



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

GLÁUCIA FERNANDA ROCHA D'ÉPIRO

**" ALTERAÇÕES NA RESPOSTA CELULAR AO
TRATAMENTO COM CLOROFILINA ASSOCIADA A
AGENTES CITOTÓXICOS *IN VITRO* "**

Londrina
2016



Universidade Estadual de Londrina



Instituto Agrônomo do Paraná



Brasileira de Pesquisa Agropecuária

GLÁUCIA FERNANDA ROCHA D'ÉPIRO

**" ALTERAÇÕES NA RESPOSTA CELULAR AO
TRATAMENTO COM CLOROFILINA ASSOCIADA A
AGENTES CITOTÓXICOS *IN VITRO* "**

Londrina
2016

GLÁUCIA FERNANDA ROCHA D'ÉPIRO

**" ALTERAÇÕES NA RESPOSTA CELULAR AO
TRATAMENTO COM CLOROFILINA ASSOCIADA A
AGENTES CITOTÓXICOS *IN VITRO* "**

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

Orientador: Dr. Mário Sérgio Mantovani

Londrina
2016

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

D'Epiro, Gláucia Fernanda Rocha .

Alterações na resposta celular ao tratamento com clorofilina associada a agentes citotóxicos in vitro / Gláucia Fernanda Rocha D'Epiro. - Londrina, 2016.
67 f. : il.

Orientador: Mário Sérgio Mantovani.

Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2016.

Inclui bibliografia.

1. ciclo celular - Teses. 2. apoptose - Teses. 3. citotoxicidade - Teses. 4. quimioproteção - Teses. I. Mantovani, Mário Sérgio. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. III. Título.

GLÁUCIA FERNANDA ROCHA D'ÉPIRO

**" ALTERAÇÕES NA RESPOSTA CELULAR AO TRATAMENTO COM
CLOROFILINA ASSOCIADA A AGENTES CITOTÓXICOS *IN VITRO* "**

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

BANCA EXAMINADORA

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

Dra. Lucia Regina Ribeiro
Universidade Estadual Paulista - UNESP

Dr. Edson Luis Maistro
Universidade Estadual Paulista - UNESP

Dra. Daniele Sartori
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Dra. Sandra Lepri
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 08 de abril de 2016.

AGRADECIMENTOS

Ao orientador Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani, pelos anos de orientação e por todos os ensinamentos.

A minha família, por todo incentivo, carinho e compreensão. O apoio de vocês sempre foi fundamental.

Ao Marcos, meu companheiro, pelo amor, pela paciência e principalmente por todo incentivo.

Aos amigos do laboratório Simone, Andressa, Lilian, Bruna, Thalita, Ingrid e Adrivanio, muito obrigada por estarem sempre dispostas a me ajudar com tanta dedicação, sem vocês jamais teria consigo realizar esse trabalho!

A Eliane, obrigada por todos esses anos de companheirismo e amizade.

À banca examinadora, pelas importantes contribuições

Aos Docentes do programa pelos ensinamentos e dedicação.

Ao Prof. Dr. Faustino Mollinedo e a Dra. Maria Consuelo Gajate do Instituto de Investigación del Cáncer de Salamanca pela colaboração e por terem me recebido em seu laboratório.

Ao programa Ciências sem Fronteiras pela bolsa concedida para a realização do estágio de doutorado sanduíche.

À coordenação pelos esforços e dedicação despendidos em benefício do curso.

À CNPq, CAPES e Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

Meus sinceros agradecimentos!

D'Épiro, Gláucia Fernanda Rocha. **Alterações na resposta celular ao tratamento com clorofilina associada a agentes citotóxicos *in vitro***. 2016. 67f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

RESUMO

A clorofilina (Chl) é um corante de alimentos derivado da clorofila que apresenta atividade quimioprotetora. Entretanto, seus mecanismos de ação não estão totalmente elucidados. O presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade quimioprotetora da clorofilina em células expostas aos agentes antitumorais doxorrubicina (Dox) e edelfosina (EDLF) e ao mutágeno ambiental benzo(a)pireno (BaP). No primeiro capítulo, as células HepG2/C3A (linhagem metabolizadora de hepatoma humano) foram expostas à Chl (25, 50, 100 e 200 μM) associada à Dox (3 ou 0,1 μM) ou ao BaP (20 μM). A análise do ciclo celular mostrou que a Chl (200 μM) foi capaz de restabelecer a distribuição normal do ciclo celular e de inibir a morte celular induzida pela Dox (0,1 μM) e o BaP (20 μM). A Dox e o BaP reprimiram a expressão dos genes envolvidos na progressão do ciclo celular (*CCNA2*, *CCNB1*, *CCND1* e *CCNE1*, *CDK1* e *CDK2*) e apoptose (*BAX*, *CASP7* e *TP53*), entretanto, a associação com clorofilina não causou alteração dessa resposta. No segundo capítulo, a linhagem HeLa (linhagem não metabolizadora de câncer cervical humano) recebeu os tratamentos com a Chl (100 e 200 μM) combinada com a Dox (0,1 μM), EDLF (10 μM) e BaP (20 μM) por 24, 48 e 72 h. A Chl não apresentou citotoxicidade e nos tratamentos associados com os três agentes (Dox, EDLF e BaP) foi capaz de atenuar o efeito citostático e reduzir a população de células apoptóticas (subG1). Porém, a Chl não foi eficaz em inibir a expressão do marcador de autofagia, LC3-II, e do marcador de apoptose, PARP clivada, induzida pelos agentes citotóxicos. Portanto, em ambos os casos, a Chl atenuou os efeitos citotóxicos e citostáticos dos agentes Dox, EDLF e BaP, o que sugere sua atividade quimioprotetora mediante à toxicidade induzida por diferentes compostos.

Palavras-chave: Quimioprotetora. Ciclo celular. Morte celular.

D'Épiro Gláucia Fernanda Rocha. **Alterations in cellular response to the treatment with chlorophyll associated with cytotoxic agents *in vitro***. 2016. 67p. Thesis (PhD in Genetics and Molecular Biology) - Londrina State University, Londrina, 2016.

ABSTRACT

Chlorophyllin (Chl) is a food colorant derived from chlorophyll that has chemoprotective activity. However, its mechanisms of action are not entirely elucidated. The aim of this study was to evaluate the chemoprotective activity of chlorophyllin in cells exposed to the antitumor agents doxorubicin (Dox) and edelfosine (EDLF) and benzo(a)pyrene (BaP), an environmental mutagen. First, the HepG2 / C3A cells (metabolizing line of human hepatoma) were exposed to Chl (25, 50, 100 and 200 μ M) alone and associated to Dox (3 or 0.1 μ M) or BaP (20 μ M). The cell cycle analysis showed that Chl (200 μ M) was able to restore the normal cell cycle distribution and inhibit the cell death induced by Dox (0.1 μ M) and BaP (20 μ M). The Dox and BaP caused down-regulation of mRNA levels of genes involved in cell cycle progression (CCNA2, CCNB1, CCND1, and CCNE1, CDK1 and CDK2) and apoptosis (BAX, CASP7, and TP53), but the association with chlorophyllin not caused change in this response. In the second chapter, HeLa (lineage not metabolizing human cervical cancer) received treatments with Chl (100 and 200 μ M) alone and combined with Dox (0,1 μ M) EDLF (10 μ M) and BaP (20 μ M) for 24, 48 and 72 h. Chl showed no cytotoxicity and treatments associated with the three agents (Dox, EDLF and BaP) was able to mitigate the cytostatic effect and reduce the population of apoptotic cells (Sub G1). However, the Chl was not effective in inhibiting the expression of autophagy marker LC3-II and apoptosis marker, cleaved PARP, induced by cytotoxic agents. Therefore, in both cases, the Chl attenuated cytotoxic and cytostatic effects of Dox agents, EDLF and BaP, which suggests its chemoprotective activity by the toxicity induced by different compounds.

Keywords: Chemoprotective. Cell cycle. Apoptosis. Cytotoxic.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Revisão bibliográfica

Figura 1 -	Estrutura da clorofilina	3
Figura 2 -	Quimioprotetores podem bloquear ou suprimir o processo de carcinogênese. A carcinogênese é iniciada com a transformação da célula normal (célula iniciada). Estas células sofrem promoção e formam um tumor de células pré-neoplásicas, que em seguida, evoluem para células neoplásicas. Alguns fitoquímicos podem interferir em diferentes passos deste processo.	7
Figura 3 -	Estrutura do benzo(a)pireno	10
Figura 4 -	Estrutura da doxorubicina	11
Figura 5 -	Estrutura química da edelfosina.....	12
Figura 6 -	Controle do ciclo celular em células de mamífero. A ativação de complexos específicos de ciclina/CDK conduz a progressão através do ciclo celular.....	13
Figura 7 -	Principais vias moleculares da apoptose. Na via extrínseca por ligação a receptores específicos o complexo DISC é formado e a caspase 8 é activada. Na via intrínseca de liberação do citocromo c das mitocôndrias resulta na formação do apoptossomo e na ativação da caspase 9. As caspase 8 e 9 ativam a caspase 3, resultando na apoptose.....	16

Capítulo I

Tabela 1 -	Lista de primers utilizadas na RT-qPCR.....	32
Figura 1 -	Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio da resazurina. A) Células tratadas com Dox 3 µM, BaP 20 µM, Chl 25, 50, 100, 200 e 300 µM. B) Células tratadas com Dox 3 µM associada à Chl 25, 50, 100, 200 e 300 µM. C) Células tratada com BaP 20 µM associado à Chl 25, 50, 100, 200 e 300 µM. Os dados são apresentados como as médias ± desvio padrão de três experimentos independentes, com *p<0,05 por ANOVA seguida de Dunnet em A) comparado ao controle, B) comparado a Dox e C) comparado ao BaP.....	34

- Figura 2 - Curvas de índice celular da linhagem HepG2/C3A obtidas pelo sistema xCELLigence-RTCA mostrando a cinética de crescimento celular após exposição aos tratamentos: A) Controle, Chl 25, 50, 100, 200 e 300 μM , BaP 20 μM e Dox 3 μM . B) Controle, Chl 25, 50, 100, 200 e 300 μM associadas ao BaP 20 μM . C) Controle, Chl 25, 50, 100, 200 e 300 μM associadas a Dox 3 μM . O Índice celular (CI) foi mensurado a cada 30 min e os dados são apresentados como média de três replicatas. 35
- Figura 3 - Análise da distribuição do ciclo celular por citometria de fluxo (PI). A) Efeitos dos tratamentos com Chl 100 μM e 200 μM , Dox 0,1 μM e BaP 20 μM na distribuição do ciclo celular (G1, S, G2 e Sub G1) após 24 horas de tratamento. Os dados são apresentados como a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. * $p < 0.05$, comparado ao grupo controle por ANOVA seguida de Dunnett. B) Controle, C) Tratamento com Chl 100 μM e D) Tratamento com Chl 200 μM . A porcentagem da população de células em cada fase do ciclo celular foi obtida pelo software Accuri C6..... 36
- Figura 4 - Análise da distribuição do ciclo celular por citometria de fluxo (PI). A) Efeitos dos tratamentos apenas com Dox 0,1 μM ; Chl 100 μM associada à Dox 0,1 μM e Chl 200 μM associada à Dox 0,1 μM na distribuição do ciclo celular (G1, S, G2 e Sub G1) após 24 horas de tratamento. Os dados são apresentados como a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. * $p < 0.05$ comparado ao grupo controle e # $p < 0.05$ comparado a Dox por ANOVA seguida de Dunnett. Histogramas obtidos pelo software Accuri C6: B) Tratamento com Dox 0,1 μM ; C) Tratamento com Chl 100 μM associada à Dox 0,1 μM e D) Tratamento com Chl 200 μM associada à Dox 0,1 μM 37
- Figura 5 - Análise da distribuição do ciclo celular por citometria de fluxo (PI). A) Efeitos dos tratamentos apenas com BaP 20 μM ; Chl 100 μM associada ao BaP 20 μM e Chl 200 μM associada a o BaP 20 μM na distribuição do ciclo celular (G1, S, G2 e Sub G1) após 24 horas de tratamento. Os dados são apresentados como a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. * $p < 0.05$,

comparado ao grupo controle e #p<0.05, comparado ao BaP por ANOVA seguida de Dunnett. Histogramas obtidos pelo software Accuri C6: B) Tratamento com BaP 20 µM, C) Tratamento com Chl 100 µM associada ao BaP 20 µM e D) Tratamento com Chl 200 µM associada ao BaP 20 µM. A porcentagem da população de células em cada fase do ciclo celular foi obtida pelo software Accuri C6..... 38

- Figura 6 - Análise de morte celular das células HepG2/C3A por citometria de fluxo. A) População de células viáveis, em apoptose inicial e apoptose tardia/necrose (UR/UL) após 24 h de tratamento com Chl 100 e Chl 200 µM; Dox 0,1 µM e Chl 100 µM e 200 µM associada à Dox 0,1 µM. As médias de três experimentos independentes foram comparadas por ANOVA seguida de Dunnett, *p<0.05 médias com diferenças significativas em relação ao grupo controle e #p<0.05 em relação a Dox. B) Quantificação de células viáveis (AV-/7-AAD-), em apoptose inicial (AV+/7-AAD-) e em apoptose tardia/necrose (AV+/7-AAD+ e AV-/7-AAD+) após 24 horas de tratamento com Chl 100 µM; Chl 200 µM; Dox 0,1 µM; Chl 100 µM associada à Dox 0,1 µM e Chl 200 µM associada à Dox 0,1 µM..... 39
- Figura 7 - Aspecto morfológico da população de células HepG2/C3A e análise dos núcleos por coloração com hoechst 33342. A) Porcentagem de células apoptóticas no controle e nos tratamentos com Chl 100 µM e 200 µM. B) Controle, C) Tratamento com Chl 100 µM e D) Tratamento com Chl 200 µM..... 40
- Figura 8 - Morfologia e análise de apoptose por coloração com Hoechst - Chl+Dox 41
- Figura 9 - Aspecto morfológico e análise de apoptose por coloração com Hoechst - Chl+BaP..... 42
- Figura 10 - Expressão relativa dos genes CCNA2, CCNB1, CCND1, CCNE1, CDK1, CDK2, BAX, CASP7 e TP53 após 24 h de tratamento. A) Chl 200 µM, Dox 3 µM e BaP 20 µM comparados ao controle negativo. B) Chl 200 µM + Dox 3 µM comparado a Dox 3 µM. C) Chl 200µM + BaP 20 µM comparados ao BaP. Os dados são apresentados como a

média da expressão relativa de três experimentos independentes. A razão e a análise estatística foram calculadas pelo software REST 2009, (*) significativo com $p \leq 0,05$43

Capítulo II

- Figura 1 - Análise da distribuição do ciclo celular por citometria de fluxo (G1, S, G2 e Sub G1). Efeitos dos tratamentos com Chl 100 μM e 200 μM , Dox 0,1 μM , EDLF 10 μM e BaP 20 μM nos seguintes tempos: A) após 24 h; B) após 48 h e C) após 72 h. Os dados são apresentados como a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, comparado ao grupo controle por ANOVA seguida de Dunnett. 56
- Figura 2 - Análise da distribuição do ciclo celular por citometria de fluxo (G1, S, G2 e Sub G1). Efeitos dos tratamentos com Dox 0,1 μM ; Chl 100 μM +Dox 0,1 μM e Chl 200 μM +Dox 0,1 μM nos seguintes tempos: A) após 24 h; B) após 48 h e C) após 72 h. Os dados são apresentados como a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes com * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, comparado a Dox por ANOVA seguida de Dunnett..... 57
- Figura 3 - Análise da distribuição do ciclo celular por citometria de fluxo (G1, S, G2 e Sub G1). Efeitos dos tratamentos com EDLF 10 μM ; Chl 100 μM + EDLF 10 μM μM e Chl 200 μM + EDLF 10 μM nos seguintes tempos: A) após 24 h; B) após 48 h e C) após 72 h. Os dados são apresentados como a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes com * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, comparado a EDLF por ANOVA seguida de Dunnett. 58
- Figura 4 - Análise da distribuição do ciclo celular por citometria de fluxo (G1, S, G2 e Sub G1). Efeitos dos tratamentos com BaP 20 μM ; Chl 100 μM + BaP 20 μM μM e Chl 200 μM + BaP 20 μM nos seguintes tempos: A) após 24 h; B) após 48 h e C) após 72 h. Os dados são apresentados como a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, comparado ao BaP por ANOVA seguida de Dunnett. 59
- Figura 5 - Análise de Western blot dos marcadores de morte celular por apoptose e autofagia em extrato de células HeLa. Os níveis das

proteínas PARP e LC3 foram detectados por immunoblotting após 24 e 48 horas de exposição aos tratamentos: Chl 200 μ M; Dox 0,1 μ M; BaP 20 μ M, EDLF 10 μ M e associados: Chl 200 μ M+Dox 0,1 μ M; Chl 200 μ M+BaP 20 μ M e Chl 200 μ M +EDLF 10 μ M..... 60

Apêndice

- Tabela 1 - Valores de Índice Celular (IC) obtidos pelo sistema xCELLigence-RTCA. Os dados foram normalizados no tempo de adição dos tratamentos. O IC foi mensurado a cada 30 min e os dados são apresentados como média \pm desvio padrão de três replicatas..... 66
- Tabela 2 - Análise de morte celular das células HepG2/C3A por citometria de fluxo. Porcentagem da população de células viáveis (LL), em apoptose inicial (LR) e apoptose tardia/necrose (UR/UL) após 24 h de tratamento com Chl 100 e Chl 200 μ M; Dox 0,1 μ M e Chl 100 μ M e 200 μ M associada à Dox 0,1 μ M. As médias da porcentagem de três experimentos independentes foram comparadas por ANOVA seguida de Dunnett, *P<0.05 médias com diferenças significativas em relação ao grupo controle e #P<0.05 em relação a Dox..... 66
- Tabela 3 - Expressão relativa normalizada com o gene de referência GAPDH. Os valores de *fold change* representam quantas vezes o gene foi menos expresso em relação ao grupo controle. 67

SUMÁRIO

1	Introdução geral	2
2	Revisão bibliográfica	3
2.1	Clorofilina	3
2.1.2	Propriedades da clorofilina	4
2.3	Agentes quimioprotetores	6
2.4	Agentes causadores do câncer	8
2.5	Benzo(a)pireno	9
2.6	Doxorrubicina	10
2.7	Edelfosina	11
2.8	Proliferação celular e os efeitos da clorofilina	12
2.9	Principais tipos de morte celular	14
2.9.1	Apoptose e os principais genes envolvidos	14
2.10	Cultura de células na experimentação <i>in vitro</i>	16
3	Referências	18
4	Objetivos	24
4.1	Objetivo geral	24
4.2	Objetivos específicos	24
5	Capítulo I	25
6	Capítulo II	51
7	Considerações finais	65
8	Apêndice	66

1 Introdução geral

A relação entre a exposição a certas substâncias químicas e o desenvolvimento de câncer já é bem estabelecida. Podem ser citados alguns exemplos clássicos como a aflatoxina e a indução de câncer de fígado (ANDRES, 2004, JUBERT et al., 2009), o benzeno e a leucemia (MCHALE et al., 2012) e o benzo(a)pireno associado ao câncer de pulmão (PLEASANCE et al., 2010). Diversos agentes carcinogênicos já foram identificados, muitos dos quais foram classificados como sendo genotóxicos, ou seja, eles atuam sobre o DNA induzindo danos. Dentre esses agentes estão fontes ambientais de toxicidade, outros, incluem as radiações UV e ionizantes, drogas terapêuticas e produtos do metabolismo celular normal (ANAND et al., 2008).

Dessa maneira, nosso organismo está exposto a uma grande variedade de agentes causadores de estresse genotóxico. Como resultado, as células lidam com os danos induzidos ao DNA por meio de respostas, sendo que, alterações que afetem esses mecanismos de defesa podem desencadear o processo de carcinogênese (BAUER et al., 2015). Por essa razão, a busca por compostos que possam inibir o efeito de agentes causadores de danos ao DNA é importante para a prevenção de cânceres entre outras doenças.

Neste contexto, a clorofilina (Chl) é um importante alvo de pesquisa como composto com potencial protetor. Estudos mostraram que ela possui atividades biológicas benéficas, das quais podem ser citadas: seu efeito antioxidante (KAMAT et al., 2000), anticarcinogênico (THIYAGARAJAN et al., 2012) e quimioprotetor (PIETRZAK et al., 2008). No entanto, os mecanismos pelas quais a Chl atua como protetora ainda não estão totalmente elucidados. Dessa maneira, estudos sobre a progressão do ciclo celular e morte celular por meio da citometria de fluxo, entre outros ensaios, aliados a análise de expressão de genes e proteínas, podem contribuir na identificação dos efeitos da Chl contra diferentes agentes citotóxicos.

O presente estudo foi realizado a fim de compreender o efeito protetor da Chl quando combinada a diferentes compostos citotóxicos. Para isso, os experimentos foram realizados com a Chl associada ao mutágeno ambiental benzo(a)pireno (BaP) e ao quimioterápico doxorrubicina (Dox), utilizando a linhagem metabolizadora HepG2/C3A. Em um segundo momento foi analisado o efeito da Chl quando combinada aos agentes: benzo(a)pireno, doxorrubicina e ao composto antitumoral edelfosina (EDLF) na linhagem celular HeLa.

2 Revisão bibliográfica

2.1 Clorofilina

A clorofilina cúprica é um derivado semi-sintético da clorofila, da qual se diferencia principalmente pela substituição do átomo central de Mg^{+} por um átomo de Cu^{+} e por não possuir o grupo fitol (Fig. 1). Devido a tais modificações, a clorofilina é uma molécula bastante estável e hidrossolúvel e por esses motivos é comumente utilizada como corante na indústria de alimentos (TOYODA et al., 2014) e de cosméticos (TOMANKOVA et al., 2011) aos quais confere coloração verde.

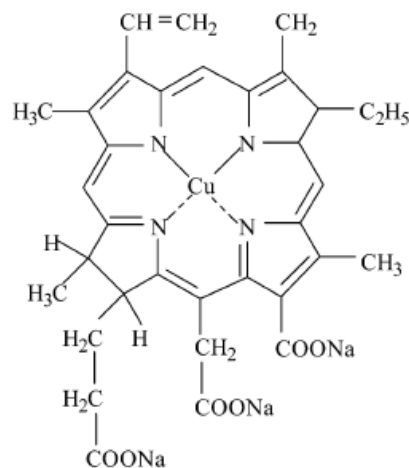


Figura 1. Estrutura química da clorofilina (Pietrzak et al., 2003).

Os corantes são uma classe de aditivos alimentares, naturais ou artificiais, que são adicionados aos alimentos com o objetivo de proporcionar coloração, tornando o produto mais atrativo e aumentando sua aceitação pelos consumidores (MINIOTI et al., 2007). Contudo, a Chl também é comercializada como suplemento alimentar, pois, faz parte da classe de corantes que apresentam propriedades benéficas para a saúde humana, na qual também estão incluídos, entre outros, a curcumina, os carotenóides e as antocianinas (STINTZING et al., 2002, FAHEY et al., 2005, BYUN et al., 2015, JIANG et al., 2015). Em alguns países a Chl também é utilizada no tratamento de pacientes como anti-inflamatório e cicatrizante (WEIR; FARLEY, 2006) e no controle de odores corporais internos em pacientes hospitalizados (YAMAZAKI et al., 2004).

2.1.2 Propriedades da clorofilina

Estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram que a clorofilina possui efeito protetor contra os danos causados por diferentes agentes mutagênicos, tais como, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPAs) (IBRAHIM et al., 2007, JOHN et al., 2010), aflatoxina (MATA et al., 2004), aminas heterocíclicas (HERNAEZ et al., 1997), metais pesados (YANG et al., 2013) e radiação ionizante (KUMAR et al., 1999).

As pesquisas relativas às atividades antioxidante e quimiopreventiva da clorofila e de seus derivados tiveram um grande avanço a partir da década de 80 (GOMES et al., 2003), mas foi durante a década de 90 que a pesquisa sobre a clorofilina progrediu. Esse impulso deve-se principalmente aos resultados obtidos através de experimentos iniciais *in vitro* que demonstraram propriedades antimutagênicas e antígenotóxicas desta molécula e também de estudos de anticarcinogenicidade *in vivo* utilizando trutas (BREINHOLT et al., 1995), camundongos e ratos (GHOSH et al., 1991, GUO et al., 1995)

Estudos posteriores revelaram o sucesso da Chl nos ensaios de quimioprevenção com pessoas expostas a aflatoxina B1 presentes na dieta (EGNER et al., 2003). No estudo de Egner e colaboradores (2001) uma determinada população na China, exposta a aflatoxina em sua dieta e com alto risco de desenvolvimento subsequente de hepatocarcinoma foi submetida a um ensaio clínico. Os indivíduos ingeriram clorofilina (100 mg) durante 4 meses, e foi constatada uma redução de 55% de aflatoxina N7-guanina na urina, sugerindo que a clorofilina poderia ser usada contra os efeitos da aflatoxina B1 (AFB1).

Estudos mostram que este pigmento pode se ligar ao carcinógeno ou mutágeno e deste modo, reduzir a sua biodisponibilidade (PIETRZAK et al., 2003, PIETRZAK et al., 2006, PIETRZAK et al., 2008). Sugere-se a hipótese de que o mecanismo inibidor de formação de adutos proporcionado pela clorofilina se baseia na complexação não covalente dessa molécula com a AFB1, tornando a aflatoxina indisponível para formar aductos com o DNA, o que explicaria, então, a sua atividade (BREINHOLT et al., 1999).

Em estudos utilizando sistemas *in vitro*, a Chl apresentou atividade protetora contra agentes que induzem danos ao DNA. Bez e colaboradores (2001) observaram que a Chl levou a uma grande redução nos efeitos genotóxicos induzidos pelo agente mutagênico metilmetanosulfonato (MMS) em fibroblastos de pulmão de hamster (V79). Negraes et al. (2004) relataram efeito anticlastogênico da Chl contra o indutor de danos etiletanosulfonato (EMS) e uma redução na frequência de aberrações cromossômicas em diferentes fases do ciclo celular após a exposição simultânea à Chl e EMS em células de ovário de hamster (CHO-K1). O potencial protetor da Chl mostra-se além de agentes químicos e físicos, Botelho et al. (2004) demonstraram que esse composto foi capaz de proteger células derivadas de carcinoma laríngeo humano (Hep-2) contra fragmentação nuclear induzida por polivírus.

Dentre outros aspectos positivos, a Chl possui a capacidade de eliminação direta de radicais livres, como foi mostrado por Kumar e colaboradores (2001). Contudo, em estudo posterior o composto apresentou atividade antioxidante, bem como pró-oxidante de maneira dose e tempo dependente (KUMAR et al., 2004).

A Chl pode modular o sistema de detoxificação de xenobióticos por meio da regulação de enzimas que participam desse processo. Singh et al. (1996) demonstraram significativa elevação da atividade da glutathiona-s-transferase depois da administração tópica e por gavagem da Chl em camundongos, enquanto que a atividade do citocromo P450 (CYP450) manteve-se inalterada. No entanto, a inibição inespecífica de várias CYPs P450 pela Chl foi observada em microsomos de fígado (YUN et al., 1995). A Chl 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. Um estudo com a Chl também demonstrou a indução da enzima de fase II NADPH quinona oxidoreductase 1 (NQO1) em células de hepatoma de murinho (FAHEY et al., 2005).

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

As informações na literatura sobre os mecanismos de ação deste corante ainda são controversas e incompletas. Além disso, apesar do amplo uso da Chl como aditivo alimentar e dos estudos que demonstram suas propriedades benéficas, o potencial citotóxico desta molécula foi observado em diferentes linhagens celulares (BOTELHO et al., 2004, TOMANKOVA et al., 2011, VESENICK et al., 2012). Sendo assim, estudos que ajudem a esclarecer seus mecanismos de ação e seus efeitos quando combinada a outros compostos são de grande relevância para garantir a segurança do seu consumo. Logo, estudos a respeito dos mecanismos de indução e inibição de apoptose em diferentes tipos celulares quando expostos à clorofilina têm grande relevância, pois podem auxiliar na investigação do potencial quimioprotetor e na avaliação da segurança para seu consumo.

2.3 Agentes quimioprotetores

A quimioprevenção pode ser definida como a utilização de compostos naturais ou sintéticos com a finalidade de prevenir, retardar ou reverter o processo de carcinogênese (SURH, 2003). As hipóteses sobre os mecanismos de ação dos quimioprotetores têm procedido do conhecimento das suas estruturas químicas e das suas propriedades físico-químicas. Atualmente, o desafio está em interpretar as complexas relações entre os quimioprotetores presentes na alimentação humana e a saúde, tendo em conta, quer a diversidade das suas estruturas químicas, quer a complexidade dos seus efeitos metabólicos (MANACH et al., 2009).

Os quimioprotetores podem agir como agentes bloqueadores, antes ou durante a iniciação da carcinogênese ou como agentes supressores, atuando no decorrer das fases de promoção e de progressão (PRAWAN, 2007) (Fig. 2). Os agentes bloqueadores previnem a ativação metabólica de pré-carcinógenos ou aumentam as atividades enzimáticas na detoxificação para uma eficiente eliminação de carcinógenos ou espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS). Os agentes supressores inibem a promoção e a progressão do câncer após a formação de células pré-neoplásicas, interferindo na regulação do ciclo celular, os sinais de transdução, a regulação da transcrição e a apoptose (MANACH et al., 2009). Alguns agentes quimioprotetores podem atuar, quer como bloqueadores, quer como supressores através de mecanismos distintos (PRAWAN, 2007).

O primeiro agente quimioprotetor aprovado pela FDA (Food and Drug Administration) foi o tamoxifen, por reduzir o risco de câncer de mama. Esse agente mostrou reduzir a incidência de câncer em cerca de 49% nas mulheres com alto risco. No entanto, o uso de tamoxifen aumenta o risco de efeitos colaterais como câncer de útero, coágulos sanguíneos, distúrbios oculares, hipercalcemia e acidente vascular cerebral (WATERS et al., 2012). Estudos têm mostrado que o medicamento para osteoporose raloxifene é efetivo tanto quanto o tamoxifen em prevenir tumores invasivos de mama - receptor de estrógeno positivo, mas possui menos efeitos colaterais (VOGEL, 2009). Outro agente reconhecido é a finasterida, para câncer de próstata, que pode reduzir a incidência para 25% em homens com alto risco, contudo, entre seus efeitos colaterais conhecidos estão a disfunção erétil, a impotência sexual e ginecomastia (THOMPSON et al., 2003). O celecoxib, um inibidor de COX-2 é outro agente aprovado para a prevenção da polipose adenomatosa familiar, no entanto, pode causar danos cardiovasculares (COOPER et al., 2010).

