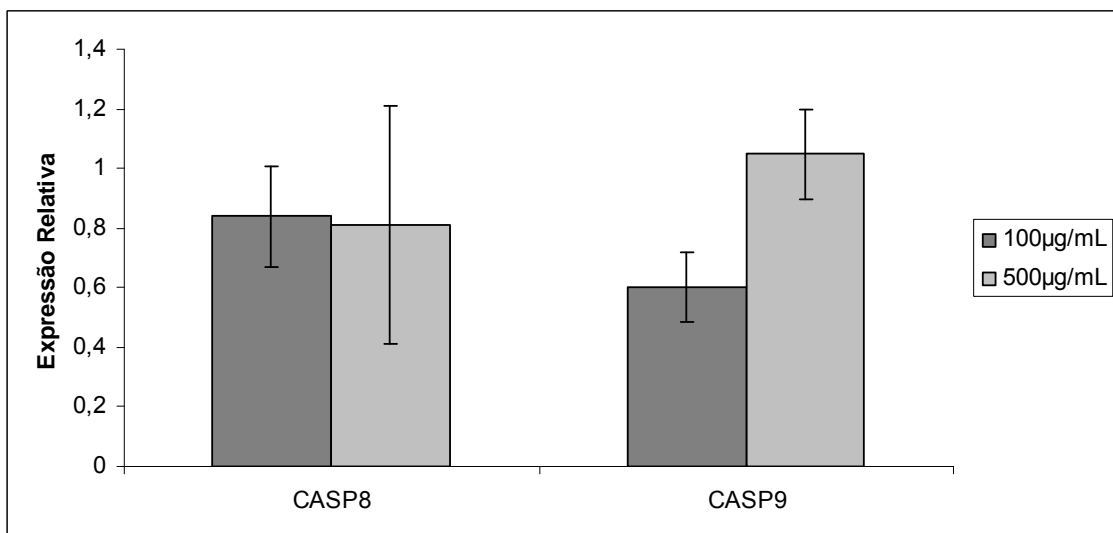
Para aprofundarmos ainda mais a investigação do efeito antiproliferativo da Clorofilina analisamos a expressão de genes envolvidos na proliferação celular tais como *APC* e *CTNNB1* que codifica a proteína  $\beta$ -catenina e na apoptose tais como *CASP8* e *CASP9*. Portanto, neste estudo de expressão gênica por qRT-PCR, foram analisados os níveis de RNAm destes genes nas células HT29 após tratamento de 12 horas com Clorofilina (100 e 500 µg/mL).

Analisando-se os valores relativos de expressão e fazendo-se a normalização pelo gene constitutivo *GAPDH*, encontrou-se que os tratamentos com Clorofilina diminuíram significativamente a expressão do gene *APC* em relação ao controle (Figura 5). Essa diminuição foi de 2,1 vezes para a concentração de 100 µg/mL e de 1,99 vezes para a concentração de 500 µg/mL. Para o gene da  $\beta$ -catenina (*CTNNB1*) também observamos diminuição significativa de 1,98 vezes para a concentração de 100 µg/mL e de 1,86 vezes para a concentração de 500 µg/mL (Figura 5).



**Figura 5** – Avaliação da expressão relativa dos genes *APC* e da  $\beta$ -catenina por RT-PCR em tempo real após 12 horas de tratamento com Clorofilina na concentração de 100 e 500 µg/mL em células HT29. \*\* $p < 0,01$ ; diferença estatisticamente significativa em relação ao controle. (Análise estatística feita pelo Software REST-384).

Na Figura 6 está apresentada a expressão relativa dos genes *CASP8* e *CASP9* e observamos que nos tratamentos com Clorofilina (100 e 500 µg/mL) não houve alteração significativa na expressão gênica quando comparados com o controle.



**Figura 6** – Avaliação da expressão relativa dos genes *CASP8* e *CASP9* por RT-PCR em tempo real após 12 horas de tratamento com Clorofilina na concentração de 100 e 500 µg/mL em células HT29. \*\* $p < 0,01$ ; diferença estatisticamente significativa em relação ao controle. (Análise estatística feita pelo Software REST-384).

