



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

ERLÂNIA ALVES DE SIQUEIRA

PRODIGIOSINAS ISOLADAS DE MICRORGANISMOS ASSOCIADOS A
***Zoanthus sociatus* DO ARQUIPÉLAGO FERNANDO DE NORONHA COM**
POTENCIAL ANTICÂNCER

Fortaleza -CE

2018

ERLÂNIA ALVES DE SIQUEIRA

**PRODIGIOSINAS ISOLADAS DE MICRORGANISMOS ASSOCIADOS A
Zoanthus sociatus DO ARQUIPÉLAGO FERNANDO DE NORONHA COM
POTENCIAL ANTICÂNCER**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Diego Veras Wilke

FORTALEZA – CE

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S629p Siqueira, Erlânia Alves de.
POTENCIAL ANTICÂNCER DE PRODIGIOSINAS ISOLADAS DE MICRO-ORGANISMOS
ASSOCIADOS A *Zoanthus sociatus* DAS ILHAS OCEÂNICAS DO BRASIL / Erlânia Alves de Siqueira. –
2018.
92 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2018.
Orientação: Prof. Dr. Diego Veras Wilke.

1. Micro-organismos marinhos. 2. potencial antitumoral. 3. prodigiosinas. I. Título.

CDD 615.1

**PRODIGIOSINAS ISOLADAS DE MICRORGANISMOS ASSOCIADOS A
Zoanthus sociatus DO ARQUIPÉLAGO FERNANDO DE NORONHA COM
POTENCIAL ANTICÂNCER**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Diego Veras Wilke (Orientador)

Universidade Federal do Ceará - UFC

Profa. Dra. Paula Christine Jimenez

Universidade Federal de São Paulo- UNIFESP

Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Júnior

Universidade Federal do Ceará - UFC

AGRADECIMENTO

Agradeço em primeiro lugar a **Deus**, que iluminou meu caminho durante esta e muitas outras caminhadas na minha vida, sem ti não seria nada, Senhor;

Aos meus queridos pais **Antonia e Manoel**, pelo incentivo infinito e por sempre acreditarem em mim e nos meus sonhos;

Aos meus **11 irmãos e familiares de Bodocó-PE** que mesmo longe estão torcendo pelo meu sucesso, e sentem-se orgulhosos de mim;

Ao meu esposo **Genilson Gomes**, pelo amor, dedicação, paciência e por sempre me incentivar a continuar... obrigada pela companhia nas noites longas de estudos juntos, você sempre ao meu lado. Você é presente de Deus na minha vida;

Ao meu orientador **Diego Veras Wilke**, que acreditou e apostou em mim, por ter me recebido no Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia Marinha (LabbMar). Nessa “curta” e intensa jornada do mestrado aprendi e amadureci muito, e parte disso devo a ele, que nunca mediu esforços para discutir sobre a farmacologia, meus resultados e sobre novas ideias para o meu projeto de pesquisa, agradeço por sempre nos motivar a pensar mais, a acreditar no nosso potencial e por todo incentivo, paciência, amizade e ensinamentos, um exemplo de pessoa e profissional. Sou muito grata por tudo.

Aos colaboradores da química, **Profa. Dra Otília Pessoa**, pelo apoio em todos os aspectos, sejam financeiros como de aprendizagem, a aluna **Taynara Matos** pela grande ajuda nas rotaevaporações, e em especial ao doutorando **Alison Batista da Silva** ao **Dr Francisco das Chagas Lima Pinto**, por estar sempre dispostos a ajudar e pelos importantes ensinamentos na área química.

A **Bianca Del Bianco**, por toda ajuda nas análises do ensaio clonogênico. Por ter se mostrado bem solícita a me ajudar, sem nem ao menos me conhecer pessoalmente. Meus sinceros agradecimentos.

Gostariam de agradecer à **Unidade Multiusuário do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos** da Universidade Federal do Ceará pelo suporte técnico.

A Banca examinadora da qualificação e da dissertação de mestrado, pelas valiosas contribuições, aos professores **Dr. Pedro Magalhães, Dra. Deysi Tenazoa, Dra. Nylane Maria Nunes, Dr. Roberto Cesar e Dra. Paula Jimenez**.

A **Katharine Gurgel**, por não só ter me ajudado nas inúmeras vezes nos experimentos “Companheira de experimentos”, mas por desde quando entrei no Labbmar, mostrou-se ser uma grande amiga para todas as horas e momentos. De coração grato por Deus ter a

colocado em minha vida. Obrigada por todos os ensinamentos no percurso do meu aprendizado no laboratório!

A **Thais Brito**, pela colaboração nos experimentos de 16S, pela amizade e companheirismo nos experimentos que fazíamos sempre juntas, uma apoiando a sempre. Uma grande amiga, sei que posso contar com você sempre.

A todos os **amigos e colegas do Labbmar**, pelo companheirismo, convivência e amizade durante essa fase, **Alexia Assef, Andréa Oliveira, Kayanny Ferreira, Elthon Ferreira, Felipe Teles, Larissa Guimarães, Renan Saes, Camila Roque, Clara Nogueira, Danilo Maciel, Rhaynan Andrade**, aos ICs **Laura, Keilla, Evelline, Matheus e Rennata**. Aos técnicos e amigos, **Msc Giovanna Riello** e o **Dr Danilo Damasceno**, pela convivência e amizade, pela paciência em sempre ensinar e passar experiências valiosas, dentro e fora do laboratório, pelo carinho e apoio constantes, meu muito obrigada a todos de coração!

À **Adelânia**, pela amizade e por todo o cuidado, carinho e atenção, até parece que sentia quando estávamos bem ou não. Tornou-se uma pessoa muito especial para mim.

Aos meus colegas e grandes amigos que fiz em Fortaleza e que a farmacologia me deu, a **Jessica** e **Renan**, pelo companheirismo aos longos dias de estudos para a seleção do mestrado, para as disciplinas que fizemos juntos e pela linda amizade que ficou...estarão sempre no meu coração.

Aos colegas e amigos que a farmacologia meu deu, **Gabriela, Mariana, Letícia** e **Manuel**, pelas discussões sobre farmacologia e sobre a vida...sei que posso contar com vocês sempre.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**) pela bolsa de estudo concedida, e o apoio do projeto de pesquisa **PROSPECMAR**, o qual este trabalho faz parte.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para realização desse trabalho, meu muito obrigada!

Aos meus Pais, Irmãos e ao meu esposo Genilson. Obrigada pelo carinho, incentivo, paciência, e amor incondicional,

dedico.

*“A realização profissional, os títulos acadêmicos
e o dinheiro só terão valor se houver harmonia
na família, afinidade entre os amigos, serenidade
no amor e paz de espírito”*

RESUMO

PRODIGIOSINAS ISOLADAS DE MICRORGANISMOS ASSOCIADOS A *Zoanthus sociatus* DO ARQUIPÉLAGO FERNANDO DE NORONHA COM POTENCIAL ANTICÂNCER. Aluna: Erlânia Alves de Siqueira. Orientador: Diego Veras Wilke. Dissertação de mestrado do Programa de pós-graduação em Farmacologia da UFC.

Câncer é uma das maiores causas de morte no mundo, é fundamentalmente uma doença genética, que aparece como consequência de mudanças patológicas na informação contida no DNA. Na tentativa de aumentar o arsenal de moléculas com potencial atividade terapêutica e incorporar o uso sustentável da biodiversidade ao processo de pesquisa e desenvolvimento de fármacos de origem marinha, os micro-organismos associados a animais marinhos passaram a ser amplamente estudados. Estes últimos são excelentes produtores de compostos com diversas atividades biológicas. O presente trabalho teve como objetivo prospectar substâncias com potencial antitumoral obtidas de micro-organismos associados a *Zoanthus sociatus* coletados nas ilhas oceânicas brasileiras. Neste trabalho, o potencial farmacológico da microbiota recuperada do *Zoanthus sociatus* coletado nas ilhas oceânicas do Brasil foi investigado em células tumorais em cultura. Dezenove cepas foram isoladas, sendo que 15 renderam extratos brutos (EB) com efeito antiproliferativo (inibição do crescimento > 75%) em células de câncer colorretal humano HCT116 na concentração de 50 µg/mL após 72h de incubação. O EB da linhagem BRA-535, apresentou IC₅₀ = 4,8 µg/mL e foi selecionada para prosseguir com a purificação dos princípios ativos e caracterização dos efeitos biológicos em células tumorais. Através de um fracionamento químico, isolou-se a estreptorubina B e a undecilprodigiosina, as duas pertencentes a classe das prodigiosinas, família de moléculas, conhecidas pelas suas propriedades anticancerígena, antimalárica, antimicrobiana e imunossupressora. A citotoxicidade das duas foi então investigada pelo ensaio do SRB, foram testadas em 3 linhagens tumorais (HCT116, B16-F10 e PC-3M) e em 2 linhagens não-tumoral (L929 e HEK293A). As duas substâncias isoladas, após 24, 48 e 72h, mostraram-se muito potentes na linhagem HCT116. A estreptorubina B nas concentrações de 5, 50 e 500 nM, foram testadas no ensaio clonogênico e reduziram significativamente o número de colônias (p<0,05) na concentração de 50 e 500 nM e na doxorrubicina. Observamos que as células de HCT 116 tratadas com estreptorubina B é excitada pelos lasers azul (488nm) e vermelho (633nm) causando emissão de fluorescência detectável em ambos os canais do laser vermelho e em detectores do laser azul. O laser violeta (405nm) não causou excitação das células tratadas com estreptorubina B nas concentrações e detectores utilizados. Os ensaios de mecanismo de ação prosseguiram com a estreptorubina B. Em relação a morfologia, observou-se aumento da picnose, em 24h de incubação, nas concentrações 500 e 1000 nM e 48h nas concentrações de 50 e 500 nM. Ocorreu aumento do número de células mortas, observado pelo ensaio de integridade de membrana utilizando o DAPI, assim como a diminuição da proliferação delas pelo ensaio de contagem celular. Não foi observado parada de ciclo celular em nenhuma fase. Ocorreu aumento da fragmentação de DNA das células de HCT116 tratadas com a estreptorubina Bem 48h de incubação. Usando a microscopia confocal, observamos que a estreptorubina B fica acumulada em organelas próximas ao núcleo nas células de HCT116, possivelmente em lisossomos ou retículo endoplasmático. Estreptorubina B e undecilprodigiosina apesar de ter sua ocorrência já descrita, nenhum trabalho com a estreptorubina B foi realizado para avaliar a sua atividade citotóxica em linhagens tumorais, podendo este ser o primeiro relato sobre suas propriedades induzindo alterações morfológicas e indução de fragmentação de DNA em células tumorais, abrindo assim a perspectiva de seu uso, auxiliando nos estudos relacionados ao câncer.

Palavras-chave: Micro-organismos marinhos, potencial antitumoral, prodigiosinas.

ABSTRACT

Prodigiosins isolated from microorganisms associated with zoanthus sociatus from the Fernando de Noronha Archipelago with anticancer potential

Master's Thesis of the Pharmacology Postgraduate Program of UFC

Cancer is one of the biggest causes of death in the world, it is fundamentally a genetic disease, which appears as a consequence of pathological changes in the information contained in the DNA. In an attempt to increase the arsenal of molecules with potential therapeutic activity and to incorporate the sustainable use of biodiversity to the process of research and development of drugs of marine origin, microorganisms associated with marine animals have been widely studied. The latter are excellent producers of compounds with diverse biological activities. The present work aimed to prospect substances with antitumor potential obtained from microorganisms associated to *Zoanthus sociatus* collected in the Brazilian oceanic islands. In this work, the pharmacological potential of the microorganism recovered from *Zoanthus sociatus* collected in the Brazilian oceanic islands was investigated in tumor cells in culture. Nineteen strains were isolated, 15 of which yielded crude extracts (EB) with antiproliferative effect (inhibition of growth > 75%) in HCT 116 human colorectal cancer cells at a concentration of 50 µg / mL after 72h of incubation. The EB of the BRA-535 line presented IC₅₀ = 4.8 µg / mL and was selected to proceed with the purification of the active principles and characterization of the biological effects in tumor cells. Through chemical fractionation, streptorubin B and undecylprodigiosin, the two belonging to the prodigiosin class, family of molecules known for their anticancer, antimalarial, antimicrobial and immunosuppressive properties were isolated. The cytotoxicity of the two was then investigated by the SRB assay, were tested in 3 tumor lines (HCT 116, B16-F10 and PC-3M) and in 2 non-tumoral lines (L929 and HEK293A). The two substances isolated after 24, 48 and 72 hours were very potent in the HCT 116 strain. Streptorubin B at concentrations of 5, 50 and 500 nM were tested in the clonogenic assay and significantly reduced the number of colonies ($p < 0.05$) at the concentration of 50 and 500 nM and doxorubicin. We observed that streptorubin B treated HCT 116 cells are excited by blue (488nm) and red (633nm) lasers causing detectable fluorescence emission in both red laser channels and blue laser detectors. The violet laser (405nm) did not cause excitation of the cells treated with streptorubin B at the concentrations and detectors used. The mechanism of action assays continued with streptorubin B. Concerning morphology, an increase of pycnosis was observed in a 24h incubation at 500 and 1000 nM and 48h concentrations at concentrations of 50 and 500 nM. There was an increase in the number of dead cells observed by the membrane integrity assay using DAPI as well as the decrease in cell proliferation by the cell count assay. No cell cycle arrest was observed at any stage. Increased DNA fragmentation of the HCT 116 cells treated with streptorubin B in 48h incubation. Using confocal microscopy, we observed that streptorubin B accumulates in organelles near the nucleus in HCT 116 cells, possibly in lysosomes or endoplasmic reticulum. Streptorubin B and undecylprodigiosine despite its occurrence already described, no work with streptorubin B has been performed to evaluate its cytotoxic activity in tumor lines, this being the first report on its properties inducing morphological alterations and induction of DNA fragmentation in cells tumor, thus opening up the perspective of its use, aiding in the studies related to the cancer.

Key words: Marine microorganisms, antitumor potential, prodigiosins.

LISTAS DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Distribuição proporcional dos 10 tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo no Brasil, exceto pele não-melanoma. | 16 |
| Figura 2. Capacidades adquiridas pelas células tumorais (Traduzido de HANAHAN & WEINBERG, 2011)..... | 16 |
| Figura 3. Planejamento experimental do presente trabalho..... | 28 |
| Figura 4. Métodos empregados no isolamento das bactérias do invertebrado <i>Zoanthus sociatus</i> das Ilhas brasileiras..... | 30 |
| Figura 5. Método empregado na criopreservação das bactérias recuperadas do invertebrado das ilhas brasileiras..... | 31 |
| Figura 6. Método empregado na obtenção dos extratos do caldo de fermentação das bactérias recuperadas das ilhas brasileiras..... | 32 |
| Figura 7. Cromatograma de isolamento do metabólito 1 e 2 | 36 |
| Figura 8. Fluxograma ilustrando o isolamento dos compostos ativos a partir do extrato bruto BRA-535 | 37 |
| Figura 9. Estratégia de seleção das populações utilizadas para A) Análise de alterações morfológicas e integridade de membrana, e B) Ciclo celular e Fragmentação de DNA nos experimentos de citometria. | 45 |
| Figura 10. Distribuição do número de colônias isoladas..... | 50 |
| Figura 11. Triagem da atividade antiproliferativa dos extratos brutos..... | 51 |
| Figura 12. Imagens das colônias da BRA 535 | 53 |

| | |
|--|----|
| Figura 13. Estrutura química das prodigiosinas: estreptorunina B (1) e undecilprodigiosina (2) isoladas da cepa BRA-535 através de fracionamento biogu | 34 |
| Figura 14. Curvas concentração-efeito de estreptorubina B (A) e undecilprodigiosina (B)..... | 56 |
| Figura 16. Emissão de fluorescência por células HCT 116 tratadas com o estreptorubina B, avaliados por citometria de fluxo..... | 59 |
| Figura 17. Percentual de células de carcinoma de colo (HCT 116) com morfologia normal ou alterada, tratadas com estreptorubina B. | 63 |
| Figura 18. Contagem de células de HCT 116 tratadas por 48h com estreptorubina B. . | 66 |
| Figura 19. Integridade de membrana das células de HCT 116 tratadas por 48h com estreptorubina | 65 |
| Figura 20. Alterações no ciclo celular de células de carcinoma de colo (HCT-116) tratadas com estreptorubina B. | 68 |
| Figura 21. Fragmentação de DNA de células de carcinoma de colo HCT 116 tratadas com estreptorubina B..... | 70 |
| Figura 22. Localização em células de HCT 116 com a estreptorubina B por microscopia confocal.. | 72 |
| Figura 23. Localização em células de HCT 116 da estreptorubina B (50 nM) mais o marcador específico de lisossomos (LysoTracker ® Blue DND-22)..... | 73 |
| Figura 24. Localização em células de HCT 116 da estreptorubina B (50 nM) mais o marcador específico de retículo endoplasmático ((ER-Tracker™ Red)..... | 74 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Fármacos anticâncer de fontes marinhas em ensaios clínicos pelo FDA (Food and Drug Administration, (FDA)). | 19 |
| Tabela 2. Dados resultantes do fracionamento cromatográfico do extrato bruto do extrato da BRA 535 | 34 |
| Tabela 3. Linhagem celular tumoral utilizada no ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i> | 38 |
| Tabela 4. Configuração óptica do citômetro BD FACSVersé™..... | 43 |
| Tabela 5. Colônias de bactérias recuperadas das ilhas oceânicas brasileiras. | 49 |
| Tabela 6. Valores de IC ₅₀ e IC ₉₅ % (µg/mL) dos extratos brutos recuperados do <i>Zoanthus sociatus</i> das ilhas oceânicas do Brasil, frente a linhagem tumoral HCT 116, expostas por 72h. | 52 |
| Tabela 7. Atividade citotóxica <i>in vitro</i> das prodigiosinas: estreptorubina B e a undeciprodigiosin. | 55 |
| Tabela 8. Valores de (IC ₅₀ = inibição do crescimento celular em 50%), (ICT= inibição do crescimento total) e efeito citotóxico (CL ₅₀ = concentração letal média) após 24, 48 e 72 horas de incubação..... | 57 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|----------|---|
| AcOEt | Acetato de etila |
| ANOVA | Análise de variância |
| APC | Aloficocianina, <i>allophycocyanin</i> |
| BD | Becton Dickinson |
| B. O. D. | <i>Biochemical Oxygen Demand</i> |
| CCDA | Cromatografia em Camada Delgada Analítica |
| CLAE | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DOX | Doxorrubicina |
| DAPI | <i>4',6-diamidino-2-fenilindol</i> |
| DMEM | <i>Dulbecco's modified Eagle's médium</i> |
| FSC | Desvio frontal, do inglês <i>Forward scatter</i> |
| FITC | Isotiocianato de fluoresceína, <i>fluorescein isothiocyanate</i> |
| PBS | Solução tampão salina, do inglês <i>Phosphate Buffer Solution</i> |
| PI | <i>Propidium Iodide</i> |
| DMEM | <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> |
| SCA | <i>Starch casein agar</i> |
| SSC | Desvio lateral, do inglês <i>Side Scatter</i> |
| SRB | <i>Sulforrodamina B</i> |
| SWA | <i>Seawater agar</i> |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 15 |
| 1.1 Câncer..... | 15 |
| 1.2 Produtos Naturais Marinhos | 18 |
| 1.2.1 Filo Cnidário | 21 |
| 1.3 Micro-organismos Marinhos..... | 22 |
| 1.4 Relevância e Justificativa..... | 24 |
| 2. OBJETIVOS | 26 |
| 2.1 Objetivo geral..... | 26 |
| 2.2 Objetivos específicos..... | 26 |
| 3 MATERIAIS E MÉTODOS | 27 |
| 3.1 Planejamento Experimental | 27 |
| 3.2 Coleta do material e cultivo dos micro-organismos | 29 |
| 3.2.1 Preservação dos Micro-organismos Isolados..... | 31 |
| 3.2.2 Obtenção dos Extratos Brutos..... | 31 |
| 3.3 Cultivo em larga escala | 32 |
| 3.3.1 Fracionamento Químico | 33 |
| 3.3.2 Métodos cromatográficos | 33 |
| 3.3.3 Método espectrométrico..... | 34 |
| 3.4 Fracionamento Cromatográfico bioguiado do extrato bruto BRA535 | 34 |
| 3.5.1 Cultivo das células | 37 |
| 3.5.2 Ensaio da Sulforodamina B | 38 |
| 3.5.3 Ensaio clonogênico | 40 |
| 3.6 Avaliação dos efeitos de estreptorubina b em células de carcinoma de cólon (HCT 116) por meio de citometria de fluxo | 41 |
| 3.6.1 Verificação da emissão de fluorescência na Estreptorubina B | 42 |
| 3.6.2 Análise dos efeitos de estreptorubina B sobre linhagens celulares tumorais. | 43 |
| 3.7 MICROSCOPIA CONFOCAL..... | 46 |

| | |
|---|-----------|
| 4 RESULTADOS | 48 |
| 4.1 Micro-organismos Recuperados das ilhas oceânicas do Brasil | 48 |
| 4.2 Fracionamento Químico do Extrato da BRA-535 | 53 |
| 4.2.1 Identificação estrutural dos metabólitos ativos presentes no Extrato da BRA-535 | 53 |
| 4.2.2 Identificação estrutural dos metabólitos ativos denominados BRA-535CBP1 e BRA-535CBP2 | 53 |
| 4.3 CURVAS DE CONCENTRAÇÃO-EFEITO..... | 54 |
| 4.3.1 Ensaio do SRB | 54 |
| 4.4 Avaliação do ensaio clonogênico | 57 |
| 4.5 Avaliação da atividade da Estreptorubina B em células de carcinoma de cólon (HCT 116)..... | 59 |
| 4.5.1 Avaliação da emissão de fluorescência da Estreptorubina B..... | 59 |
| 4.5.2 Alterações na morfologia celular | 62 |
| 4.5.3 Contagem de Células e Integridade de Membrana celular | 65 |
| 4.5.4 Avaliação do Ciclo Celular | 67 |
| 4.5.5 Avaliação da Fragmentação de DNA | 70 |
| 4.6 Análise das células HCT 116 por Microscopia Confocal | 71 |
| 5 DISCUSSÃO | 75 |
| 6 CONCLUSÃO..... | 81 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 82 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

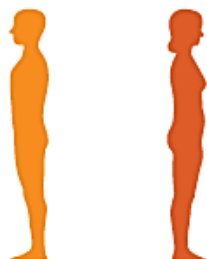
O câncer é considerado a doença do caos, em que provoca colapso da ordem biológica no corpo humano. Essa desordem mais especificamente é provocada pelo mal funcionamento do controle que normalmente é responsável por determinar quando e onde as células do corpo irão multiplicar-se (WEINBERG, 2008). Ela aparece como uma consequência de mudanças patológicas ou acúmulos de mutações na informação contida no DNA (Ácido Desoxirribonucleico)(ALBERTS et al., 2011). Segundo Instituto Nacional do Câncer (2018),câncer é um conjunto de mais de 100 tipos diferentes de doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células anormais com potencial invasivo. Sua origem é multifatorial, cujos agentes causais podem agir em conjunto ou em sequência para iniciar ou promover a carcinogênese. O desenvolvimento da maioria dos cânceres requer múltiplas etapas que ocorrem ao longo de muitos anos. Portanto, alguns tipos de câncer podem ter seu desenvolvimento impedido, evitando-se a exposição aos fatores determinantes. Se o potencial de malignidade for detectado antes de as células tornarem-se malignas, ou numa fase inicial da doença, tem-se uma condição mais favorável para seu tratamento e, conseqüentemente, para sua cura (ALBERTS et al., 2011).

No Brasil o câncer é a segunda maior causa de morte, apresentando 190 mil óbitos por ano. O aumento da expectativa de vida, a urbanização e a globalização são, alguns dos fatores que podem explicar parte dos 596 mil novos casos de câncer que afetaram os brasileiros no ano de 2016. A estimativa para o Brasil, biênio 2018-2019, aponta a ocorrência de cerca de 600 mil casos novos de câncer, para cada ano. Excetuando-se o câncer de pele não melanoma (aproximadamente 170 mil casos novos), ocorrerão cerca de 640 mil casos novos de câncer (INCA, 2018).

O International Agency for Research on Cancer (IARC, 2016) estima que em 2035, a incidência global vai ser maior que 24 milhões de novos casos de câncer e aproximadamente 14,6 milhões de mortes por câncer. Os principais tipos de cânceres apresentados na figura 1 destaca os de maior incidência como: câncer de próstata, pulmão, cólon e reto, estômago e cavidade oral em homens e de mama, cólon e reto,

colo do útero, pulmão e glândula tireóide em mulheres, reforçando a magnitude do problema do câncer no país (INCA, 2018).

Figura 1. Distribuição proporcional dos 10 tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo no Brasil, exceto pele não-melanoma.

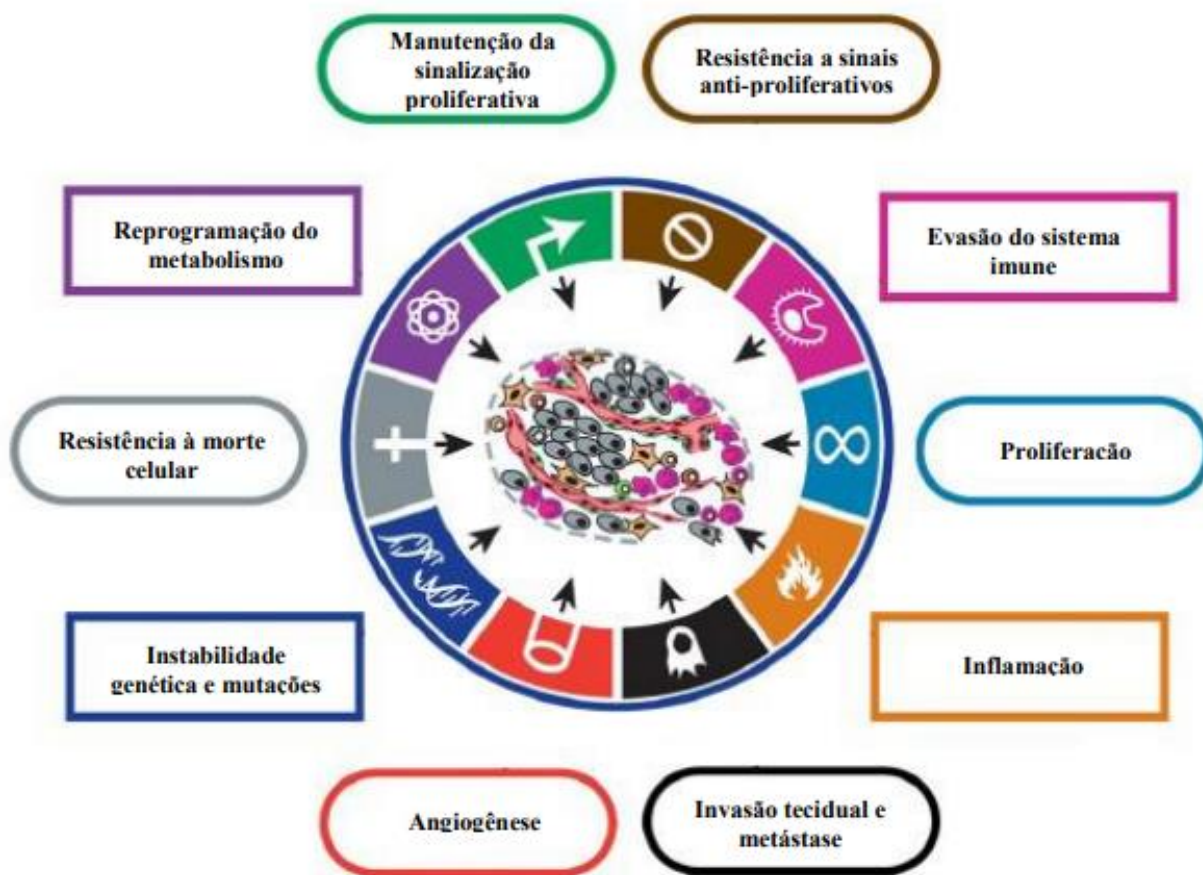
| Localização Primária | Casos | % | | | Localização Primária | Casos | % |
|-----------------------------|--------|-------|---------------|--|-----------------------------|--------|-------|
| Próstata | 68.220 | 31,7% | Homens |  | Mama Feminina | 59.700 | 29,5% |
| Traqueia, Brônquio e Pulmão | 18.740 | 8,7% | | | Cólon e Reto | 18.980 | 9,4% |
| Cólon e Reto | 17.380 | 8,1% | | | Colo do Útero | 16.370 | 8,1% |
| Estômago | 13.540 | 6,3% | | | Traqueia, Brônquio e Pulmão | 12.530 | 6,2% |
| Cavidade Oral | 11.200 | 5,2% | | | Glândula Tireoide | 8.040 | 4,0% |
| Esôfago | 8.240 | 3,8% | | | Estômago | 7.750 | 3,8% |
| Bexiga | 6.690 | 3,1% | | | Corpo do Útero | 6.600 | 3,3% |
| Laringe | 6.390 | 3,0% | | | Ovário | 6.150 | 3,0% |
| Leucemias | 5.940 | 2,8% | | | Sistema Nervoso Central | 5.510 | 2,7% |
| Sistema Nervoso Central | 5.810 | 2,7% | | | Leucemias | 4.860 | 2,4% |

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: Instituto Nacional de Câncer, 2018.