Portanto, apesar dos efeitos benéficos dos quimioprotetores citados, seus efeitos secundários são uma preocupação quando se considerada a administração a longo prazo em pessoas saudáveis que podem ou não desenvolver câncer. Este fator indica a necessidade de agentes que são seguros e eficazes na prevenção do câncer. Assim, a dieta e produtos naturais ou seus derivados são candidatos potenciais para a obtenção desses efeitos benéficos.

Diversos estudos estabeleceram uma relação entre quimioprotetores alimentares e apoptose. A indução da apoptose elimina células geneticamente danificadas de um tecido (JOHNSON, 2007). Em grande parte dos quimioprotetores foram observados efeitos na regulação das vias intrínsecas da apoptose (MEHTA et al., 2010). É o caso da epigallocatequina que demonstrou, aumentar a caspase 9 e a Bax, modular membros da família de proteínas Bcl2, e aumentar o Fas. Do mesmo modo, a quercetina, a genisteína e a apigenina induziram apoptose em células cancerígenas. Em estudos com animais, praticamente todos esses fitoquímicos citados demonstraram retardar o desenvolvimento de tumores (GOPALAKRISHNAN; TONY KONG, 2008). Outras classes de quimioprotetores, incluindo compostos organosulfurados provenientes do alho e isotiocianatos, apresentaram a capacidade de induzir apoptose em linhagens celulares (ALTONSY et al., 2012).

Muitos fitoquímicos quimioprotetores possuem capacidade de induzir a parada do ciclo celular. É o caso dos isotiocianatos, flavonóides, polifenóis, estilbenos, antocianidinas e procianidinas, todos eles causaram a parada de G2/M em linhagens celulares (GOPALAKRISHNAN; TONY KONG, 2008). Outros compostos, por sua vez, previnem a parada de ciclo, a indução de danos e de apoptose causada por agentes citotóxicos, pois atuam como bloqueadores e assim, reduzem os efeitos prejudiciais às células (SMITH et al., 2001). Dessa maneira, é cada vez maior o interesse em compostos presentes na dieta que podem atuar na prevenção de doenças, principalmente o desenvolvimento de câncer (NAIR et al., 2007).

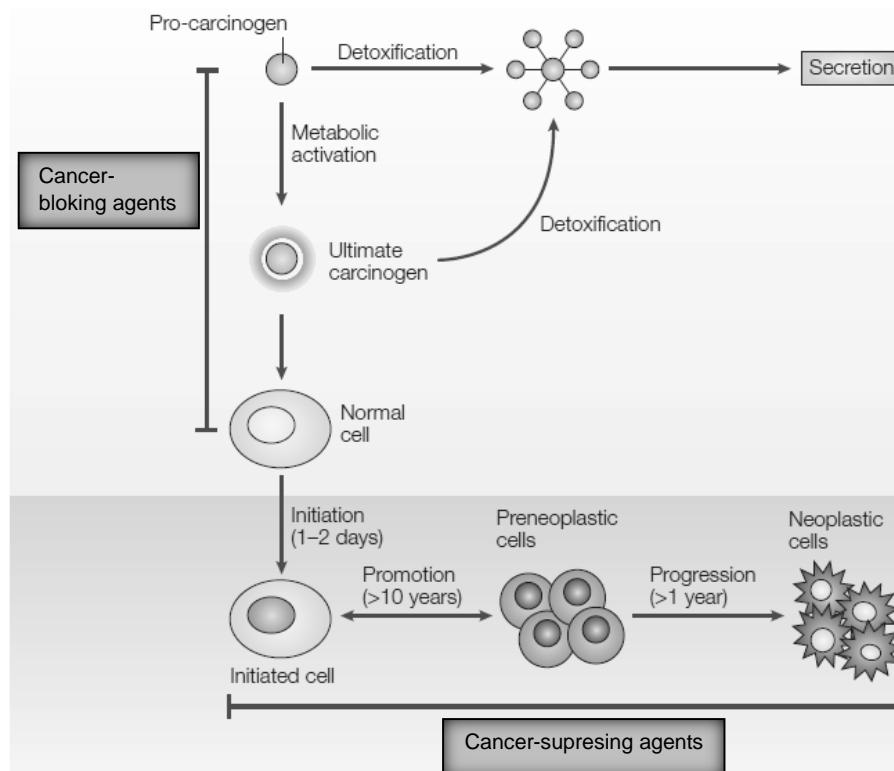


Figura 2. Quimioprotetores podem bloquear ou suprimir o processo de carcinogênese. A carcinogênese é iniciada com a transformação da célula normal (célula iniciada). Estas células sofrem promoção e formam um tumor de células pré-neoplásicas, que em seguida, evoluem para células neoplásicas. Alguns fitoquímicos podem interferir em diferentes passos deste processo. Adaptado de Suhr (2003).

2.4 Agentes causadores do câncer.

O câncer é uma das doenças mais temidas no mundo todo e sua incidência tem aumentado progressivamente tanto em países desenvolvidos como em países em desenvolvimento. É uma das principais doenças não transmissíveis que representam uma ameaça à saúde mundial. Fatores como: economias em crescimento, envelhecimento da população, estilos de vida cada vez mais “ocidentalizados”, populações carentes, contaminação do ambiente e as infecções transmissíveis que podem causar câncer têm contribuído para o rápido aumento da sua incidência (BHANDARI, 2015) . A previsão para novos casos de câncer é de 23,6 milhões a cada ano até 2030 em todo o mundo, se as recentes projeções de incidência dos principais tipos de câncer e o crescimento global da população no futuro forem considerados. Esse número representa 68% mais casos do que no ano de 2012, com uma porcentagem um pouco maior nos países com o Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) médio e baixo (66% mais casos em 2030 do que em 2012) em relação aos países com o IDH mais elevado (56% a mais de casos em 2030 do que em 2012) (BRAY et al., 2012).

O câncer pode ser causado por diferentes fatores internos e externos. Como fatores internos podem ser citados: as mutações herdadas, os hormônios e as condições imunológicas. Já os fatores externos são os responsáveis pela incidência da maioria dos tipos de cânceres, sendo que, grande parte está relacionada ao estilo de vida (ANAND et al., 2008), dentre os quais serão ressaltados: a poluição ambiental, a dieta e o consumo de cigarro.

A exposição a determinados poluentes ambientais pode aumentar consideravelmente o risco de desenvolvimento do câncer, o que inclui: a contaminação do ar por partículas de carbono associadas com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPAs), formaldeído e compostos orgânicos voláteis; a contaminação de alimentos por aditivos e por compostos químicos como nitratos, pesticidas, dioxinas e outros organoclorados; metais e metaloides; e também fármacos e cosméticos (ANAND et al., 2008).

Os HPAs podem aderir a partículas pequenas de carbono na atmosfera e penetrar no organismo através da respiração. A exposição longa a estes compostos, que estão presentes em quantidades significativas nas grandes cidades, está associada ao aumento do risco de morte por câncer de pulmão. Além dos HPAs, outros poluentes ambientais, como o óxido nítrico, aumentam o risco deste tipo de câncer na população. Além disso, a exposição a queima de combustíveis também está associada ao aumento do risco de leucemia em crianças (BELPOMME et al., 2007).

A dieta é outro fator que pode contribuir com a incidência do câncer. O tipo de alimentação está relacionado com grande parte dos casos de câncer colorretal (DIVISI et al., 2006, RYAN-HARSHMAN; ALDOORI, 2007). A contribuição da dieta para o desenvolvimento do câncer ainda não está totalmente compreendida. No entanto, sabe-se que muitos carcinógenos que são ingeridos, como os nitratos, nitrosaminas, pesticidas e dioxinas, provém do alimento, dos aditivos alimentares ou do processo de cozimento (DIVISI et al., 2006). O consumo exagerado de carne

vermelha, por exemplo, é um fator de risco para o desenvolvimento de muitos tipos de cânceres, especialmente para aqueles do trato gastrointestinal, mas também colorretal, próstata, bexiga e mama (CHAO et al., 2005, RODRIGUEZ et al., 2006, GARCIA-CLOSAS et al., 2007, TAPPEL, 2007)

Já o consumo de cigarros aumenta o risco do desenvolvimento de pelo menos 14 tipos de câncer. Além disso, é responsável por cerca de 25 a 30% de todas as mortes por câncer e 87% das mortes por câncer de pulmão. Em comparação com os não fumantes, os homens fumantes (23 vezes) e as mulheres fumantes (17 vezes) são mais propensos a desenvolver câncer de pulmão (ANAND et al., 2008). Além do câncer de pulmão, o tabagismo está ligado com o desenvolvimento dos cânceres de boca, laringe, faringe, esôfago, estômago, bexiga urinária, pâncreas, fígado, colo uterino, cólon e reto. O cigarro também está relacionado com doença coronariana do coração, doença pulmonar obstrutiva crônica dos pulmões, acidente vascular cerebral, complicações na gravidez, aneurisma arterial, trombose vascular, úlcera do aparelho digestivo e impotência sexual no homem. No Brasil, 200 mil pessoas são vítimas do tabaco por ano (Instituto Brasileiro de controle do Câncer, 2015) .

2.5 Benzo(a)pireno

O benzo(a)pireno pertence à classe dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), que são caracterizados por possuírem dois ou mais anéis aromáticos condensados em sua estrutura química (Fig. 3). Estas substâncias possuem uma ampla distribuição e estão presentes em misturas complexas em todos os compartimentos ambientais: água, ar e solo. A composição e a complexidade das misturas de HPAs dependem das fontes emissoras. De maneira geral, essas misturas são bastante complexas e contêm uma grande variedade de HPAs em diferentes níveis de concentração (HARITASH; KAUSHIK, 2009).

Os HPAs, assim como seus derivados, estão associados ao aumento da incidência de diversos tipos de cânceres, pois os vários componentes deste grupo são capazes de reagir com o DNA, diretamente ou após sofrerem transformações metabólicas, tornando-se potenciais carcinógenos e eficientes mutágenos (KASALA et al., 2015).

As principais fontes de HPAs são os processos de combustão incompleta de material orgânico, como a queima de combustíveis fósseis, de carvão, de rejeitos, a fumaça de cigarro além de vários processos industriais como a produção de alumínio e a gaseificação do coque. Dessa maneira, alguns grupos populacionais, como pessoas que residem ou trabalham em ambientes diretamente influenciados por estas fontes, estão submetidos a um risco maior. Além disso, esses compostos químicos são encontrados em alimentos e bebidas (PHILLIPS, 1999).

Dentre os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, o benzo(a)pireno é um dos mais conhecidos e estudados, sendo considerado um potente agente carcinogênico em animais, além

de embriotóxico e teratogênico. A toxicidade do BaP é provocada por sua ação pró-carcinogênica uma vez que alguns dos seus metabólitos intermediários se ligam ao DNA e portanto, são agentes mutagênicos/carcinogênicos (ARCHIBONG et al., 2002, INYANG et al., 2003).

O benzo(a)pireno, assim como os demais HPAs, exercem seu efeito carcinogênico pela via de metabolização de xenobióticos por meio das enzimas de fase I e II. Após ser absorvido, o HPA é biotransformado no fígado pelo complexo enzimático citocromo P450 (CYP450). Nas células hepáticas, as reações catalisadas pelas enzimas citocromo P450-monooxigenase se processam no retículo endoplasmático. Após as reações de biotransformação, os HPAs hidroxilados são eliminados da célula (SHIMADA, 2006).

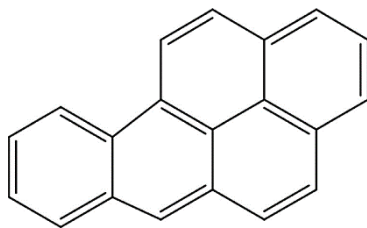


Figura 3. Estrutura do benzo(a)pireno (KASALA et al., 2015)

2.6 Doxorrubicina

A doxorrubicina (Dox) é um quimioterápico citotóxico que pertence ao grupo das antraciclinas (Fig. 4), ela age intercalando-se no DNA e inibindo as topoisomerases I e II, levando a uma série de danos no DNA e conseqüentemente à morte por apoptose (TACAR et al., 2013). A enzima DNA topoisomerase I (TOP1), promove a quebra de uma das fitas de DNA e permite o giro da fita quebrada sobre a fita intacta, de forma a reduzir a tensão torcional da molécula. Algumas substâncias, como as antraciclinas, inibem a religação do DNA depois da quebra mediada pela TOP1. Já a enzima DNA Topoisomerase II (TOP2) induz a quebra das duas fitas do DNA, reduzindo a tensão torcional no DNA e a condensação dos cromossomos. A quebra é momentânea e o reparo do DNA é feito pela mesma TOP2. A função de religação da TOP2 pode ser bloqueada por inibidores dessa enzima e, como consequência, o período em que as duas fitas permanecem quebradas é mais longo e geralmente leva as células a ativarem a via da apoptose (NITISS, 2009).

Sendo assim, os efeitos tóxicos da Dox ocorrem por meio da inibição da transcrição, síntese e replicação do DNA, mas também geram radicais livres, que em excesso apresentam efeitos prejudiciais como a peroxidação dos lipídios de membrana e agressão às proteínas, enzimas, carboidratos e DNA (THORN et al., 2011).

Apesar de sua eficiência no tratamento do câncer, a Dox não possui atividade seletiva contra células tumorais e sua toxicidade é conhecida em tecidos saudáveis (CARVALHO et al.,

2009), enfatizando a toxicidade cardíaca (JONES et al., 2006). Pesquisas sugerem que a apoptose dos miócitos está diretamente relacionada ao estresse oxidativo causado pela Dox (EWER; LIPPMAN, 2005, LAO et al., 2013). Estudos mostram que compostos naturais podem exercer efeitos benéficos na cardiotoxicidade induzida pela Dox, por meio da neutralização de radicais livres (XIN et al., 2011). Dessa maneira, a busca por substâncias citoprotetoras que visem reduzir a toxicidade das drogas sem diminuir seu potencial quimioterápico tem sido alvo de pesquisas.

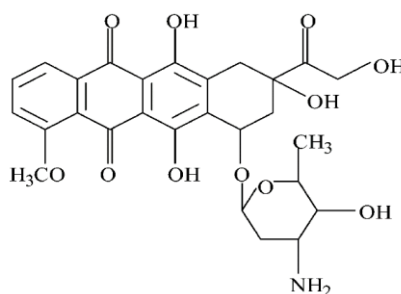


Figura 4. Estrutura química da doxorubicina (PIETRZAK et al., 2003)

2.7 Edelfosina

A edelfosina (1-O-octadecil-2-O-metil-rac-glicerol-3-fosfocolina) (Fig. 5) é um fármaco antitumoral com potencial seletivo que se acumula preferencialmente em células tumorais e promove apoptose em vários tipos de células derivadas de cânceres, sólidos e hematológicos. A edelfosina (EDLF) é membro do grupo dos alquil éter fosfolipídios de primeira geração, conhecidos como lipídios antitumorais (ATLs) ou alquilfosfolipídeos (APs), os quais possuem uma ligação éster na cadeia principal de glicerol do fosfolipídio (GAJATE; MOLLINEDO, 2002).

Os ATLs foram primeiramente utilizados como imunomoduladores e antimetabólitos do metabolismo de fosfolipídeos e demonstraram atividade contra células tumorais e Trypanosomatídeos patogênicos. A partir dos primeiros resultados em que foi observada a capacidade que esses lipídios possuíam de modificar a resposta biológica de células tumorais, se intensificaram os estudos que buscam determinar o mecanismo de ação deste grupo tendo em vista desenvolver um possível agente terapêutico. Assim, foram sintetizados diferentes análogos que demonstraram atividade antitumoral promissora, como a miltefosina, ilmofosina e a edelfosina. Entre os ATLs sintetizados, a edelfosina apresentou maior atividade e logo passou a ser o composto mais efetivo nos ensaios de atividade antitumoral (MOLLINEDO et al., 2004)

Diferente da maioria dos fármacos empregados na terapêutica da atualidade, cujo alvo principal é o DNA (ex. agentes alquilantes e análogos de bases nitrogenadas), os ATLs se caracterizam por atuar a nível da membrana celular. A interação dos ATLs com a membrana se deve às suas características estruturais, que por possuírem uma cadeia apolar hidrocarbonada, se inserem facilmente na bicamada lipídica da membrana plasmática, produzindo uma alteração

complexos são heterodímeros compostos de uma subunidade reguladora, as ciclinas, e uma subunidade catalítica, as quinases (CDKs). A maneira como muitas ciclinas regulam a mitose ainda permanece incerta. Mas, evidências suportam a hipótese de que as ciclinas A e B são as principais ciclinas mitóticas em animais (MORGAN, 2007), com uma terceira classe (B3) sendo importante em algumas espécies (JACOBS et al., 1998).

A ciclina A é um componente necessário para o início da síntese de DNA durante a fase S e para a entrada na mitose. Existem dois subtipos de ciclina A: a ciclina A1, sua expressão está restrita a poucos tecidos, como por exemplo, aos testículos e linhagens leucêmicas; e a ciclina A2, que é expressa em quase todos os tecidos (YANG et al., 1997). Em linhagens celulares de mamíferos, a ciclina A2 é detectada durante a fase S e é degradada durante a prometáfase, ela promove tanto a transição G1/S como a transição G2/M. A proteína Ciclina A2 se desloca dinamicamente entre o núcleo e o citoplasma e sua concentração no estado estacionário favorece o núcleo (JACKMAN et al., 2002).

As CDK1 e CDK2 se associam com as ciclinas A, B e B3. A ciclina tipo A pode se ligar as CDK1 (ou CDC2) e CDK2, já a ciclina tipo B se liga somente a CDK1 e a ciclina B3 associa-se apenas com CDK2. Os níveis das ciclinas variam de maneira cíclica durante o ciclo celular para ativar as CDKs específicas exigidas para a progressão adequada do ciclo celular (HARTWELL; KASTAN, 1994).

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

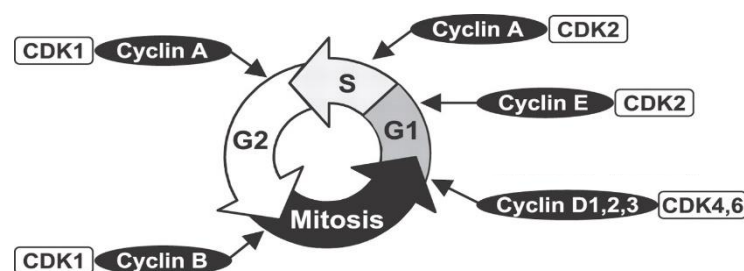


Figura 6. Controle do ciclo celular em células de mamífero. A ativação de complexos específicos de ciclina/CDK conduz a progressão através do ciclo celular. Adaptado de Andrés (2004).

2.9 Principais tipos de morte celular

Existem diferentes tipos de morte celular descritos na literatura, entretanto, há três padrões principais e mais comuns: apoptose, autofagia e necrose. Esses processos de morte podem ser classificados de acordo com suas características morfológicas e bioquímicas (OKADA; MAK, 2004). Alterações na coordenação desses tipos de morte celular estão implicadas na tumorigênese (RICCI; ZONG, 2006).

A morte celular por autofagia é um processo adaptativo conservado evolutivamente e controlado geneticamente. Ela ocorre em resposta a um estresse metabólico que resulta na degradação de componentes celulares (LUM et al., 2005). Durante a autofagia, porções do citoplasma são encapsuladas por membrana, originando estruturas denominadas autofagossomos. Estes irão se fundir com os lisossomos, em seguida, o conteúdo dos autofagossomos é degradado pelas hidrolases lisossomais (KELEKAR, 2005).

Outro tipo de morte celular é a necrose, neste processo as células sofrem um insulto o que resulta no aumento do volume celular, agregação da cromatina, desorganização do citoplasma, perda da integridade da membrana plasmática e conseqüentemente na ruptura celular. Durante a necrose, o conteúdo celular é liberado, causando danos às células vizinhas e uma reação inflamatória no local (ZIEGLER; GROSCURTH, 2004). A morte celular por apoptose será abordada no tópico seguinte.

2.9.1 Apoptose e os principais genes envolvidos

A apoptose pode ser reconhecida por características morfológicas muito marcantes e coordenadas. Essas características incluem o encolhimento e perda de contato com as células vizinhas, formação de vacúolos citoplasmáticos, formação de *blebs* na membrana plasmática e nuclear, condensação da cromatina, fragmentação celular em corpúsculos que são fagocitados pelas células vizinhas e exposição do resíduo de fosfatidilserina na superfície externa da membrana plasmática (PLENCHETTE et al., 2004).

A apoptose é um processo ativo que pode ser desencadeado por diversos estímulos, tanto intra como extracelulares (Fig. 7). Esse processo é controlado por genes específicos que podem participar, dentre outros, de cinco passos sequenciais e distintos, tais como: a “decisão” da célula morrer ou viver; a ativação dos mecanismos de morte celular; a execução do processo de morte celular; a eliminação por fagocitose e a degradação da célula morta. Os genes que atuam no primeiro passo afetam somente células específicas. Por outro lado, genes que atuam nos passos seguintes, afetam todas as células em processo de morte (SHI, 2003).

Praticamente todos os estímulos desencadeiam a apoptose via ação das caspases, um grupo de enzimas proteolíticas sintetizadas como pró-enzimas inativas (RIEDL; SCOTT, 2003). Quando as células recebem um sinal de morte as caspases são ativadas por clivagem

proteolítica. A interação entre essas enzimas com os receptores de membrana ou moléculas adaptadoras acontece pela presença dos domínios de morte (*death domain*) (BOATRIGT; SALVESEN, 2003).

As caspases possuem a capacidade de reconhecer e clivar substratos que possuam resíduos de aspartato, dessa maneira, elas sinalizam para a apoptose e clivam esses substratos, levando à condensação e fragmentação nuclear, externalização de fosfolípidios de membrana que irão sinalizar para estas células serem fagocitadas por macrófagos (BOATRIGT; SALVESEN, 2003), por isso, o nome caspase, que deriva dessa função (*cysteine-aspartic-acid-proteases*). As caspases podem ser divididas funcionalmente em três grupos: as iniciadoras ou desencadeantes (2, 8, 9 e 10), que ativam outras caspases; as efetoras ou executoras (3, 6 e 7), ativadas pelas iniciadoras, essas clivam as proteínas-chave que processam a apoptose e o terceiro grupo possui função inflamatória (4, 5, 11, 12, 13 e 14), pois estão envolvidas na maturação de citoquinas (CHANG; YANG, 2000).

A ativação e o controle da cascata das caspases são essências para os diversos processos celulares envolvidos na homeostasia e diferenciação celular. Consequentemente, o controle da atividade das caspases apresenta grande potencial terapêutico. Em mamíferos, a morte celular programada apresenta duas vias, a via extrínseca ou via do receptor da morte (caspase-8) e a intrínseca ou via mitocondrial (caspase-9) (YIN et al., 2003). Ambas apresentam três fases: iniciação, decisão e degradação (FERRI; KROEMER, 2001).

De maneira simplificada, a via extrínseca é desencadeada pela ativação de caspases associadas à via de sinalização dos receptores de morte. Esses receptores transmitem sinais apoptóticos iniciados por ligantes de morte específicos (SHI, 2003). Quando os receptores de morte celular reconhecem um ligante específico, os seus domínios de morte interagem com moléculas conhecidas como FADD/MORT-1. Essas moléculas têm a capacidade de recrutar a caspase-8 que irá ativar a caspase-3, executando a morte por apoptose (DANIEL et al., 2001).

A via intrínseca é ativada por vários agentes físicos, químicos ou biológicos, que podem convergir para a mitocôndria e disparar a fase de iniciação. Os diferentes sinais indutores de apoptose são detectados pela mitocôndria, fazendo com que ocorra um desacoplamento da cadeia respiratória e consequente liberação de citocromo *c* e proteínas ativadoras da apoptose para o citosol (GUPTA, 2003). Quando no citosol, o citocromo *c* forma um complexo com a APAF-1 e a caspase-9, o chamado apoptossomo, que promove a clivagem da pró-caspase-9, liberando a caspase-9 ativa. Uma vez ativada, a caspase-9 ativa a caspase-3 ocasionando a apoptose (RUPNARAIN et al., 2004). Entre os diversos substratos das caspases pode-se citar a *mdm-2* (*murine double minute*), uma proteína que se liga à p53, mantendo-a no citoplasma. Ao ser clivada pelas caspases, essa proteína libera a p53 que se transloca para o núcleo, ativando a transcrição de genes pró-apoptóticos como o *BAX* (SCHULER et al., 2003).

O *TP53* é um gene supressor de tumor, ele codifica uma fosfoproteína nuclear (p53) que tem papel ativo na parada do ciclo celular e na indução da expressão de genes de reparo de

DNA lesado. Quando há uma lesão no DNA, o nível de p53 na célula aumenta e, após o reparo o nível diminui. Dependendo da intensidade do dano, p53 pode induzir a morte das células geneticamente alteradas via indução do *BAX* (NAKAMURA et al., 2002). Os genes pró-apoptóticos *BAX* e *BAK* fazem parte da família Bcl-2 e parecem ser cruciais para induzir a permeabilização da membrana mitocondrial externa e a subsequente liberação das moléculas apoptogênicas, como o citocromo c e SMAC/DIABLO, a qual leva a ativação das caspases. Os membros da família dos anti-apoptóticos, como *BCL-2* e *BCL-XL*, inibem *BAX* e *BAK* (WILLIS et al., 2007).

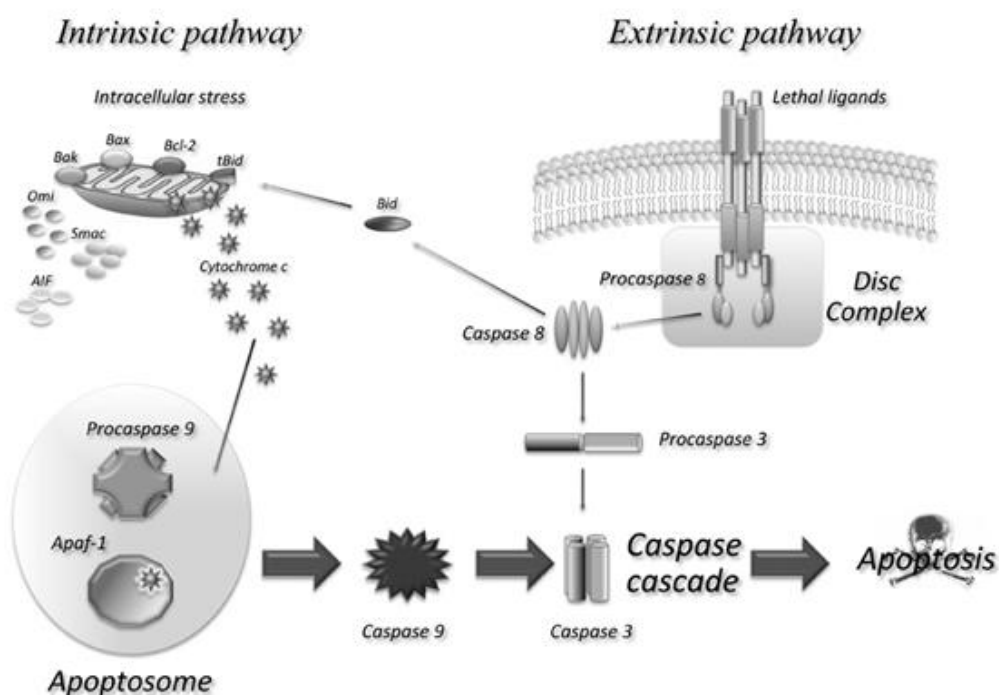


Figura 7. Principais vias moleculares da apoptose. Na via extrínseca por ligação a receptores específicos o complexo DISC é formado e a caspase 8 é ativada. Na via intrínseca de liberação do citocromo c das mitocôndrias resulta na formação do apoptossomo e na ativação da caspase 9. As caspase 8 e 9 ativam a caspase 3, resultando na apoptose (FAVALORO et al., 2012).

2. 10 Cultura de células na experimentação *in vitro*

A cultura de células eucariotas tornou-se um recurso valioso para a pesquisa biomédica. Células mantidas em cultura são modelos biológicos mais simples que os estabelecidos com base em animais de experimentação e tendem a fornecer respostas simplificadas para problemas complexos de investigação biomédica (FRESHNEY, 2006).

Embora o sistema *in vivo* reproduza com mais semelhança as condições humanas, por efeito da metabolização, o sistema *in vitro* é eficaz na detecção de agentes ambientais mutagênicos e antimutagênicos. Algumas linhagens celulares hepáticas, como HTC, HepG2 e culturas primárias de hepatócitos são de grande utilidade em estudos de genotoxicidade e

mutagenicidade, uma vez que o fígado é o principal sítio de metabolização de xenobióticos (MERSCH-SUNDERMANN et al., 2004). Deste modo, tais células, mesmo em condições de cultura e em níveis de expressão variáveis, apresentam ainda enzimas de fase I e fase II do metabolismo de drogas (VALENTIN-SEVERIN et al., 2003).

Os dados produzidos a partir de culturas de células *in vitro* podem ser suficientemente informativos, particularmente para estudos funcionais, bioquímicos e moleculares, como também para análise de alvos farmacológicos e produção de produtos biológicos, incluindo vacinas e anticorpos (FRESHNEY, 2005).

As vantagens da utilização das células de mamíferos em cultura se devem à facilidade de padronização das condições experimentais como: a densidade populacional, pH, temperatura, composição do meio de cultivo, possibilidade de aplicação do tratamento em qualquer fase do ciclo celular, reprodutibilidade, material relativamente uniforme em seus requisitos metabólicos e em seu comportamento e a organização dos cromossomos e do seu DNA é a mesma das células *in vivo* (RABELLO-GAY et al., 1991).

Linhagens celulares estabelecidas a partir de células neoplásicas e não-neoplásicas são também utilizadas em estudos pré-clínicos para o desenvolvimento de novas abordagens diagnósticas e em estudos sobre a biologia de doenças, como o câncer. Em condições laboratoriais apropriadas, células malignas proliferam indefinidamente (BOEHM; HAHN, 2004). Tendo em vista que as alterações genéticas presentes em linhagens de células malignas se assemelham às alterações existentes nos tumores de origem, a utilização de células transformadas encontra vasta aplicação no desenvolvimento de tratamentos contra o câncer (BERZOFKY et al., 2004).

