



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

LARISSA ALVES GUIMARÃES

**ESTUDOS ALVO-DIRECIONADOS DE PRODUTOS NATURAIS DE
ACTINOBACTÉRIAS MARINHAS**

Fortaleza
2018

LARISSA ALVES GUIMARÃES

ESTUDOS ALVO-DIRECIONADOS DE PRODUTOS NATURAIS DE
ACTINOBACTÉRIAS MARINHAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Leticia Veras Costa Lotufo

Fortaleza

2018

LARISSA ALVES GUIMARÃES

ESTUDOS ALVO-DIRECIONADOS DE PRODUTOS NATURAIS DE
ACTINOBACTÉRIAS MARINHAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Aprovada em 07/06/2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Leticia Veras Costa Lotufo (Orientadora)
Universidade de São Paulo – USP

Prof^a. Dr^a. Quezia Bezerra Cass
Universidade Federal de São Carlos – UFSCAR

Prof^a. Dr^a. Paula Christine Jimenez
Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP

Prof. Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Roberto Cesar Pereira Lima Júnior
Universidade Federal do Ceará – UFC

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)

G979e Guimaráes, Larissa Alves.

Estudos alvo-direcionados de produtos naturais de actinobactérias marinhas / Larissa Alves Guimaráes. – 2018.
219 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2018.

Orientação: Profa. Dra. Leticia Veras Costa Lotufo.

1. Clorizidina A. 2. Imunoafinidade de fluorescência. 3. Proteínas Inibidoras da Apoptose.
4. Ensaio de bioafinidade. 5. Citotoxicidade. I. Título.

CDD 615.1

As mulheres, cientistas e professoras
que mais me inspiram,
Letícia Veras Costa Lotufo e
Paula Christine Jimenez,
dedico esta tese.

A todas as mulheres brasileiras que,
com bravura e dignidade,
insistem em fazer ciência nesse país,
dedico.

*"Não é sobre chegar no topo do mundo
e saber que venceu
É sobre escalar e sentir que o caminho
te fortaleceu
É sobre ser abrigo e também ter morada
em outros corações
E assim ter amigos contigo em todas as
situações"*

Ana Vilela, Trem-bala.

AGRADECIMENTOS

A Deus e Nossa Senhora, por que, hoje, sinto mais fortemente que me acompanham em todos os momentos.

À **Dra. Letícia Lotufo**, por ter sido sempre luz durante esses meus 9 anos de caminhada científica. Por ter confiado em mim, por ter aberto novos caminhos e oportunidades que eu jamais teria trilhado sem tê-la como orientadora-amiga. Uma orientadora entusiasta e apaixonada pelo que faz, que inspira, incentiva e mostra o melhor caminho a seguir, principalmente, naqueles dias mais turvos e incertos. Por todos os aprendizados, pelos conselhos sábios, pelo respeito, pela alegria contagiante, pela leveza de espírito e pelo carinho, guardarei sempre uma imensa gratidão e o exemplo de orientação.

À **Dra. Paula Jimenez**, pela amizade que ultrapassou as fronteiras laboratoriais, pelo apoio e confiança que sempre pude contar. Por ter acompanhado e me compreendido diante dos desafios que enfrentei nessa caminhada, sem perder a fé, me incentivou a seguir em frente. Pelo exemplo de cientista que sabe, e ensina, o valor de cada pequena conquista, compartilhar valiosos conselhos (em todas as áreas dessa bela vida), pela sensibilidade, pelo respeito, pelo carinho, serei sempre profundamente grata.

Ao **Dr. Eli Chapman**, pela preciosíssima oportunidade de realizar meu doutorado sanduiche por um ano em seu laboratório, me permitindo trabalhar e conviver intensamente com “o lado bioquímico” do estudo dos produtos naturais marinhos. Pela imensurável orientação científica oferecida a este trabalho, pelo incentivo e extremo entusiasmo pelo “hard work” na ciência.

Aos grupos de pesquisa do **Dr. William Fenical** e **Dr. James La Clair (Jim)**, pela valiosa oportunidade de colaboração neste estudo.

Aos professores da banca, **Dr. Roberto César** e **Dr. Pedro Magalhães**, pelas cuidadosas contribuições e questionamentos. Em especial, agradeço a **Dra. Quezia Cass**, pelas provocações filosóficas e por abrir minha visão para o mundo da cromatografia de bioafinidade.

Ao **Dr. Danilo Rocha** pela ajuda com experimentos de microscopia confocal e pelas (sempre) belas imagens capturadas, pela amizade e pelas conversas enriquecedoras.

Aos queridos integrantes do **Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais Marinhos (LAFARMAR-USP)** pela amizade, pela colaboração e pela convivência harmoniosa. Em especial, agradeço a **Dra. Paola Branco** pela disponibilidade e pela generosa ajuda nos estudos com as prodigininas. À amiga **Bianca Sahm**, a colega, pela confiança e companheirismo, pela força, por ser a minha irmã paulista do coração que me acolheu em sua casa na temporada São Paulo. Igualmente grata as amigas **Luciana Furtado** e **Evelyne Santos**, por serem as melhores 'amigas cearenses morando em São Paulo' que eu poderia ter, por também terem me recebido em seus lares quando precisei, pela parceria nos momentos alegria e nos momentos mais corridos dessa fase.

Aos integrantes do Chapman's Lab, na *University of Arizona* (UofA), que me acolheram tão bem e tornaram meus dias longe da casa mais leves. Em especial, agradeço ao **Andrew Ambrose (Andy)** pela parceria, pelos ensinamentos na rotina de expressão e purificação das proteínas recombinantes e nos demais projetos desenvolvidos no laboratório, pela amizade, paciência e disponibilidade em ajudar sempre que precisei. Igualmente grata à **Magdalena Kedzior (Magda)** que mesmo sem me conhecer pessoalmente, cedeu gentilmente seu apartamento para minha estadia inicial. Jamais esquecerei esse gesto tão lindo e bondoso. À melhor amiga iraniana que eu poderia ter, **Niloufar Mollasalehi (Nilou)**, por compartilhar comigo os desafios de morar fora do seu país, pelo cuidado e carinho, por ter sido uma grande companheira pra todas as horas. Agradeço também aos demais amigos do laboratório **Joseph Tillotson**, **Taoda Shi**, **Alisson Ross**, **Damian Manson** e **Fabian De la Cruz** pela convivência superharmoniosa e divertida dentro e fora do lab. Agradeço também à **Martha Jane (MJ)**, a melhor assistente administrativa do departamento de Farmacologia e Toxicologia da UofA poderia ter, pela acolhida sorridente, pela disponibilidade, pelo respeito e pela ajuda com as papeladas estrangeiras.

Ao **Dr. Norberto Peporine** pela generosa oportunidade conviver mais intensamente com a química de produtos naturais, pela acolhida descontraída e alegria contagiante. Em especial, agradeço aos demais integrantes do Laboratório de Química Orgânica da USP-RP, em especial à **Dra. Anelize Bauermeister**, a (Super-) Ane, pela paciência, pela disponibilidade e pelos valiosos ensinamentos na análise do ensaio de bioafinidade, da rede molecular, e também pelo energético empenho no desafio de isolar os demais *hits* minoritários da BRA-177. Agradeço também as queridas **Eduarda Moreira** e **Camila Capel** por terem me acolhido alegremente na "República caneca", na temporada Ribeirão Preto, pela convivência harmoniosa, pelo companheirismo e amizade.

À **Dra. Otília Pessoa**, e seu grupo de pesquisa, pela parceria de longa data e pela colaboração no isolamento da prodigininas e, em especial, também agradeço à **Dra. Maria da Conceição (Ceíça)**, ao **Alisson Batista** e **Dr. Francisco das Chagas (Chaguinha)** pela ajuda e parceria na rotina de extração dos cultivos de larga escala.

Ao querido **Dr. Diego Wilke**, pelo imenso entusiasmo pela pesquisa e disponibilidade em ajudar sempre, pelas boas conversas e conselhos, e pela alegre amizade. Agradeço também aos demais colegas do **Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia Marinha (LaBBMar-UFC)**, o laboratório que vi nascer durante o meu doutorado, obrigada **Alexia Assef**, **Katharine Gurgel**, **Thaís Brito**, **Erlânia Alves** e **Kayanny Ferreira** pela colaboração e acolhida em meio a tantas idas e vindas desses meus últimos anos de doutorado.

À saudosa e sempre querida **família ECOTOX**, pelos fortes laços de amizade e parceria. Em especial, agradeço as gatas **Jeamylle Nilin** e **Janisi Aragão**, por terem me entrevistado e, principalmente, me aprovado para entrar no laboratório que mudaria a minha vida., pra melhor! A **Marcela Davanzo (Tchuca)** e **Janaína Bernado**, pela amizade que nasceu na rotina do trabalho da ecotoxicologia e pelas boas histórias que ficaram como legado. Ao **Elthon Ferreira**, que me ensinou o bê-a-bá na bancada da microbiologia, mas que depois que aprendi, ficou “sentido” por que eu não quis mais obedecê-lo, rs. Brincadeiras à parte, só tenho a lhe agradecer, pois, se hoje eu vejo a importância do espírito de trabalho em equipe, de nunca deixar um coleguinha de trabalho na mão, foi por eu vi você dar esse exemplo. À **Lívia Pitombeira**, a amiga-cerimonialista disponível de qualquer local do mundo, pelas boas conversas e conselhos (desde quando voltávamos do lab de ônibus), pelo seu jeito sempre determinado, pela torcida e amizade sincera. À **Marcionília Pimentel** pelo seu jeito de ser, ver e viver a vida tão Marciolindo, pela compreensão, por me ajudar a enxergar coisas tão óbvias quanto um “para-choque de caminhão”, especialmente, quando eu mais precisava. À **Évila Damasceno**, por ser uma grande amiga e lôra, se fez companheira, mesmo à distância, pela parceria na ciência, nos pré- e pós-festas do lab (e até no chá de panela). Ao **Renan Daku Saes**, por sempre me encorajar, por ter me ligado e falado umas verdades com sotaque de Ferndópolis sempre que preciso, pelos áudios de risada inconfundíveis, por conseguir sobreviver dia após dia (rs) e nos fazer feliz. Ao **Alysson Queiroz**, meu irmão de cor e biotipo, pela amizade e parceria desde a graduação, passando pelo laboratório e até na docência no ensino fundamental. Nosso destino é o ensino superior, bro!

As secretárias **D. Laura** e **D. Célia** pela prontidão em instruir e resolver as papeladas e burocracias do dia-a-dia da pós-graduação.

Aos meus pais, **Eliana** e **Capistrano**, pelo amor e dedicação que vão além dos seus limites. Por terem me dado exemplo de família e de cidadania, por terem acolhido minhas escolhas profissionais, pelo incentivo a sempre seguir em frente e voar mais alto, mesmo quando com o coração apertado, pois suas orações nunca cessaram(rão). Aos meus irmãos, **Juliana** e **Lucas**, por serem parte singular de mim, são meus diamantes, que me sustentam no andar da vida, com aquele amor que só o amor de irmão provém. Obrigada por acreditarem em mim, família!

Ao meu **Pedro Henrique Bringel**, pelo amor que nos uniu na Biologia, que cruzou oceanos para me levar seu carinho, sua paz e acalento. Por também vivenciar a vida de pós-graduação, pela paciência, compreensão e companheirismo que me encheram de força e confiança pra encarar os desafios dessa caminhada. Estendo minha gratidão aos meus queridos sogrinhos **Socorro** e **Hermano** por me acolherem como filha, pela torcida, apoio e carinho.

À MinhaMelhor, **Mariana Castelo**, por ter sido minha amiga-irmã de berço, pela vida estudantil partilhada do maternal ao ensino fundamental, por vibrar a cada conquista, pelas palavras sinceras e decididas bem ao seu modo de ser. Agradeço também aos meus padrinhos, **Terezinha** e **Airton**, por serem meus segundos pais, pelo apoio e acolhida certa.

À **vó Rosália**, pela oração forte, por ser fonte de palavras sábias, em especial, quando estava longe, e ao telefone, rezava e dizia que “para Deus não existe distância”. Por sempre me orientar pelo caminho da verdade e do bem. Em especial, também agradeço a **Dra. Ana Maria Ponte** por todo apoio e incentivo à carreira docente, pela palavra-amiga, pelos sábios conselhos e pela torcida sempre.

À **Aninha** por acompanhar todo o meu caminhar na pós-graduação, por ter me ajudado a ver o quanto andei e cresci, e o quanto é importante saber do que se é capaz.

À **Fundação Cearense de Amparo a Pesquisa (FUNCAP)** pela bolsa de estudo concedida.

ESTUDOS ALVO-DIRECIONADOS DE PRODUTOS NATURAIS DE ACTINOBACTÉRIAS MARINHAS.

RESUMO: O desenvolvimento de diferentes estratégias de prospecção de produtos naturais que têm o alvo molecular como perspectiva-chave, tem contribuído para inovação e descoberta de novas substâncias com potencial anticâncer. Nesse contexto, este trabalho realizou o estudo de produtos naturais de actinobactérias marinhas através de diferentes tipos de abordagem para a elucidação do alvo molecular de ação da substância isolada (capítulo I) e para a prospecção alvo-dirigida de produtos naturais (capítulo II). No primeiro estudo, clorizidina A, isolada de *Streptomyces* sp. e com atividade antitumoral conhecida, foi submetida a abordagem de marcação por fluorescência de imunoafinidade (IAF) com o objetivo de elucidar o alvo molecular e investigar sua atividade citotóxica em células tumorais. A sonda IAF da clorizidina A foi sintetizada a partir do acoplamento do marcador IAF à referida molécula e, nos estudos de localização celular, a sonda apresentou-se, inicialmente, dispersa no citosol e, posteriormente, concentrada em lisossomos de células HCT-116. A Enolase 1 (ENO1) e a GAPDH, duas proteínas da via glicotítica, foram detectadas em maior abundância nas células tratadas. A Clorizidina A e sua sonda foram capazes de ligar-se a ENO1 recombinante, indicando-a como a proteína-alvo da molécula natural, e a avaliação da atividade citotóxica indicou a ocorrência de inibição da proliferação celular relacionada a alterações ocorridas na fase G₀/G₁, mediante inibição da via glicolítica. O segundo estudo utilizou o ensaio de bioafinidade (EB) com o objetivo de identificar substâncias ligantes das proteínas inibidoras da apoptose (IAPs) e com potencial anticâncer, em extratos de actinobactérias marinhas. O EB com as proteínas-alvo survivina, livina e BIR3-XIAP recombinantes, e 21 extratos de actinobactérias marinhas, resultou na detecção de 100 potenciais *hits*, cuja maioria foi detectada para as três proteínas-alvo. A rede molecular com 21 extratos analisados permitiu a identificação de grupos de compostos correspondentes a sete diferentes classes de produtos naturais conhecidas. A desreplicação dos 12 *hits* da cepa BRA177 (*Actinomadura* sp.) através das bases de dados DNP e AntiMarin, e comparação dos respectivos espectros de fragmentação, indicou que estes compostos pertencem as classes das tambjaminas e prodigininas. O fracionamento químico do extrato de BRA177 levou ao isolamento de três prodigininas,

metilciclooctilprodigiosina (1), ciclonoilprodigiosina (2) e nonilprodigiosina, (3), correspondentes aos *hits* obtidos no EB. Os *hits* 2 e 3 apresentaram-se citotóxicos a linhagens tumorais, após exposição a curto e longo prazos. Dessa forma, estes achados abrem perspectivas para a investigação da relação entre a inibição da via glicolítica e a atividade anticâncer da clorizidina A e, para investigação da interação das prodigininas e tambjamins de BRA117 com as proteínas IAPs.

Palavras-chave: Clorizidina A. Imunoafinidade de fluorescência. Proteínas Inibidoras da Apoptose. Ensaio de bioafinidade. Citotoxicidade.

TARGETED-DIRECTED STUDIES OF NATURAL PRODUCTS FROM MARINE ACTINOBACTERIAS.

ABSTRACT: The development of different strategies for prospecting natural products which have the molecular target as the key perspective has contributed to innovation and discovery of new substances with anticancer potential. In this context, this work carried out the study of natural products from marine actinobacteria through different approaches for the elucidation of the molecular target of action of the isolated substance (chapter I) and for the target-oriented prospection of natural products (chapter II). In the first study, chlorizidine A, isolated from *Streptomyces* sp. and with known antitumor potential, was subjected to the immunoaffinity fluorescence (IAF) approach to elucidate its molecular target and to investigate its cytotoxic activity in tumor cells. The IAF probe of chlorizidine A was synthesized from the coupling of the IAF tag to the natural molecule and, in cell colocalization studies, the probe was initially dispersed in the cytosol and subsequently concentrated in the lysosomes of HCT-116 cells. Enolase 1 (ENO1) and GAPDH, two proteins of the glycolytic pathway, were detected in higher abundance in the treated cells. Chlorizidine A and its IAF probe were able to bind to recombinant ENO1, indicating that as the target protein of the natural molecule, while evaluation of the cytotoxic activity suggested the occurrence of inhibition of cell proliferation related to changes occurring in the G0/G1 phase, by inhibition of the glycolytic pathway. The second study used a bioaffinity-based assay to identify substances with anticancer potential that bind to inhibitors of apoptosis proteins (IAPs) in extracts of marine actinobacteria. The bioaffinity assay using the recombinant target proteins survivin, livin and BIR3-XIAP, and 21 extracts of marine actinobacteria, recovered 100 hits, most of which were detected for the three target proteins. The molecular network with 21 analyzed extracts allowed the identification of groups of compounds corresponding to seven different classes of known natural products. Dereplication of the 12 hits identified for strain BRA177 (*Actinomadura* sp.) through the DNP and AntiMarin databases, along with comparison of the respective fragmentation spectra, indicated that these compounds belong to the classes of tambjamines and prodiginines. The chemical fractionation of the BRA177 extract led to the isolation of three prodiginines, methylcyclooctylprodigiosine (**1**), cyclononylprodigiosine (**2**) and nonylprodigiosine (**3**), corresponding to the hits

obtained in the bioaffinity assay. Hits **2** and **3** were cytotoxic to tumor cell lines by short- and long-term exposure. Thus, these findings open perspectives for investigation of the relationship between the inhibition of glycolytic pathway and the anticancer activity of chlorizidine A, and for investigation of the BRA117's prodiginines and tambjamines interaction with IAPs proteins.

Keywords: Chlorizidine A. Immunoaffinity fluorescence. Apoptosis Inhibitory Proteins. Bioaffinity assay. Cytotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Características intrínsecas do câncer.....	24
Figura 1.2	Distribuição por origem de todas as entidades químicas identificadas no período de 01/1981 a 12/2014.....	26
Figura 1.3	<i>Salinispora tropica</i> e o substância antitumoral isolado do seu extrato, Salinosporamida A.....	34
Figura 1.4	Estratégias de prospecção de produtos naturais anticâncer.....	38
Figura 2.1	Esquema ilustrativo da abordagem por marcação de fluorescência de imunoafinidade (IAF).....	42
Figura 2.2	Exemplos de aplicação da abordagem IAF na elucidação do alvo molecular de produtos naturais marinhos.....	44
Figura 2.3	Estrutura da (-)-clorizidina A (1), (-)-clorizidina A bis-acetato (2), clorizidina B (3) e adutos 4 e 5.....	48
Figura 2.4	Desenho experimental.....	50
Figura 2.5	Síntese da sonda fluorescente de imunoafinidade (sonda IAF, 3) pela esterificação da (-)-clorizidina A (1) com o marcador fluorescente de imunoafinidade (marcador IAF, 4).....	52
Figura 2.6	Ilustração do ensaio de ligação por ITC.....	61
Figura 2.7	Localização subcelular da sonda IAF (3) em células HCT-116.....	65
Figura 2.8	Análise de afinidade da sonda IAF (3).....	67
Figura 2.9	Identificação das proteínas-alvo da sonda IAF.....	68
Figura 2.10	Análise por western blot das frações imunoprecipitadas..	69
Figura 2.11	Análise da concentração e viabilidade celular.....	70
Figura 2.12	Efeitos sobre a distribuição das fases do ciclo celular (A) e na fragmentação internucleossomal (B) de células HCT-116.....	73

Figura 2.13	Análise da ligação da (-)-clorizidina A (1) ou da sonda IAF (3) com a proteína ENO1 recombinante por nano-ITC.....	74
Figura 2.14	Passos 6-9 da glicólise da D-glicose.....	80
Figura 2.15	Estrutura da triazina AP-III-a4 (ENOblock).....	84
Figura 3.1	Desenho esquemático das vias indutoras de apoptose...	89
Figura 3.2	As oito IAPs humanas e seus domínios estruturais.....	92
Figura 3.3	Pequenas moléculas inibidoras de IAPs.....	96
Figura 3.4	Esquema ilustrativo do ensaio de bioafinidade (esquerda) comparado com os métodos tradicionais (direita).....	95
Figura 3.5	Desenho Experimental.....	100
Figura 3.6	Esquema ilustrativo do ensaio de bioafinidade.....	106
Figura 3.7	Esquema ilustrativo da construção de uma rede molecular (<i>molecular networking</i>).....	109
Figura 3.8	Fracionamento químico do extrato acetato de etila obtido do cultivo em larga escala da cepa <i>Actinomadura</i> sp. (BRA177).....	112
Figura 3.9	Amostras dos processos de expressão heteróloga e purificação das IAPs survivina, livina e cIAP2, e amostra purificada do domínio BIR3 da XIAP (BIR3-XIAP).....	117
Figura 3.10	Análise da obtenção de <i>hits</i> do ensaio de bioafinidade com as IAPs.....	119
Figura 3.11	Rede molecular (<i>molecular network</i>) dos extratos submetidos ao ensaio de bioafinidade.....	125
Figura 3.12	Análise do ensaio de bioafinidade do extrato da <i>Actinomadura</i> sp. (BRA177).....	127
Figura 3.13	Cromatogramas do extrato bruto da <i>Actinomadura</i> sp. (BRA177) e respectivos <i>hits</i> detectados pelo ensaio de bioafinidade.....	130
Figura 3.14	Perfil de fragmentação dos <i>hits</i> detectados pelo ensaio de bioafinidade no extrato da <i>Actinomadura</i> sp. (BRA177).....	134

Figura 3.15	Estruturas das três prodigininas isoladas do extrato da <i>Actinomadura</i> sp. (BRA177).....	137
Figura 3.16	Avaliação do efeito citotóxico a longo prazo dos <i>hits</i> da <i>Actinomadura</i> sp. (BRA177) frente à linhagem SK-Mel-147.....	139
Figura 3.17	Estruturas químicas das tambjamins K e F.....	151

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1	Produtos naturais marinhos aprovados para uso na clínica, pelo FDA.....	29
Tabela 1.2	Produtos naturais de actinobactérias marinhas com atividade antitumoral.....	33
Tabela 2.1	Atividade citotóxica da (-)-clorizidina A (1), derivado bis-acetato (2) e sonda fluorescente de imunoafinidade da (-)-clorizidina A (sonda IAF, 3).....	63
Tabela 3.1	Estratégias de inibição das proteínas inibidoras da apoptose (IAPs).....	94
Tabela 3.2	Extratos de actinobactérias utilizados no presente trabalho para prospecção de moléculas moduladoras de IAPs.....	101
Tabela 3.3	Plasmídeos das proteínas-alvo e células hospedeiras para expressão heteróloga.....	103
Tabela 3.4	Linhagens celulares humanas utilizadas no estudo da atividade citotóxica e respectivos tipos histológicos.....	113
Tabela 3.5	Extratos de actinobactérias marinhas submetidos à cromatografia de bioafinidade com as IAPs e as respectivas <i>m/z</i> retidas (<i>hits</i>).....	119
Tabela 3.6	Desreplicação dos <i>hits</i> provenientes do ensaio de bioafinidade com o extrato da <i>Actinomadura</i> sp (BRA177).....	132
Tabela 3.7	Avaliação da atividade citotóxica dos <i>hits</i> (prodigininas) isolados da <i>Actinomadura</i> sp. (BRA177) frente a um painel de linhagens tumorais e não tumorais.....	138

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

6His	6 resíduos de Histidina
AcOEt	Acetato de etila
ASPSP	Arquipélago São Pedro e São Paulo
BME	β -mercaptoetanol
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CI ₅₀	Concentração inibitória média
CO ₂	Dióxido de carbono
DMSO	Dimetilsufóxido
EB	Ensaio de bioafinidade
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
EM	Espectrometria de massas
EM/EM	Espectrometria de massas sequencial (em <i>tandem</i>)
GNPS	<i>Global Natural Product Social Molecular Networking</i>
HCl	Ácido clorídrico
HR-ESI-MS	Espectrometria de massas de alta resolução com fonte de ionização por <i>eletrospray</i>
IAF	Imunoafinidade de fluorescência (do inglês, <i>Immunoaffinity Fluorescent</i>)
IAPs	Proteínas inibidoras da apoptose (do inglês, <i>Inhibitor of Apoptosis Proteins</i>)
KCl	Cloreto de potássio
K _d	Constante de dissociação
LB	<i>Luria-Bertani</i>
<i>m/z</i>	Razão massa/carga
MeOH	Metanol
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H tetrazolina bromida
PBS	Tampão fosfato
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de carbonos
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de prótons
RPM	Rotações por minuto

SDS-PAGE *Sodium Dodecyl Sulphate - Poliacrilamide Gel Electrophoresis*
UV-Vis Ultravioleta visível

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	23
1.1 CÂNCER	23
1.2 OS PRODUTOS NATURAIS	25
1.2.1 <i>Produtos naturais marinhos</i>	27
1.3 MICRO-ORGANISMOS MARINHOS COMO FONTE DE PRODUTOS NATURAIS	31
1.3.1 <i>Actinobactérias</i>	32
1.4 AS ESTRATÉGIAS DE PROSPECÇÃO E ELUCIDAÇÃO DO ALVO MOLECULAR DE PRODUTOS NATURAIS MARINHOS ANTICÂNCER	35
2. CAPÍTULO I	39
2.1 INTRODUÇÃO	40
2.1.1 <i>O gênero Streptomyces</i>	40
2.1.2 <i>A abordagem de fluorescência de imunoafinidade (IAF) na elucidação do alvo molecular de ação de produtos naturais</i>	41
2.1.3 <i>Clorizidina A de Streptomyces sp. (CNH287): o alcaloide híbrido de pirroloisondolona e diidropirrolizina inédito</i>	46
2.2 OBJETIVOS	49
2.2.1 <i>Objetivo geral</i>	49
2.2.2 <i>Objetivos específicos</i>	49
2.3 MÉTODOS	50
2.3.1 <i>Desenho Experimental</i>	50
2.3.2 <i>Obtenção dos compostos</i>	50
2.3.3 <i>Cultivo de células</i>	52
2.3.4 <i>Ensaio do MTT</i>	53
2.3.5 <i>Estudos por microscopia de fluorescência e confocal</i>	54
2.3.6 <i>Ensaio de imunoprecipitação</i>	55
2.3.7 <i>Identificação das proteínas-alvo</i>	56
2.3.7.1 <i>Digestão das proteínas</i>	56
2.3.7.2 <i>Análise por espectrometria de massas</i>	57
2.3.8 <i>Western Blot</i>	57
2.3.9 <i>Estudos por citometria de fluxo</i>	58
2.3.9.1 <i>Verificação da viabilidade celular</i>	59
2.3.9.2 <i>Avaliação do ciclo celular</i>	59
2.3.10 <i>Ensaio de ligação por calorimetria de titulação nano-isotérmica (Nano-ITC)</i>	60
2.4 RESULTADOS	63
2.4.1 <i>Atividade citotóxica da (-)-clorizidina A e seus derivados semissintéticos</i> 63	64
2.4.2 <i>Localização subcelular da (-)-clorizidina A em células HCT-116</i>	64
2.4.3 <i>Afinidade da sonda IAF da (-)-clorizidina A por alvos proteicos em células HCT-116</i>	66
2.4.4 <i>Efeitos da (-)-clorizidina A e do derivado bis-acetato sobre a concentração de células, viabilidade e ciclo celular</i>	69
2.4.5 <i>Análise da ligação com a proteína ENO1</i>	73
2.5 DISCUSSÃO	75
2.6 CONCLUSÕES	86
3. CAPÍTULO II	87
3.1 INTRODUÇÃO	88
3.1.1 <i>Apoptose como alvo de terapia anticâncer</i>	88

3.1.2	IAPs: Proteínas inibidoras da apoptose	90
3.1.3	O ensaio de bioafinidade como estratégia de prospecção alvo-direcionada de produtos naturais	96
3.2	OBJETIVOS	99
3.2.1	Objetivo geral	99
3.2.2	Objetivos específicos	99
3.3	MÉTODOS	100
3.3.1	Desenho Experimental	100
3.3.2	Obtenção dos extratos	100
3.3.3	Obtenção de proteínas recombinantes	102
3.3.3.1	<i>Transformação de E. coli quimicamente competentes</i>	103
3.3.3.2	<i>Expressão de proteínas recombinantes em E. coli</i>	103
3.3.3.3	<i>Purificação de proteínas recombinantes por cromatografia de afinidade a íons metálicos (IMAC)</i>	104
3.3.3.4	<i>Eletroforese de proteínas</i>	105
3.3.4	Ensaio de bioafinidade	106
3.3.4.1	<i>Ligação da proteína-alvo à resina</i>	107
3.3.4.2	<i>Captura dos compostos ligantes</i>	107
3.3.4.3	<i>Identificação dos hits</i>	108
3.3.5	Construção da rede molecular dos extratos	109
3.3.6	Desreplicação dos hits do extrato da <i>Actinomadura sp. (BRA177)</i>	110
3.3.7	Cultivo em larga escala da <i>Actinomadura sp. (BRA177)</i>	111
3.3.8	Fracionamento químico do extrato da <i>Actinomadura sp. (BRA177)</i>	111
3.3.9	Cultivo de células tumorais e não tumorais	112
3.3.10	Avaliação da atividade citotóxica – Ensaio do MTT	113
3.3.11	Avaliação da atividade citotóxica a longo prazo – Ensaio clonogênico	114
3.4	RESULTADOS	116
3.4.1	Expressão heteróloga e purificação das IAPs recombinantes	116
3.4.2	Hits do ensaio de bioafinidade com as IAPs	118
3.4.3	Rede molecular (molecular networking) dos extratos	123
3.4.4	Análise e desreplicação dos hits do extrato da <i>Actinomadura sp. (BRA177)</i>	125
3.4.5	Isolamento dos hits do extrato da <i>Actinomadura sp. (BRA177)</i>	136
3.4.6	Atividade citotóxica dos hits da <i>Actinomadura sp. (BRA177)</i>	138
3.5	DISCUSSÃO	140
3.6	CONCLUSÕES	157
4.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	158
	REFERÊNCIAS	160
	ANEXO I	179
	ANEXO II	181
	ANEXO III	182
	ANEXO IV	183
	ANEXO V	218
	ANEXO VI	219

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Câncer

O câncer é considerado um conjunto de doenças de origem genética e/ou epigenética, que envolve crescimento exacerbado de células anormais com potencial invasivo, sendo uma das patologias alvo de inúmeras pesquisas para o desenvolvimento ou descoberta de novos fármacos (FERREIRA; OLIVA; ANDRICOPULO, 2018; FOUAD; AANEI, 2017).