Na formação do tumor, as células normais evoluem progressivamente para o estado neoplásico, processo caracterizado por mudanças dinâmicas no genoma celular, silenciando ou deletando genes supressores de tumor e dessa forma estimulando a atividade de oncogêneses, gerando defeitos no circuito regulatório que governa a proliferação celular e homeostase tecidual. A (Figura 2) proposta Hanahan e Weinberg (2011) sobre como células normais evoluem progressivamente para o estado neoplásico, mostra as 10 capacidades adquiridas em comum para todos os tipos de câncer, que incluem: instabilidade genética, autossuficiência em fatores do crescimento, insensibilidade a supressores do crescimento, evasão da destruição pelo sistema imunológico, potencial replicativo ilimitado, inflamação relacionada ao tumor, invasão tecidual e metástase, indução à angiogênese, evasão da apoptose e desregulação do metabolismo energético (HANAHAN & WEINBERG, 2011).

Figura 2. Capacidades adquiridas pelas células tumorais (Traduzido de HANAHAN & WEINBERG, 2011).



Fonte: Adaptado de Hanahan & Weinberg, 2011.

Levando em consideração o arsenal de medicamentos que existem para o tratamento de cânceres e do sucesso terapêutico em vários esquemas de tratamentos, ainda não se chegou a um composto ideal, e assim, a necessidade da busca por novos fármacos ainda é uma meta prioritária para terapia do câncer, devido ao rápido desenvolvimento de resistência à múltiplas drogas quimioterápicas. Além disso, a alta toxicidade geralmente associada a quimioterapia e seus efeitos colaterais aumentam a demanda por novos medicamentos antitumorais, com uma maior eficiência terapêutica e menos efeitos colaterais (OLANO; MENDEZ & SALAS, 2009).

Cada vez mais tem-se instigado o interesse constante e crescente pela descoberta de novas moléculas que possam vir a ser utilizadas como drogas medicamentosas, com ação mais eficiente, seletiva e com menos efeitos colaterais contra o câncer (HILL & FENICAL, 2010). Dessa forma a busca por novos compostos e a descoberta de seu princípio de ação é cada vez mais importante, a saber que promoverá a diminuição dos efeitos colaterais causados por elevadas doses de medicamentos tóxicos, e a atuação

mais específica no combate a diferentes tipos de cânceres. Portanto, a diversidade química dos produtos naturais de organismos marinhos associados à pluralidade dos alvos terapêuticos vem oferecer perspectivas inovadoras na abordagem clínica das neoplasias malignas. (COSTA-LOTUFO et al., 2009).

1.2Produtos Naturais Marinhos

O ecossistema marinho compõe 95% da biosfera e, dos 31 filos animais conhecidos, 12 são exclusivamente marinhos e nunca foram encontrados além dos oceanos. Os ecossistemas concederam produtos naturais extraordinários, os quais foram utilizados diretamente ou após modificações químicas, para o desenvolvimento de novos fármacos (BOEUF, 2011). Porém, o potencial farmacológico do ambiente marinho, em grande parte foi esquecido até meados do século passado e, até o presente momento, a biodiversidade encontrada nesse ambiente ainda permanece em grande parte desconhecida (ROBERTS, 2002; BOEUF, 2011).

Os produtos naturais possuem um papel importante na descoberta de novos fármacos, principalmente no caso do câncer, onde 60% das drogas em uso clínico derivam de produtos naturais (CRAGG et al., 2009). Além das clássicas fontes terrestres como as plantas e o solo, também vem ganhando destaque a pesquisa com produtos naturais de origem marinha. O ambiente marinho tem se mostrado uma fonte rica em compostos extremamente potentes como: antitumoral, anti-inflamatória, analgésica, imunomodulatória e antialérgicas. Dessa forma, há um número significativo de moléculas importantes de origem marinha, ou que passaram por um processo de síntese a partir de um composto marinho. (NEWMAN & CRAGG, 2016, 2004). Segundo Blunt e colaboradores (2015) em 2013 foram registrados 491 novos compostos derivados de produtos naturais marinhos.

Na (Tabela 1) estão descritos os diversos compostos de diferentes fontes marinhas que estão em fase clínica, e diversos tipos de tumores para se tratar. Muitas dessas moléculas são modificações estruturais de compostos já aprovados como a trabectedina (Lurbinectina e Joromicina) ou imunoconjugação de produtos naturais, similares ao Brentuximab vedotin.

Tabela 1. Fármacos anticâncer de fontes marinhas em ensaios clínicos pelo FDA (Food and Drug Administration, (FDA)).

| FÁRMACO | CLASSE QUÍMICA | ORGANISMO FONTE | TIPO DE TUMOR | FASE CLÍNICA |
|---|-----------------------|--|---|---------------------|
| Glembatumumab Vedotin* | Peptídeo | Molusco/bactéria | Melanoma avançado, mama, pulmão, osteossarcoma | Fase II |
| Pinatuzumabe Vedotin* | Peptídeo | Molusco/bactéria | Linfoma não Hodgkin | Fase II |
| Polatuzumabe Vedotin* | Peptídeo | Molusco/bactéria | Linfoma não Hodgkin | Fase II |
| Lifastuzamabe Vedotin* | Peptídeo | Molusco/bactéria | Ovário, pulmão | Fase I, II |
| DSTP-30865* | Peptídeo | Molusco/bactéria | Câncer de próstata metastático resistente | Fase I |
| Plitidepsina Aplidin® | Peptídeo | Ascídia/bactéria <i>Aplidium albican</i> | Mieloma múltiplo refratário | Fase I, III |
| HuMab-TF-011 vc MMAE* | Peptídeo | Molusco/bactéria | Cervical, endometrial, próstata, renal, esôfago, pulmão | Fase I |
| Joromicina Zalypsis® | Alcalóide | Molusco/bactéria | Sarcoma e Ewing | Fase II |
| Plinabulina | Dicetopiperazina | Fungo | Pulmão avançado | Fase III |
| Elisidepsina, Irlavec® | Peptídeo | Molusco/bactéria | Tumores sólidos | Fase II |
| Salinosporamida A, | β -lactâmico | Bactéria <i>Salinispora tropica</i> | Glioma estágio IV, Mieloma refratário | Fase I, II |

| Marizomib® | | | | |
|--|-------------|------------------------------------|---|-----------------|
| ASG-5Me* | Peptídeo | Molusco/bactéria | Próstata, gástrico, pâncreas | Fase I |
| GSK 2857916* | Peptídeo | Molusco/bactéria | Mieloma múltiplo refratário | Fase I |
| SGN-75* | Peptídeo | Molusco/bactéria | Linfoma não Hodgkin, renal | Fase I |
| Lurbinectina | Alcalóide | Ascídia | Tumores resistentes à compostos de platina | Fase I, II, III |
| PM060184 | Policetídeo | Esponja <i>Liphoplocama lithis</i> | Melanoma metastático, Leucemia mielóide aguda, Linfoma de Hodgkin, Tumores sólidos, pulmão, glioma recorrente | Fase I, II |
| Panobinostat Farydak® | Alcalóide | Esponja <i>Psammaplysina sp</i> | Linfoma | Fase II, III |
| Estaurosporina | Alcalóide | Bactéria | Leucemia mielóide aguda | Fase I, II |

* Fármacos ligados à anticorpo

Mais de 100 novos produtos naturais marinhos estão em desenvolvimento clínico, principalmente como agente anticâncer e anti-infecciosos. Entre 2005 e 2007, 13 novos fármacos derivados de produtos naturais foram aprovados, cinco representam novas classes de fármacos, incluindo os produtos marinhos Dolastatina (Adcetris®), trabectedina (Yondelis®), e ziconotídeo (Prialt®) dentre outros (NEWMAN & CRAGG, 2016; HARVEY, 2008).

Recentemente sete das substâncias de origem marinha aprovadas pelo FDA para uso clínico, quatro são determinadas para o tratamento do câncer, dentre elas a citarabina (Cytosar-U®, aprovado pela primeira vez em 1969 para o tratamento da leucemia), mesilato de eribulina (Halaven®, aprovado pela primeira vez em 2010 para o tratamento do câncer de mama metastático), brentuximab vedotin (Adcetris®, aprovado pela primeira vez em 2011 para o tratamento do linfoma maligno de células T anaplásicas, linfoma de Hodgkin) e trabectedina (Yondelis®, aprovado pela primeira vez em 2015 para o tratamento de sarcoma dos tecidos moles e câncer de ovário) (MAYER, 2018).

1.2.1 Filo Cnidário

O filo cnidário de onde pertence os corais, representam fontes promissoras de compostos bioativos, com um grande interesse farmacológico (YAN et al, 2005) e terapêutico (CHI et al, 2012; BEETON et al, 2005; TEJUCA et al, 2004). A ordem *Zoanthidea* até o momento pouco estudada para compostos biologicamente ativos, porém com alguns exemplos de seu potencial. Caracterizados por essa ordem temos as toxinas não peptídicas potentes, como a palitoxina, que foi descrita pela primeira vez por Richard E. Moore e Paul J. Scheuer, isolado do *Zoanthideo Palythoa toxica* (MOORE & SCHEUER, 1971). Kijjoa & Sawangwong (2004) e Carté (1996) estudaram os diterpenos fuscoidina A e pseudopterinas isolados dos corais *Euniseia fusca* e a *Pseudopterogorgia elisabethae* respectivamente e viram que esses isolados possuíam uma importante e potente atividade anti-inflamatória.

Outra espécie pertencente a ordem *Zoanthidea* são os *Zoanthus sociatus* que até então, poucos estudos químicos foram relatados baseados neste invertebrado, sendo o isolamento e caracterização de pequenas moléculas, como o zoanthosterol (KELECOM, 1981) de esterol, assim como os alcaloides norzantamínicos e seus análogos (CER-PACHECO, et al, 2014; FUKUZAWA et al, 1995). Então, além desses compostos bioativos, foi possível verificar uma atividade antifilarial do extrato de clorofórmio / metanol de *Z. sociatus* (LAKSHMI et al, 2004). Foram realizados apenas dois estudos para verificar a toxicidade do extrato bruto de *Z. sociatus*. Estudos realizados por DIAZ-GARCIA e colaboradores (2011), verificou que os componentes de *Z. sociatus* mostrou-se abaixo de 7 kDa responsável pela inibição da secreção de insulina mediada pelo

bloqueio do influxo de Ca^{2+} em células β isoladas de rato. Já Dominguez e colaboradores (2013) avaliou a atividade biológica de uma fração cromatográfica de Sephadex G-50 de baixo peso molecular (LMW) letal a camundongos, ocasionada por parada cardiorrespiratória.

A busca de novos produtos naturais se concentrou, inicialmente, em invertebrados marinhos como ascídias, esponjas, corais, moluscos e briozoários, além das algas. Diversos estudos destacaram a importância dos invertebrados marinhos como fonte de novos compostos com aplicação biomédica, no entanto, o suprimento dessas moléculas interessantes foi o principal gargalo do desenvolvimento pré-clínico e clínico, pois, em diversos casos, a síntese química mostrou-se muito difícil de ser obtida racionalmente, devido à complexidade das moléculas. Vale ressaltar que não é econômica nem ecologicamente viável obter estes compostos diretamente dos organismos hospedeiros coletados no ambiente ou cultivados por técnicas de aquicultura. Portanto, a prospecção de moléculas com potencial biomédico a partir de micro-organismos surge como uma solução sustentável para a exploração dos recursos marinhos como fonte de novas drogas (NEWMAN & CRAGG, 2016, 2004).

1.3 Micro-organismos Marinhos

Os oceanos representam um dos mais significantes e menos compreendidos, ambientes naturais habitados por micro-organismos do planeta (MARTIN-QUADRADO et al., 2007). Os micro-organismos marinhos compõem uma fonte rica de moléculas estruturalmente diversas, a grande maioria dos produtos marinhos existentes, já descritos, foram isoladas de invertebrados marinhos tais como esponjas, tunicados, moluscos e briozoários (CAPON, 2011). Alguns dos representantes marinhos responsáveis pela produção comprovada de substâncias bioativas pertencem aos generos *Dietzia*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Salinispora*, *Salinibacterium* e *Marinispora*. Nos últimos vinte anos, foram apresentadas 659 substâncias bacterianas marinhas, das quais 256 foram encontradas em actinobacteria, pertencentes aos gêneros *Streptomyces* (57%) ou *Salinispora* (28%) (KONG et al., 2010).

Dentre as substâncias presentes na biota marinha, as classes mais estudadas são: terpenóides, ácidos graxos (gorduras), policetídeos, acetogeninas, polifenólicos (conhecidos também como aromáticos), alcalóides, peptídeos e macrolídeos, dentre

outros. A diversidade estrutural é ampliada quando se trata de metabolitos isolados de micro-organismos marinhos, originados em alguns casos por meio de rotas biosintética (vias metabólicas responsáveis pela produção dos produtos naturais por um determinado organismo) mistas, que podem estar relacionadas a simbiose (relação vantajosa entre organismos vivos de espécies diferentes) (BLUNT et al., 2011; HAY & FENICAL, 1996).

Mohapatrae colaboradores(2002), demonstraram em seus estudos que os metabolitos isolados de invertebrados marinhos, na verdade, eram sintetizados por micro-organismos, especificamente por bactérias. Por exemplo, a briostatina, é um policetídeo atualmente em fase de testes clínicos, que tem sido obtido do briozoário *Bugula neritina* há algumas décadas. Entretanto, os estudos apoiados em evidências moleculares revelaram que briostatinas são produzidas pela proteobactéria simbiote *Candidatus endobugula sertula* (NEWMAN & CRAGG, 2016; DAVIDSON et al., 2001). Muitos estudos vêm sendo desenvolvidos atualmente com os derivados da briostatina, para tratamentos de doenças como Alzheimer e HIV (NEWMAN & CRAGG, 2016).

Levando em consideração os fortes indícios de que os micro-organismos associados sejam os verdadeiros responsáveis pelo elaborado arsenal de metabolitos secundários isolados de invertebrados marinhos e suprindo-lhes dos meios de cultivo apropriados, o fornecimento sustentado de metabolitos bioativos a partir da fermentação biológica de micro-organismos marinhos é uma atrativa solução para a prospecção racional dos recursos do mar, além de aumentar o arsenal de moléculas com potencial aplicação terapêutica e incorporar sustentabilidade ao processo de pesquisa e desenvolvimento de fármacos de origem marinha (FENICAL; JENSEN, 2006).

1.4 Relevância e Justificativa

Vários fármacos encontram-se disponíveis para o tratamento do câncer e com casos de sucesso terapêutico em vários esquemas de tratamento dos mais variados tipos de cânceres. Todavia ainda carecem mais opções para diversos tipos de neoplasias. Desta forma, é necessário encontrar e desenvolver novas alternativas terapêuticas mais eficientes, que possibilite obter compostos mais seletivos, com menos efeitos colaterais, maior potência terapêutica e menor índice de resistência para a terapia do câncer. Embora o número de opções sendo comercializadas ainda seja reduzido, os produtos naturais marinhos têm grande importância neste cenário, uma vez que são medicamentos órfãos, sendo o câncer um alvo potencial.

O Brasil possui o segundo maior litoral contínuo do mundo, com cerca de 8.500 km de extensão, compreendendo uma área total de quase 4,5 milhões de Km² (mar territorial e zona econômica exclusiva), equivalente a quase metade do território continental. Nessa área, estão incluídos cinco conjuntos de ilhas oceânicas: Arquipélago de Fernando de Noronha (FN), Ilha de Trindade e Arquipélago Martim Vaz (TMV), Atol das Rocas (AR) e Arquipélago de São Pedro e São Paulo (ASPSP).

A localização geográfica das Ilhas Oceânicas e a presença de brasileiros nessas localidades, na maioria cientistas, possui uma grande importância geopolítica e econômica, pois atende a requisito previsto pela Convenção das Nações Unidas sobre o Direito do Mar, que garante ao Brasil estabelecer, ao redor de suas Ilhas Oceânicas, direitos de soberania sobre a Zona Econômica Exclusiva (CIRM, 2016).

O aspecto científico ambiental se apoia no conhecimento, para compreensão dos ecossistemas e conservação de seus biomas terrestre e marinho, em cooperação com outros Ministérios, órgãos públicos nas diversas esferas de governo e instituições privadas e ONG. As Ilhas possuem logística complexa e custos elevados em função da distância ao Continente, cerca de 1.200 Km. O Programa de Pesquisas Científicas nas Ilhas Oceânicas busca ampliar o acesso e coordenar as pesquisas científicas (CIRM, 2016).

Se considerarmos o potencial biotecnológico da diversidade marinha brasileira, a situação torna-se ainda mais crítica, especialmente quando consideramos trabalhos

relacionados com as espécies que habitam as ilhas oceânicas brasileiras, onde os trabalhos são muito escassos. Dentre as áreas de interesse, o desenvolvimento de fármacos e medicamentos a partir de metabólitos secundários de organismos marinhos é, sem dúvida, estratégico, uma vez que a contribuição dos produtos marinhos no desenvolvimento de produtos de interesse farmacêutico já é uma realidade.

A prospecção do potencial farmacológico da biodiversidade encontrada nas ilhas oceânicas do Brasil é pouco explorada, o que torna esse sítio uma promessa de ser um rico celeiro de compostos bioativos. Os micro-organismos marinhos são importantes fontes de novos metabólitos secundários bioativos, nossos resultados embasam o promissor potencial químico e farmacológico desses metabólitos. Desta forma, o presente projeto teve como objetivo estudar o potencial farmacológico da microbiota presente nos invertebrados das Ilhas Arquipélago de Fernando de Noronha (FN), Ilha de Trindade e Arquipélago Martim Vaz (TMV), Atol das Rocas (AR) e Arquipélago de São Pedro e São Paulo (ASPSP).

O conhecimento da biodiversidade é também um compromisso assumido pelo Brasil, constituindo um dos objetivos do país na área ambiental. Dessa forma, o desenvolvimento desta proposta também atende esta necessidade e ajudará a entender os padrões biogeográficos da composição dessas comunidades de micro-organismos presentes nos invertebrados. Finalmente, pretende-se descobrir produtos naturais marinhos presentes nas ilhas oceânica do Brasil com potencial para tratamento do câncer.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Realizar prospecção de substâncias isoladas de bactérias marinhas associadas ao zoantídeo *Zoanthus sociatus* das ilhas oceânicas do Brasil com potencial biotecnológico, com ênfase no câncer.

2.2 Objetivos específicos

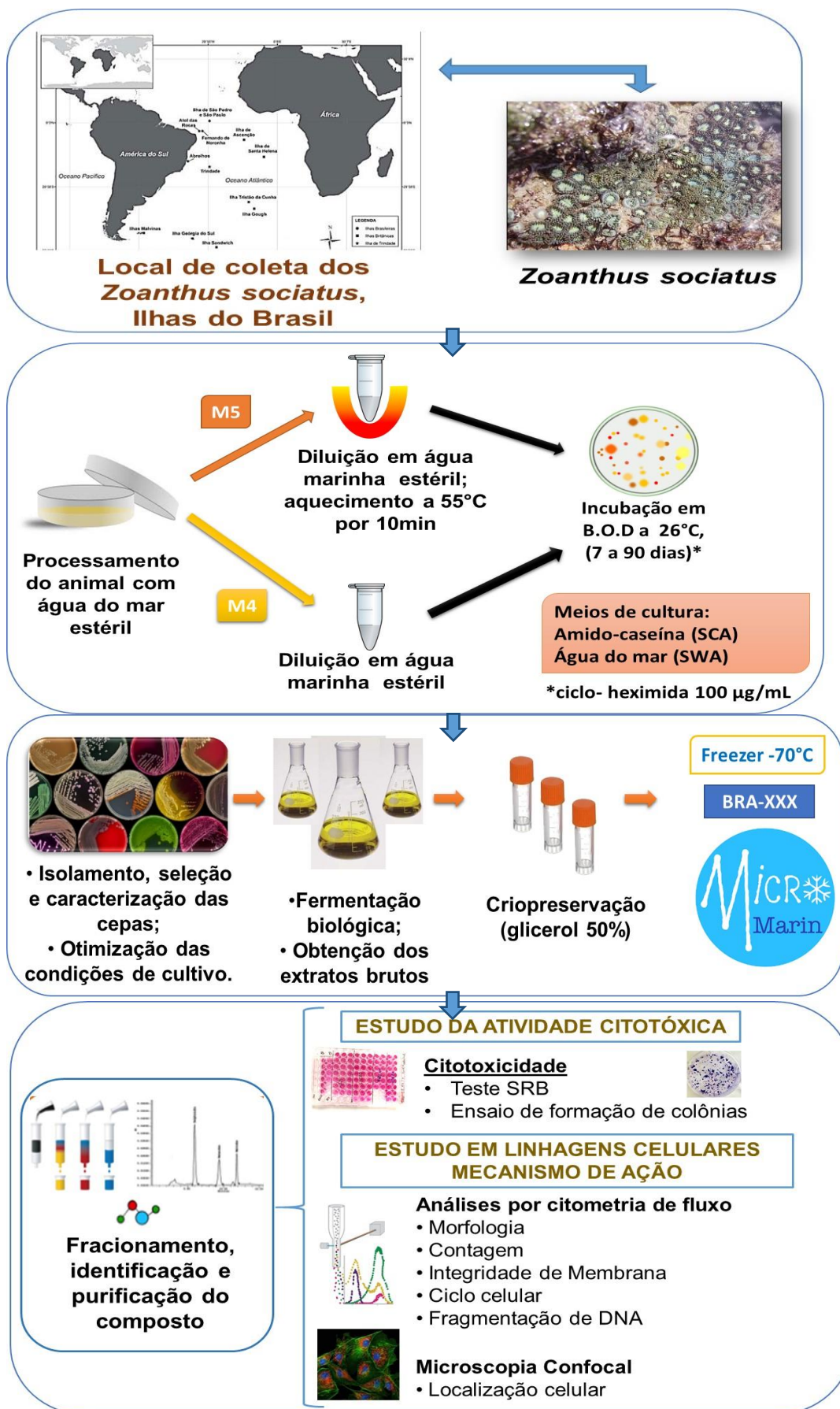
- Isolar e catalogar bactérias isoladas a partir do invertebrado *Zoanthus sociatus* coletado em ilhas oceânicas: Arquipélago de Fernando de Noronha (FN), Ilha de Trindade e Arquipélago Martim Vaz (TMV), Atol das Rocas (AR) e Arquipélago de São Pedro e São Paulo (ASPSP)
- Preparar extratos orgânicos a partir dos fermentados biológicos das bactérias;
- Identificar extratos que inibam a proliferação de células tumorais *in vitro*;
- Realizar o fracionamento químico guiado pelo efeito antiproliferativo de um extrato ativo selecionado;
- Isolar e identificar os metabólitos secundários responsáveis pela atividade biológica;
- Avaliar os efeitos das moléculas isoladas em células tumorais (HCT 116, B16-F10, PC-3M) e não tumorais (L929 e HEK293A) *in vitro*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Planejamento Experimental

As amostras do invertebrado *Zoanthus sociatus* utilizadas neste trabalho foram coletadas nas ilhas oceânicas brasileiras: Arquipélago de Fernando de Noronha (FN), Ilha de Trindade e Arquipélago Martim Vaz (TMV), Atol das Rocas (AR) e Arquipélago de São Pedro e São Paulo (ASPSP). As amostras obtidas foram processadas por métodos distintos, visando aumentar o número de diferentes culturas bacterianas isoladas dos invertebrados coletados. Os extratos orgânicos com atividade antiproliferativa foram selecionados para prosseguir estudos. Após a seleção das linhagens, as condições de cultivo foram otimizadas para maior produção de substâncias ativas. Os compostos ativos foram então isolados através de fracionamento químico guiado pelo efeito antiproliferativo e suas estruturas químicas elucidadas. Finalmente, o mecanismo de ação, de pelo menos um composto ativo, foi investigado. A (Figura 3) resume o planejamento experimental adotado neste trabalho.

Figura 3. Planejamento experimental do presente trabalho.



3.2 Coleta do material e cultivo dos micro-organismos

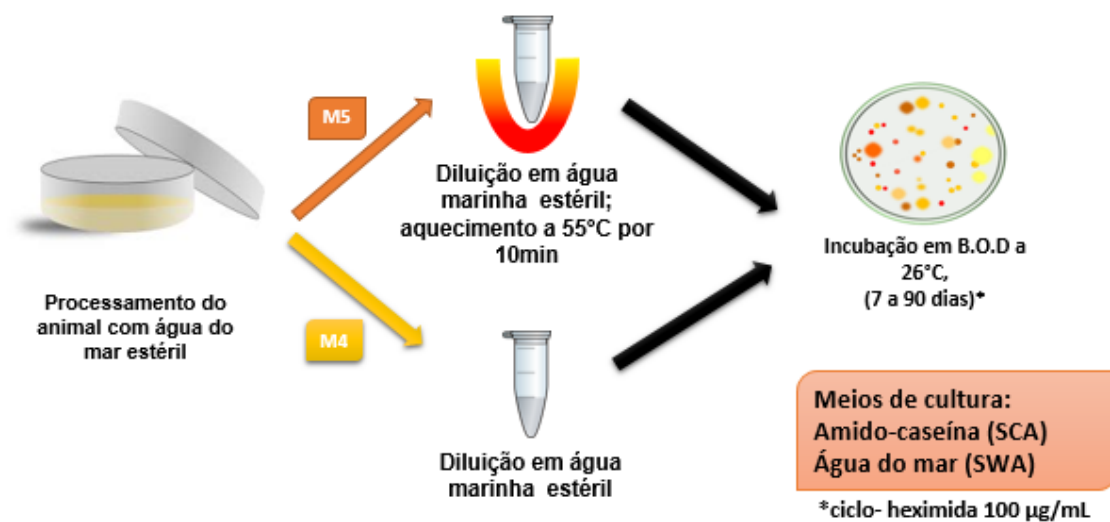
As amostras dos invertebrados *Zoanthus sociatus* utilizadas neste trabalho foram coletadas com número de autorização 44435-1, que tem como responsável a Professora Dra. Leticia Lotufo, nas ilhas oceânicas brasileiras de Arquipélago de Fernando de Noronha (FN), Ilha de Trindade e Arquipélago Martim Vaz (TMV), Atol das Rocas (AR) e Arquipélago de São Pedro e São Paulo (ASPSP). A coleta desse material foi realizada em parceria com a Rede Nacional de Pesquisa em Biodiversidade Marinha (SISBIOTA MAR) (<http://www.sisbiota.ufsc.br/>).

O material coletado foi adequadamente armazenado em pacotes de plástico estéreis (Whirl-Pak; Nasco), e sem seguida colocados em um botijão contendo nitrogênio líquido, onde foram transportados. Ao chegar ao local onde o processamento foi realizado, as amostras foram transferidas para um ultrafreezer -70°C (MDF-U54VC, Sanyo), onde permaneceram até o momento do processamento.

Espécimes do zoantídeo *Zoanthus sociatus* coletado foram processados em câmara de fluxo laminar unidirecional (Filtracom, modelo MiniFlow I) por dois métodos distintos, que estão ilustrados na (Figura 4). O primeiro método utilizado (M4), consistiu em separar uma pequena porção da amostra de invertebrado (aproximadamente 1,0 g), colocando-a em um microtubo contendo água do mar filtrada e estéril. Em seguida a amostra foi homogeneizada e, para cada placa contendo diferentes meios de cultura, alíquotas de 100 µL foram estriadas com haste estéril em toda a superfície da placa.