3 Referências

- ALTONSY, M. O.; HABIB, T. N.; ANDREWS, S. C. Diallyl disulfide-induced apoptosis in a breast-cancer cell line (MCF-7) may be caused by inhibition of histone deacetylation. **Nutr Cancer**, v. 64(8), p. 1251-1260, 2012.
- ANAND, P.; KUNNUMAKKARA, A. B.; SUNDARAM, C.; HARIKUMAR, K. B.; THARAKAN, S. T.; LAI, O. S.; SUNG, B.; AGGARWAL, B. B. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. **Pharm Res**, v. 25(9), p. 2097-2116, 2008.
- ANDRES, V. Control of vascular cell proliferation and migration by cyclin-dependent kinase signalling: new perspectives and therapeutic potential. **Cardiovasc Res**, v. 63(1), p. 11-21, 2004.
- ARCHIBONG, A. E.; INYANG, F.; RAMESH, A.; GREENWOOD, M.; NAYYAR, T.; KOPSOMBUT, P.; HOOD, D. B.; NYANDA, A. M. Alteration of pregnancy related hormones and fetal survival in F-344 rats exposed by inhalation to benzo(a)pyrene. **Reprod Toxicol**, v. 16(6), p. 801-808, 2002.
- BAUER, N. C.; CORBETT, A. H.; DOETSCH, P. W. The current state of eukaryotic DNA base damage and repair. **Nucleic Acids Res**, v., p., 2015.
- BELPOMME, D.; IRIGARAY, P.; HARDELL, L.; CLAPP, R.; MONTAGNIER, L.; EPSTEIN, S.; SASCO, A. J. The multitude and diversity of environmental carcinogens. **Environ Res**, v. 105(3), p. 414-429, 2007.
- BERZOFSKY, J. A.; TERABE, M.; OH, S.; BELYAKOV, I. M.; AHLERS, J. D.; JANIK, J. E.; MORRIS, J. C. Progress on new vaccine strategies for the immunotherapy and prevention of cancer. **J Clin Invest**, v. 113(11), p. 1515-1525, 2004.
- BEZ, G. C.; JORDAO, B. Q.; VICENTINI, V. E.; MANTOVANI, M. S. Investigation of genotoxic and antigenotoxic activities of chlorophylls and chlorophyllin in cultured V79 cells. **Mutat Res**, v. 497(1-2), p. 139-145, 2001.
- BHANDARI, P. R. Crocus sativus L. (saffron) for cancer chemoprevention: A mini review. **J Tradit Complement Med**, v. 5(2), p. 81-87, 2015.
- BOATRIGT, K. M.; SALVESEN, G. S. Mechanisms of caspase activation. **Curr Opin Cell Biol**, v. 15(6), p. 725-731, 2003.
- BOEHM, J. S.; HAHN, W. C. Immortalized cells as experimental models to study cancer. **Cytotechnology**, v. 45(1-2), p. 47-59, 2004.
- BOTELHO, M. V.; ORLANDI, J. M.; DE MELO, F. L.; MANTOVANI, M. S.; LINHARES, R. E.; NOZAWA, C. Chlorophyllin protects HEP-2 cells from nuclear fragmentation induced by poliovirus. **Lett Appl Microbiol**, v. 39(2), p. 174-177, 2004.
- BRAY, F.; JEMAL, A.; GREY, N.; FERLAY, J.; FORMAN, D. Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008-2030): a population-based study. **Lancet Oncol**, v. 13(8), p. 790-801, 2012.
- BREINHOLT, V.; ARBOGAST, D.; LOVELAND, P.; PEREIRA, C.; DASHWOOD, R.; HENDRICKS, J.; BAILEY, G. Chlorophyllin chemoprevention in trout initiated by aflatoxin B(1) bath treatment: An evaluation of reduced bioavailability vs. target organ protective mechanisms. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 158(2), p. 141-151, 1999.
- BREINHOLT, V.; HENDRICKS, J.; PEREIRA, C.; ARBOGAST, D.; BAILEY, G. Dietary chlorophyllin is a potent inhibitor of aflatoxin B1 hepatocarcinogenesis in rainbow trout. **Cancer Res**, v. 55(1), p. 57-62, 1995.
- BYUN, S. Y.; KIM, D. B.; KIM, E. Curcumin ameliorates the tumor-enhancing effects of a high-protein diet in an azoxymethane-induced mouse model of colon carcinogenesis. **Nutr Res**, v., p., 2015.
- CÂNCER, I. B. D. C. D. (2015). "Agentes Cancerígenos." Retrieved dez 2015, 2015.
- CARVALHO, C.; SANTOS, R. X.; CARDOSO, S.; CORREIA, S.; OLIVEIRA, P. J.; SANTOS, M. S.; MOREIRA, P. I. Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect. **Curr Med Chem**, v. 16(25), p. 3267-3285, 2009.
- CHANG, H. Y.; YANG, X. Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 64(4), p. 821-846, 2000.

- CHAO, A.; THUN, M. J.; CONNELL, C. J.; MCCULLOUGH, M. L.; JACOBS, E. J.; FLANDERS, W. D.; RODRIGUEZ, C.; SINHA, R.; CALLE, E. E. Meat consumption and risk of colorectal cancer. **JAMA**, v. 293(2), p. 172-182, 2005.
- CHIMPLOY, K.; DIAZ, G. D.; LI, Q.; CARTER, O.; DASHWOOD, W. M.; MATHEWS, C. K.; WILLIAMS, D. E.; BAILEY, G. S.; DASHWOOD, R. H. E2F4 and ribonucleotide reductase mediate S-phase arrest in colon cancer cells treated with chlorophyllin. **Int J Cancer**, v. 125(9), p. 2086-2094, 2009.
- CHIU, L. C.; KONG, C. K.; OOI, V. E. Antiproliferative effect of chlorophyllin derived from a traditional Chinese medicine Bombyx mori excreta on human breast cancer MCF-7 cells. **Int J Oncol**, v. 23(3), 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(4), p. 735-740, 2005.
- COOPER, K.; SQUIRES, H.; CARROLL, C.; PAPAIOANNOU, D.; BOOTH, A.; LOGAN, R. F.; MAGUIRE, C.; HIND, D.; TAPPENDEN, P. Chemoprevention of colorectal cancer: systematic review and economic evaluation. **Health Technol Assess**, v. 14(32), p. 1-206, 2010.
- DANIEL, P. T.; WIEDER, T.; STURM, I.; SCHULZE-OSTHOFF, K. The kiss of death: promises and failures of death receptors and ligands in cancer therapy. **Leukemia**, v. 15(7), p. 1022-1032, 2001.
- 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(6), p. 1254-1261, 2003.
- DIVISI, D.; DI TOMMASO, S.; SALVEMINI, S.; GARRAMONE, M.; CRISCI, R. Diet and cancer. **Acta Biomed**, v. 77(2), p. 118-123, 2006.
- EGNER, P. A.; MUNOZ, A.; KENSLER, T. W. Chemoprevention with chlorophyllin in individuals exposed to dietary aflatoxin. **Mutat Res**, v. 523-524, p. 209-216, 2003.
- EGNER, P. A.; WANG, J. B.; ZHU, Y. R.; ZHANG, B. C.; WU, Y.; ZHANG, Q. N.; QIAN, G. S.; KUANG, S. Y.; GANGE, S. J.; JACOBSON, L. P.; HELZLSOUER, K. J.; BAILEY, G. S.; GROOPMAN, J. D.; KENSLER, T. W. Chlorophyllin intervention reduces aflatoxin-DNA adducts in individuals at high risk for liver cancer. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98(25), p. 14601-14606, 2001.
- EWER, M. S.; LIPPMAN, S. M. Type II chemotherapy-related cardiac dysfunction: time to recognize a new entity. **J Clin Oncol**, v. 23(13), p. 2900-2902, 2005.
- FAHEY, J. W.; STEPHENSON, K. K.; DINKOVA-KOSTOVA, A. T.; EGNER, P. A.; KENSLER, T. W.; TALALAY, P. Chlorophyll, chlorophyllin and related tetrapyrroles are significant inducers of mammalian phase 2 cytoprotective genes. **Carcinogenesis**, v. 26(7), p. 1247-1255, 2005.
- FAVALORO, B.; ALLOCATI, N.; GRAZIANO, V.; DI ILIO, C.; DE LAURENZI, V. Role of apoptosis in disease. **Ageing (Albany NY)**, v. 4(5), p. 330-349, 2012.
- FERRI, K. F.; KROEMER, G. Organelle-specific initiation of cell death pathways. **Nat Cell Biol**, v. 3(11), p. E255-263, 2001.
- FRESHNEY, R. I. (2005). *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. New York Wiley-Liss: 105-113, 175-197, 291-306.
- FRESHNEY, R. I. (2006). *Basic Principles of Cell Culture*, in *Culture of Cells for Tissue Engineering*. G. Vunjak-Novakovi and I. Freshney. New Jersey, John Wiley & Sons: 3-22.
- GAJATE, C.; MOLLINEDO, F. Biological activities, mechanisms of action and biomedical prospect of the antitumor ether phospholipid ET-18-OCH(3) (edelfosine), a proapoptotic agent in tumor cells. **Curr Drug Metab**, v. 3(5), p. 491-525, 2002.
- GARCIA-CLOSAS, R.; GARCIA-CLOSAS, M.; KOGEVINAS, M.; MALATS, N.; SILVERMAN, D.; SERRA, C.; TARDON, A.; CARRATO, A.; CASTANO-VINYALS, G.; DOSEMECI, M.; MOORE, L.; ROTHMAN, N.; SINHA, R. Food, nutrient and heterocyclic amine intake and the risk of bladder cancer. **Eur J Cancer**, v. 43(11), p. 1731-1740, 2007.
- GHOSH, A.; SEN, S.; SHARMA, A.; TALUKDER, G. Inhibition of clastogenic effects of cesium chloride in mice in vivo by chlorophyllin. **Toxicol Lett**, v. 57(1), p. 11-17, 1991.
- GOMES, M. S.; SINNECKER, P.; TANAKA, R. T.; LANFER-MARQUEZ, U. M. Effect of harvesting and drying conditions on chlorophyll levels of soybean (*Glycine max* L. Merr). **J Agric Food Chem**, v. 51(6), p. 1634-1639, 2003.

- GOPALAKRISHNAN, A.; TONY KONG, A. N. Anticarcinogenesis by dietary phytochemicals: cytoprotection by Nrf2 in normal cells and cytotoxicity by modulation of transcription factors NF-kappa B and AP-1 in abnormal cancer cells. **Food Chem Toxicol**, v. 46(4), p. 1257-1270, 2008.
- GUO, D.; SCHUT, H. A.; DAVIS, C. D.; SNYDERWINE, E. G.; BAILEY, G. S.; DASHWOOD, R. H. Protection by chlorophyllin and indole-3-carbinol against 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)-induced DNA adducts and colonic aberrant crypts in the F344 rat. **Carcinogenesis**, v. 16(12), p. 2931-2937, 1995.
- GUPTA, S. Molecular signaling in death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis (Review). **Int J Oncol**, v. 22(1), p. 15-20, 2003.
- HARITASH, A. K.; KAUSHIK, C. P. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. **J Hazard Mater**, v. 169(1-3), p. 1-15, 2009.
- HARTWELL, L. H.; KASTAN, M. B. Cell cycle control and cancer. **Science**, v. 266(5192), p. 1821-1828, 1994.
- HERNAEZ, J.; XU, M.; DASHWOOD, R. Effects of tea and chlorophyllin on the mutagenicity of N-hydroxy-IQ: studies of enzyme inhibition, molecular complex formation, and degradation/scavenging of the active metabolites. **Environ Mol Mutagen**, v. 30(4), p. 468-474, 1997.
- IBRAHIM, M. A.; ELBEHAIRY, A. M.; GHONEIM, M. A.; AMER, H. A. Protective effect of curcumin and chlorophyllin against DNA mutation induced by cyclophosphamide or benzo[a]pyrene. **Z Naturforsch C**, v. 62(3-4), p. 215-222, 2007.
- INYANG, F.; RAMESH, A.; KOPSOMBUT, P.; NIAZ, M. S.; HOOD, D. B.; NYANDA, A. M.; ARCHIBONG, A. E. Disruption of testicular steroidogenesis and epididymal function by inhaled benzo(a)pyrene. **Reprod Toxicol**, v. 17(5), p. 527-537, 2003.
- JACKMAN, M.; KUBOTA, Y.; DEN ELZEN, N.; HAGTING, A.; PINES, J. Cyclin A- and cyclin E-Cdk complexes shuttle between the nucleus and the cytoplasm. **Mol Biol Cell**, v. 13(3), p. 1030-1045, 2002.
- JACOBS, H. W.; KNOBLICH, J. A.; LEHNER, C. F. Drosophila Cyclin B3 is required for female fertility and is dispensable for mitosis like Cyclin B. **Genes Dev**, v. 12(23), p. 3741-3751, 1998.
- JIANG, H.; WANG, Z.; MA, Y.; QU, Y.; LU, X.; LUO, H. Effects of Dietary Lycopene Supplementation on Plasma Lipid Profile, Lipid Peroxidation and Antioxidant Defense System in Feedlot Bamei Lamb. **Asian-Australas J Anim Sci**, v. 28(7), p. 958-965, 2015.
- JOHN, K.; DIVI, R. L.; KESHAVA, C.; OROZCO, C. C.; SCHOCKLEY, M. E.; RICHARDSON, D. L.; POIRIER, M. C.; NATH, J.; WESTON, A. CYP1A1 and CYP1B1 gene expression and DNA adduct formation in normal human mammary epithelial cells exposed to benzo[a]pyrene in the absence or presence of chlorophyllin. **Cancer Lett**, v. 292(2), p. 254-260, 2010.
- JOHNSON, I. T. Phytochemicals and cancer. **Proc Nutr Soc**, v. 66(2), p. 207-215, 2007.
- JONES, R. L.; SWANTON, C.; EWER, M. S. Anthracycline cardiotoxicity. **Expert Opin Drug Saf**, v. 5(6), p. 791-809, 2006.
- JUBERT, C.; MATA, J.; BENCH, G.; DASHWOOD, R.; PEREIRA, C.; TRACEWELL, W.; TURTELTAUB, K.; WILLIAMS, D.; BAILEY, G. Effects of chlorophyll and chlorophyllin on low-dose aflatoxin B(1) pharmacokinetics in human volunteers. **Cancer Prev Res (Phila)**, v. 2(12), p. 1015-1022, 2009.
- KAMAT, J. P.; BOLOOR, K. K.; DEVASAGAYAM, T. P. Chlorophyllin as an effective antioxidant against membrane damage in vitro and ex vivo. **Biochim Biophys Acta**, v. 1487(2-3), p. 113-127, 2000.
- KASALA, E. R.; BODDULURU, L. N.; BARUA, C. C.; SRIRAM, C. S.; GOGOI, R. Benzo(a)pyrene induced lung cancer: Role of dietary phytochemicals in chemoprevention. **Pharmacol Rep**, v. 67(5), p. 996-1009, 2015.
- KELEKAR, A. Autophagy. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1066, p. 259-271, 2005.
- KUMAR, S. S.; CHAUBEY, R. C.; DEVASAGAYAM, T. P.; PRIYADARSINI, K. I.; CHAUHAN, P. S. Inhibition of radiation-induced DNA damage in plasmid pBR322 by chlorophyllin and possible mechanism(s) of action. **Mutat Res**, v. 425(1), p. 71-79, 1999.
- KUMAR, S. S.; DEVASAGAYAM, T. P.; BHUSHAN, B.; VERMA, N. C. Scavenging of reactive oxygen species by chlorophyllin: an ESR study. **Free Radic Res**, v. 35(5), p. 563-574, 2001.
- KUMAR, S. S.; SHANKAR, B.; SAINIS, K. B. Effect of chlorophyllin against oxidative stress in splenic lymphocytes in vitro and in vivo. **Biochim Biophys Acta**, v. 1672(2), p. 100-111, 2004.

- LAO, J.; MADANI, J.; PUERTOLAS, T.; ALVAREZ, M.; HERNANDEZ, A.; PAZO-CID, R.; ARTAL, A.; ANTON TORRES, A. Liposomal Doxorubicin in the treatment of breast cancer patients: a review. **J Drug Deliv**, v. 2013, p. 456409, 2013.
- LUM, J. J.; DEBERARDINIS, R. J.; THOMPSON, C. B. Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 6(6), p. 439-448, 2005.
- MANACH, C.; HUBERT, J.; LLORACH, R.; SCALBERT, A. The complex links between dietary phytochemicals and human health deciphered by metabolomics. **Mol Nutr Food Res**, v. 53(10), p. 1303-1315, 2009.
- MATA, J. E.; YU, Z.; GRAY, J. E.; WILLIAMS, D. E.; RODRIGUEZ-PROTEAU, R. Effects of chlorophyllin on transport of dibenzo(a, l)pyrene, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo-[4,5-b]pyridine, and aflatoxin B(1) across Caco-2 cell monolayers. **Toxicology**, v. 196(1-2), p. 117-125, 2004.
- MCHALE, C. M.; ZHANG, L.; SMITH, M. T. Current understanding of the mechanism of benzene-induced leukemia in humans: implications for risk assessment. **Carcinogenesis**, v. 33(2), p. 240-252, 2012.
- MEHTA, R. G.; MURILLO, G.; NAITHANI, R.; PENG, X. Cancer chemoprevention by natural products: how far have we come? **Pharm Res**, v. 27(6), p. 950-961, 2010.
- MERSCH-SUNDERMANN, V.; KNASMULLER, S.; WU, X. J.; DARROUDI, F.; KASSIE, F. Use of a human-derived liver cell line for the detection of cytoprotective, antigenotoxic and cogenotoxic agents. **Toxicology**, v. 198(1-3), p. 329-340, 2004.
- MINIOTI, K. S.; SAKELLARIOU, C. F.; THOMAIDIS, N. S. Determination of 13 synthetic food colorants in water-soluble foods by reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled with diode-array detector. **Anal Chim Acta**, v. 583(1), p. 103-110, 2007.
- MOLLINEDO, F.; FERNANDEZ, M.; HORNILLOS, V.; DELGADO, J.; AMAT-GUERRI, F.; ACUNA, A. U.; NIETO-MIGUEL, T.; VILLA-PULGARIN, J. A.; GONZALEZ-GARCIA, C.; CENA, V.; GAJATE, C. Involvement of lipid rafts in the localization and dysfunction effect of the antitumor ether phospholipid edelfosine in mitochondria. **Cell Death Dis**, v. 2, p. e158, 2011.
- MOLLINEDO, F.; GAJATE, C.; MARTIN-SANTAMARIA, S.; GAGO, F. ET-18-OCH3 (edelfosine): a selective antitumour lipid targeting apoptosis through intracellular activation of Fas/CD95 death receptor. **Curr Med Chem**, v. 11(24), p. 3163-3184, 2004.
- MORGAN, D. O. Cell Cycle: Principles of Control. **Yale J Biol Med**, v. 80(3), p. 141-142, 2007.
- NAIR, S.; LI, W.; KONG, A. N. Natural dietary anti-cancer chemopreventive compounds: redox-mediated differential signaling mechanisms in cytoprotection of normal cells versus cytotoxicity in tumor cells. **Acta Pharmacol Sin**, v. 28(4), p. 459-472, 2007.
- NAKAMURA, S.; GOMYO, Y.; ROTH, J. A.; MUKHOPADHYAY, T. C-terminus of p53 is required for G(2) arrest. **Oncogene**, v. 21(13), p. 2102-2107, 2002.
- NEGRAES, P. D.; JORDAO, B. Q.; VICENTINI, V. E.; MANTOVANI, M. S. Anticlastogenicity of chlorophyllin in the different cell cycle phases in cultured mammalian cells. **Mutat Res**, v. 557(2), p. 177-182, 2004.
- NITISS, J. L. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. **Nat Rev Cancer**, v. 9(5), p. 338-350, 2009.
- OKADA, H.; MAK, T. W. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. **Nat Rev Cancer**, v. 4(8), p. 592-603, 2004.
- PERES, C. M.; CURI, R. (2005). Como cultivar células, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- PHILLIPS, D. H. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the diet. **Mutat Res**, v. 443(1-2), p. 139-147, 1999.
- PIETRZAK, M.; HALICKA, H. D.; WIECZOREK, Z.; WIECZOREK, J.; DARZYNKIEWICZ, Z. Attenuation of acridine mutagen ICR-191--DNA interactions and DNA damage by the mutagen interceptor chlorophyllin. **Biophys Chem**, v. 135(1-3), p. 69-75, 2008.
- PIETRZAK, M.; WIECZOREK, Z.; STACHELSKA, A.; DARZYNKIEWICZ, Z. Interactions of chlorophyllin with acridine orange, quinacrine mustard and doxorubicin analyzed by light absorption and fluorescence spectroscopy. **Biophys Chem**, v. 104(1), p. 305-313, 2003.
- PIETRZAK, M.; WIECZOREK, Z.; WIECZOREK, J.; DARZYNKIEWICZ, Z. The "interceptor" properties of chlorophyllin measured within the three-component system: intercalator-DNA-chlorophyllin. **Biophys Chem**, v. 123(1), p. 11-19, 2006.

- PLEASANCE, E. D.; STEPHENS, P. J.; O'MEARA, S.; MCBRIDE, D. J.; MEYNERT, A.; et al. A small-cell lung cancer genome with complex signatures of tobacco exposure. **Nature**, v. 463(7278), p. 184-190, 2010.
- PLENCHETTE, S.; CATHELIN, S.; REBE, C.; LAUNAY, S.; LADOIRE, S.; SORDET, O.; PONNELLE, T.; DEBILI, N.; PHAN, T. H.; PADUA, R. A.; DUBREZ-DALOZ, L.; SOLARY, E. Translocation of the inhibitor of apoptosis protein c-IAP1 from the nucleus to the Golgi in hematopoietic cells undergoing differentiation: a nuclear export signal-mediated event. **Blood**, v. 104(7), p. 2035-2043, 2004.
- PRAWAN, A. O. K., TIN; LI, WENGE; TONY KONG, AH-NG. Application of Pharmacogenomics to Dietary Cancer Chemoprevention. **Current Pharmacogenomics**, v. 5(3), p. 190-200, 2007.
- RICCI, M. S.; ZONG, W. X. Chemotherapeutic approaches for targeting cell death pathways. **Oncologist**, v. 11(4), p. 342-357, 2006.
- RIEDL, S. J.; SCOTT, F. L. (2003). Caspases: Activation, Regulation, and Function. Essentials of apoptosis. X. M. YIN and Z. DONG, Humana press: 3-24.
- RODRIGUEZ, C.; MCCULLOUGH, M. L.; MONDUL, A. M.; JACOBS, E. J.; CHAO, A.; PATEL, A. V.; THUN, M. J.; CALLE, E. E. Meat consumption among Black and White men and risk of prostate cancer in the Cancer Prevention Study II Nutrition Cohort. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 15(2), p. 211-216, 2006.
- RUPNARAIN, C.; DLAMINI, Z.; NAICKER, S.; BHOOLA, K. Colon cancer: genomics and apoptotic events. **Biol Chem**, v. 385(6), p. 449-464, 2004.
- RYAN-HARSHMAN, M.; ALDOORI, W. Diet and colorectal cancer: Review of the evidence. **Can Fam Physician**, v. 53(11), p. 1913-1920, 2007.
- SCHIMMER, A. D. Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice. **Cancer Res**, v. 64(20), p. 7183-7190, 2004.
- SCHULER, M.; MAURER, U.; GOLDSTEIN, J. C.; BREITENBUCHER, F.; HOFFARTH, S.; WATERHOUSE, N. J.; GREEN, D. R. p53 triggers apoptosis in oncogene-expressing fibroblasts by the induction of Noxa and mitochondrial Bax translocation. **Cell Death Differ**, v. 10(4), p. 451-460, 2003.
- SHI, Y. (2003). Structural biology of programmed cell death. Essentials of apoptosis. X.-M. Yin and Z. Dong. New Jersey, Humana Press: 95-118.
- SHIMADA, T. Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. **Drug Metab Pharmacokinet**, v. 21(4), p. 257-276, 2006.
- SINGH, A.; SINGH, S. P.; BAMEZAI, R. Postnatal effect of arecoline on chlorophyllin-modulated hepatic biotransformation system enzymes in suckling neonate and lactating mice. **Teratog Carcinog Mutagen**, v. 16(2), p. 89-96, 1996.
- STINTZING, F. C.; STINTZING, A. S.; CARLE, R.; FREI, B.; WROLSTAD, R. E. Color and antioxidant properties of cyanidin-based anthocyanin pigments. **J Agric Food Chem**, v. 50(21), p. 6172-6181, 2002.
- SURH, Y. J. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. **Nat Rev Cancer**, v. 3(10), p. 768-780, 2003.
- TACAR, O.; SRIAMORNSAK, P.; DASS, C. R. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. **J Pharm Pharmacol**, v. 65(2), p. 157-170, 2013.
- TAPPEL, A. Heme of consumed red meat can act as a catalyst of oxidative damage and could initiate colon, breast and prostate cancers, heart disease and other diseases. **Med Hypotheses**, v. 68(3), p. 562-564, 2007.
- TESSEMA, M.; LEHMANN, U.; KREIPE, H. Cell cycle and no end. **Virchows Arch**, v. 444(4), p. 313-323, 2004.
- THIYAGARAJAN, P.; SENTHIL MURUGAN, R.; KAVITHA, K.; ANITHA, P.; PRATHIBA, D.; NAGINI, S. Dietary chlorophyllin inhibits the canonical NF-kappaB signaling pathway and induces intrinsic apoptosis in a hamster model of oral oncogenesis. **Food Chem Toxicol**, v. 50(3-4), p. 867-876, 2012.
- THOMPSON, I. M.; GOODMAN, P. J.; TANGEN, C. M.; LUCIA, M. S.; MILLER, G. J.; FORD, L. G.; LIEBER, M. M.; CESPEDES, R. D.; ATKINS, J. N.; LIPPMAN, S. M.; CARLIN, S. M.; RYAN, A.; SZCZEPANEK, C. M.; CROWLEY, J. J.; COLTMAN, C. A., JR. The influence of finasteride on the development of prostate cancer. **N Engl J Med**, v. 349(3), p. 215-224, 2003.

- THORN, C. F.; OSHIRO, C.; MARSH, S.; HERNANDEZ-BOUSSARD, T.; MCLEOD, H.; KLEIN, T. E.; ALTMAN, R. B. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. **Pharmacogenet Genomics**, v. 21(7), p. 440-446, 2011.
- TOMANKOVA, K.; KEJLOVA, K.; BINDER, S.; DASKOVA, A.; ZAPLETALOVA, J.; BENDOVA, H.; KOLAROVA, H.; JIROVA, D. In vitro cytotoxicity and phototoxicity study of cosmetics colorants. **Toxicol In Vitro**, v. 25(6), p. 1242-1250, 2011.
- TOYODA, T.; CHO, Y. M.; MIZUTA, Y.; AKAGI, J.; NISHIKAWA, A.; OGAWA, K. A 13-week subchronic toxicity study of sodium iron chlorophyllin in F344 rats. **J Toxicol Sci**, v. 39(1), p. 109-119, 2014.
- TUMOLO, T.; LANFER-MARQUEZ, U. M. Copper chlorophyllin: A food colorant with bioactive properties? **Food Research International**, v. 46(2), p. 451-459, 2012.
- VAKIFAHMETOGLU, H.; OLSSON, M.; ZHIVOTOVSKY, B. Death through a tragedy: mitotic catastrophe. **Cell Death Differ**, v. 15(7), p. 1153-1162, 2008.
- VALENTIN-SEVERIN, I.; LE HEGARAT, L.; LHUGUENOT, J. C.; LE BON, A. M.; CHAGNON, M. C. Use of HepG2 cell line for direct or indirect mutagens screening: comparative investigation between comet and micronucleus assays. **Mutat Res**, v. 536(1-2), p. 79-90, 2003.
- VARELA, M. R.; VILLA-PULGARIN, J. A.; YEPES, E.; MULLER, I.; MODOLELL, M.; MUNOZ, D. L.; ROBLEDO, S. M.; MUSKUS, C. E.; LOPEZ-ABAN, J.; MURO, A.; VELEZ, I. D.; MOLLINEDO, F. In vitro and in vivo efficacy of ether lipid edelfosine against Leishmania spp. and SbV-resistant parasites. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6(4), p. e1612, 2012.
- VESENICK, D. C.; DE PAULA, N. A.; NIWA, A. M.; MANTOVANI, M. S. Evaluation of the Effects of Chlorophyllin on Apoptosis Induction, Inhibition of Cellular Proliferation and mRNA Expression of CASP8, CASP9, APC and B-catenin. **Current Research Journal of Biological Sciences** v. 4(3), p. 315-322, 2012.
- VINK, S. R.; VAN DER LUIT, A. H.; KLARENBECK, J. B.; VERHEIJ, M.; VAN BLITTERSWIJK, W. J. Lipid rafts and metabolic energy differentially determine uptake of anti-cancer alkylphospholipids in lymphoma versus carcinoma cells. **Biochem Pharmacol**, v. 74(10), p. 1456-1465, 2007.
- VOGEL, V. G. The NSABP Study of Tamoxifen and Raloxifene (STAR) trial. **Expert Rev Anticancer Ther**, v. 9(1), p. 51-60, 2009.
- WATERS, E. A.; MCNEEL, T. S.; STEVENS, W. M.; FREEDMAN, A. N. Use of tamoxifen and raloxifene for breast cancer chemoprevention in 2010. **Breast Cancer Res Treat**, v. 134(2), p. 875-880, 2012.
- WEIR, D.; FARLEY, K. L. Relative delivery efficiency and convenience of spray and ointment formulations of papain/urea/chlorophyllin enzymatic wound therapies. **J Wound Ostomy Continence Nurs**, v. 33(5), p. 482-490, 2006.
- WILLIS, S. N.; FLETCHER, J. I.; KAUFMANN, T.; VAN DELFT, M. F.; CHEN, L.; CZABOTAR, P. E.; IERINO, H.; LEE, E. F.; FAIRLIE, W. D.; BOUILLET, P.; STRASSER, A.; KLUCK, R. M.; ADAMS, J. M.; HUANG, D. C. Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. **Science**, v. 315(5813), p. 856-859, 2007.
- XIN, Y. F.; WAN, L. L.; PENG, J. L.; GUO, C. Alleviation of the acute doxorubicin-induced cardiotoxicity by Lycium barbarum polysaccharides through the suppression of oxidative stress. **Food Chem Toxicol**, v. 49(1), p. 259-264, 2011.
- YAMAZAKI, H.; FUJIEDA, M.; TOGASHI, M.; SAITO, T.; PRETI, G.; CASHMAN, J. R.; KAMATAKI, T. Effects of the dietary supplements, activated charcoal and copper chlorophyllin, on urinary excretion of trimethylamine in Japanese trimethylaminuria patients. **Life Sci**, v. 74(22), p. 2739-2747, 2004.
- YANG, R.; MOROSETTI, R.; KOEFFLER, H. P. Characterization of a second human cyclin A that is highly expressed in testis and in several leukemic cell lines. **Cancer Res**, v. 57(5), p. 913-920, 1997.
- YANG, U. J.; PARK, T. S.; SHIM, S. M. Protective effect of chlorophyllin and lycopene from water spinach extract on cytotoxicity and oxidative stress induced by heavy metals in human hepatoma cells. **J Toxicol Environ Health A**, v. 76(23), p. 1307-1315, 2013.
- YUN, C. H.; JEONG, H. G.; JHOUN, J. W.; GUENGERICH, F. P. Non-specific inhibition of cytochrome P450 activities by chlorophyllin in human and rat liver microsomes. **Carcinogenesis**, v. 16(6), p. 1437-1440, 1995.
- ZIEGLER, U.; GROSCURTH, P. Morphological features of cell death. **News Physiol Sci**, v. 19, p. 124-128, 2004.