A homeostase do crescimento celular é mantida por meio de mecanismos que regulam a sua proliferação, como parada do crescimento e apoptose. As células tumorais mostram uma perda no controle da proliferação celular e, muitas vezes, tornam-se independentes de sinais mitogênicos para a sua progressão por meio das diferentes fases do ciclo celular (HANAHAN; WEINBERG, 2000, 2011; MALUMBRES; BARBACID, 2009). O princípio biomolecular do distúrbio proliferativo observado na carcinogênese baseia-se na presença de mutações gênicas que interferem na expressão normal de proteínas envolvidas no controle do ciclo celular e da morte celular. A lesão genética, responsável pelo desenvolvimento de neoplasias, é resultante de mutações em células germinativas ou somáticas, sendo de origem hereditária ou adquirida, respectivamente (FOUAD; AANEI, 2017; VOGELSTEIN et al., 2013).

Os principais genes responsáveis pela complexidade do câncer são os proto-oncogenes, que promovem o crescimento celular, os genes supressores tumorais, que inibem o crescimento, e os genes reguladores de apoptose (LUO; SOLIMINI; ELLEDGE, 2009). A mutação nesses genes reguladores do ciclo celular resulta na perda do controle da proliferação celular (FOSTER, 2008; NAGEL; SEMENOVA; BERNS, 2016). Dessa forma, as alterações nos mecanismos de regulação do ciclo celular tornam a célula apta a se duplicar sem a devida checagem, permitindo o crescimento desordenado das células e o acúmulo de uma série de mutações que contribuem para o surgimento das características malignas das células (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Este crescimento desordenado das células no câncer é também resultado da autossuficiência na sinalização de fatores de crescimento e da

insensibilidade destas células aos supressores de tumor. Além disso, elas têm a capacidade de evasão da morte celular programada e do sistema imunológico, apresentando um potencial replicativo ilimitado e de reprogramação do seu metabolismo energético, sendo capaz de invadir e formar metástases, além de promover a angiogênese, o que resulta na imortalização das mesmas. A figura 1.1 apresenta as características inerentes das células tumorais (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

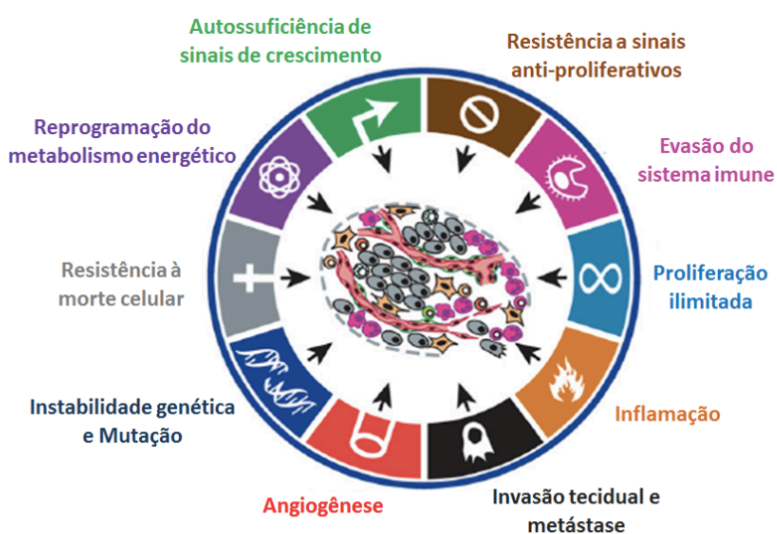


Figura 1.1. Características intrínsecas do câncer. Fonte: HANAHAN; WEINBERG, 2011.

Além das características intrínsecas do câncer, é importante ressaltar que este se desenvolve em um microambiente complexo, do qual depende para seu crescimento sustentado, invasão e metástase. A interação entre as células tumorais e o estroma, que é formado por células de tecido conectivo, representa uma forte relação que influencia na iniciação e progressão da doença e no prognóstico do paciente (GOUBRAN et al., 2014; QUAIL; JOYCE, 2013).

Diferentes tipos de terapias foram aplicadas ao câncer em diferentes momentos ao longo da história da medicina. As principais estratégias terapêuticas utilizadas atualmente incluem cirurgia, radioterapia, quimioterapia, terapia adjuvante e terapias alvo-direcionadas (IMRAN et al., 2017; SUDHAKAR, 2009).

A quimioterapia consiste em um tratamento a base de fármacos, de forma isolada ou combinada, com o objetivo de atingir as células transformadas

e no processo de crescimento, disseminação e/ou invasão tecidual. Muitos desses medicamentos atuam em alvos moleculares como DNA e o complexo mitótico (URRUTICOECHEA et al., 2010). As terapias alvo-direcionadas consistem no uso de fármacos desenvolvidos para atuarem num contexto oncogênico específico, e incluem terapias hormonais, imunoterapia, inibidores de transdução de sinal, moduladores de expressão gênica, indutores de apoptose, inibidores de angiogênese, dentre outros (HANAHAN; WEINBERG, 2011; NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2018).

No entanto, apesar do considerável arsenal de fármacos já existentes para o tratamento do câncer, em muitos casos, o sucesso terapêutico não é alcançado devido a falhas nos esquemas terapêuticos, altos índices de recidivas, redução da sobrevida dos pacientes e dos efeitos adversos, o que leva a uma contínua busca por novos fármacos (FOUAD; AANEI, 2017; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

1.2 Os Produtos Naturais

Os produtos naturais podem ser definidos, de forma geral, como as moléculas derivadas de fontes naturais que não estão envolvidas no metabolismo primário do organismo-fonte. Estas substâncias são, principalmente, codificadas geneticamente e produzidas por vias metabólicas secundárias, e pertencem às mais diversas classes de substâncias orgânicas além de possuírem diversas funções biológicas (DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012; PYE et al., 2017)

A exploração das fontes naturais pelo homem visando o seu uso terapêutico se iniciou nas primeiras civilizações e, até os dias atuais, o interesse nos produtos naturais se mantém e impulsiona a pesquisa por novos fármacos para inovação e/ou aprimoramento dos tratamentos de diversas doenças. Ao longo dos anos, inúmeros medicamentos oriundos de fontes naturais chegaram ao mercado e muitos permanecem em uso na clínica até hoje.

Segundo a revisão mais recente de Newman e Cragg (2016), os produtos naturais seguem líderes em prover a molécula ou inspirar o desenvolvimento de mais de 60 % de todos os novos fármacos aprovados para uso na clínica entre os anos de 1981 e 2014. Por outro lado, 27% dos fármacos

são de origem totalmente sintética (figura 1.2). Ainda dentro dessa classificação, os autores relataram que apenas um fármaco (sorafenib, Nexavar[®]), formalmente reportado em domínio público, foi desenvolvido integralmente a partir de bibliotecas construídas por química combinatória (NEWMAN; CRAGG, 2016).

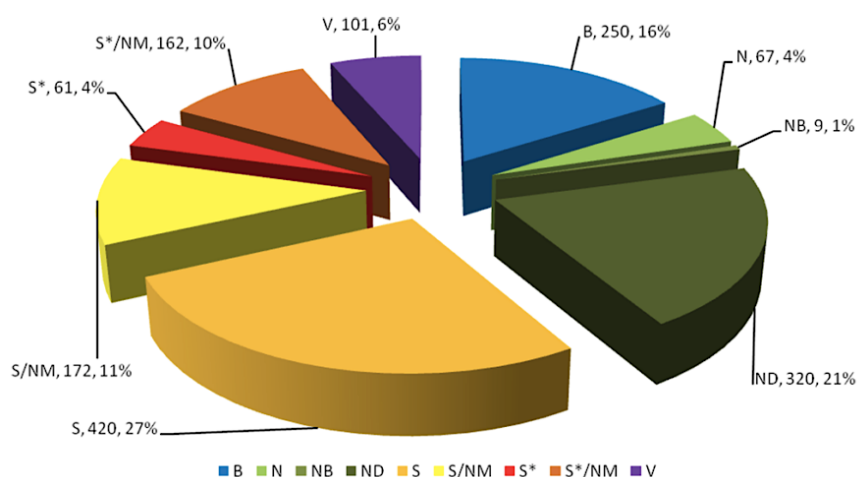


Figura 1.2. Distribuição por origem de todas as entidades químicas identificadas no período de 01/1981 a 12/2014 (n = 1.562). “B”: Biológico, geralmente uma proteína ou um peptídeo grande (>50 resíduos) isolado de um organismo ou linhagem celular ou produzido por meios biotecnológicos; “N”: Produto natural em si; “NB”: Produto natural botânico (mistura definida); “ND”: Derivado semissintético de produto natural; “S”: Totalmente sintético, normalmente encontrado de modo randômico ou modificado a partir de um agente pré-existente; “S*”: Originado por síntese total, mas com o grupo farmacofórico de um produto natural; “NM” (subcategoria): Mímico funcional de um produto natural; “V”: Vacina. Fonte: NEWMAN, CRAGG, 2016.

Nesse contexto, os produtos naturais são considerados “estruturas privilegiadas”, especialmente quando observado que, ao longo de milhares de anos, tais moléculas co-evoluíram para interagir com macromoléculas (alvos biológicos) específicas. As estruturas químicas naturais podem diferir das substâncias sintéticas em diversos aspectos químicos, como a tendência em conter menos átomos de nitrogênio, halogênio ou enxofre, porém maior número de átomos de oxigênio; além da probabilidade de maior ocorrência de anéis e centros quirais (COSTANTINO; BARLOCCO, 2006; DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012). Conseqüentemente, a estereoquímica apresentada por estes produtos naturais amplifica a extraordinária variedade molecular e impõe grandes desafios na sua elucidação molecular (BLUNT et al., 2013; DOMÍNGUEZ et al., 2014).

Assim sendo, a combinação das particularidades das moléculas naturais com as técnicas de biossíntese combinatória e/ou química combinatória são responsáveis pela geração de moléculas com propriedades farmacológicas otimizadas. Essa abordagem colaborativa impulsiona as expectativas e os esforços na prospecção de substâncias de importância biomédica de fontes naturais (CRAGG; GROTHAUS; NEWMAN, 2009).

Com relação às fontes naturais, plantas e micro-organismos terrestres são as fontes tradicionais de produtos naturais, tendo formado a base para a maioria dos medicamentos, seguido de subsequentes estudos clínicos, químicos e farmacológicos. Dentre estes medicamentos, estão, por exemplo, o analgésico morfina das papoulas (*Papaver somniferum*), os digitálicos ou glicosídeos cardiotônicos das dedaleiras (*Digitalis* spp.), o antibiótico penicilina dos fungos (*Penicillium* spp.) além da salicina do salgueiro-branco (*Salix alba* L.), a partir do qual o anti-inflamatório ácido acetilsalicílico foi sintetizado (DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012). Contudo, ao lado do protagonismo das clássicas fontes, os produtos de origem marinha vêm conquistando um papel de destaque na história mais recente da Farmacologia.

1.2.1 Produtos naturais marinhos

Ao horizonte de 70% da superfície do planeta Terra, encontram-se os mares e oceanos, resguardando uma imensa e singular biodiversidade em seus diferentes ecossistemas, como os recifes de corais, o assoalho marinho, zonas abissais, além das zonas estuarinas e manguezais. As formas de vida desses ecossistemas também se diversificam quanto a sua fisiologia, interação com os demais organismos no meio marinho e mecanismos adaptativos à variação dos fatores abióticos a que está sujeito o ambiente marinho (BHATNAGAR; KIM, 2010).

A exploração desse ambiente como fonte de novos fármacos permaneceu distante dos cientistas de produtos naturais até os anos 1950. Inicialmente, a exploração ficou restrita aos organismos mais visíveis e facilmente coletados, principalmente devido à dificuldade de acesso às zonas mais profundas. Apenas na década de 1970, com o aprimoramento de técnicas e equipamentos de mergulho seguros, que diversas pesquisas puderam explorar

de forma efetiva os recursos marinhos e avançar para mais além das zonas entremarés (GERWICK; MOORE, 2012).

O avanço progressivo da exploração marinha nos últimos 45 anos, levou ao isolamento de milhares de estruturas química únicas de produtos naturais marinhos com diversas atividades biológicas (DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012). Tais substâncias naturais, ou derivados, que chegaram em fase de teste clínico possuem diversos alvos terapêuticos como canais iônicos, enzimas, DNA, microtúbulos, proteassomo, células imunológicas e vias de estresse oxidativo (GERWICK; MOORE, 2012; MAYER, 2018).

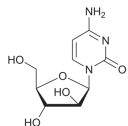
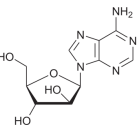
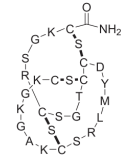
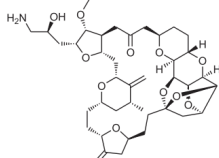
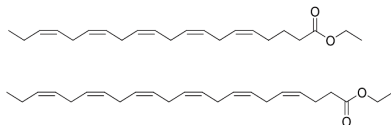
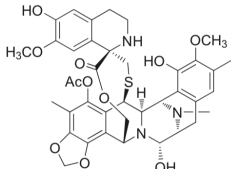
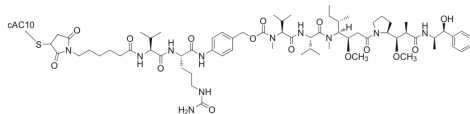
Os primeiros produtos naturais marinhos aprovados pelo FDA (*Food and Drug Administration*, agência regulatória dos EUA) foram desenvolvidos a partir do trabalho pioneiro de Bergmann e Feeney (1951), com o isolamento dos derivados raros de nucleosídeos da esponja caribenha *Tethya crypta* (*Cryptotethya crypta*) os arabinonucleosídeos espongotimidina e espongouridina. Essas substâncias serviram de modelo para o desenvolvimento de uma nova classe de análogos sintéticos, como a vidarabina (adenina-arabinosídeo, Ara-A) e a citarabina (citosina-arabinosídeo, Ara-C) usados até hoje na quimioterapia de infecções virais e de câncer, respectivamente (BERGMANN; FEENEY, 1951; MAYER et al., 2010).

Entretanto, o primeiro produto totalmente natural obtido de um organismo marinho a ser comercializado como medicamento foi o ziconotídeo ou ω -conotoxina MVIIA (Prialt[®], tabela 1.1), um peptídeo analgésico isolado a partir do molusco *Conus magus* na década de 80 (OLIVERA et al., 1985). Uso deste peptídeo foi aprovado nos EUA para o tratamento de dor crônica severa em 2004 (BLUNT; BUCKINGHAM; MUNRO, 2012; MAYER et al., 2010).

A trabectedina (ET-743, Yondelis[®], tabela 1.1) foi o primeiro fármaco de origem marinha aprovado na União Europeia, em 2007, e foi o que recebeu a aprovação mais recente pelo FDA, em 2015, para o tratamento de sarcomas de tecidos moles e câncer de ovário. Inicialmente, a trabectedina foi isolada da ascídia caribenha *Ecteinascidia turbinata*, mas com baixíssimo rendimento (0,0001%) (POMMIER et al., 1996). A entrada desse composto nos ensaios pré-clínicos e clínicos só foi possível através da adoção da maricultura em larga escala da *E. turbinata* em lagoas abertas. Posteriormente, a semissíntese da trabectedina foi desenvolvida a partir da cianosafracina B, obtida a partir da

fermentação da bactéria *Pseudomonas fluorescens*, e assim, permitindo a comercialização do Yondelis® (CUEVAS; FRANCESCH, 2009; DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012).

Tabela 1.1. Produtos naturais marinhos aprovados para uso na clínica, pelo FDA (*Food and Drug Administration*, EUA).

Estrutura química/nome	Nome comercial (ano de aprovação)	Organismo fonte/ Provável produtor	Classe química	Aplicação terapêutica
 <p>Citarabina, Ara-C</p>	Cytosar-U (1969)	Esponja/bactéria	Nucleosídeo	Câncer
 <p>Vidarabina, Ara-A</p>	Vira-A (1976)	Esponja/bactéria	Nucleosídeo	Antiviral
 <p>Ziconotídeo</p>	Prialt (2004)	Molusco	Peptídeo	Dor crônica severa
 <p>Mesilato de eribulina, ET389</p>	Halaven (2010)	Esponja/bactéria	Policetídeo	Câncer
 <p>Ômega-3 etil-éster</p>	Lovaza (2004)	Peixe	Ácido graxo	Hipertrigliceridemia
 <p>Trabectedina, ET-743</p>	Yondelis (2015)	Ascídia/bactéria	Alcaloide	Câncer
 <p>Brentuximab vedotin</p>	Adcetris (2011)	Molusco/cianobactéria	Anticorpo conjugado ao fármaco	Câncer

Fonte: Adaptado de GERWICK; MOORE, 2012; MAYER et al., 2010; WATERS et al., 2010.

No total, atualmente, o painel global de medicamentos de origem marinha consiste de sete compostos aprovados pelo FDA (*Food and Drug Administration*, EUA) (tabela 1.1), além de 23 produtos naturais (ou derivados destes) em diferentes fases dos ensaios clínicos (tabela 1.1, anexo I) e dezenas de outros compostos naturais em fase de pré-clínica (MAYER et al., 2017; MAYER, 2018).

Quanto à aplicação terapêutica, é notável que a indicação para o tratamento do câncer se sobressai entre os produtos naturais marinhos em uso clínico como também em fase de estudos clínicos e pré-clínicos. De fato, a pesquisa por novas moléculas marinhas com atividade anticâncer proporciona significativa contribuição na história dos produtos naturais marinhos, e também na identificação de novos alvos terapêuticos.

Com relação dos produtos naturais marinhos em estudo clínico, a maioria destas moléculas foram provenientes de invertebrados marinhos, como ascídias, esponjas, moluscos e briozoários. De fato, foi este grupo de organismos que inaugurou os estudos em bioprospecção marinha e são, em grande parte, encontrados nos ecossistemas tropicais de águas rasas. Entretanto, mais recentemente, tem-se apresentado indícios de que nem sempre o organismo provedor é o real produtor dos compostos bioativos (BLUNT; BUCKINGHAM; MUNRO, 2012).

Os invertebrados marinhos são frequentemente habitados por grandes quantidades de micro-organismos simbiotes ou associados, e estes podem ser, por sua vez, as verdadeiras fontes do produto natural bioativo ali encontrado. Diversos estudos têm provado que essa hipótese pode estar correta mais frequentemente do que se imagina, com base em evidências experimentais ou circunstanciais (GERWICK; FENNER, 2013). A briostatina 1, por exemplo, isolada do briozoário *Bugula neritina*, teve a proteobactéria endossimbionte *Candidatus Endobugula sertula* como o candidato proposto para a sua biossíntese, através de análises metagenômicas (RADJASA et al., 2011; SUDEK et al., 2007). De forma similar, para a trabectedina, a proteobactéria *Candidatus Endoecteinascidia frumentensis*, um endossimbionte da ascídia *E. turbinata*, foi identificada como micro-organismo responsável pela sua biossíntese. Análises

metaproteômica e enzimáticas confirmaram essa hipótese (BLUNT et al., 2013; RATH et al., 2011).

Diante destes resultados, as perspectivas em torno da bioprospecção marinha continuam avivadas, em especial, em torno dos processos metabólicos dos micro-organismos marinhos, cada vez mais reconhecidos como a mais provável rota de descoberta de novos fármacos marinhos (GERWICK; FENNER, 2013; SUBRAMANI; AALBERSBERG, 2013).

1.3 Micro-organismos marinhos como fonte de produtos naturais

Segundo o Censo da Vida Marinha (2010), 90% da biomassa de toda a vida marinha é atribuída aos micro-organismos marinhos, e sua diversidade pode ser extrapolada para pelo menos dezenas ou centenas de milhões de tipos de micro-organismos. Cosmopolitas como são, os micro-organismos marinhos colonizam praticamente qualquer ecossistema desse ambiente, inclusive regiões de condições extremas de temperatura, salinidade, pressão e luminosidade (AUSUBEL; CRIST; WAGGONER, 2010; FENICAL; JENSEN, 2006).

A ênfase crescente em torno dos micro-organismos marinhos advém da sua capacidade de sintetizar moléculas bioativas e aumentar o arsenal de compostos com potencial aplicação terapêutica, além da perspectiva de incorporação de sustentabilidade ao processo de pesquisa e desenvolvimento de fármacos de origem marinha. Diferentemente dos invertebrados marinhos, por exemplo, a possibilidade de cultura em larga escala e fermentação do microrganismo permite o suprimento econômico e independente das coletas ameaçadoras para a população daqueles organismos (FENICAL; JENSEN, 2006; HILL; FENICAL, 2010).

Deste modo, microbiologistas, ecólogos, biólogos evolucionistas e químicos tem atentado cada vez mais para metabolismo secundário singular dos micro-organismos marinhos, em especial, fungos, bactérias e cianobactérias, devido ao seu potencial biotecnológico promissor (IMHOFF; LABES; WIESE, 2011).

Esse interesse tem inspiração na importância histórica dos micro-organismos terrestres como exímios produtores de moléculas com atividade biológica, seja contra outros micro-organismos ou contra estados fisiológicos de

diversas doenças. Tais substâncias bioativas são largamente utilizadas como antibióticos, como no tratamento de múltiplas infecções bacterianas (penicilinas, cefalosporinas, estreptomicina e vancomicina), além de se mostrarem notavelmente eficazes contra neoplasias (bleomicina, dactinomicina, doxorubicina e estaurosporina), podendo também agir como imunossuppressores (ciclosporina) viabilizando, por exemplo, o transplante de órgãos (BHATNAGAR; KIM, 2010).

Diante dos bem-sucedidos exemplos de fontes terrestres, a pesquisa com produtos naturais de micro-organismos marinhos vem dando seus primeiros, e firmes passos, com moléculas em estudos clínicos que tem se mostrado fortes candidatas a serem os próximos medicamentos de origem marinha (BHATNAGAR; KIM, 2010).

1.3.1 Actinobactérias

As actinobactérias, também referidas como actinomicetos, são um grupo de bactérias Gram-positivas e filamentosas, amplamente distribuídas pelos diversos ecossistemas terrestres e marinhos, como em solos e sedimentos de áreas rasas e profundas, e também se associam a vários organismos marinhos, como esponjas e ascídias. Além de desempenharem um papel ecológico crucial na ciclagem de nutrientes, as actinobactérias também são prolíficas produtoras de metabólitos secundários com aplicação farmacológica (OLANO; MÉNDEZ; SALAS, 2009; SUBRAMANI; AALBERSBERG, 2013; ZOTCHEV, 2012). O destaque deste grupo foi reforçado pela estimativa de que cerca de 45% dos metabólitos secundários bioativos isolados de micro-organismos, tem as actinobactérias como fonte, promovendo o interesse e reconhecimento crescentes desse grupo de micro-organismos como uma célebre fonte de produtos naturais (BÉRDY, 2005).

As actinobactérias terrestres, em especial do gênero *Streptomyces*, foram as primeiras a serem estudadas e a renderem substâncias bioativas que se tornaram medicamentos, em especial antibióticos e antitumorais, até hoje usados na clínica. A estreptomicina, por exemplo, isolada de *Streptomyces griseus* na década de 40, foi primeiro antibiótico derivado do respectivo gênero filogenético e, também, o primeiro representante da classe dos

aminoglicosídeos, utilizado ainda hoje no tratamento de infecções bacterianas (MIAO; DAVIES, 2010).

À medida que o interesse científico pelos micro-organismos marinhos foi despertado, as actinobactérias marinhas começaram a ser também exploradas, revelando o seu potencial para produção de diversos metabólitos secundários com diversas atividades biológicas, como antibacteriana, antifúngica, imunossupressora, anti-inflamatória, antiparasitária, antiviral e antitumoral (HASSAN; SHAIKH, 2017).

Quanto às substâncias antitumorais, inúmeras moléculas obtidas de diferentes gêneros de actinobactérias e pertencentes a diferentes classes químicas, induzem citotoxicidade em células tumorais através de diferentes mecanismos de ação. Alguns destes exemplos estão apresentados na tabela 1.2.

Tabela 1.2. Produtos naturais de actinobactérias marinhas com atividade antitumoral.

Composto	Natureza química	Espécie	Outras atividades biológicas	Mecanismo de ação
Diazeponomicina	Alcaloide	<i>Micromonospora</i>	Anti-inflamatória, Antibacteriana, Antiprotease, Antiparasitária	Ligação aos receptores benzodiazepínicos, inibição da via Ras/MAPK
Estreptoclorina	Indol	<i>Streptomyces roseolilacinus</i>	Antiangiogênico, Antibacteriano, Antiinflamatório	Inibidor de TNF α
Salinosporamida A	Policetídeo	<i>Salinispora tropica</i>	Antimalárico	Inibidor do proteassomo
Salinipironas A, B	Policetídeo	<i>Salinispora tropica</i>	-	Inibidor de produção de interleucina-5
Chalcomicina	Policetídeo	<i>Streptomyces</i> sp.	-	Inibidor de síntese proteica
Manumicinas	Policetídeo	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibacteriana	Inibidor da farnesiltransferase
Luminiacina	Policetídeo	<i>Streptomyces</i> sp.	Antiangiogênico	Inibidor de formação de tubo capilar
Arenamida A, B	Peptídeo	<i>Salinispora arenicola</i>	-	-
Estrepesquitriol	Sesquiterpeno	<i>Streptomyces</i> sp.	-	TNF- α inibidor
Tiocoralina	Peptídeo	<i>Micromonospora</i>	Antibacteriana	Ativação da via Notch

Fonte: adaptado de HASSAN, SHAIKH, 2017.

Um exemplo marcante na história dos produtos naturais de actinobactérias marinhas foi a descoberta da salinosporamida A (NPI-0052), a partir de *Salinispora tropica* (figura 1.3), uma actinobactéria estritamente marinha isolada do sedimento de profundidade coletado em Bahamas. A salinosporamida A é uma β -lactona rara que mostrou potente efeito citotóxico por meio da inibição seletiva e irreversível da função catalítica dos proteassomos – complexos proteicos responsáveis pela degradação de proteínas no interior das células e já reconhecidos como alvo quimioterápico do câncer (FELING et al., 2003; GIDDINGS; NEWMAN, 2013). O ingresso da salinosporamida A na fase I de testes clínicos ocorreu em apenas três anos após a sua descoberta, em 2003, para o tratamento de linfomas, mieloma múltiplo e glioblastomas. Atualmente em estudos de fase III, esse fármaco tem sido testado para o tratamento de glioblastomas em associação com outros quimioterápicos. Este autêntico produto natural marinho é o primeiro candidato para o tratamento de câncer obtido da fermentação salina de um actinomiceto marinho restrito (CLINICAL TRIALS, 2018; SUBRAMANI; AALBERSBERG, 2012).

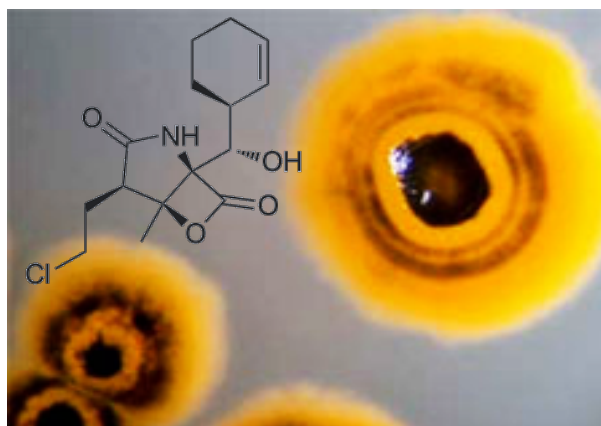


Figura 1.3. *Salinispora tropica* e o substância antitumoral isolado do seu extrato, Salinosporamida A. Fonte: ucsdnews.ucsd.edu/archive.

Após a descoberta as salinosporamida A, uma série de mais 10 salinosporamidas, foram também identificadas a partir do gênero *Salinispora* (FELING et al., 2003; REED et al., 2007) incluído, a salinosporamida K identificada a partir de técnicas de mineração genômica (do inglês, *genome*

mining) (EUSTÁQUIO et al., 2011). Os estudos mais recentes de genômica e engenharia genética tem comprovado o grande potencial biossintético do gênero *Salinispora*, e realçam ainda mais relevância dos estudos de prospecção das actinobactérias marinhas (JENSEN; MOORE; FENICAL, 2015).

1.4 As estratégias de prospecção e elucidação do alvo molecular de produtos naturais marinhos anticâncer

Tradicionalmente, a prospecção de novos fármacos anticâncer a partir de fontes naturais fundamenta-se, de início, na identificação de atividade biológica em extratos orgânicos dos organismos. Nesse tipo de abordagem, também chamada de fenotípica, o extrato considerado ativo em um modelo estabelecido de avaliação, passa pelo processo de fracionamento químico, em paralelo aos ensaios de atividade biológica, até o isolamento da(s) molécula(s) ativa(s). A partir de então, procede-se com o estudo aprofundado da atividade biológica, determinação do mecanismo de ação e elucidação do alvo de ação da(s) substância(s) isolada(s) (JUNG; KWON, 2015; MOFFAT; RUDOLPH; BAILEY, 2014).

Nessa abordagem, os modelos de triagem dos extratos naturais, quanto a sua atividade anticâncer, têm sido largamente fundamentados em ensaios baseados nos fenótipos clássicos das células tumorais, como ensaios de inibição da proliferação celular ou indução de morte celular. O estudo da atividade anticâncer da substância isolada de um extrato ativo, em geral, envolve a realização de outros ensaios fenotípicos, como avaliação de alterações morfológicas, alterações no ciclo celular, avaliação de eventos bioquímicos e da expressão genética, dentre muitos outros, a fim de se obter um direcionamento para o modo de ação pela qual a substância em estudo age (MOFFAT; RUDOLPH; BAILEY, 2014).