O segundo método (M5), consistiu em separar uma pequena porção do invertebrado (aproximadamente 1,0 g) colocando-a em um microtubo contendo água do mar filtrada e estéril, que foi aquecida a 55 °C em banho seco, durante 10 minutos. Posteriormente, essa amostra recém aquecida foi homogeneizada e, para cada placa contendo diferentes meios de cultura, alíquotas de 100 µL foram estriadas com haste estéril em toda a superfície da placa. Em sua maioria, os actinomicetos são formadores de esporos aéreos bastante resistentes, por exemplo, ao calor e ao ressecamento. Esse método de aquecimento visa reduzir o aparecimento de outras bactérias que fugiam ao interesse deste trabalho. As placas seguiram para incubação em estufa incubadora de B.O.D. (CIENTEC, modelo CT-708) a 26 °C por, no mínimo, sete dias, podendo lá permanecer por até 90 dias. As placas foram observadas diariamente para a verificação do surgimento das cepas bacterianas de interesse, que seriam posteriormente isoladas.

Figura 4. Métodos empregados no isolamento das bactérias do invertebrado *Zoanthus sociatus* das Ilhas brasileiras.



Fonte: Elaborado pela autora.

Os dois tipos diferentes de meios de cultura que foram utilizados nesse plaqueamento inicial, foram: o meio ágar amido-caseína (SCA) foi preparado como recomendado pelo fabricante (HIMEDIA). O meio ágar água do mar (SWA) também foi preparado em laboratório e consiste de água do mar filtrada diluída a 75% em água destilada e 18% de ágar. A todos os meios sólidos foram acrescentados 100 µg/mL de cicloheximida para conter o crescimento de fungos.

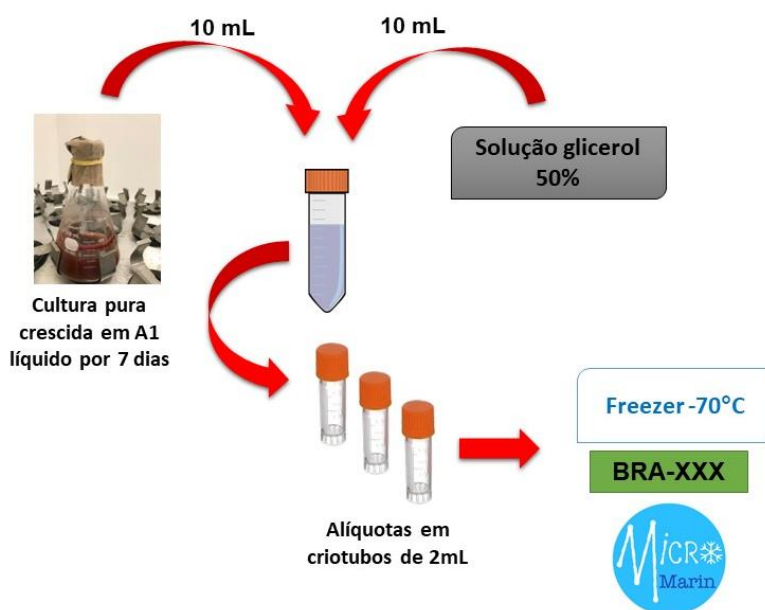
Durante o período de incubação, colônias que foram reconhecidas por suas características fenotípicas (cor, brilho, forma, textura etc.) próprias dos actinomicetos, foram selecionadas e inoculadas em uma nova placa contendo meio de cultura. A purificação desses micro-organismos isolados foi realizada através de repiques sucessivos utilizando a técnica denominada esgotamento por estrias, em placas com meio sólido A1, que foi preparado em laboratório e consiste de amido solúvel, extrato de levedura e peptona (BD Biosciences), em água do mar filtrada diluída a 75% em água destilada e 18% de ágar.

Após o isolamento das colônias de interesse, cada cepa foi inoculada a partir do meio sólido para meio A1 líquido (possui a mesma composição do meio A1 sólido, porém sem a adição de ágar) de onde se procedeu a criopreservação do micro-organismo (item 3.2.1 a seguir) e a extração do caldo para obtenção dos extratos brutos (item 3.2.2 adiante).

3.2.1 Preservação dos Micro-organismos Isolados

Cada cepa de micro-organismo isolada do invertebrado coletado foi preservada a -70°C utilizando como agente crioprotetor, o glicerol. A partir da cultura líquida crescida por aproximadamente sete dias, 10 mL do fermentado foram aliqotados em tubo Falcon estéril e adicionaram-se 10 mL de solução glicerol 50% filtrada (Dinâmica), diluído em água destilada previamente autoclavada. Em seguida, esta solução foi aliqotada em tubos criogênicos de 2 mL, que foram, então, estocados em ultrafreezer -70°C (MDF-U54VC, Sanyo). As cepas congeladas passaram a compor o banco de micro-organismos marinhos (MicroMarin) do Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia Marinha e foram nomeadas com o código BRA- seguido da numeração subsequente do banco. Esse processo está ilustrado na (Figura 5).

Figura 5. Método empregado na criopreservação das bactérias recuperadas do invertebrado das ilhas brasileiras.



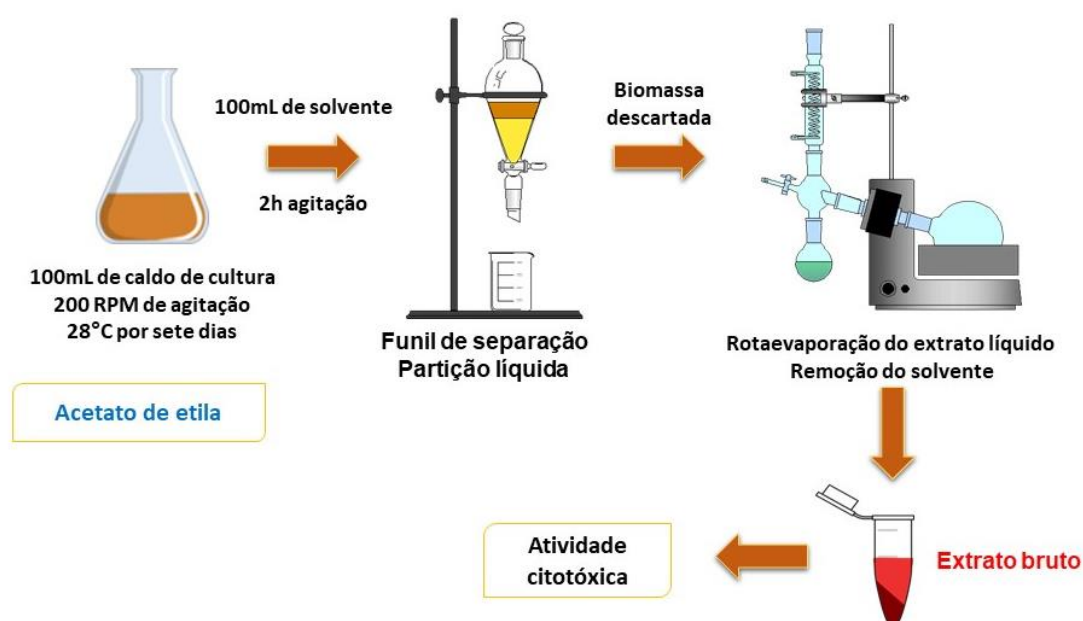
Fonte: Elaborado pela autora.

3.2.2 Obtenção dos Extratos Brutos

Inicialmente, as culturas isoladas foram inoculadas em Erlenmeyers de 500 mL contendo 100 mL de meio líquido A1 e mantidos a 200 RPM de agitação (TECNAL,

TE-245) e 26°C por aproximadamente sete dias. Após esse período, os meios de cultura foram extraídos com o solvente acetato de etila (AcOEt), numa proporção de 1:1, sob agitação a 100 RPM durante uma hora. Em seguida, o conteúdo de cada Erlenmeyer foi filtrado em funil de separação, os extratos líquidos foram rotaevaporados para remoção do solvente e obtenção do extrato bruto (Figura6). A biomassa resultante foi descartada. Após a filtração, o extrato foi avaliado quanto a sua atividade citotóxica em células tumorais em cultura pelo ensaio do SRB (mostrado no item 3.5 adiante).

Figura 6. Método empregado na obtenção dos extratos do caldo de fermentação das bactérias recuperadas das ilhas brasileiras.



Fonte: Elaborado pela autora.

3.3 Cultivo em larga escala

A cepa BRA-535 foi selecionada para o crescimento em maior escala, pois o extrato resultante dessa cepa mostrou-se com efeito antiproliferativo. Para isto, essa bactéria foi crescida em Erlenmeyers de 2 L contendo 500 mL de meio líquido A1 durante quatorze dias, a 150 RPM de agitação e 26°C. Para a obtenção de uma quantidade de extrato suficiente para prosseguir com os experimentos deste trabalho, foram necessárias 57 L de fermentado, que posteriormente foram extraídos e o extrato AcOEt foi rotaevaporado, resultando na obtenção 1,5 g de extrato bruto.

3.3.1 Fracionamento Químico

3.3.2 Métodos cromatográficos

3.3.2.1 Cromatografia de adsorção

Em colaboração com o Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará sob a coordenação da Profa. Dra. Otília Desdênia Loiola Pessoa, juntamente com o Dr. Francisco das Chagas Lima Pinto e MSc. Alison Batista da Silva foi realizado o fracionamento em coluna cromatográfica empregando gel de sílica 60 da Merck[®] ou da Vetec[®] [Ø 70-230 µm] em coluna de vidro. O comprimento e o diâmetro das colunas variaram de acordo com as alíquotas das amostras e as quantidades de gel de sílica utilizadas. Para a análise em cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) utilizaram cromatoplasmas de alumínio cobertas com gel de sílica 60 [Ø 5-40 µm] F₂₅₄ – Merck[®] (espessura de 0,2 mm).

A revelação das substâncias nas placas foram realizadas através de exposição à lâmpada ultravioleta da marca Spectroline[®] modelo CM-10 em dois comprimentos de onda (254 e 365 nm) e pulverização com solução de vanilina (C₈H₈O₃) em HClO₄ 0,75 M/EtOH (1:1), seguido de aquecimento (100 °C) em chapa elétrica até sua completa revelação. Os eluentes utilizados foram: hexano (Hex), diclorometano (CH₂Cl₂), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH), puros ou combinados em proporções crescentes de polaridade. Os solventes P. A. utilizados na eluição foram das marcas Vetec[®] e Synth[®].

3.3.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As análises por CLAE foram realizadas empregando um aparelho da marca SHIMADZU, modelo UFLC, equipado com detector UV-Vis com arranjo de diodos (SPD-M20A) e um sistema de bomba ternário. As separações foram feitas em coluna semi-preparativa Phenomenex[®] C18 (10 mm x 250 mm, 5 µm), mantidas em um forno termostático à 35°C.

Os solventes empregados apresentaram grau HPLC (MeOH, ACN e H₂O-Milli-Q) e foram adequadamente filtrados através de membranas de nylon com poros de 0,45 µm (Milipore). As amostras foram dissolvidas nas fases móveis empregadas em cada análise e filtradas através de membranas de nylon com poros de 0,45 µm (Whatman).

3.3.3 Método espectrométrico

3.3.3.1 Espectrometria de massas

Os espectros de massas de alta resolução foram obtidos no Laboratório Multiusuário de Química e Produtos Naturais (LMQPN) da Embrapa Agroindústria Tropical através de colaboração com o Dr. Kirley Canuto em um espectrômetro WATERS, modelo *UPLC – QTOF – MS/MS*, equipado com fonte de ionização por eletrospray (IES), sendo as *scans* adquiridas no modo positivo e negativo. A análise por *LC/MS* foi obtida usando uma coluna BEH de fase reversa de 15 cm e fase móvel um gradiente composto por CH₃CN (0,1 % Ác Fórmico) / H₂O (0,1 % Ác Fórmico) variando de 2-98% de CH₃CN em 15 minutos, com um fluxo de 0,2 mL/min.

3.3.3.2 Análise das amostras em bases de dados

O programa *AntiMarin* contém dados de todos os compostos da base *MarinLit*, que contém dados de todos os compostos publicados obtidos de organismos marinhos, combinados com os da *AntiBase*, a base de dados que contém a informação de todos os compostos naturais obtidos de micro-organismos, sejam eles marinhos ou terrestres. Desse modo, o banco de dados do *AntiMarin* soma aproximadamente 55 mil entradas. A análise é realizada a partir de dados obtidos em um espectrômetro de massas de alta resolução, onde é possível fazer a busca com dados da substância, tanto no modo positivo (protonada ou sodiada) quanto no modo negativo.

3.4 Fracionamento Cromatográfico bioguiado do extrato bruto BRA535

O extrato bruto ativo obtido da cepa BRA-535 foi submetido à cromatografia de adsorção em coluna, sendo o mesmo solubilizado em 1,0 mL de CH₂Cl₂ e disposto sobre 3,0 g de gel de sílica em coluna de 1,5 cm de diâmetro interno. A eluição foi realizada utilizando os solventes Hex, AcOEt e MeOH, puros ou em misturas binárias, em gradiente crescente de polaridade, nas proporções indicadas na (Tabela 2) abaixo. Foram geradas 8 frações, as quais tiveram seu potencial citotóxico avaliado frente a células tumorais humanas da linhagem HCT116 (adenocarcinoma de cólon). Dentre elas, a fração C mostrou-se ser a mais ativa frente a células tumorais humanas testadas.

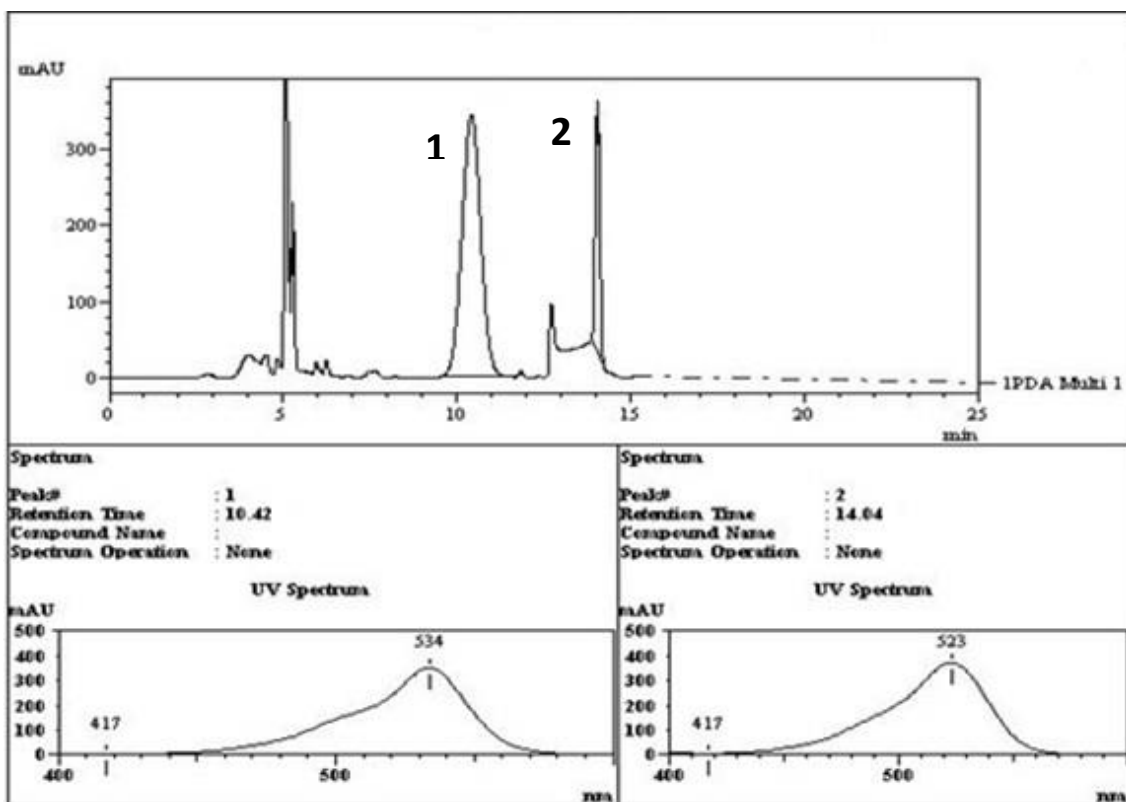
Tabela 2. Dados resultantes do fracionamento cromatográfico do extrato bruto do extrato da BRA 535

| Eluente | Volume (mL) | Frações | Massa (mg) | Rendimento (%) |
|------------------|--------------------|----------------|-------------------|-----------------------|
| Hex 100% | 200 | A | 100,2 | 6,7 |
| Hex/AcOEt (3:1) | 200 | B | 227,9 | 15,2 |
| Hex/AcOEt (2:1) | 200 | C | 125,0 | 8,3 |
| Hex/AcOEt (1:1) | 200 | D | 143,6 | 9,6 |
| AcOEt 100% | 200 | E | 513,8 | 34,2 |
| AcOEt/MeOH(4:1) | 200 | F | 115,8 | 7,7 |
| AcOEt/MeOH (2:1) | 200 | G | 48,3 | 3,2 |
| MeOH 100% | 200 | H | 135,4 | 9,1 |
| Total | - | - | 1.410 | 94 |

A fração C (125,0 mg) foi dissolvida em 0,5 mL de CH₂Cl₂ e submetida a cromatografia de adsorção em gel de sílica (1 g em coluna de 0,5 cm de diâmetro), resultando em 40 frações com aproximadamente 5 mL. A eluição foi realizada utilizando os solventes Hex, AcOEt e MeOH, puros ou em misturas binárias, em gradiente crescente de polaridade. As frações foram monitoradas por CCDA a qual foi possível a reunião em 5 frações denominadas de f CA; f CB; f CC e f CD e f CE. Dentre elas, a fração CB mostrou-se ser a mais ativa frente a células tumorais humanas testadas.

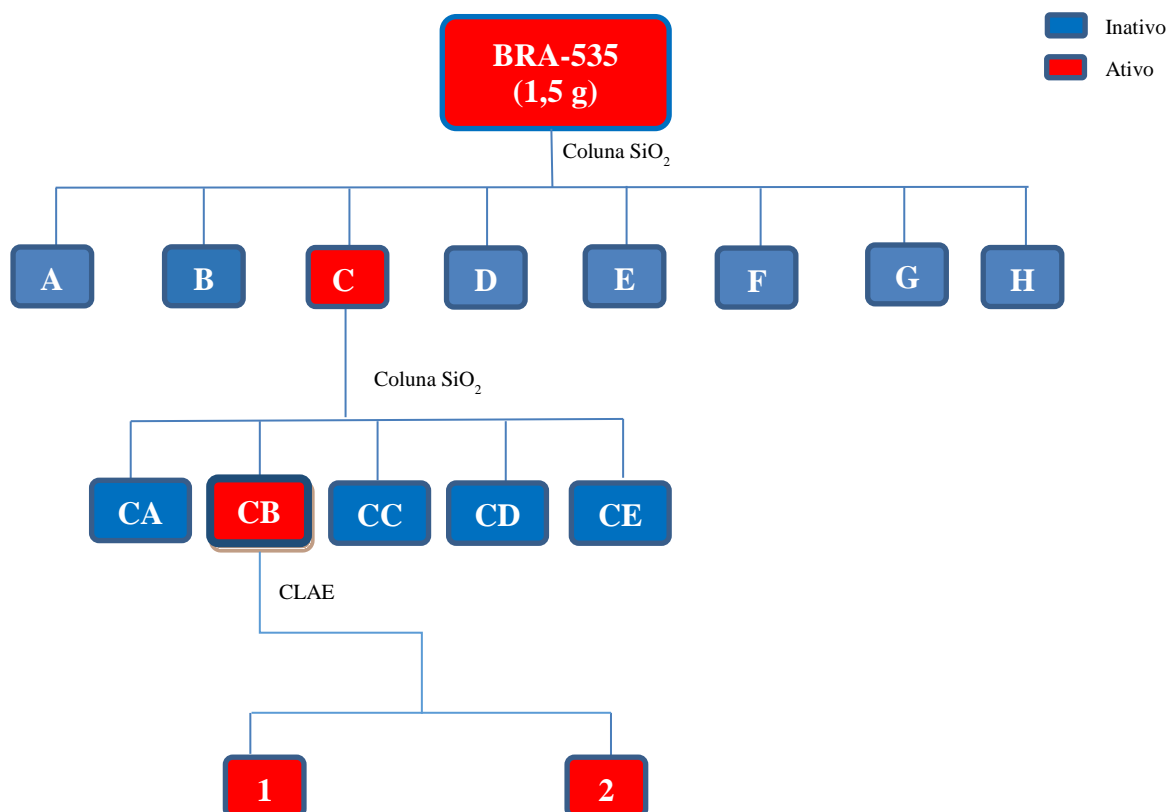
A fração CB (15,4 mg) foi purificada por CLAE, injetando-se alíquotas de 200 µL da amostra dissolvida em uma mistura de CH₃CN /H₂O 6:4 (v/v) com concentração de aproximadamente 15,4 mg/mL. A separação foi realizada utilizando uma coluna semipreparativa de fase reversa C18, usando como fase móvel gradiente composto por CH₃CN /H₂O variando de 60 a 100 % de CH₃CN em 20 minutos com um fluxo de 4,72 mL/min. Foram coletados 2 picos (Fig. 7, abaixo) registrados com tempos de retenção de 10,42 minutos (pico 1) e 14,04 minutos (pico 2), que após secos forneceram 1,8 mg de uma resina roxa denominado **BRA-535-CBP1 (1)** e 1,6 mg de uma resina rosa denominado **BRA-535-CBP2 (2)**, respectivamente.

Figura 7. Cromatograma de isolamento do metabólito 1 e 2



Fonte: Elaborado por MSc. Alison Batista.

Figura 8. Fluxograma ilustrando o isolamento dos compostos ativos a partir do extrato bruto BRA-535



Fonte: Elaborado por MSc. Alison Batista.

3.5 Avaliação da Atividade Citotóxica *in vitro*

3.5.1 Cultivo das células

As linhagens celulares utilizadas nos experimentos de avaliação da atividade citotóxica estão listadas na (Tabela 3) com especificações quanto ao tipo histológico do câncer, à procedência e concentração de plaqueamento das linhagens.

As células foram cultivadas em frascos plásticos para cultura (Sarstedt), 25 cm², volume de 50 mL ou 75 cm², volume de 250 mL) utilizando o meio de cultura DMEM (Gibco) complementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (100 U/mL penicilina e 100 µg/mL estreptomicina).

As culturas foram manuseadas em câmara de fluxo laminar vertical (ESCO, modelo Airstream classe II-B2; VECO, modelo Biosafe 12 classes II) e mantidas em incubadora de CO₂ a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂ (SAYNO, modelo MCO-19AIC; NUAIRE, modelo TS Autoflow). O crescimento das culturas foi acompanhado diariamente com auxílio de microscópio óptico invertido (LABOMED, modelo TCM

400; Nikon, modelo Diaphot) e o repique para meio de cultura novo foi feito quando necessário. Para o desprendimento das células aderidas utilizou-se uma solução de tripsina-EDTA 0,5% (Gibco) diluída 10X em PBS (FRESHNEY, 2005).

Tabela 3. Linhagem celular tumoral utilizada no ensaio de citotoxicidade *in vitro*

| Linhagem Celular | Tipo Histológico | Procedência | Concentração de plaqueamento (cél/mL) |
|-------------------------|-----------------------------|--------------------|--|
| HCT116 | Carcinoma de cólon humano | BCRJ | $3,0 \times 10^4$ |
| B16-F10 | Melanoma metastático murino | BCRJ | $3,0 \times 10^4$ |
| PC-3M | Próstata metastático humano | NCI | $2,5 \times 10^4$ |
| L929 | Fibroblasto murino | BCRJ | $3,0 \times 10^4$ |
| HEK293A | Rim embrionário humano | FIOCRUZ | $3,0 \times 10^4$ |

3.5.2 Ensaio da Sulforodamina B

No ensaio da Sulforodamina B (SRB) o corante utilizado é uma aminoxantina de cor rosa brilhante, que possui dois grupos sulfônicos que são capazes de se ligar às porções terminais dos aminoácidos das células que foram fixadas com o ácido tricloroacético (SKEHAN et al., 1990). Quanto maior o número de células viáveis, maior a captação do corante e maior é o valor da absorbância. Este ensaio permite também que as placas sejam estocadas, e desse modo, a leitura pode ser realizada posteriormente (HOUGHTON et al., 2007; SKEHAN et al., 1990).

Atualmente o método do SRB é um dos mais utilizados na rotina de triagem de drogas anticâncer pelo Instituto Nacional de Câncer dos Estados Unidos (NCI) para uso em programas de avaliação de drogas anticâncer (FRESHNEY, 1994; RUBINSTEIN et al., 1990).

Procedimento experimental

Para a realização desse ensaio, as células foram plaqueadas 24 horas antes da adição da amostra teste em placas de 96 poços na concentração de 3×10^4 céls/mL.

Em uma análise inicial, as amostras a serem testadas foram diluídas em dimetilsulfóxido, DMSO 0,4%, e testadas quanto ao seu efeito antiproliferativo para determinar os extratos mais ativos. Em seguida as moléculas isoladas do extrato selecionado (BRA-535) foram testadas nas células citadas na tabela 3, após 24, 48 e 72 horas de incubação. As duas substâncias encontradas foram testadas no painel de linhagens da tabela 3, em concentrações decrescentes de 12,7 μ M a 0,0007 μ M, e foram incubadas juntamente com a suspensão de células em volume final de 200 μ L durante 24, 48 e 72 h, em estufa a 5% de CO₂ a 37°C.

No momento em que as células foram tratadas, a placa tempo zero (não tratada) foi fixada com ácido tricloroacético (TCA) a 10%, e a placa foi reservada a uma temperatura de 4 °C por no mínimo 1h, para que em seguida pudesse ser feita a coloração com SRB.

Após o tempo de incubação, 24, 48 e 72 horas, o sobrenadante das células foi retirado e as mesmas foram também fixadas com TCA a 10%, sendo então guardadas a uma temperatura de 4°C por no mínimo 1 hora. Após o período de fixação, as placas foram lavadas 5 vezes com água destilada e em seguida esperou a secagem dos poços até que não houvesse umidade aparente. Em seguida adicionou-se 100 μ L da solução de SRB a 0,4%, e as placas então foram mantidas em estufa a 5% de CO₂ a 37°C por 30 minutos. Ao término do tempo de incubação, as placas foram lavadas 5 vezes usando ácido acético a 1% para remover o excesso de SRB que não ficou ligado aos aminoácidos celulares. Já as paredes dos poços foram limpas cuidadosamente para remover qualquer excesso de SRB que pudesse falsear o teste.

Para realizar a leitura das placas, o SRB que estava ligado aos aminoácidos fixados, foi solubilizado em 200 μ L de tampão tris base 10 mM a 4°C, e homogeneizadas em mesa agitadora (shaker) por pelo menos 10 minutos, em temperatura ambiente. As absorbâncias foram lidas em leitor de placa (Fisher Scientific, modelo Multiskan FC) no comprimento de onda 564 nm ou 570 nm.

Análise do Dados

- Normalização dos dados de proliferação celular:

Os valores de absorbância foram normalizados em excel para $X=\log[X]$ e em seguida os gráficos de absorbância x concentração foram plotados para determinar em que concentrações a amostra foi citotóxica ou citostática, a partir de interpolação de regressão não-linear no programa GraphPad Prism (GraphPad Software versão 7.0).

As equações a seguir são utilizadas para a normalização dos resultados feitos no excel:

Se $T \geq T_0$ e $< CN \rightarrow$ efeito citostático

Fórmula:

$$\% \text{ proliferação celular} = 100 \times (T - T_0) / (CN - T_0)$$

Se $T < T_0 \rightarrow$ efeito citocida

Fórmula:

$$\% \text{ proliferação celular} = 100 \times (T - T_0) / T_0$$

onde T: Absorbância das células tratadas

T₀: Absorbância das células da placa tempo zero

CN: Absorbância das células do controle negativo

-Determinação de Inibição da Proliferação celular:

Para análise de inibição de proliferação celular, os experimentos foram analisados segundo suas médias e respectivos erros-padrão. Para a análise das amostras testadas em diluição seriada, em triplicatas, um gráfico de absorbância x concentração foi plotado para determinação da inibição do crescimento celular em 50% (IC₅₀) com seu efeito citostático, a inibição do crescimento total (ICT) e seu efeito citotóxico com a concentração letal média (CL₅₀) a partir de interpolação de regressão não-linear GraphPad Prism (GraphPad Software versão 7.0).