4 Objetivos

4.1 Objetivo geral

Devido a promissora utilidade da clorofilina como agente quimioprotetor, compreende-se a necessidade de verificar o efeito da clorofilina quando combinada a diferentes agentes citotóxicos nas linhagens HepG2/C3A e Hela. Os dados obtidos *in vitro* poderão auxiliar no entendimento dos mecanismos pelos quais a clorofilina atua como protetora.

4.2 Objetivos específicos

- Analisar se a clorofilina é capaz de alterar os efeitos citotóxicos causados pelos compostos bezo(a)pireno, doxorrubicina e edelfosina.
- Avaliar o potencial protetor da clorofilina nos processos de ciclo celular e apoptose quando combinada aos diferentes agentes indutores de danos.
- Avaliar o efeito da clorofilina associada ou não aos agentes na expressão de genes envolvidos nos processos de proliferação e morte celular.
- Compreender o efeito protetor da clorofilina na expressão de proteínas envolvidas na morte celular por apoptose e autofagia.

5 Capítulo I

Atividade protetora da clorofilina contra os agentes citotóxicos doxorrubicina e benzo(a)pireno em células de hepatoma humano HepG2/C3A

Gláucia Fernanda Rocha D'Épiro^{1*}; Simone Cristine Semprebon¹; Andressa Megumi Niwa¹; Lilian Areal Marques¹; Bruna Isabela Biazi¹; Thalita Alves Zanetti¹; Ingrid Felicidade²; Adrivanio Baranoski¹ e Mário Sérgio Mantovani¹

¹Departamento de Biologia, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, Paraná, Brasil

²Departamento de Patologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brasil.

* Autor para correspondência

Departamento de Biologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.

e-mail: glaudepairo@gmail.com

Resumo

A clorofilina (Chl) é um corante de alimentos derivado da clorofila que apresenta atividade quimioprotetora. Os mecanismos pelos quais a Chl atua como protetora não estão totalmente elucidados. O presente estudo investigou o efeito protetor da Chl contra a toxicidade celular induzida pela doxorrubicina (Dox) e benzo(a)pireno (BaP) em células HepG2/C3A. As células foram expostas à Chl (25, 50, 100 e 200 μM) associada ou não à Dox (3 ou 0,1 μM) ou ao BaP (20 μM). A Chl (100 e 200 μM), não apresentou citotoxicidade nem alteração na proliferação celular e nos tratamentos associados, foi capaz de proteger as células contra a citotoxicidade da Dox e do BaP. A análise do ciclo celular mostrou que a Dox levou ao aumento na população de células em G2/M. Já o BaP, aumentou a população de células em Sub G1 e S. A maior concentração de Chl (200 μM) foi capaz de restabelecer a distribuição normal do ciclo celular em ambos os casos. Além disso, a Chl também inibiu a morte celular induzida pela Dox (0,1 μM) e o BaP (20 μM), pois houve redução na porcentagem de células apoptóticas e necróticas. No entanto, a Chl não apresentou efeito contra a redução dos níveis de mRNA causada pela Dox e pelo BaP dos genes envolvidos na progressão do ciclo celular (*CCNA2*, *CCNB1*, *CCND1* e *CCNE1*, *CDK1* e *CDK2*) e apoptose (*BAX*, *CASP7* e *TP53*). Contudo, a presença da Chl no tratamento simultâneo foi capaz de atenuar os efeitos causados pela Dox nas células HepG2/C3A, o que reafirma seu potencial como agente protetor.

Palavras chave: quimioproteção; apoptose; ciclo celular; citotoxicidade.

1 Introdução

O interesse em compostos presentes na dieta que tenham a capacidade de neutralizar os efeitos de agentes tóxicos trazendo benefícios para a saúde humana, incluindo a prevenção de doenças como o câncer, é cada vez maior. A Clorofilina (Chl) tem sido um importante alvo de estudos neste campo, por apresentar importantes atividades biológicas, dentre elas o potencial quimioprotetor (Tumolo et al., 2012). A Chl, de coloração verde escura, é um derivado semi-sintético da clorofila, da qual se diferencia pela substituição do núcleo central de magnésio pelo cobre e por não possuir o grupo fitol. Tais modificações conferem à essa molécula maior estabilidade e solubilidade. A Chl é comumente utilizada como corante em alimentos e como suplemento alimentar (Tumolo et al., 2012). Estudos mostraram que este pigmento pode proteger as células contra os efeitos causados por diversos agentes mutagênicos (Mata et al., 2004; Hernaez et al., 1997; García-Rodríguez et al., 2001; Kumar et al., 1999). Assim, a Chl possui diferentes mecanismos responsáveis por sua atividade protetora. Um deles envolve sua propriedade anti-oxidante, que ocorre principalmente pela captura de espécies reativas de oxigênio (ROS) *in vitro* e *in vivo* (Kamat et al., 2000).

A capacidade para formar complexos com compostos policíclicos aromáticos é outro mecanismo pelo qual a Chl pode neutralizar o efeito de mutágenos (Hayatsu et al., 1999). Os complexos são mantidos por interação de “empilhamento” entre as moléculas aromáticas simples do mutágeno e os anéis de porfirina da Chl. A formação destes complexos em solução aquosa sequestra as moléculas livres do composto mutagênico o que leva a uma redução da sua concentração na forma ativa (monômero) (Dashwood et al., 1996).

Grande parte de todos os cânceres são causados principalmente pela exposição à produtos tóxicos presentes no ambiente (Anand et al., 2008). Dentre eles está o benzo(a)pireno (BaP), um poluente ambiental altamente carcinogênico que pertence à família dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPAs). Esses compostos são formados pela combustão incompleta da matéria orgânica e permanecem no ambiente por um longo período. A exposição ao BaP acontece principalmente por meio da queima de combustíveis fósseis, da fumaça do cigarro e da ingestão de alimentos defumados, carnes de churrasco e óleos superaquecidos (Oliveira et al., 2007). O BaP é ativado metabolicamente no fígado, através do complexo citocromo P450 (Guengerich, 2000). A maioria dos seus metabólitos é eliminada como conjugado de glutatona, via bile, no entanto, uma pequena parte dos metabólitos ativados pode escapar dessas reações de complexação e ligar-se a moléculas celulares como DNA, RNA e proteínas promovendo alterações em suas estruturas (Baird et al., 2005).

Diferente do BaP, a doxorubicina (Dox) é um agente quimioterápico empregado no tratamento de leucemias, linfomas e uma variedade de tumores sólidos (Ashour et al., 2011). No entanto, seu efeito tóxico também atinge células que não são alvo no tratamento, o que pode levar a ocorrência de cardiotoxicidade e hepatotoxicidade nos pacientes, alguns dos principais

fatores que limitam o seu uso (Lao et al., 2013; Kalendera et al., 2005). A Dox possui diferentes mecanismos pelos quais causa a citotoxicidade celular, os principais são: a capacidade de se intercalar com o DNA inibindo a sua replicação, gerar radicais livres induzindo danos no DNA, além de causar danos na membrana e inibição da topoisomerase II (Thorn et al., 2011).

Os efeitos causados pela Dox e o BaP interferem no ciclo celular e podem levar à retenção das células em diferentes fases, assim como induzir a morte celular. No entanto, sabe-se pouco sobre os efeitos da Chl quando associada a esses agentes na progressão do ciclo e indução de morte celular. Assim, estudos que investiguem esses processos podem ajudar a esclarecer os mecanismos de ação protetora da Chl. Neste contexto, o presente estudo buscou avaliar a atividade protetora da Chl contra os efeitos tóxicos causados por dois diferentes compostos, o quimioterápico doxorrubicina e o agente mutagênico ambiental benzo(a)pireno em células HepG2/C3A. Para isso, as células expostas à clorofilina associada aos agentes citotóxicos foram avaliadas quanto a proliferação celular, citotoxicidade, indução de apoptose, ciclo celular e análise de expressão de genes envolvidos nestes processos.

2 Material e Métodos

2.1 Agentes químicos

A clorofilina (Chlorophyllin sodium copper salt, Sigma-Aldrich), foi dissolvida em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium – DMEM (Gibco) e esterilizada por filtração (Millex - Millipore 0,22 μm), o agente quimioterápico doxorrubicina (Dox) (Adriplastina, Pharmacia) e o agente mutagênico ambiental benzopireno (BaP) (Sigma-Aldrich) foram utilizados como indutores de danos. As concentrações dos compostos foram previamente determinados através de ensaios de viabilidade celular.

2.2 Linhagem celular

A linhagem de carcinoma hepatocelular (HepG2/C3A) foi adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro e cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (SBF, Gibco) e contendo 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco). As células foram mantidas em estufa com 5% de CO_2 a 37°C. Nestas condições, o ciclo celular é de aproximadamente 24 horas.

2.3 Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio da resazurina

As células foram semeadas na concentração de 25.000 células/poço em placas de 96 poços e incubadas por 24 h para estabilização. A Chl, a Dox e o BaP foram avaliadas individualmente quanto à atividade citotóxica para determinação do efeito dose-resposta e tempo-resposta. Em seguida, foi estabelecido o protocolo dos tratamentos associados em que a clorofilina foi combinada com os agentes citotóxicos doxorubicina e benzo(a)pireno (Chl+Dox e Chl+BaP). A Chl foi utilizada nas concentrações de 25, 50, 100 e 200 μM associadas à Dox (3 μM) e ao BaP (20 μM). As células foram expostas aos tratamentos por 24 e 48 h. Ao final deste período, o meio de cultura foi removido e as células foram incubadas com a resazurina (7-hydroxy-10-oxido-phenoxazin-10-ium-3-one) 60 μM por 3 h. A fluorescência foi mensurada em leitor de microplacas VICTOR 3 (PerkinElmer) (530-560 nm de excitação e 580-600 nm de emissão). As avaliações foram realizadas em três repetições.

2.4 Análise Celular em Tempo Real (Real-Time Cell Analyzer - RTCA)

A análise da proliferação celular foi realizada em tempo real através do equipamento xCELLigence, Real Time Cell Analyzer (RTCA, Roche), de acordo com as recomendações do fabricante. Este sistema monitora o status biológico celular através de medidas de impedância. Para isso, foi utilizada uma placa de cultivo que possui um sistema de sensores de eletrodos (E-plate), que gera um campo elétrico quando uma voltagem (<20 mV) é aplicada entre os eletrodos. Alterações no *status* biológico celular, como o número de células, viabilidade celular, morfologia e adesão alteram os valores de impedância, os quais são expressos pelo Índice Celular (IC), gerado pelo xCELLigence. As alterações na impedância são proporcionais ao número de células dentro do poço, às mudanças morfológicas e de adesão. Assim, quanto maior o número e tamanho das células, maior a impedância.

Para este ensaio as células foram semeadas em uma E-Plate de 96 poços na quantidade de 25.000 células/poço e incubadas à temperatura ambiente por 30 min no fluxo laminar. Posteriormente, a placa foi colocada na estação do RTCA que permaneceu na estufa CO₂ a 37°C. Após 24 h de estabilização, foram adicionados os tratamentos com Chl (25, 50, 100, 200 e 300 μM) e com Chl associada à Dox (3 μM) ou ao BaP (20 μM). A impedância foi monitorada a cada 30 minutos por 96 horas. O experimento foi delineado de acordo com as indicações do fabricante e realizado em três repetições. O IC foi calculado através do software RTCA.

2.5 Análise de ciclo celular por citometria de fluxo

Foram semeadas 500.000 células/poço em placas de 6 poços e após 24 h de incubação foram tratadas com Chl 100 e 200 μM associada ou não à Dox (0,1 μM) ou ao BaP (20 μM) por 24 h. Neste ensaio a concentração da Dox foi reduzida de 3 para 0,1 μM devido a uma limitação da técnica, pois, a Dox acima de 0,1 emite fluorescência na mesma intensidade que marcador iodeto de propídeo. As concentrações de clorofilina foram selecionadas a partir dos resultados dos ensaios de viabilidade e proliferação celular. As células foram desprendidas do frasco utilizando Accutase (StemPro Accutase Cell Dissociation Reagent, Life technologies), centrifugadas (2.000 rpm por 5 min) e resuspendidas em PBS. As amostras foram tratadas com RNase (Life technologies) (0,1 mg/mL) por 30 min a 37°C, em seguida, receberam a solução hipotônica do fluorocromo (50 mg/mL iodeto de propídeo, 0,1% citrato de sódio, 0,1% Triton X-100). As amostras foram mantidas no gelo e protegidas da luz por 30 min. Após este período, a fluorescência do iodeto de propídeo foi estimada por citometria de fluxo (Accuri C6, BD Pharmingen™). O conteúdo de DNA foi analisado e foram estimadas as porcentagens de células nas diferentes fases do ciclo (Sub G1, G1, S e G2/M). Para cada amostra foram adquiridos 10.000 eventos e foram realizados três experimentos independentes.

2.6 Análise de morte celular

2.6.1 Citometria de fluxo (Annexin V-PE/7-AAD)

A análise de morte celular foi realizada utilizando o Kit Annexin V-PE Apoptosis Detection (BD Pharmingen). As células HepG2/C3A foram semeadas (500.000 células/poço) e após 24 h de incubação foram tratadas com Chl 100 e 200 μM associada ou não à Dox (0,1 μM) e ao BaP (20 μM) por 24 h. As células foram desprendidas, centrifugadas (2.000 rpm por 5 min) e lavadas duas vezes com tampão PBS a 4°C. Em seguida, cada amostra foi resuspendida em tampão de ligação (Annexin V) e marcada com os fluorocromos Annexin V-Phycoerythrin (AV-PE) e 7-aminoactinomycin D (7-AAD) de acordo com o protocolo do fabricante. As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo (Accuri C6, BD Pharmingen™) utilizando o software BD Accuri C6. Para cada amostra foram adquiridos 10.000 eventos e foram realizados três experimentos independentes.

2.6.2 Coloração com Hoechst 33342

As células foram semeadas em placa de 6 poços na densidade de 500.000 células/poço. Após 24 h de incubação, foram tratadas com Chl 100 e 200 μM associada ou não à Dox (3 μM) ou ao BaP (20 μM) por 24 h. As amostras foram expostas ao fluorocromo Hoechst 33342 (5

µg/mL) durante 20 min no escuro, e em seguida os núcleos foram visualizados em microscópio de fluorescência em aumento de 460 X (filtro azul, 390/40 nm excitação e 446/33 nm de emissão - FLoid® Cell Imaging Station, Life technologies). Foram consideradas viáveis as células com núcleos ovais e baixa fluorescência, enquanto as células apoptóticas são caracterizadas pela condensação do núcleo e presença de corpos apoptóticos com alta fluorescência. Foram realizados três experimentos independentes e analisadas 500 células por amostra. A porcentagem de células apoptóticas foi calculada da seguinte maneira: taxa de apoptose = células apoptóticas / (células apoptóticas + células vivas) x 100.

2.7 Análise da expressão gênica por RT-qPCR

As células foram semeadas em placa de 6 poços na densidade de 500.000 células/poço. Após 24 h de incubação, foram tratadas com Chl (200 µM) associada ou não à Dox (0,1 µM) ou ao BaP (20 µM) por 24 h. O RNA total foi isolado através do mini kit RNeasy (Qiagen), de acordo com recomendações do fabricante. A integridade do RNA foi confirmada através de eletroforese em gel de agarose (1%), a concentração e a pureza (A260/A280) foram verificadas utilizando o aparelho Nanodrop® 2000 (ThermoScientific).

Em seguida, o cDNA foi sintetizado a partir de 500 ng de RNA total, utilizando dNTPs (Invitrogen, Life Technologies), Oligo-dT (Invitrogen, Life Technologies) e enzima transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen, Life Technologies). As reações de PCR em tempo real foram realizadas através do sistema de detecção em tempo real CFX96 TOUCH™ (Biorad). A amplificação dos fragmentos foi detectada pela fluorescência emitida pelo fluoróforo SYBR® Green Supermix (Bio-Rad). As reações de qPCR foram realizadas nas seguintes condições: 50 °C por 2 minutos, 95 °C por 5 minutos e 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 15 segundos, 72 °C por 20 segundos. Os dados foram normalizados utilizando o gene de referência gliceraldeído-3-fosfatodesidrogenase (GAPDH). Foram verificados os níveis de mRNA das Ciclinas A2, B1, D1 e E1 (*CCNA2*, *CCNB1*, *CCND1* e *CCNE1*), das quinases dependentes de ciclina (*CDK1* e *CDK2*), dos genes envolvidos no processo de apoptose BCL2-associated X protein (*BAX*), caspase 7 (*CASP7*) e do gene supressor tumoral - tumor protein p53 (*TP53*). Foram realizados três experimentos independentes. As sequências dos *primers* podem ser observadas na tabela 1.

Tabela 1. Sequência de primers utilizadas na RT-qPCR

Genes	Primer	Referencia
CCNA2	F: GAC CCT GCA TTT GGC TGT G	Hsieh, 2006
	R: ACA AAC TCT GCT ACT TCT GG	
CCNB1	F: AGA GCA TCT AAG ATT GGA GAG	Sigma*
	R: CCA TGT CAT AGT CCA ACA TAG	
CCND1	F: GCC TCT AAG ATG AAG GAG AC	Sigma*
	R: CCA TTT GCA GCA GCT C	
CCNE1	F: GAC TTA CAT GAA GTG CTA CTG	Sigma*
	R: GAC GAG AAA TGA TAC AAG GC	
CDK1	F: ATG AGG TAG TAA CAC TCT GG	Sigma*
	R: CCT ATA CTC CAA ATG TCA ACT G	
CDK2	F: GAG ACC TTA AAC CTC AGA ATC	Sigma*
	R: TGG AAT AAT ATT TGC AGC CC	
BAX	F: TTT CTG ACG GCA ACT TCA ACT GGG	Sigma*
	R: TGT CCA GCC CAT GAT GGT TCT GAT	
CASP7	F: TCA CCA TGC GAT CCA TCA AGA CCA	Sigma*
	R: TTT GTC TGT TCC GTT TCG AAC GCC	
TP53	F: TAC CAC CAT CCA CTA CAA CT	Sigma*
	R: GAC AGG CAC AAA CAC GCA C	
GAPDH	F: GAA GGT GAA GGT CGG AGT C	Sugaya, 2005
	R: GGA AGA TGG TGA TGG GAT TT	

Tabela 1. Lista de primers analisados por RT-qPCR em tempo real. *Primers obtidos da Sigma-Aldrich (KiCqStart® SYBR® Green Primers - Predesigned primers for gene expression analysis - <http://www.sigmaaldrich.com/catalog>).

2. 8 Análise estatística

Os resultados foram analisados utilizando-se Análise de Variância (ANOVA) seguido de Dunnet através do software GraphPad Prism1 version 5.00 (GraphPad Software, San Diego, California, USA). Os dados de RT-qPCR foram normalizados e analisados de acordo com Pfaffl et al. (2002) utilizando o software REST 2009.

3 Resultados

3.1 Atividade protetora da clorofilina contra a citotoxicidade induzida pela Dox e BaP

Os ensaios de viabilidade celular (resazurina) e cinética do crescimento celular (RTCA) mostraram que a Chl apresentou citotoxicidade apenas na maior concentração (300 μM). As concentrações de 25, 50, 100 e 200 μM de Chl obtiveram valores próximos ao do grupo controle. Os agentes citotóxicos Dox (3 μM) e BaP (20 μM) reduziram tanto a viabilidade como a proliferação das células HepG2/C3A de modo tempo dependente (Figura 1 A).

Utilizando o ensaio da resazurina foi possível observar que a exposição das células à Dox (3 μM) após 24 e 48 h causou uma redução significativa na viabilidade celular (Fig. 1 A). Contudo, a Chl foi capaz de reduzir este efeito citotóxico (Fig. 1 B). Nos tratamentos associados com a Dox (3 μM) todas as concentrações de Chl (25, 50, 100, 200 e 300 μM) aumentaram a viabilidade das células após 24 h de exposição em relação ao tratamento somente com a Dox. No entanto, após 48 h de incubação apenas as concentrações de 100, 200 e 300 μM de Chl, atenuaram o efeito da Dox.

O BaP (20 μM) apresentou maior efeito citotóxico após 48 h de tratamento, sendo assim, o efeito protetor da Chl pôde ser melhor observado neste período de exposição. Nos tratamentos associados, todas as concentrações da Chl foram efetivas em proteger as células contra a redução da viabilidade celular causada pelo BaP (Fig. 1 C).

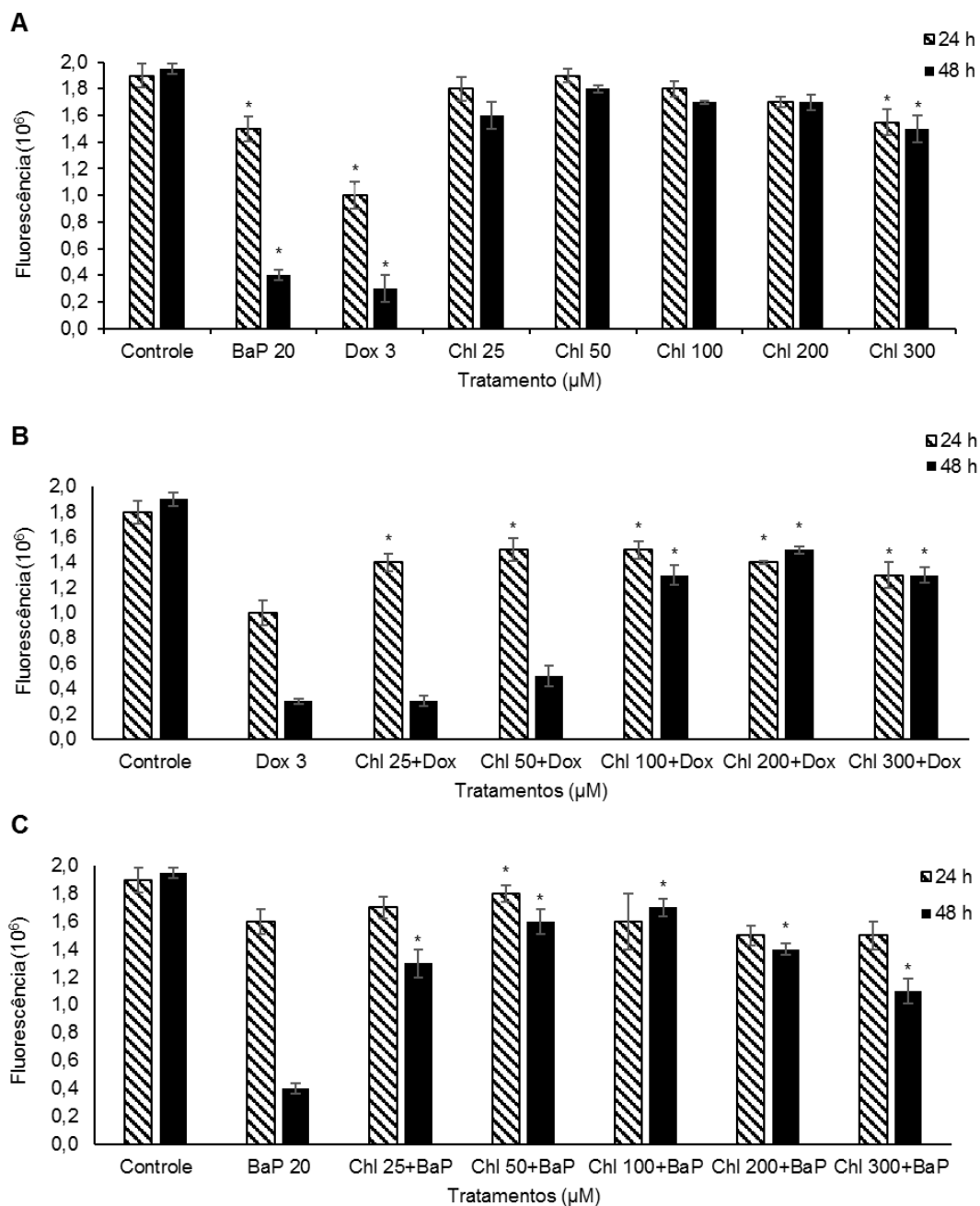


Figura 1. Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio da resazurina. A) Células tratadas com Dox 3 μM , BaP 20 μM , Chl 25, 50, 100, 200 e 300 μM . B) Células tratadas com Dox 3 μM associada à Chl 25, 50, 100, 200 e 300 μM . C) Células tratada com BaP 20 μM associada à Chl 25, 50, 100, 200 e 300 μM . Os dados são apresentados como as médias \pm desvio padrão de três experimentos independentes, com $*p < 0,05$ por ANOVA seguida de Dunnet em A) comparado ao controle, B) comparado a Dox e C) comparado ao BaP.

A avaliação da cinética de proliferação celular (RTCA), mostrou que as curvas de crescimento referentes aos tratamentos com Chl nas concentrações de 25, 50, 100 e 200 μM ficaram próximas do controle. Apenas a concentração de 300 μM apresentou um declínio em sua curva. Quanto aos agentes citotóxicos, tanto a Dox (3 μM) quanto o BaP (20 μM) causaram uma grande redução no Índice Celular (IC) (Figura 2 A). A Chl foi capaz de atenuar o efeito de ambos os agentes citotóxicos, pois aumentou o índice celular nos tratamentos associados (Figura 2 B e

C). As concentrações de Chl acima de 50 μM foram mais efetivas em proteger as células quando combinadas à Dox, o efeito protetor foi observado a partir de 24 h e se manteve até o final do experimento (92 h).

O agente citotóxico BaP reduziu o IC após aproximadamente 40 horas de exposição, apresentando uma resposta celular tardia na linhagem HepG2\C3A. Dessa maneira, o efeito protetor da Chl em relação ao BaP foi mais evidente após 72 h de exposição. As curvas que melhor demonstraram a atividade protetora da Chl são aquelas em que o BaP foi associado a Chl 50, 100 e 200 μM . Sendo assim, as concentrações de 100 e 200 μM de Chl, foram escolhidas para serem utilizadas nos demais ensaios.

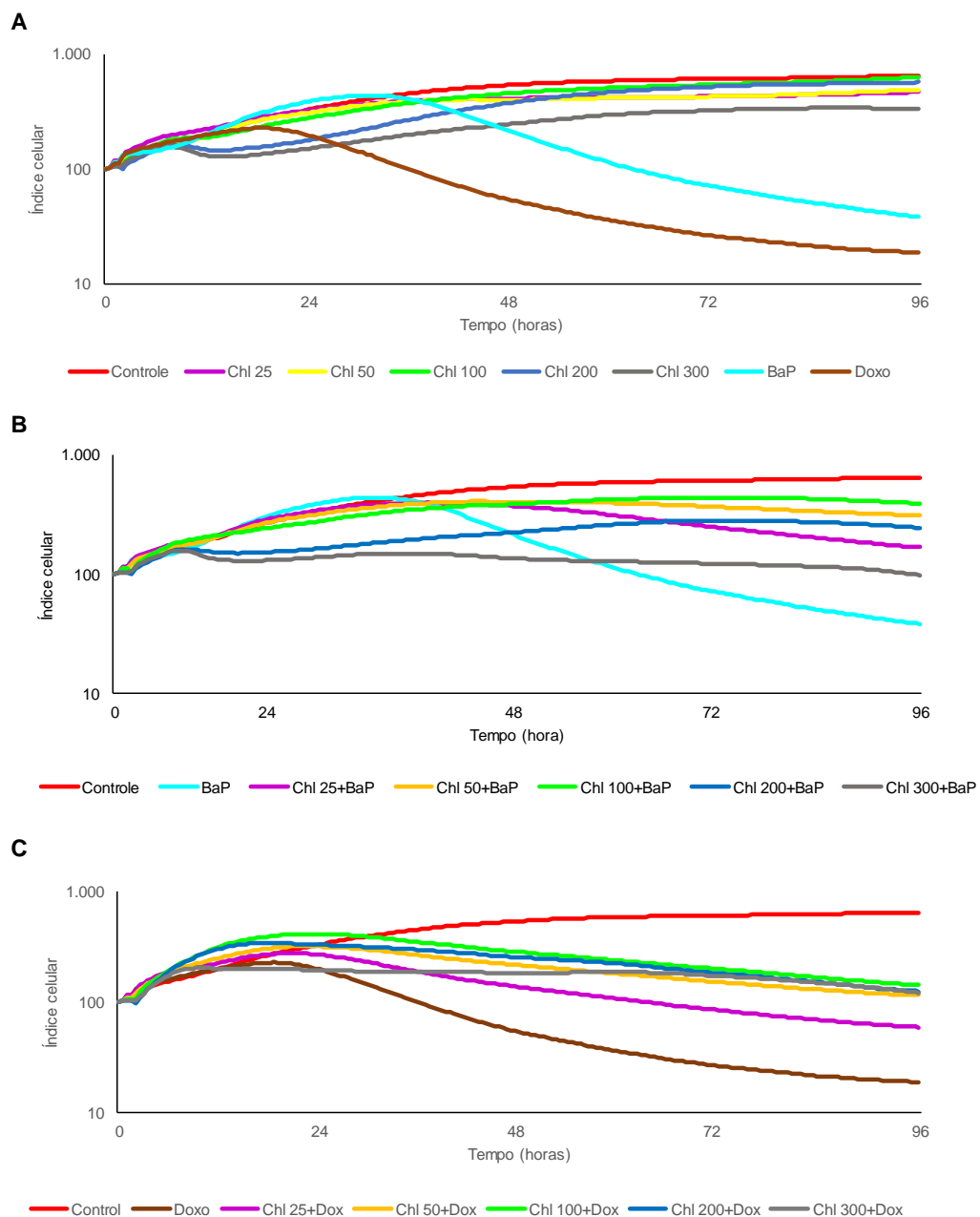


Figura 2. Curvas de índice celular da linhagem HepG2/C3A obtidas pelo sistema xCELLigence-RTCA mostrando a cinética de crescimento celular após exposição aos tratamentos: A) Controle, Chl 25, 50, 100, 200 e 300 μM , BaP 20 μM e Dox 3 μM . B) Controle, Chl 25, 50, 100, 200 e 300 μM associadas ao BaP 20 μM . C) Controle, Chl 25, 50, 100, 200 e 300 μM associadas a Dox 3 μM . O Índice celular (CI) foi mensurado a cada 30 min e os dados são apresentados como média de três replicatas.