## Discussão

A Clorofilina é um derivado semi-sintético da clorofila pertencente à classe das porfirinas, comumente utilizada como corante alimentar. Ela faz parte de um grupo de fitoquímico implicado como agente preventivo do câncer (FERRUZZI; BLAKESLEE, 2007). Vários estudos têm relatado que a clorofila nos vegetais verdes e o seu derivado Clorofilina, exibe atividade antígenotóxica contra vários mutágenos *in vitro*, atividade anticarcinogênica *in vivo* (DASHWOOD, 1997) e em ensaios de intervenção clínica (EGNER et al., 2001)

Para determinar as concentrações utilizadas foi realizado o Ensaio de Citotoxicidade - MTT. Este é um teste usado para verificar a citotoxicidade de substâncias e é um dos métodos mais empregados e mais sensíveis para detecção de citotoxicidade *in vitro* (FOTAKIS; TIMBRELL, 2006). Porém, esse ensaio que é comumente chamado de citotoxicidade, não apenas avalia a morte celular, mas também pode indicar a inibição de crescimento celular, ou seja, o efeito citostático.

No presente estudo, observamos que a citotoxicidade da Clorofilina ocorre a partir da concentração de 500 µg/mL, no tempo de 24 horas. Essa concentração reduziu em aproximadamente 20% a taxa de sobrevivência celular. Na menor concentração foi observado que a citotoxicidade ocorre a partir do tempo de 48 horas de exposição. Atualmente o *Food and Drug Administration* permite a ingestão de três tabletes de 100 mg por dia de Clorofilina. Essa dose tem sido eficaz em estudos preliminares em população de alto risco exposta a aflatoxina B1 (EGNER et al., 2001), mas pouco é conhecido sobre a atual concentração alcançada *in situ*, tampouco sistemicamente ou no trato gastrointestinal na dose oral. Estudos prévios, não mostraram consequência da toxicidade na exposição a longo prazo de ratos a concentrações de Clorofilina tão altas como 1% a 3% da dieta, em que a concentração plasmática da Clorofilina foi da ordem de 56 a 116 µg/mL (HARRISON et al., 1954).

Os dados obtidos pela avaliação da cinética de proliferação celular em que analisamos a curva de crescimento celular em diferentes tempos de tratamentos, corrobora com os resultados do ensaio do MTT. A partir dessa análise, foi confirmado que a maior concentração de Clorofilina diminuiu a proliferação celular a partir do tempo de 24 horas de exposição. Na menor concentração, o crescimento celular foi inibido a partir do tempo de 48 horas. Dessa forma, esse efeito antiproliferativo da Clorofilina em relação às células tumorais é positivo.