O modo, ou mecanismo de ação, de uma substância natural pode ser definido como o(s) evento(s) pelo(s) qual(is) esta substância regula um processo biológico específico. A nível molecular, este evento é desencadeado a partir da interação da molécula natural com uma macromolécula ou um complexo macromolecular específico, ou seja, o alvo molecular. Na tradicional abordagem fenotípica, o estudo do modo de ação e a elucidação do alvo molecular de um

produto natural é, frequentemente, um processo dispendioso, que requer diversas etapas experimentais e a utilização de diferentes técnicas até a completa identificação do seu alvo (BAKER, 2015; CARLSON, 2010; JUNG; KWON, 2015; LA CLAIR, 2010).

Nesse contexto, a estratégia de marcação de fluorescência de imunoafinidade (IAF), também denominada abordagem IAF, utilizada no presente trabalho, foi desenvolvida com o objetivo de permitir a elucidação do alvo molecular de produtos naturais antes mesmo do esclarecimento do respectivo mecanismo de ação. Esta técnica envolve a incorporação de um marcador fluorescente e imunodetectável à molécula natural, gerando uma sonda IAF do produto natural. Esta sonda é, então, utilizada em um processo de experimentos, que permite o estudo da sua localização subcelular, usando um microscópio de fluorescência, e permite ainda o seu reconhecimento, utilizando técnicas de imunoenaios, e a identificação da(s) proteína(s) celular(es) a que se liga(m) o produto natural (LA CLAIR; FENICAL; COSTA-LOTUFO, 2016). A partir da identificação do alvo de ação do produto natural, o estudo de seu mecanismo de ação toma um caminho mais simplificado, visto que irão concentrar-se, sobremaneira, nos efeitos e nas vias de sinalização influenciadas pelo alvo.

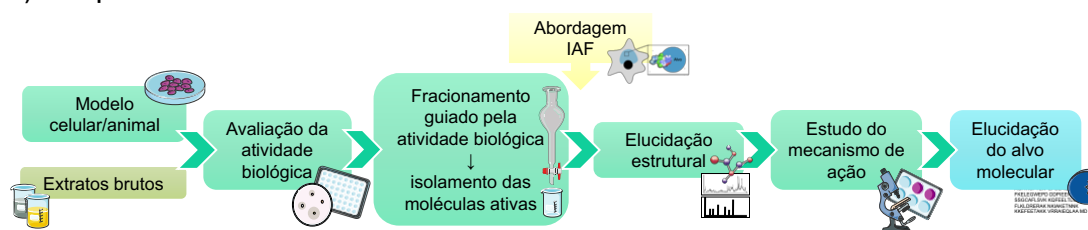
No caso particular da terapia anticâncer, o conhecimento do alvo molecular de uma substância é essencial para o processo de desenvolvimento do fármaco, visto que, por características inerentes à essa patologia (como a necessidade de tratamentos mais seletivos e a aquisição de resistência a medicamentos, por exemplo), o alvo de ação e as vias envolvidas em sua atividade podem ser decisivas para a escolha do tratamento (HOELDER; CLARKE; WORKMAN, 2012). Nesse contexto, a prospecção de novos fármacos anticâncer a partir de fontes naturais também pode ser realizada do ponto de vista do alvo molecular, usando-o como ponto de partida para a busca de moléculas que atuem sobre este. Nessa estratégia alvo-direcionada, os ensaios de triagem variam desde ensaios bioquímicos, que indicam a interação direta do produto natural com o alvo de interesse, assim como ensaios celulares, que indicam o envolvimento específico de um alvo, seja este uma proteína ou um gene. Ensaios de triagem computacionais também fazem parte desse tipo de abordagem, nos quais o alvo de interesse é testado frente a uma painel virtual

de pequenas moléculas a fim de se identificar moléculas com potencial de atuação sobre este alvo. Uma vez que uma molécula candidata é identificada, prossegue-se com o estudo dos efeitos, ou seja, do fenótipo, causado por esta molécula em modelos celulares (JUNG; KWON, 2015; MOFFAT; RUDOLPH; BAILEY, 2014).

Nesse âmbito, o ensaio de bioafinidade, também utilizado no presente trabalho, é um exemplo de abordagem alvo-direcionada, que foi desenvolvida a fim de identificar substâncias que atuem sobre alvos específicos, e que pode ser aplicado para validar alvos de importância terapêutica no câncer. Neste ensaio de bioafinidade, um alvo molecular de natureza proteica é ligado a uma resina com afinidade de ligação a proteínas, e, dessa forma, este complexo é utilizado para identificar substâncias ligantes em extratos complexos. Por meio de análises químicas de alta sensibilidade e resolução, as moléculas retidas podem ser identificadas e caracterizadas, a partir de seus sinais químicos de m/z (razão massa/carga) e perfil de fragmentação. A partir daí, segue-se com o isolamento dos ligantes guiado pelas respectivas m/z , e as etapas subsequentes envolvem a validação da interação (ligação) com o alvo-molecular e validação da atividade anticâncer em modelos biológicos (KANG et al., 2014; LAU et al., 2015a).

As estratégias de prospecção fenotípica e alvo-direcionada de moléculas com atividade anticâncer a partir fontes naturais estão ilustradas na figura 1.4. Nela também estão indicadas as etapas nas quais a abordagem IAF e o ensaio de bioafinidade podem ser utilizadas.

A) Fenotípica



B) Alvo-direcionada

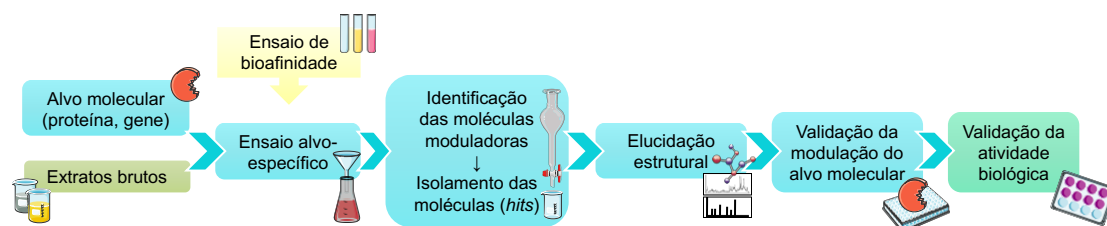


Figura 1.4. Estratégias de prospecção de produtos naturais anticâncer. Fonte: Elaborado pela autora.

No presente trabalho, realizou-se o estudo de produtos naturais de actinobactérias marinhas através de diferentes abordagens para a elucidação do alvo molecular de ação da substância já isolada (capítulo I) e para a prospecção alvo-direcionada de produtos naturais (capítulo II). O primeiro capítulo consistiu no estudo de elucidação do alvo molecular de ação da clorizidina A, isolada de *Streptomyces* sp., através da abordagem IAF, juntamente com a investigação da sua atividade citotóxica em células tumorais. O segundo capítulo consistiu na prospecção alvo-direcionada de substâncias ligantes das proteínas inibidoras da apoptose (IAPs), com potencial anticâncer, a partir de extratos de actinobactérias marinhas, através do ensaio de bioafinidade.

2. CAPÍTULO I

**A ABORDAGEM DE FLUORESCÊNCIA DE
IMUNOAFINIDADE (IAF) PARA A ELUCIDAÇÃO DO
ALVO MOLECULAR DE AÇÃO DA (-)-CLORIZIDINA A,
OBTIDA DE *Streptomyces* sp.**

2.1 INTRODUÇÃO

2.1.1 O gênero *Streptomyces*

O gênero *Streptomyces* é um gênero de actinobactérias surpreendentemente diverso, com cerca de 600 espécies, abundante nos ambientes terrestre e marinho. No solo, em particular, estas bactérias são os principais agentes da reciclagem de carbono, especialmente, a partir de detritos insolúveis de plantas e fungos. Ademais, as bactérias do gênero *Streptomyces* são responsáveis pela produção de grande parte dos antibióticos (antibacterianos) conhecidos hoje, além de outros metabólitos secundários com atividades antifúngica, antitumoral, antiviral, por exemplo; e enzimas de interesse médico e industrial (LABEDA et al., 2012; VENTURA et al., 2007).

O primeiro antibiótico de *Streptomyces* a ser descoberto foi a estreptomicina, em 1944, por Waksman e colaboradores, a partir da cultura de *Streptomyces griseus*. A estreptomicina foi o primeiro medicamento a ser utilizando no tratamento da tuberculose. Em 1952, Waksman foi agraciado com o premio Nobel de Fisiologia e Medicina por esta importante descoberta (PROCÓPIO et al., 2012; NOBELPRIZE.ORG, 1952). Outros antibacterianos aminoglicosídeos foram isolados a partir de outras espécies de *Streptomyces*, como por exemplo, a neomicina, a canamicina, a espectinomicina e a tobramicina, e são utilizados até hoje na clínica (MANIVASAGAN et al., 2013).

Dentre as espécies do gênero *Streptomyces*, o *S. coelicolor* A3(2) está entre as mais estudadas, também considerada como um “organismo modelo” para o estudo de processos de crescimento e desenvolvimento não só de actinobactérias, mas também aplicável a outros organismos multicelulares. Os estudos de mineração genômica do *S. coelicolor* A3(2) permitiram a identificação dos grupamentos gênicos (*clusters*) de biossíntese de vários antibióticos e a descoberta do papel regulatório dos antibióticos tanto na sua autorregulação, como na regulação cruzada, e na interação interespecífica em actinobactérias (CHATER, 2016; LIU et al., 2013; VAN DER MEIJ et al., 2017). Tais estudos abriram as portas para um vasto campo de descobertas a cerca do potencial biossintético dos demais gêneros de actinobactérias e, também, de outros micro-organismos.

A capacidade biossintética de diversas substâncias com atividade anticâncer por *Streptomyces* spp. também merece destaque. Dentre estes, muitos estão em uso na quimioterapia do câncer atualmente, e pertencem a diversas classes de compostos como antraciclinas (aclarrubicina, daunomicina, doxorrubicina), peptídeos (actinomicina D, bleomicina), ácidos aureólicos (mitramicina, cromomicinas A2 e A3), análogo de purina (pentostatina), enedinas (neocarzinostatina), mitomicinas e muitos outros. Os mecanismos de ação destes compostos incluem intercalação de DNA e indução de apoptose, permeabilização mitocondrial, inibição de enzimas-chave de vias de transdução de sinal e do metabolismo celular (AFTAB; ZECHEL; SAJID, 2015; OLANO; MÉNDEZ; SALAS, 2009).

Mais recentemente as pesquisas por novos fármacos anticâncer de *Streptomyces* sp. recuperados a partir fontes marinhas levaram a descoberta de inúmeras moléculas com diversas estruturas químicas. Dentre os compostos isolados de cepas recuperadas do sedimento marinho, estão as amosamidas (HUGHES et al. 2009), carboxamicina (Hohmann et al. 2009), boenamidas, estreptoclorina, estreptocordina e estreptopirrolisina.

2.1.2 A abordagem de fluorescência de imunoafinidade (IAF) na elucidação do alvo molecular de ação de produtos naturais

A marcação de fluorescência de imunoafinidade (IAF, do inglês, *immunoaffinity fluorescent*), ou abordagem IAF, foi desenvolvida por La Clair e colaboradores, ao longo da última década, com objetivo de permitir tanto a análise por imagem em células vivas como a elucidação do alvo molecular de produtos naturais através de uma única sonda (YU et al., 2010).

O desenvolvimento dessa técnica se iniciou com a identificação de uma molécula fluorescente que permitisse a marcação de vários produtos naturais. Inicialmente, Alexander e colaboradores (2006) padronizaram a marcação de produtos naturais obtidos de diferentes fontes com o derivado sintético fluorescente da cumarina, etil-7-dimetilaminocumarina-4-acetato (atualmente conhecido como “tag IAF”, aqui referido como “marcador IAF”). Além da fluorescência, esse derivado apresentou características que favoreceram sua

escolha como marcador IAF, como a ausência de atividade biológica, a rápida absorção pelas células (animais e vegetais), a não-localização no interior dessas células e a sua remoção após lavagem, a solubilidade em água, a fotoestabilidade, dentre outras.

Posteriormente, os autores desenvolveram um anticorpo específico para o marcador IAF, que permitisse a captura da sonda IAF do produto natural a partir de lisados celulares e a posterior identificação do(s) respectivo(s) alvo(s) molecular(es) IAF. Após a criação e a avaliação de um painel de anticorpos monoclonais quanto à seletividade e afinidade de ligação ao marcador IAF, e quanto à habilidade de identificar as proteínas marcadas em lisados celulares, o anticorpo XRI-TF35 foi escolhido para compor o chamado anticorpo anti-IAF (LA CLAIR; FENICAL; COSTA-LOTUFO, 2016; YU et al., 2010).

Este anticorpo anti-IAF pode ser acoplado a uma resina, para garantir um suporte sólido e permitir a separação do complexo “resina- anticorpo anti-IAF-sonda IAF-alvo molecular” do restante da mistura. Dessa forma, a marcação de um produto natural com o marcador IAF confere a este a propriedade de sonda bifuncional, ou seja, capaz de emitir fluorescência e de ser capturada através de imunoenaios utilizando o anticorpo anti-IAF XRI-TF35. A ilustração geral da abordagem IAF está apresentada na figura 2.1.

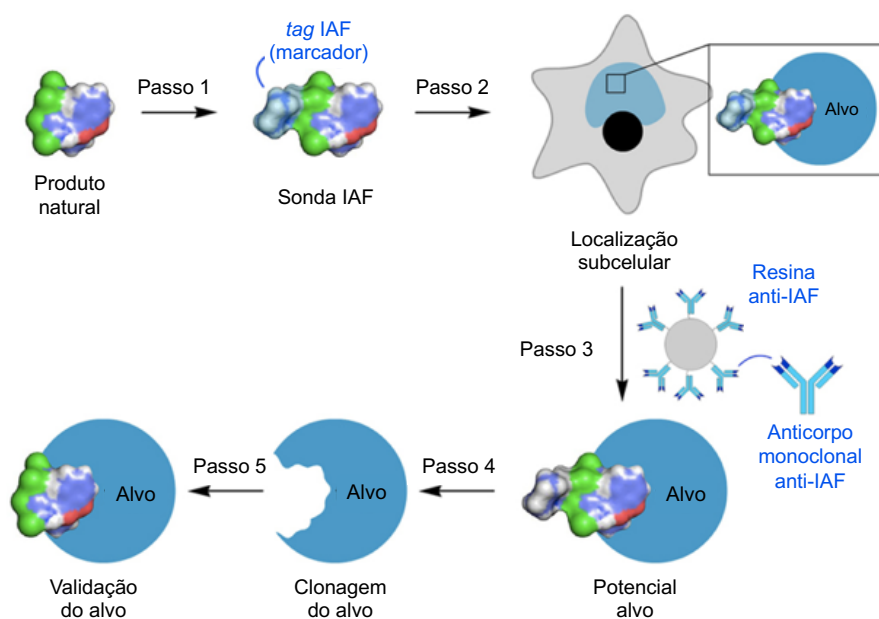


Figura 2.1. Esquema ilustrativo da abordagem por marcação de fluorescência de afinidade (IAF). Fonte: LA CLAIR, FENICAL, COSTA-LOTUFO, 2016.

A aplicação da abordagem IAF já permitiu a identificação do alvo molecular de alguns produtos naturais de micro-organismos marinhos, como as amosamidas (HUGHES et al., 2009b), os marinopirróis (HUGHES et al., 2009a) e a seriniquinona (TRZOSS et al., 2014).

O estudo do modo de ação das amosamidas, isoladas de uma cepa de *Streptomyces* sp. (CNR698) provinda do sedimento coletado nas ilhas Bahamas, foi o primeiro exemplo de aplicação desta abordagem bifuncional (Figura 2.2 A). Nesse trabalho, Hughes e colaboradores (2009) acoplaram o marcador IAF à amosamida B e puderam localizar e rastrear esta sonda IAF no citosol de várias células tumorais. Para os estudos de imunoafinidade, os autores estabeleceram um ensaio de imunoprecipitação (IP), utilizando o anticorpo anti-IAF XRI-TF35 acoplado a uma resina para capturar as biomoléculas ligadas a sonda IAF da amosamida B em lisados de células HeLa. Após a análise por eletroforese da fração imunoprecipitada, seguida de análise por CL-EM/EM, foi possível identificar a miosina como a principal proteína-alvo da amosamida B. A validação do alvo molecular da amosamida B foi realizada por meio da marcação da miosina II com a sonda IAF e da realização de ensaios através de microscopia confocal (HUGHES et al., 2009b).

A segunda abordagem IAF foi realizada no estudo dos marinopirróis isolados do cultivo de *Streptomyces* sp. (CNQ418), uma cepa estritamente marinha recuperada a partir do sedimento coletado na costa da Califórnia (Figura 2.2 B). Esse caso é um exemplo da extensão da aplicação da abordagem IAF no qual se utilizou um outro tipo de marcador IAF (com um grupamento acil fenol) que permitiu a sua transferência da sonda IAF do produto natural para a(s) respectiva(s) proteína(s)-alvo, mediante a ligação entre estes. Após a análise da fração imunoprecipitada com a sonda IAF do marinopirrol A, a partir do lisado de células HCT-116, a actina e a actinina foram identificadas como os prováveis alvos do marinopirrol A. Em seguida, a actina contendo o marcador IAF foi purificada da fração imunoprecipitada, e a análise por espectrometria de massas seguida de verificação manual, identificou a lisina K₁₁₅ como o resíduo para o qual o marcador IAF foi transferido. Mais além, a fluorescência natural da molécula de marinopirrol A foi aproveitada para a confirmação da co-localização da sonda IAF do marinopirrol A e do próprio produto natural marinopirróis (HUGHES et al., 2009a).

A elucidação do alvo molecular da seriniquinona, um produto natural isolado da cultura de uma rara bactéria marinha do gênero *Serinicoccus*, foi o terceiro exemplo na qual a abordagem IAF foi empregada (Figura 2.2 C). A fluorescência natural da seriniquinona possibilitou os estudos por microscopia confocal, nos quais foi identificado que esta, inicialmente, se concentrava no retículo endoplasmático de células HCT-116 e, em seguida, se acumulava em vesículas autofagossômicas. Os ensaios de imunoprecipitação com a sonda IAF da seriniquinona resultaram na obtenção de diversas proteínas candidatas à alvo molecular, sendo a HSP70 e GAPDH e a dermicidina, as mais abundantes no gel de eletroforese. No entanto, a análise por espectrometria de massas, seguida de validação por outras técnicas, mostraram que a dermicidina é o alvo molecular da serinoquinona. E o recrutamento das demais proteínas parece ser resultante da interação adicional com a própria dermicidina (TRZOSS et al., 2014).

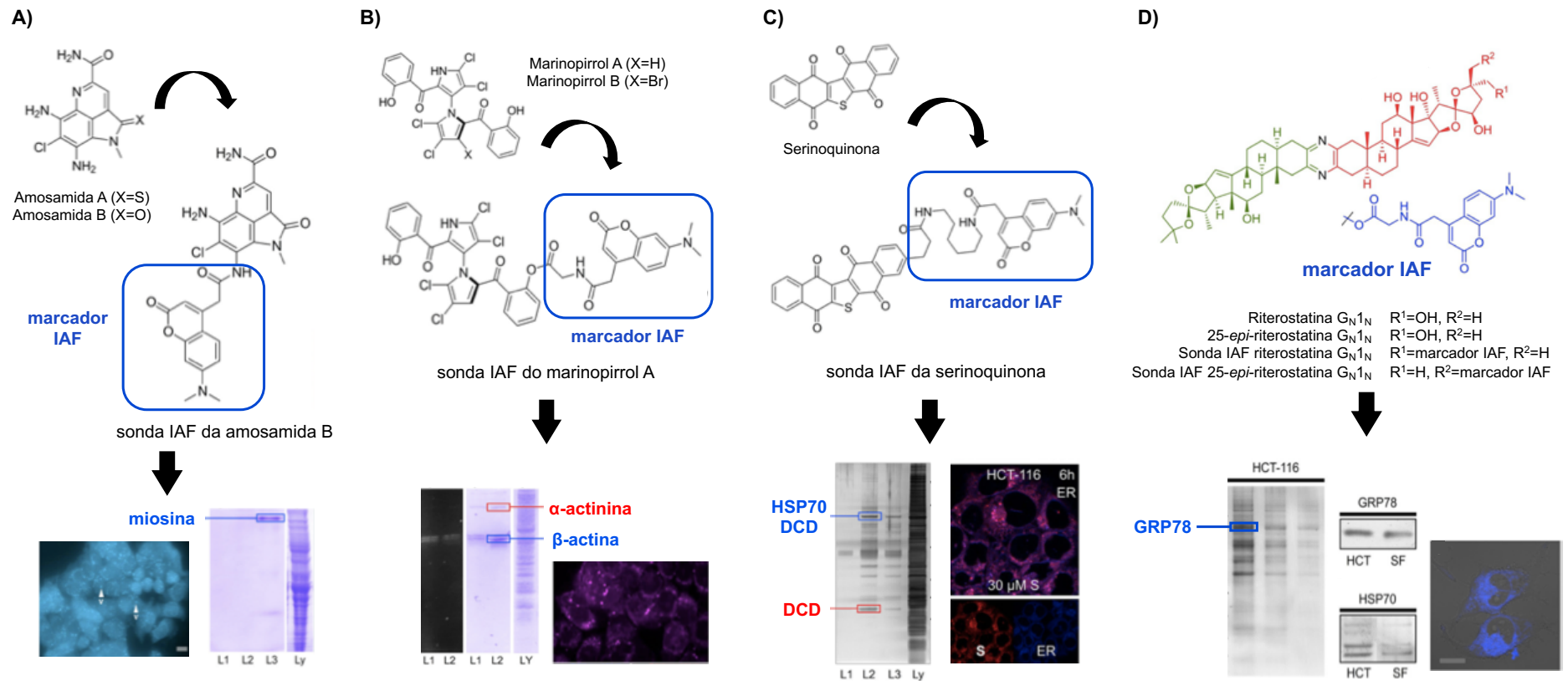


Figura 2.2. Exemplos de aplicação da abordagem IAF na elucidação do alvo molecular de produtos naturais marinhos. A) Miosina foi identificada como alvo molecular da amosamida B em células HCT-116 e a fluorescência da respectiva sonda IAF em células Hela. B) Actina foi identificada como alvo molecular do marinopirrol A e a fluorescência da respectiva sonda IAF, em células HCT-116. C) Dermicidina foi identificada como alvo da seriniquinona e a co-localização da respectiva sonda IAF no retículo endoplasmático, em células HCT-116. D) GRP78 foi identificada como alvo da riterostatina G_N1_N em células HCT-116, e a fluorescência da sonda IAF, em células SF298. Fonte: Elaborado a partir de HUGHES; MACMILLAN; *et al.*, 2009; HUGHES *et al.*, 2009; TRZOSS *et al.*, 2014; AMBROSE *et al.*, 2017; LA CLAIR, FENICAL, COSTA-LOTUFO, 2016.

Em outro estudo mais recente, o alvo molecular da riterostatina G_N1_N , um composto híbrido de cefalostatina-riterazina, foi elucidado a partir da síntese de sonda IAF (Figura 2.2 D). No estudo de microscopia confocal, as sondas IAF de dois isômeros C25 de riterostatina se concentraram no retículo endoplasmático de células HCT-116. Após os ensaios de imunoprecipitação e análise por espectrometria de massas, um conjunto de seis isoformas da HSP70 foram identificados como possíveis alvos de ambas as sondas, sendo a GRP78 (HSPA5), uma isoforma específica do retículo endoplasmático, a mais abundante nos géis de eletroforese. A ligação entre a riterostatina G_N1_N foi observada por ensaios de calorimetria de titulação isotérmica e a atividade citotóxica do composto foi correlacionada com a redução da expressão de GRP78 em células HCT-116. Mais além, a riterostatina G_N1_N induziu o aumento da expressão de proteínas-chave da via de estresse do retículo endoplasmático, indicando, elucidando assim o GRP78 como alvo molecular da riterostatina G_N1_N (AMBROSE et al., 2017).

Diante deste cenário, a abordagem IAF pode ser considerada uma abordagem integrativa de grande potencial na investigação do alvo molecular de ação de produtos naturais, conectando diferentes técnicas celulares, químicas e bioquímicas.

2.1.3 Clorizidina A de *Streptomyces* sp. (CNH287): o alcaloide híbrido de pirroloisondolona e diidropirrolizina inédito

Em 2013, Álvarez-Mico e colaboradores isolaram a clorizidina A a partir da cultura do *Streptomyces* sp. marinho (CNH287), uma cepa recuperada de sedimento coletado na costa de San Clemente, na Califórnia, EUA, e que apresentou cultivo dependente de água do mar. O fracionamento do extrato acetato da cepa foi guiado pela atividade citotóxica em células tumorais e levou ao isolamento uma substância citotóxica, a clorizidina A (ALVAREZ-MICO et al., 2013).

A clorizidina A apresentou algumas dificuldades durante o seu processo de purificação devido à degradação que a substância apresentou em soluções contendo solventes orgânicos ou aquosos a temperatura ambiente.

Uma menor degradação foi observada quando as soluções foram mantidas refrigeradas e secas sob corrente de gás nitrogênio. Apesar disso, as soluções estoques diluídas da clorizidina A puderam ser guardadas e preservadas com o mínimo de exposição à luz e ao ar (ALVAREZ-MICO et al., 2013).

Posteriormente, a elucidação estrutural da clorizidina A revelou a presença de um sistema de anéis de pirroloisondolona, 5*H*-pirrolo[2,1-*a*]isoindol-5-ona, que ainda não havia sido reportado em moléculas naturais. Este anel contém dois átomos de cloro e está conectado, em C-7, a um anel de diidropirrolizina, 2,3-di-hidro-1*H*-pirrolizina, também diclorado (figura 2.3). Mais além, a clorizidina A também apresentou atividade óptica de rotação levógira, ou seja, para a esquerda ($[\alpha]_D - 35$) (ALVAREZ-MICO et al., 2013).

Os autores também investigaram a relação estrutura-atividade da clorizidina, através da funcionalização dos carbonos C-6 e C-8. A metilação destes carbonos gerou um derivado bis-metílico que não apresentou atividade citotóxica frente a células HCT-116 ($CI_{50} > 50 \mu\text{M}$). Por outro lado, a acetilação resultou em derivado bis-acetato que apresentou um leve aumento da atividade citotóxica ($CI_{50} = 1,8 \pm 1,2 \mu\text{M}$) em relação a clorizidina ($CI_{50} = 4,0 \pm 0,9 \mu\text{M}$), e que também apresentou melhor estabilidade (ALVAREZ-MICO et al., 2013).

A clorizidina B foi o segundo composto isolado do extrato da cepa CNH287 no referido trabalho, e também se mostrou propensa a degradação (3, Figura 2.3). A estrutura da clorizidina B não apresentou o mesmo sistema de anéis de pirroloisondolona da clorizidina A, e os ensaios de citotoxicidade revelaram ausência de atividade. Análises adicionais demonstraram que a clorizidina B pode ser considerada um artefato do processo de cultivo da cepa, podendo ser produzido a partir da hidrólise e descarboxilação da carbonila em C-5, da clorizidina A. Posteriormente, a adição dos grupos benzilamida e cisteína-O-metil éster produzindo os derivados 4 e 5 (Figura 2.3) demonstraram que, de fato, a carbonila em C-5 está sujeita à substituição nucleofílica (reação na qual um espécie nucleófila, ou seja, com par não-compartilhado de elétrons, substitui uma espécie deficiente em elétrons de determinada molécula). Dessa forma, a amida C-5 do anel de nucleofílico pode ser considerada o grupamento chave para a atividade citotóxica da clorizidina (ALVAREZ-MICO et al., 2013).

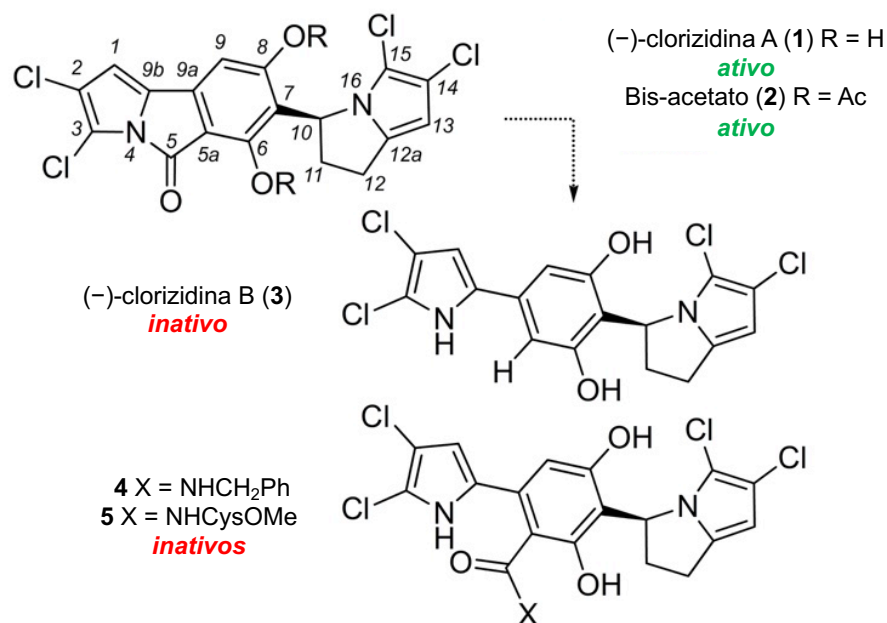


Figura 2.3. Estrutura da (-)-clorizidina A (1), (-)-clorizidina A bis-acetato (2), clorizidina B (3) e adutos 4 e 5. Conversão de 1 ao análogo inativo 3 surgiu de hidrólise seguida de descarboxilação. Além disso, os nucleófilos foram facilmente adicionados a 1 para gerados adutos, como 4 ou 5, que também exibiram perda de atividade citotóxica nas células HCT-116. Fonte: ÁLVAREZ-MICÓ *et al.*, 2013.

Nesse contexto, diante dos seus resultados prévios de estrutura-atividade e da sua estrutura química inédita, a clorizidina A foi eleita para melhor investigação da sua atividade biológica através da abordagem de fluorescência de imunoafinidade. Neste capítulo foi descrito o estudo realizado de forma colaborativa entre os grupos do Dr. James La Clair (*University of California in San Diego - UCSD*), Dr. William Fenical (*Scripps Institute of Oceanography, UCSD*), Dr. Eli Chapman (*University of Arizona*) juntamente com o nosso grupo de pesquisa, a fim de elucidar o alvo-molecular e o mecanismo de ação da clorizidina A. Os dados aqui apresentados foram publicados durante o doutorado no periódico *ChemBioChem* ao final de 2015 (Anexo VI) (ÁLVAREZ-MICÓ *et al.*, 2015).