3.5.3 Ensaio clonogênico

O ensaio clonogênico ou ensaio de formação de colônias é definido pela capacidade de uma única célula proliferar e gerar uma colônia, é um ensaio de

sobrevivência celular *in vitro*. Inicialmente, essa técnica foi desenvolvida para avaliar os efeitos da radiação nas células, na década de 1950, no entanto, ainda é usado para estudos sobre o câncer (MUNSHI; HOBBS; MEYN, 2005).

Procedimento experimental

As células HCT116 foram plaqueadas (500 céls/poço) em placas de 6 poços, com capacidade de 3 ml de volume em cada poço. Após 24h do plaqueamento, as células foram tratadas com DMSO 0,4% (controle negativo). Como controle positivo foi utilizado a doxorubicina (0,4 μ M). Para analisar a capacidade de formação de colônia, a estreptorubina B foi testada nas concentrações de (5, 50 e 500 nM). Foi acompanhado o crescimento celular diariamente e verificado sempre o controle negativo, pois é necessário que a formação de colônia no poço controle cubra mais ou menos 50-70% da placa, mas que ainda consiga ver as colônias individuais/isoladas. Ao completar 72h de tratamento foi feito a troca do meio de cultura dos poços, e o crescimento continuou por mais oito dias, totalizando onze dias de tratamento. Quando atingiu a confluência necessária o experimento foi interrompido.

Foi feito a retirada do meio de cultura, feito duas lavagens com PBS e adicionado o corante cristal de violeta (0,5% cristal de violeta em metanol 50% e água destilada) sob agitação por 4h. Após corar, foi feito lavagens com água destilada até total remoção do corante, as placas em seguida foram deixadas em temperatura ambiente para secagem total.

Análise dos Dados:

Foi utilizado o equipamento *In-vivoMS FX PRO* (Bruker) para a leitura das placas e os dados analisados pelo software Image J, que quantificou os resultados quanto ao número de colônias e área de preenchimento de cada placa.

3.6 Avaliação dos Efeitos de Estreptorubina B em células de carcinoma de cólon (HCT116) por meio de citometria de fluxo

3.6.1 Verificação da emissão de fluorescência na Estreptorubina B

A citometria de fluxo possibilita investigar e classificar inúmeras alterações e características de eventos biológicos em células ou outras partículas microscópicas. O equipamento citômetro possui um feixe de luz (*laser*) que incide sobre as células, à medida que elas fluem individualmente sob um fluxo hidrodinâmico, permitindo a detecção dos sinais desviados por cada célula. Os detectores são capazes de registrar desvios na dispersão linear (FSC, *Forward Scatter*) ou lateral (SSC, *Side Scatter*) da luz, além de captar a fluorescência emitida pelos marcadores utilizados, classificando as células de partículas com cada evento (TUCHIN, 2011; GIVAN, 2004).

Procedimento experimental

Nas concentrações de (1, 50, 250, 500 e 1000nM) da estreptorubina B tratadas com células HCT116 por 24h, foi observada sua capacidade de florescer nos canais de detecção de fluorescência, presente no citômetro FACSVerse (BD Biosciences). Utilizou-se do DMSO 0,4% (controle negativo).

A linhagem celular foi plaqueada em placas de 24 poços, na concentração de 4×10^4 células/mL, e incubadas com estreptorubina B nas concentrações (1, 50, 250, 500 e 1000nM) por 24h. Após soltura das células por tripsinização, as células foram para avaliação da identificação de fluorescência. Foram adquiridas dez mil células de cada grupo. Durante a aquisição, todos os canais de detecção de fluorescência exibidos na (Tabela 4) foram habilitados, com o intuito de se avaliar o máximo de faixas de comprimento de onda de fluorescência que o equipamento pudesse avaliar. Os valores das voltagens de cada canal foram ajustados a partir da primeira amostra adquirida pelo equipamento, tendo sido mantidos ao longo do experimento.

Para analisar a fluorescência nas referidas concentrações de estreptorubina B, foi feita a verificação da emissão de fluorescência para os canais que emitem luz violeta (505 nm), luz azul (488 nm) e luz vermelha (633 nm) utilizando o citômetro FACSVerse (BD Biosciences).

Tabela 4. Configuração óptica do citômetro BD FACSVersTM

| Laser | Filtros ópticos | Faixa de detecção (nm) | Exemplos de fluorocromos detectáveis |
|--------------------------|------------------------|-------------------------------|---|
| Violeta (405 nm) | 450/50 | 425–475 | V450 |
| | 510/50 | 485–535 | V500 |
| Azul (488 nm) | 530/30 | 515–545 | FITC |
| | 585/42 | 564–606 | PE, PI |
| | 700/54 | 665LP | 7-AAD |
| | 780/60 | 750–810 | PE-Cy7 |
| Vermelho (633 nm) | 660/20 | 650–670 | APC |
| | 780/60 | 750–810 | APC-Cy7 |

Fonte: Adaptado de wwwbdbiosciences.com/documents/BD_FACSVers_FilterGuide.pdf; Adaptado de Santos, 2016.

Análise dos Dados

Os dados foram analisados a partir da intensidade de fluorescência mediana (IFM) apresentado após o experimento realizado, assim como os gráficos gerados nesse experimento. Os gráficos foram analisados e gerados utilizando o citômetro FACSVers (BD Biosciences). Para verificação da ocorrência de diferenças entre os diferentes grupos, e diferenças de emissão de fluorescência nos canais os dados foram colocados em gráficos de barra e analisados no programa GraphPad Prism (GraphPad Software versão 7.0).

3.6.2 Análise dos Efeitos de Estreptorubina B sobre Linhagens Celulares Tumorais

Para os estudos preliminares do mecanismo de ação da estreptorubina B, utilizaram-se as células da linhagem de carcinoma de cólon (HCT116). Para os ensaios descritos a seguir, a linhagem celular foi plaqueada em placas de 24 poços, na concentração de 3×10^4 células/mL, e incubadas com estreptorubina B.

Procedimento experimental

As células HCT116 foram tratadas com DMSO 0,4% (controle negativo). Como controle positivo foi utilizado a doxorubicina (0,4 μ M). Para analisar a morfologia, a estreptorubina B foi testada nas concentrações de 50, 500 e 1000 nM incubadas por 24h.

A morfologia, integridade de membrana e contagem celular, a estreptorubina B foi testada nas concentrações de 50 e 500nM incubadas por 48h. Para o ciclo celular e fragmentação de DNA foram testadas as concentrações de (125, 625 e 1.250 nM) em 24 e 48h de incubação. As células foram analisadas utilizando o citômetro FACSVerse (BD Biosciences).

Após soltura das células por tripsinização, as células foram para avaliação de alterações morfológicas e contagem de células. Dez mil células foram contadas de cada replicata de cada grupo, com os fragmentos celulares omitidos da análise. As células foram dispostas quanto à sua dispersão linear, correlacionando ao seu volume, e dispersão lateral, correlacionando à sua granulosidade. Uma parte das células foi marcada com 5µM de DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) para avaliação da integridade da membrana plasmática.

Para análise de ciclo celular e fragmentação de DNA, as células da linhagem tumoral de carcinoma de colón (HCT116) foram tratadas com a estreptorubina B, após a centrifugação e lavagem dos tratados, foi adicionado 5µM de DAPI(4',6-diamidino-2-fenilindol) com Triton X-100 1% para lisar as membranas plasmáticas e marcar o DNA de todas as células. Neste ensaio, o DAPI se liga ao DNA após a membrana plasmática das células ter sido permeabilizada por um detergente, permitindo que o DAPI se ligue ao DNA de todas as células. Células com o núcleo íntegro emitirão alta fluorescência, e aquelas que apresentam núcleos com condensação da cromatina e DNA fragmentado incorporam menos o DAPI e por isso emitem menor fluorescência. Além disso, o DAPI se intercala proporcionalmente à quantidade de DNA da célula, permitindo mensurar as fases do ciclo celular por meio da quantidade de DNA presente em cada fase do ciclo.

Análise dos Dados

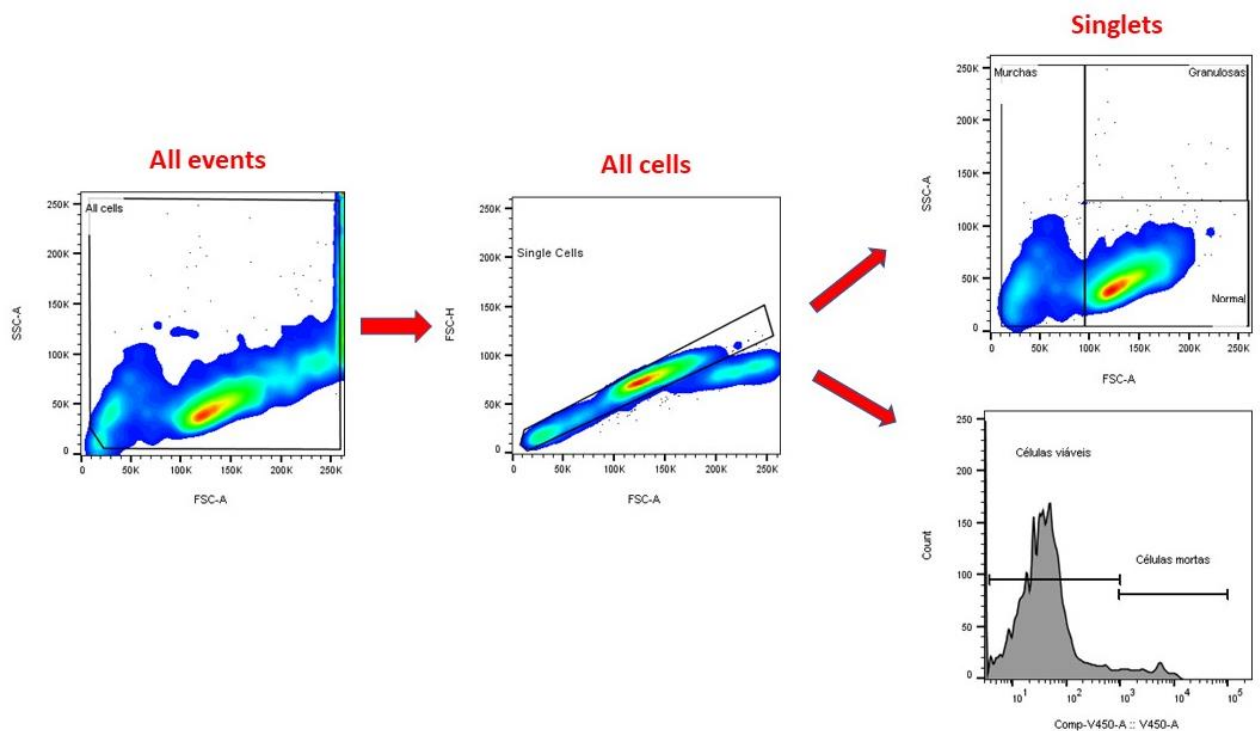
Os dados foram analisados a partir da média e dos respectivos erros padrão do experimento realizado em triplicata. Para verificação da ocorrência de diferenças entre os diferentes grupos, os dados foram analisados no programa GraphPad Prism (GraphPad Software versão 7.0), os dados foram comparados em relação ao controle negativo por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Dunnet com nível de significância máximo de 5% ($p < 0,05$).

Após a marcação adequada, 10 mil eventos foram adquiridos no citômetro para avaliação de morfologia e ciclo celular. Foi realizada a estratégia de gates apropriada

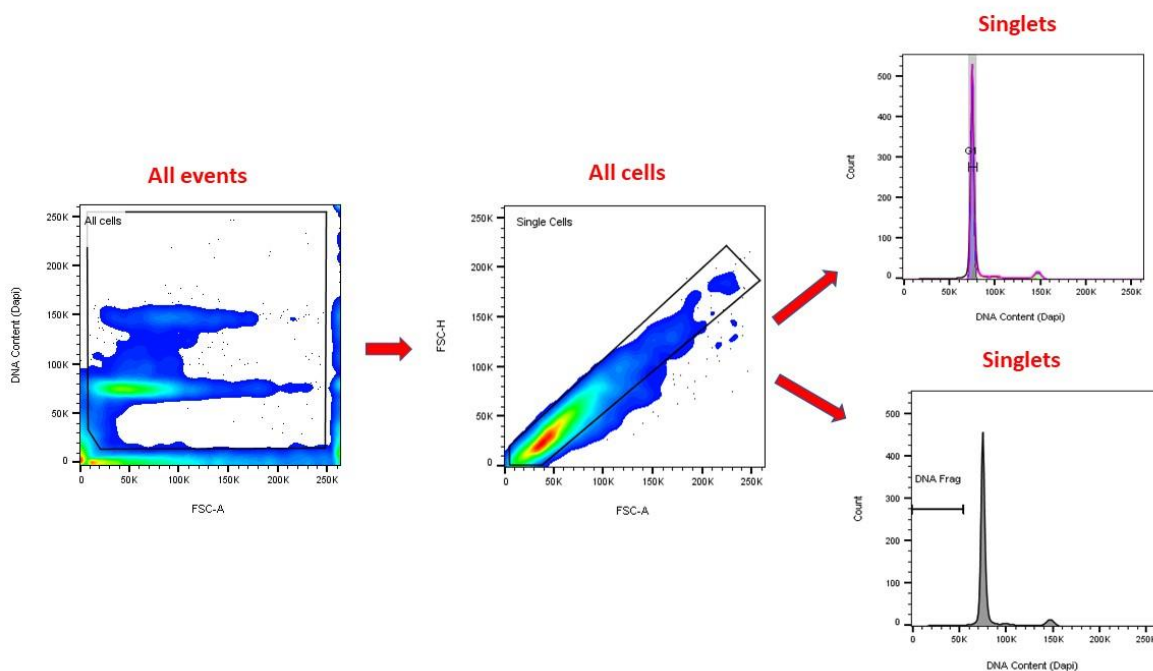
para a população de células desejada tendo sido excluídos os debris e agregados da análise (Fig. 11). Inicialmente foi criado um gráfico de pontos (dot plot) com parâmetros de morfologia (FSC vs SSC) contendo todos os eventos adquiridos pelo citômetro (*all events*) onde foi criada uma região de seleção (gate) contendo todas as células adquiridas (*all cells*) de forma a excluir os debris e outliers. Em um novo gráfico contendo apenas a população de *all cells* criou-se um *gate* para selecionar os eventos simples (*singlets*) através da plotagem de 2 medidas do parâmetro FSC. Finalmente, foram criados gráficos contendo apenas *singlets* com gates apropriados de alterações morfológicas (Figura9A) (redução do tamanho e aumento da granulosidade) ou ciclo celular e fragmentação de DNA (Figura9B). A contagem de células foi realizada a partir de dados do *gate* de células com morfologia normal. Os resultados de contagem, morfologia e ciclo celular foram analisados utilizando o software FlowJo (Tree Star Inc).

Figura 9. Estratégia de seleção das populações utilizadas para A) Análise de alterações morfológicas e integridade de membrana, e B) Ciclo celular e Fragmentação de DNA nos experimentos de citometria.

A)



B)



Fonte: Elaborado pela autora.

3.7 Microscopia Confocal

A microscopia confocal é uma técnica que permite a aquisição de imagens utilizando fluorescência. O microscópio confocal gera as imagens com uma maior resolução e contraste se comparadas às imagens geradas por um microscópio óptico convencional. Uma vez que o microscópio confocal tem a capacidade de excluir a luz emitida por outros pontos que não estão no plano focal. Esse tipo de microscópio possui um conjunto de lentes capaz de focar um cone de luz em uma profundidade predeterminada da célula ou amostra a ser estudada. Quando o ponto focal é alterado, porém se mantém a profundidade, é possível iluminar todo o plano da amostra em estudo, ponto a ponto e, dessa forma, é possível a construção de imagens tridimensionais (SAMWOGERERE & WEEKS, 2005).

O princípio da fluorescência é baseado no uso de compostos químicos denominados fluoróforos. Em geral, os fluoróforos são específicos e utilizados com o intuito de localizar uma área específica da amostra (como núcleo ou actinas, por exemplo). A fluorescência acontece por um fenômeno onde os elétrons do fluoróforo os fótons de energia provindos da fonte do microscópio, que por sua vez capta o fóton emitido pelo elétron ativado e com ele gera uma imagem (METZ, 2004).

Procedimento experimental

Células da linhagem HCT116 foram plaqueadas na concentração de $4,0 \times 10^4$ /mL em placas circulares com lamínulas acopladas ao fundo, apropriadas para confocal, e foram incubadas com estreptorubina B na concentração de (50nM e 250nM) por 48h em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ e 95% de umidade. O DMSO a 0,4% foi utilizado como controle negativo.

Após as 48h de incubação, o meio das células foi descartado e foram feitas três lavagens com salina, 2 placas só com as amostras nas concentrações testadas foram diretamente para análise em microscópio confocal sem nenhum marcador, e as outras placas com as células e amostras foram então incubadas com marcadores específicos para retículo endoplasmático (ER-Tracker™ Red) e lisossomos (LysoTracker ® Blue DND-22) na concentração de 50 nM por 2h de incubação.

Análise dos Dados:

A análise dos dados foi feita utilizando a microscopia confocal, com registro de imagens da localização da estreptorubina B, com objetiva - Plan-Apochromat 63x/1.40 Oil DIC M27. Dessa forma foi possível avaliar as características morfológicas das células tratadas com estreptorubina B e compará-las ao controle negativo (não-tratado) assim como as células tratadas só com a substância (estreptorubina B).

4 RESULTADOS

4.1 Micro-organismos Recuperados das ilhas oceânicas do Brasil

Todas as cepas isoladas foram registradas e depositadas no inventário de bactérias do Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia Marinha, adicionando dados como local de coleta, método de processamento, meio de cultura inicial e fenótipo da bactéria isolada. O número maior de micro-organismos recuperados dos Zoantideo *Zoanthus sociatus*, foi recuperado da ilha de Fernando de Noronha (FN), onde apresentou 12 cepas, em seguida da ilha de Trindade (TMV) com 7 cepas recuperadas. Não foram recuperadas cepas de exemplares coletados em Atol das Rocas (AR) e Arquipélago de São Pedro e São Paulo (ASPSP). Foi visto também que o método M4 é mais eficiente, onde a grande maioria das cepas recuperadas foram a partir desse método com 15 cepas isoladas e apenas 4 cepas isoladas a partir do método M5 (Tabela 5).

Tabela 5. Colônias de bactérias recuperadas das ilhas oceânicas brasileiras. Identificação, local de coleta, método de processamento, meio de cultura do isolamento inicial, classificação quanto ao seu fenótipo e

| Cepas Isoladas | Local de coleta | Método de processamento | Meio de cultura inicial | Fenótipo |
|-----------------------|------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-----------------|
| BRA-535 | FN | M4 | SCA | ACTINOMICETO |
| BRA-573 | FN | M4 | SWA | ACTINOMICETO |
| BRA-551 | FN | M4 | SWA | ACTINOMICETO |
| BRA-552 | FN | M4 | SWA | ACTINOMICETO |
| BRA-553 | FN | M4 | SWA | ACTINOMICETO |
| BRA-595 | TMV | M4 | SCA | GRAM-NEGATIVA |
| BRA-596 | TMV | M4 | SCA | GRAM-NEGATIVA |
| BRA-597 | FN | M4 | SCA | ACTINOMICETO |
| BRA-598 | TMV | M4 | SWA | ACTINOMICETO |
| BRA-599 | FN | M5 | SCA | GRAM-NEGATIVA |
| BRA-600 | FN | M5 | SCA | GRAM-NEGATIVA |
| BRA-601 | TMV | M5 | SCA | GRAM-NEGATIVA |
| BRA-602 | FN | M5 | SWA | GRAM-NEGATIVA |
| BRA-603 | TMV | M4 | SCA | ACTINOMICETO |
| BRA-604 | TMV | M4 | SCA | ACTINOMICETO |
| BRA-609 | FN | M4 | SCA | ACTINOMICETO |
| BRA-610 | TMV | M4 | SCA | GRAM-NEGATIVA |
| BRA-611 | FN | M4 | SWA | GRAM-NEGATIVA |
| BRA-617 | FN | M4 | SWA | ACTINOMICETO |

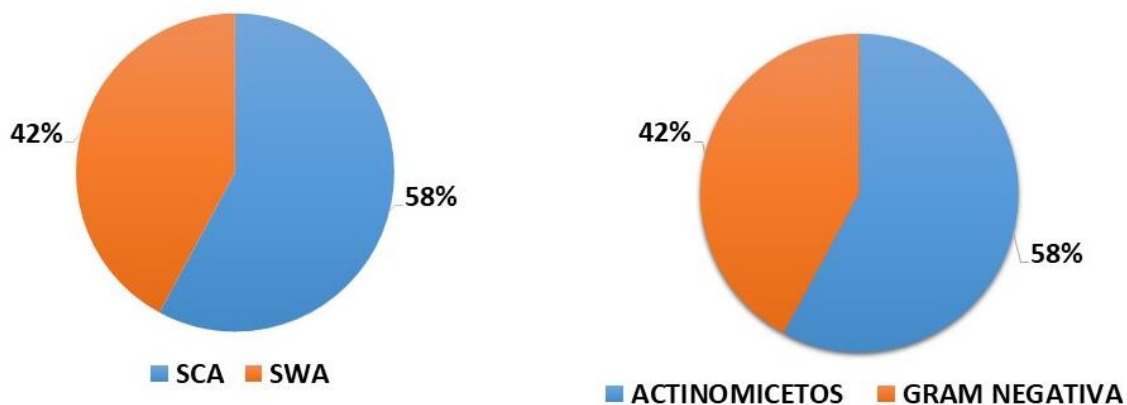
atividades citotóxicas dos extratos brutos.

Com as amostras de invertebrados marinhos coletadas nas ilhas oceânicas do Brasil, 19 cepas de micro-organismos foram recuperadas e isoladas com base em suas características semelhantes às de actinomicetos (58%) e gram negativas (42%). Dos meios utilizados para o isolamento dos micro-organismos, o SCA foi mais favorável ao

crescimento de cepas, apresentando 58% mais favorável, e o meio SWA apresentou menos favorável com 42% das cepas isoladas (Figura 10).

Figura 10. Distribuição do número de colônias isoladas por (A) utilizando os tipos de meios de cultura (SWA) e (SCA) e em (B) por perfil fenotípico (actinomiceto e Gram negativa).

A) B)

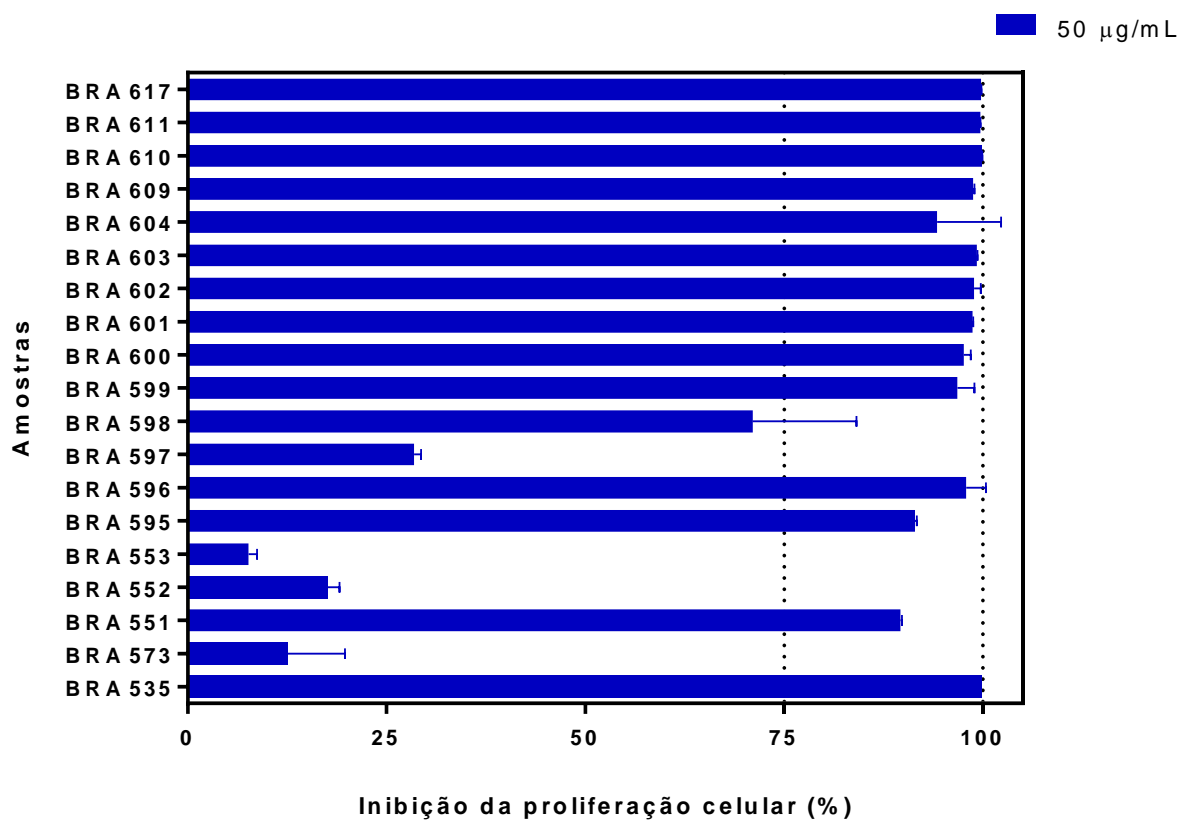


Fonte: Elaborado pela autora.

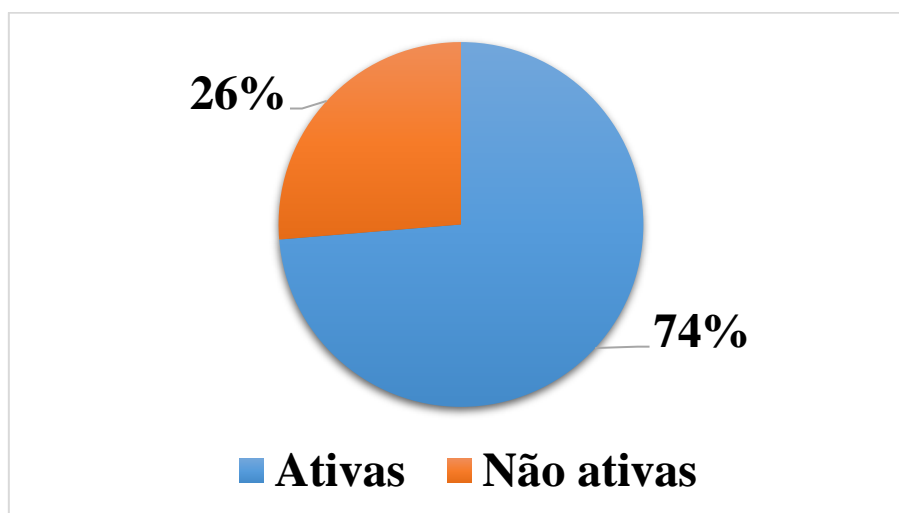
Os extratos brutos obtidos foram testados contra a linhagem HCT 116, em concentração inicial de 50 $\mu\text{g/mL}$. Os extratos brutos que apresentaram inibição da proliferação celular em pelo menos 75% na menor ou maior concentração, foram considerados ativos (Figura 11A) e (Figura 11B). Em seguida foram submetidos a uma análise quantitativa, para a obtenção das respectivas CI_{50} frente a linhagem tumoral HCT 116, incubadas por 72h a concentrações seriadas entre 0,0036 e 50 $\mu\text{g/mL}$, os dados estão apresentados na (Tabela 6).

Figura 11. Triagem da atividade antiproliferativa dos extratos brutos na concentração de 50 μ g/mL por 72h na linhagem de c ncer de c lon HCT 116. **A**, Inibi o da prolifera o celular em percentagem, e **B**, Percentuais de extratos ativos e inativos considerando o limiar de 75% de inibi o na triagem.