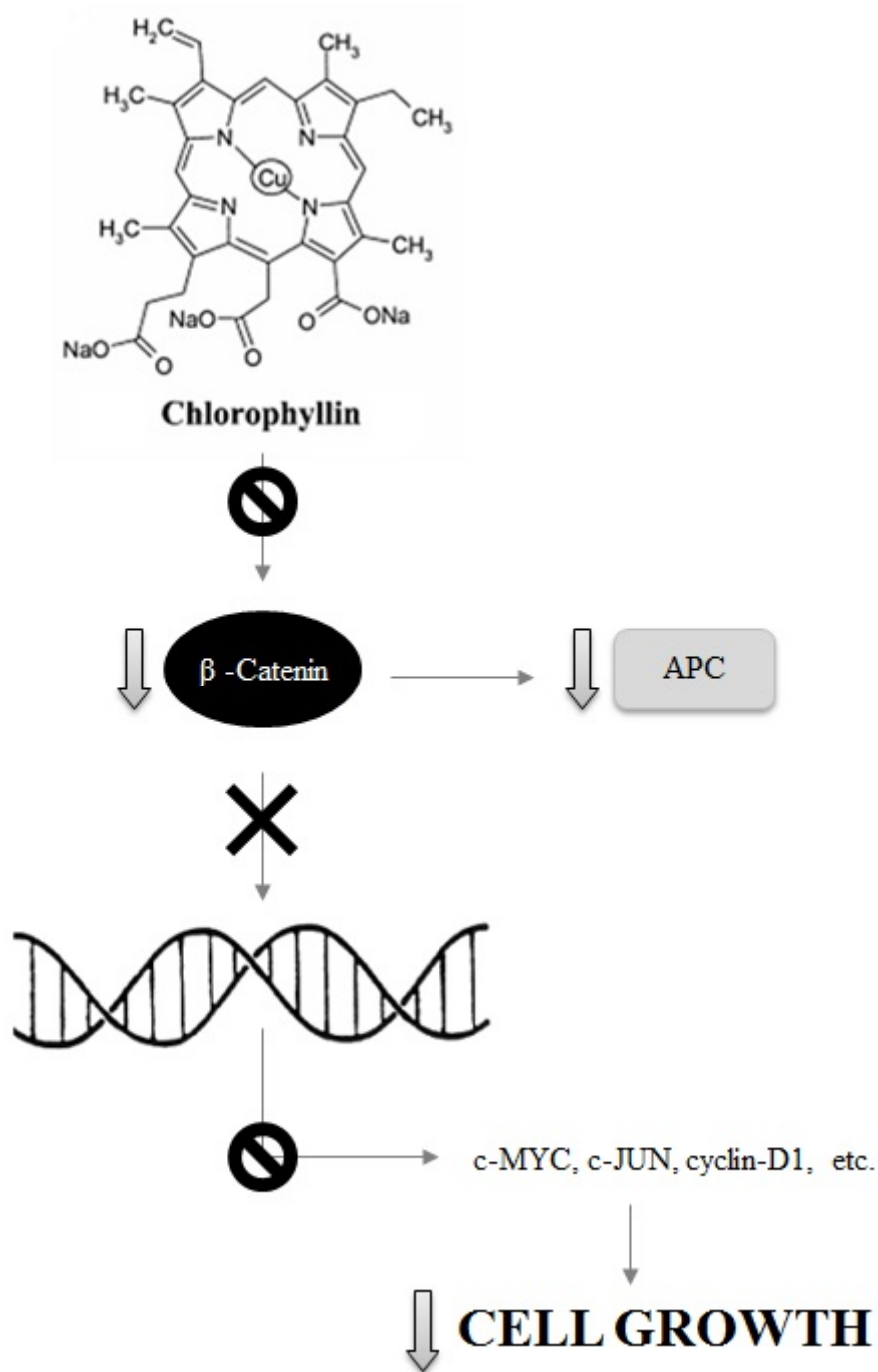
Os dados de proliferação nos revelam que houve, de fato, diminuição do crescimento celular de modo dose-dependente, porém através da análise da viabilidade pode

ser demonstrado que processos celulares são responsáveis por essa inibição. O Ensaio de Viabilidade Celular, realizado concomitantemente com o Ensaio de Cinética de Proliferação, revelou que para a maior concentração no tempo de 24 horas e para a menor no tempo de 48 horas, mais de 80% das células foram viáveis, revelando assim, que possivelmente a redução da sobrevivência celular deve-se não a morte ou processos de alteração da permeabilidade celular, mas deve-se a inibição da proliferação celular apoptose-independente. Um estudo anterior também demonstrou que em linhagem murina de mieloma concentrações mais baixas de Clorofilina produzem um efeito citostático enquanto maiores concentrações apresentam efeito citocida (CHERNOMORSKY et al., 1997). Este fato pode significar que o uso da Clorofilina, com efeito citostático, em co-adjuvante com um agente quimioterápico, que causa a morte celular, pode trazer efeitos desejáveis no tratamento do câncer. Em tratamentos agudos, a Clorofilina seria utilizada para reduzir o crescimento celular com baixa toxicidade, podendo ser usada por mais tempo, enquanto o quimioterápico atuaria promovendo a morte de células neoplásicas.