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 Objetivo geral

- ✓ Identificar o(s) alvo(s) molecular(es) da (-)-clorizidina A e validar sua atividade citotóxica em células tumorais.

2.2.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar a atividade citotóxica da (-)-clorizidina A e de dois derivados semissintéticos: um derivado bis-acetato e um derivado acoplado a sonda de imunoafinidade fluorescente (sonda IAF) em células tumorais.
- ✓ Analisar a localização subcelular da (-)-clorizidina A em células tumorais.
- ✓ Detectar as possíveis proteínas-alvo da (-)-clorizidina A em lisados de células tumorais.
- ✓ Avaliar os efeitos da (-)-clorizidina A e do de bis-acetato na viabilidade e no ciclo celular de células HCT-116.
- ✓ Validar a ligação da (-)-clorizidina A à proteínas-alvo mais abundante.

2.3 MÉTODOS

2.3.1 Desenho Experimental

A figura 2.4 apresenta o desenho experimental seguido para o estudo do alvo e mecanismos de ação da molécula natural (-)-clorizidina A, onde estão esquematizadas todas as etapas deste trabalho.

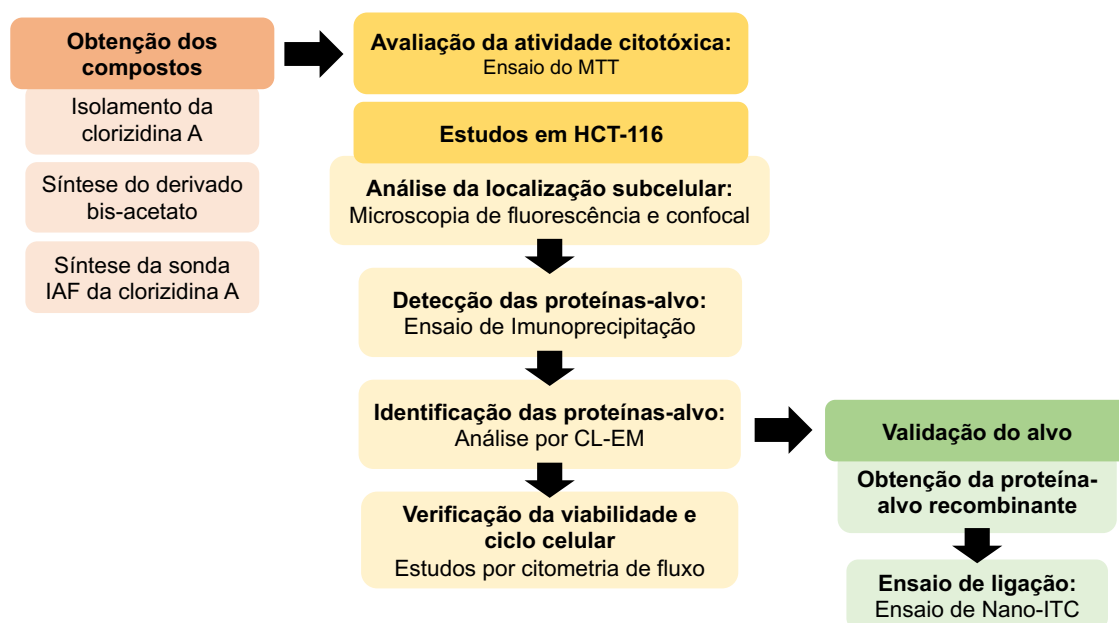


Figura 2.4. Desenho experimental.

2.3.2 Obtenção dos compostos

Os compostos estudados neste trabalho foram produzidos pelo laboratório do Dr. William Fenical, no Scripps Institution of Oceanography, UCSD, EUA.

A (-)-clorizidina A foi isolada a partir da cultura em larga escala da cepa de *Streptomyces* sp. (CNH287) como reportado no trabalho anterior (ALVAREZ-MICO et al., 2013). A cepa CNH287 foi cultivada em meio a base de água do mar (para 1 L de água do mar: 10 g de amido, 4 g de extrato de levedura, 2 g de peptona, 1 g de CaCO₃, 40 mg de Fe₂(SO₄)₃.4H₂O e 100 mg de KBr) sob 230 RPM de agitação a 27 °C. Após um dia de cultivo, a resina Amberlite XAD-

18 (20 g/L) estéril foi adicionada e a cultura permaneceu sob agitação com a resina por mais seis dias. Em seguida, a resina foi filtrada, lavada com água destilada e extraída com acetona. A acetona foi removida sob pressão reduzida e esse extrato foi reservado. A fração aquosa, por sua vez, foi extraída com acetato de etila (AcOEt) (3 x 400 mL), e o solvente foi removido em seguida. A combinação desses dois extratos rendeu um total de 1,7 g de extrato bruto. O extrato bruto foi fracionado por cromatografia em sílica gel sob um gradiente tipo *Step* de isooctano:AcOEt:MeOH. A fração contendo a (-)-clorizidina A (1:1 isooctano:AcOEt) foi submetida a novo fracionamento em coluna C18 sob vácuo utilizando gradiente tipo *Step* de CH₃CN:H₂O. As frações 4:1 e 9:1 CH₃CN:H₂O foram purificadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) de fase reversa para render a (-)-clorizidina A (**1**) (50 mg) (Figura 2.3), como uma película amarela.

O derivado bis-acetato da clorizidina A (**2**) foi sintetizado a partir da reação de acetilação da (-)-clorizidina A, utilizando anidrido acético e trietilamina, como descrito anteriormente (ALVAREZ-MICO et al., 2013).

A sonda fluorescente de imunoafinidade da (-)-clorizidina A (Sonda IAF, **3**) foi sintetizada através do acoplamento do marcador fluorescente de imunoafinidade (**4**, 7-dietilamino-4-cumarina acetamida) (ALEXANDER et al., 2006; YU et al., 2013) à (-)-clorizidina A (**1**) (como descrito no anexo II). O marcador IAF foi obtido como descrito anteriormente (Figura 2.3). A sonda IAF foi obtida como uma mistura de isômeros dos carbonos C-6 e C-8, revelado pela análise de Ressonância Nuclear Magnética (RMN) (ver anexo II) Além desta, um derivado éster metílico do marcador IAF (**5**) foi sintetizado para ser utilizado como controle negativo da sonda IAF.

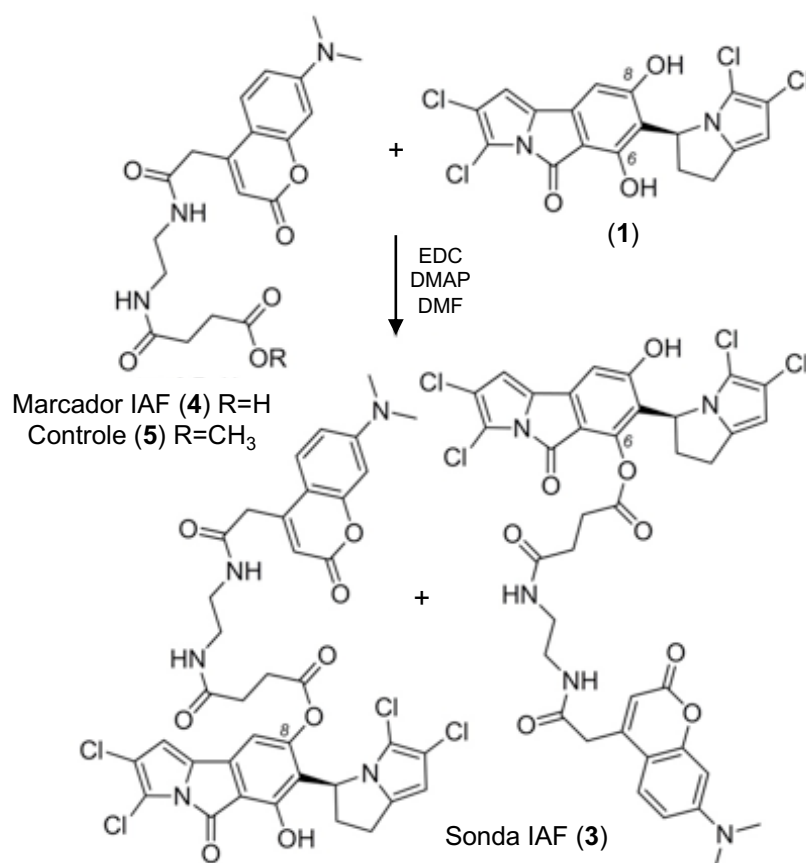


Figura 2.5. Síntese da sonda fluorescente de imunoafinidade (sonda IAF, **3**) pela esterificação da (-)-clorizidina A (**1**) com o marcador fluorescente de imunoafinidade (marcador IAF, **4**). O éster metílico (**5**) foi preparado como controle negativo para a sonda IAF. As análises de RMN de **3** sugeriram a presença de isômeros C-6 e C-8, uma vez que foram observados picos duplicados nas posições H9/C9 e H10/C10, e apenas sinais únicos foram observados em outras posições, como H1/C1 e H13/C13 (Anexo II).

2.3.3 Cultivo de células

As linhagens tumorais HCT-116 (carcinoma de cólon humano), PC-3M (carcinoma de próstata metastático humano) e SF-268 (glioma e astrocitoma humano) e a linhagem não-tumoral MRC-5 (fibroblasto de pulmão fetal humano) foram utilizadas nos experimentos de avaliação da atividade citotóxica. As células foram cultivadas em garrafas de cultura (75 cm²) utilizando o meio de cultura RPMI 1640 (Gibco) complementado com soro fetal bovino (10 %), glutamina (2 mM) e antibióticos (1 %, penicilina 100 U/mL e estreptomicina 100 µg/mL). Para os ensaios de sublocalização celular e imunoprecipitação, em que as células HCT-116 foram cultivadas em meio McCoy (Gibco), complementado com soro fetal bovino inativado (10 %) e antibióticos (1 %, penicilina 100 U/mL e

estreptomicina 100 µg/mL). As culturas foram manuseadas em câmaras de fluxo laminar vertical e mantidas em incubadora a 37 °C com atmosfera de CO₂ de 5 % e umidade de 95 %. O acompanhamento das culturas foi realizado com auxílio de microscópio óptico invertido e os repiques para meio de cultura novo foram feitos quando necessário. Para o desprendimento das células utilizou-se uma solução de tripsina-EDTA a 0,5 % (Gibco) diluída 10X em PBS (Gibco).

2.3.4 Ensaio do MTT

No ensaio do MTT a citotoxicidade da amostra testada é determinada de forma indireta, através da análise colorimétrica da atividade metabólica das células, que se baseia na redução do MTT, um sal de cor amarela, a formazan, um precipitado roxo, pelas enzimas mitocondriais das células viáveis (MOSMANN, 1983).

As células foram plaqueadas em multiplaca de 96 poços na concentração de 5×10^4 células/mL para serem aderidas, 24 h antes do teste. A (-)-clorizidina A e seus derivados foram diluídos em DMSO (Sigma) e testadas em concentrações seriadas (0,0064 a 10 µg/mL), em duplicata, com tempo de incubação de 72 h, a 37 °C e CO₂ 5 %. Três horas antes do término do tempo de incubação, o sobrenadante foi descartado e 150 µL da solução de MTT (Sigma) a 5 mg/mL em meio RPMI 1640 foi adicionado em todos os poços da placa, que foi incubada novamente por 3 h. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e o precipitado de cada poço foi ressuscitado em 150 µL de DMSO e agitado até sua completa dissolução, para leitura da absorbância em espectrofotômetro de placa no comprimento de onda de 595 nm.

Os experimentos foram analisados segundo suas médias e respectivos erros-padrão. Para determinação da concentração inibitória média capaz de provocar 50 % do efeito máximo (CI₅₀), foi realizada uma regressão não-linear a partir dos dados normalizados, resultando em um gráfico de absorbância × concentração e seus respectivos intervalos de confiança de 95 % (IC 95 %) obtidos no programa GraphPad Prism (versão 5.0).

2.3.5 Estudos por microscopia de fluorescência e confocal

A sonda IAF da (-)-clorizidina A foi utilizada para os estudos de absorção e de localização subcelular em células HCT-116, através de microscopia de fluorescência e microscopia confocal, respectivamente.

As células HCT-116 foram plaqueadas em uma densidade de 10^6 células/cm² em placas de 35 mm com lâmina de vidro ao fundo (MatTek Corporation). A (-)-clorizidina A, a sonda IAF e o controle negativo da sonda IAF foram diluídos em DMSO e dissolvidos em meio de cultura. Os compostos foram incubados com as células a partir de solução estoque concentrada 10X, ficando a concentração de DMSO final abaixo de 0,5 %.

Para o ensaio de absorção celular, as células foram tratadas com 10 μ M da sonda IAF e em seguida foi realizada a captura de imagens ao longo do tempo de 24 h, em microscópio de fluorescência que permitia a incubação simultânea das células a 37 °C e CO₂ 5 %. As imagens foram capturadas em intervalos de 5 a 10 min com 500 μ s de exposição, de modo que a fototoxicidade para as células ou fotobranqueamento da sonda fluorescente fossem mínimos.

Para o ensaio de localização subcelular, as células foram tratadas com 5 μ M da sonda IAF ou do respectivo controle negativo por 6 e 16h, em volume final de 1 mL de meio de cultura. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com 1 mL de meio de cultura sem a sonda IAF e as imagens foram obtidas em microscópio confocal LSM 710 (Carl Zeiss).

Para verificar o efeito da presença da (-)-clorizidina A na localização da sonda IAF, foram testadas duas condições: 1) as células foram pré-tratadas com a 25 μ M da (-)-clorizidina A por 1 h e em seguida, foram tratadas com 5 μ M do respectivo análogo fluorescente por 6h; 2) as células foram tratadas com 5 μ M do análogo fluorescente e posteriormente, foram tratadas com 25 μ M da (-)-clorizidina A por 1 h, antes da captura de imagens.

Para o estudo de co-localização, foi utilizado o corante LysoTracker Red DND-99, um corante fluorescente utilizado para marcação e rastreamento de vesículas ácidas, como lisossomos, em células vivas (SØRENSEN; NOVAK, 2001). Para isso, as células tratadas com 5 μ M da sonda IAF por 16 h, foram marcadas com 2,5 μ M do LysoTracker Red DND-99 (Life Technologies) por 15 min e, em seguida, procedeu-se a captura das imagens.

2.3.6 Ensaio de imunoprecipitação

A fim de identificar as possíveis proteínas-alvo da (-)-clorizidina A, realizou-se o ensaio de imunoprecipitação, que consiste na utilização da sonda IAF do produto natural e uma resina acoplada covalentemente ao anticorpo específico para o marcador IAF (anticorpo anti-IAF) (item 2.3.2). Nessa estratégia, o complexo resina-anticorpo anti-IAF é capaz de se ligar a sonda IAF, carregando consigo as proteínas que se ligaram ao produto natural, a partir do lisado das células tratadas com a sonda IAF. O protocolo utilizado foi adaptado de Trzoss et al. (2014).

A primeira etapa do experimento consiste na preparação dos lisados celulares. Para tal, as células HCT-116 foram tratadas com o 10 μ M da sonda IAF. Após 6h de incubação, as células foram desprendidas do fundo utilizando um raspador de células, centrifugadas a 300 RPM a 4 °C por 5 min e, em seguida, lavadas três vezes com 5 mL de PBS pH 7,2 a 4 °C. Então, as células foram lisadas passando a suspensão de células (500 μ L) em PBS 7,2 contendo coquetel de inibidores de proteases (Roche) através de uma agulha calibre 30. O lisado foi centrifugado a 13000 RPM a 4 °C por 5 min, para remoção de agregados e partículas insolúveis e, em seguida, foi concentrado a cerca de 1 mg/mL de proteínas totais, utilizando tubos contendo filtros de 9 kDa (iCON, Pierce Biotechnology).

Na segunda etapa, foi realizada a imunoprecipitação das proteínas a partir dos lisados obtidos, utilizando a resina Affigel 10 (Bio-rad) contendo 3,5 mg/mL do anticorpo anti-IAF, XRI-TF35 (Instituto de Pesquisa Xenobe). Os lisados celulares (400 μ L) foram incubados com o complexo resina-XRI-TF35 a 4 °C por 12 h sob agitação. Em seguida, a resina foi lavada três vezes com 2 mL de PBS a 4 °C. As proteínas ligadas foram eluídas da resina por meio de incubação com solução de ácido 7-dimetilamino-4-cumarina-acético a 1 mg/mL em tampão RIPA a temperatura ambiente por 1 h.

As proteínas eluídas foram analisadas por eletroforese em gel de poli-acrilamida-SDS (SDS-PAGE). As amostras foram aplicadas em gel pré-pronto NuPage 4-12% bis-tris (Novex) e a corrida foi realizada em tampão MOPS-SDS (Novex). Os géis foram corados como corante GelCode Blue

(Pierce). Por fim, as bandas detectadas no gel foram excisadas e digeridas para posterior análise por espectrometria de massas (item 2.3.7).

2.3.7 Identificação das proteínas-alvo

A análise de identificação das proteínas foi realizada no centro de Espectrometria de massas, Biomolecular e Proteômica, da Universidade da Califórnia San Diego, EUA.

2.3.7.1 Digestão das proteínas

Para que pudessem ser analisadas por espectrometria de massas, as proteínas-alvo contidas no gel foram digeridas em peptídeos. Para tal, as fatias de gel foram cortadas em pequenos cubos (1 mm × 1 mm) e descoradas por três lavagens sequenciais: primeiramente, adicionou-se 100 µL da solução de bicarbonato de amônio (100 mM) por 15 min, e em seguida adicionou-se 100 µL de acetonitrila por 15 min. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e as amostras foram secas em concentrador a vácuo Speedvac. As amostras de gel foram, então, reduzidas por incubação com 200 µL de solução de bicarbonato de amônio (100 mM) contendo DTT (10 mM) a 56 °C por 30 min. Após a incubação, o líquido foi removido e os pedaços de gel foram incubados com 200 µL de solução de bicarbonato de amônio contendo iodoacetamida (55 mM) no escuro por 20 min. O sobrenadante foi descartado e as amostras foram lavadas com solução de bicarbonato de amônio (100 mM) por 15 min, seguido de adição de acetonitrila para desidratação dos pedaços de gel. Após a remoção do líquido, as amostras foram secas em Speedvac.

Para digestão dos peptídeos, uma solução de tripsina (0,01 µg/µL) em bicarbonato de amônio (50 mM) a 4 °C, foi adicionada até cobrir os pedaços de gel e incubadas em gelo por 30 min. Após a reidratação completa, o excesso de tripsina foi removido e as amostras foram incubadas com nova solução de bicarbonato de amônio (50 mM) a 37 °C *overnight*. Para extração dos peptídeos, foi adicionado 50 µL de ácido fórmico (0,2 %) e acetonitrila (5 %) seguido de homogeneização das amostras em agitador vortex a temperatura ambiente por 30 min. Em seguida, o sobrenadante foi reservado e extração foi realizada

novamente. Ao final, os sobrenadantes foram reunidos e submetidos a análise por espectrometria de massas.

2.3.7.2 Análise por espectrometria de massas

As amostras digeridas foram analisadas diretamente por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial (CL-EM/EM) utilizando fonte de ionização por *electrospray* (QSTAR Elite híbrido Quad-TOF, AB/MDS Sciex). Para a cromatografia líquida de fase reversa em nanoescala foi utilizado um capilar de vidro (180 ID) de 10 cm empacotado com beads C18 Zorbax de 5 μm (Agilent). Os tampões utilizados foram: tampão A (H_2O 98%, CH_3CN 2%, ácido fórmico e TFC 0,005%) e tampão B (CH_3CN 100%, ácido fórmico 0,2 % e TFA 0,005%). Os peptídeos foram eluídos da coluna C-18 usando gradiente linear de 5-60% do tampão B ao longo de 60 min com fluxo de 400 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Os dados de EM/EM foram adquiridos de acordo os critérios de seleção dependente dos próprios conjunto de dados. Para isso, foram selecionados apenas os 4 picos mais intensos com estado de carga de 2 a 4, com mais de 20 contagens, excluindo-se os primeiros íons configurados para “360 segundos” e com tolerância mínima para exclusão da massa de 100 ppm. Os dados de tempo de vôo das massas foram adquiridos entre m/z 400 e 1.600 Da. Os dados de fragmentação da análise por EM/EM foram adquiridos de m/z 50 a 2.000 Da. A identificação dos peptídeos foi feita usando o algoritmo Paragon™ executado no programa Protein Pilot 2.0 (Life Technologies) (SHILOV et al., 2007).

2.3.8 Western Blot

O Western blot, também chamado de immunoblot, é um método bioquímico e molecular utilizado para detectar a expressão de uma determinada proteína em uma amostra, utilizando um anticorpo específico para a proteína de interesse. Neste estudo, esta metodologia foi utilizada para validar a presença das proteínas-alvo da sonda IAF (-)-clorizidina A, nas frações obtidas no ensaio de imunoprecipitação.

O procedimento de realização do ensaio do Western blot consiste em várias etapas: extração e quantificação de proteínas totais das células submetidas ao tratamento com o composto, separação das proteínas desnaturadas por peso molecular em eletroforese vertical em gel de poliacrilamida, eletrotransferência das proteínas para uma membrana capaz de ligar proteínas e a revelação de proteínas específicas por meio de sondas do anticorpo respectivo por um método colorimétrico que se baseia na reação da enzima fosfatase alcalina sobre o substrato NBT/BCIP, resultando em uma marcação de cor púrpura na membrana.

Os anticorpos primários utilizados neste experimento foram: ENO1, actina, GAPDH e HSP90 (ProSci). Os anticorpos secundários *anti-mouse* HRP, *anti-rabbit* HRP e *anti-goat* HRP ligados a fosfatase alcalina foram utilizados na detecção final das proteínas utilizando NBT/BCIP (Pierce). Todos os anticorpos foram diluídos de 1:5000 em tampão Tris-salino (TBS) contendo Tween (0,01 %) e leite em pó (5%).

2.3.9 Estudos por citometria de fluxo

A técnica de citometria de fluxo permite investigar e classificar inúmeras alterações e características de eventos biológicos em células ou outras partículas microscópicas. O 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 induzidos por cada célula. Os detectores são capazes de registrar desvios na dispersão linear (FSC, do inglês *Forward Scatter*) ou lateral (SSC, do inglês *Side Scatter*) da luz, além de captar a fluorescência emitida pelos marcadores utilizados, classificando cada célula ou partícula com um evento (GIVAN, 2004).

Para estes ensaios, as células HCT-116 foram plaqueadas em multiplaca de 24 poços na concentração de 5×10^4 células/mL para serem aderidas, 24 h antes do teste. A (-)-clorizidina A e seu derivado bis-acetato foram testados nas concentrações de 1 e 5 μM por 24 h. Como controles negativo e positivo dos experimentos foram utilizados DMSO 0,15% (v/v) e doxorubicina (Sigma) a 0,25 μM , respectivamente.

2.3.9.1 Verificação da viabilidade celular

Este ensaio baseia-se na intensidade de dispersão da luz incidente sobre as células e na capacidade do iodeto de propídeo (PI, do inglês, *Propidium Iodide*) se ligar ao DNA apenas das células cuja membrana plasmática esteja rompida, como nos casos de apoptose tardia e necrose, emitindo alta fluorescência vermelha quando excitado pelo *laser* azul (488 nm). As células cuja membrana permanece íntegra emite uma fluorescência mais baixa, permitindo a diferenciação entre células viáveis e não viáveis.

Após a incubação, as células foram coletadas usando 150 μ L tripsina-EDTA a 0,05%, a suspensão de células resultante foi centrifugada a 1500 RPM por 2 minutos e o pellet ressuspenso em 500 μ L de uma solução de PI (Sigma) a 5 mg/mL em PBS. Após 5 minutos de incubação no escuro, as amostras foram analisadas em citômetro de fluxo. Para cada replicata, cinco mil células foram adquiridas em uma região fechada (*gate*) do qual os fragmentos celulares e eventos duplicados foram excluídos da análise, seguido de obtenção do histograma no canal FL3 (excitação: λ_{\max} 488 nm; emissão: λ_{\max} 620 nm) em escala logarítmica, utilizando o programa BD Accuri™ C6 (versão 1.0.264.21).

Os dados foram analisados a partir da média e dos respectivos erros padrão das médias de 3 experimentos, realizados em duplicata. A ocorrência de diferenças significativas entre os grupos experimentais e controle negativo foi determinada através de análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Dunnet com nível de significância de 5% ($p < 0,05$), no programa GraphPad Prism (versão 5.0).

2.3.9.2 Avaliação do ciclo celular

Esse ensaio baseia-se na capacidade do PI se ligar ao DNA das células cujas membranas plasmáticas foram previamente rompidas, emitindo diferentes níveis de fluorescência vermelha quando excitado pelo *laser* azul (488 nm). Esses sinais permitem a predição da fase do ciclo celular em que uma célula se encontra (G_0/G_1 , S ou G_2/M), baseada no conteúdo de DNA que se apresenta (2n, 4n ou uma situação intermediária, respectivamente). Quando a intensidade de fluorescência emitida pelo PI mostra-se abaixo da referida para

uma célula diploide ($2n$), pode-se considerar a existência de cromatina condensada e/ou DNA fragmentado (sub-G₀/G₁), por outro lado, se a intensidade de fluorescência está além da característica de uma célula com DNA duplicado ($4n$), a ocorrência de células poliploides é presumível.

Após a incubação, as células foram coletadas usando 150 μ L tripsina-EDTA a 0,05%, a suspensão de células resultante foi centrifugada a 1500 RPM por 2 minutos e o pellet ressuspense em 500 μ L de uma solução de PI (Sigma) a 5 mg/mL em PBS, seguido de adição de 20 μ L de solução de Triton X-100 (0,1%) e citrato de sódio (0,1%). Após 30 minutos de incubação no escuro, as amostras foram analisadas em citômetro de fluxo. Para cada replicata, cinco mil células foram adquiridas em uma região fechada (*gate*) do qual os fragmentos celulares e eventos duplicados foram excluídos da análise, seguido de obtenção do histograma do ciclo celular no canal FL3 (excitação: λ_{\max} 488 nm; emissão: λ_{\max} 620 nm) em escala linear, utilizando o programa BD Accuri™ C6 (versão 1.0.264.21).

O perfil do ciclo celular foi analisado no programa no programa ModFit LT (versão 4.0) e os dados das percentagens de células em sub-G₀/G₁, G₀/G₁, S e G₂/M foram determinados a partir das médias e dos erros padrão das médias de 3 experimentos em duplicata. A ocorrência de diferenças significativas entre os grupos experimentais e controle negativo foi determinada através de análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Dunnet com nível de significância de 5% ($p < 0,05$), no programa GraphPad Prism (versão 5.0).

2.3.10 Ensaio de ligação por calorimetria de titulação nano-isotérmica (Nano-ITC)

A calorimetria de titulação isotérmica (ITC, do inglês *Isothermal titration calorimetry*) é uma técnica biofísica para determinar parâmetros termodinâmicos de interações bioquímicas, por meio da quantificação das trocas de calor ocorridas durante um evento de interação molecular. Considerando que trocas de calor ocorrem em quase todos os processos químicos e bioquímicos, essa técnica pode ser utilizada na análise de diversos tipos de interações moleculares, como, por exemplo, em estudos de ligação antígeno-anticorpo,

DNA-proteína, enzima-substrato, enzima-inibidor, proteína-proteína além de outras interações proteína-ligante (LADBURY; CHOWDHRY, 1996).

Em um experimento de ITC, determinado composto ligante é titulado, através de uma seringa, em uma solução contendo a proteína de interesse, incubada dentro da célula de amostra do calorímetro (figura 2.6). A partir de então, a extensão da ligação é determinada pela quantificação direta das trocas de calor, seja este gerado ou absorvido mediante a ligação entre a proteína e o composto ligante. A ITC é uma ferramenta experimental que permite a determinação da constante de dissociação (K_d), estequiometria da reação (n) e variação de entalpia (ΔH), em um único experimento.

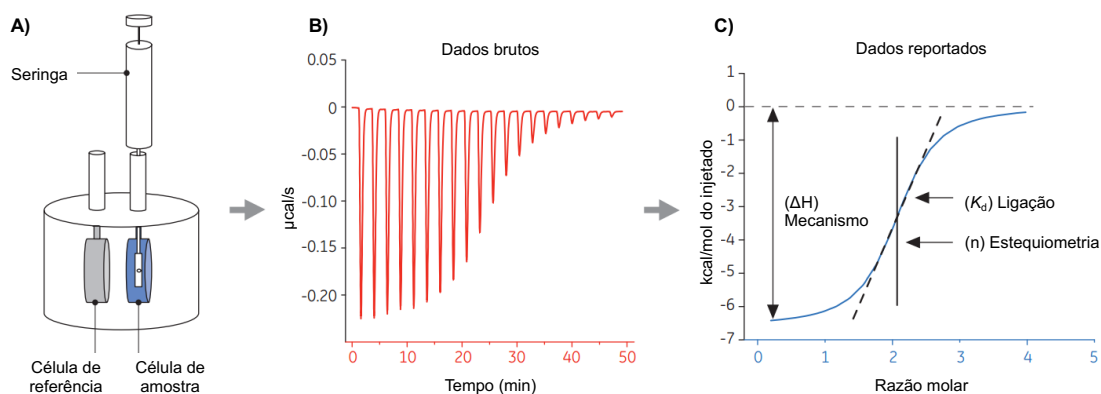


Figura 2.6. Ilustração do ensaio de ligação por ITC. A) Um ligante é titulado dentro da célula de amostra. B) Uma reação exotérmica libera calor e gera picos negativos. C) Os picos são integrados e apresentados em um gráfico de Wiseman. Fonte: <https://biophy.uchicago.edu/calorimetry.php>.

O estudo da interação da (-)-clorizidina A e da sonda IAF com a proteína enolase 1 (ENO1) foi realizado através de nano-ITC, que permite a utilização de pequenos volumes do composto. A proteína ENO1 recombinante (pET14b-ENO1) foi obtida através de expressão em células de *E. coli* BL21(DE3) e purificação por cromatografia de afinidade a íons metálicos (IMAC) (como descrito no anexo III). A produção da ENO1 e os experimentos de nano-ITC foram realizados pelo laboratório do Dr. Eli Chapman.