A)



B)



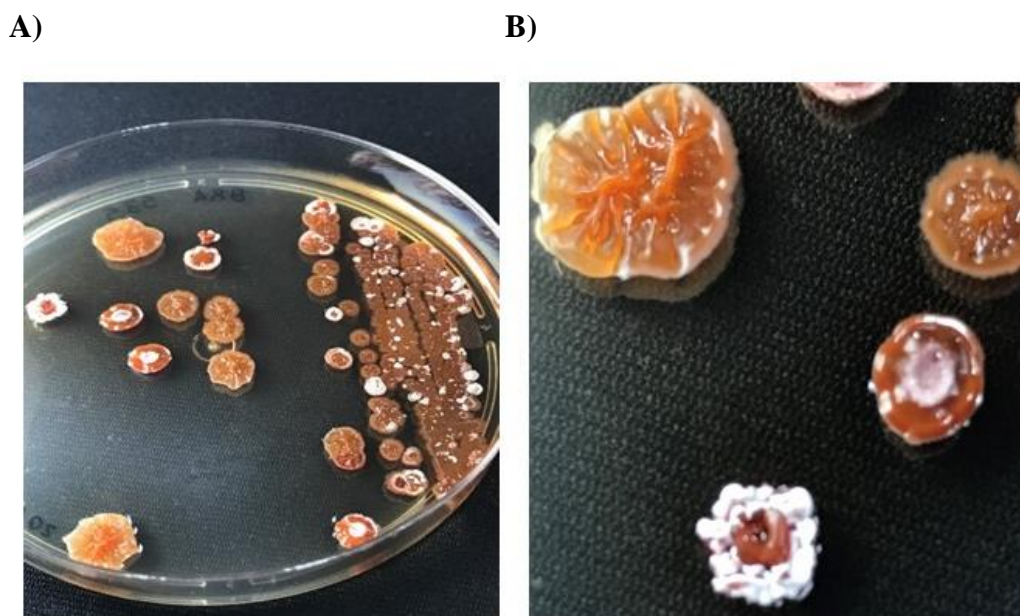
Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 6. Valores de IC₅₀ e IC_{95%} (µg/mL) dos extratos brutos recuperados do *Zoanthus sociatus* das ilhas oceânicas do Brasil, frente a linhagem tumoral HCT 116, expostas por 72h.

| Cepas Isoladas | IC ₅₀ (µg/mL) (IC 95%) |
|----------------|-----------------------------------|
| BRA 535 | 4,795 (3,408 - 6,748) |
| BRA 551 | 0,257 (0,202 - 0,326) |
| BRA 595 | 25,53 (24,83 - 26,25) |
| BRA 596 | 21,89 (20,07 - 23,88) |
| BRA 598 | 37,89 (29,57 - 48,54) |
| BRA 599 | 14,41 (10,56 - 19,67) |
| BRA 600 | 32,44 (23,56 - 44,66) |
| BRA 601 | 39,45 (29,15 - 53,39) |
| BRA 602 | ~12, 23 |
| BRA 603 | >50 µg/ mL |
| BRA 604 | >50 µg/ mL |
| BRA 609 | 39,95 (36,44 - 43,78) |
| BRA 610 | 38,56 (36,38 - 40,88) |
| BRA 611 | >50 µg/ mL |
| BRA 617 | 0,31 (0,1022 - 0,9676) |

O extrato das cepas BRA-535, BRA-551 e BRA-617 foram os mais ativos e o BRA-535 foi escolhido para prosseguir com os experimentos (Figura 12). Apesar de não ter sido o extrato com menor IC₅₀ apresentado, ele mostrou uma atividade antiproliferativa potente por se tratar de um extrato bruto, apresentando uma IC₅₀: 4,8 µg/mL. Os extratos com menores IC₅₀ como a BRA-551, os compostos encontrados nele, como estaurosporinas, já tinha sido estudado pelo nosso grupo de estudo. O extrato BRA- 617, foi isolado depois que os estudos com a BRA-535 já estavam com os experimentos encaminhados, porém o extrato bruto da BRA-617 foi injetado em HPLC e foi encontrado substâncias derivadas do grupo da piericidina.

Figura 12. Imagens das colônias da BRA 535 em placa de ágar contendo meio A1. A) visão geral da placa; B) detalhe das colônias, evidenciando a presença de esporos de coloração branco acinzentado.



Fonte: Elaborado pela autora.

4.2 Fracionamento Químico do Extrato da BRA-535

4.2.1 Identificação estrutural dos metabólitos ativos presentes no Extrato da BRA-535

Com a colaboração do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará sob a coordenação da Profa. Dra. Otília Desdênia Lioiolo Pessoa, juntamente com o Dr Francisco das Chagas Lima Pinto e Ms Alison Batista da Silva a identificação dos compostos foi realizada com base nos resultados espectrométricos (UV-Vis, *LC-MS*) e por comparação com os dados existentes na literatura.

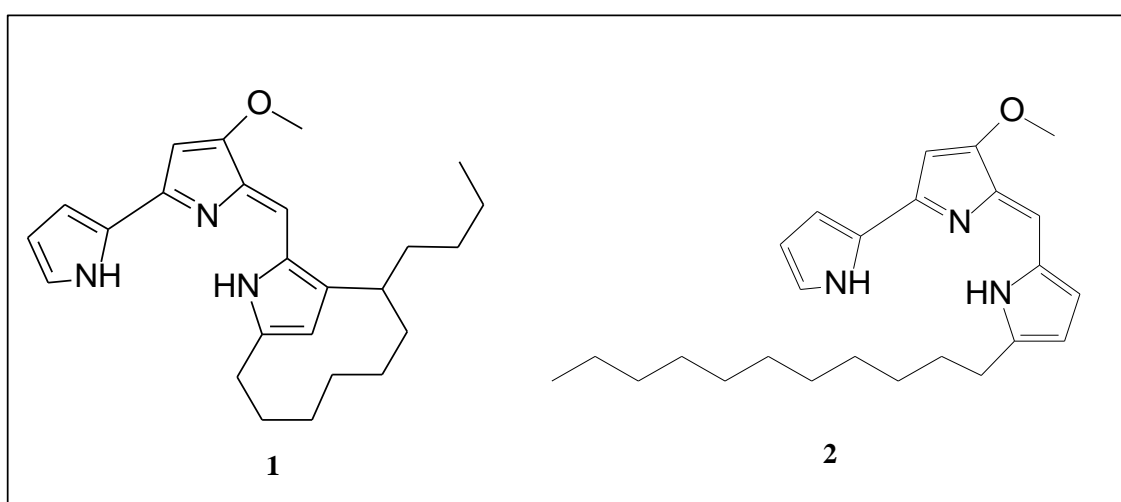
4.2.2 Identificação estrutural dos metabólitos ativos denominados BRA-535CBP1 e BRA-535CBP2

Esses dois compostos foram isolados por CLAE e analisados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um Espectrômetro de Massas (*LC/MS*) e as massas encontradas foram comparadas ao banco de dados para massas de produtos naturais marinhos: *AntiMarin*.

O perfil de UV-Vis (~530 nm) mostrou bandas de absorção compatíveis com compostos pertencentes à classe das prodigiosinas.

A consulta ao banco de dados do software *AntiMarin*, permitiu a identificação do metabólito denominado BRA-535CBP1 como sendo a estreptorubina B (1) e o metabólito denominado BRA-535CBP2 como sendo a undecilprodigiosina(2) (Figura13, abaixo).

Figura 13. Estrutura química das prodigiosinas:estreptorubina B (1) e undecilprodigiosina (2) isoladas da cepa BRA-535 através de fracionamento bioguiado.



Fonte: Elaborado pelo MSc. Alison Batista.

4.3 Curvas de Concentração-efeito

4.3.1 Ensaio do SRB

A inibição do crescimento celular em 50% (IC₅₀), inibição do crescimento total (ICT) e concentração letal média (CL₅₀) das amostras estreptorubina B e undecilprodigiosina foi determinada por várias linhagens celulares. As duas amostras mostraram-se muito ativa, com esses parâmetros na grandeza de μM por 72h. Foi possível observar que as duas substâncias foram mais sensíveis a linhagem de HCT116 apresentando valores de CI₅₀ de 0,16 nMe 4,5 nM respectivamente (Tabela 7).

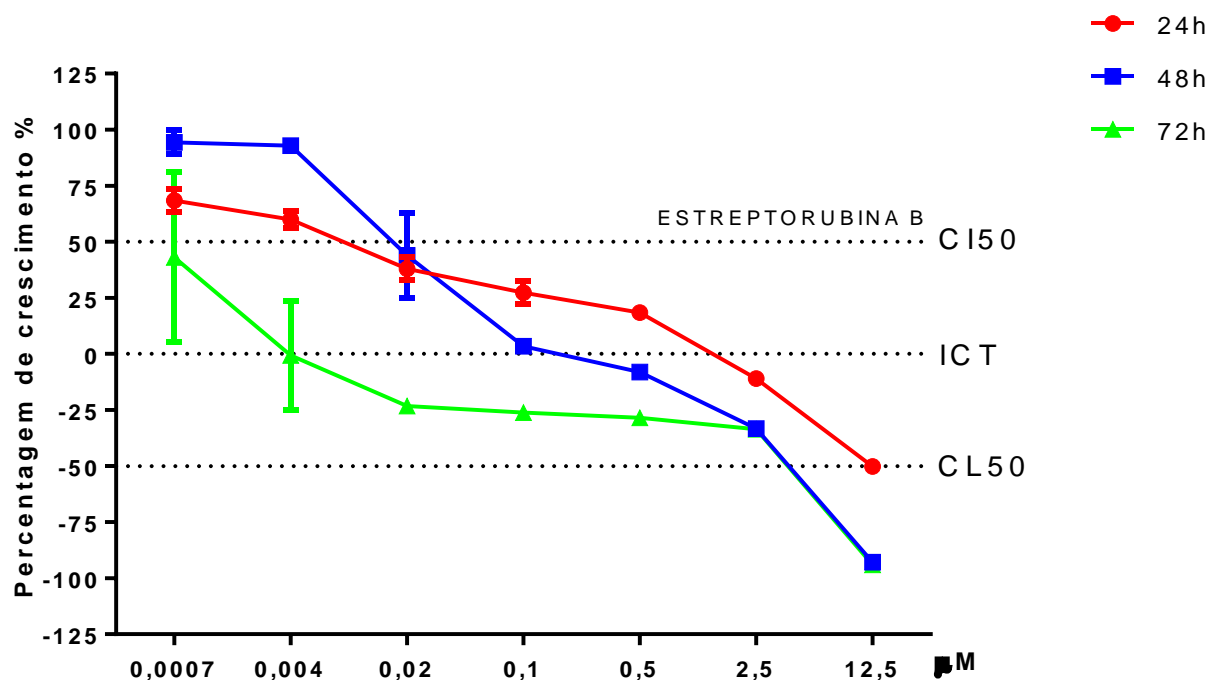
Tabela 7. Atividade citotóxica *in vitro* das prodigiosinas: estreptorubina B e a undecilprodigiosin em três linhagens tumorais (HCT116, PC-3M E B16-F10) e 2 não-tumoral (L929 E HEK293A) pelo ensaio de SRB no tempo de 72h. Apresentando os valores de (IC50 = inibição do crescimento celular em 50%), (ICT= inibição do crescimento total) e efeito citotóxico (CL50 = concentração letal média).

| ESTREPTORUBINA B | | | | | |
|----------------------------|---------------------------|--------------|----------------|---------------------|----------------|
| | LINHAGENS TUMORAIS | | | NÃO TUMORAIS | |
| | HCT116 | PC-3M | B16-F10 | L929 | HEK293A |
| IC50 | 0,16nM | 15,4 nM | 10 nM | 464 nM | 6,3 nM |
| ICT | 4,02 nM | 463 nM | 427 nM | 1.332 nM | 68,6 nM |
| CL50 | 96,8 nM | > 12.704nM | > 12.704nM | 3.827 nM | 747 nM |
| UNDECILPRODIGIOSINA | | | | | |
| | HCT116 | PC-3M | B16-F10 | L929 | HEK293A |
| IC50 | 4,5 nM | 61 nM | 10 nM | 577 nM | 12 nM |
| ICT | 41 nM | 1.109 nM | 429 nM | 1.653 nM | 118 nM |
| CL50 | 372 nM | >12.704 nM | >12.704nM | 4.733 nM | 1.173 nM |

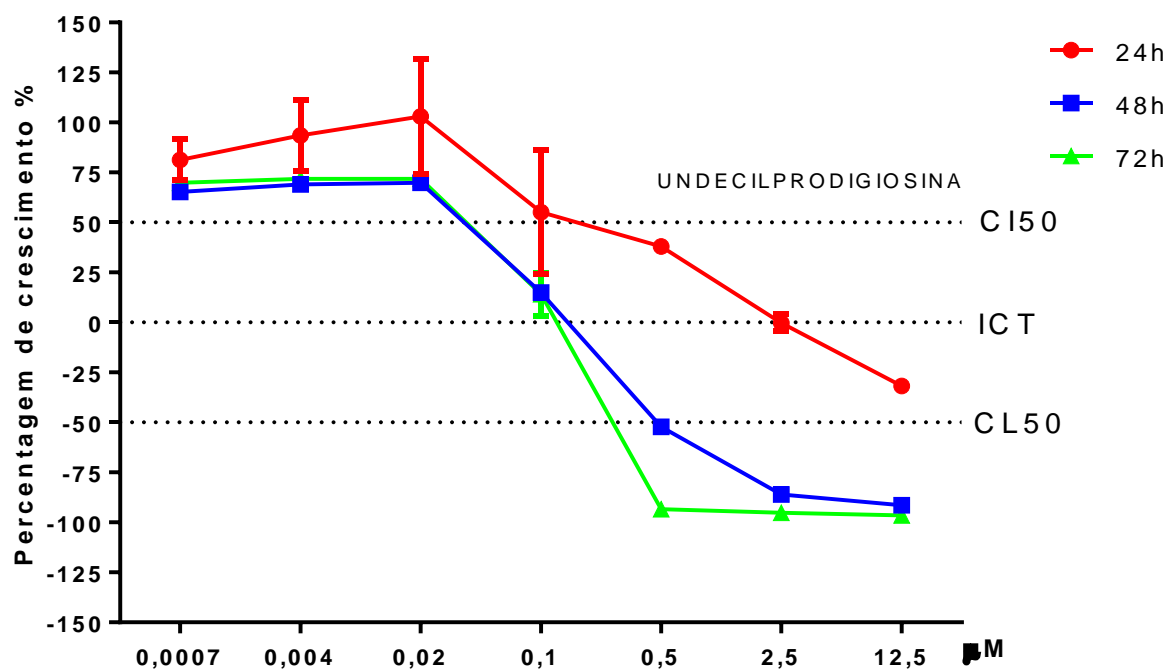
Através da triagem feita com as linhagens tumorais, como foi visto na (Tabela 7)a HCT116 apresentou-se mais sensível as duas substâncias em comum. Na (Figura 14A)estão apresentadas curvas de concentração-efeito de estreptorubina B e undecilprodigiosinana linhagemtumoral mais sensível (HCT-116) conseqüentemente, evidenciando perfis de bioatividade semelhantes nas duas amostras, apesar da estreptorubina B mostrar ser mais potente que a undecilprodigiosina em quase todas as linhagens tumorais. Pode-se observar que as duas substâncias em comum se mostraram citotóxicas na ordem de nM. A (Tabela 8) mostra os valoresde IC50, ICT e CL50 obtidos após experimento com HCT116 nos tempos de 24, 48 e 72h de tratamento com as duas substâncias, podemos confirmar sua atividade antiproliferativa inicialmente em 24h e sua atividade citotóxicaem 48 e 72h.

Figura 14. Curvas concentração-efeito de estreptorubina B (A) e undecilprodigiosina (B) sobre a linhagem celular HCT116 avaliadas pelo ensaio do SRB após 24, 48 e 72 horas de incubação.

A)



B)



Em **A)** gráfico representativo de estreptorubina B testados em células HCT116 em **B)** gráfico representativo de undecilprodigiosina testados em células HCT116. Observando o eixo y - acima de zero: efeito citostático (IC50 = inibição do crescimento celular em 50%), no ponto zero (ICT= inibição do

crescimento total) abaixo de zero: efeito citotóxico (CL50 = concentração letal média). As linhas na cor vermelha indicam o tratamento de 24h, linhas azuis indicam tempo de tratamento de 48h e em linhas em verde indicam tratamento de 72h com as amostras estreptorubina B e undecilprodigiosina. Os dados estão apresentados como os valores da média \pm desvio-padrão obtidos de experimentos realizados em triplicata.

Tabela 8. Valores de (IC50 = inibição do crescimento celular em 50%), (ICT= inibição do crescimento total) e efeito citotóxico (CL50 = concentração letal média) após 24, 48 e 72 horas de incubação.

| ESTREPTORUBINA B | | | UNDECILPRODIGIOSINA | | |
|------------------|------|-----------|---------------------|------|---------|
| 24h | IC50 | 1,06 nM | 24h | IC50 | 92nM |
| | ICT | 117 nM | | ICT | 3.849nM |
| | LC50 | >12.704nM | | LC50 | - |
| 48h | IC50 | 4,92nM | 48h | IC50 | 8,28nM |
| | ICT | 92 nM | | ICT | 96nM |
| | LC50 | 1.702 nM | | LC50 | 1.119nM |
| 72h | IC50 | 0,17 nM | 72h | IC50 | 7,83nM |
| | ICT | 4,21 nM | | ICT | 72 nM |
| | CL50 | 99 nM | | CL50 | 663nM |

(-) Dados não calculados na análise.

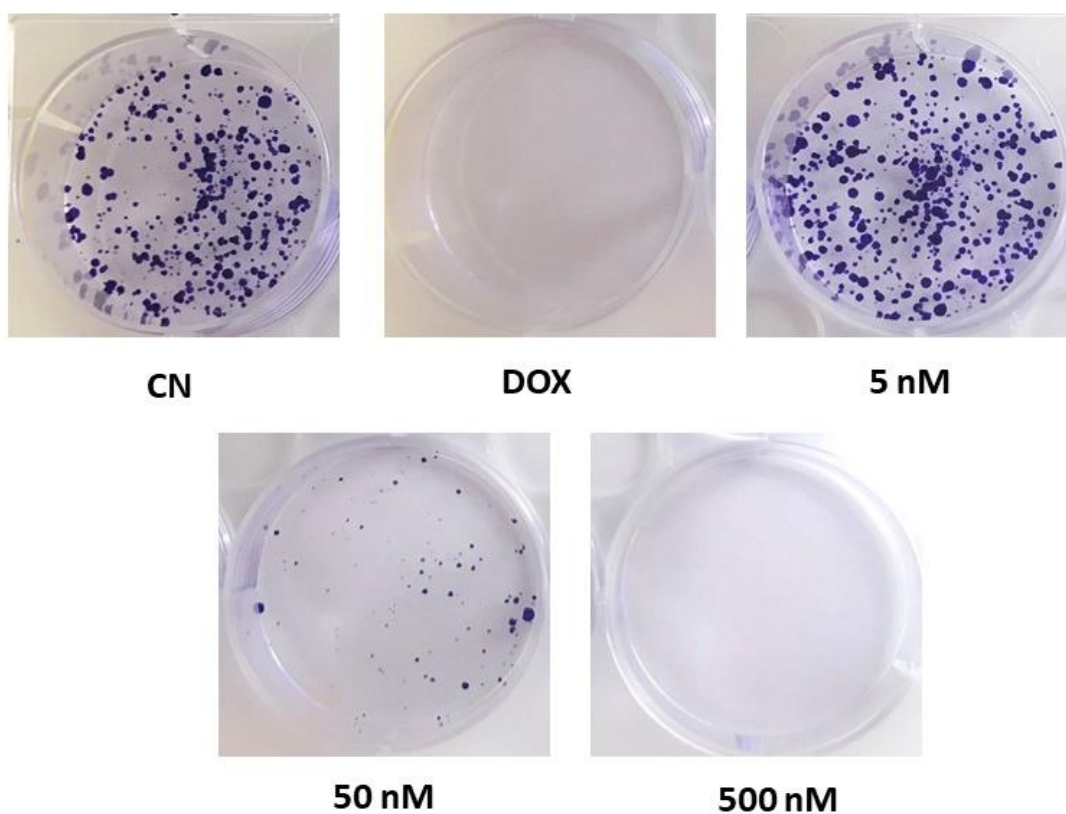
Os próximos ensaios foram feitos apenas com a estreptorubina B, que se mostrou com grande potencial antiproliferativo e citotóxica frente as linhagens tumorais testadas. Na literatura apesar de já ter sido descrita, foram realizados apenas estudos da elucidação química e atividade antimalárica, sendo do nosso interesse a realização de mais estudos para essa substância, já para a undecilprodigiosina, sua atividade biológica já é bem descrita na literatura.

4.4 Avaliação do ensaio clonogênico

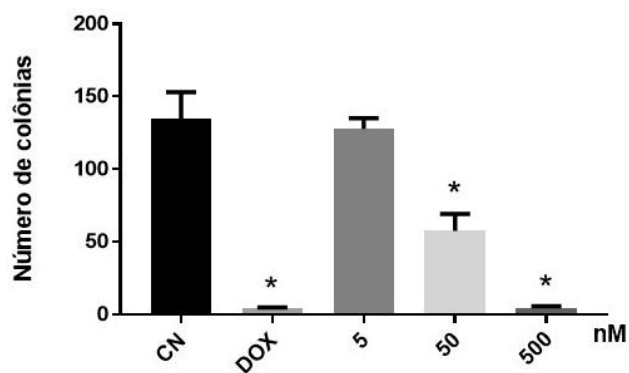
Os resultados obtidos no ensaio clonogênico são mostrados na figura 15. Observou-se redução significativa ($p < 0,05$) do número de colônias e da área após 11 dias de tratamento com a estreptorubina B nas concentrações de 50 e 500 nM comparando-se ao controle negativo (DMSO0,4%). O tratamento com a Doxorubicina também causou redução significativa ($p < 0,05$). Os dados estão representados nos gráficos B e C.

Figura 15. Efeito da estreptorubina B no ensaio clonogênico, utilizando a linhagem HCT 116, após 11 dias de tratamento com as concentrações de 5, 50 e 500 nM da estreptorubina, controle negativo (DMSO 0,4%) e Doxorubicina como controle positivo. As imagens das placas em (A) foram analisadas através do programa image J, que quantificou o número de colônias (B) e a área de preenchimento da placa (C). * $p < 0,05$ comparado ao controle negativo por ANOVA seguido por teste de Dunnett.

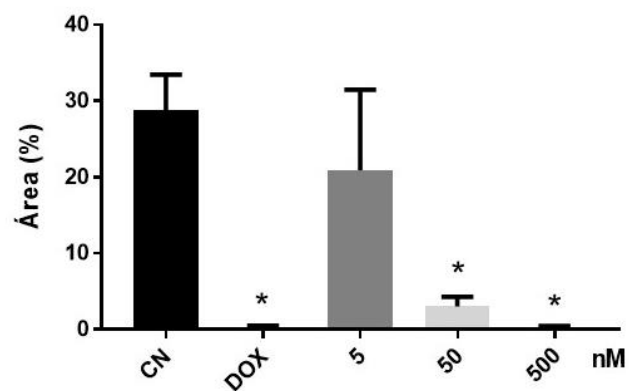
A)



B)



C)



4.5 Avaliação da atividade da Estreptorubina B em células de carcinoma de cólon (HCT116)

4.5.1 Avaliação da emissão de fluorescência da Estreptorubina B

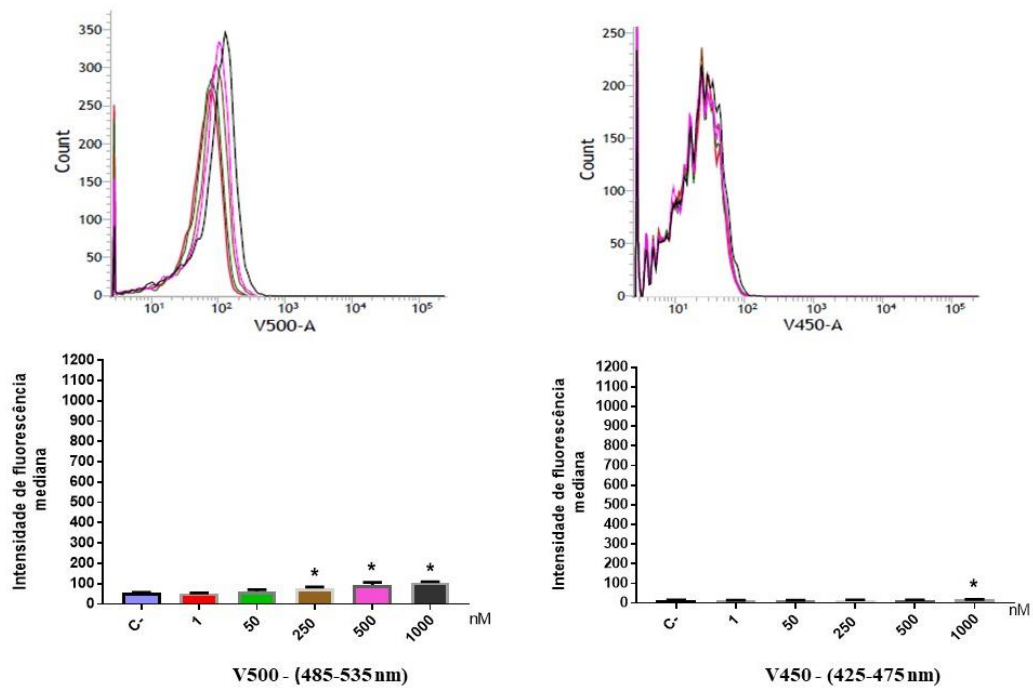
As células HCT 116 tratadas com estreptorubina B emitiram fluorescência na maioria dos canais de detecção com intensidade de forma concentração-dependente (Figura 16). Os lasers azul (488nm) e vermelho (633nm) excitaram as células tratadas com estreptorubina B causando emissão de fluorescência detectável em ambos os canais do laser vermelho (Figura 16C) e nos 4 detectores do laser azul (Figura 16B). O laser violeta (405nm) não causou excitação das células tratadas com estreptorubina B nas concentrações e detectores utilizados (Figura 16A).

Foram gerados os dados de intensidade de fluorescência mediana no mesmo experimento a partir de cada canal presente no citometro de fluxo e desses gerou-se gráficos de barras representativos com a emissão de fluorescência nas concentrações usadas, correspondente a cada canal. (Figura 16).

Os resultados desse experimento são de grande importância para os posteriores experimentos de citometria de fluxo, pois ocasiona uma certa limitação no uso de determinados canais que são utilizados para a realização de certos experimentos de mecanismo de ação.

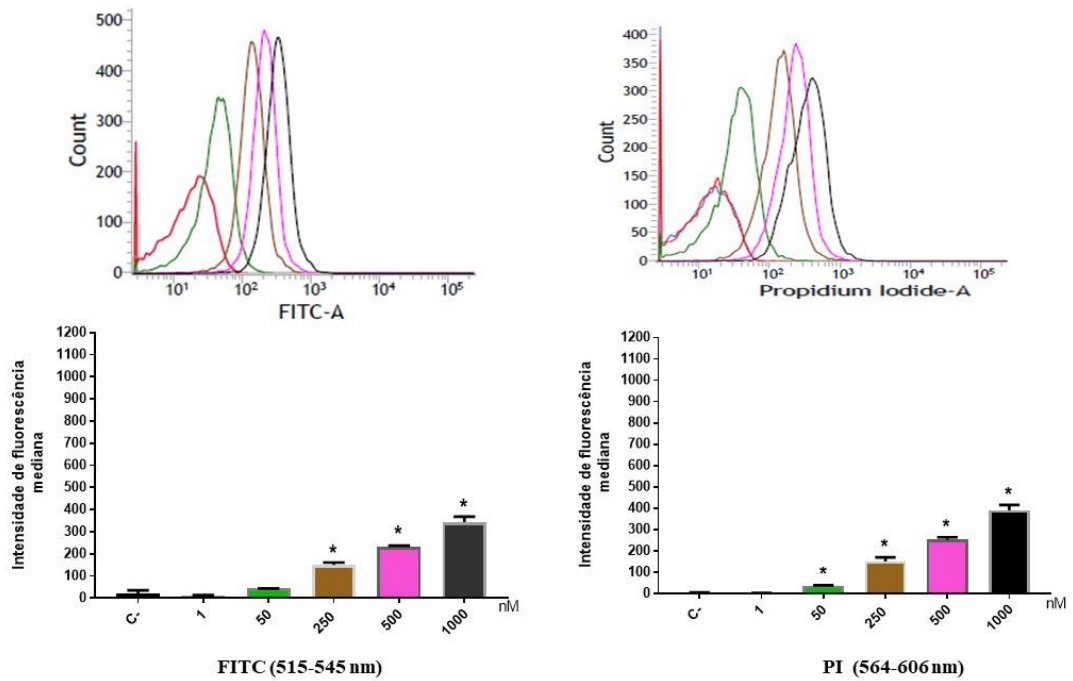
Figura 15. Emissão de fluorescência por células HCT 116 tratadas com o estreptorubina B, avaliados por citometria de fluxo. Conjunto de gráficos em histograma que representam a intensidade de fluorescência comparadas com controle (DMSO, 4%) nas concentrações (1, 50, 250, 500 e 1000 nM). Os 8 blocos de histograma representam os 8 canais de detecção do citômetro de fluxo BD FACSVerserTM. Abaixo de cada histograma estar representando a intensidade de fluorescência mediana de cada canal com gráficos de barra com as devidas concentrações em nM, obtidas no mesmo experimento. Os dados estão apresentados como os valores da média \pm D.P.M., foram analisados por análise de variância (ANOVA) seguido do pós-teste de Dunnett. * $p < 0,05$ indicando diferença quando comparado ao controle negativo (DMSO, 4%).