Em relação aos dados obtidos do efeito inibitório da Clorofilina, foi possível investigar o mecanismo molecular de ação desta molécula através do estudo da expressão gênica do gene *APC* e da  $\beta$ -catenina (*CTNNB1*). A proteína APC regula a divisão celular por meio de sua capacidade de se ligar a  $\beta$ -catenina, e levar sua degradação mediada por proteassomo (WANG et al., 2006). A  $\beta$ -catenina, que está presente no citoplasma, tem capacidade de se ligar e ativar fatores transcricionais cujo produto protéico promovem a divisão celular, como por exemplo, a ciclina D1. O deslocamento da  $\beta$ -catenina para o núcleo ocorre naturalmente mediante à sinais externos para promover a proliferação (YOCHUM et al., 2007). Porém, quando ocorre mutação do gene *APC*, esta acarreta a perda do controle da  $\beta$ -catenina, levando a um exacerbado aumento de sua concentração no citoplasma e o seu deslocamento aumentado para o núcleo. Na maioria dos cânceres de cólon intestinal, como é no caso da HT29, a mutação do gene *APC* é encontrada, ou seja, o produto protéico desse gene não é funcional, o que causa o descontrole da proliferação celular (MORIN et al., 1996)

A Clorofilina nas duas concentrações testadas diminuiu a expressão gênica tanto do *APC* quanto da  $\beta$ -catenina. Sugerimos com isso, baseados nestes resultados, que a Clorofilina atua principalmente na diminuição da proliferação por reduzir a expressão do gene da  $\beta$ -catenina (promotor da proliferação) e como consequência disso, ocorre a diminuição da expressão do gene *APC*. A inibição da expressão do *APC* é decorrente da diminuição da  $\beta$ -catenina devido à baixa demanda dessa proteína e a pouca necessidade de sua regulação

(Figura 7). De acordo com Carter et al. (2004), estudos de proteômica poderão aprofundar os conhecimentos desse mecanismo de ação.



**Figura 7** – Mecanismo de ação da Clorofilina na expressão gênica do *APC* e  $\beta$ -catenina.

Em um estudo realizado com linhagens humanas HL-60 (leucemia promielocítica), K-562 (leucemia mielogênica), MCF-7 (carcinoma de mama) e linhagem murina S-180 (sarcoma), após 72 horas de incubação com Clorofilina, nas concentrações de

25, 50, 100, 200 e 400 µg/mL a densidade das células, ou seja, o crescimento celular reduziu de modo dose-dependente (CHIU et al., 2003).

Nesse mesmo trabalho, os autores demonstraram a diminuição da ciclina D1 e ciclina E, por *western blot* e Citometria de Fluxo, respectivamente, quando células MCF-7 foram tratadas com Clorofilina na concentração de 200 e 400 µg/mL e incubadas por 72 horas, sugerindo assim, um possível mecanismo molecular de controle da proliferação celular (CHIU et al., 2003). A diminuição da expressão da ciclina D1 neste trabalho pode ser decorrente da diminuição da expressão da β-catenina, como foi observado no nosso estudo.

A redução da proliferação e da viabilidade celular em altas concentrações pode estar relacionada não apenas com o efeito citotóxico ou citostático sobre as células ou seu material genético, mas também com a indução de apoptose. Díaz et al. (2003) relataram em seus estudos que a Clorofilina nas concentrações de 62,5; 125; 250 e 500 uM (45-360 µg/mL) elevaram a apoptose em linhagens de câncer de cólon HTC116, através de observações morfológicas e do aumento da expressão a nível de proteína da caspase-8, mas não da caspase-9, sugerindo assim, que nesse tipo celular a via de apoptose estimulada é a extrínseca.

Chiu et al. (2005) também avaliaram a Clorofilina nas concentrações de 200 e 400 µg/mL, quanto a seu potencial indutor de apoptose, em células de câncer de mama MCF-7. Os resultados encontrados, mostraram que somente a maior concentração (400 µg/mL) induziu o aumento da apoptose nos tempos de 24, 48 e 72 horas. Esse mesmo trabalho também constata o efeito antiproliferativo através da depleção da ciclina-D1, proteína envolvida no ciclo celular, pela Clorofilina, na maior concentração.