Inicialmente, uma solução contendo $8,75 \mu\text{M}$ de ENO1 em tampão de estoque (HEPES 20 mM, KCl 150 mM, MgCl_2 5 mM, glicerol 5%, β -mercaptoetanol 2 mM, pH 7,4) foi preparada. Em seguida, $300 \mu\text{L}$ dessa solução

foi degaseificada e aplicada na câmara do nano-ITC (TA instruments). Um total de 14-20 injeções sequenciais de (-)-clorizidina A ou da sonda IAF foram feitas a cada 200 s ao longo da janela de tempo de 3000 s. Os picos obtidos a partir da injeção inicial até 75 s após a última injeção foram integrados e ajustados ao modelo de ligação independente, usando o programa NanoAnalyse (TA instruments).

2.4 RESULTADOS

2.4.1 Atividade citotóxica da (-)-clorizidina A e seus derivados semissintéticos

A (-)-clorizidina A (**1**), o derivado bis-acetato (**2**) e a sonda fluorescente de imunoafinidade da (-)-clorizidina A (sonda IAF, **3**) foram avaliados quanto ao seu potencial citotóxico frente as linhagens tumorais HCT-116, PC-3M e SF-268, e à linhagem não-tumoral MRC-5, através do ensaio do MTT. Além destes, o composto controle negativo da sonda IAF fluorescente de imunoafinidade (**5**) também foi avaliado frente a linhagem HCT-116. A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo. Os valores de CI_{50} após 72 h de incubação estão apresentados na tabela 2.1.

Tabela 2.1. Atividade citotóxica da (-)-clorizidina A (**1**), derivado bis-acetato (**2**) e sonda fluorescente de imunoafinidade da (-)-clorizidina A (sonda IAF, **3**) frente a linhagens celulares HCT-116 (carcinoma de cólon humano), PC-3M (carcinoma de próstata metastático humano), SF-268 (glioma e astrocitoma humano) e MRC-5 (fibroblasto de pulmão fetal humano). Os compostos foram testados pelo ensaio do MTT após 72 h de incubação e os valores de CI_{50} (μ M) e respectivos intervalos de confiança de 95% (IC 95%) foram obtidos através de regressão não-linear, usando o programa GraphPad Prism 5.0. N. T.: não testado.

Composto	CI_{50} [μ M] (CI 95%)			
	HCT-116	PC-3M	SF-268	MRC-5
(-)-clorizidina A (1)	10,0 (3,2 - 33,6)	> 11	> 11	> 11
bis-acetato (2)	1,6 (1,1 - 2,2)	1,7 (1,0 - 3,0)	> 18	> 18
sonda IAF (3)	2,2 (0,8 - 6,0)	4,5 (3,3 - 6,2)	N. T.	> 11
Controle negativo da sonda IAF (5)	> 50	N. T.	N. T.	N. T.
Doxorrubicina	0,19 (0,08 - 0,42)	1,22 (0,31 - 4,71)	0,75 (0,55 - 1,04)	2,09 (0,58 - 7,6)

A (-)-clorizidina A apresentou moderada atividade citotóxica frente as células HCT-116 com CI_{50} de 10 μ M, enquanto nas demais linhagens, não apresentou citotoxicidade significativa mesmo na maior concentração testada (11 μ M). Já o derivado bis-acetato mostrou-se cerca de seis vezes mais potente frente as células HCT-116 (CI_{50} de 1,6 μ M) e também apresentou citotoxicidade

frente as células PC-3M com CI_{50} de 1,7 μ M. A sonda IAF também apresentou atividade citotóxica frente as células HCT-116 e PC-3M, com CI_{50} de 2,2 e 4,5 μ M, respectivamente. Já o controle negativo da sonda IAF não apresentou atividade frente a linhagem HCT-116 ($CI_{50} > 50 \mu$ M).

2.4.2 Localização subcelular da (-)-clorizidina A em células HCT-116

A sonda IAF da (-)-clorizidina A foi empregada nos estudos de localização subcelular em células HCT-116 se utilizando da propriedade fluorescente que o marcador IAF confere a molécula em estudo, uma vez acoplada a este. Inicialmente, a absorção da sonda IAF pelas células foi analisada através da incubação das células com 10 μ M do composto e simultânea captura de imagens por microscopia de fluorescência, ao longo de 24 h. Como pode ser observado na figura 2.7 A, a sonda IAF (fluorescência azul) entrou no citosol das células HCT-116, sendo nitidamente visualizada a partir de 1h de incubação, e lá permaneceu durante todo o curso temporal do experimento.

Para uma análise mais detalhada, estudos de microscopia confocal foram realizados após incubação com 5 μ M da sonda IAF ou do controle negativo por 6 e 16 h, seguido de lavagem com meio sem o composto antes da aquisição das imagens. Como observado na figura 2.7 B e C, a sonda IAF se localizou no citosol de células HCT-116 após 6 h de incubação. Após 16 h, a fluorescência da sonda IAF apresentou-se menos difusa, aparentemente concentrada em vesículas subcelulares. Por outro lado, as células tratadas com o controle negativo da sonda IAF (5) não apresentaram fluorescência detectável (inserções nas figuras 2.7 C e E).

A interferência da (-)-clorizidina A na fluorescência da sonda IAF também foi testada mediante pré- e pós-tratamento com 25 μ M (-)-clorizidina A por 1 h. A fluorescência da sonda IAF foi reduzida tanto pelo pré-tratamento (Figura 2.7 F) como pelo pós-tratamento (figura 2.7 G) com a (-)-clorizidina A, assim, indicando que a localização da fluorescência azul da sonda IAF está correlacionada com a atividade da (-)-clorizidina A.

Afim de investigar se sonda IAF estaria se acumulando em vesículas de natureza ácida, como lisossomos, foi utilizada a marcação com o corante

fluorescente LysoTracker red DND-99. A fluorescência vermelha do LysoTracker se co-localizou com a fluorescência azul da sonda IAF resultando na fluorescência magenta, como observado da figura 2.7 H.

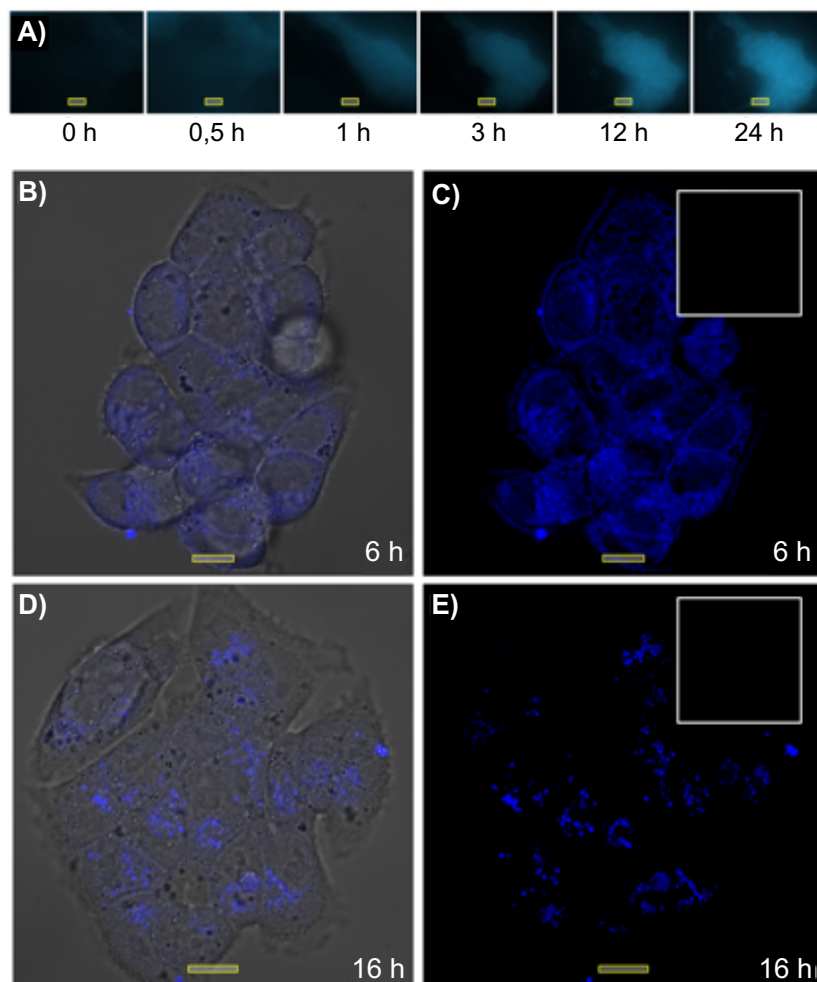


Figura 2.7. Localização subcelular da sonda IAF (**3**) em células HCT-116. A) Análise das células HCT-116 tratadas com 10 μM de **3** ao longo do tempo de 24 h, por meio de microscopia de fluorescência. Análise por microscopia confocal das células HCT-116 tratadas com 5 μM de **3** por 6 h (B, C) e 16 h (D, E), cada incubação seguida de lavagem com meio sem **3** antes da análise. Imagens com (B, D) e sem (C, E) sobreposição de campo de luz branca. Inserções em (C) e (E) representam a realização do mesmo experimento com o controle negativo da sonda IAF (**5**), demonstrando a sua completa remoção após a lavagem. Barras de escala: 10 μm . (Continua)

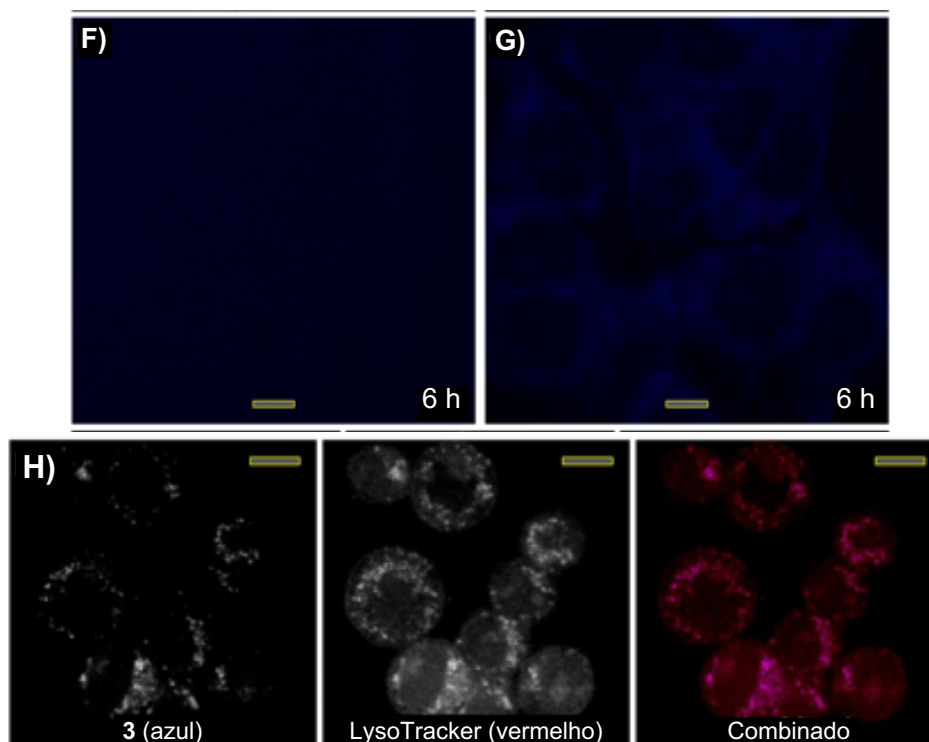


Figura 2.7. Localização subcelular da sonda IAF (**3**) em células HCT-116. F) Análise por microscopia confocal das células HCT-116 tratadas com 25 μM de (-)-clorizidina A (**1**) por 1 h antes do tratamento com 5 μM de **3** por 6 h. G) Análise por microscopia confocal das células HCT-116 tratadas com 5 μM de **3** por 6 h, seguido de tratamento com 25 μM de **1** por 1 h antes da análise. H) Análise por microscopia confocal das células HCT-116 tratadas com 5 μM de **3** por 16 h e, então, coradas com 2,5 μM de LysoTracker Red DND-99 por 15 min antes da análise. Os tons em magenta representam a sobreposição das imagens indicando a co-localização de **3** (azul) e do LysoTracker Red DND-99 (vermelho). Barras de escala: 10 μm .

2.4.3 Afinidade da sonda IAF da (-)-clorizidina A por alvos proteicos em células HCT-116

A investigação dos possíveis alvos proteicos da (-)-clorizidina A foi realizada através da técnica de imunoprecipitação, utilizando células HCT-116 tratadas com 10 μM da sonda IAF da (-)-clorizidina A por 6 h. Os lisados celulares obtidos foram submetidos ao ensaio de imunoprecipitação seguido de eletroforese em gel de poliacrilamida, resultando na obtenção de 4 bandas distintas (Figura 2.8, faixa F2). A banda mais intensa (banda 1) apresentou peso molecular de aproximadamente 48 kDa, seguida pela banda 2, com cerca de 28 kDa. As duas bandas menos intensas, banda 3 e banda 4, apresentaram aproximadamente 90 kDa e 45 kDa, respectivamente. O lisado celular tratado

com 50 μM do controle negativo da sonda IAF não apresentou bandas identificáveis (Figura 2.8, faixa F3).

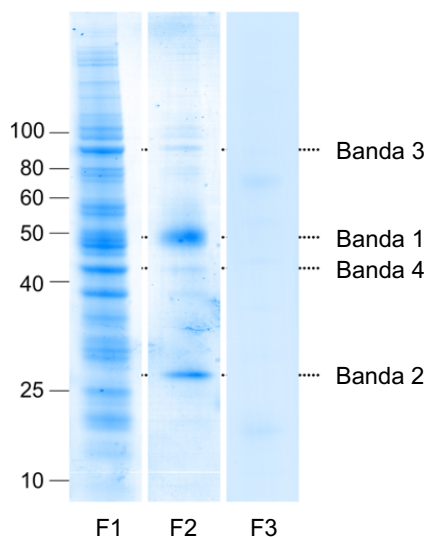


Figura 2.8. Análise de afinidade da sonda IAF (**3**). A) Fração imunoprecipitada (IP) a partir do lisado de células HCT-116 (1 mg/mL de proteínas totais) em PBS (pH 7,2) após tratamento com 10 μM de **3** por 6 h, apresentou quatro bandas distintas após coloração com GelCodeBlue. Faixas F1-3 correspondem ao lisado celular total (F1) e as frações IP com **3** (F2) e com o controle negativo da sonda IAF **5** (F3).

Para identificação das quatro bandas majoritárias detectadas na fração imunoprecipitada com a sonda IAF, as bandas foram excisadas do gel, digeridas com tripsina e analisadas diretamente por CL-EM/EM. A banda 1 foi identificada como enolase 1 (ENO1) com 12 consultas correspondentes (Figura 2.9 A). A banda 2 foi identificada como gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (Figura 2.9 B). Já as bandas 3 e 4 foram identificadas como proteína de choque térmico HSP90 e actina, respectivamente (Figuras 2.9 C e D).

A) Banda 1: ENO1 – 12 consultas correspondentes

MSILKIHAREIFDS**RGNPTVEVDLFTSKGLFRAAVPSGASTGIYEALERLD**NDKTRYMGK
 GVS KAVEHIN**KTIAPALVSK**LNVT EQEKIDKLMIEMDGTENKS**KFGANAILGVSLAVCK**
AGAVEKGVPLYRHIADLAGNSEVILPVPFNVINGGSHAGN**KLAMQEFMILPVGAANFRE**
AMRIGAEVYHNLKNVIKEYGKDATNVGDEGGFAPNILEN**KEGLELLKT**AIGKAGYTD**KV**
VIGMDVAASEFFRS**GKYDLDFKSPDDPSRYISPDQLADLYK**SFIKDYPVVSIEDPFDDDD
 WGAWQ**KFTASAGIQVVGDDLTVTNPK**RIAKAVNEKSCNCLLL**KVNQIGSVTESLQACKLA**
 QANGWGMVSHRSGETEDTFIADLVVGLCTGQIKTGAPCRSERLAKYNQLLRIEEELGSK
 AKFAGRNFNPLAK

B) Banda 2: GAPDH – 5 consultas correspondentes

MGKVKGVNGFGRIGRLVTRAAFNSGKVDIVAINDPFIDLNYMVYMFQYDSTHGKFGHTV
 KAENG**KLIVINGNPITIFQERD**PSKIKWGDAGAEYVVESTGVFTTMEKAGAHLLQGGA**KRVI**
ISAPSADAPMFVMGVNHEKYDNSLKIIISNACCTTNCLAPLAKVIHDFNGIVEGLMTTVHA
 ITATQKTVDGPGSKLWRD**RGALQNIIPASTGAAKA**VGKVIPELNGKLTGMFA**RVP**TANV
SVVDLTCRLEKPAKYDDIKKVVQASEGPLKGLGYTEHQVVSDFNSDTHSSTFDAGAG
 IALNDHFV**KLISWYDNEFGYSNR**VDLMAHMASKE

C) Banda 3: HSP90 – 12 consultas correspondentes

MPEEVHGGEEVETFAFQAEIAQLMSLIINTFYSNKEIFL**RELISNASDALDK**IRYESLT
 DPSKLDGKEL**KIDIIPNPQERTLT**LVDGTGIGMT**KADLNNLGTIAKS**GTKAFMEALQAG
 ADISMIGQFVGFYSAYLVAEKVVITKHNDDEQYAWESSAGGSFTVRADHGEPGRGK
 VILHL**KEDQTEYLEER**RVKEVVKHSQFIGYPITLYLEKEREKESDDEAEEEKGEKEEE
 DKDDEEKPIEDVGSDEEDDSGDKKKKTKKIKE**KYIDQEELNK**TKPIWTR**NPDDITQEE**
YGEFYKSLTNDWEDHLAVKHFSVEGQLE**FALLFIPRRAPFDLFENK**KKNNIKLYVRRV
 FIMDSCDELIPEYLNFI**RGVVDSEDLPLNISRE**MLQQSKILKVIRKNIIVKKCLLSELA
 EDKENYKFFYAFSKNLKLGIEDSTNRRRLSELLRYHTSQSGDEMTSLSEYVSRMKETQ
KSIYYITGESKEQVANS AFVERVRKRGFEVVMTEPIDEYCVQQLKEFDGKSLVSVT**KEG**
LELPEDEEEKKKMEESKAKFENLCKLMKEILDKKVEKVTISNRLVSSPCCIVTSTYGWTA
 NMERIMKAQALRDNSTMGYMMAKKHLEINPDHPIVETLRQKAEADKNDKAVKDLVLLFE
 TALLSSGFSLDPQTHSNRIYRMIKLGLGIDEVEAAEENAAVPDEIPPLEGDEEDASRM
 EEVD

D) Banda 4: actina – 7 consultas correspondentes

MDDIAALVVDNGSGMCKAGFAGDDAPRAVFPISIVGRPRHQGMVGMGQKDSYVGDQAQ
 KRGLTLKYPIEHGIVTNWDDMEKIWHHTFYNEL**RVAPEEHPVLLTEAPLNPK**ANREKMT
 QIMFETFNTPAMYVAIQAVLSLYASGRTTGIVMDSGDGVTHTVPIYEGYALPHAILRLDL
 AG**RDLTDYLMKILTERGYSFTT**TAER**EIVRDIKEKLCYVALDFEQEMATAASSSSLE****KSY**
ELPDGQVITIGNERFRCEALFQPSFLGMESCGIHETTFFNSIMKCDVDIR**KDLYANTVLS**
GGTTMYPGIADRM**QKEITALAPSTMKI**KIAPPERRKYSVWIGGSILASLSTFQQMWIS**KQ**
EYDESGPSIVHRKCF

Figura 2.9. Identificação das proteínas-alvo da sonda IAF. A)-D) Sequências de proteínas demonstrando os peptídeos obtidos (preenchimento em azul) para cada banda de proteínas imunoprecipitada na figura 2.8 A. Os resíduos em vermelho representam os sítios de clivagem. A análise foi realizada a partir dos dados de fragmentação das amostras digeridas, obtidos por EM/EM, utilizando o algoritmo Paragon™ executado no programa Protein Pilot 2.0.

Para validar a presença das proteínas identificadas, a fração imunoprecipitada com a sonda IAF foi analisada por western blot. A obtenção da banda correspondente a ENO1 apresentou um perfil concentração-dependente após incubação com 10 e 50 μM da sonda IAF por 6 h, como observado na figura 2.10 A. A presença das demais proteínas, GAPDH, HSP90 e actina, também foi validada por western blot utilizando maiores volumes da fração imunoprecipitada para melhor visualização das bandas (Figura 2.10 B). Nenhuma das bandas identificadas na fração imunoprecipitadas com a sonda IAF foi detectada na fração correspondente ao controle negativo da sonda IAF (50 μM) (Figura 2.10 A e B, faixa F3).

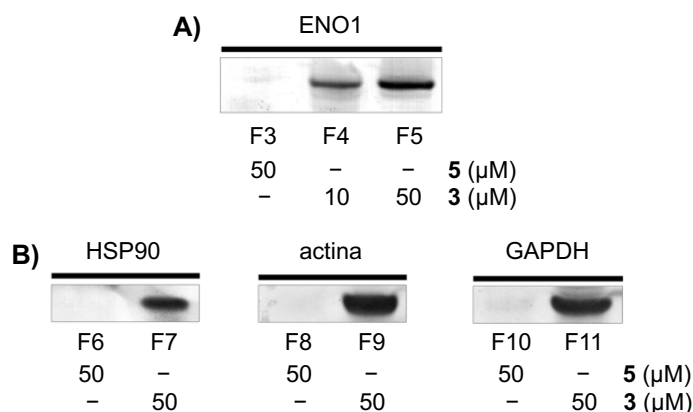


Figura 2.10. Análise por western blot das frações imunoprecipitadas. A) demonstrando a quantidade de ENO1 na fração IP de células HCT-116 com a sonda IAF (**3**) (10 e 50 μM) e com o controle **5** (50 μM) por 6 h. B) Análise por western blot demonstrando a presença de HSP90, actina e GAPDH na fração IP de células HCT-116 tratadas com **3** (50 μM) por 6 h. A fração IP foi aplicada em concentração 100 vezes maior em A e B, como mostrado pelo aumento da intensidade da banda.

2.4.4 Efeitos da (-)-clorizidina A e do derivado bis-acetato sobre a concentração de células, viabilidade e ciclo celular

A avaliação da concentração de células, viabilidade e ciclo celular de células HCT-116 tratadas com a (-)-clorizidina A ou seu derivado bis-acetato foi realizada através de citometria de fluxo utilizando marcação com iodeto de propídeo. Desse modo, as células foram tratadas com o veículo (controle negativo), doxorrubicina (0,25 μM) ou (-)-clorizidina A (1 μM e 5 μM) ou derivado bis-acetato (1 μM e 5 μM).

Os tratamentos com 1 e 5 μM da (-)-clorizidina A e 1 μM do derivado bis-acetato apresentaram uma redução na concentração de células após 24 h de incubação, porém apenas a concentração de 5 μM do derivado bis-acetato apresentou redução significativa em relação ao controle negativo (Figura 2.11 A). A doxorrubicina também causou redução significativa na concentração de células comparado ao controle negativo.

Quanto a viabilidade celular, ambos os tratamentos com 1 e 5 μM da (-)-clorizidina A não apresentaram efeitos sobre a porcentagem de células viáveis e não viáveis, em relação ao controle negativo. O derivado bis-acetato

também não causou efeito na concentração de 1 μM , contudo apresentou discreta redução na porcentagem células viáveis acompanhada de um aumento significativo no número de células não viáveis na concentração de 5 μM . A doxorrubicina apresentou leve aumento na porcentagem de células não viáveis, porém, este não foi significativo (Figura 2.11 B).

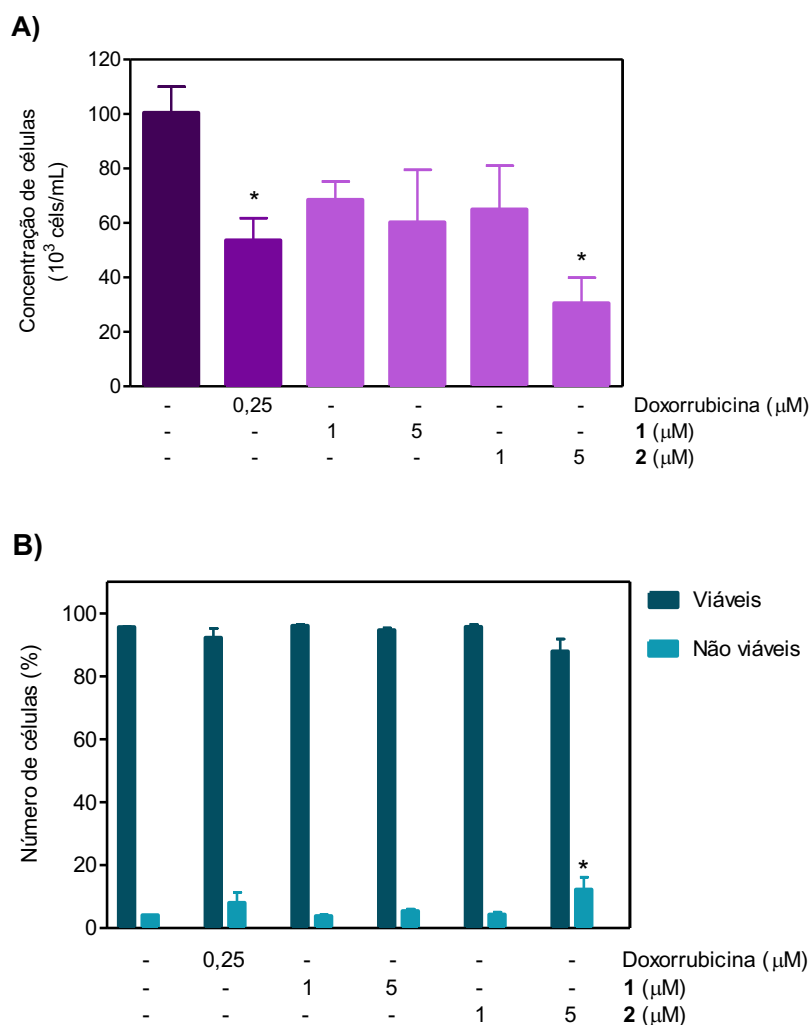


Figura 2.11. Análise da concentração e viabilidade celular. Concentração de células (A) e viabilidade celular (B) de células HCT-116 tratadas com 1,0 e 5,0 μM da (-)-clorizidina A (**1**) ou do derivado bis-acetato (**2**) por 24 h, através de citometria de fluxo utilizando marcação com iodeto de propídeo (PI). DMSO (0,15%) e doxorrubicina (0,25 μM) foram utilizados como controles negativo e positivo, respectivamente. Os dados apresentados correspondem à média \pm E.P.M. de 3 experimentos independentes, realizados em duplicata, com 5.000 eventos adquiridos por replicata. * $p < 0,05$ comparado ao controle negativo por ANOVA seguido por teste de Dunnet.

As alterações no perfil do ciclo celular de células HCT-116 tratadas com da (-)-clorizidina A ou com o derivado bis-acetato, puderam ser verificadas por meio da correlação direta entre a fluorescência emitida pelas células marcadas com iodeto de propídeo e o respectivo conteúdo de DNA nuclear. Como pode ser observado na figura 2.12 A, ambos os tratamentos com 1 e 5 μM da (-)-clorizidina A não causaram efeitos relevantes na distribuição das fases do ciclo celular, em relação ao controle negativo. Por outro lado, o derivado bis-acetato causou aumento significativo no número de células na fase G_0/G_1 e redução significativa no número de células na fase S, apenas na concentração de 5 μM . A doxorrubicina (0,25 μM), por sua vez, aumentou o número de células em G_2/M e reduziu o número de células na fase S, ambos de forma significativa em relação ao controle negativo. Quanto a fragmentação de DNA, o tratamento com 5 μM do derivado bis-acetato foi o único que apresentou um aumento na porcentagem de células com DNA fragmentado, porém, não foi significativo (Figura 2.12 B).