3.2 Efeito protetor da clorofilina contra as alterações no ciclo celular produzidas pela Dox e BaP

A fim de investigar os mecanismos pelos quais a Chl reduz a toxicidade da Dox e do BaP foi realizada a análise da distribuição das células HepG2/C3A nas fases G1, S, G2 e Sub G1 do ciclo celular por citometria de fluxo.

O tratamento com a Chl na concentração de 200 μM reduziu a população de células na fase S para 8%. O tratamento com a Dox causou a parada do ciclo celular na fase G2/M, pois houve grande redução das células nas fases G1 (20%) e S (4%) e aumento na fase G2/M (69%), também houve um pequeno aumento, porém não estatisticamente significativo, de células na fase Sub G1 (3%) que representa a população de células apoptóticas (Fig. 3 A; 4 A e B). Já a exposição ao agente mutagênico BaP causou um acúmulo de células em Sub G1 (21%), o que indica o potencial apoptótico deste composto, além disso, elevou o número de células na fase S (21%) e reduziu na fase G1 (32%) (Fig. 3 A; 5 A e B).

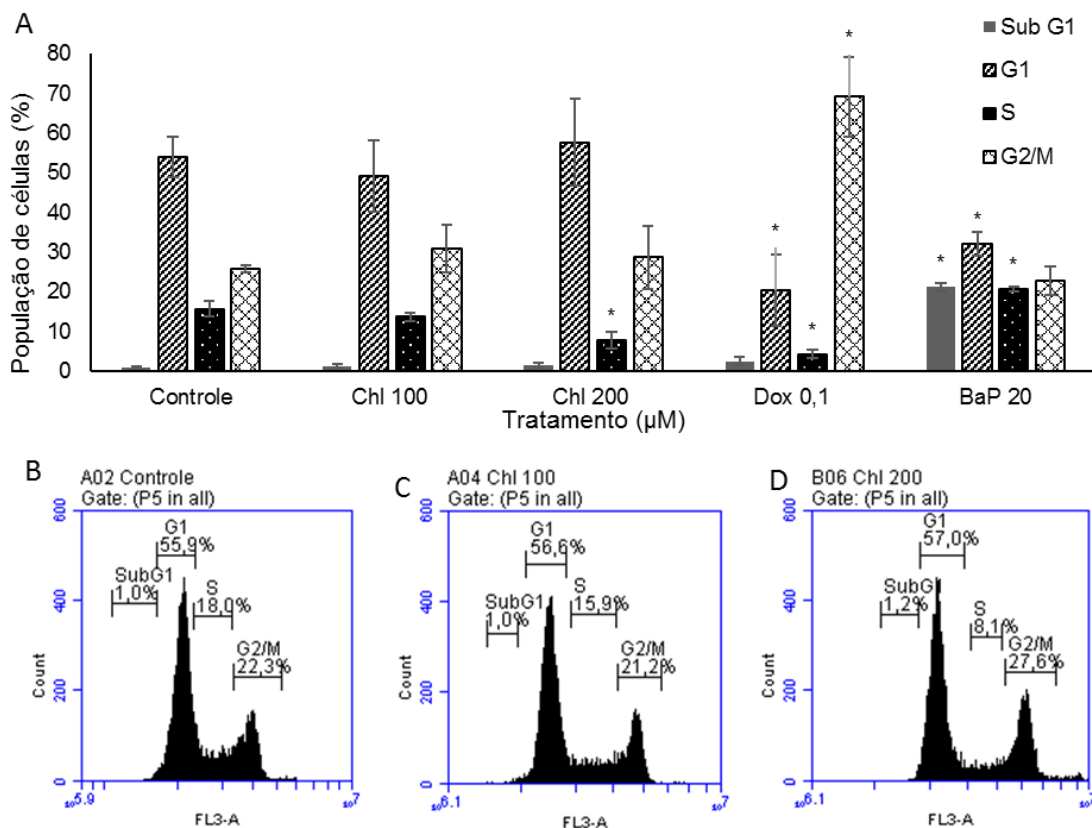


Figura 3. Análise da distribuição do ciclo celular por citometria de fluxo (PI). A) Efeitos dos tratamentos com Chl 100 μM e 200 μM , Dox 0,1 μM e BaP 20 μM na distribuição do ciclo celular (G1, S, G2 e Sub G1) após 24 horas de tratamento. Os dados são apresentados como a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. * $p < 0.05$, comparado ao grupo controle por ANOVA seguida de Dunnett. B) Controle, C) Tratamento com Chl 100 μM e D) Tratamento com Chl 200 μM . A porcentagem da população de células em cada fase do ciclo celular foi obtida pelo software Accuri C6.

Nos tratamentos associados, a Chl 100 e 200 μM protegeu as células das alterações causadas pela Dox 0,1 μM , sendo que a maior concentração de Chl foi capaz de manter a distribuição normal do ciclo celular (G1 57%, S 7% e G2/M 30%) e reduzir, mesmo que discretamente, a porcentagem de células em Sub G1 (2%) (Fig. 4).

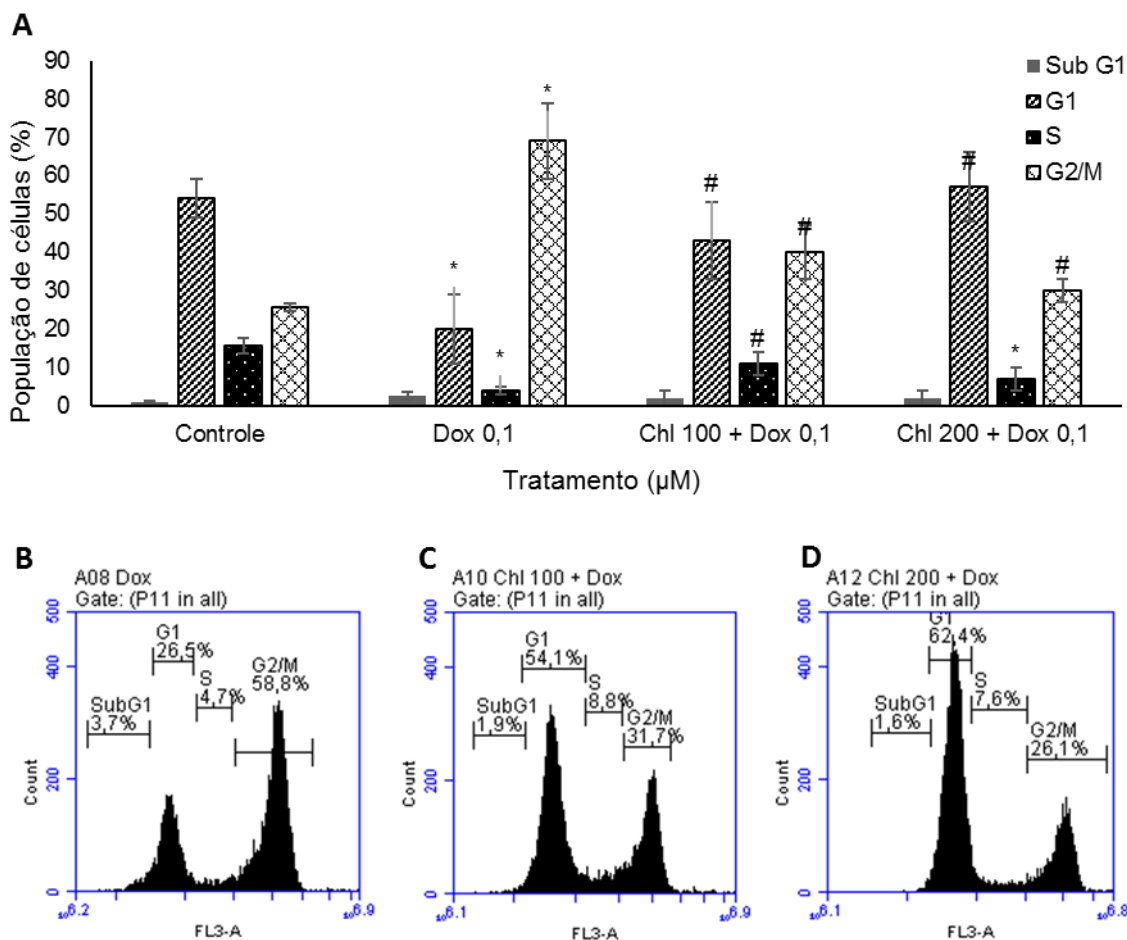


Figura 4. Análise da distribuição do ciclo celular por citometria de fluxo (PI). A) Efeitos dos tratamentos apenas com Dox 0,1 μM ; Chl 100 μM associada à Dox 0,1 μM e Chl 200 μM associada à Dox 0,1 μM na distribuição do ciclo celular (G1, S, G2 e Sub G1) após 24 horas de tratamento. Os dados são apresentados como a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. * $p < 0.05$ comparado ao grupo controle e # $p < 0.05$ comparado a Dox por ANOVA seguida de Dunnett. Histogramas obtidos pelo software Accuri C6: B) Tratamento com Dox 0,1 μM ; C) Tratamento com Chl 100 μM associada à Dox 0,1 μM e D) Tratamento com Chl 200 μM associada à Dox 0,1 μM .

A análise da progressão do ciclo celular após os tratamentos associados da Chl com o BaP, mostrou que as concentrações de 100 e 200 μM de Chl reduziram o número de células na fase Sub G1 (4%), e assim como no tratamento associado à Dox, a maior concentração (Chl 200 μM) manteve a distribuição normal do ciclo celular quando combinada com o BaP (Fig. 5).

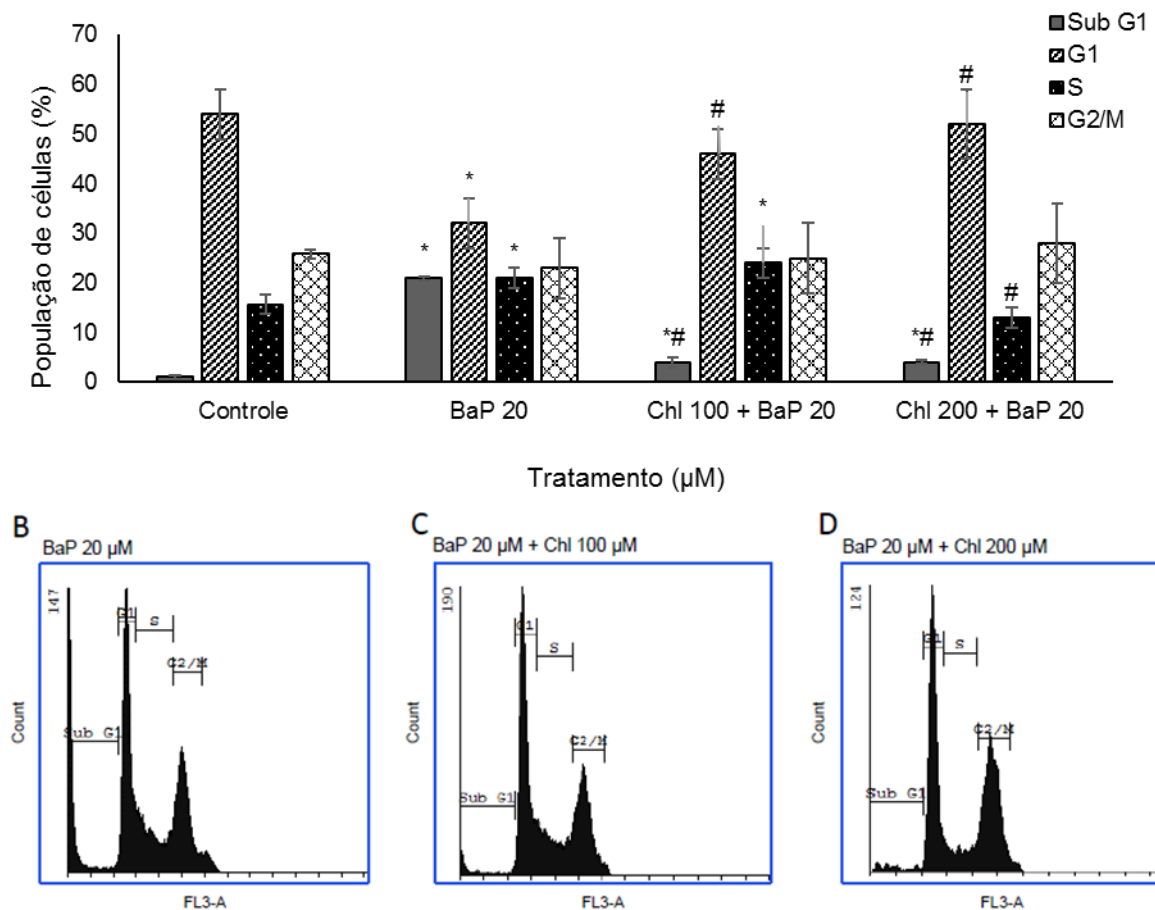


Figura 5. Análise da distribuição do ciclo celular por citometria de fluxo (PI). A) Efeitos dos tratamentos apenas com BaP 20 μM ; Chl 100 μM associada ao BaP 20 μM e Chl 200 μM associada a o BaP 20 μM na distribuição do ciclo celular (G1, S, G2 e Sub G1) após 24 horas de tratamento. Os dados são apresentados como a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. * $p < 0.05$, comparado ao grupo controle e # $p < 0.05$, comparado ao BaP por ANOVA seguida de Dunnett. Histogramas obtidos pelo software Accuri C6: B) Tratamento com BaP 20 μM , C) Tratamento com Chl 100 μM associada ao BaP 20 μM e D) Tratamento com Chl 200 μM associada ao BaP 20 μM . A porcentagem da população de células em cada fase do ciclo celular foi obtida pelo software Accuri C6.

3.3 Atividade protetora da Chl contra a morte celular induzida pela Dox e BaP

A análise da apoptose foi realizada por citometria de fluxo (Anexina V (AV) e 7-amino-actinomicina (7-AAD)), com o objetivo de investigar os mecanismos pelos quais a Chl protege as células contra o efeito citotóxico da Dox. Para tanto, os eventos foram distribuídos e analisados em três populações celulares distintas: células viáveis (AV-/7-AAD-), células na fase inicial da apoptose (AV+/7-AAD-) e células na fase tardia da apoptose ou em necrose (AV-/7-AAD+ e AV+/7-AAD+).

O tratamento com a Dox (0,1 μM) por 24 h causou um aumento na população de células em apoptose inicial para 4% e em apoptose tardia/necrose para 45%, consequentemente houve redução na porcentagem de células viáveis para 52%. Nos tratamentos associados com a Dox, a Chl nas concentrações de 100 e 200 μM apresentou atividade antiapoptótica, pois reduziu a população de células em apoptose inicial (2,0% e 1,6% respectivamente) e tardia/necrose (31,2% e 26,6% respectivamente), dessa maneira, aumentando a porcentagem de células viáveis para aproximadamente 70 % (Fig.6).

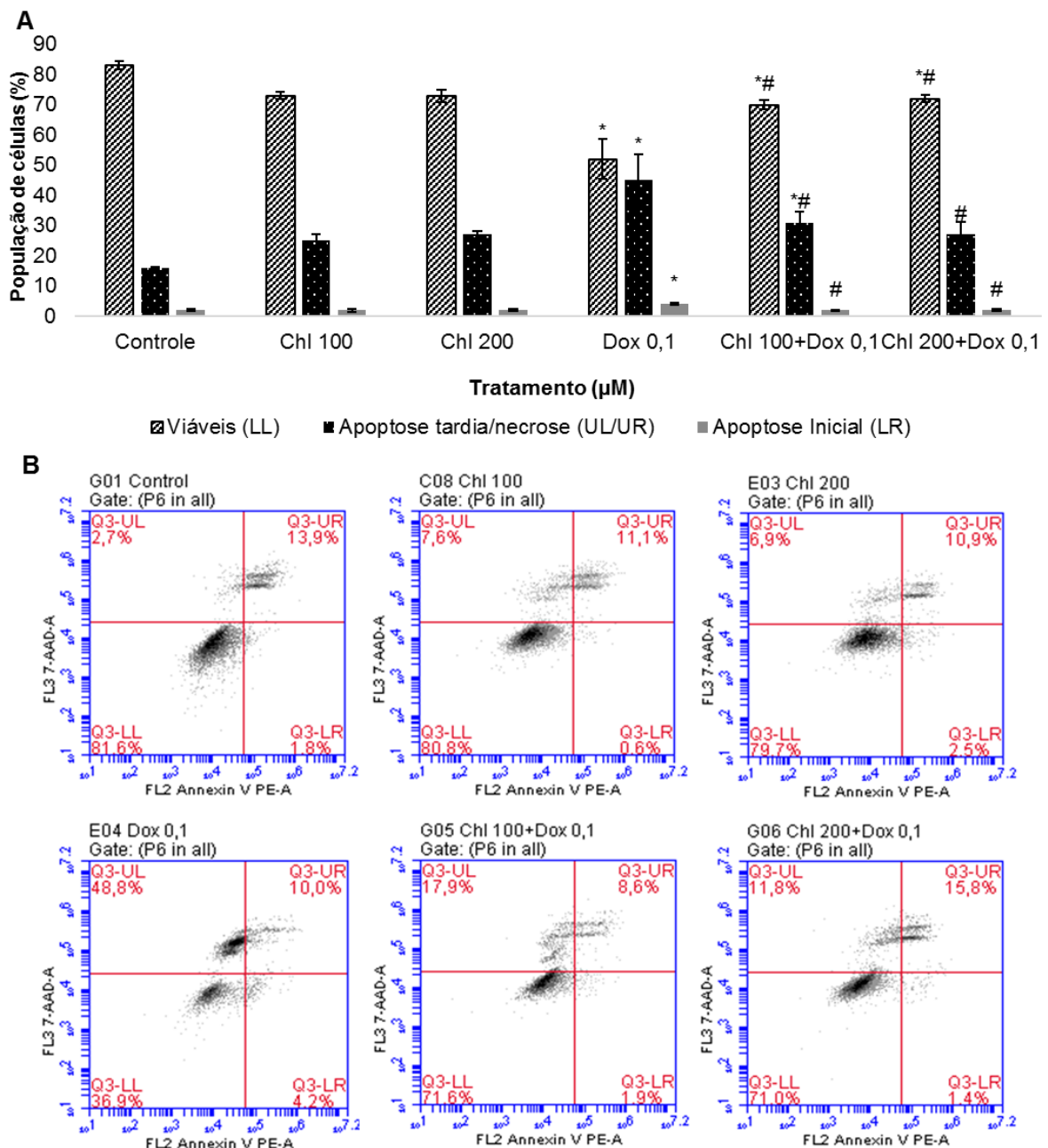


Figura 6. Análise de morte celular das células HepG2/C3A por citometria de fluxo. **A)** População de células viáveis, em apoptose inicial e apoptose tardia/necrose (UR/UL) após 24 h de tratamento com Chl 100 e Chl 200 μM ; Dox 0,1 μM e Chl 100 μM e 200 μM associada à Dox 0,1 μM . As médias de três experimentos independentes foram comparadas por ANOVA seguida de Dunnett, * $p < 0.05$ médias com diferenças significativas em relação ao grupo controle e # $p < 0.05$ em relação a Dox. **B)** Quantificação de células viáveis (AV-/7-AAD-), em apoptose inicial (AV+/7-AAD-) e em apoptose tardia/necrose (AV+/7-AAD+ e AV-/7-AAD+) após 24 horas de tratamento com Chl 100 μM ; Chl 200 μM ; Dox 0,1 μM ; Chl 100 μM associada à Dox 0,1 μM e Chl 200 μM associada à Dox 0,1 μM .

Por uma questão de limitação da técnica, a avaliação de apoptose por citometria de fluxo das células expostas ao BaP não pode ser considerada, pois o composto apresentou fluorescência na mesma intensidade utilizada para detecção do marcador anexina V (FL2).

A indução de morte por apoptose também foi investigada por meio da análise morfológica utilizando o corante hoechst 33342. As células não tratadas utilizadas como controle apresentaram morfologia normal, com núcleos regulares e ovais, e permaneceram aderidas à placa. Nos tratamentos com Chl 100 e 200 μM as células mantiveram as características normais, semelhantes ao controle (Fig. 7 B, C e D). Já os tratamentos com Dox (3 μM) e BaP (20 μM) apresentaram um grande número de células não aderidas, com perda da morfologia normal, núcleo condensado e/ou corpos apoptóticos (figuras 8 B e 9 B). Ambos causaram aumento na porcentagem de células apoptóticas, a Dox para 25% e o BaP para 16% quando comparadas ao controle (1,1 %) (Fig. 8A).

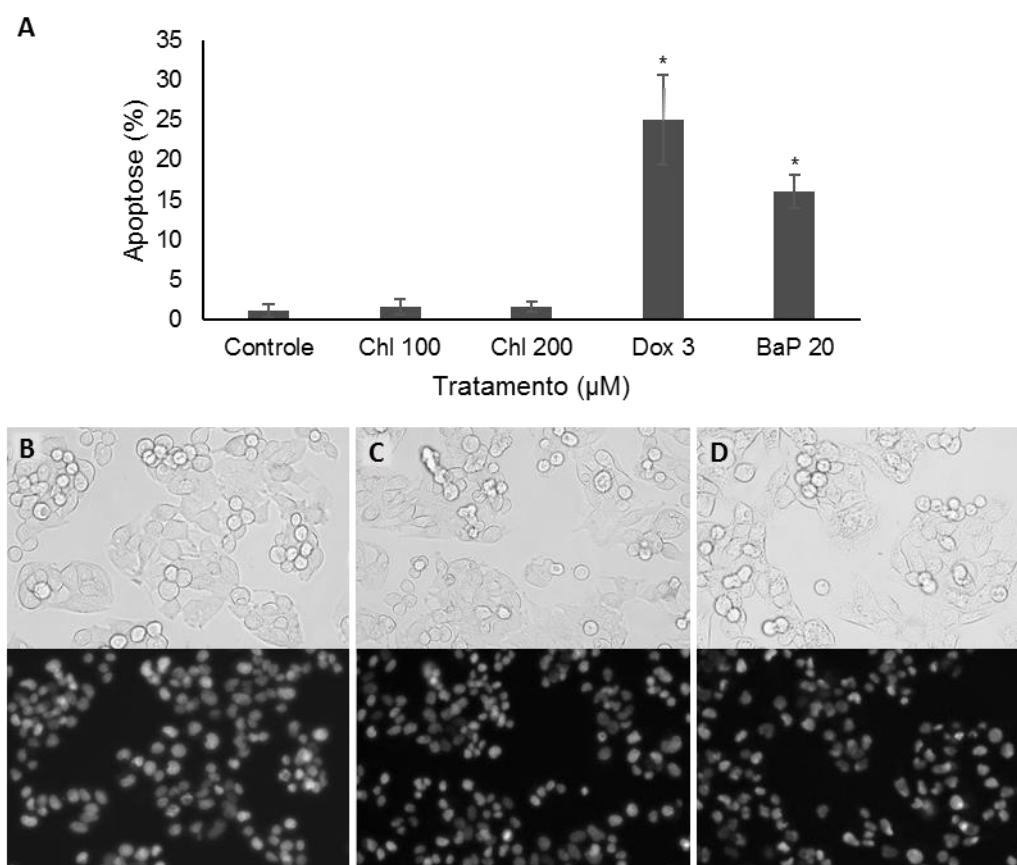


Figura 7. Aspecto morfológico da população de células HepG2/C3A e análise dos núcleos por coloração com hoechst 33342. A) Porcentagem de células apoptóticas no controle e nos tratamentos com Chl 100 μM e 200 μM . B) Controle, C) Tratamento com Chl 100 μM e D) Tratamento com Chl 200 μM .

No entanto, os tratamentos simultâneos com Dox 3 μM e Chl 100 e 200 μM reduziram a porcentagem de células apoptóticas para 7% e 6% respectivamente (Figura 8).

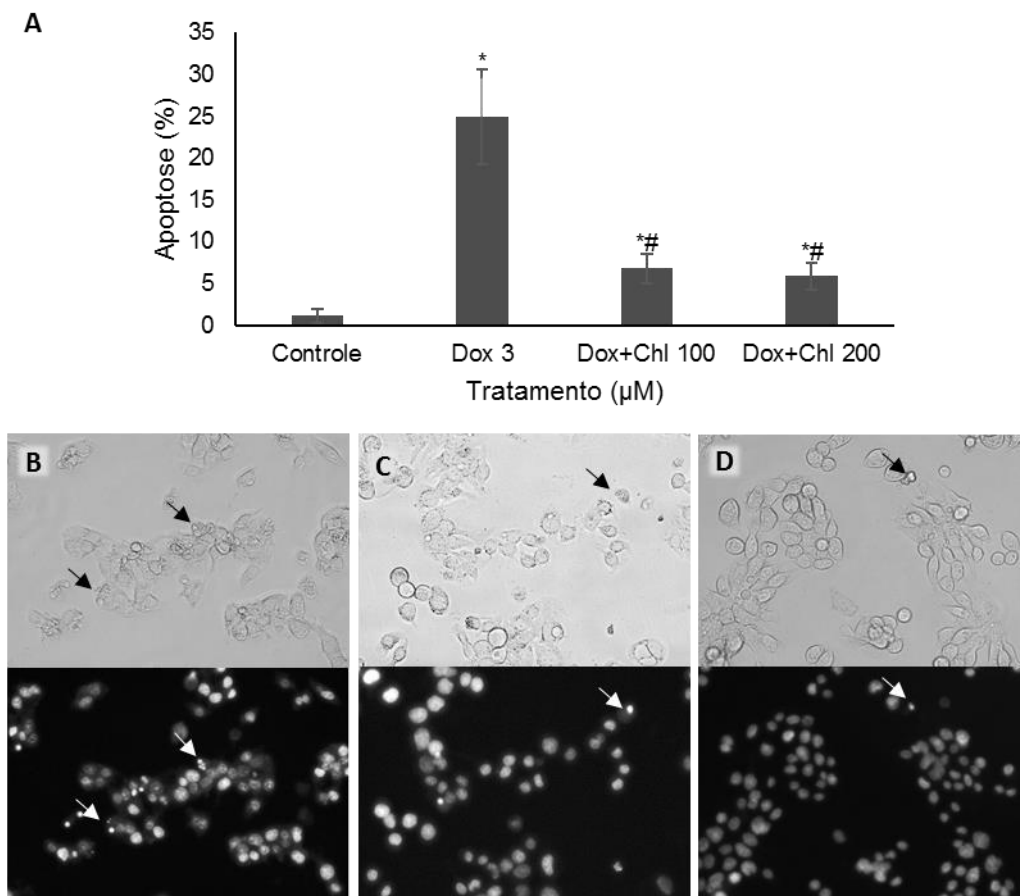


Figura 8. Morfologia e análise da apoptose por coloração com Hoechst 33342 das células HepG2/C3A. A) Porcentagem de células apoptóticas nos tratamentos com Dox 3 μM , Chl 100 μM associada à Dox 3 μM e Chl 200 μM associada à Dox 3 μM . B) Células tratadas com Dox 3 μM , C) Células tratadas com Chl 100 μM associada à Dox 3 μM e D) Células tratadas com Chl 200 μM associada à Dox 3 μM . As setas indicam núcleos apoptóticos. As médias de três experimentos independentes foram comparadas por ANOVA seguida de Dunnett, * $P < 0.05$ médias com diferenças significativas em relação ao grupo controle e # $P < 0.05$ em relação a Dox

A Chl também foi eficaz em proteger as células contra o efeito do BaP, os tratamentos associados levaram a uma grande redução na quantidade de núcleos apoptóticos para 4,6% na concentração de 100 μM e para 3,6% na concentração de 200 μM . Nos tratamentos associados com Chl a maioria das células tiveram sua morfologia preservada (Fig. 9).