No presente estudo, foram analisadas as concentrações de 100 e 500 µg/mL através da análise morfológica em microscopia de fluorescência e através da análise da expressão gênica das caspases-8 e -9. Os resultados experimentais obtidos neste trabalho, demonstraram que nenhuma das concentrações estudadas induziram apoptose, seja através da análise nas mudanças morfológicas das células como condensação da cromatina, formação de corpos apoptóticos, fragmentação do DNA nuclear ou através do aumento da expressão dos genes das caspases. Essas variações de resultados obtidos nos estudo apresentados podem ser justificados pelo uso de diferentes linhagens celulares, mostrando que os diferentes tecidos e órgãos não respondem do mesmo modo ao tratamento com a Clorofilina e que alguns tipos de câncer são mais resistentes à morte celular por apoptose.

Através desses resultados, podemos sugerir que a detecção da citotoxicidade pelo ensaio do MTT não se deve pela morte celular, mas sim pela diminuição da proliferação celular (efeito citostático), confirmado pelos demais ensaios.

Concluimos com esse trabalho, que a Clorofilina nas concentrações estudadas possuem efeito inibitório da proliferação em células HT29 e um possível mecanismo de ação para esse fato é a diminuição da expressão do gene da  $\beta$ -catenina. Também concluimos que a Clorofilina, no tempo de 24 horas, não induz apoptose nessa linhagem celular, ou seja, possui efeito citostático ao invés de efeito citocida. Portanto, mais estudos são necessários sobre os mecanismos envolvidos e as possíveis aplicações quanto ao potencial terapêutico da Clorofilina em relação ao câncer.

## Referências

- ABRAHAM, S. K., SARMA, L., KESAVAN, P. C. Role of chlorophyllin as an in vivo anticlastogen: protection against gamma radiation and chemical clastogens. **Mutation Res.**, v. 322, p. 209-212, 1994.
- ARIMOTO, S. et al. Binding of polycyclic planar mutagens to chlorophyllin resulting in inhibition of the mutagenic activity. **Mutation Res.**, v. 287, p. 293-305, 1993.
- BEZ, G. C. et al. Investigation of genotoxic and antigenotoxic activities of chlorophylls and chlorophyllin in cultured V79 cells. **Mutat. Res.**, v. 497, p. 139-145, 2001.
- BRONZETTI, G.; GALLI, A.; DELLA, C. Antimutagenic effects of chlorophyllin. **Basic Life Sci.**, v. 52, p. 463-468, 1990.
- BUSTIN, S. A. et al. MIQE Guidelines: The Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chem.**, v. 55, p. 611-622, 2009.
- CARTER, O.; GEORGE, B. S.; DASHWOOD, R. H. The Dietary Phytochemical Chlorophyllin Alters E-Cadherin and  $\beta$ -Catenin Expression in Human Colon Cancer Cells. **J. Nutr.**, v. 134, p. 3441-3444, 2004.
- CASTANEDA, 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.
- 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.
- CHERNOMORSKY, S. A. et al. Antimutagenicity, cytotoxicity and composition of chlorophyllin copper complex. **Cancer Letter**, v. 120, p. 141-147, 1997.