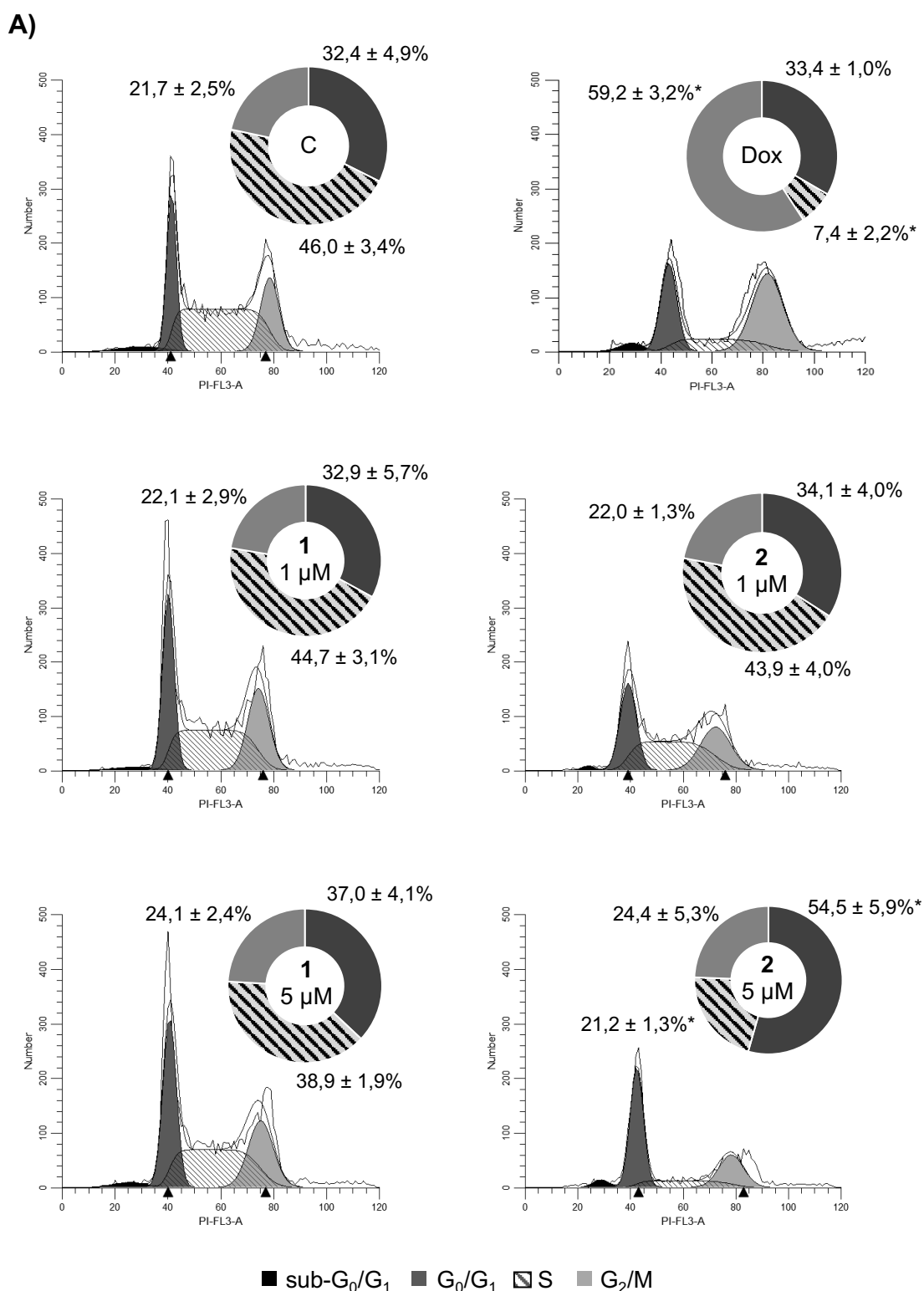


Figura 2.12. Efeitos sobre a distribuição das fases do ciclo celular (A) e na fragmentação internucleossomal (B) de células HCT-116 tratadas com 1,0 e 5,0 μM da (-)-clorizidina A (1) ou do derivado bis-acetato (2) por 24 h, através de citometria de fluxo utilizando marcação com iodeto de propídeo (PI). DMSO (0,15%) e doxorubicina (0,25 μM) foram utilizados como controles negativo e positivo, respectivamente. Os dados apresentados correspondem à média de 3 experimentos independentes, realizados em duplicata, com 5.000 eventos adquiridos por replicata. *p < 0,05 comparado ao controle negativo por ANOVA seguido por teste de Dunnet. (Continua)

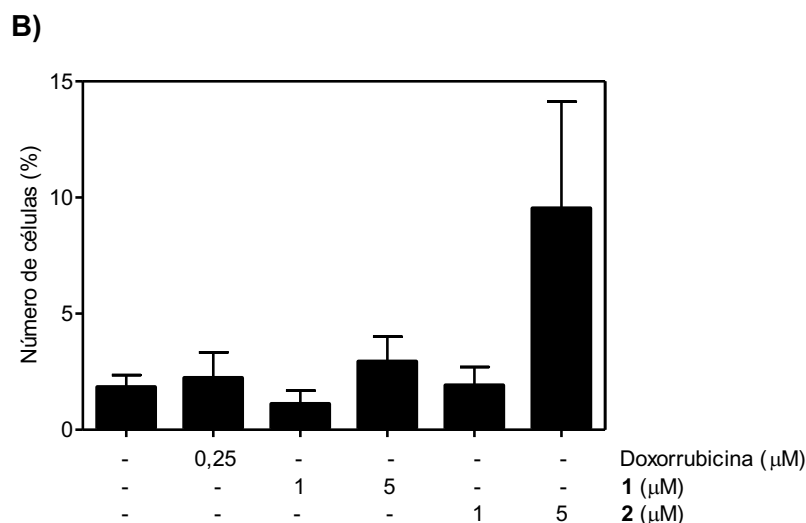


Figura 2.12. Efeitos sobre a distribuição das fases do ciclo celular (A) e na fragmentação internucleossomal (B) de células HCT-116 tratadas com 1,0 e 5,0 μM da (-)-clorizidina A (**1**) ou do derivado bis-acetato (**2**) por 24 h, através de citometria de fluxo utilizando marcação com iodeto de propídeo (PI). DMSO (0,15%) e doxorubicina (0,25 μM) foram utilizados como controles negativo e positivo, respectivamente. Os dados apresentados correspondem à média de 3 experimentos independentes, realizados em duplicata, com 5.000 eventos adquiridos por replicata. * $p < 0,05$ comparado ao controle negativo por ANOVA seguido por teste de Dunnet.

2.4.5 Análise da ligação com a proteína ENO1

A ENO1 foi identificada como a proteína mais abundante na fração imunoprecipitada a partir do lisado de células HCT-116 tratadas com a sonda IAF. Por essa razão, a ENO1 foi selecionada para a realização do estudo da interação com (-)-clorizidina A e a sonda IAF da (-)-clorizidina A. Para tanto, a ENO1 foi obtida de forma recombinante e utilizada nos ensaios de ligação por calorimetria de nano-titulação isotérmica (nano-ITC), pelo laboratório do Prof. Eli Chapman (Universidade do Arizona).

A ligação entre a ENO1 e (-)-clorizidina A revelou um K_d de $1,9 \pm 0,9$ μM e a estequiometria da ligação foi de 1,4-1,6 moléculas de (-)-clorizidina A para uma de ENO1 (Figura 2.13 A). Por sua vez, a sonda IAF a foi capaz de se ligar a ENO1 com K_d de $0,69 \pm 0,01$ μM e com estequiometria de 0,9-1,7 moléculas de sonda IAF por uma molécula de ENO1 (Figura 2.13 B). Em ambos os casos, a variação da entalpia (ΔH) da ligação entre os compostos e a ENO1 foi negativa (figura 2.13).

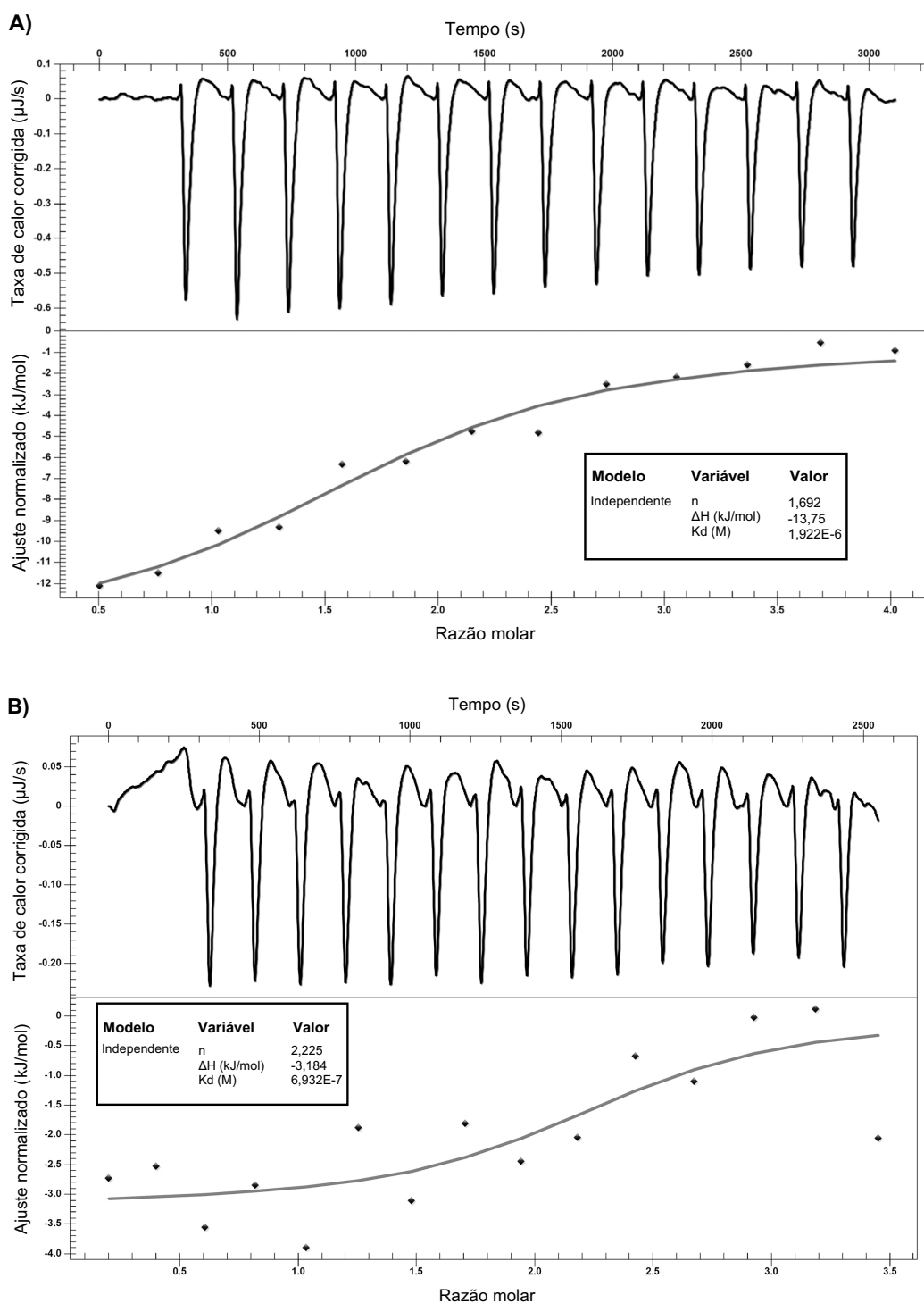


Figura 2.13. Análise da ligação da (-)-clorizidina A (**1**) ou da sonda IAF (**3**) com a proteína ENO1 recombinante por nano-ITC. A) Traço representativo da titulação de 100 μM de **1** em 8,75 μM de ENO1 em tampão contendo HEPES (20 mM), KCl (150 mM), MgCl_2 (5 mM), glicerol (5%), β -mercaptoetanol (2 mM), pH 7,4. B) Traço representativo da titulação de 85 μM de **3** em 8,75 μM de ENO1 no mesmo tampão. Os dados foram calculados a partir de um modelo de ligação independente usando o programa NanoAnalyze.

2.5 DISCUSSÃO

De modo geral, os compostos que possuem anéis heterocíclicos simples contendo nitrogênio, como o anel pirrólico, tem atraído considerável atenção devido as propriedades biológicas que estes apresentam, além da função como grupo farmacofórico que estes anéis nitrogenados desempenham (BHARDWAJ et al., 2015). Nos últimos anos, inúmeros produtos naturais com estruturas químicas únicas, contendo anéis pirrólicos, foram isolados a partir de diversas fontes terrestres e marinhas, inclusive actinobactérias (BLUNT et al., 2013; YOUNG; THORNTON; THOMPSON, 2010).

A clorizidina A é um alcaloide natural inédito que foi isolado a partir do fracionamento guiado pela atividade citotóxica do extrato do *Streptomyces* sp. (CNH-287), uma cepa recuperada do sedimento coletado na costa de San Clemente, na Califórnia, EUA. A estrutura química da clorizidina A é composta por anéis de pirroloisindolona e pirrolizina, ambos diclorados, que são características químicas raras em produtos naturais de origem bacteriana (ALVAREZ-MICO et al., 2013; MANTOVANI; MOORE, 2013).

Além do isolamento e elucidação estrutural da clorizidina A, Alvarez-Mico e colaboradores (2013) realizaram o estudo da relação estrutura-atividade do produto natural a partir da síntese de derivados fenólicos, dentre os quais o derivado bis-acetato se mostrou mais estável e levemente mais ativo, frente à células HCT-116, do que a clorizidina A (ALVAREZ-MICO et al., 2013).

O presente estudo visou a elucidação do alvo molecular da clorizidina A (**1**) e a investigação da sua atividade citotóxica, e do respectivo derivado bis-acetato (**2**), em células tumorais. A abordagem por marcação fluorescente de imunoafinidade (IAF) foi utilizada para a realização de experimentos celulares e análises biomoleculares a partir da síntese da sonda IAF da clorizidina A (**3**), a fim de identificar e validar o alvo molecular de ação do produto natural.

A sonda IAF da clorizidina A foi preparada por meio de método semi-sintético, no qual o marcador IAF (**4**), um derivado da cumarina, foi acoplado à molécula da clorizidina A, realizado pelo grupo do Dr. William Fenical e Dr. James La Clair, da Universidade da Califórnia San Diego. A obtenção da sonda IAF da clorizidina A como uma mistura de isômeros dos carbonos C-6 e C-8

revelou a ausência de seletividade na marcação dos grupamentos fenólicos da clorizidina A.

Similar ausência de seletividade foi observada para a marcação da napiradiomicina CNQ525.510B, na qual a reação de acoplamento ao marcador IAF gerou uma mistura de isômeros dos carbonos C-15 e C-17 da referida napiradiomicina. Os autores relataram que não foi possível separar estes regioisômeros da sonda IAF da napiradiomicina CNQ525.510B, apesar de inúmeras tentativas por meio de diferentes técnicas cromatográficas. Por outro lado, para a outra napiradiomicina estudada, a reação de acoplamento gerou a sonda IAF marcada apenas no carbono C-17 da napiradiomicina A80915C. Mais além, os experimentos em células tumorais com as sondas IAF de ambas as napiradiomicinas revelaram resultados semelhantes (FARNAES; LA CLAIR; FENICAL, 2014).

Na avaliação inicial da atividade citotóxica, a clorizidina A apresentou-se citotóxica frente as células HCT-116 (carcinoma de cólon), com CI_{50} de 10 μM , cerca 2,5 vezes maior do que o valor reportado no estudo anterior, cuja CI_{50} foi de 4 μM (ALVAREZ-MICO et al., 2013). O derivado bis-acetato da clorizidina apresentou-se mais citotóxico do que a clorizidina A frente as células HCT-116 e PC-3M (carcinoma de próstata metastático), com valores de CI_{50} similares para ambas as linhagens, 1,6 e 1,7 μM , respectivamente, que condizem com os resultados obtidos anteriormente para células HCT-116, cuja CI_{50} foi de 1,8 μM (ALVAREZ-MICO et al., 2013).

Ainda no trabalho de 2013, foi reportado que a avaliação da citotoxicidade do derivado bis-acetato frente ao painel de 60 linhagens do NCI, *National Cancer Institute* (NCI-60), revelou que o composto não apresentou seletividade marcante entre linhagens. No entanto, vale destacar que o derivado bis-acetato se apresentou citotóxico para as linhagens de melanomas SK-MEL-5 e SK-MEL-2, e de carcinoma de mama MDA-MB-231, com valores de CI_{50} de 3,6, 10,6 e 11,3 μM respectivamente. Para a linhagem HCT-116 do NCI-60, o valor de CI_{50} reportado foi de 16,8 μM (ALVAREZ-MICO et al., 2013).

A sonda IAF da clorizidina A também apresentou atividade citotóxica frente as células HCT-116 e PC-3M, com CI_{50} de 2,2 e 4,5 μM respectivamente (tabela 2.1). Portanto, a sonda IAF se mostrou como um composto bioativo, inclusive, relativamente mais ativo do que a clorizidina A, nas condições aqui

testadas. Vale ressaltar que o controle negativo da sonda IAF, o derivado éster metílico do marcador IAF (5), não demonstrou citotoxicidade frente as células HCT-116.

As sondas IAF de outros produtos naturais citotóxicos estudados através desta mesma abordagem, em geral mantiveram a atividade biológica apresentada pelo produto natural *per se*. De forma similar ao resultado para sonda IAF da clorizidina, as duas diferentes sondas IAF sintetizadas a partir da seriniquinona ($CI_{50} = 250$ e 240 nM) apresentaram aumento da atividade citotóxica em relação a seriniquinona ($CI_{50} = 0,99$ μ M) frente a células HCT-116 (TRZOSS et al., 2014). Noutro estudo, a sonda IAF da espirohexenolida A ($CI_{50} = 6$ μ M) apresentou-se mais ativa do que a espiroexenolida A ($CI_{50} = 21$ μ M) (YU et al., 2013). Em alguns casos, no entanto, a sonda IAF apresentou redução parcial da atividade citotóxica em relação ao produto natural, como ocorrido nos estudos da amosamida B (CI_{50} amosamida B = 320 nM; CI_{50} sonda IAF = 17 μ M) (HUGHES et al., 2009b).

A investigação do alvo molecular da clorizidina começou pela análise da absorção e da localização subcelular da sonda IAF em células HCT-116. Esta linhagem tumoral foi escolhida por ter sido a linhagem para qual todos os três compostos aqui estudado apresentaram-se citotóxicos, além de ser o modelo celular tumoral tradicionalmente utilizado nos estudos de produtos naturais marinhos com a abordagem IAF.

Os experimentos de microscopia de fluorescência e confocal confirmaram que a sonda IAF da clorizidina A foi absorvida pelas células HCT-116 partir de 1 h de incubação. Após se distribuir no citosol das células, a referida sonda IAF se concentrou em vesículas subcelulares e lá permaneceu por 24 h, mesmo após lavagem. Ao contrário, as células incubadas com o controle negativo da sonda IAF não apresentaram fluorescência, sugerindo que este foi removido pela lavagem. Mais além, a redução da fluorescência da sonda IAF da clorizidina A nas células co-tratadas com a clorizidina A, indica que a ocorrência de competição entre os compostos e a atuação através de mecanismo de ação em comum. Logo, estes dados tomados em conjunto, confirmam que a sonda IAF da clorizidina A representa, de fato, a ação desempenhada pelo produto natural. Mais além, a observação da co-localização da fluorescência da sonda IAF da clorizidina A (azul) com a fluorescência do corante LysoTracker Red

(vermelho), em tons de magenta, indica que sonda IAF da clorizidina A se localizou no interior de lisossomos em células HCT-116 após 16 h de incubação.

Compreender o tráfego e a localização subcelular de uma molécula, seja ela natural ou sintética, é uma parte integral da compreensão da sua função dentro da célula e do seu mecanismo de ação. Para tal, os ensaios de imagem de fluorescência utilizando modelos celulares se tornou o método mais utilizado no estudo da distribuição de compostos químicos (BEUZER; LA CLAIR; CANG, 2016; ZHENG et al., 2011).

O LysoTracker Red, um corante composto por uma amina fracamente básica que se acumula seletivamente em compartimentos celulares com baixo pH interno, é mais comumente utilizado como marcador de lisossomos, podendo também ser empregado na marcação de autofagossomos (PIERZYŃSKA-MACH; JANOWSKI; DOBRUCKI, 2014; SORENSEN; NØVAK, 2001). Os lisossomos são organelas membranosas envolvidas na digestão de macromoléculas, distinguidos por possuir um lúmen ácido (pH 4,0-6,0) e conter várias proteases específicas que são ativas nestas condições. A disfunção da estrutura ou função lisossômica está associada a diversas patologias, incluindo inflamação, câncer e doenças neurodegenerativas (CHEN et al., 2015).

Outros trabalhos com produtos naturais isolados de *Streptomyces* sp. marinhos, como a espirohexenolida A e a amosamida B, também apresentaram acúmulo em lisossomos por meio de metodologia similar a aplicada neste trabalho. A espirohexenolida A, uma molécula naturalmente fluorescente, se concentrou em vesículas ao redor do núcleo de células HCT-116, a partir de 6 h de incubação, e sua fluorescência se co-localizou com a do LysoTracker red (KANG et al., 2009). Enquanto que, para a amosamida B, foi através da sua respectiva sonda IAF, que se observou resultado similar também em células HCT-116, porém, a partir de 12 h de incubação (HUGHES et al., 2009b).

Através do ensaio de imunoprecipitação com células HCT-116, a sonda IAF da clorizidina A (10 μ M) retornou, consistentemente, quatro bandas majoritárias após 6 h de incubação. Após a digestão das bandas e análise dos peptídeos resultantes por espectrometria de massas, a identificação das proteínas através do algoritmo Paragon revelou que a primeira e a segunda banda mais intensa, com cerca de 48 e 28 kDa, correspondem as proteínas enolase 1 (ENO1) e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH),

respectivamente. As duas bandas menos intensas, de 90 e 45 kDa, foram identificadas como a proteína de choque térmico HSP90 e a actina, respectivamente. A presença destas proteínas na fração imunoprecipitada com a sonda IAF da clorizidina A foi validada por western blot. A proteína ENO1, em particular, apresentou perfil concentração-dependente. Dessa forma, considerando que nenhuma das quatro proteínas foi detectada nos ensaios de imunoprecipitação e western blot com o controle negativo da sonda IAF, estes dados confirmam que estas são as proteínas candidatas a alvo molecular da clorizidina A em células HCT-116.

Interessantemente, as duas proteínas mais abundantes na fração imunoprecipitada com a sonda IAF da clorizidina, ENO1 e GAPDH, são enzimas que atuam em reações próximas da via glicolítica (figura 2.14). A via glicolítica, ou glicólise, é uma via praticamente universal do catabolismo da glicose em plantas e animais, cuja função principal é produzir energia e compostos intermediários para outras vias metabólicas. Por meio da via glicolítica, uma molécula de glicose é degradada (oxidada) a duas moléculas de três átomos de carbono, o piruvato, através de uma série de dez reações catalisadas por enzimas que ocorrem no citosol das células. Parte da energia liberada durante as reações sequenciais da via glicolítica é conservada em forma de compostos de alta energia, a adenosina trifosfato (ATP) e o dinucleotídeo de nicotinamida-adenina reduzido (NADH) (FADAKA et al., 2017; NELSON, DAVID L.; M. COX, 2014).

A GAPDH catalisa a oxidação do gliceraldeído-3-fosfato a 1,3-bifosfoglicerato (**6** e **7**, respectivamente, figura 2.14) gerando uma molécula de NADH e um íon hidreto (H^+). Esta é a primeira reação de conservação de energia da glicólise. A enolase (ENO) é uma metaloenzima que catalisa a desidratação reversível do 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato (**9** e **10**, respectivamente, figura 2.14) (ALFAROUK et al., 2014; NELSON, DAVID L.; M. COX, 2014). A ENO1, enolase 1 (α -enolase ou enolase não neuronal), uma das três isoformas da enolase, é encontrada na maioria dos tecidos adultos em mamíferos. Além desta, a enolase 2 (γ -enolase ou enolase neuroespecífica) é encontrada em células neuronais e sistema neuroendócrino difuso, e a enolase 3 (β -enolase ou enolase músculo específica) é encontrada nos músculos esqueléticos e

cardíaco. Em mamíferos, cada uma das três isoenzimas é codificada por *loci* independentes (SUZUKI; UMEDA; KATO, 1980; VIZIN; KOS, 2015).

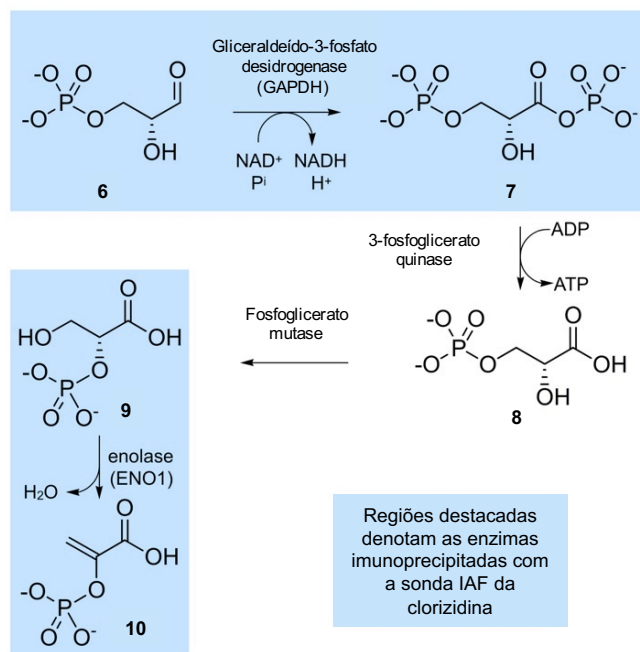


Figura 2.14. Passos 6-9 da glicólise da D-glicose, ressaltando a atuação de GAPDH (passo 6) e ENO1, as proteínas imunoprecipitadas mais abundantes no lisado de células HCT-116 utilizando a sonda IAF da clorizidina A. Fonte: ALVAREZ-MICO et al., 2015.

A obtenção de ENO1 e GAPDH nos ensaios de imunoprecipitação, após 6 h de incubação, está de acordo com o observado nos experimentos de microscopia confocal, cuja fluorescência da sonda IAF da clorizidina A apareceu difusa pelo citosol no mesmo tempo experimental (figura 2.7 B e C). Estes dados corroboram com o fato que ambas as proteínas, ENO1 e GAPDH, se localizam predominantemente no citosol de células de mamíferos (PAGLIARO; KERR; TAYLOR, 1989; VÖPEL; MAKHATADZE, 2012). Diante disto, estes dados fornecem evidências de que a clorizidina A possa atuar sobre as vias de sinalização reguladas por ambas as proteínas.

Em contrapartida, a identificação das proteínas HSP90 e actina, observadas em menores quantidades na fração imunoprecipitada com a sonda IAF da clorizidina A, pode ser devido a ocorrência de interação molecular adicional entre ENO1 ou GAPDH com estas proteínas. Existem evidências que GAPDH e ENO1, assim como outras enzimas glicolíticas, aldolase, piruvato-cinase e lactato-desidrogenase, são capazes de interagir com proteínas do

citoesqueleto, como os filamentos de actina (F-actina) e tubulina (DÍAZ-RAMOS et al., 2012; WALSH; KEITH; KNULL, 1989).

De forma alternativa, a obtenção de HSP90 e actina, duas proteínas abundantes em células de mamíferos, poderia ser resultado de ligação não específica com base na reatividade nucleofílica da carbonila C-5 da sonda IAF da clorizidina A.

No presente estudo, a caracterização dos efeitos da clorizidina A e do respectivo derivado bis-acetato em células HCT-116 foi realizada por meio de citometria de fluxo após 24 h de incubação. Uma redução da concentração de células foi observada nos tratamentos com 1 e 5 μM de ambos os compostos, juntamente com a ausência de efeitos distinguíveis na porcentagem de células viáveis, acompanhada do aumento significativo na porcentagem de célula viáveis apenas na concentração de 5 μM do derivado bis-acetato. Estes resultados indicam que, nas condições aqui testadas, a clorizidina A e o derivado bis-acetato causaram a inibição da proliferação celular ao invés de morte celular.

No estudo de Lew e Tolan (2012), o *knockdown* da GAPDH e ENO1, aldolase e triose-fosfato isomerase, com siRNA causou redução da taxa de proliferação celular em linhagem de fibroblastos 3T3 murino transformadas com Ras. A avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de exclusão de azul de Trypan revelou que não houve redução no número de células viáveis em relação ao controle negativo para nenhum dos quatro tratamentos com os respectivos siRNA, ao longo de 5 dias de transfecção. Diante disso, os autores inferiram que a redução na proliferação celular observada ocorreu devido a inibição da proliferação celular ao invés de morte celular (LEW; TOLAN, 2012).

Na análise do ciclo celular, a clorizidina A não demonstrou efeitos relevantes na distribuição das fases do ciclo celular, em ambos os tratamentos com 1 e 5 μM . O derivado bis-acetato causou aumento da porcentagem de células na fase G_0/G_1 acompanhado de redução da porcentagem de células na fase S, ambos estatisticamente significativos. Estes resultados estão de acordo com o fato que a inibição da via glicolítica causa parada do ciclo celular na fase G_1 em células tumorais (DANG; SEMENZA, 1999; SHIM et al., 1998). Mais além, é sabido que os níveis de glicólise são elevados durante a fase G_1 do ciclo celular (BAO et al., 2013).

Considerando a maior abundância da ENO1 em relação as outras quatro proteínas imunoprecipitadas, a ligação da ENO1 à clorizidina A e à respectiva sonda IAF foi validada por método biofísico, utilizando ensaio de calorimetria de titulação isotérmica (ITC) e a proteína ENO1 recombinante. Dessa forma, comprovou-se que ambas as moléculas testadas foram capazes de se ligar à ENO1 com valores de K_d de 1,9 e 0,69 μM , respectivamente.

A via glicolítica é reconhecida como um alvo primário para intervenção terapêutica do câncer, considerando que a maioria dos tumores invasivos apresentam modulações específicas no metabolismo celular. Dentre as alterações marcantes desempenhadas pelas células tumorais, está o favorecimento da realização da glicólise mesmo na presença de oxigênio, a chamada “glicólise aeróbia”, seguida de fermentação láctica. Este fenômeno primeiramente observado pelo bioquímico Otto Warburg, na década de 30, é conhecido como efeito Warburg (FADAKA et al., 2017; HANAHAN; WEINBERG, 2011). Desse modo, as células tumorais dependem da energia gerada durante a glicólise em detrimento da respiração mitocondrial, que é o processo gerador de energia majoritário nas células saudáveis. Apesar do baixo rendimento energético em relação à fosforilação oxidativa, quanto a quantidade de moléculas de ATPs formados, este redirecionamento metabólico aparentemente contraditório é compensado por mecanismos que garantem vantagens para a manutenção das altas taxas de proliferação.

Dentre esses mecanismos, estão o aumento da expressão de transportadores de glicose (GLUTs) e transportadores de monocarboxilatos (MCTs), que transportam lactato e piruvato, além do aumento da expressão das enzimas participantes de toda a cascata de reação envolvidas na conversão da glicose à lactato. Desse modo, as células tumorais se tornam mais resistentes aos estados de hipóxia temporários ou permanentes, aumentam o fornecimento de compostos intermediários para a síntese de nucleotídeos e aminoácidos, e aceleram a produção energética, em relação as células saudáveis (FADAKA et al., 2017; GANAPATHY-KANNIAPPAN; GESCHWIND, 2013; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

A dependência das altas taxas de glicólise pelas células tumorais pode ser atribuída à ocorrência de defeitos na respiração mitocondrial devido a mutações no DNA mitocondrial, também pode ser causada pela ativação de

oncogenes e/ou estímulos hipóxicos nos tecidos tumorais (CAREW et al., 2002; DANG; SEMENZA, 1999; RAMANATHAN; WANG; SCHREIBER, 2005).

Os indícios de que a dependência da reprogramação do metabolismo da glicose por parte das células tumorais poderia ser usado como intervenção terapêutica anticâncer, veio dos estudos de inibição da via glicolítica (NAGEL; SEMENOVA; BERNS, 2016). Várias enzimas da via glicolítica foram identificadas como alvo molecular de diversas moléculas inibidoras sintéticas e naturais. Dentre estas, a hexocinase, a fosfofrutocinase, a lactato-desidrogenase e o transportador de monocarboxilato 1 (MCT1) possuem moléculas inibidoras em fase de testes clínicos para o tratamento diferentes tipos de neoplasias, câncer de próstata, leucemia, câncer de faringe, além de outras patologias (GRANCHI; FANCELLI; MINUTOLO, 2014).