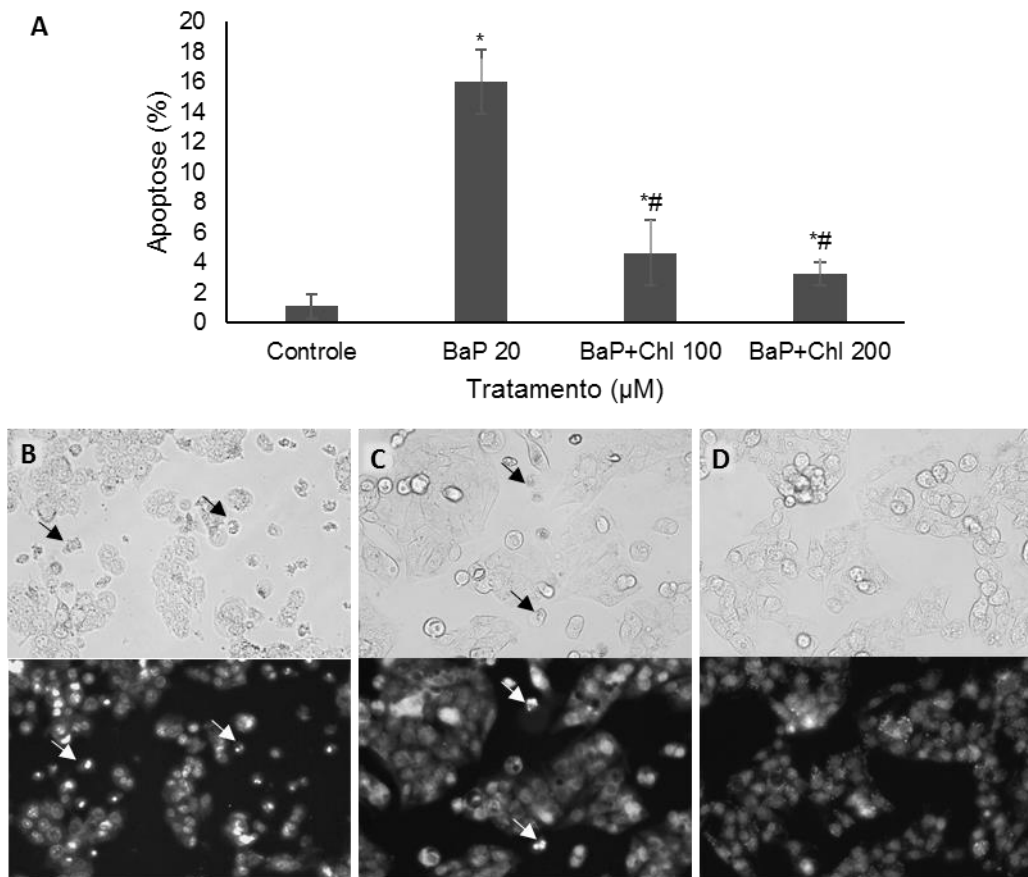


Figura 9. Aspecto morfológico e análise da apoptose por coloração com Hoechst 33342 das células HepG2/C3A. A) Porcentagem de células apoptóticas nos tratamentos com BaP 20 µM, Chl 100 µM associada ao BaP 20 µM e Chl 200 µM associada ao BaP 20 µM. B) Células tratadas com BaP 20 µM, C) Células tratadas com Chl 100 µM associada ao BaP 20 µM e D) Células tratadas com Chl 200 µM associada ao BaP 20 µM. As setas indicam núcleos apoptóticos. As médias de três experimentos independentes foram comparadas por ANOVA seguida de Dunnett, * $P < 0.05$ médias com diferenças significativas em relação ao grupo controle e # $P < 0.05$ em relação ao BaP.

3.4 Expressão dos genes envolvidos na progressão do ciclo celular e apoptose

Na análise de expressão de genes relacionados ao ciclo celular, verificamos que o tratamento com Chl 200 µM reduziu os níveis de mRNA dos genes *CCNA2*, *CDK1* e *CDK2* como pode ser observado na Figura 10 A e B. A exposição das células aos agentes citotóxicos Dox e BaP reduziu a expressão das ciclinas *CCNA2*, *CCNB1*, *CCND1* e *CCNE1* e também das quinases dependentes de ciclina *CDK1* e *CDK2*. Nos tratamentos em que a Chl 200 µM foi associada a Dox e ao BaP todos os genes também tiveram a expressão reduzida.

Em relação aos genes *BAX*, *CASP* e *TP53* envolvidos no processo de morte celular, também houve diminuição nos níveis de mRNA nos tratamentos com a Dox, o BaP e a Chl 200 µM associada à Dox. No tratamento associado com Chl 200 µM e BaP apenas o gene *TP53* não teve a expressão alterada quando comparado ao controle (Fig. 10 C). Não houve alteração significativa nas células expostas à Chl 200 µM.

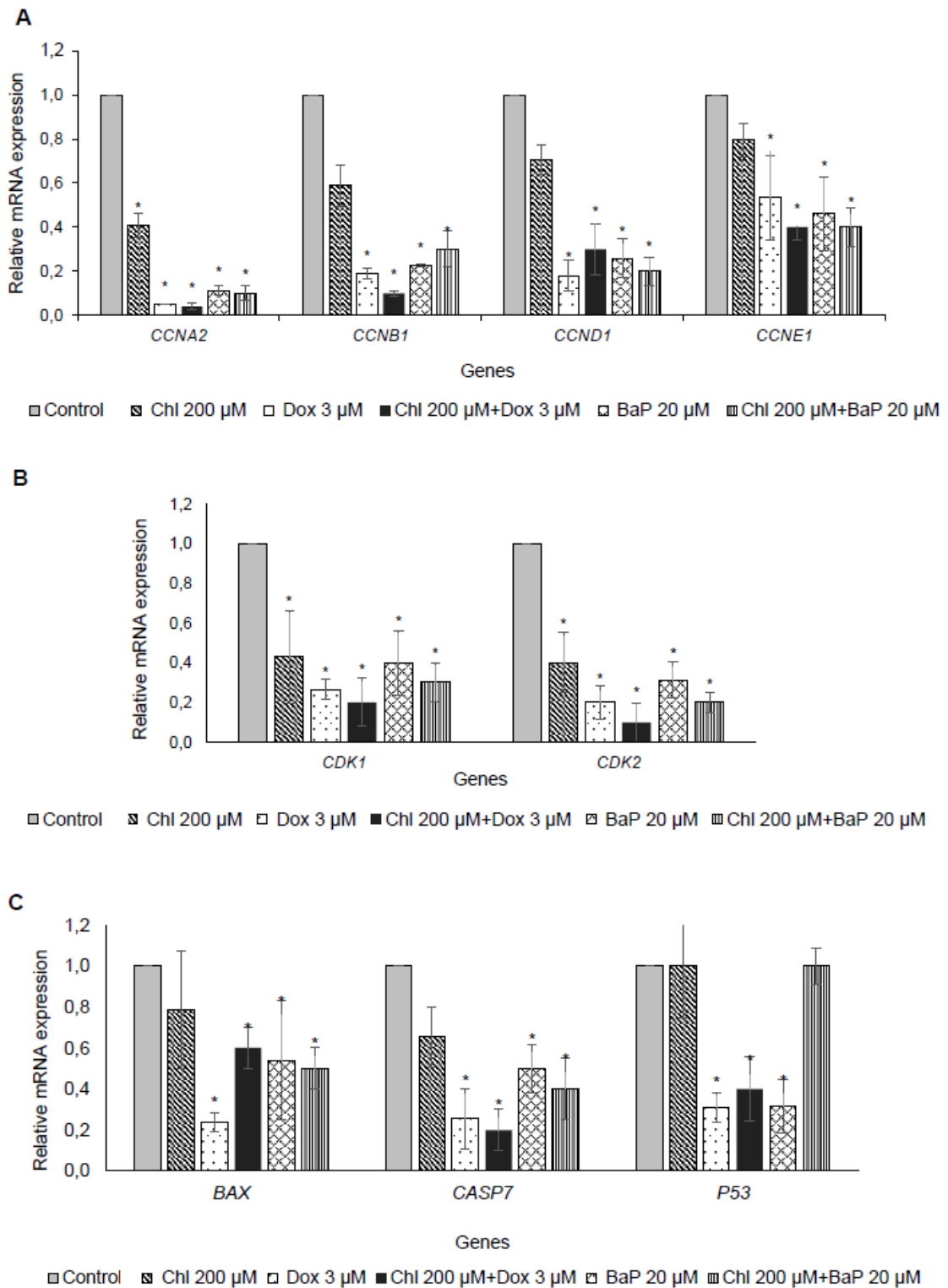


Figura 10. Expressão relativa dos genes *CCNA2*, *CCNB1*, *CCND1*, *CCNE1*, *CDK1*, *CDK2*, *BAX*, *CASP7* e *TP53* após 24 h de tratamento. **A)** Chl 200 µM, Dox 3 µM e BaP 20 µM comparados ao controle negativo. **B)** Chl 200 µM + Dox 3 µM comparado a Dox 3 µM. **C)** Chl 200µM + BaP 20 µM comparados ao BaP. Os dados são apresentados como a média da expressão relativa de três experimentos independentes. A razão e a análise estatística foram calculadas pelo software REST 2009, (*) significativo com $p \leq 0,05$.

4 Discussão

A busca por compostos presentes na dieta que possam proteger as células dos efeitos tóxicos causados por agentes mutagênicos, como por exemplo, os efeitos secundários causados pela quimioterapia, tem atraído a atenção da comunidade científica. Dentre esses compostos com potencial protetor, destaca-se a Clorofilina (Chl), pois apresenta, entre outras, atividade quimioprotetora e antimutagênica (Egner et al., 2001).

No presente estudo, a Chl foi associada ao quimioterápico doxorrubicina e ao carcinógeno ambiental benzo(a)pireno com o objetivo de investigar os mecanismos pelos quais atua como citoprotetora. O efeito protetor da Chl contra a toxicidade induzida pela Dox e BaP foi investigado em células HepG2/C3A por meio da análise da viabilidade, proliferação e progressão do ciclo celular e da expressão de genes envolvidos nesses processos.

É importante destacar que as linhagens de carcinoma hepatocelular são modelos bem estabelecidos para a avaliação de compostos com atividades protetoras em investigações toxicológicas (Chen et al., 2011; Pereira et al., 2013; Wang et al., 2012). Algumas dessas linhagens, como a HepG2/C3A (Kelly, 1994) utilizada no presente estudo, mantiveram funções específicas do fígado. Dentre essas funções está a capacidade de expressar enzimas do metabolismo de xenobióticos em níveis próximos aos encontrados em hepatócitos primários, o que as tornam modelos adequados aos estudos de toxicidade (Guillouzo e Guillouzo, 2008).

O presente estudo mostrou que a Chl nas concentrações de 25, 50, 100 e 200 μM não foi citotóxica. Outros estudos *in vivo* e *in vitro* demonstraram citotoxicidade baixa ou ausente da Chl (Bez et al. 2001; Garcia-Rodriguez et al. (2001). Já os tratamentos com a Dox e o BaP foram citotóxicos para as células HepG2/C3A, reduzindo a viabilidade e a proliferação celular de modo tempo dependente. A toxicidade de ambos foi confirmada pelos resultados de progressão do ciclo celular e indução de morte. Estudos mostraram a redução da viabilidade celular após exposição à Dox (Thorn et al., 2011) e ao BaP (Caino et al., 2007), evidenciando a alta toxicidade desses compostos.

A Doxorrubicina é um fármaco antineoplásico da família das antraciclinas, que exercem o efeito citotóxico, principalmente, por intercalarem-se entre os pares de base do DNA, inibindo a topoisomerase II (TOPO II), enzima responsável pela conformação e estabilidade do DNA (Thorn et al., 2011).

Assim como a Doxorrubicina, o BaP é altamente citotóxico. Quando metabolizado, o BaP gera moléculas reativas que se intercalam no DNA formando adutos. Essas estruturas distorcem o DNA dupla-hélice e interrompem a replicação, induzindo mutações (Baird et al., 2005). Além da capacidade de se ligar ao DNA, a Dox e o BaP, são potenciais agentes mutagênicos por induzir danos ao DNA através do estresse oxidativo (An et al., 2011; Simunek et al., 2009).

O perfil das curvas obtidas pelo RTCA após os tratamentos com a Dox e o BaP é semelhante ao apresentado por compostos que interferem na síntese de DNA, na transcrição e

na tradução (Abassi et al., 2009). A curva gerada por esses compostos é caracterizada por um aumento inicial do índice celular (IC) que permanece acima do controle, seguido por uma redução do IC abaixo dos níveis do controle, refletindo a resposta citotóxica dos compostos. A curva do tratamento com BaP, mostrou que seu efeito citotóxico foi tempo dependente, caracterizado por uma resposta celular tardia. Já as curvas dos tratamentos associados mostraram que a Chl reduziu o efeito citotóxico do BaP, mantendo os índices celulares mais próximos do controle. Já a curva gerada pelo tratamento com a Dox mostrou que seu efeito citotóxico ocorreu aproximadamente após 24 h de tratamento, tornando-se mais evidente após esse período. Essa resposta causada pela exposição à Dox também foi minimizada pela Chl, pois nos tratamentos associados as curvas se mantiveram próximas do controle. A avaliação morfológica está de acordo com estes resultados, pois a integridade das células foi preservada nos tratamentos associados.

Embora a Dox e o BaP sejam compostos com diferentes origens, eles possuem mecanismos de toxicidade similares, pois são capazes de interagir com o material genético causando danos no DNA. Sendo assim, a resposta celular após exposição à Dox e ao BaP também foi semelhante e quando associados à Chl ambos tiveram seu efeito reduzido. Dessa maneira, estes resultados propõem que a Chl pode atuar como protetora contra a atividade citotóxica de compostos que apresentam tais mecanismos de ação.

A análise da progressão do ciclo celular por citometria de fluxo, mostrou que a exposição das células HepG2/C3A à Dox causou acúmulo de células na fase G2/M. Resultados semelhantes foram obtidos após o tratamento com Dox, em linhagem tumoral de mama BCap37 (Zeng et al., 2000). A parada do ciclo celular causada pela citotoxicidade da Dox foi analisada em células de leucemia P388. O estudo revelou que as células sincronizadas nas fases S e G2/M foram mais sensíveis à Dox do que as células na fase G1 (Ling et al., 1996). Além disso, Stacey et al. (2000) confirmaram o fato de que as antraciclinas são mais ativas nas células em proliferação nas fases S e G2/M devido à expressão máxima da sua enzima alvo, TOPO II, nestas fases.

Outro mecanismo que explica o efeito tóxico da Dox, é a desregulação da sinalização de check-point induzida por danos no DNA ou devido a inibição de genes específicos envolvidos nesse processo (Thorn et al., 2011). Nosso estudo mostrou que a toxicidade causada pela Dox reduziu de maneira geral os níveis de mRNA dos membros da família das Ciclinas (CCNA2, CCNB1, CCND1 e CCNE1) e das quinases dependentes de ciclina (CDK1 e CDK2). A mitose é iniciada por mudanças abruptas na atividade dos complexos ciclinas dependentes de quinases (complexo ciclina-CDK). A expressão da Ciclina A2, que é relacionada com as fases S e G2/M, pode ser reduzida sob condições de estresse genotóxico como resultado da ativação do check-point e consequente diminuição da fase S (Federico et al., 2010). Outro efeito importante da exposição a agentes indutores de dano é a inibição dos complexos CDK2/ciclina E, que diminui a fosforilação na proteína Rb (retinoblastoma) e consequentemente a inativação dos membros

da família dos fatores de transcrição E2F, levando assim à baixa regulação transcricional da ciclina e por último a parada do ciclo. Essa forte depressão transcricional das ciclinas determina um efeito inibidor do composto sobre os complexos de CDK/ciclina (Federico et al., 2010).

A Chl na concentração de 200 μ M reduziu a população de células na fase S, o que pode estar relacionado a redução dos níveis de mRNA da CCNA2 e das quinases dependentes de ciclina CDK1 e CDK2, pois, suas proteínas se associam para promover a progressão do ciclo celular. Em linhagens celulares de mamíferos, a ciclina A2 é detectada durante a fase S e é degradada durante a prometáfase, ela promove tanto a transição G1/S como a transição G2/M. Alguns autores têm demonstrado potencial antiproliferativo da clorofilina através da inibição de ciclinas. Chimony et al. (2009) investigaram a expressão de reguladores chave do ciclo celular e verificaram redução na expressão das ciclinas A, B e E em células HCT116 tratadas com Chl. Chiu et al. (2003) observaram redução nos níveis protéicos de ciclina D1 e de ciclina E1 em células MCF-7 tratadas com Chl, assim como o aumento no número de células na fase G2/M.

Em nosso estudo, a exposição simultânea à Chl e Dox produziu efeito protetor nas células HepG2/C3A. Embora a Chl na concentração de 200 μ M tenha reduzido a população de células na fase S, foi capaz de manter a distribuição normal do ciclo celular quando combinada a Dox e ao BaP. No entanto, a redução na expressão dos genes causada pelo tratamento com a Dox não foi modulada pela Chl nos tratamentos associados. A Chl pode ter como alvo diferentes vias de sinalização pelas quais atua como protetora que podem não envolver os genes aqui estudados. O estudo de Noshay e Hamad (2013) mostrou o efeito protetor da Chl contra a genotoxicidade e citotoxicidade causadas pela cisplatina e 5-fluorouracil, e observaram que o pré-tratamento com Chl foi capaz de restaurar a atividade mitótica de células da medula óssea de camundongos que havia sido suprimida pela administração dos quimioterápicos.

Com relação ao agente mutagênico BaP, a exposição das células a esse composto aumentou significativamente a população de células em Sub G1, indicando a presença de células em apoptose. Houve também aumento do número de células na fase S. O estudo de Shinozaki e colaboradores (1998) observaram resultado semelhante em linhagens humanas de câncer de pulmão (PC-10 e PC-3) expostas ao benzo[a]pyrene-diol-epoxide. Porém, Caino e colaboradores (2006) verificaram aumento de células de carcinoma humano broncoalveolar (H358) em G2/M após tratamento com benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol e um ligeiro aumento das células na fase S também foi detectado.

Diversos estudos estabeleceram que os HPAs, dentre eles o BaP, formam adutos com o DNA, o que está relacionado com a redução da síntese de DNA e proliferação celular (Buterin et al.2000). Por sua vez, o BaP ligado ao DNA pode induzir quebras de fita dupla causando danos à molécula. Tais fatores explicam a interferência causada pelos HPA's na distribuição do ciclo celular e o alto potencial carcinogênico. Por isso o interesse em compostos que possam inibir ou minimizar seus efeitos prejudiciais.

No presente estudo, a análise da progressão do ciclo celular após o tratamento associado da Chl com o BaP, mostrou que a Chl reduziu o número de células em Sub G1, e assim como no tratamento associado à doxorrubicina, a maior concentração (Chl 200 μ M) manteve a distribuição normal do ciclo celular quando combinada com o BaP. O tratamento associado com Chl e o BaP manteve a expressão do gene TP53 próxima do controle, demonstrando que a presença da Chl manteve os níveis normais de mRNA de TP53 nas células HepG2/C3A. Este gene codifica uma fosfoproteína nuclear (p53) que tem papel ativo na parada do ciclo celular e na indução da expressão de genes de reparo de DNA lesado. A p53 é um importante sinalizador de vias metabólicas que regulam a integridade mitocondrial, a oxidação de lipídeos e a resposta a antioxidantes. Níveis basais de p53 controlam respostas antioxidantes, limitando o estresse oxidativo.

Dentre as propriedades da Chl, é importante destacar a sua capacidade de inibir a morte celular induzida por agentes mutagênicos. O estudo de Ibrahim e colaboradores (2007) mostrou que a administração da Chl reduziu a fragmentação do DNA em amostras de fígado de ratos tratados com ciclofosfamida e benzo(a)pireno. Resposta semelhante foi observada por Botelho e colaboradores (2004), os autores atribuíram o resultado a capacidade que a Chl possui de se ligar aos agentes mutagênicos e assim, inibir a fragmentação nuclear.

No presente estudo a Chl (100 e 200 μ M) foi capaz de prevenir a morte celular causada pela Dox e pelo BaP. Foi possível observar que as células expostas aos tratamentos associados com Chl apresentaram menor quantidade de núcleos apoptóticos e tiveram a morfologia preservada em relação àquelas tratadas apenas com a Dox ou o BaP. Zhang e colaboradores (2008) relataram a atividade protetora da Chl contra a morte celular induzida por peróxido de hidrogênio em células humanas de veia umbilical (HUVEC) e relacionaram este efeito à sua capacidade antioxidante. Por outro lado, Yu e colaboradores (2010) mostraram que a Chl apresentou um pequeno efeito citoprotetor e baixo efeito anti-apoptótico em linhagens humanas de epitélio de pulmão (A549) e leucemia (Jurkat T) tratadas com peróxido de hidrogênio. Esses resultados mostram que o efeito protetor da Chl pode ser dependente do tipo celular e do agente citotóxico, o que pode ser positivo para o seu uso combinado com quimioterápicos na tentativa de proteger as células que não são alvo do tratamento.

O efeito protetor da Chl contra as atividades citotóxicas da Dox e do BaP pode estar relacionado a alta afinidade que a Chl possui para formar complexos com diferentes agentes mutagênicos, como observado por Pietrzak e colaboradores (2003). Os complexos são mantidos por interação entre as moléculas do mutágeno e a Chl, com a formação destes complexos em solução aquosa as moléculas livres do composto são capturadas reduzindo a sua concentração na forma ativa (Dashwood et al., 1996). Assim, a Chl é capaz de atenuar os efeitos tóxicos do agente mutagênico, uma vez que neutraliza as suas moléculas, impedindo sua absorção pelas células e posterior interação com o DNA.

Portanto, a Chl protegeu as células HepG2/C3A de maneira efetiva da toxicidade causada pelos agentes mutagênicos Dox e BaP, atuando contra a inibição do ciclo e a indução da morte celular. Dessa maneira, nossos resultados sugerem que a Chl pode ser uma boa candidata a ser utilizada como agente quimioprotetor para atenuar os efeitos citotóxicos da Dox, assim como para proteger as células dos efeitos causados pelo agente mutagênico ambiental BaP.

Agradecimentos

Esta pesquisa teve o apoio financeiro do CNPq, CAPES e Fundação Araucária.

6 Referências

- ABASSI, Y. A.; XI, B.; ZHANG, W.; YE, P.; KIRSTEIN, S. L.; GAYLORD, M. R.; FEINSTEIN, S. C.; WANG, X.; XU, X. Kinetic cell-based morphological screening: prediction of mechanism of compound action and off-target effects. **Chem Biol**, v. 16(7), p. 712-723, 2009.
- ANAND, P.; KUNNUMAKKARA, A. B.; SUNDARAM, C.; HARIKUMAR, K. B.; THARAKAN, S. T.; LAI, O. S.; SUNG, B.; AGGARWAL, B. B. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. **Pharm Res**, v. 25(9), p. 2097-2116, 2008.
- ASHOUR, O. M.; ELBERRY, A. A.; ALAHDAL, A.; AL MOHAMADI, A. M.; NAGY, A. A.; ABDEL-NAIM, A. B.; ABDEL-SATTAR, E. A.; MOHAMADIN, A. M. Protective effect of bilberry (*Vaccinium myrtillus*) against doxorubicin-induced oxidative cardiotoxicity in rats. **Med Sci Monit**, v. 17(4), p. BR110-115, 2011.
- BAIRD, W. M.; HOOVEN, L. A.; MAHADEVAN, B. Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action. **Environ Mol Mutagen**, v. 45(2-3), p. 106-114, 2005.

- BEZ, G. C.; JORDAO, B. Q.; VICENTINI, V. E.; MANTOVANI, M. S. Investigation of genotoxic and antigenotoxic activities of chlorophylls and chlorophyllin in cultured V79 cells. **Mutat Res**, v. 497(1-2), p. 139-145, 2001.
- BOTELHO, M. V.; ORLANDI, J. M.; DE MELO, F. L.; MANTOVANI, M. S.; LINHARES, R. E.; NOZAWA, C. Chlorophyllin protects HEP-2 cells from nuclear fragmentation induced by poliovirus. **Lett Appl Microbiol**, v. 39(2), p. 174-177, 2004.
- BUTERIN, T.; HESS, M. T.; LUNEVA, N.; GEACINTOV, N. E.; AMIN, S.; KROTH, H.; SEIDEL, A.; NAEGELI, H. Unrepaired fjord region polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in ras codon 61 mutational hot spots. **Cancer Res**, v. 60(7), p. 1849-1856, 2000.
- CAINO, M. C.; OLIVA, J. L.; JIANG, H.; PENNING, T. M.; KAZANIETZ, M. G. Benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol promotes checkpoint activation and G2/M arrest in human bronchoalveolar carcinoma H358 cells. **Mol Pharmacol**, v. 71(3), p. 744-750, 2007.
- CHEN, Z.-Y.; MA, K. Y.; LIANG, Y.; PENG, C.; ZUO, Y. Role and classification of cholesterol-lowering functional foods. **Journal of Functional Foods**, v. 3(2), p. 61-69, 2011.
- CHIMPLOY, K.; DIAZ, G. D.; LI, Q.; CARTER, O.; DASHWOOD, W. M.; MATHEWS, C. K.; WILLIAMS, D. E.; BAILEY, G. S.; DASHWOOD, R. H. E2F4 and ribonucleotide reductase mediate S-phase arrest in colon cancer cells treated with chlorophyllin. **Int J Cancer**, v. 125(9), p. 2086-2094, 2009.
- CHIU, L. C.; KONG, C. K.; OOI, V. E. Antiproliferative effect of chlorophyllin derived from a traditional Chinese medicine *Bombyx mori* excreta on human breast cancer MCF-7 cells. **Int J Oncol**, v. 23(3), p. 729-735, 2003.
- CHOI, H.; HARRISON, R.; KOMULAINEN, H.; DELGADO SABORIT, J. M. (2010). Polycyclic aromatic hydrocarbons. WHO Guidelines for Indoor Air Quality: Selected Pollutants. W. H. Organization. Copenhagen, WHO Regional Office for Europe: 289-325.
- DASHWOOD, R.; YAMANE, S.; LARSEN, R. Study of the forces of stabilizing complexes between chlorophylls and heterocyclic amine mutagens. **Environ Mol Mutagen**, v. 27(3), p. 211-218, 1996.
- DASHWOOD, R. H. The importance of using pure chemicals in (anti) mutagenicity studies: chlorophyllin as a case in point. **Mutat Res**, v. 381(2), p. 283-286, 1997.
- EGNER, P. A.; WANG, J. B.; ZHU, Y. R.; ZHANG, B. C.; WU, Y.; ZHANG, Q. N.; QIAN, G. S.; KUANG, S. Y.; GANGE, S. J.; JACOBSON, L. P.; HELZLSOUER, K. J.; BAILEY, G. S.; GROOPMAN, J. D.; KENSLER, T. W. Chlorophyllin intervention reduces aflatoxin-DNA adducts in individuals at high risk for liver cancer. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98(25), p. 14601-14606, 2001.
- FEDERICO, M.; SYMONDS, C. E.; BAGELLA, L.; RIZZOLIO, F.; FANALE, D.; RUSSO, A.; GIORDANO, A. R-Roscovitine (Seliciclib) prevents DNA damage-induced cyclin A1 upregulation and hinders non-homologous end-joining (NHEJ) DNA repair. **Mol Cancer**, v. 9, p. 208, 2010.
- GARCIA-RODRIGUEZ, M. C.; LOPEZ-SANTIAGO, V.; ALTAMIRANO-LOZANO, M. Effect of chlorophyllin on chromium trioxide-induced micronuclei in polychromatic erythrocytes in mouse peripheral blood. **Mutat Res**, v. 496(1-2), p. 145-151, 2001.
- GUENGERICH, F. P. Metabolism of chemical carcinogens. **Carcinogenesis**, v. 21(3), p. 345-351, 2000.
- GUILLOUZO, A.; GUGUEN-GUILLOUZO, C. Evolving concepts in liver tissue modeling and implications for in vitro toxicology. **Expert Opin Drug Metab Toxicol**, v. 4(10), p. 1279-1294, 2008.
- HAYATSU, H.; SUGIYAMA, C.; ARIMOTO-KOBAYASHI, S.; NEGISHI, T. Porphyrins as possible preventers of heterocyclic amine carcinogenesis. **Cancer Lett**, v. 143(2), p. 185-187, 1999.
- HERNAEZ, J.; XU, M.; DASHWOOD, R. Effects of tea and chlorophyllin on the mutagenicity of N-hydroxy-IQ: studies of enzyme inhibition, molecular complex formation, and degradation/scavenging of the active metabolites. **Environ Mol Mutagen**, v. 30(4), p. 468-474, 1997.
- IBRAHIM, M. A.; ELBEHAIRY, A. M.; GHONEIM, M. A.; AMER, H. A. Protective effect of curcumin and chlorophyllin against DNA mutation induced by cyclophosphamide or benzo[a]pyrene. **Z Naturforsch C**, v. 62(3-4), p. 215-222, 2007.
- JOHNSON, N.; SHAPIRO, G. I. Cyclin-dependent kinases (cdks) and the DNA damage response: rationale for cdk inhibitor-chemotherapy combinations as an anticancer strategy for solid tumors. **Expert Opin Ther Targets**, v. 14(11), p. 1199-1212, 2010.
- KALENDER, Y.; YEL, M.; KALENDER, S. Doxorubicin hepatotoxicity and hepatic free radical metabolism in rats. The effects of vitamin E and catechin. **Toxicology**, v. 209(1), p. 39-45, 2005.