- 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.
- 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.
- DASHWOOD, R. H. Chlorophylls as anticarcinogens. **Int. J. Oncol.**, v. 10, p. 721-727, 1997.
- DASHWOOD, R. H.; BREINHOLT, V.; BAILEY, G. S. Chemopreventive properties of chlorophyllin: inhibition of aflatoxin B1 (AFB1)-DNA binding in vivo and antimutagenic activity against AFB1 and two heterocyclic amines in the Salmonella mutagenicity assay. **Carcinogenesis**, v. 12, p. 939-942, 1991.
- 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.
- EDWARDS, B. J. Treatment of chronic leg ulcers with ointment containing soluble chlorophyll. **Physiotherapy**, v. 40, p. 177-9, 1954.
- EGNER, P. A. et al. Chlorophyllin intervention reduces aflatoxin-DNA adducts in individuals at high risk for liver cancer. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 98, p. 14601-14606, 2001.
- FERRUZZI, M. G. et al. Antioxidant and antimutagenic activity of dietary chlorophyll derivatives determined by radical scavenging and bacterial reverse mutagenesis assays. **J. Food Sci.**, v. 67, p. 2589-2595, 2002.
- FERRUZZI, M. G.; BLAKESLEEB, J. Digestion, absorption, and cancer preventative activity of dietary chlorophyll derivatives. **Nutrition Res.**, v. 27. p. 1-12, 2007.
- FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J. A. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology Letters**, v. 160, p. 171-177, 2006.
- HARRISON, J. W. E.; LEVIN, S. E.; TRABIN, B. The safety and fate of potassium sodium copper chlorophyllin and other copper compounds. **J. Am. Pharm. Assoc.**, v. 18, p. 722-737, 1954.
- HAYATSU, H. et al. Porphyrins as potential inhibitors against exposure to carcinogens and mutagens. **Mutation Res.**, v. 290, p. 79-85, 1993.
- LARATO, D. C.; PFAU, F. R. Effects of water soluble chlorophyllin ointment on gingival inflammation. **N.Y. Dent. J.**, v. 36, p. 291-3, 1970.
- MADRIGAL-BUJAJIDAR, E.; VELAZQUEZ-GUADARRAMA, N.; DIAZ-BARRIGA, S. Inhibitory effect of chlorophyllin on the frequency of sister chromatid exchanges produced by benzo[a]pyrene in vivo. **Mutation Res.**, v. 388, p. 79-83, 1997.
- MORIN, P. J.; VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K. W. Apoptosis and APC in colorectal tumorigenesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 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.
- NEGISHI, T. et al. Inhibition of the genotoxicity of 3-amino-1 methyl-5H-pyrido [4,3-b] Indole (trp-P-2-) in *Drosophila* by chlorophyllin. **Carcinogenesis**, v. 10, p. 145-149, 1989.
- NEGRAES, P. D.; JORDÃO, B. Q.; VICENTINI, V. E. P.; MANTOVANI, M. S. Anticlastogenicity of chlorophyllin in the different cell cycle phases in cultured mammalian cells. **Mutation Res.**, v. 557, p. 177-182, 2004.
- OLVERA, O. et al. The protective effects of chlorophyllin in treatment with chromium (VI) oxide in somatic cells of *Drosophila*. **Mutation Res.**, v. 301, p. 201-204, 1993.
- ONG, T. M.; WHONG, W. Z.; STEWART, J. D.; BROCKMAN, H. E. Chlorophyllin: a potent antimutagen against environmental and dietary complex mixtures. **Mutation Res.**, v. 173, p. 111-115, 1986.
- PFAFFL, M. W.; HORGAN, G. W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 30, p. 1-10, 2002.
- RAMPAZO, L. G. L.; JORDÃO, B. Q.; VICENTINI, V. E. P.; MANTOVANI, M. S. Chlorophyllin antimutagenesis mechanism under different treatment conditions in the micronucleus assay in V79 cells. **Cytologia**, v. 67, p. 323-327, 2002.
- ROVOZZO, G. C.; BURKE, C. N. **A manual of basic virological techniques**. New Jersey: Prentice Hall, 1973.
- SANTOSH KUMAR, S.; CHAUBEY, R. C.; DEVASAGAYAM, T. P. A.; PRIYADARSINI, K. I.; CHAUHAN, P. S. Inhibition of radiation induced DNA damage in plasmid pBR322 by chlorophyllin and possible mechanism(s) action. **Mutation Res.**, v. 425, p. 71-79, 1999.
- SARKAR, D.; SHARMA, A.; TALUKDER, G. Chlorophyll and chlorophyllin as modifiers of genotoxic effects. **Mutation Res.**, v. 318, p. 239-247, 1994.
- 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.
- SUGAYA, S; NAKANISHI, H; TANZAWA, H. Down-regulation of SMT3A gene expression in association with DNA synthesis induction after X-ray irradiation in nevroid 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.
- WANG, R. et al. 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.

YOCHUM, G. S.; CLELAND, R.; MCWEENEY, S.; GOODMAN, R. H. An Antisense Transcript Induced by Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling Decreases E2F4. **The J. Bio. Chem.**, v. 282, p. 871-878, 2007.

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.