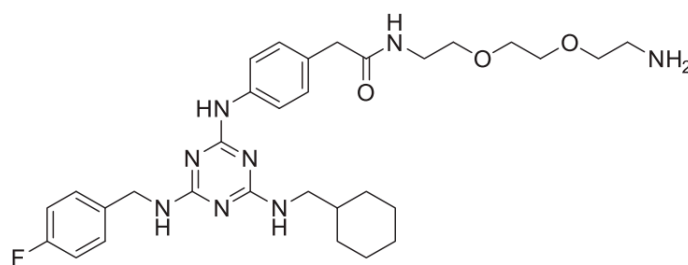
De fato, aumento da expressão genética de GAPDH e da sua função enzimática está associado com a proliferação celular e tumorigênese (GRANCHI; MINUTOLO, 2012; TANG et al., 2012). Estudos também apontam para o envolvimento de GAPDH no envelhecimento celular e senescência, e ainda na indução de apoptose em células tumorais (NICHOLLS et al., 2012). Diante disso, e apesar da expressão genética e proteica de GAPDH ser comumente utilizada como referência em experimentos, ainda se considera que as funções glicolíticas e não glicolíticas da GAPDH apresentam potencial valor terapêutico (COLELL; GREEN; RICCI, 2009; SCATENA et al., 2008; TRISTAN et al., 2011). No entanto, algumas moléculas inibidoras da GAPDH, como iodoacetato (IAA) e 3-bromopiruvato (3-BrPA), são mais consideradas como prova de conceito para a inibição de GAPDH e da via glicolítica do que necessariamente moléculas antitumorais de aplicação direta na clínica, devido a ausência de seletividade e toxicidade associada (SCATENA et al., 2008).

A superexpressão de ENO1 tem sido implicada na progressão tumoral em diferentes linhagens tumorais, como carcinoma de pulmão, carcinoma de mama e carcinoma de cabeça e pescoço (HENNIPMAN et al., 1988; WU et al., 2002; ZHANG; CILLEY; CHINOY, 2000). Em outro estudo, a superexpressão da ENO1 foi confirmada em amostras de tumores de pacientes com câncer de pulmão, e tal expressão foi associada como um potente fator prognóstico de sobrevivência destes pacientes (NAHM et al., 2006). Assim como a GAPDH, a enolase também apresenta atividade extra metabólicas. A ENO1 também pode

ser translocada para a membrana celular de monócitos (WYGRECKA et al., 2009), bem como em células tumorais de mama e câncer de pulmão (CHANG et al., 2006), onde atua como receptor de plasminogênio, promovendo a ativação do plasminogênio em plasmina, uma serina-protease envolvida na degradação da matriz extracelular. Dessa forma, ENO1 pode contribuir para o processo de invasão tecidual e metástase pelas células tumorais (CAPPELLO et al., 2017; CERUTI et al., 2013).

Em 2013, Jung e colaboradores identificaram a triazina AP-III-a4, batizada de ENOblock (figura 2.15), a partir de uma triagem de uma biblioteca de triazinas sintéticas desenhada para encontrar agentes citotóxicos sob condições de hipóxia, utilizando células HCT-116. Ao confirmar a ligação do ENOblock à enolase através de cromatografia de afinidade utilizando o lisado celular, além da banda relativa a enolase, os autores também identificaram uma banda relativa a actina. A actina, no entanto, foi descartada com alvo do ENOblock devido ao resultado negativo no ensaio de polimerização da actina (JUNG et al., 2013).

O ENOblock é o primeiro inibidor não análogo de substrato que se liga diretamente a ENO1 e inibe sua atividade, reduzindo a viabilidade celular sob condições de hipóxia. Sob condições normais de oxigênio, o ENOblock reduziu a invasão e migração celular *in vitro* e *in vivo*, sem induzir citotoxicidade em células HCT-116. Mais além, ENOblock potencializou a atividade citotóxica causada pelo taxol e vincristina, fármacos que interferem com a dinâmica de microtúbulos (JUNG et al., 2013).



ENOblock

Figura 2.15. Estrutura da triazina AP-III-a4 (ENOblock). Fonte: GRANCHI; FANCELLI; MINUTOLO, 2014.

Portanto, a inibição da via glicolítica, incluindo a inibição da ENO1 e GAPDH, pode ser considerada uma estratégia válida para sensibilização das

células tumorais a diferentes agentes tumorais, assim aumentando a eficácia e a seletividade em direção aos tumores (GRANCHI; FANCELLI; MINUTOLO, 2014). Diante do exposto, os resultados aqui apresentados sugerem uma possível aplicação bioquímica da clorizidina A, ou de um análogo mais adequado, para o estudo mais aprofundadas funções de ENO1 e GAPDH e da sua relação como desenvolvimento e progressão tumoral. Mais ainda, este trabalho reforça que a marcação de fluorescência de imunoafinidade é uma estratégia adequada para a elucidação do alvo molecular de produtos naturais marinhos.

2.6 CONCLUSÕES

A clorizidina A isolada de *Streptomyces* sp. apresenta moderada citotoxicidade frente à linhagem HCT-116. Os respectivos derivados semissintéticos, o derivado bis-acetato e a sonda IAF, possuem maior potencial citotóxico do que a clorizidina A frente as linhagens tumorais HCT-116 e PC-3M.

A sonda IAF da clorizidina A possui propriedade fluorescente e viabiliza sua captura por meio de imunoafinidade, que permitiram inferir a localização subcelular da clorizidina A e a identificação das suas proteínas-alvo. Nos ensaios com células HCT-116, a sonda IAF da clorizidina A se localiza, inicialmente, dispersa no citosol e, posteriormente, concentrada em lisossomos. As proteínas enolase 1, GAPDH, HSP90 e actina estão entre as proteínas candidatas a alvo molecular da clorizidina A, sendo a enolase 1, a mais abundante dentre estas e considerada a proteína-alvo mais provável da clorizidina A em lisados de células HCT-116. Mais além, a clorizidina A e a respectiva sonda IAF apresentam potencial de ligação à enolase 1 recombinante.

Nos estudos por citometria de fluxo, a clorizidina A e o derivado bis-acetato reduzem o número de células com poucos efeitos sobre o percentual de células não viáveis. Mais além, a clorizidina A não causa alterações relevantes na distribuição das fases do ciclo celular, enquanto que o derivado bis-acetato induz aumento significativo no número de células na fase G₀/G₁, redução no número de células na fase S e aumento na porcentagem de DNA fragmentado, apenas na maior concentração testada.

3. CAPÍTULO II

PROSPECÇÃO ALVO-DIRECIONADA DE PRODUTOS NATURAIS MARINHOS MODULADORES DAS PROTEÍNAS INIBIDORAS DA APOPTOSE (IAPs)

3.1 INTRODUÇÃO

3.1.1 Apoptose como alvo de terapia anticâncer

A evasão à apoptose, uma forma de morte celular programada, é uma das características das células tumorais, ao lado da autossuficiência de sinais de crescimento e resistência a sinais antiproliferativos (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Esse tipo de morte celular ocorre ao longo da vida em quase todos os tecidos, como parte do desenvolvimento normal do organismo, e também em processos patogênicos (POON et al., 2014). Sendo assim, a apoptose pode ser vista como uma importante barreira para o desenvolvimento do câncer (PLATI; BUCUR; KHOSRAVI-FAR, 2011).

Morfologicamente, a apoptose é marcada por um padrão de alterações que incluem encolhimento celular, condensação da cromatina, fragmentação internucleossomal e formação de prolongamentos, ou "blebs", de membrana. Ao final do processo, há a formação dos chamados corpos apoptóticos, que são reconhecidos e fagocitados por macrófagos, não desencadeando, portanto, uma resposta inflamatória fisiológica (KEPP et al., 2011; LAUBER et al., 2012).

A apoptose é precisamente executada através de proteases específicas, como as caspases. As caspases podem ser divididas em dois grupos, sendo as iniciadoras (caspases-2, -8, -9, -10), ativadas mediante estímulo apoptótico; e as efetoras (caspases-3, -6, -7), ativadas pelas próprias caspases iniciadoras e que medeiam a clivagem de outros substratos, levando à morte celular (KEPP et al., 2011; OUYANG et al., 2012).

As cascatas apoptóticas podem ser induzidas por duas vias de sinalização: a via extrínseca, ou do receptor de morte celular, e a via intrínseca, ou mitocondrial (figura 3.1). A via extrínseca é desencadeada pela ligação de TNF e Fas-L aos seus respectivos receptores de membrana, TNF-R1 e Fas, culminando na ativação da caspase-8/-10, que, por sua vez, ativam caspase-3/-6/-7 (KEPP et al., 2011; OUYANG et al., 2012).

A via intrínseca é marcada pela despolarização da membrana externa da mitocôndria e a liberação de várias proteínas, como o citocromo c, do espaço intermembrana mitocondrial para o citosol da célula (evento decisivo de ativação

dessa via), levando à ativação da caspase-9, seguida da ativação da caspase-3 (KEPP et al., 2011; OUYANG et al., 2012). Além do citocromo c, a liberação de Smac/DIABLO (Segundo ativador mitocondrial de caspase/ Proteína de Ligação-IAP Direta com baixo pI) no citosol também é sinal para ativação intrínseca da apoptose (ADRAIN; CREAGH; MARTIN, 2001; SCHIMMER, 2004).

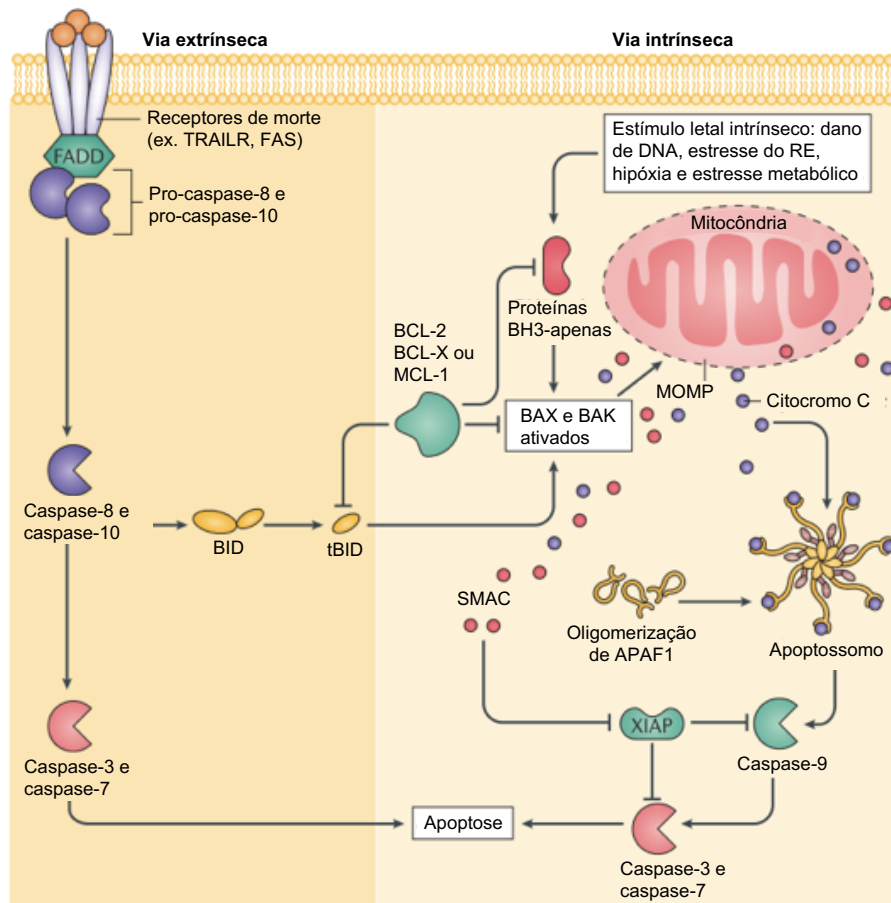


Figura 3.1. Desenho esquemático das vias indutoras de apoptose Fonte: Adaptado de ICHIM; TAIT, 2016.

Na condição de independência de crescimento, multiplicação e de amolde tecidual, as células tumorais enfrentam intenso estresse e dependem fortemente das aberrações nas vias de sinalização da apoptose para se manterem viáveis. Assim, quimioterápicos capazes de restaurar a sensibilidade à apoptose em células tumorais podem ser efetivos na terapia do câncer e, portanto, despertam o interesse na pesquisa de novos fármacos antineoplásicos (FERNALD; KUOKAWA, 2013; FLYGARE et al., 2012).

De fato, a ação de vários agentes citotóxicos, independente dos seus mecanismos primários, assim como a radioterapia, convergem para a indução de apoptose (OLIVER; VALLETTE, 2005). Por trás da resistência a essas terapias está a ocorrência de mutações que afetam genes efetores específicos de controle e regulação da sinalização apoptótica, como o silenciamento epigenético de caspase 8, a diminuição da expressão de proteínas pró-apoptóticas BAX e Apaf-1, assim como o aumento da regulação das proteínas anti-apoptóticas das famílias do Bcl-2 e das proteínas inibidoras de apoptose (IAPs) (WONG et al., 2010).

Desse modo, evidencia-se a importância da avaliação dos componentes da via apoptótica na susceptibilidade das células neoplásicas à morte celular por apoptose. A princípio, todos esses componentes podem ser alvos para o desenvolvimento de quimioresistência e, portanto, podem se tornar também objetos de estudo na busca do entendimento desse mecanismo e de estratégias terapêuticas alternativas (OLIVER; VALLETTE, 2005).

3.1.2 IAPs: Proteínas inibidoras da apoptose

As proteínas inibidoras da apoptose (IAPs) foram primariamente conhecidas por inibirem a atividade das caspases efetoras, direta ou indiretamente, protegendo a célula da morte por apoptose. Essa família de proteínas pode ser considerada como potencial alvo molecular de terapias antitumorais direcionadas à apoptose. Posteriormente, diversas outras funções foram atribuídas as IAPs, dentre elas a regulação de outras vias de sobrevivência celular, do ciclo celular e da migração celular (GYRD-HANSEN; MEIER, 2010; OWENS et al., 2013; PLATI; BUCUR; KHOSRAVI-FAR, 2011; SCHIMMER, 2004).

Os genes das primeiras IAPs foram descobertos pela por Crook e colaboradores (1993), no genoma de baculovirus (vírus que infectam artrópodes), como parte de um estudo que procurou identificar genes anti-apoptóticos fundamentais para a replicação viral. Os pesquisadores identificaram um gene, responsável pela codificação de uma proteína de 31 kDa, que quando expressa mimetizava as ações da p53 (proteína supressora tumoral)

prevenindo a morte celular por apoptose do hospedeiro, mediante a infecção viral (CROOK; CLEM; MILLER, 1993; FULDA; VUCIC, 2012). Posteriormente, outras IAPs homólogas foram identificadas em leveduras, nematoides, insetos e em várias espécies de mamíferos, incluindo os humanos (DEVERAUX; REED, 1999; WANG; LIN, 2013).

Estruturalmente, os membros da família das IAPs são caracterizados pela presença de pelo menos um domínio BIR (do inglês, *baculovirus IAP repeat*), que contém cerca de 80 resíduos de aminoácidos e abriga um íon Zn^{2+} ao centro. O domínio BIR tem uma estrutura conservada e medeia as interações proteína-proteína, sendo essencial para a função antiapoptótica das IAPs. No entanto, estudos estruturais mostram evidências de que nem todo domínio BIR é capaz de inibir a apoptose (BUDHIDARMO; DAY, 2015; DEVERAUX; REED, 1999; LOPEZ; MEIER, 2010).

A família das IAPs humanas é composta por oito proteínas: NAIP (BIRC1), cIAP1 (BIRC2), cIAP2 (BIRC3), XIAP (BIRC4), survivina (BIRC5), Apollon/Bruce (BIRC6), livina/ML-IAP (BIRC7) e ILP-2 (BIRC8). As IAPs humanas contêm de um a três domínios BIR, tipicamente arranjados na sua porção proteica N-terminal (figura 3.2) (BUDHIDARMO; DAY, 2015; DEVERAUX; REED, 1999; LOPEZ; MEIER, 2010).

As IAPs também podem conter um domínio RING na porção C-terminal, o qual confere atividade semelhante de ubiquitina ligase (E3), favorecendo a ligação da ubiquitina (ubiquitinação) a si mesmas e a outras proteínas, mediante interação com uma enzima conjuradora de ubiquitina (E2). Juntamente com a enzima ativadora de ubiquitina (E1), as enzimas E2 e E3, atuam na via de proteolítica da ubiquitina-proteassomo, pela qual as proteínas marcadas pelo processo de ubiquitinação são encaminhadas para degradação através do proteassomo (BUDHIDARMO; DAY, 2015; MACFARLANE et al., 2002).

Um domínio de ligação a ubiquitina chamado UBA (do inglês, *ubiquitin-associated*) também está presente em algumas IAPs. O domínio UBA é capaz de se ligar a cadeias de mono- e poli-ubiquitina de proteínas em complexos proteicos, permitindo assim a modulação de vias de sinalização pelas IAPs (BUDHIDARMO; DAY, 2015).

A cIAP1 e cIAP2 ainda apresentam um domínio CARD (do inglês, *caspase activation recruitment domain*), que provavelmente medeia interações proteína-proteína, porém sua função real ainda é pouco clara. E, além destes, a survivina possui um domínio em α -hélice, ou CC (do inglês, *Coiled Coil*), necessário para interação com outras proteínas reguladora da mitose (LACASSE et al., 2008).

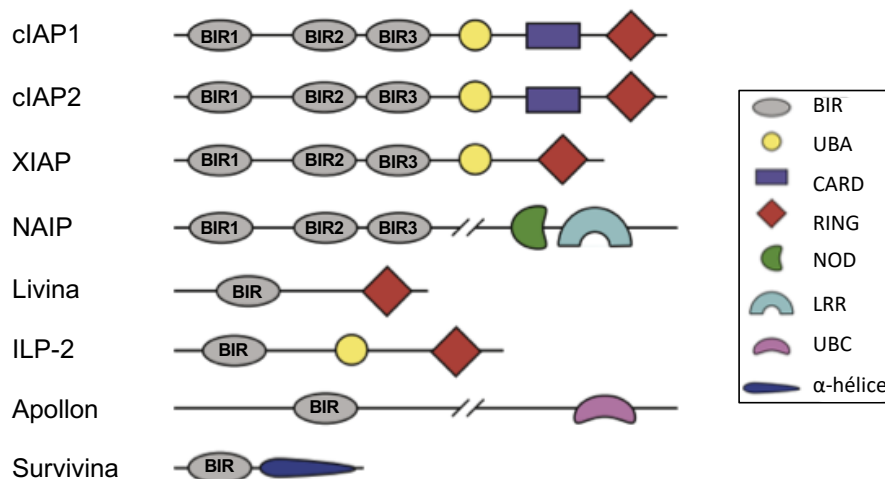


Figura 3.2. As oito IAPs humanas e seus domínios estruturais. Fonte: adaptado de BUDHIDARMO; DAY, 2015; LACASSE et al., 2008.

Dentre as IAPs, cIAP1, cIAP2, XIAP, survivina e livina, estão diretamente envolvidas na regulação da apoptose, mas também podem regular a sobrevivência celular por outros meios, tais como o controle do ciclo celular, migração e inflamação (DE ALMAGRO; VUCIC, 2012).

Nesse contexto, diversos estudos têm correlacionado a desregulação ou disfunção das IAPs com a ocorrência de condições patológicas como tumorigênese, doenças autoimunes e neurodegenerativas. De fato, as IAPs são frequentemente superexpressas em diversos tipos de tumores, bem como várias linhagens tumorais, o que atrai atenção para estas proteínas como potenciais alvos terapêuticos (LACASSE et al., 2008; WANG; LIN, 2013).

A XIAP é uma das IAPs mais estudadas, que comprovadamente se liga e inibe as caspases efetoras -3, -7 e -9. O domínio BIR2 da XIAP e o link entre o domínio BIR1 e BIR2, interagem com a porção N-terminal das caspase -3 e -7, inibindo-as, enquanto o domínio BIR3 se liga ao monômero da caspase 9

impedindo sua dimerização e, assim, sua ativação. Smac/DIABLO é um antagonista endógeno das IAPs, que pode se ligar aos domínios BIR2 e BIR3 da XIAP, e simultaneamente evitar que a XIAP se ligue e iniba as caspases efetoras (BERTHELET; DUBREZ, 2013; DE ALMAGRO; VUCIC, 2012).

A cIAP1 e cIAP2 são reguladores críticos de ambas as vias de sinalização do NF- κ B. cIAP1/2 ativam a via clássica, ou canônica, através da poliubiquitinação de RIP1, causando o aumento da expressão de proteínas de sobrevivência celular, como c-FLIP. Por outro lado, na via alternativa, ou não canônica, cIAP1/2 regulam a ubiquitinação e degradação proteossomal de NIK, prevenindo assim a ativação dessa via e por consequência impedindo a apoptose mediada por TNF α (OWENS et al., 2013; VARFOLOMEEV et al., 2007).

A livina, também conhecida como proteína IAP específica do melanoma (ML-IAP) pode exercer sua função apoptótica através da inibição das caspases -3, -7 e -9, e também através da ligação a Smac/DIABLO, liberando a XIAP do seu bloqueio, e marcando Smac/DIABLO para proteossomal (CHANG; SCHIMMER, 2007; MA et al., 2006). Estudos mais recentes com células de câncer colorretal indicaram que superexpressão de livina aumenta o potencial de migração e a invasão celular, assim como o silenciamento do gene da livina aumentou a sensibilidade a agentes quimioterápicos, como 5-FU (5-fluorouracil) (CAO; SUN, 2016; OH et al., 2016). A livina é notavelmente superexpressa não apenas em melanomas, mas em diversos tipos de tumores, como por exemplo, gliomas, neuroblastomas, osteosarcomas, leucemias, câncer de bexiga, pulmonar e pancreático, sendo raramente expressa em tecidos normais (KASOF; GOMES, 2001; YAN, 2011).

Assim como a livina, a survivina apresenta expressão diferencial em células tumorais. Normalmente, a survivina é expressa em tecidos embrionários e durante o desenvolvimento fetal, mas é praticamente indetectável em tecidos adultos totalmente diferenciados e saudáveis (ADIDA et al., 1998; STAUBER; MANN; KNAUER, 2007). Clinicamente, a superexpressão de survivina tem sido correlacionada ao mau prognóstico do câncer, com resistência a apoptose induzida pelos quimioterápicos, curto tempo de sobrevida dos pacientes e maiores chances de recidiva da doença (ISLAM et al., 2000; QI et al., 2009; RODEL et al., 2012).

Estudos mostram que a superexpressão de survivina inibe ambas as vias intrínseca e extrínseca da apoptose, e que a depleção de survivina em cultura de células humanas afeta a apoptose e causam defeitos na divisão celular (LI et al., 1998; ROY et al., 2015). Na mitose, a survivina desempenha papel fundamental ao integrar o complexo passageiro do cromossomo (CPC), juntamente ao INCENP, borealina e aurora B, que controla a formação e estabilização do fuso mitótico. (ALTIERI, 2013; COUMAR et al., 2013).

Nesse contexto, inúmeras são as evidências de que a inibição das IAPs aumenta a sensibilidade das células tumorais aos quimioterápicos já usados na clínica. Dentre as principais estratégias utilizadas para inibir as IAPs estão o uso de moléculas peptidomiméticas e pequenas moléculas inibidoras, além de oligonucleotídeos antisense e siRNA (do inglês, *small interfering RNA*) (DE ALMAGRO; VUCIC, 2012; OWENS et al., 2013). Alguns exemplos de inibidores das IAPs em fase de testes clínicos e pré-clínicos estão apresentados na tabela 3.1.

Tabela 3.1. Estratégias de inibição das proteínas inibidoras da apoptose (IAPs).

IAP	Composto	Tipo	Companhia	Fase clínica
XIAP	AEG35156	Oligonucleotídeo antisense	Aegera Therapeutics	Fase 1
	Embelina	Pequena molécula inibidora do domínio BIR3		Pré-clínica
	Polifenilureias (Xantags)	Pequena molécula inibidora do domínio BIR2	Burnham Institute	Pré-clínica
	Arilsulfonamidas (TWX006, TWX24)		Novartis	Pré-clínica
Survivina	Oligonucleotídeo antisense	Oligonucleotídeo antisense	Eli Lilly	Fase 2
	YM155	Pequena molécula inibidor de transcrição	Astellas Pharma	Fase 2
	Seferdina	Pequena molécula inibidora da Hsp90		Pré-clínica
	AICAR			Fase 2
	Anticorpo anti-survivina	Anticorpo		Fase 1
cIAPs e XIAP	TL32711 (Birinapint) composto A	Smac mimético	TetraLogic Pharma	Fase 1/2
	AEG40826 (HGS1029)		Aegera Therapeutics	Fase 1

AEG4730		Aegera Therapeutics	Fase 2
Composto 8, BV6, SM-122, SM-164		Ascenta Therapeutics	Pré-clínica
AT-406		Ascenta Therapeutics	Fase 1
Composto 3		Universidade do Texas/ Joyant	Fase 1
LBW242, LCL-161		Novartis	Fase 1
Composto C		Genentech	Fase 1
Composto 11		Pfizer	Pré-clínica
JP-1201			Pré-clínica

Fonte: Adaptado de OWENS, 2013.

Dentre as pequenas moléculas inibidoras das IAPs em testes pré-clínicos, pode-se destacar as moléculas de origem sintética capazes de se ligar diretamente à alguma região das IAPs, como polifenilureias (xantags) e a arilsulfonamidas TWX006 e TWX24; de origem natural, a embelina.

As arilsulfonamidas TWX006 e TWX24 (figura 3.3) foram identificadas através de triagem de alto rendimento de uma biblioteca de química combinatória, utilizando um ensaio de atividade enzimática da caspase 3. Ensaio bioquímicos confirmaram que o composto TWX24 foi capaz de bloquear a interação da XIAP com a caspase 3. O estudo computacional *in silico* mostrou que TWX006 se liga a região de conexão entre os domínios BIR1 e BIR3 da XIAP (WU et al., 2003).

A embelina (figura 3.3) é uma quinona presente na erva *Japanese ardisia* que foi descoberta como inibidor da XIAP através da triagem computacional, com base na estrutura química, de uma base de dados de compostos medicinais isolados de plantas. A embelina inibe a XIAP através da ligação ao seu domínio BIR3, induzindo a ativação de caspase-9 e apoptose em células tumorais de câncer de próstata (NIKOLOVSKA-COLESKA et al., 2004).

Em estudo posterior da sua atividade anticâncer, a embelina foi capaz de inibir a resistência de células de carcinoma de pulmão de células não-pequenas (CPCNP) à cisplatina, causada pela superexpressão de XIAP, culminando em ativação da caspase-3 e morte por apoptose (CHENG et al., 2010). Além da atividade antitumoral, outras atividades biológicas foram

recentemente reportadas para a embelina como, por exemplo, anti-inflamatória, antidiabética, antibacteriana, anticâncer, dentre outras (NIGAM et al., 2015).

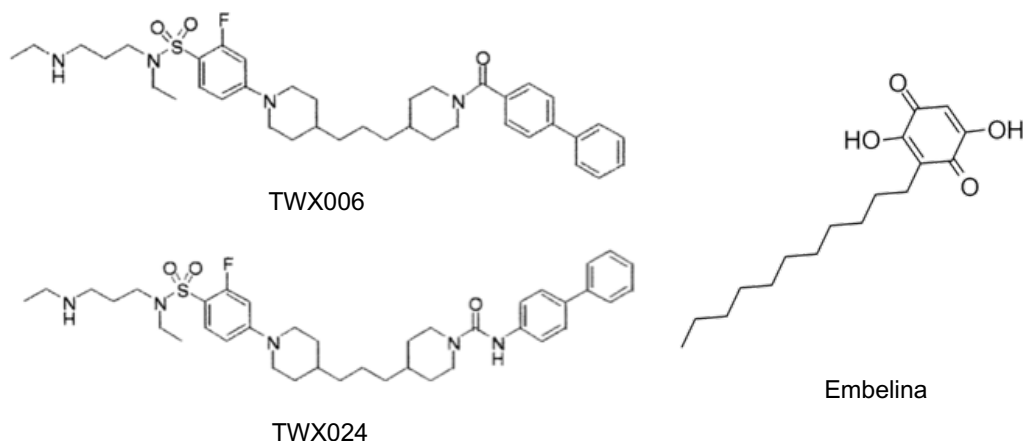


Figura 3.3. Pequenas moléculas inibidoras de IAPs. As arilsulfonamidas sintéticas TWX006 e TWX24, e o produto natural embelina.

Nesse cenário, apesar de muitos aspectos a cerca das funções de algumas IAPs ainda necessitarem de esclarecimento, a inibição ou redução da expressão das IAPs pode ser considerada como uma estratégia efetiva de indução de apoptose em diversos tipos de tumores (OLIVER; VALLETTE, 2005). Mais além, os estudos de produtos naturais, em especial os de origem marinha, moduladores diretos das IAPs ainda são escassos.

3.1.3 O ensaio de bioafinidade como estratégia de prospecção alvo-direcionada de produtos naturais

O ensaio de bioafinidade recentemente desenvolvido pelos grupos de pesquisa do Dr. Eli Chapman e Dr. James La Clair, viabiliza a captura de substâncias naturais através de afinidade reversa para atribuição do modo de ação baseado na ligação a proteínas dentro de proteomas celulares. Em 2015, Lau e colaboradores descreveram este ensaio, originalmente nomeado de cromatografia funcional (do inglês, *functional chromatography*), e cujas principais etapas estão ilustradas na figura 3.4 (KANG et al., 2014; LAU et al., 2015b). Porém, considerando que o referido método se baseia na afinidade da proteína-

alvo por substâncias presentes em extratos orgânicos, optamos por denominá-la aqui de ensaio de bioafinidade.