A)

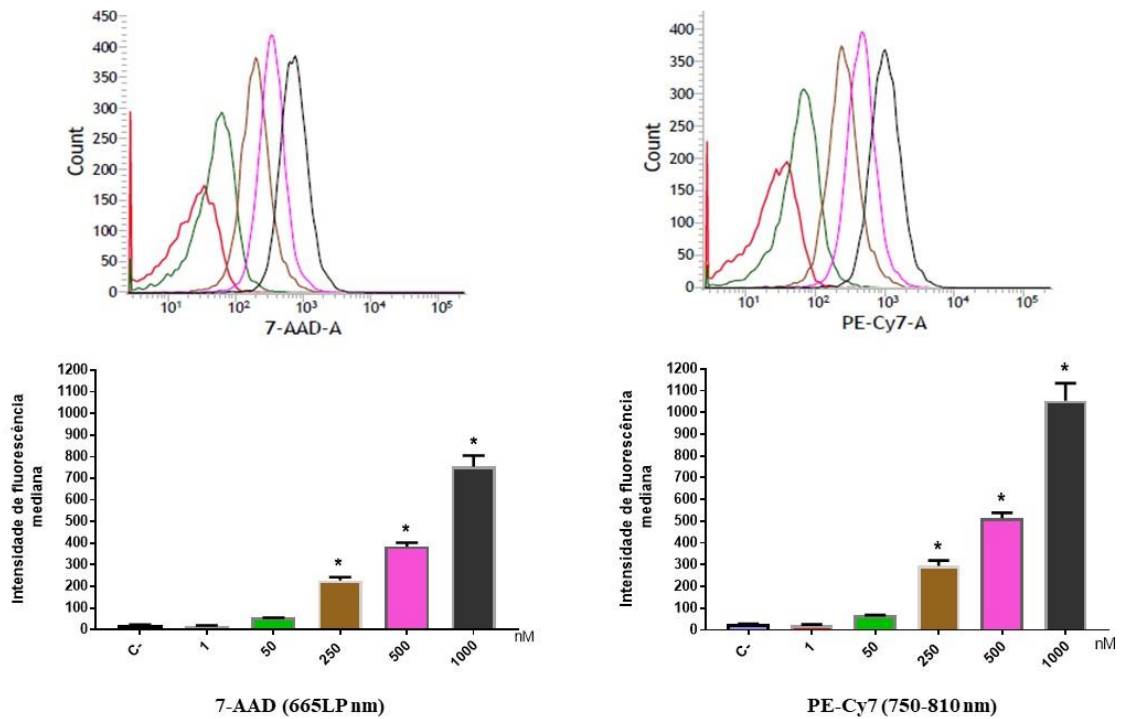


Laser Violeta

B)

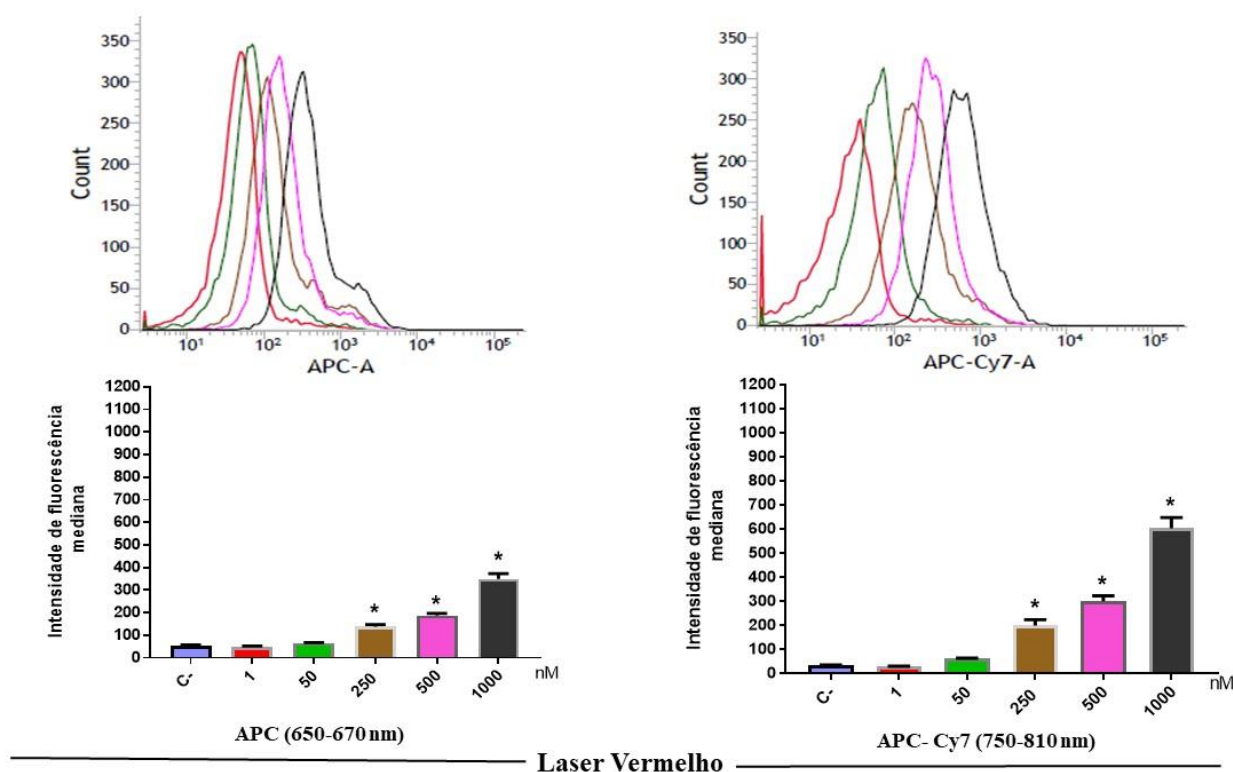


Laser Azul



Laser Azul

C)



4.5.2 Alterações na morfologia celular

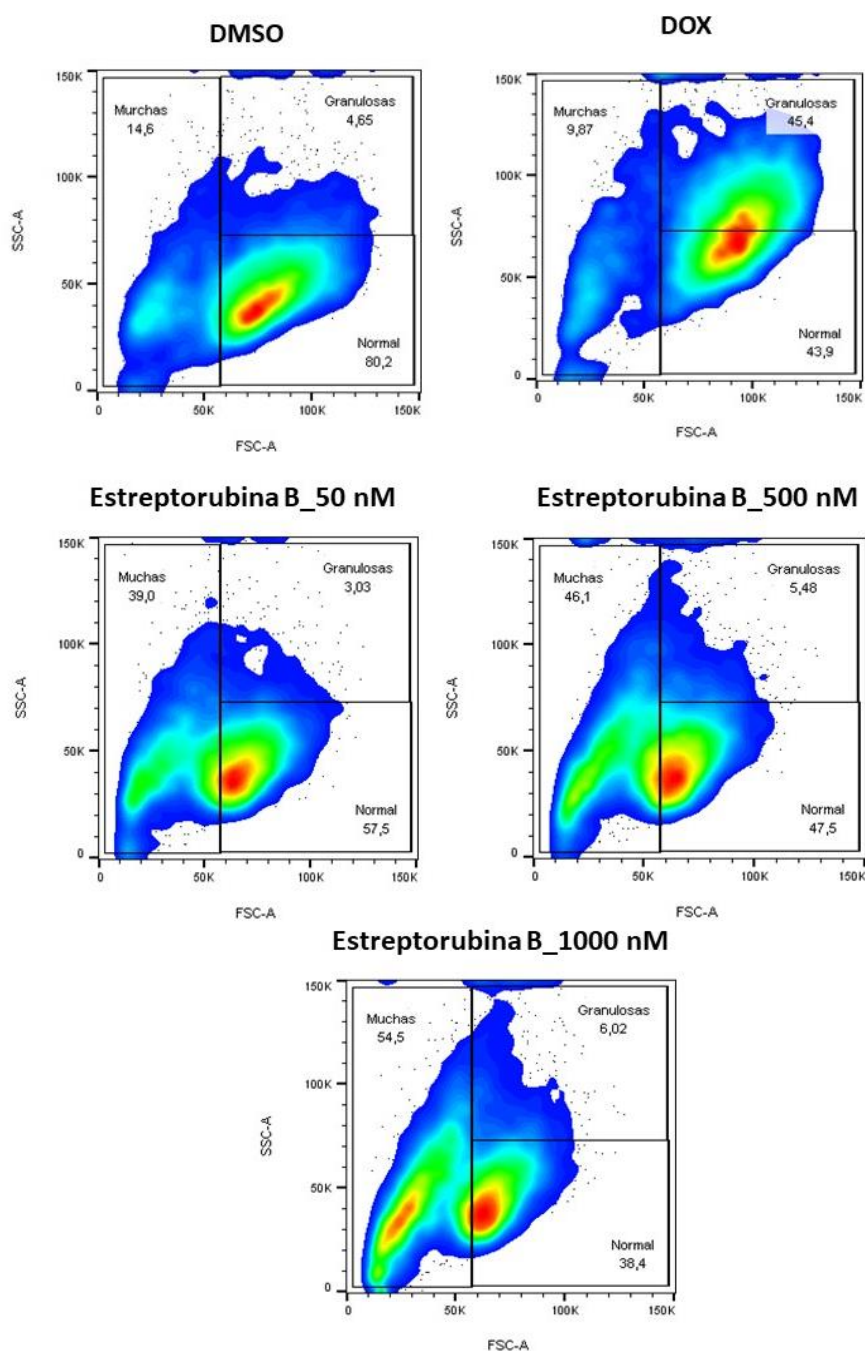
Foi através dos resultados de fluorescência que detectamos quais canais poderiam ser usados. Então, a partir desses resultados passamos a usar o corante Dapi (4',6-diamidino-2-fenilindol) nocanal V450 pertencente ao laser violeta, para as avaliações dos resultados de mecanismo de ação da estreptorubina B por citometria de fluxo.

Nas concentrações de 50, 500 e 1000 nM provocaram alterações morfológicas nas células de HCT116. Os tratamentos de 24h foram capazes de aumentar as características de espalhamento da luz na análise de citometria de fluxo (Figura 17A e B), evidenciando as células com granulosidade e com tamanho reduzido na forma de gráfico de pontos. Percebe-se com o aumento de concentrações um aumento do tamanho reduzido das células, conseqüentemente diminuição de células normais. O mesmo foi observado para um tempo de incubação maior de 48h com as concentrações de 50 e 500 nM que o número de células murchas também aumentou com o aumento das concentrações, observou-se que na maior concentração chega a 65,6% dessas células

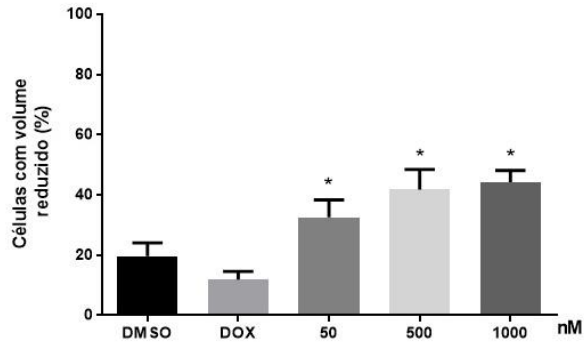
com volume reduzido e que a granulidade é reduzida em todas as concentrações testadas (Figura 17C e D).

Figura 16. Percentual de células de carcinoma de colo (HCT116) com morfologia normal ou alterada, tratadas com estreptorubina B por 24h nas concentrações (50, 500 e 1000 nM) em (A); e por 48h nas concentrações (50 e 500 nM) (D), (C-) DMSO 0,4% foi utilizado como controle negativo, (C+) DOX. Percentual de células com aumento de tamanho reduzido e granulidade comparadas ao grupo controle negativo (B, C, D, E e F). Os dados estão apresentados como os valores da média \pm D.P.M., foram analisados por análise de variância (ANOVA) seguido do pós-teste de Dunnett. * $p < 0,05$ indicando diferença quando comparado ao controle negativo.

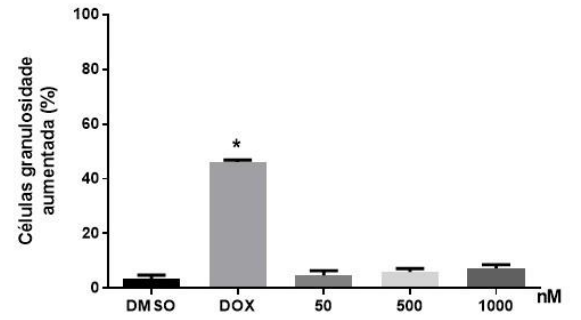
A)



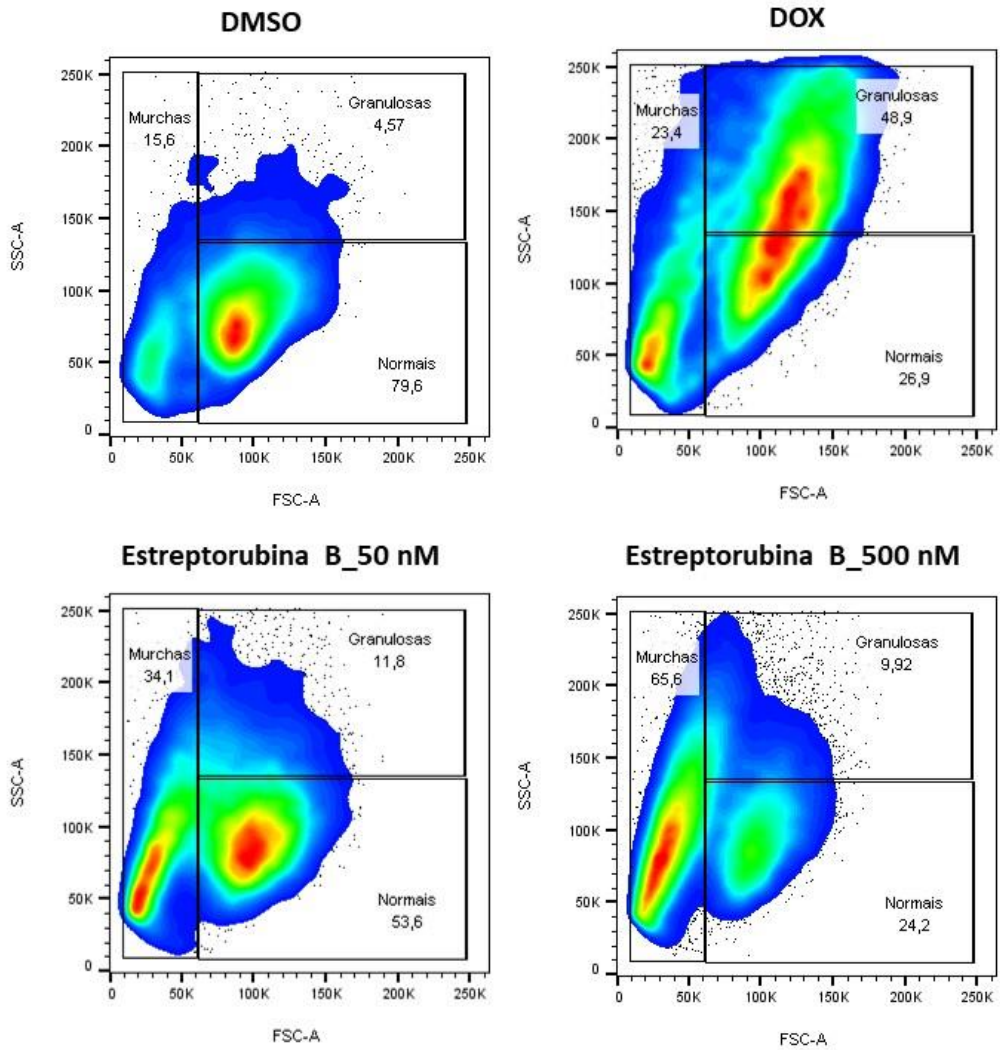
B)



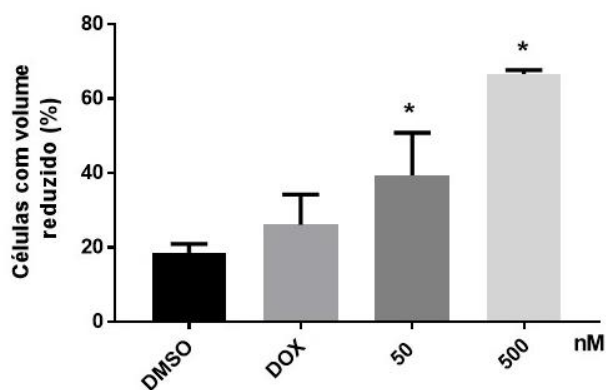
C)



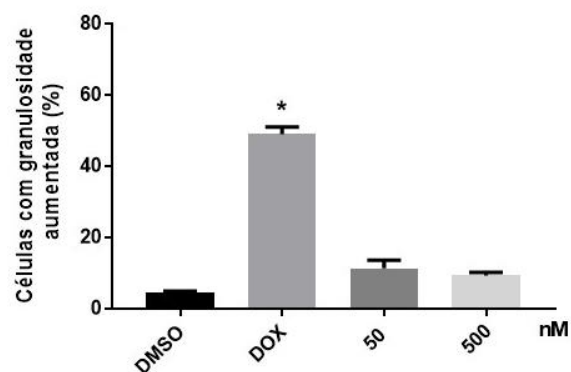
D)



E)



F)

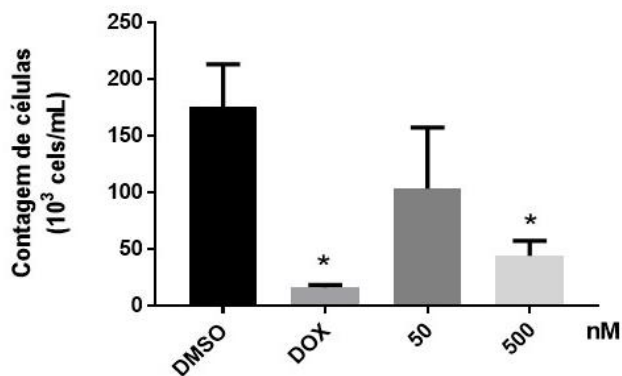


4.5.3 Contagem de Células e Integridade de Membrana celular

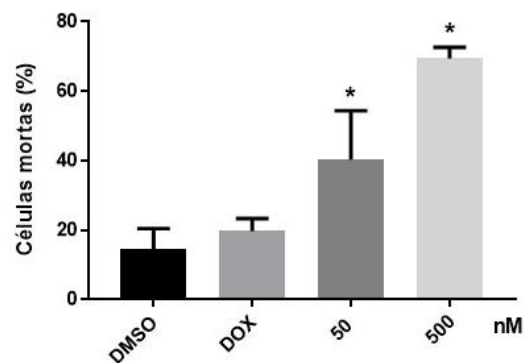
Pode-se observar uma diminuição do número de células nas concentrações de 50 e 500 nM da estreptorubina B quando comparado com o controle (DMSO 0,4%) depois de 48h de incubação, mostrando que a substância favoreceu uma inibição da proliferação de células de HCT 116. A doxorubicina (DOX) a 0,4 μ M também reduziu a contagem das células como apresentado na figura 18A. Como apresentado na Figura 18C, foram encontradas alterações na integridade da membrana das células tratadas com as concentrações testadas, mostrando que a substância causou danos na membrana das células, alterou a porcentagem de células com a membrana íntegra, e aumentou o número de células mortas (Figura 18B)

Figura 17. Contagem de células de HCT 116 tratadas por 48h com estreptorubina B nas concentrações de 50 e 500 nM e controle negativo (DMSO 0,4 %) em (A). Em B e C integridade de membrana das células de HCT 116 tratadas por 48h com estreptorubina nas concentrações de 50 e 500 nM e controle negativo (DMSO 0,4%). A doxorubicina (DOX) 0,4 μ M. Os dados estão apresentados como os valores da média \pm D.P.M., foram analisados por análise de variância (ANOVA) seguido do pós-teste de Dunnett utilizando o programa GraphPad Prism (* $p < 0,05$).

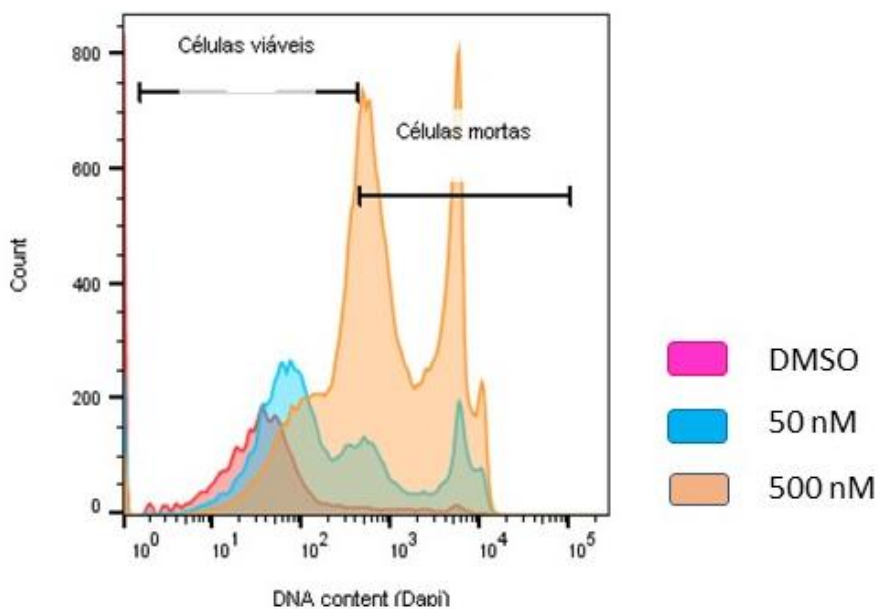
A)



B)



C)

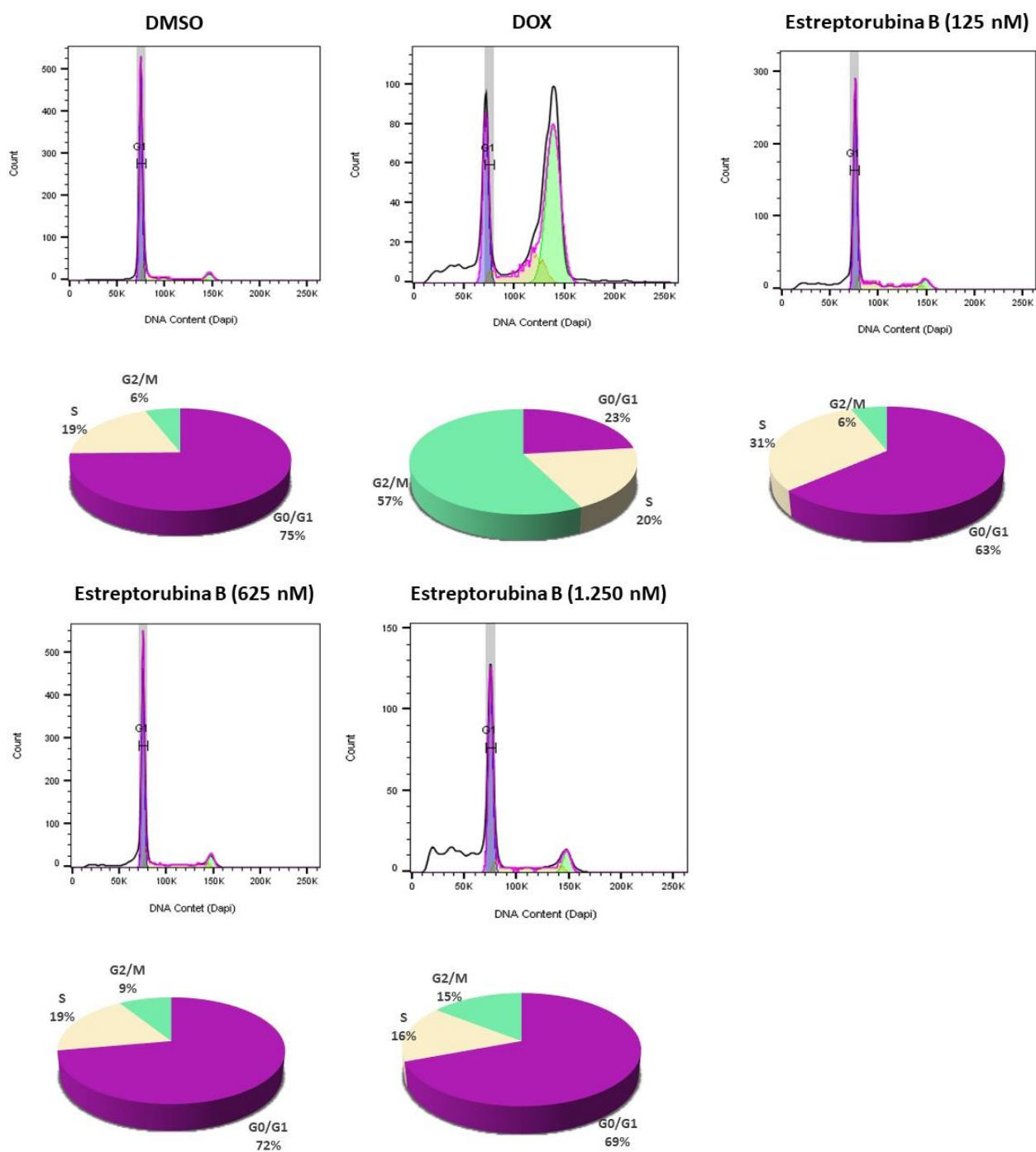


4.5.4 Avaliação do Ciclo Celular

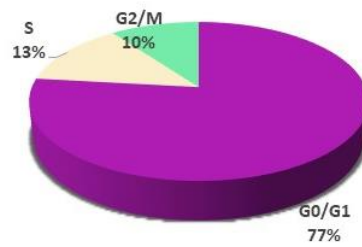
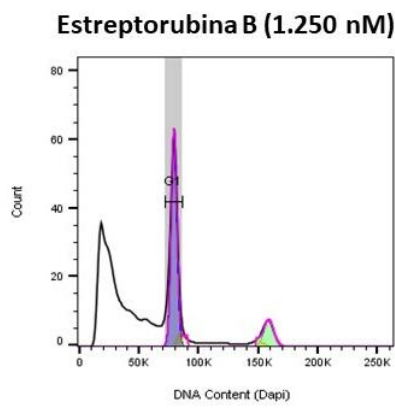
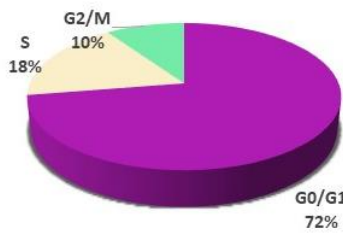
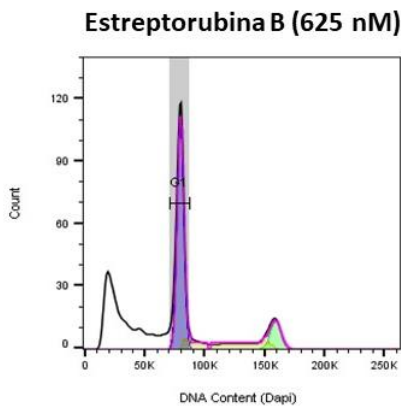
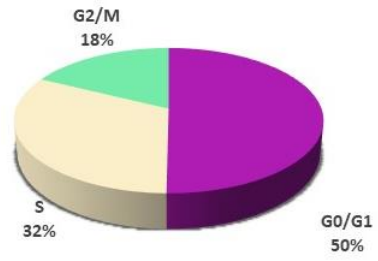
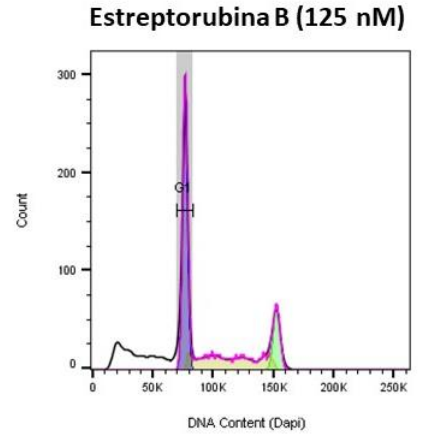
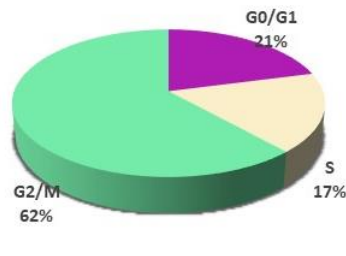
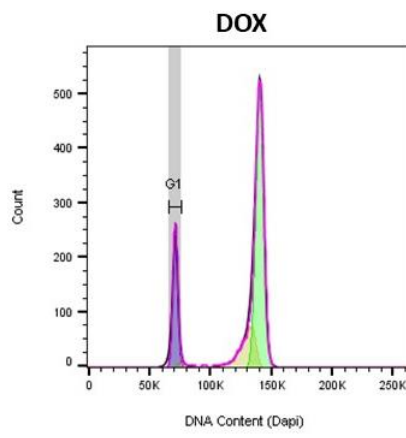
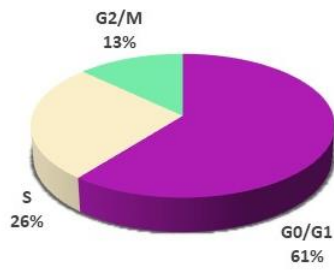
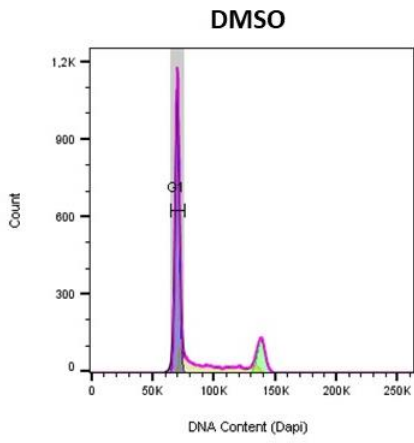
Foi possível verificar que a estreptorubina B não interferiu nas fases do ciclo celular G₀/G₁, S e G₂/M das células tratadas quando comparadas ao controle negativo (DMSO 0,4%) nos tempos de 24 e 48 horas. Foi possível observar que a doxorrubicina (DOX) 0,4 µM induziu a diminuição do percentual do número de células na fase G₀/G₁ (~21% e ~23%) e da fase S (~20% e ~17%) e aumentou a G₂/M (~57 e ~62%) quando comparado ao controle negativo (Figura19 A e B). A estreptorubina B provocou aumento significativo ($p < 0,05$) de fragmentação de DNA (Figura20 A e B).