- KAMAT, J. P.; BOLOOR, K. K.; DEVASAGAYAM, T. P. Chlorophyllin as an effective antioxidant against membrane damage in vitro and ex vivo. **Biochim Biophys Acta**, v. 1487(2-3), p. 113-127, 2000.
- KELLY, J. H. (1994). Permanent human hepatocyte cell line and its use in a liver assist device (LAD). B. C. O. Medicine. US5290684 A.
- KUMAR, S. S.; CHAUBEY, R. C.; DEVASAGAYAM, T. P.; PRIYADARSINI, K. I.; CHAUHAN, P. S. Inhibition of radiation-induced DNA damage in plasmid pBR322 by chlorophyllin and possible mechanism(s) of action. **Mutat Res**, v. 425(1), p. 71-79, 1999.
- LAO, J.; MADANI, J.; PUERTOLAS, T.; ALVAREZ, M.; HERNANDEZ, A.; PAZO-CID, R.; ARTAL, A.; ANTON TORRES, A. Liposomal Doxorubicin in the treatment of breast cancer patients: a review. **J Drug Deliv**, v. 2013, p. 456409, 2013.
- LING, Y. H.; EL-NAGGAR, A. K.; PRIEBE, W.; PEREZ-SOLER, R. Cell cycle-dependent cytotoxicity, G2/M phase arrest, and disruption of p34cdc2/cyclin B1 activity induced by doxorubicin in synchronized P388 cells. **Mol Pharmacol**, v. 49(5), p. 832-841, 1996.
- MATA, J. E.; YU, Z.; GRAY, J. E.; WILLIAMS, D. E.; RODRIGUEZ-PROTEAU, R. Effects of chlorophyllin on transport of dibenzo(a, l)pyrene, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo-[4,5-b]pyridine, and aflatoxin B(1) across Caco-2 cell monolayers. **Toxicology**, v. 196(1-2), p. 117-125, 2004.
- NOSHY, M. M.; HAMAD, H. R. Chlorophyllin Protects Against Cisplatin and 5-Fluorouracil Regimen Induced Genotoxicity and Cytotoxicity Without Affecting Their Antitumor Activity. **Academic Journal of Cancer Research**, v. 6(2), p. 90-98, 2013.
- PEREIRA, O. R.; MACIAS, R. I. R.; PEREZ, M. J.; MARIN, J. J. G.; CARDOSO, S. M. Protective effects of phenolic constituents from *Cytisus multiflorus*, *Lamium album* L. and *Thymus citriodorus* on liver cells. **Journal of Functional Foods**, v. 5(3), p. 1170–1179, 2013.
- PIETRZAK, M.; WIECZOREK, Z.; STACHELSKA, A.; DARZYNKIEWICZ, Z. Interactions of chlorophyllin with acridine orange, quinacrine mustard and doxorubicin analyzed by light absorption and fluorescence spectroscopy. **Biophys Chem**, v. 104(1), p. 305-313, 2003.
- SHINOZAKI, R.; INOUE, S.; CHOI, K. S. Flow cytometric measurement of benzo[a]pyrene-diol-epoxide-DNA adducts in normal human peripheral lymphocytes and cultured human lung cancer cells. **Cytometry**, v. 31(4), p. 300-306, 1998.
- STACEY, D. W.; HITOMI, M.; CHEN, G. Influence of cell cycle and oncogene activity upon topoisomerase IIalpha expression and drug toxicity. **Mol Cell Biol**, v. 20(24), p. 9127-9137, 2000.
- THORN, C. F.; OSHIRO, C.; MARSH, S.; HERNANDEZ-BOUSSARD, T.; MCLEOD, H.; KLEIN, T. E.; ALTMAN, R. B. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. **Pharmacogenet Genomics**, v. 21(7), p. 440-446, 2011.
- TUMOLO, T.; LANFER-MARQUEZ, U. M. Copper chlorophyllin: A food colorant with bioactive properties? **Food Research International**, v. 46(2), p. 451–459, 2012.
- WANG, N.; FENG, Y.; CHEUNG, F.; CHOW, O. Y.; WANG, X.; SU, W.; TONG, Y. A comparative study on the hepatoprotective action of bear bile and *Coptidis Rhizoma* aqueous extract on experimental liver fibrosis in rats. **BMC Complement Altern Med**, v. 12, p. 239, 2012.
- YU, J. W.; YANG, R.; KIM, Y. S. Differential cytoprotective effect of copper- and iron-containing chlorophyllins against oxidative stress-mediated cell death. **Free Radic Res**, v. 44(6), p. 655-667, 2010.
- ZENG, S.; CHEN, Y. Z.; FU, L.; JOHNSON, K. R.; FAN, W. In vitro evaluation of schedule-dependent interactions between docetaxel and doxorubicin against human breast and ovarian cancer cells. **Clin Cancer Res**, v. 6(9), p. 3766-3773, 2000.
- ZHANG, Y.; GUAN, L.; WANG, X.; WEN, T.; XING, J.; ZHAO, J. Protection of chlorophyllin against oxidative damage by inducing HO-1 and NQO1 expression mediated by PI3K/Akt and Nrf2. **Free Radic Res**, v. 42(4), p. 362-371, 2008.

6 Capítulo II

Ação da Clorofilina nos processos de proliferação celular e apoptose em células HeLa tratadas com doxirrubicina, edelfosina e benzo(a)pireno.

Gláucia Fernanda Rocha D'Épiro^{1*}; Mário Sérgio Mantovani¹, Consuelo Gajate², Faustino Mollinedo²

¹ Departamento de biologia, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, Paraná, Brasil;

² Centro de Investigación del Cáncer (CIC), Universidade de Salamanca, Campus Miguel de Unamuno, Salamanca, Espanha

* Autor para correspondência

Departamento de Biologia, Universidade Estadual de Londrina, CEP 86051-990, Londrina, Paraná, Brasil.

Telefone: (55) 43 3371-4977

e-mail: glaudepairo@gmail.com

Resumo

A clorofilina, um corante semi-sintético derivado da clorofilia, é capaz de inibir a atividade de diversos compostos químicos. Muitos mecanismos têm sido propostos para explicar a atividade quimioprotetora da Chl, incluindo sua capacidade para formar complexos com agentes mutagênicos. O objetivo deste estudo foi analisar a capacidade da clorofilina de alterar os efeitos causados por três diferentes agente citotóxicos: benzo(a)pireno (BaP), doxorubicina (Dox) e edelfosina (EDLF) nos processos de proliferação e morte celular. Para isso, foram realizados os ensaios de citometria de fluxo e Western blot, utilizando a linhagem HeLa. A Chl foi avaliada nas concentrações de 100 e 200 μM sozinha e associada com a Dox 0,1 μM ; EDLF 10 μM e BaP 20 μM . Os resultados mostraram que a Chl atenuou os efeitos causados pelos três agentes. A Chl 200 μM reduziu o efeito citostático da Dox (parada em G2/M), porém não foi capaz de inibir a indução de apoptose demonstrada pela presença da PARP clivada. O efeito citostático causado pela EDLF (parada em G2/M), também foi alterado pela Chl 200 μM , além disso, inibiu sua citotoxicidade, através da redução de células em Sub G1, entretanto, foi observada a expressão dos marcadores de morte celular, PARP clivada e LC3-II. No tratamento associado com o BaP, a Chl reduziu seu efeito apoptótico, com diminuição de PARP clivada e da população em Sub G1. Portanto, a presença da Chl atenuou os efeitos dos três agentes quanto a distribuição das fases do ciclo celular e fragmentação do DNA (apoptose), o que sugere sua capacidade em alterar a toxicidade de compostos de diferentes naturezas e mecanismos de ação.

Palavras chave: ciclo celular, morte celular, quimioprotetora

1 Introdução

Estudos demonstraram que a presença da clorofilina (Chl) é capaz de reduzir a mutagenicidade de diversos agentes tais como aminas heterocíclicas, aflatoxinas, benzo(a)pireno, espécies reativas de oxigênio e íons de metais pesados (NAGINI et al., 2015). Muitos mecanismos podem contribuir para as propriedades quimioprotetoras da Chl, um deles foi proposto baseado no fato de que a Chl foi mais efetiva em reduzir a mutagenicidade de compostos policíclicos com estruturas aromáticas planas (ARIMOTO et al., 1993). De acordo com esse mecanismo, os complexos são mantidos por interações entre o anel de porfirina da Chl e os anéis aromáticos dos agentes mutagênicos (HAYATSU et al., 1999).

A Chl apresenta ainda, a possibilidade de formar complexos heterólogos com compostos mutagênicos (TACHINO et al., 1994). Outro mecanismo, foi baseado na capacidade da Chl de reagir diretamente com grupos ativos de mutágenos, resultando na sua neutralização (OLVERA et al., 2000). Devido ao fato da Chl ser antioxidante, sua habilidade de sequestrar espécies reativas de oxigênio pode ser responsável pela redução da toxicidade de mutágenos que possuem a atividade mediada direta ou indiretamente por espécies reativas de oxigênio (ZHANG et al., 2012).

O uso da Chl como quimioprotetora ou para potencializar a eficácia do quimioterápico, tem sido considerado, uma vez que ela pode atuar por meio de mecanismos distintos, dependendo do agente a ela associado (ARDELT et al., 2001, NAGINI et al., 2015). A combinação de agentes trouxe avanços importantes no tratamento de alguns tipos de cânceres (linfomas, tumores da infância, e das neoplasias de células germinativas). O uso simultâneo de compostos com mecanismos diferentes de ação parece ser mais eficaz (MEIYANTO et al., 2012).

A maioria dos quimioterápicos, podem provocar efeitos secundários assim como a indução de mutações e outros efeitos citotóxicos em células que não são alvo no tratamento. Sendo assim, é comum que os pacientes passem a ingerir suplementos alimentares para diminuir os efeitos colaterais da terapia. No entanto, estes suplementos podem afetar a eficácia das drogas antitumorais, tornando evidente a necessidade de que as combinações sejam testadas previamente.

O presente estudo aborda dois aspectos acerca do efeito da clorofilina: combinada a dois agentes antitumorais, Dox e EDLF e combinada ao mutágeno ambiental BaP, sendo que, cada um dos agentes possui mecanismos distintos pelos quais podem induzir toxicidade nas células.

A Dox é um quimioterápico da família da antraciclinas muito utilizado no tratamento de diferentes tipos de tumores sólidos e leucemias. Sabe-se que a Dox, mesmo em concentrações baixas, interfere com a atividade da topoisomerase II, esta interferência ocasiona quebras no DNA, e este fator está correlacionado à sua citotoxicidade (TACAR et al., 2013).

Já a Edelfosina (EDLF), é um agente antitumoral, membro do grupo dos lipídios antitumorais, que atua principalmente a nível da membrana celular. A EDLF possui uma cadeia

apolar hidrocarbonada, o que permite sua fácil inserção na bicamada lipídica da membrana plasmática, produzindo uma alteração na sua conformação e afetando uma série de eventos, dentre eles: estresse celular, desregulação das vias apoptóticas, inibição do crescimento e parada do ciclo celular, que por fim desencadeia a resposta apoptótica (MOLLINEDO et al., 2011).

O efeito da Chl combinada ao BaP foi incluído por ser um mutágeno ambiental da família dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, com conhecido mecanismo de ação que age principalmente ligando-se no DNA de forma covalente (aductos) e provocando alterações em sua estrutura com consequências na replicação, transcrição e tradução (KASALA et al., 2015).

Para contribuir com o entendimento dos mecanismos de ação da Chl nosso estudo analisou o processo de ciclo celular e apoptose em células HeLa sobre o efeito da Chl associada a agentes com conhecidos efeitos citotóxicos por diferentes mecanismos: benzo(a)pireno, doxorrubicina e edelfosina.

2 Material e métodos

2.1 Linhagem celular

Neste estudo foi utilizada a linhagem de carcinoma de colo uterino HeLa. As células foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (SBF, Gibco) e contendo 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco). As células foram mantidas em estufa úmida com 5% de CO₂ a 37°C.

2.2 Agentes químicos

A clorofilina (Chlorophyllin sodium copper salt, Sigma-Aldrich), foi dissolvida em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium – DMEM (Gibco) e esterilizada por filtração (Millex - Millipore 0,22 µm). Para indução da citotoxicidade celular foram utilizados os seguintes compostos: o quimioterápico doxorrubicina (Dox) (Adriplastina, Pharmacia), o agente anticâncer edelfosina (EDFL) (Inkeysa) e o agente mutagênico ambiental benzo(a)pireno (BaP) (Sigma-Aldrich)

2.3 Análise de fragmentação do DNA (apoptose) e ciclo celular por citometria de fluxo

Foram semeadas 5x10⁵ células/poço em placas de 6 poços e após 24 h de incubação foram tratadas com Chl 100 e 200 µM associada ou não à Dox (0,1 µM), EDLF (10 µM) ou BaP (20 µM) por 24, 48 e 72 h. Após os períodos de tratamento, as células foram fixadas em álcool

70% e permanecerem a 2 °C. Para a realização do ensaio, as amostras foram incubadas com RNase (Life technologies) (0,1 mg/mL) e iodeto de propídeo (20 µg/mL) à temperatura ambiente e em agitação por 30 min. Em seguida, a fluorescência do iodeto de propídeo foi estimada por citometria de fluxo (FACScalibur, BD Pharmingen™). O conteúdo de DNA foi analisado e foram estimadas as porcentagens de células nas diferentes fases do ciclo celular (G1, S e G2/M). A porcentagem de células da região Sub G1 corresponde a porcentagem de morte celular por apoptose. Para cada amostra foram adquiridos 10.000 eventos e foram realizados três experimentos independentes. A quantificação das porcentagens tanto das células apoptóticas como das diferentes fases do ciclo celular foi realizada por meio do programa Cyflogic (Perttu Terho & CyFlo Ltd).

2.4 Análise da expressão de proteínas por Western blot

Foram semeadas 3×10^4 células/placa e após estabilização as células foram tratadas com Chl 200 µM sozinha e associada aos agentes citotóxicos Dox 0,1 µM; EDLF 10 µM e BaP 20 µM durante 24 e 48 horas. As proteínas foram extraídas utilizando uma solução de lise (WCE 300) e inibidor de protease (10%). As proteínas totais foram quantificadas utilizando a metodologia de Bradford (método colorimétrico baseado na reação do corante azul de Coomassie ao unir-se a proteína). A quantidade de proteínas totais de cada amostra foi determinada mediante leitura das absorbâncias obtidas por espectrofotometria. Para a realização da eletroforese em gel de poliacrilamida foram utilizados 30 µg de proteínas totais. Após a separação das proteínas, foi realizada a transferência das mesmas para membranas de PVDF (Milipore). Posteriormente, as membranas foram bloqueadas com leite desnatado (5%), lavadas (TBS) e incubadas *overnight* com os anticorpos primários LC3A e PARP (Cell Signaling Technologie). Após serem lavadas, realizou-se a incubação com o anticorpo secundário (Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody, Cell Signaling Technologie) por 1 h. Após serem lavadas, as membranas foram reveladas por quimioluminescência (Amersham ECL Western Blotting Detection Reagent, GE Healthcare Life Science). O peso molecular foi determinado utilizando padrões de peso molecular conhecido (Kaleidoscope Prestained Standards, BioRad).

2.5 Análise estatística

Os resultados foram analisados por Análise de Variância (ANOVA) seguido de Dunnet através do software GraphPad Prism1 version 5.00 (GraphPad Software, San Diego, California, USA).

3 Resultados

3.1 Efeito da clorofilina nas alterações produzidas pela Dox, EDLF e BaP no ciclo celular

A fim de investigar o efeito da Chl nas alterações causadas pelos agentes Dox, EDLF e BaP no ciclo celular, foi realizada a análise da distribuição das células HeLa nas fases G1, S, G2 e Sub G1 por citometria de fluxo.

Os tratamentos com Chl 100 e 200 μM por 24, 48 e 72 h não causaram alterações significativas na distribuição das fases do ciclo celular, como pode ser observado na figura 1. O tratamento apenas com a Dox 0,1 μM causou a retenção das células na fase G2/M e consequentemente, uma grande redução das células na fase G1, em 24, 48 e 72 h (fig. 1).

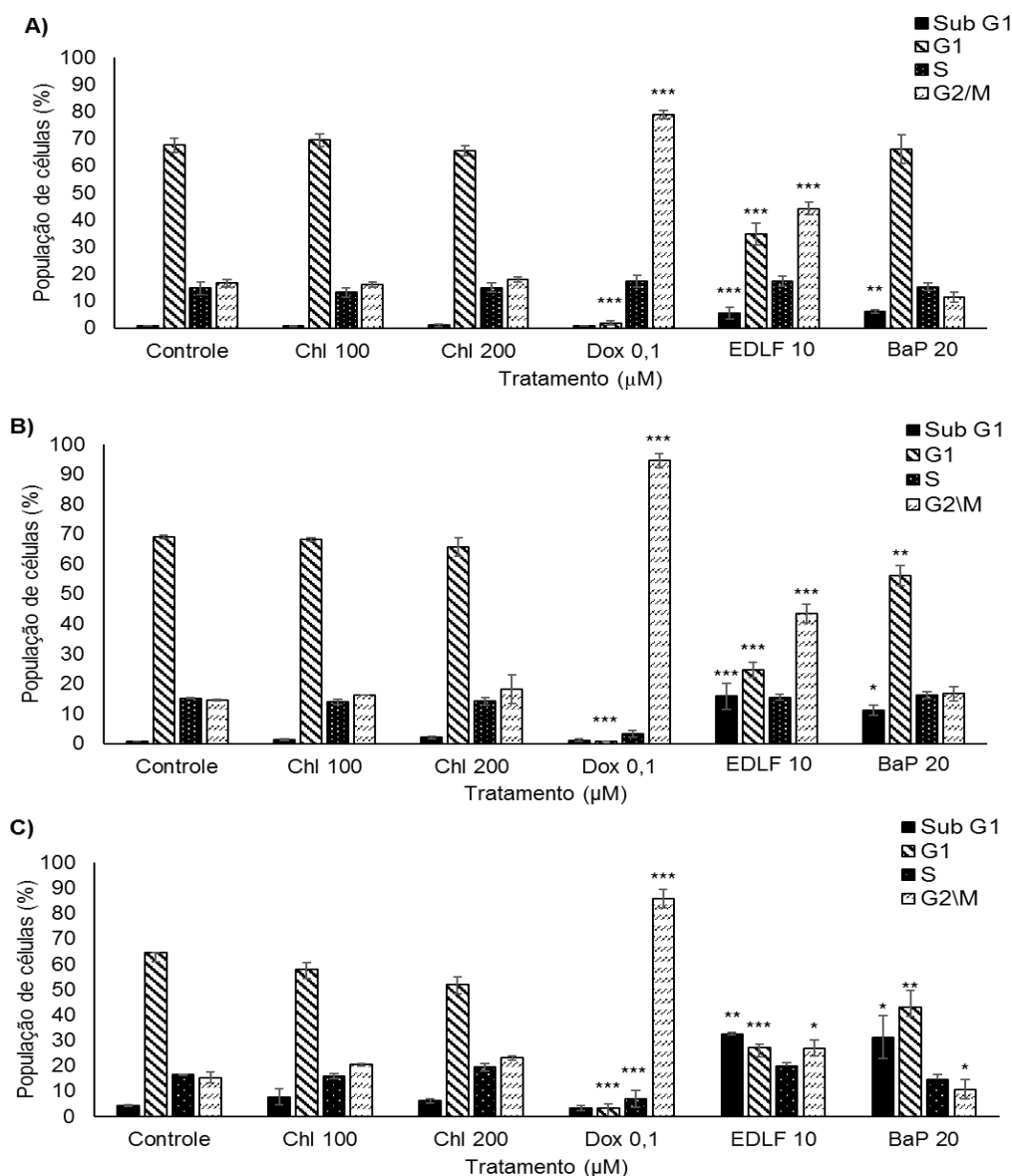


Figura 1. Análise da distribuição do ciclo celular por citometria de fluxo (G1, S, G2 e Sub G1). Efeitos dos tratamentos com Chl 100 μM e 200 μM , Dox 0,1 μM , EDLF 10 μM e BaP 20 μM nos seguintes tempos: A) após 24 h; B) após 48 h e C) após 72 h. Os dados são apresentados como a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, comparado ao grupo controle por ANOVA seguida de Dunnett.

Nos tratamentos associados, a Chl foi capaz de interferir nas alterações causadas pela Dox 0,1 μM . A maior concentração (Chl 200 μM), levou ao aumento da população de células em G1 e reduziu G2/M em 24, 48 e 72 h, esse efeito foi mais eficiente em 24 h (Fig. 2).

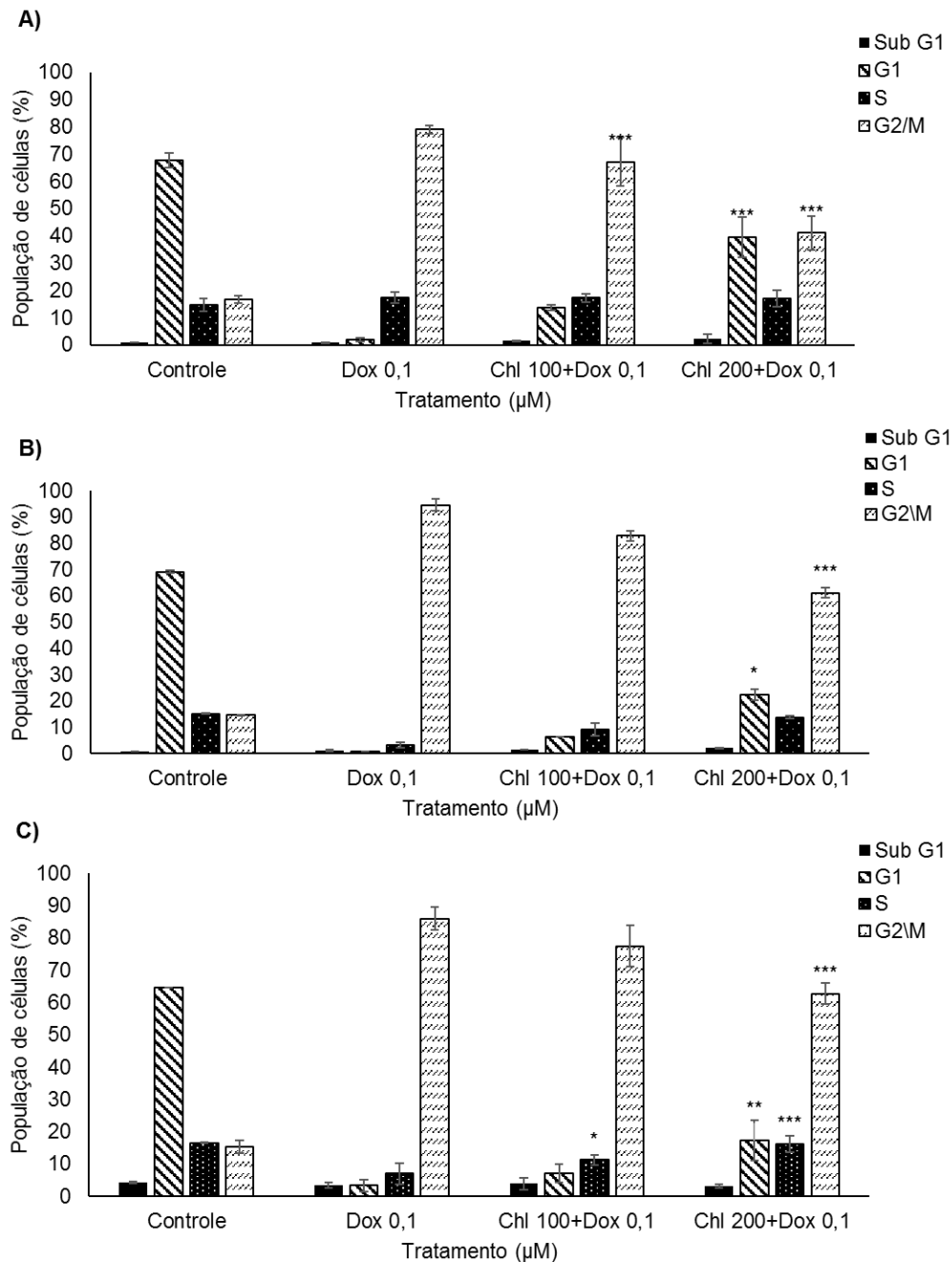


Figura 2. Análise da distribuição do ciclo celular por citometria de fluxo (G1, S, G2 e Sub G1). Efeitos dos tratamentos com Dox 0,1 μM ; Chl 100 μM +Dox 0,1 μM e Chl 200 μM +Dox 0,1 μM nos seguintes tempos: A) após 24 h; B) após 48 h e C) após 72 h. Os dados são apresentados como a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes com * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, comparado a Dox por ANOVA seguida de Dunnett.

O composto antitumoral EDLF na concentração de 20 μM , induziu a retenção das células na fase G2/M do ciclo celular, com uma concomitante diminuição da percentagem de células na fase G1, nos três tempos testados. Causou ainda um aumento da percentagem de células apoptóticas (Sub G1) de maneira tempo-dependente: de 0,9% para 5,5 % em 24 h; de 0,8 % para 15,9 % em 48 h e de 4,3 % para 32,6 % em 72 h (Fig. 1). Em relação aos tratamentos associados, a Chl também interferiu nas alterações causadas pela EDLF 20 μM . A Chl 100 μM levou ao aumento da população de células em G1 em 24 e 48 h e à redução em Sub G1, após 48 h. Na presença da Chl 200 μM , foi observado um aumento em G1 e redução de G2/M em 24 e 48 h. E após 48 h, a Chl 200 μM reduziu de maneira significativa a população de células em Sub G1 (Fig 3).

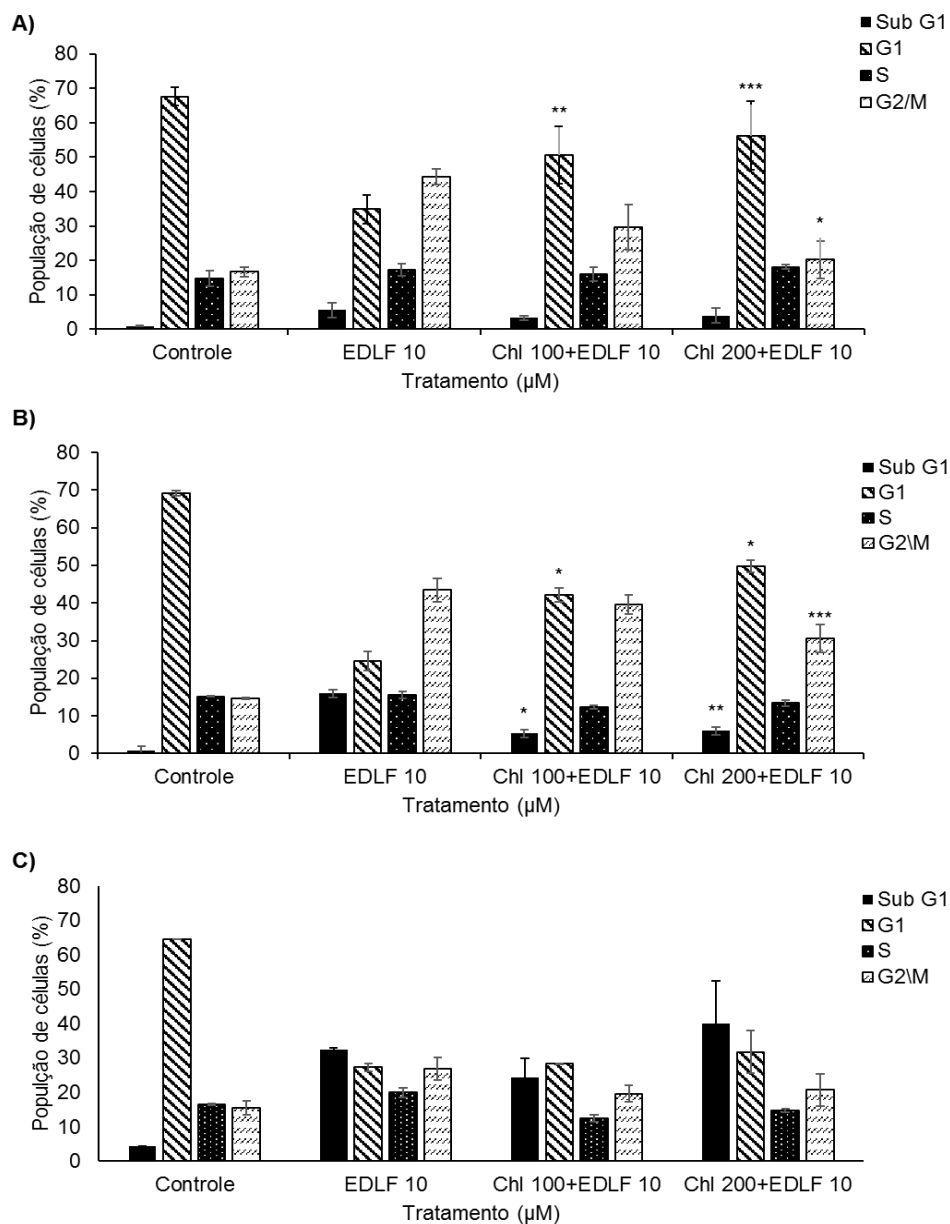


Figura 3. Análise da distribuição do ciclo celular por citometria de fluxo (G1, S, G2 e Sub G1). Efeitos dos tratamentos com EDLF 10 μM ; Chl 100 μM + EDLF 10 μM e Chl 200 μM + EDLF 10 μM nos seguintes tempos: A) após 24 h; B) após 48 h e C) após 72 h. Os dados são apresentados como a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes com * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, comparado a EDLF por ANOVA seguida de Dunnett.

A exposição ao agente mutagênico BaP causou aumento na população de células em Sub G1 de maneira tempo-dependente para: 6,2% em 24 h; 11,2% em 48 h e 31,2% em 72 h de tratamento. Quando combinada ao BaP, a Chl (100 e 200 μM) foi capaz de inibir seu efeito pró-apoptótico, reduzindo a população de células em Sub G1 nos períodos de 48 e 72 h de exposição (Fig. 4).

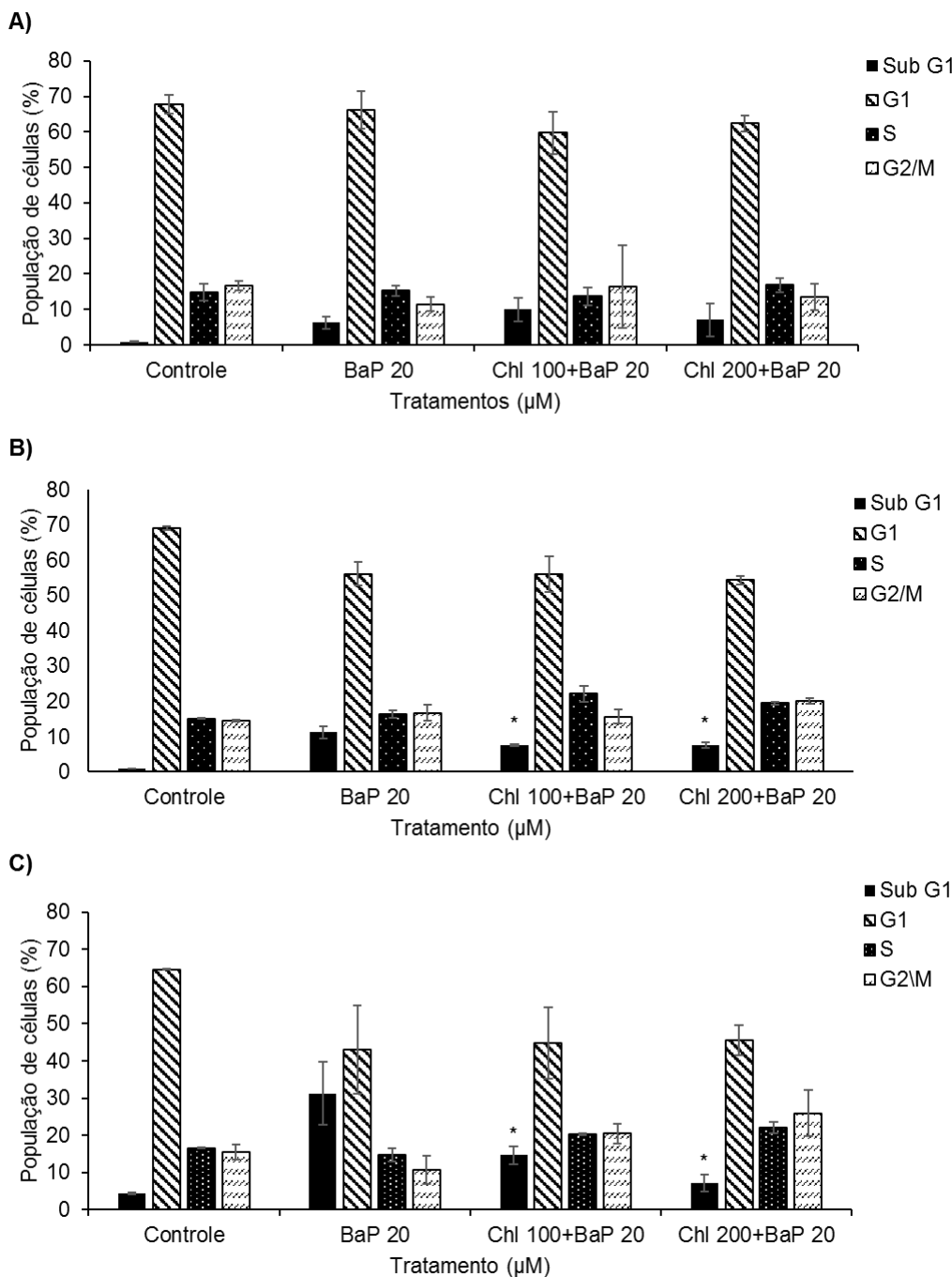


Figura 4. Análise da distribuição do ciclo celular por citometria de fluxo (G1, S, G2 e Sub G1). Efeitos dos tratamentos com BaP 20 μM ; Chl 100 μM + BaP 20 μM e Chl 200 μM + BaP 20 μM nos seguintes tempos: A) após 24 h; B) após 48 h e C) após 72 h. Os dados são apresentados como a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, comparado ao BaP por ANOVA seguida de Dunnett.