Figura 18. Alterações no ciclo celular de células de carcinoma de colo (HCT-116) tratadas com estreptorubina B por 24h (A) e 48h (B). A doxorubicina (DOX) 0,4 uM foi utilizada como controle positivo deste experimento. Distribuição das fases do ciclo calculadas pelo programa seguida pela divisão das fases do ciclo celular em porcentagem. Os dados estão apresentados como os valores da média \pm D.P.M., foram analisados por análise de variância (ANOVA) seguido do pós-teste de Dunnet. * $p < 0,05$ indicando diferença quando comparado com o controle negativo (DMSO 0,4%).

A)



B)

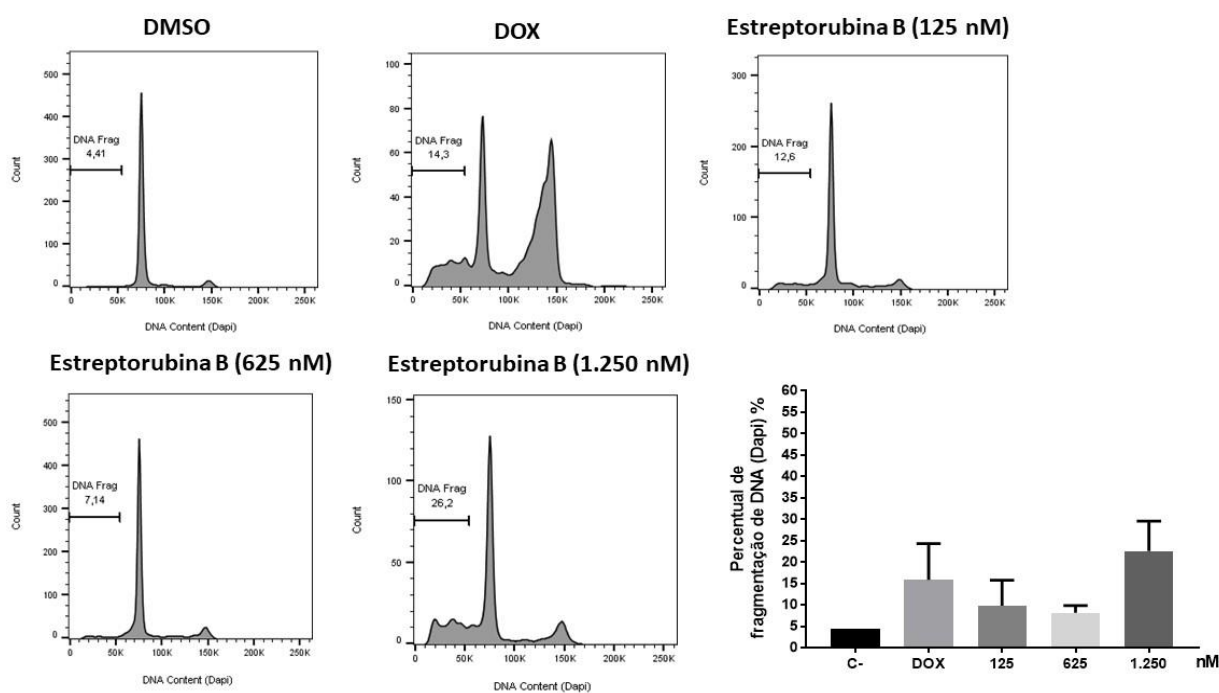


4.5.5 Avaliação da Fragmentação de DNA

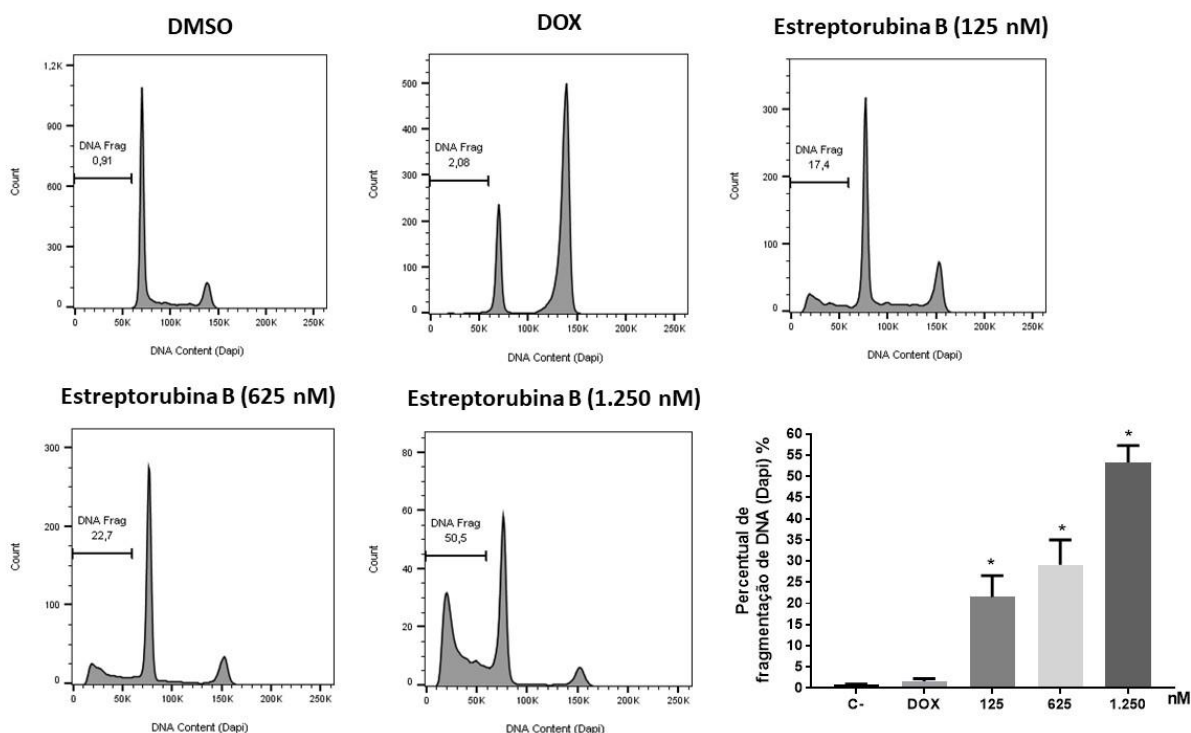
Em 24 e 48 horas, a estreptorubina B nas concentrações de 125, 625 e 1.250 nM provocou fragmentação de DNA. Para as concentrações testadas em 24h de incubação não ocorreu diferença estatística se comparado ao controle negativo, porém em 48h de tratamento foi possível verificar que as amostras fragmentaram o DNA de forma perceptível em todas as concentrações analisadas, comparado ao controle negativo (DMSO 0,4%), apresentando para a concentração menor de 125 nM (17,4%); intermediária 625 nM (22,7%) e maior 1.250 nM (50,5%) de DNA fragmentado (Figura 20A). No final de cada grupo de histogramas gerados após análises nos tempos de 24 e 48h de tratamento e verificação dos valores de fragmentação de DNA, foi avaliado o percentual de fragmentação de DNA apresentada em cada concentração correspondente aos histogramas.

Figura 190. Fragmentação de DNA de células de carcinoma de colo HCT116 tratadas com estreptorubina B por 24h (A) e 48h (B). A doxorubicina (DOX) 0,4 μ M foi utilizada como controle positivo deste experimento. Os dados estão apresentados como os valores da média \pm D.P.M., foram analisados por análise de variância (ANOVA) seguido do pós-teste de Dunnett. * $p < 0,05$ indicando diferença quando comparado com o controle negativo (DMSO 0,4%).

A)



B)



4.6 Análise das células HCT116 por Microscopia Confocal

Após analisar os testes anteriores e verificar que de fato a estreptorubina B poderia estar causando possivelmente morte celular, procurou-se entender melhor seu mecanismo de ação, através de sua fluorescência apresentada, verificando se o local de ação dela poderia estar relacionado com sua atividade citotóxica, fragmentação de DNA provocando morte celular. Através do uso de marcadores específicos de lisossomos (LysoTracker® Blue DND-22) e retículo endoplasmático (ER-Tracker™ Red) foi visto a possível localização da estreptorubina B através do uso de microscopia confocal.

Observamos emissão de fluorescência nas concentrações testadas e acúmulo da estreptorubina B em organelas próximas ao núcleo (Figura 21) e possível localização nas células de HCT116 que foram tratadas com estreptorubina B coradas com lisossomos (cor azul) (Figura 22) e retículo endoplasmático (Figura 23), sendo possível observar marcações mais específicas próximas a essas organelas, não descartando a possibilidade de sua localização nelas ou próximas a elas. Portanto, através de microscopia confocal foi possível confirmar a fluorescência presente na estreptorubina B, assim como a região de sua possível localização. Por ser um experimento piloto não podemos descartar a

possibilidade da localização da estreptorubina B nos marcadores mostrados nesse estudo, mas é necessário mais estudos e repetições de experimentos com outros marcadores para se comprovar o local mais especificamente. O DMSO 0,4% foi utilizado como controle negativo.

Figura 21. Localização em células de HCT116 com a estreptorubina B por microscopia confocal. Em A (50 nM) e em B (250 nM) é possível observar a localização e fluorescência depois de 48h de incubação.

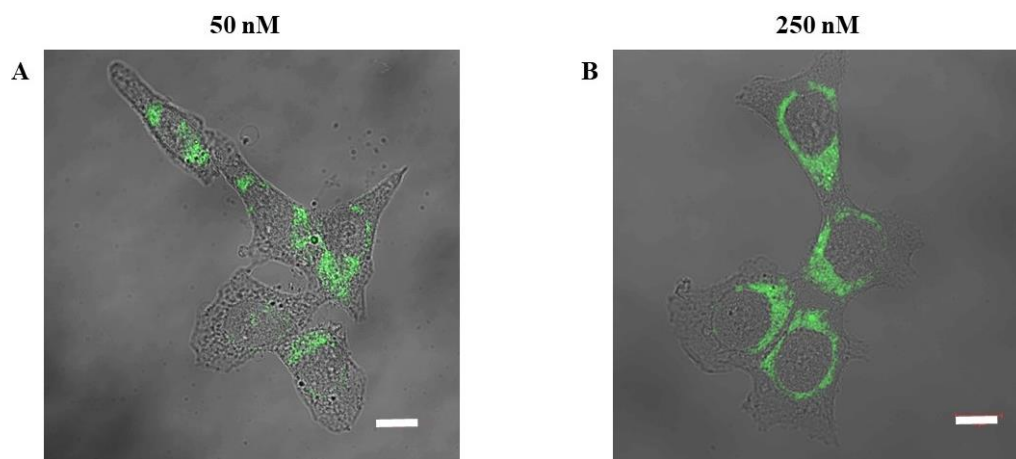
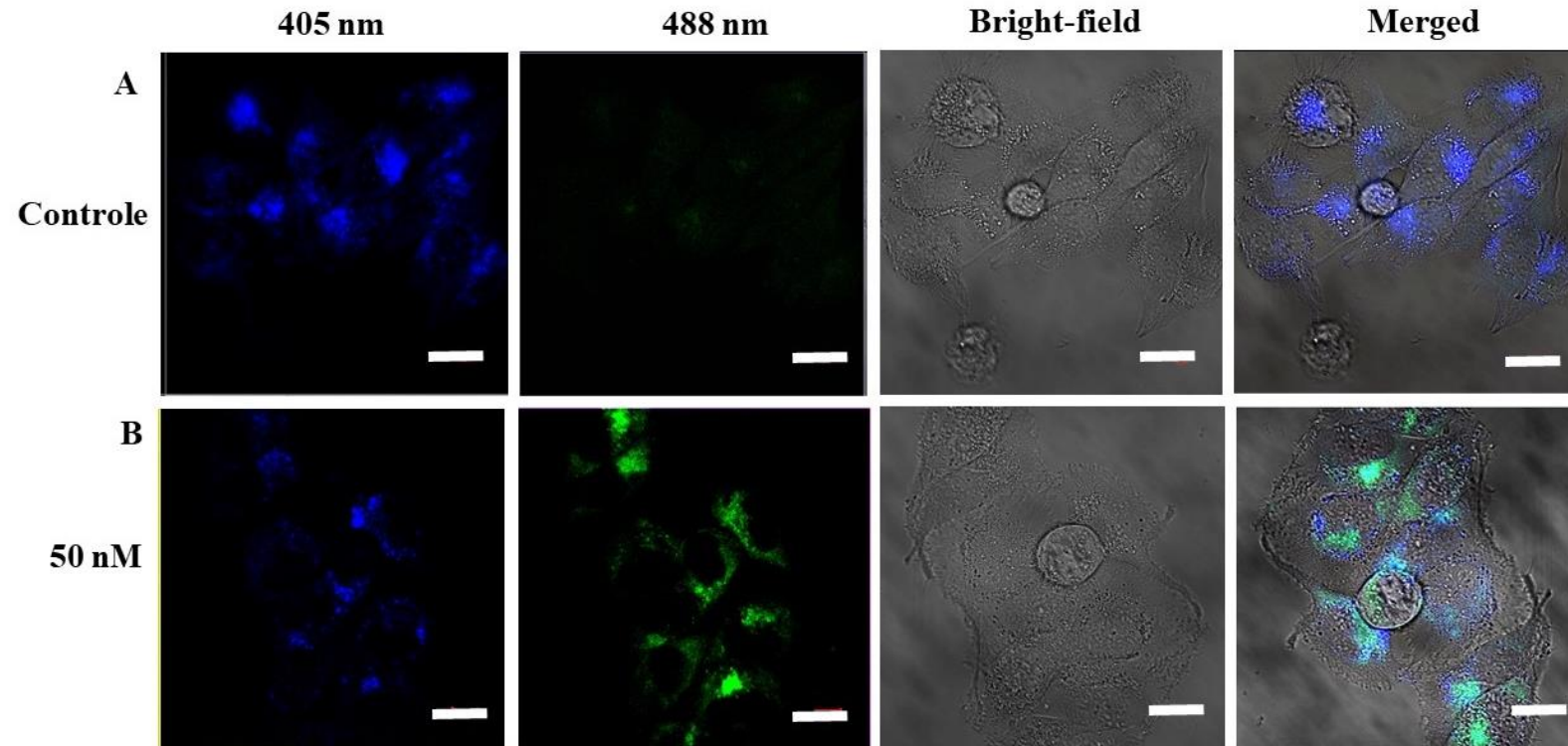
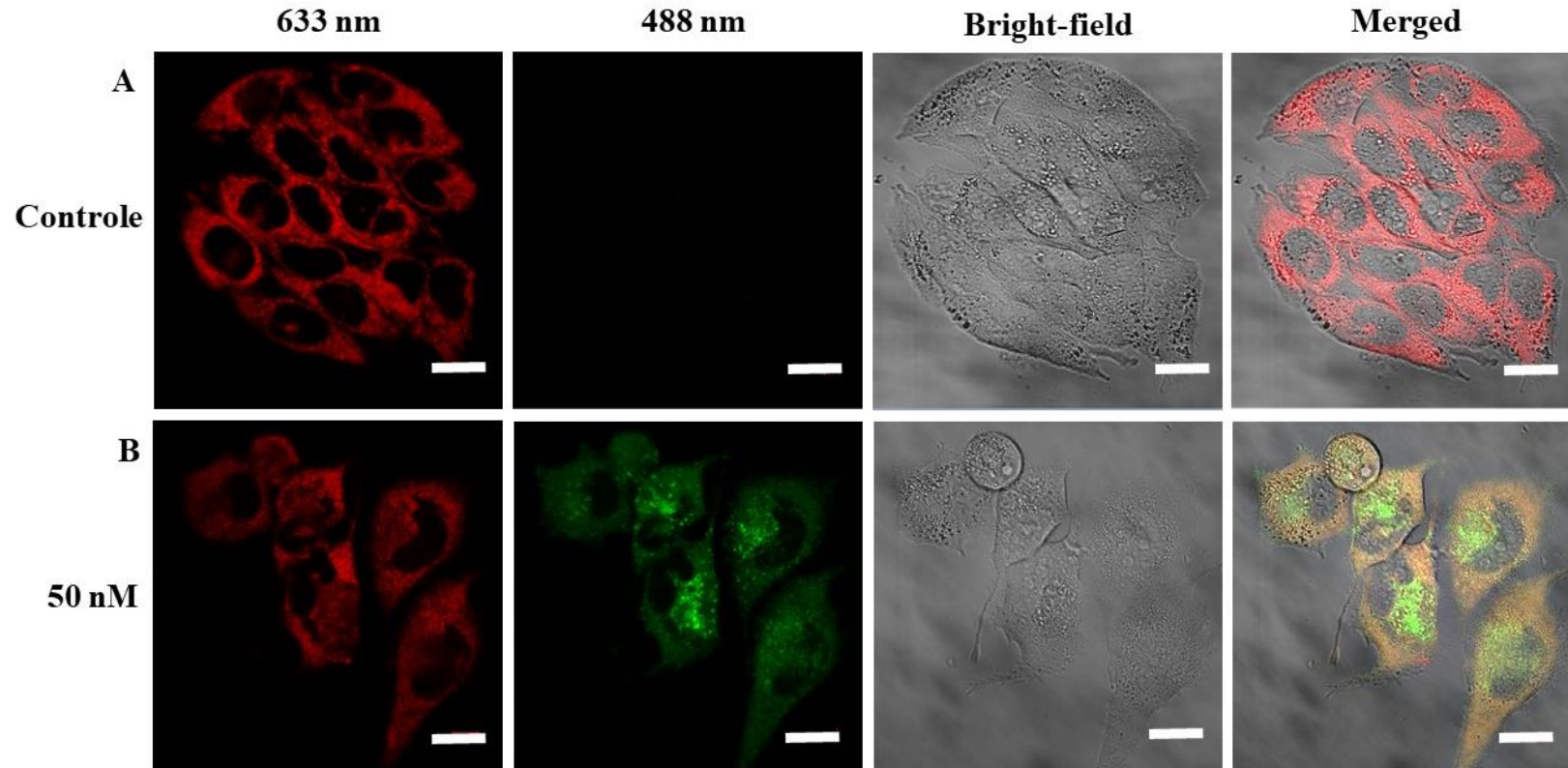


Figura 22. Localização em células de HCT116 da estreptorubina B (50 nM) mais o marcador específico de lisossomos (LysoTracker® Blue DND-22).



Em A, se encontra o controle negativo(DMSO 0,4%). A cor azul nas células representa a presença do marcador de lisossomos, a verde a presença da estreptorubina B, e em B, os dois estão apresentados juntos para verificação da localização. Barra denota 10 μm .

Figura 23. Localização em células de HCT116 da estreptorubina B (50 nM) mais o marcador específico de retículo endoplasmático ((ER-Tracker™ Red).



Em A, se encontra o controle negativo(DMSO 0,4%). A cor vermelha nas células representa a presença do marcador de retículo endoplasmático, a verde a presença da estreptorubina B, e em B, os dois estão apresentados juntos para verificação da localização. Barra denota 10 μm .

5 DISCUSSÃO

Esse estudo foi feito a partir da triagem realizada para a descoberta de compostos bioativos, com o intuito de encontrar novos compostos com potencial biotecnológico que pudessem contribuir em estudos relacionados ao câncer. Foram utilizadas bactérias de actinomicetos e Gram negativas isolados de invertebrados marinhos (*Zoanthus sociatus*) coletados nas ilhas oceânicas do Brasil: Arquipélago de Fernando de Noronha (FN), Ilha de Trindade e Arquipélago Martim Vaz (TMV), Atol das Rocas (AR) e Arquipélago de São Pedro e São Paulo (ASPSP). Esse trabalho faz parte de um grande projeto denominado Prospecmar-Ilhas (Prospecção Sustentável em Ilhas Oceânicas: Biodiversidade, Química, Ecologia e Biotecnologia), que objetiva realizar a prospecção de recursos biológicos nas ilhas brasileiras, visando o conhecimento de sua biodiversidade, o seu uso sustentável e o desenvolvimento de produtos e processos biotecnológicos.

Dezenove cepas de micro-organismos foram recuperadas, distinguindo-se aquelas bactérias que tinham um aspecto mais opaco ou esporulavam na sua maioria das vezes eram consideradas actinomiceto (11) e aquelas brilhosas com aspecto viscoso eram as gram negativas (8). O método (M4), que é um método de aquecimento, onde diminuiu o crescimento das bactérias Gram negativas, permitiu o isolamento de um grande número de cepas sendo, a recuperação de actinomicetos maior que o de bactérias Gram negativas. Dos meios de cultura utilizados para o isolamento dos micro-organismos, o SCA foi mais favorável ao crescimento, 15 cepas foram recuperadas, pois é um tipo de meio mais enriquecido de nutrientes que possui amido caseína na sua composição, e o meio SWA mais pobre em nutrientes, apresentou-se menos favorável com 4 cepas recuperadas apenas.

Verificou-se um grande potencial antiproliferativo, por meio da triagem dos extratos brutos das bactérias associadas e testados frente a linhagem tumoral de colo retal humano. Das dezenove cepas avaliadas, 15 foram ativas na concentração de 50 µg/mL testadas em HCT 116 por 72h. O fracionamento bioguiado da BRA-535 juntamente com técnicas cromatográficas proporcionaram a escolha da fração mais ativa e, em seguida, a identificação dos compostos ativos presentes nessa fração: estreptorubina B e undecilprodigiosina. O câncer colo retal humano é um dos tipos de câncer mais prevalentes na população mundial, pois acomete homens e mulheres, e está entre os cânceres mais agressivos e o terceiro que provoca mais mortes (INCA, 2018).

Os estudos prosseguiram com as duas substâncias, pois as mesmas pertencem a classe das prodigiosinas. Os alcaloides da família das prodigiosinas constituem um caso particular na história da química dos produtos naturais (MARTINELL et al., 2000). Apresentam pigmentos naturais de cor vermelha produzidos por um grupo restrito de micro-organismos (FÜRSTNER, 2003, BULL & WARD, 2000). A palavra prodigiosina derivada de “prodigiosus” (*Bacillus prodigiosus*), micro-organismo do qual foi isolada a primeira prodigiosina com estrutura química conhecida, e que deu nome à esta família de compostos (WILLIAMSON et al., 2006). No presente estudo a identificação do gênero da bactéria isolada ainda está em curso.

Estudos realizados por nosso grupo de pesquisa em 2017, mostraram o isolamento de outros três derivados de prodigininas adquiridas da cepa 177 pertencente ao gênero *Actinomadura*. Os mesmos também se mostraram com atividade citotóxica significativa avaliadas nas linhagens de HCT116 (adenocarcinoma de cólon), MCF-7 (carcinoma de mama) e SK-Mel-147 (melanoma) (SILVA et al., 2017).

No presente estudo a estreptorubina B e undecilprodigiosina foram mais sensíveis alinhagem HCT116, que é uma linhagem tumoral primária, se comparada às linhagens tumorais secundárias B16-F10 e PC-3M, que já tem um potencial agressivo e são linhagens metastáticas. Foi observado uma diferença de respostas nas linhagens testadas, isso pode ser devido ao fato de as células tumorais desenvolverem mecanismos fisiológicos complexos que permitem a reprogramação do metabolismo energético (HANAHAN & WEINBERG, 2011). As células de câncer promovem um suporte para algumas necessidades fundamentais da proliferação descontrolada como, rápida geração de ATP para manutenção do estado energético, aumento da biossíntese de macromoléculas, e manutenção do estado redox apropriado, além de possuírem a capacidade de modificar o metabolismo celular (CAIRNS, HARRIS & MAK, 2011).

As prodigininas são um grupo de metabólitos especializados com um núcleo comum de 4-metoxipirritipirrometeno produzido por uma variedade de bactérias, incluindo *Streptomyces* e actinobactérias relacionadas (FÜRSTNER & ANGEW, 2003). Os membros da família prodiginina possuem uma série de atividades biológicas interessantes e foram mostrados para serem antimaláricos oralmente eficazes em um modelo de infecção murina (FÜRSTNER & ANGEW, 2003, PAPIREDDY et al., 2011). Em geral, as prodigiosinas têm um amplo espectro de atividade, apresentam propriedades imunossupressoras, anti-tumorais, antimalárica, antimicrobiana e proteção

contra radiação ultravioleta (CLIFT & THOMSON, 2009; REGOURD et al., 2007; BULL & WARD, 2000).

As prodigininas são um grupo estruturalmente notável de antibióticos. Os membros desta família incluem a undecilprodigiosina (FÜRSTNER & ANGEW, 2003) e seus derivados cíclicos streptorubina B (PAPIREDDY et al., 2011) e metacycloprodigiosina (LAATSCH et al., 1991), bem como metabolitos prodigiosina R1 (WASSERMAN et al., 1969) e roseofilina (KAWASAKI et al., 2008), que parecem derivar de um precursor comum. Algumas prodigiosinas foram testadas contra células de câncer de pulmão, cérebro, rim, ovário, cólon, melanoma, leucemia, mostrando uma atividade mais potente do que a doxorubicina, contra qual há resistência por parte células do carcinoma do pulmão, que também expressam a proteína multirresistente a fármacos (Multidrug Resistent Protein-1, MRP1) (PANDEYA & CHANDERB, 2007).