3.3 Efeito da Chl na expressão de proteínas relacionados aos processos de morte celular por apoptose e autofagia.

Para investigar se os efeitos da Chl sozinha e quando combinada aos diferentes agentes citotóxicos estavam relacionados com a inibição da morte celular por apoptose e/ou autofagia, realizou-se a análise das proteínas LC3 e PARP por ensaio de Western blot.

Nos tratamentos apenas com a Chl 200 μM não houve a presença da forma lipidada LC3-II (Fig. 5). Apenas os tratamentos com a EDLF 10 μM sozinha e em associação com a Chl 200 μM induziram a expressão da LC3-II em 24 e 48 h. A proteína PARP também foi avaliada, a figura 5 mostra a presença da forma clivada nos tratamentos com Chl 200 μM e Dox 0,1 μM e forte aumento nos tratamentos com EDLF 10 μM e BaP 20 μM quando comparados ao controle. Em relação aos tratamentos associados, a Chl 200 μM quando combinada ao BaP reduziu a formação de PARP clivada, apenas em 24 h (Fig. 5).

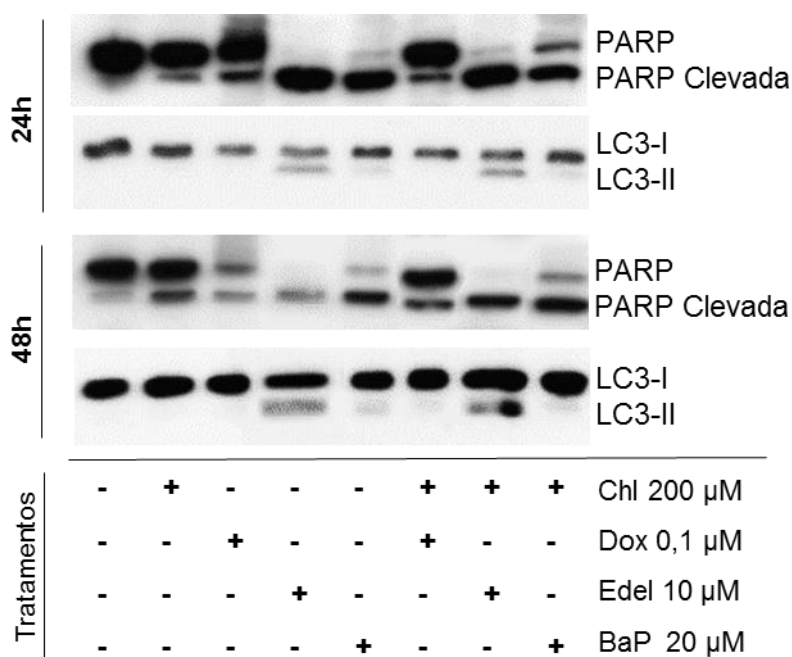


Figura 5. Análise de Western blot dos marcadores de morte celular por apoptose e autofagia em extrato de células HeLa. Os níveis das proteínas PARP e LC3 foram detectados por imunoblotting após 24 e 48 horas de exposição aos tratamentos: Chl 200 μM ; Dox 0,1 μM ; BaP 20 μM , EDLF 10 μM e associados: Chl 200 μM +Dox 0,1 μM ; Chl 200 μM +BaP 20 μM e Chl 200 μM +EDLF 10 μM .

4 Discussão

A cada ano, descobertas sobre os mecanismos pelos quais os constituintes da dieta podem impedir o desenvolvimento do câncer são publicadas, sendo que a regulação do ciclo celular e indução de morte celular são assuntos de grande interesse da área. O desafio em descobrir constituintes quimiopreventivos seguros advindos da dieta é considerável, contudo, os benefícios futuros são de grande valor.

A Chl é capaz de atuar como protetora contra diversos agentes mutagênicos e carcinogênicos. Dessa maneira, foram propostos diferentes mecanismos por meio dos quais a Chl pode inibir os danos induzidos por esses agentes. Esses mecanismos incluem: a atividade antioxidante, sua capacidade em interagir com grupos ativos de mutágenos e de formar complexos com diferentes compostos, além da ativação das vias de detoxificação de xenobióticos (NAGINI et al., 2015). No entanto, estudos sobre os efeitos da Chl nos processos de ciclo celular e morte celular ainda são escassos. O presente estudo, investigou o potencial protetor da Chl contra as alterações produzidas por três agentes citotóxicos com diferentes mecanismos de ação. Foram, portanto, analisados seu efeito isolado e em associação com a Dox, EDLF e BaP nos processos de proliferação e morte celular.

O presente estudo, demonstrou que a Chl foi capaz de reduzir o efeito citostático (parada em G2/M) dos agentes antitumorais Dox e EDLF e do efeito citotóxico (indução de morte celular) da EDLF e BaP. Sabe-se que os agentes utilizados no presente estudo alteram a distribuição das fases do ciclo celular e induzem morte celular em resposta à sua toxicidade (GAJATE; MOLLINEDO, 2002, TACAR et al., 2013, STELLAS et al., 2014), entretanto, os principais mecanismos pelos quais cada um atua na célula são diferentes. E este fator, reforça a hipótese de que a Chl pode atuar contra agentes que possuem naturezas e mecanismos de ação distintos.

Como esperado, a Dox na concentração de 0,1 μM alterou a distribuição das fases do ciclo celular, levando a um aumento da população de células em G2/M. Este efeito era esperado uma vez que a Dox é mais ativa nas células em proliferação nas fases S e G2/M devido à expressão máxima da sua enzima alvo, TOPO II, nestas fases (LING et al., 1996). Apesar de modificar a distribuição das células nas fases do ciclo celular, quando comparada ao tratamento apenas com a Dox, a associação com a Chl não foi capaz de fazer com que o ciclo recuperasse sua distribuição para próxima do controle. A presença da forma clivada da proteína PARP no tratamento associado, sugere que a Chl não foi eficiente em proteger as células contra a indução de morte por apoptose causadas pela Dox. Este resultado pode estar relacionado com a resposta ao dano celular, não havendo reparo das células em G2/M, estas podem ser encaminhadas para a apoptose para sua eliminação (JOHNSON; SHAPIRO, 2010).

Estudos anteriores *in vivo* e *in vitro* mostraram que a Chl foi capaz de atuar como protetora contra os efeitos causados por potentes agentes antitumorais que atuam

principalmente a nível de DNA, como a: ciclofosfamida, bleomicina, cisplatina, 5-fluorouracil e a doxorubicina (TE et al., 1997, GENTILE et al., 1998, NOSHY; HAMAD, 2013). Entretanto, supõe-se que este seja o primeiro estudo com a Chl combinada a um composto da natureza da EDLF, um lipídeo antitumoral, que atua principalmente a nível de membrana (GAJATE; MOLLINEDO, 2002).

A Chl combinada ao composto antitumoral EDLF, apresentou efeito protetor tempo-dependente, sendo que, em 24 h a presença da maior concentração da Chl (200 μ M) manteve a distribuição do ciclo mais próxima do controle. Entretanto, após 72 h o tratamento associado não apresentou efeito significativo. Apesar de reduzir a população de células em Sub G1, foi observada a presença da forma clivada da proteína PARP e da proteína LC3-II no tratamento associado com a Chl 200 μ M. A presença das proteínas no tratamento associado, sugere que, a expressão das proteínas pode estar antecedendo as alterações morfológicas (a apoptose é detectada por meio da fragmentação do DNA). O que pode ser demonstrado pelo tratamento associado com a Chl 200 μ M após 72 h, o qual, não foi capaz de reduzir a população em Sub G1, que representa as células apoptóticas.

Ardelt e colaboradores (2001) também investigaram o potencial protetor da Chl quando associada a diferentes compostos, a mostarda de quinacrina e mostarda de nitrogênio. Ambas causaram retenção das células em G2/M e induziram apoptose nas células tumorais HL-60 e MCF-7. Nos tratamentos associados, a Chl (0,22 M) protegeu as células dos efeitos citotóxicos e citostáticos da mostarda de quinacrina, entretanto, não foi eficiente contra a mostarda de nitrogênio.

Estudos demonstraram o potencial protetor da Chl em associação com diferentes mutágenos ambientais, dentre eles, os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, como o dibenzo(a)pireno (REDDY et al., 1999); e as aminas heterocíclicas, como a 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo-[4,5-b]piridina (SUGIYAMA et al., 1996) e 2- amino-3-metilimidazol [4,5-f] quinolina (DASHWOOD; GUO, 1992). Os autores atribuíram a proteção, principalmente, a capacidade que a Chl possui de formar complexos com os compostos mutagênicos, impedindo assim, sua interação com o material genético. No presente estudo, o BaP aumentou significativamente a porcentagem de células apoptóticas (Sub G1), o que corrobora com o forte aumento da PARP clivada. Quando associada ao BaP, a Chl foi capaz de inibir a indução da morte celular por apoptose, o que pode ser verificado por meio da redução das células apoptóticas e dos níveis de PARP clivada.

Alguns autores propuseram que a estrutura aromática dos agentes seria necessária para conferir sensibilidade a Chl (ARIMOTO et al., 1993, DASHWOOD et al., 1996, ARDELT et al., 2001). Por outro lado, estudos demonstraram o potencial protetor da Chl contra agentes com diferentes estruturas e mecanismos de ação (PIETRZAK et al., 2003, PIETRZAK et al., 2006, ZHANG et al., 2008), o que está de acordo com o presente estudo.

Portanto, a presença da Chl reduziu os efeitos dos três diferentes agentes na distribuição das fases do ciclo celular e fragmentação do DNA (apoptose). Contudo, sua eficiência parece estar relacionada com o tempo de exposição e também com o tipo do agente a ela associado. Assim como na literatura, os resultados sugerem que seu efeito pode apresentar maior ou menor efetividade dependendo da natureza e/ou mecanismo do composto a qual está associada.

Agradecimentos

Programa Ciência sem Fronteiras/CNPq, Capes e Fundação Araucária.

5 Referências

ARDELT, B.; KUNICKI, J.; TRAGANOS, F.; DARZYNKIEWICZ, Z. Chlorophyllin protects cells from the cytostatic and cytotoxic effects of quinacrine mustard but not of nitrogen mustard. **Int J Oncol**, v. 18(4), p. 849-853, 2001.

ARIMOTO, S.; FUKUOKA, S.; ITOME, C.; NAKANO, H.; RAI, H.; HAYATSU, H. Binding of polycyclic planar mutagens to chlorophyllin resulting in inhibition of the mutagenic activity. **Mutat Res**, v. 287(2), p. 293-305, 1993.

DASHWOOD, R.; GUO, D. Inhibition of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ)-DNA binding by chlorophyllin: studies of enzyme inhibition and molecular complex formation. **Carcinogenesis**, v. 13(7), p. 1121-1126, 1992.

DASHWOOD, R.; YAMANE, S.; LARSEN, R. Study of the forces of stabilizing complexes between chlorophylls and heterocyclic amine mutagens. **Environ Mol Mutagen**, v. 27(3), p. 211-218, 1996.

GAJATE, C.; MOLLINEDO, F. Biological activities, mechanisms of action and biomedical prospect of the antitumor ether phospholipid ET-18-OCH(3) (edelfosine), a proapoptotic agent in tumor cells. **Curr Drug Metab**, v. 3(5), p. 491-525, 2002.

GENTILE, J. M.; RAHIMI, S.; ZWIESLER, J.; GENTILE, G. J.; FERGUSON, L. R. Effect of selected antimutagens on the genotoxicity of antitumor agents. **Mutat Res**, v. 402(1-2), p. 289-298, 1998.

HAYATSU, H.; SUGIYAMA, C.; ARIMOTO-KOBAYASHI, S.; NEGISHI, T. Porphyrins as possible preventers of heterocyclic amine carcinogenesis. **Cancer Lett**, v. 143(2), p. 185-187, 1999.

JOHNSON, N.; SHAPIRO, G. I. Cyclin-dependent kinases (cdks) and the DNA damage response: rationale for cdk inhibitor-chemotherapy combinations as an anticancer strategy for solid tumors. **Expert Opin Ther Targets**, v. 14(11), p. 1199-1212, 2010.

KASALA, E. R.; BODDULURU, L. N.; BARUA, C. C.; SRIRAM, C. S.; GOGOI, R. Benzo(a)pyrene induced lung cancer: Role of dietary phytochemicals in chemoprevention. **Pharmacol Rep**, v. 67(5), p. 996-1009, 2015.

LING, Y. H.; EL-NAGGAR, A. K.; PRIEBE, W.; PEREZ-SOLER, R. Cell cycle-dependent cytotoxicity, G2/M phase arrest, and disruption of p34cdc2/cyclin B1 activity induced by doxorubicin in synchronized P388 cells. **Mol Pharmacol**, v. 49(5), p. 832-841, 1996.

- MEIYANTO, E.; HERMAWAN, A.; ANINDYAJATI. Natural products for cancer-targeted therapy: citrus flavonoids as potent chemopreventive agents. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 13(2), p. 427-436, 2012.
- MOLLINEDO, F.; FERNANDEZ, M.; HORNILLOS, V.; DELGADO, J.; AMAT-GUERRI, F.; ACUNA, A. U.; NIETO-MIGUEL, T.; VILLA-PULGARIN, J. A.; GONZALEZ-GARCIA, C.; CENA, V.; GAJATE, C. Involvement of lipid rafts in the localization and dysfunction effect of the antitumor ether phospholipid edelfosine in mitochondria. **Cell Death Dis**, v. 2, p. e158, 2011.
- NAGINI, S.; PALITTI, F.; NATARAJAN, A. T. Chemopreventive potential of chlorophyllin: a review of the mechanisms of action and molecular targets. **Nutr Cancer**, v. 67(2), p. 203-211, 2015.
- NOSHY, M. M.; HAMAD, H. R. Chlorophyllin Protects Against Cisplatin and 5-Fluorouracil Regimen Induced Genotoxicity and Cytotoxicity Without Affecting Their Antitumor Activity. **Academic Journal of Cancer Research**, v. 6(2), p. 90-98, 2013.
- OLVERA, O.; ARCEO, C.; ZIMMERING, S. Chlorophyllin [CHLN] and the mutagenicity of monofunctional alkylating agents in *Drosophila*: the action of CHLN need not include an influence on metabolic activation. **Mutat Res**, v. 467(2), p. 113-117, 2000.
- PIETRZAK, M.; WIECZOREK, Z.; STACHELSKA, A.; DARZYNKIEWICZ, Z. Interactions of chlorophyllin with acridine orange, quinacrine mustard and doxorubicin analyzed by light absorption and fluorescence spectroscopy. **Biophys Chem**, v. 104(1), p. 305-313, 2003.
- PIETRZAK, M.; WIECZOREK, Z.; WIECZOREK, J.; DARZYNKIEWICZ, Z. The "interceptor" properties of chlorophyllin measured within the three-component system: intercalator-DNA-chlorophyllin. **Biophys Chem**, v. 123(1), p. 11-19, 2006.
- REDDY, A. P.; HARTTIG, U.; BARTH, M. C.; BAIRD, W. M.; SCHIMERLIK, M.; HENDRICKS, J. D.; BAILEY, G. S. Inhibition of dibenzo[a,h]pyrene-induced multi-organ carcinogenesis by dietary chlorophyllin in rainbow trout. **Carcinogenesis**, v. 20(10), p. 1919-1926, 1999.
- STELLAS, D.; SOULIOTIS, V. L.; BEKYROU, M.; SMIRLIS, D.; KIRSCH-VOLDERS, M.; DEGRASSI, F.; CUNDARI, E.; KYRTOPOULOS, S. A. Benzo[a]pyrene-induced cell cycle arrest in HepG2 cells is associated with delayed induction of mitotic instability. **Mutat Res**, v. 769, p. 59-68, 2014.
- SUGIYAMA, C.; SHINODA, A.; HAYATSU, H.; NEGISHI, T. Inhibition of 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline-mediated DNA-adduct formation by chlorophyllin in *Drosophila*. **Jpn J Cancer Res**, v. 87(4), p. 325-328, 1996.
- TACAR, O.; SRIAMORNSAK, P.; DASS, C. R. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. **J Pharm Pharmacol**, v. 65(2), p. 157-170, 2013.
- TACHINO, N.; GUO, D.; DASHWOOD, W. M.; YAMANE, S.; LARSEN, R.; DASHWOOD, R. Mechanisms of the in vitro antimutagenic action of chlorophyllin against benzo[a]pyrene: studies of enzyme inhibition, molecular complex formation and degradation of the ultimate carcinogen. **Mutat Res**, v. 308(2), p. 191-203, 1994.
- TE, C.; GENTILE, J. M.; BAGULEY, B. C.; PEARSON, A. E.; GREGORY, T.; FERGUSON, L. R. In vivo effects of chlorophyllin on the antitumour agent cyclophosphamide. **Int J Cancer**, v. 70(1), p. 84-89, 1997.
- ZHANG, Y.; GUAN, L.; WANG, X.; WEN, T.; XING, J.; ZHAO, J. Protection of chlorophyllin against oxidative damage by inducing HO-1 and NQO1 expression mediated by PI3K/Akt and Nrf2. **Free Radic Res**, v. 42(4), p. 362-371, 2008.
- ZHANG, Y. L.; GUAN, L.; ZHOU, P. H.; MAO, L. J.; ZHAO, Z. M.; LI, S. Q.; XU, X. X.; CONG, C. C.; ZHU, M. X.; ZHAO, J. Y. [The protective effect of chlorophyllin against oxidative damage and its mechanism]. **Zhonghua Nei Ke Za Zhi**, v. 51(6), p. 466-470, 2012.

7 Considerações finais

Muitas evidências indicam a eficácia da suplementação com a Chl na redução de doenças, como por exemplo, o câncer. Contudo, estudos aprofundados são necessários, para uma melhor caracterização dos seus efeitos como composto quimioprotetor.

Os resultados do presente estudo demonstraram o potencial quimioprotetor da clorofilina contra os efeitos tóxicos dos agentes antitumorais doxorrubicina e edelfosina e do mutágeno ambiental benzo(a)pireno, na proliferação e morte celular. Este potencial foi verificado em dois modelos experimentais *in vitro* bem estabelecidos, a linhagem metabolizadora de câncer de fígado, HepG2/C3A e a linhagem não metabolizadora de câncer cervical, HeLa.

Os dados reforçam a capacidade que a clorofilina possui para alterar a resposta celular de agentes com diferentes origens e mecanismos de ação. Assim, apesar da sua utilização como suplemento alimentar devido ao seu potencial quimioprotetor, a Chl pode afetar a eficácia das drogas antitumorais, o que demonstra a necessidade de que as possíveis combinações sejam testadas.

O desenvolvimento de novas pesquisas poderá auxiliar os profissionais de saúde a responder as questões sobre dieta e suplementação alimentar. É necessário ainda, mais conhecimento sobre as concentrações dos agentes quimioprotetores e sobre seus mecanismos que podem impedir o desenvolvimento do câncer.

8 Apêndice

Tabela 1. Valores de Índice Celular (IC) obtidos pelo sistema xCELLigence-RTCA. Os dados foram normalizados no tempo de adição dos tratamentos. O IC foi mensurado a cada 30 min e os dados são apresentados como média \pm desvio padrão de três replicatas.

Tratamento	Tempo (Horas)				
	0	24	48	72	96
Controle	0,830 \pm 0,02	2,035 \pm 0,14	3,913 \pm 0,10	4,176 \pm 0,10	4,405 \pm 0,13
Chl 25 μ M	1,003 \pm 0,16	2,768 \pm 0,20	4,036 \pm 0,06	4,193 \pm 0,03	4,567 \pm 0,09
Chl 50 μ M	0,859 \pm 0,05	2,271 \pm 0,22	3,440 \pm 0,30	3,646 \pm 0,28	4,154 \pm 0,21
Chl 100 μ M	0,765 \pm 0,05	1,765 \pm 0,11	3,457 \pm 0,28	4,093 \pm 0,39	4,731 \pm 0,30
Chl 200 μ M	0,845 \pm 0,18	1,305 \pm 0,27	3,137 \pm 0,54	4,309 \pm 0,59	4,688 \pm 0,62
Chl 300 μ M	0,904 \pm 0,16	1,197 \pm 0,13	2,187 \pm 0,38	2,854 \pm 0,41	2,960 \pm 0,40
Dox 3 μ M	0,826 \pm 0,16	1,881 \pm 0,47	0,465 \pm 0,27	0,235 \pm 0,17	0,166 \pm 0,12
Chl 25 μ M +Dox 3 μ M	0,956 \pm 0,18	2,562 \pm 0,45	1,299 \pm 0,22	0,808 \pm 0,23	0,569 \pm 0,21
Chl 50 μ M +Dox 3 μ M	0,807 \pm 0,11	2,463 \pm 0,36	1,749 \pm 0,34	1,234 \pm 0,24	0,934 \pm 0,19
Chl 100 μ M +Dox 3 μ M	0,840 \pm 0,06	3,295 \pm 0,31	2,435 \pm 1,24	1,722 \pm 1,01	1,241 \pm 0,79
Chl 200 μ M +Dox 3 μ M	0,862 \pm 0,06	2,920 \pm 0,58	2,165 \pm 0,41	1,571 \pm 0,12	1,088 \pm 0,13
Chl 300 μ M + Dox 3 μ M	0,808 \pm 0,15	1,584 \pm 0,20	1,469 \pm 0,30	0,881 \pm 0,16	1,013 \pm 0,33
BaP 20 μ M	0,899 \pm 0,04	2,711 \pm 0,12	1,907 \pm 0,24	0,646 \pm 0,03	0,351 \pm 0,01
Chl 25 μ M +BaP 20 μ M	1,060 \pm 0,08	3,029 \pm 0,22	3,929 \pm 0,49	2,662 \pm 0,85	1,824 \pm 0,71
Chl 50 μ M +BaP 20 μ M	0,884 \pm 0,07	2,366 \pm 0,18	3,535 \pm 0,24	3,236 \pm 0,39	2,748 \pm 0,41
Chl 100 μ M +BaP 20 μ M	0,848 \pm 0,05	2,031 \pm 0,17	3,241 \pm 0,18	3,646 \pm 0,27	3,318 \pm 0,20
Chl 200 μ M +BaP 20 μ M	0,903 \pm 0,10	1,371 \pm 0,17	1,998 \pm 0,15	2,489 \pm 0,24	2,203 \pm 0,43
Chl 300 μ M +BaP 20 μ M	0,725 \pm 0,06	1,211 \pm 0,11	0,979 \pm 0,10	1,404 \pm 0,39	0,727 \pm 0,14

Tabela 2. Análise de morte celular das células HepG2/C3A por citometria de fluxo. Porcentagem da população de células viáveis (LL), em apoptose inicial (LR) e apoptose tardia/necrose (UR/UL) após 24 h de tratamento com Chl 100 e Chl 200 μ M; Dox 0,1 μ M e Chl 100 μ M e 200 μ M associada à Dox 0,1 μ M. As médias da porcentagem de três experimentos independentes foram comparadas por ANOVA seguida de Dunnett, *P<0.05 médias com diferenças significativas em relação ao grupo controle e #P<0.05 em relação a Dox.

Tratamentos	Viáveis (LL)	Apop. Tardia /necrose (UL/UR)	Apop. Inicial (LR)
Controle	82,5 \pm 1,3	16,2 \pm 0,2	1,6 \pm 0,4
Chl 100 μ M	72,6 \pm 1,2	25,2 \pm 2,2	2,2 \pm 0,5
Chl 200 μ M	73,3 \pm 2,0	27,3 \pm 1,2	1,9 \pm 0,4
Dox 0,1 μ M	51,7 \pm 6,7*	44,9 \pm 8,5*	4,5 \pm 0,3*
Chl 100 μ M+Dox 0,1 μ M	70,5 \pm 1,6* #	31,2 \pm 3,7*#	1,9 \pm 0,1#
Chl 200 μ M+Dox 0,1 μ M	71,8 \pm 1,1*#	26,6 \pm 4,2 #	1,6 \pm 0,3#

Tabela 3. Expressão relativa normalizada com o gene de referência *GAPDH*. Os valores de *fold change* representam quantas vezes o gene foi menos expresso em relação ao grupo controle.

Gene	Tratamento	Expressão	Std. Error	P(H1)	Resultado	Fold change
CCNA2	Chl 200 µM	0,41	0,302 - 0,515	0,00	DOWN	-2,46
	Dox 3 µM	0,05	0,041 - 0,060	0,04	DOWN	-20,0
	Chl 200 µM+Dox 3 µM	0,04	0,021 - 0,058	0,00	DOWN	-25,0
	BaP 20 µM	0,11	0,078 - 0,145	0,00	DOWN	-8,93
	Chl 200 µM+BaP 20 µM	0,07	0,046 - 0,121	0,04	DOWN	-14,1
CCNB1	Chl 200 µM	0,59	0,533 - 0,638	0,06		-1,70
	Dox 3 µM	0,19	0,177 - 0,207	0,04	DOWN	-5,26
	Chl 200 µM+Dox 3 µM	0,14	0,104 - 0,191	0,00	DOWN	-7,25
	BaP 20 µM	0,23	0,209 - 0,247	0,00	DOWN	-4,41
	Chl 200 µM+BaP 20 µM	0,15	0,098 - 0,269	0,00	DOWN	-6,62
CCND1	Chl 200 µM	0,71	0,553 - 0,867	0,12		-1,41
	Dox 3 µM	0,18	0,134 - 0,251	0,04	DOWN	-5,56
	Chl 200 µM+Dox 3 µM	0,31	0,252 - 0,393	0,00	DOWN	-3,22
	BaP 20 µM	0,26	0,175 - 0,394	0,00	DOWN	-3,86
	Chl 200 µM+BaP 20 µM	0,15	0,117 - 0,196	0,02	DOWN	-6,71
CCNE1	Chl 200 µM	0,80	0,730 - 0,866	0,02		-1,26
	Dox 3 µM	0,54	0,366 - 0,773	0,05	DOWN	-1,87
	Chl 200 µM+Dox 3 µM	0,44	0,379 - 0,489	0,03	DOWN	-2,29
	BaP 20 µM	0,46	0,354 - 0,602	0,03	DOWN	-2,16
	Chl 200 µM+BaP 20 µM	0,37	0,281 - 0,441	0,08	DOWN	-2,70
CDK1	Chl 200 µM	0,43	0,294 - 0,613	0,02	DOWN	-2,33
	Dox 3 µM	0,26	0,196 - 0,388	0,02	DOWN	-3,79
	Chl 200 µM+Dox 3 µM	0,15	0,100 - 0,252	0,00	DOWN	-6,62
	BaP 20 µM	0,40	0,313 - 0,520	0,00	DOWN	-2,53
	Chl 200 µM+BaP 20 µM	0,29	0,239 - 0,372	0,02	DOWN	-3,44
CDK2	Chl 200 µM	0,14	0,099 - 0,201	0,00	DOWN	-6,94
	Dox 3 µM	0,22	0,141 - 0,329	0,07	DOWN	-4,46
	Chl 200 µM+Dox 3 µM		0,405 - 0,621	0,02	DOWN	-2,01
	BaP 20 µM	0,31	0,240 - 0,384	0,05	DOWN	-3,19
	Chl 200 µM+BaP 20 µM	0,18	0,145 - 0,221	0,02	DOWN	-5,65
BAX	Chl 200 µM	0,79	0,591 - 1,079	0,23		-1,27
	Dox 3 µM	0,24	0,177 - 0,316	0,04	DOWN	-4,20
	Chl 200 µM+Dox 3 µM	0,56	0,467 - 0,625	0,04	DOWN	-1,80
	BaP 20 µM	0,54	0,347 - 0,795	0,00	DOWN	-1,85
	Chl 200 µM+BaP 20 µM	0,47	0,415 - 0,552	0,08	DOWN	-2,12
CASP7	Chl 200 µM	0,65	0,514 - 0,815	0,01		-1,53
	Dox 3 µM	0,26	0,181 - 0,359	0,04	DOWN	-3,92
	Chl 200 µM+Dox 3 µM	0,22	0,106 - 0,412	0,03	DOWN	-4,48
	BaP 20 µM	0,55	0,456 - 0,726	0,00	DOWN	-1,81
	Chl 200 µM+BaP 20 µM	0,42	0,399 - 0,440	0,00	DOWN	-2,39
TP53	Chl 200 µM	1,08	0,793 - 1,629	0,85		-0,92
	Dox 3 µM	0,31	0,233 - 0,446	0,03	DOWN	-3,23
	Chl 200 µM+Dox 3 µM	0,40	0,311 - 0,512	0,03	DOWN	-2,51
	BaP 20 µM	0,32	0,239 - 0,419	0,00	DOWN	-3,16
	Chl 200 µM+BaP 20 µM	1,32	0,995 - 1,817	0,25		-0,76