A avaliação da atividade citotóxica das prodigiosinas identificadas nesse trabalho foi pelo método de SRB para avaliar o potencial antiproliferativo e pelo ensaio clonogênico para avaliar a sobrevivência celular, os dois ensaios mostraram o grande potencial que essas substâncias possuem. Através do ensaio clonogênico foi possível observar o significativo e potente efeito das concentrações de 50 e 500 nM da estreptorubina B que reduziram a proliferação das células de HCT 116, mediante exposição a longo prazo. Portanto o ensaio clonogênico além de permitir observar a morte da célula em relação ao controle, permite também inferir o que está acontecendo com as células tratadas depois de mais tempo de incubação.

Um dos derivados das prodigininas mais estudados é a prodigiosina. O potencial antitumoral dela foi acessada através do painel de 60 linhagens tumorais do NCI (*National Cancer Institute*, NCI-60), no qual apresentou valor médio de CI_{50} de 2,1 μ M (MANDERVILLE, 2001), que se assemelha dos valores de CI_{50} obtidos para os derivados aqui isolados. A citotoxicidade das prodigiosinas é principalmente atribuível ao seu efeito proapoptótico contra as células malignas, que é independente do p53 e da resistência aos medicamentos. A indução de apoptose independente de p53 é realmente uma vantagem de prodigiosinas em relação a outros quimioterápicos cujos efeitos proapoptóticos requerem p53 funcional (TF HO et al., 2007; CAMPAS et al., 2003).

Tendo em vista a citotoxicidade observada pela estreptorubina B e undecilprodigiosina nas linhagens tumorais testadas nesse trabalho, e sabendo também

do amplo potencial que as mesmas apresentam, através de experimentos de citometria de fluxo e microscopia confocal buscamos investigar sua citotoxicidade na linhagem HCT116 após 24 e 48h de incubação. Devido às substâncias isoladas serem corantes naturais, por meio de citometria de fluxo foi verificada a emissão de fluorescência da estreptorubina B em 5 dos 8 canais presente no citometro de fluxo.

Através da citometria de fluxo foi possível verificar a morfologia das células após serem tratadas com estreptorubina B, apresentando valores significativos de aumento da população de células murchas, ou seja, redução do volume celular, além de provocar danos na membrana relativo ao aumento de células mortas e diminuição da proliferação celular nas concentrações de 50 e 500 nM após 48h de incubação. Um estudo realizado por Hassankhani e colaboradores em 2015, mostrou que a prodigiosina diminuiu significativamente a viabilidade e o número de células na linhagem de adenocarcinoma de cólon (HT-29), de forma dose-dependente, nas concentrações de 100, 400 e 600 nM.

As prodigiosinas em geral têm múltiplos alvos celulares e empregam diferentes mecanismos moleculares para induzir a apoptose dependendo do tipo de câncer. Portanto, o modo exato de ação de prodigiosinas na indução de apoptose é incerto. Elas também são opções atraentes porque não são afetados por várias bombas de resistência a múltiplos medicamentos que podem conferir resistência a outros agentes anticancerígenos (CHANG et al., 2011; WILLIAMSON et al., 2007; LLAGOSTERA et al., 2005; SOTO-CERRATO et al., 2004).

A estreptorubina B não apresentou parada de ciclo celular em nenhuma fase no presente trabalho. No entanto, foi visto aumento de fragmentação de DNA em todas as concentrações testadas em 48h de incubação, possivelmente alterações sugestivas de apoptose aparecem intensificadas, além de recorrente condensação e fragmentação nuclear. As prodigiosinas também podem atuar como agentes intercaladores de DNA que causam a fragmentação do DNA e a morte das células tumorais (MELVIN et al., 2000).

A localização celular da prodigiosina pode dar indícios de seu mecanismo de ação, assim como de outros derivados da mesma classe, a mesma foi detectada no núcleo (LLAGOSTERA et al., 2005), concentrada no citoplasma das células (BALDINO et al., 2006), em grânulos perto do núcleo (KATAOKA et al., 1995) e na membrana mitocondrial (FRANCISCO et al., 2007). O mesmo foi visto nesse trabalho, a

estreptorubina B foi localizada próximo as organelas de lisossomos, principalmente a organela de retículo endoplasmático (RE), próximo ao núcleo em células de HCT 116 após 48h de incubação, analisado através de microscopia confocal.

Levando em consideração a localização da estreptorubina B no retículo endoplasmático visto nesse trabalho, os resultados de aumento de morte celular por rompimento de membrana e fragmentação de DNA em magnitudes parecidas, sugerimos que esteja ocorrendo morte celular ocasionada provavelmente por estresse de retículo endoplasmático, porém ainda não é conclusivo.

O estresse de RE provoca mecanismos de morte celular principalmente por apoptose, esse mecanismo ocorre através da ativação de caspases via mitocôndria, a fim de eliminar células potencialmente defeituosas. O estresse do RE é caracterizado por acúmulo de defeitos no enovelamento proteico, comprometendo a homeostase do RE (DIEHL et al., 2011; RON; WALTER, 2007). Senft e Ronai (2015) realizou estudos e comprovou que quando o estresse de RE é mais severo ou de longa duração, a autofagia também pode participar como um mecanismo de morte celular.

A apoptose é caracterizada por ser um processo fisiológico que ocorre para manter a homeostase em organismos multicelulares (HANAHAN e WEINBERG, 2011). Uma família de protease, as caspases, é que direciona a célula para morrer, a chamada morte celular programada. A morfologia das células apoptóticas apresentam redução do tamanho celular, condensação e fragmentação do DNA, além de comprometer a integridade da membrana, os chamados *blebs* (FOSTER, 2008). Uma outra resposta celular fisiológica é a autofagia, que assim como a apoptose, pode ser provocada em certos estágios do estresse celular, como exemplo a baixa quantidade de nutrientes (MIZUSHIMA, 2007). O processo autofágico, ocorre inicialmente pela incorporação da organela e a extensão de uma membrana dupla que se fecha juntamente com uma porção do citoplasma, formando o autofagossomo. O lisossomo portador de diversas hidrolases ácidas se funde ao autofagossomo para então, digerir seu conteúdo (ALBERTS et al., 2010; HANAHAN e WEINBERG, 2011).

Os experimentos preliminares de mecanismo de ação da estreptorubina B assim como os de atividade citotóxica em linhagens tumorais estão sendo descrito pela primeira vez neste trabalho. Até o presente, apenas sua estrutura química elucidada e atividade antimalárica foram descritas na literatura (PAPIREDDY et al., 2011).

As potentes atividades anticancerígenas de alguns membros da família das prodigiosinas são evidentes. A citotoxicidade seletiva contra as células cancerosas, o efeito proapoptótico independente de p53 e a atividade anti-metastática, indicam o grande potencial desses metabolitos bacterianos como agentes anticancerígenos. Os recentes ensaios oncológicos múltiplos de fase I e II de GX15-070 (obatoclast), um análogo sintético da prodigiosina desenvolvido pela Gemin X Pharmaceuticals, confirmam ainda mais o uso de prodigiosinas como compostos para desenvolver novas terapêuticas contra o câncer (PÉREZ-TOMÁS & VIÑAS, 2010; PANDEY et al., 2009).

Nossos achados mostraram que tanto a estreptorubina B como undecilprodigiosina possuem um interessante potencial biotecnológico, podendo ser capaz de induzir inibição celular nas linhagens testadas. Esses dados sugerem que as substâncias encontradas devam prosseguir com estudos de mecanismo de ação.

6 CONCLUSÃO

Os micro-organismos associados ao *Zoanthus sociatus* das ilhas oceânicas do Brasil são fonte de substâncias com potencial biotecnológico. A cepa BRA-535 isolada do *Zoanthus sociatus* da ilha de Fernando de Noronha, foi reconhecida como produtora de diferentes moléculas do grupo das prodigiosinas como estreptorubina B e undecilprodigiosina. Estas substâncias mostraram-se bioativa contra todas as linhagens de células testadas, induzindo alterações no metabolismo celular e inibição da proliferação.

O estudo da atividade biológica das moléculas estreptorubina B e undecilprodigiosina é necessário mais experimento que possa afirmar seu mecanismo de ação, mas os resultados desse presente estudo já mostraram dados significativos de possível morte celular com características de estresse de retículo, células apresentando picnoses associada a rompimento de membrana e fragmentação de DNA em magnitudes parecidas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACS. American Cancer Society, 2016. Disponível em: <<http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/002550-pdf.pdf>>. Acesso em 2018.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; HOPKIN, K.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Fundamentos da Biologia Celular. Comunidades Celulares: Tecidos, Células-tronco e Câncer; Porto Alegre- RS. **Artmed**; p. 717-724, 2011.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Biologia Molecular da Célula, 5ª ed., **Artmed**, p. 586-589, Porto Alegre, 2010.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Biologia molecular da célula. 4 ed. São Paulo (SP): **Artmed**; 2006.

ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. D. C.; MONTANARI, C. A.; DONNICI*, C. L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo- celular não-específicos que interagem com o DNA: Uma Introdução. **Química Nova**, v.28, n.1, p.118-129, 2005.

BALDINO CM, PARR J, WILSON CJ et al. Indoloprodigiosins from the C-10 bipyrrrolic precursor: new antiproliferative prodigiosin analogs. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 16, p. 701–4, 2006.

BEETON C., PENNINGTON M.W., WULFF H., SINGH S., NUGENT D., CROSSLEY G., KHAYTIN I., CALABRESI P.A., CHEN C.Y., GUTMAN G.A., et al. Targeting effector memory T cells with a selective peptide inhibitor of Kv1.3 channels for therapy of autoimmune diseases. **Mol. Pharmacol.** v. 67, p. 1369–1381, 2005.

BLUNT, J. W. et al. Marine natural products. **Natural Product Reports** ., v. 32, n. 2, p. 116–211, 2015.

BLUNT, J.W.; COPP, B.R.; MUNRO, M.H.G.; NORTHCOTE, P.T.; PRINSEP. M.R. Marine natural products. **Natural Product Reports**. v.28, n.196, 2011.

BOEUF, G. Marine biodiversity characteristics. **Comptes Rendus Biologies**. v.334, n.435, 2011.

CAMPOS, TFC; BEZERRA, FHR; SRIVASTAVA, NK; VIEIRA, MM; VITA-FINZI
Holocene tectonic uplift of the St Peter St Paul Rocks (Equatorial Atlantic) consistent with the emplacement by extrusion. **Mar Geo**, v.271, p. 177-186, 2010.

CAMPAS,C; M. DALMAU , B. MONTANER , M. BARRAGÁN , B. BELLOSILLO,
D. COLOMER , G. PONS , R. PÉREZ-TOMÁS , J. GIL, Prodigiosin induz apoptose de células B e T de células B crônicas leucemia linfocítica.**Leucemia**, v. 17, p.746 – 750, 2003.

CARTÉ, B. K. Biomedical potential of marine natural products. **Bioscience**, v. 46, p. 271-286, 1996.

CHABNER, B. A. AND ROBERTS, T. G., JR.: Timeline: chemotherapy and the war on câncer. **Nat. Rev. Cancer**, v.5, p. 65–72, 2005.

CHANG C-C, CHEN W-C, HO S-F, WU H-S, WEI Y-H, Development of natural anti-tumor drugs by microorganisms. **J Biosci Bioeng**, v. 111, p. 501–511. 2011.

CHI V., PENNINGTON M.W., NORTON R.S., TARCHA E.J., LONDONO L.M., SIMS-FAHEY B., UPADHYAY S.K., LAKEY J.T., IADONATO S., WULFF H., et al. Development of a sea anemone toxin as an immunomodulator for therapy of autoimmune diseases. **Toxicon**. v. 59, p. 529–546, 2012.

COSTA-LOTUFO, L. V., JIMENEZ, P. C., WILKE, D. V.; EPIFANIO, R. A. Organismos marinhos como fonte de novos fármacos: Histórico & perspectivas. **Química Nova**, XY, p.114, 2009.

CRAGG, G. M., GROTHAUS, P. G., AND NEWMAN, D. J.: Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. **Chem. Rev.**, v. 109, p. 3012–3043, 2009.

CRAGG, G.M.; GROTHAUS, P.G.; NEWMAN, D.J. Impact of Natural Products on Developing new anticancer agents. **Chemical. Reviews.** v. 109, p. 3012-3043, 2009.

CROCE, A.C.; BOTTIROLI, G. Autofluorescence spectroscopy and imaging: a tool for biomedical research and diagnosis. **European journal of histochemistry.** v. 58, n. 4, 2014.

CROCE, A.C.; FERRIGNO, A.; SANTIN, G.; VAIRETTI, M.; BOTTIROLI, G. Bilirubin: an autofluorescence bile biomarker for liver functionality monitoring. **Journal of biophotonics.** v. 7, n. 10, p. 810-817, 2014.

DAVIDSON, S.K.; ALLEN, S.W.; LIM, G.E.; ANDERSON, C.M.; HAYGOOD, M.G. (2001) Evidence for the biosynthesis of bryostatins by the bacterial symbiont, "Candidatus Endobugula sertula", of the bryozoan *Bugula neritina*. **Applied and Environmental Microbiology.** v. 67, p. 4531-4537, 2001.

DEVITA, V. T., JR. AND CHU, E.: A history of cancer chemotherapy, *Cancer Res.*, v. 68, p. 8643–8653, 2008.

DIAZ-GARCIA C.M., SANCHEZ-SOTO C., FUENTES-SILVA D., LEON-PINZON C., DOMINGUEZ-PEREZ D., VARELA C., RODRIGUEZ-ROMERO A., CASTANEDA O., Hiriart M. Low molecular weight compounds from *Zoanthus sociatus* impair insulin secretion via Ca⁺² influx blockade and cause glucose intolerance in vivo. **Toxicon**; v. 59, p. 306–314, 2012.

DIEHL, J. A.; FUCHS, S. Y.; KOUMENIS, C. The cell biology of the unfolded protein response. **Gastroenterology.** v. 141, p. 38-41, 2011.

DOMINGUEZ-PEREZ D., DIAZ-GARCIA C.M., GARCIA-DELGADO N., SIERRA-GOMEZ Y., Castaneda O., Antunes A. Insights into the toxicological properties of a low molecular weight fraction from *Zoanthus sociatus* (cnidaria). **Mar. Drugs**; v. 11, p. 2873–2881, 2013.

EVANS, N.D.; GNUDI, L.; ROLINSKI, O.J.; BIRCH, D.J.S.; PICKUP, J.C. Glucose-dependent changes in NAD(P)H-related fluorescence lifetime of adipocytes and fibroblasts *in vitro*: potential for non-invasive glucose sensing in diabetes mellitus.

Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. v. 80, n. 2, p. 122-129, 2005.

FENICAL, W. JENSEN, P.R. Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria. **Nature Chemical Biology**. v. 2, p. 666673, 2006.

FENICAL, W. Chemical studies of marine bacteria: developing a new resource. **Chemical Reviews**, 93, 1673–1683, 1993.

FRANCISCO R, PÉREZ-TOMÁS R, GIMÈNEZ-BONAFÉ P et al. Mechanisms of prodigiosin cytotoxicity in human neuroblastoma cell lines. **Eur J Pharmacol**. v. 572, p. 111–9, 2007.

FOSTER, I. Cancer: A cell cycle defect. **Radiography**, v.14, n.2, p. 144-149, doi:10.1016/j. radi.2006. 12.001, 2008.

FUKUZAWA S., HAYASHI Y., UEMURA D. The isolation and structures of five new alkaloids, norzoanthamine, oxyzoanth amine, norzoanthaminone, cyclozoanthamine and epinorzoanthamine. **Heterocycl. Commun**, v. 1, p. 207–214, 1995.

FURSTNER, A. Chemistry and Biology of Roseophilin and the Prodigiosin Alkaloids: A Survey of the Last 2500 Years. **Angewandte Chemistry International Edition**, v. 42, p. 3582 – 3603, 2003.

HANAHAN, D.; COUSSENS, L.M. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. **Cancer Cell**. Suíça, v. 21, n. 3, p. 309-322. 2012.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v.144, p. 646-674, 2011.

HARVEY, A. L. Natural Products in Drug Discovery. **Drug Discovery Today**, v. 13, p. 894-901, 2008.

HASSANKHANI, R; SAM, M. R; MOHAMMAD, M; AHANGAR, P. Prodigiosin isolated from cell wall of *Serratia marcescens* alters expression of apoptosis-related genes and increases apoptosis in colorectal cancer cells. **Med Oncol**, v. 32 n. 366, p. 1-8, 2015.

HILL, R. T. & FENICAL, W. Pharmaceuticals from marine natural products: surge or ebb? *Current opinion in biotechnology*, v. 21, n. 6, p. 777–9, 2010.

HIRATA, Y.; UEMURA, D.. Halichondrins - antitumor polyether macrolides from a marine sponge. **Pure And Applied Chemistry**, [s.l.], v. 58, n. 5, p.701-710, 1 jan. 1986.

HUSSON, T.R.; MALLIK, A.K.; ZHANG, J.X.; ISSA, N.P. Functional imaging of primary visual cortex using flavoprotein autofluorescence. **Journal of Neuroscience**. v. 27, n. 32, p. 8665-8675, 2007.

INCA. 2018. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Estimativa 2018: Incidência de Câncer no Brasil** / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: INCA, 111p.: il. col., mapas.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (Organização Mundial da Saúde) (Org.). **Globocan, 2012: Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. 2012.** Disponível em: <http://globocan.iarc.fr/Pages/burden_sel.aspx>. Acesso em: 20 abril. 2016.

KALLURI, R.; WEINBERG, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. **Journal of Clinical Investigation**; v. 119, p.1420-8, 2009.

KATAOKA T, MUROI M, OHKUMA S et al. Prodigiosin 25-C uncouples vacuolar type H(+)-ATPase, inhibits vacuolar acidification and affects glycoprotein processing. **FEBS Lett**, v. 359, p. 53–59, 1995.

KAWASAKI, T.; SAKURAI, F.; HAYAKAWA, Y. A prodigiosin from the roseophilin producer *Streptomyces griseoviridis*. **J. Nat. Prod.**, v. 71, p. 1265–1267, 2008.

KELECOM A. Studies of Brazilian marine invertebrates. VIII. Zoanthosterol, a new sterol from the zoanthid *Zoanthus sociatus* (hexacorallia, zoanthidea) Bull. **Soc. Chim. Belges**, v. 90, p. 971–976, 1981.

KIJJOA, A.; SAWANGWONGH, P. Drugs and cosmetics from the sea. **Mar. Drugs**, v. 2, p. 73-82, 2004.

KONG, D.X.; JIANG, Y.Y.; ZHANG, H.Y. Marine natural products as sources of novel scaffolds: achievement and concern. **Drug Discovery Today**, v.15, n.884, 2010.

LAATSCH, H.; KELLNER, M.; WEYLAND, H. J. **Antibiot.** v. 44, p. 187–191, 1991.

LAKOWICZ J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy. Third Edition. Baltimore, Maryland, USA. Springer, University of Maryland School of Medicine, v.954, p.1-97, 2006.

LAKSHMI V., SAXENA A., PANDEY K., BAJPAI P., MISRA-BHATTACHARYA S. Antifilarial activity of *Zoanthus* species (phylum coelenterata, class anthozoa) against human lymphatic filaria, *Brugia malayi*. **Parasitol. Res.**, v. 93, p. 268–273, 2004.

LIANG, J.; WU, W.L.; LIU, Z.H.; MEI, Y.J.; CAI, R.X.; SHEN, P. Study the oxidative injury of yeast cells by NADH autofluorescence. **Spectrochimica Acta Part A.** v. 67, n. 2, p. 355-359, 2007.

LLAGOSTERA E, SOTO-CERRATO V, JOSHI R et al. High cytotoxic sensitivity of the human small cell lung doxorubicin-resistant carcinoma (GLC4/ADR) cell line to prodigiosin through apoptosis activation. **Anticancer Drugs**, v. 16 p 393–9, 2005.

MA, X. AND WANG, Z.: Anticancer drug discovery in the future: an evolutionary perspective, **Drug Discov. Today**, v. 14, p. 1136–1142, 2009.

MANDERVILLE, R. A. Synthesis, Proton-Affinity and Anti-Cancer Properties of the Prodigiosin- Group Natural Products. **Synthesis**, p. 195–218, 2001.

MARTINELL, M. GIRALT, E. MONTANER, B. NAVARRO, S. PIQUE, M. GIL, J. P. RICARDO, Prodigiosin from supernatant *Serratia marcescens* induces apoptosis haematopoietic in cancer cells lines. **British Journal of Pharmacology**, v. 131, p. 585–593, 2000.

MARTIN-QUADRADO, A. B., LOPEZ-GARCIA, P., ALBA, J. C., MOREINA, D., STRITTMATTER, A. Metagenomics of the deep Mediterranean, a warm Bathypelagic habitat. **PLoS ONE** 2, e914. 2007.

MAYER, A. Marine Pharmaceutical: The Clinical Pipeline. Available online: <http://marinepharmacology.midwestern.edu/clinPipeline.htm> (accessed on 3 January 2018).

MELVIN MS, TOMLINSON JT, SALUTA GR, KUCERA GL, LINDQUIST N,MANDERVILLE RA. Double-strand DNA cleavage by copperprodigiosin. **J Am Chem Soc**, v. 122, p. 6333–6334, 2000.

MIZUSHIMA, N. Autophagy: process and function. **Genes & development**, v.21, n.22, p.2861-73, doi: 10.1101/gad. 1599207, 2007.

MONSEL, A.; LÉCART, S.; ROQUILLY, A. et al. Analysis of autofluorescence in polymorphonuclear neutrophils: a new tool for early infection diagnosis. **PloS one**. v. 9, n. 3, p. e92564, 2014.

MORGENSTERN, A et al. Divalent Transition-Metal-Ion Stress Induces Prodigiosin Biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* M145: Formation of Coeligiosins. **Chemistry A European Journal Communication**, v. 21, p. 6027 – 6032, 2015.

MUNSHI, A.; HOBBS, M.; MEYN, R. E. Clonogenic Cell Survival Assay. **Methods in Molecular Medicine**, v. 110, p. 21–29, 2005.

NATIONAL CANCER INSTITUTE (NCI). Disponível em: <<http://www.cancer.gov/>>. Acesso em: 2018.

NEWMAN, D. J., CRAGG, G. M. Drugs and Drug Candidates from Marine Sources: Na Assessment of the Current “State of Play”. **Journal Natural Products**. v.79(3), p.629-661, 2016.

NEWMAN, D. J., CRAGG, G. M. Marine Natural Products and Related Compounds in Clinical and Advanced Preclinical Trials. **Current Medicinal Chemistry**, v.11(13), p.1693-1713, 2004.

OLANO, C.; MÉNDEZ, C.; SALAS, J. A. Antitumor Compounds from Marine Actinomycetes. **Marine Drugs**, 7(2), 210248, 2009.

PANDEY, R., CHANDER, SAINIS, K. B. Prodigiosins as anti cancer agents: living upto their name. **curr. Pharm. Des.** V.15, p. 732 – 741, 2009.

PANDEY, R., CHANDER, B.; SAINIS, K. B. Prodigiosins, A Novel Family of Immunosuppressants with Anticancer Activity, **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**, v. 44, p. 295–302, 2007.

PAPIREDDY, K.; SMILKSTEIN, M.; KELLY, J. X.; SHWETA; SALEM, S. M.; ALHAMADSHEH, M.; HAYNES, S. W.; CHALLIS, G. L.; Reynolds, K. A. **J. Med. Chem.**, v. 54, p. 5296–5306, 2011.

PATKOVÁ, J.; VOJTÍSEK, M.; TUMA, J. et al. Evaluation of lipofuscin-like pigments as an index of lead-induced oxidative damage in the brain. **Experimental and toxicologic pathology**. v. 64, n. 1, p. 51-56, 2012.

PÉREZ-TOMÁS R, VIÑAS M. New insights on the antitumoral properties of prodiginines. **Curr. Med. Chem.**, v. 17, p. 2222 – 2231, 2010.

RAVELO, A. G., ESTÉVEZ-BRAUN, A., CHÁVEZ-ORELLANA, H., PÉREZ-SACAU, E., AND MESA-SIVERIO, D.: Recent studies on natural products as anticancer agentes. **Curr. Top. Med. Chem.**, v. 4, p. 241–265, 2004.

REGOURD, J.; AL-SHEIKH ALI, A.; THOMPSON. A. Synthesis and anticâncer activity of C-ring-functionalized prodigiosin analogs. **J. Med. Chem.**, v. 50, p. 1528–1536, 2007.

REINERT, K.C.; GAO, W.; CHEN, G.; WANG, X.; PENG, Y.P.; EBNER, T.J. Cellular and metabolic origins of flavoprotein autofluorescence in the cerebellar cortex *in vivo*. **Cerebellum**. v. 10, n. 3, p. 585-599, 2011.

SANTOS, M.G.; ALMEIDA, V.G.; AVELAR-FREITAS, B.A. et al. Phytochemical screening of the dichloromethane–ethanolic extract of *Eriosema campestre* var. macrophyllum roots and its antiproliferative effect on human peripheral blood lymphocytes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 26, n. 4, p. 464-470, 2016.

SECRETARIA DA COMISSÃO INTERMINISTERIAL PARA OS RECURSOS DO MAR. (Marinha do Brasil). Disponível; <<https://www.mar.mil.br/secirm/portugues/ilhasoceanicas.html>>. Acessado em 05 de março de 2018.

SENFOT, D.; RONAI, Z. A. UPR, autophagy, and mitochondria crosstalk underlies the ER stress response. **Trends Biochem. Sci.** v. 40, p. 141-148, 2015.

SILVA, F.R.O.; BELLINI, M.H.; NABESHIMA, C.T.; SCHOR, N.; VIEIRA, N.D.Jr.; COURROL, L.C. Enhancement of blood porphyrin emission intensity with aminolevulinic acid administration: A new concept for photodynamic diagnosis of early prostate cancer. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**. v. 8, n. 1, p. 7-13, 2011.

SOTO-CERRATO V, LLAGOSTERA E, MONTANER B et al. Mitochondriamediated apoptosis operating irrespective of multidrug resistance in breast cancer cells by the anticancer agent prodigiosin. **Biochem Pharmacol**, v. 68, p. 1345–1352. 2004.

TEJUCA M., DIAZ I, FIGUEREDO R., ROQUE L., PAZOS F., MARTINEZ D., IZNAGA-ESCOBAR N., PEREZ R., ALVAREZ C., LANIO M.E. Construction of an immunotoxin with the pore forming protein StI and ior C5, a monoclonal antibody against a colon cancer cell line. **Int. Immunopharmacol.** v. 4, p. 731–744, 2004.

TF HO , CJ MA , CH LU , YT TSAI , YH WEI , JS. CHANG , JK LAI , PJ CHEUH , CT YEY , PC TANG , J. TSAI , CHANG , JL KO , FS LIU , HE YEN , CC CHANG, Undecylprodigiosin induz selectivamente apoptose em células de carcinoma da mama humano independente de p53. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 225, p. 318 – 328, 2007.

TUCHIN, V.V. *Advanced Optical Flow Cytometry. Methods and Disease Diagnosis*, 1^a ed., Wiley-VCH, p. 2-3, 2011.

WALTER, P.; RON, D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. **Science**. v. 334, p. 1081-1086, 2011.

WASSERMAN, H. H.; RODGERS, G. C.; KEITH, D. D. J. **Am. Chem. Soc.** 1969, v. 91, p. 1263–1264. (b) WASSERMAN, H. H.; KEITH, D. D.; RODGERS, G. C. The structure of metacycloprodigiosin. **Tetrahedron**, v. 32, p. 1855–1861, 1976.

WEINBERG, A. R. *A biologia do CÂNCER*. Porto Alegre (SP): **Artmed**; 2008.

WEINER, L. M.; MURRAY, J. C.; SHUPTRINE, C. W. Antibody-based immunotherapy of cancer: New insights, new targets. **Cell**, v.148, n.6, p.1081-1084, 2012.

WILLIAMSON, N. R.; FINERAN, P. C; LEEPER, F. J; Salmond, G. P. C. The biosynthesis and regulation of bacterial prodiginines, **Nature**, v. 4, 887–899,2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (Org.). **U.S. Cancer Mortality Trends**. 2015. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>. Acesso em: 2016.

YAN L., HERRINGTON J., GOLDBERG E., DULSKI P.M., BUGIANESI R.M., SLAUGHTER R.S., BANERJEE P., BROCHU R.M., PRIEST B.T., KACZOROWSKI G.J., et al. *Stichodactyla helianthus* peptide, a pharmacological tool for studying Kv3.2 channels. **Mol. Pharmacol.** v. 67, p. 1513–1521, 2005.