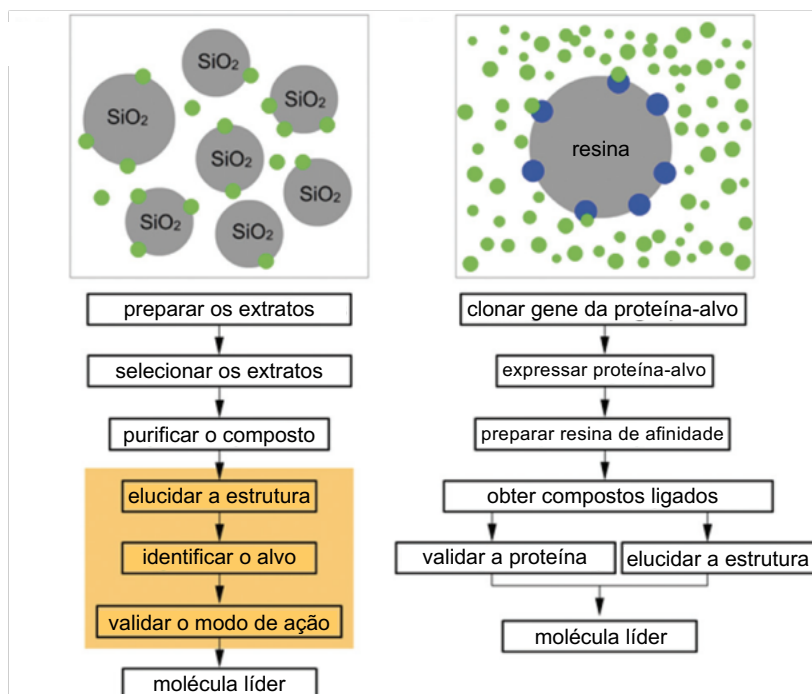


Figura 3.4. Esquema ilustrativo do ensaio de bioafinidade (esquerda) comparado com os métodos tradicionais (direita) para obtenção de moléculas naturais com alvo molecular especificado. Fonte: LAU *et al.*, 2015.

O trabalho de Kang e colaboradores (2014) foi o primeiro a aplicar o ensaio de bioafinidade, que utilizou a p97, uma chaperona AAA+ (ATPase associada a várias atividades celulares) envolvida em vias de degradação proteica e implicada em diversas patologias, incluindo o câncer, como proteína-alvo. A p97 (com cauda 6His) foi obtida a partir de expressão heteróloga em *Escherichia coli* e acoplada à resina Affi-gel 15, que, nessa condição, manteve sua atividade enzimática (KANG *et al.*, 2014).

Dessa forma, os autores realizaram o ensaio de bioafinidade, utilizando uma biblioteca de extratos provenientes de fungos e plantas, seguida de análise das amostras por CLAE-EM, que resultou na detecção de três substâncias (*hits*), posteriormente identificados como reoemodina, 1-hidroxi-didroherbarina e fomapirrolidona A. Estas substâncias foram isoladas após cultivo dos fungos, seguida da obtenção e fracionamento dos respectivos

extratos brutos. A validação dos compostos como inibidores da p97 foi realizada através de ensaio de atividade ATPásica e ensaios em modelos celulares específicos para o estudo das vias nas quais a p97 está envolvida. Tais experimentos revelaram que os *hits* apresentaram diferentes tipos de inibição enzimática da p97 recombinante (valores de IC₅₀ entre 6 e 39 µM), além de terem demonstrado efeito modulador da p97 na via ubiquitina-proteassoma em células HEK293 (KANG et al., 2014).

Para a descrição mais detalhada do método, Lau e colaboradores (2015) realizaram o ensaio de bioafinidade utilizando, além da p97, a chaperona HSC70 e, a proteína equivalente a actina, FtzH. O experimento foi realizado com o extrato do fungo *Lecythophora* sp. e permitiu a detecção de dois *hits* para a p97, que também foram detectados para as demais proteínas. Após o fracionamento químico do extrato, os compostos foram identificados como os oxaspirols B e C, uma rara classe de produtos naturais. A realização dos ensaios de atividade ATPásica revelou que apenas o oxaspirol B apresentou atividade inibitória da p97 recombinante (IC₅₀ de 31,2 µM). Diante disso, os autores levantaram a hipótese de que uma porção enona da molécula de oxaspirol B pode ser essencial para a sua atividade inibitória (LAU et al., 2015b).

Nesse contexto, diante do potencial do ensaio de bioafinidade em identificar substâncias com atividade moduladora de proteínas de importância terapêutica, este método foi escolhido para realização da prospecção de substâncias naturais utilizando as proteínas IAPs como proteínas-alvo. Neste capítulo foi descrito o estudo realizado em colaboração com os grupos do Dr. Eli Chapman (*University of Arizona*), Dr. Norberto Peporine Lopes (Universidade de São Paulo), juntamente com nosso grupo de pesquisa, a fim de realizar a prospecção alvo-direcionada de substâncias moduladoras das IAPs a partir de extratos de actinobactérias marinhas.

3.2 OBJETIVOS

3.2.1 Objetivo geral

- ✓ Realizar a prospecção de substâncias moduladoras das proteínas inibidoras da apoptose (IAPs), com potencial anticâncer, a partir de extratos de actinobactérias marinhas, e validar o ensaio de bioafinidade para este fim.

3.2.2 Objetivos específicos

- ✓ Realizar a expressão heteróloga e a purificação das IAPs: cIAP2, survivina, livina e domínio BIR3 da XIAP, recombinantes.
- ✓ Realizar o ensaio de bioafinidade com extratos de actinobactérias marinhas tendo as IAPs purificadas como proteínas-alvo, e detectar as moléculas que se ligaram a estas proteínas (*hits*).
- ✓ Construir uma rede molecular (*molecular network*) dos extratos e identificar as relações entre os compostos, e os *hits*, presentes nos extratos.
- ✓ Realizar a desreplicação dos *hits* de um extrato selecionado, nas bases de dados de produtos naturais DNP e AntiMarin.
- ✓ Realizar o fracionamento químico do extrato selecionado e isolar os respectivos *hits*.
- ✓ Avaliar a atividade citotóxica dos *hits* isolados frente a linhagens tumorais.

3.3 MÉTODOS

3.3.1 Desenho Experimental

A figura 3.5 apresenta o desenho experimental seguido para a prospecção de moléculas moduladoras de IAPs em extratos de microorganismos marinhos, onde estão esquematizadas todas as etapas deste trabalho.

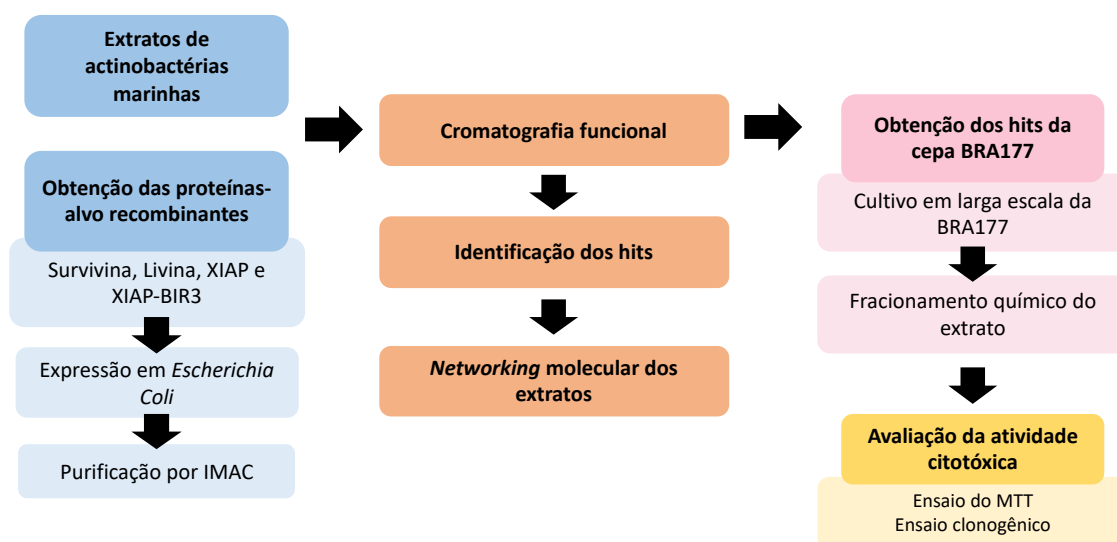


Figura 3.5. Desenho Experimental.

3.3.2 Obtenção dos extratos

Os extratos brutos foram obtidos do banco de extratos do Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia Marinha (LaBBMar), a partir de cepas de actinobactérias recuperadas do sedimento ou de invertebrados marinhos, coletados em praias do litoral do Ceará e do Arquipélado São Pedro e São Paulo (ASPSP). A lista de extratos está apresentada na tabela 3.2.

Primeiramente, as culturas puras foram inoculadas em erlenmeyers de 500 mL contendo 100 mL de meio de cultura A1 e mantidos a 28 ± 2 °C e 200 RPM de agitação. O tempo de crescimento foi de 7 e 15 dias, para as cepas do litoral do Ceará e do ASPSP, respectivamente. Após esse período, as culturas

foram extraídas com o solvente acetato de etila (AcOEt) ou butanol (BuOH), numa proporção de 1:1, sob agitação a 100 RPM durante duas horas. Em seguida, a partição líquida foi realizada, a fração aquosa foi descartada e a fração acetato foi rotaevaporada sob pressão reduzida para remoção do solvente e obtenção do extrato bruto (FERREIRA et al., 2016; GUIMARÃES, 2013).

Os extratos também foram previamente avaliados quanto ao seu potencial citotóxico frente a linhagem tumoral HCT-116 (carcinoma de cólon) através do ensaio do MTT. A identificação molecular de algumas cepas foi realizada através do sequenciamento do gene do RNAr 16S (FERREIRA et al., 2016; GUIMARÃES, 2013).

Tabela 3.2. Extratos de actinobactérias utilizados no presente trabalho para prospecção de moléculas moduladoras de IAPs. Para cada extrato está descrito o local de origem e a amostra da qual a respectiva cepa foi recuperada. Os valores de CI_{50} obtido pelo ensaio de MTT de 72 h frente as células HCT-116 (carcinoma de cólon) e a identificação molecular obtida a partir do sequenciamento do RNAr 16S, também estão discriminados para as respectivas cepas. N.T.: Não testado. N.I.: Não identificado.

Código	Local	Amostras	CI_{50} (μ M)	Identificação molecular
BRA028	Porto do Mucuripe	Sedimento da dragagem	0,02 (0,003 - 0,127)	N.I.
BRA093	Praia da Taiba	Sedimento	N.T.	N.I.
BRA134	ASPSP	Sedimento	11,13 (8,25 - 15,02)	<i>Salinispora</i> sp.
BRA154	ASPSP	Sedimento	16,02 (11,03 - 22,72)	<i>Actinomadura</i> sp.
BRA166	ASPSP	Sedimento	2,46 (0,78 - 7,73)	<i>Actinomadura</i> sp.
BRA177	ASPSP	Sedimento	4,096 (1,25 - 13,46)	<i>Actinomadura</i> sp.
BRA180A	ASPSP	Sedimento	N.T.	<i>Actinomadura</i> sp.
BRA190B	ASPSP	Sedimento	0,74 (0,26 - 2,06)	<i>Salinispora arenicola</i>
BRA203B	ASPSP	Sedimento	10,11 (5,65 - 18,07)	N.I.
BRA214	ASPSP	Sedimento	11,11 (7,89 - 15,66)	<i>Streptomyces</i> sp.
BRA220	Porto do Mucuripe	Sedimento da dragagem	12,54 (8,33 - 18,86)	N.I.
BRA227	Praia da Taiba	Sedimento	0,8873 (0,47 - 1,66)	N.I.
BRA232	Praia do Paracuru	Sedimento	26,53 (9,38 - 75,06)	N.I.

BRA233	Praia do Paracuru	Sedimento	23,70 (11,96 - 46,97)	N.I.
BRA234	Praia da Taíba	Sedimento	3,283 (2,11 - 5,10)	N.I.
BRA235	Praia do Paracuru	Sedimento	1,20 (0,35 - 4,18)	N.I.
BRA244	Praia do Mucuripe	Sedimento	10,77 (5,00 - 23,17)	N.I.
BRA249	ASPSP	Sedimento	06,10 (2,38 - 15,66)	N.I.
BRA250	ASPSP	Ascidia	> 50	N.I.
BRA258	ASPSP	Sedimento	1,01 (0,58 - 1,73)	<i>Salinispora arenicola</i>
BRA263	ASPSP	<i>Palythoa caribaeorum</i>	N.T.	N.I.

Fonte: FERREIRA et al., 2016; GUIMARÃES, 2013. Banco de dados de micro-organismos do laboratório.

3.3.3 Obtenção de proteínas recombinantes

Os plasmídeos utilizados neste trabalho foram produzidos pelo laboratório do Prof. Dr. Eli Chapman, *University of Arizona*, Tucson, EUA, e estão listados na tabela 3.3. As sequências de nucleotídeos das IAPs cIAP2, survivina, livina e domínio BIR3 da XIAP (BIR3-XIAP) foram amplificadas a partir dos respectivos clones de cDNA (DNASU) e subclonadas em vetor pSpeedET (DNASU). As sequências das IAPs foram confirmadas através do sequenciamento dos respectivos plasmídeos.

O vetor pSpeedET contém um gene de resistência a canamicina e este foi o antibiótico de seleção utilizando para os plasmídeos das IAPs. As IAPs expressas por meio desse vetor possuem uma sequência de 6 resíduos de histidina (*His-tag*), ou cauda 6His, adicionada à extremidade N-terminal, para possibilitar a purificação por cromatografia de afinidade a íons metálicos.

As etapas de expressão heteróloga em *Escherichia coli* e purificação das proteínas recombinantes, bem como os experimentos de cromatografia de bioafinidade foram realizadas no laboratório do Dr. Eli Chapman, durante o período de doutorado sanduíche.

3.3.3.1 Transformação de *E. coli* quimicamente competentes

A cepas de *E. coli* utilizadas para expressão das IAPs estão listados na tabela 3.3. Uma alíquota de 50 µL de células *E. coli* quimicamente competentes foi incubada com 0,5-1 µL do plasmídeo de interesse em microtubo sobre gelo por 30 min. Em seguida, foi submetida a choque térmico a 42 °C por 45 segundos, retornando ao gelo por mais 2 minutos. Após o tempo de incubação, 800 µL de meio de cultura SOC foi adicionado a suspensão de células, que foi incubada a 37 °C e 200 RPM de agitação por 1 hora. Após este período, as células foram plaqueadas em meio de cultura Luria-Bertani (LB) sólido contendo canamicina a 50 µg/mL e incubadas 37 °C por 16 horas.

Tabela 3.3. Plasmídeos das proteínas-alvo e células hospedeiras para expressão heteróloga. Tanto os plasmídeos das proteínas, como as cepas de *E. coli* utilizadas nesse trabalho fazem parte do banco de plasmídeos e cepas do laboratório do Dr. Eli Chapman, *University of Arizona*, EUA. *BIR3-XIAP foi obtida como proteína já purificada do banco de proteínas do referido laboratório.

Plasmídeo	Hospedeiro para expressão heteróloga
pSpeedET-survivina	<i>E. coli</i> BL21(DE3)
pSpeedET-livina	<i>E. coli</i> BL21(DE3)
pSpeedET-clAP2	<i>E. coli</i> BL21(Rosetta 2)
pSpeedET-BIR3-XIAP	<i>E. coli</i> BL21(DE3)*

3.3.3.2 Expressão de proteínas recombinantes em *E. coli*

Células de *E. coli* transformadas com plasmídeo de interesse foram cultivadas em Erlenmeyers de 1L com 500 mL de meio LB complementado canamicina 50 µg/mL. Os frascos foram inoculados com 5 mL da cultura pré-inóculo, que partiu de uma colônia individual, e incubados a 37 °C e 200 RPM. O crescimento da cultura foi monitorado através da leitura da densidade óptica em 600 nm (DO₆₀₀) em espectrofotômetro. Ao atingir DO₆₀₀ de 0,6, a cultura foi transferida para cultivo a 16 °C, até atingir DO₆₀₀ de 0,8 e, em seguida, a expressão do plasmídeo foi induzida com IPTG a 500 µM (Gold Biotechnology). Em seguida, as culturas foram incubadas novamente a 16 °C e 200 RPM por 16 horas. Após o período de incubação, 300 µL da cultura foram coletados para

posterior análise da expressão da proteína por eletroforese em SDS-PAGE (item 3.3.4.4).

A cultura foi então transferida para frascos de centrifugação (400 mL) e centrifugada a 7.000 RPM e 4 °C por 8 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi conservado a -80 °C até seu devido processamento, não ultrapassando o período de 24 horas.

3.3.3.3 *Purificação de proteínas recombinantes por cromatografia de afinidade a íons metálicos (IMAC)*

O pellet bacteriano foi descongelado sobre gelo e, em seguida, ressuspenso em 20 mL de tampão de lise a 4 °C (HEPES 50 mM, pH 7,4, KCl 150 mM, MgCl₂ 5 mM, glicerol 5%) adicionado de β-mercaptoetanol a 2 mM e PMSF a 1 mM. As células foram lisadas através de passagem em microfluidizador sob pressão de 12.000 Psi (827,37 Bar) a 4°C por 3 vezes. O lisado contendo a proteína de interesse foi separado dos fragmentos celulares por ultracentrifugação a 32.000 RPM e 4 °C por 1 hora. Nesse intervalo, a resina de afinidade foi preparada para utilização, sendo utilizado 1 mL da resina para cada 1 L de cultura. Para isto, 2 mL de solução de resina de afinidade a metal Talon® (Clontech) carregada com íons cobalto (Co²⁺), em etanol (1:1), foi aplicado em uma coluna de cromatografia por fluxo gravitacional de 20 mL (Bio-Rad). Em seguida, a resina (volume final de 1 mL) foi lavada com 10 mL de água destilada e, posteriormente equilibrada com 10 mL do tampão de lise.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi incubado com resina previamente equilibrada a 4 °C por 1 hora, para que a cauda 6His da proteína se ligasse aos íons Co²⁺ imobilizados na resina. Após a incubação, a mistura foi aplicada a uma coluna de cromatografia por fluxo gravitacional (20 mL), para retenção da resina ligada a proteína. O restante da mistura que passou pela coluna foi coletado e reservado para posterior análise.

Primeiramente, a resina foi lavada com 10 mL de tampão de lavagem I (HEPES 50 mM, pH 7,4, 150 mM KCl, MgCl₂ 5 mM, glicerol 5%), seguida de lavagem com 10 mL de tampão de lavagem II (HEPES 50 mM, pH 7,4, 1M KCl, MgCl₂ 5 mM, glicerol 5%) ambos os tampões contendo β-mercaptoetanol a 2mM. Ambas as lavagens da coluna foram coletadas, reunidas e, também, reservadas.

Por fim, procedeu-se a eluição das proteínas utilizando alta concentração de imidazol, que compete com a cauda 6His da proteína pela interação com os íons Co^{2+} , resultando na liberação da proteína da resina. Para a cIAP2 a eluição foi feita com 4 frações de 5 mL de tampão de eluição (HEPES 50 mM, pH 7,4, KCl 150 mM, MgCl_2 5 mM, glicerol 5%) contendo imidazol a 250 mM. Para survivina e livina, foi feita a eluição seriada das proteínas com 5 frações de 5 mL do mesmo tampão de eluição, mas contendo concentrações crescentes de imidazol (20, 40, 80, 160 e 250 mM). As eluições foram coletadas e mantidas a 4 °C.

Alíquotas das frações reservadas e das eluições foram analisadas por eletroforese em SDS-PAGE (item 3.3.4.4). As eluições contendo a proteína de interesse foram reunidas para diálise, em membrana de 12-14 kDa de porosidade Spectra (Spectrum Labs), para remoção do excesso de imidazol. A diálise foi realizada em solução tampão (HEPES 20 mM pH 7,4, KCl 150 mM, MgCl_2 1mM, glicerol 5%, β -mercaptoetanol 2mM) a 4 °C e sob leve homogeneização por 16 horas.

Após a diálise, a fração proteica foi concentrada por centrifugação em filtros com membrana de corte de 10 kDa Amicon Ultra (Millipore). A concentração proteica foi calculada pelo método de Bradford (BioRad). Posteriormente, foi adicionado 10% de glicerol à fração proteica, que foi aliquotada, congelada em nitrogênio líquido e mantidas a -80 °C até seu uso no ensaio de bioafinidade.

3.3.3.4 *Eletroforese de proteínas*

As amostras da cultura com expressão induzida e não-induzida foram centrifugadas a 14.000 RPM por 3 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspensão em 60 μL de tampão de amostra 2X (Tris-HCl 100mM pH 6,8, SDS 4%, glicerol 20 %, azul de bromofenol 0,02%, β -mercaptoetanol 0,1%). Para as amostras das etapas de purificação, foram adicionados 20 μL do tampão de amostra. Os tubos foram incubados em banho seco a 100 °C por 5 minutos, e posteriormente, 10 μL de cada amostra foram aplicados em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) a 12%. O marcador de

peso molecular de proteínas PageRuler 10-180 kDa (Thermo Scientific) foi adicionado no primeiro poço de cada gel.

A eletroforese foi realizada em tampão de corrida (Tris 25 mM, glicina 0,25 M, SDS 0,1%, pH 8,3) a 15 mA de amperagem por cerca de 40 minutos. Em seguida, os géis foram corados em solução corante (MeOH 40%, ácido acético 10%, azul brilhante 0,0025%) e descorados em solução descorante (MeOH 40%, ácido acético 10%) a 75 RPM de agitação. Por fim, a análise dos géis foi realizada com auxílio de transiluminador de luz branca. Os géis e todas as soluções-tampão foram preparadas em laboratório.

3.3.4 Ensaio de bioafinidade

O ensaio de bioafinidade (EB) foi o método utilizado para identificação de possíveis moduladores das IAPs survivina, livina, cIAP2 e domínio BIR3 da XIAP (BIR3-XIAP) em extratos de bactérias marinhas, que estão listados na tabela 3.2. O protocolo utilizado foi adaptado de Lau *et al.* (2015) e Kang *et al.* (2014) e a representação esquemática deste experimento está apresentada na figura 3.6. A obtenção das proteínas-alvo recombinantes utilizadas neste experimento foi descrita no item 3.3.4. O domínio BIR3-XIAP purificado foi obtido a partir do banco de proteínas criopreservadas do laboratório do Dr. Eli Chapman (*University of Arizona*).

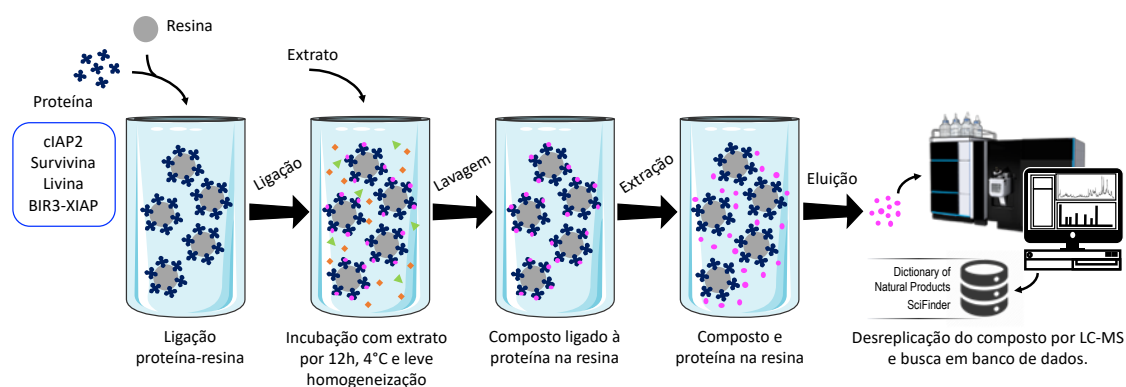


Figura 3.6. Esquema ilustrativo do ensaio de bioafinidade. Fonte: Elaborado pela autora.

3.3.4.1 Ligação da proteína-alvo à resina

Primeiramente, as proteínas-alvo foram ligadas à resina Affi-Gel 15 (Bio-Rad), formada por microesferas de gel de agarose (75-300 μm) com alta afinidade por aminas primárias. Essa ligação ocorre através do deslocamento do grupo N-hidroxissuccinimida, acoplado à superfície da resina, permitindo a formação da ligação amida estável entre a proteína e a resina (figura 3.7) (BIO-RAD LABORATORIES, 2018).

Foram utilizados 100 μL da resina para cada extrato a ser testado. A cada experimento foram testados cerca de 10 extratos simultaneamente. Inicialmente, 1 mL de resina (1:1 em isopropanol) foi alíquotada em microtubo (2 mL) e lavada duas vezes com 1 mL de tampão PBS 2X, contendo MgCl_2 a 5 mM, aqui referido como “tampão EB”. Em seguida, a resina foi incubada com uma solução contendo 2 mg da proteína-alvo e incubada a 4 $^\circ\text{C}$, sob leve homogeneização por inversão, por 12 h. Após este período, a resina foi incubada com uma solução de etanolamina a 1 M sob homogeneização por 1,5 h, a fim de ocupar os sítios livres da resina. Em seguida, a resina foi lavada três vezes com tampão EB e considerada pronta para aplicação dos extratos.

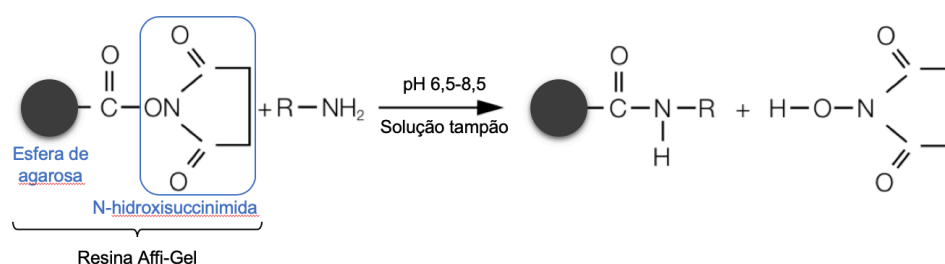


Figura 3.7. Reação de acoplamento da resina Affi-Gel com ligantes contendo grupo amina primária. Fonte: Adaptado de BIO-RAD LABORATORIES, 2018.

3.3.4.2 Captura dos compostos ligantes

Os extratos foram diluídos a 100 mg/mL (concentração final) em DMSO, e 5 μL de cada extrato foi diluído em 800 μL de tampão EB (massa final de 0,5 mg de extrato), de acordo com o número de proteínas a serem testadas. Posteriormente, 200 μL da suspensão de resina ligada a proteína-alvo (1:1, em

tampão EB) foram adicionados nos respectivos tubos. Os tubos foram incubados a 4 °C sob leve homogeneização por inversão, por 12 h.

Após a incubação, os sobrenadantes foram descartados e a resina foi lavada três vezes com tampão FC. Em seguida, as moléculas retidas pela proteína foram eluídas com 500 µL de etanol 95%. Por fim, as eluições foram secas sob ar comprimido e conservada à -80 °C.

3.3.4.3 Identificação dos hits

As análises das amostras do ensaio de bioafinidade foram realizadas juntamente com a Dra. Anelize Bauermeister, no Laboratório de Química Orgânica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, sob supervisão do Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes.

Inicialmente, as amostras foram ressuspensas em 500 µL de MeOH e filtradas para remoção dos possíveis íons residuais do tampão CF através de um mini-sistema de filtragem. O mini-sistema foi montado individualmente para cada amostra e utilizou cerca de 50 g de Sephadex LH-20 (GE Healthcare) dispostos acima de uma pequena camada de lenços anti-estáticos (Kimtech), ambos acomodados na base de uma pipeta Pasteur de vidro. Posteriormente, as amostras foram analisadas por cromatografia líquida acoplada com detector UV (LC-UV), acoplada à espectrometria de massas de alta resolução com fonte de ionização por *electrospray* (microOTOFII, Bruker) (HR-ESI-MS). Para a CL, foi utilizada uma coluna C18 (Luna Phenomenex, 5 µ, 100 Å, 250 x 4,6 mm) e um gradiente H₂O:MeOH, (ambos contendo 0,1 % de ácido fórmico) 5-100 %, em 30 min sob fluxo de 1 mL/min. Para a EM, foi utilizado o modo de massas no íon positivo variando de 100-1000 m/z, com energia do cone de 500 V, utilizando gás nitrogênio (fonte de gás a 220 °C, fluxo de gás a 10L/min e nebulizador a 5,5 Bar). O equipamento foi autocalibrado usando solução de TFA.

Os dados foram analisados utilizando o programa Compass (Bruker), para a identificação dos picos das moléculas que se ligaram à proteína acoplada à resina e obtenção dos respectivos valores de massa/carga (*m/z*), ou seja, os hits.

3.3.5 Construção da rede molecular dos extratos

A construção de uma rede molecular (*molecular networking*) entre moléculas de origem natural é uma abordagem que se baseia nos dados de espectrometria de massas sequencial (EM/EM) com abordagem computacional por meio de uma plataforma global de redes moleculares de produtos naturais, o GNPS (do inglês, *Global Natural Product Social Molecular Networking*).

Essa análise permite a identificação de relações entre os padrões de fragmentação dos compostos contidos em determinado grupo de amostras, assim como a sua desreplicação com base nos dados contidos no GNPS (WANG et al., 2016). Neste trabalho, a rede molecular foi construída para 21 extratos de bactérias marinhas (tabela 3.2) e o protocolo utilizado foi adaptado de Floros et al. (2016). A representação esquemática do processo de construção de uma rede molecular está apresentada na figura 3.7.

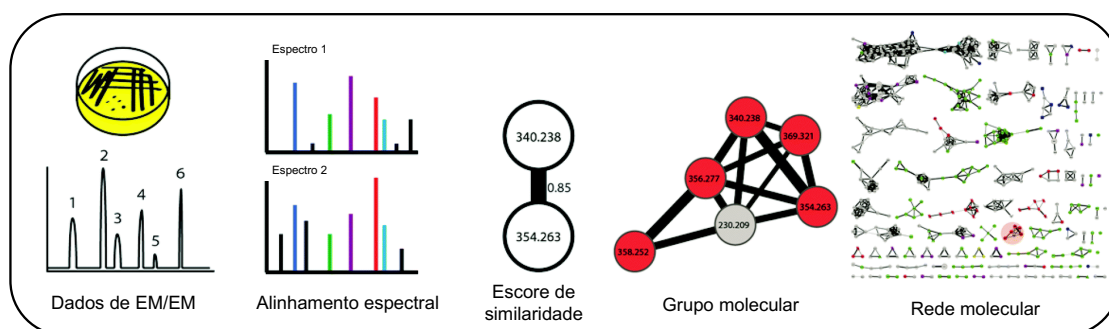


Figura 3.7. Esquema ilustrativo da construção de uma rede molecular (*molecular networking*). Fone: Adaptado de LUZZATTO-KNAAN, MELNIK, DORRESTEIN, 2015.

Inicialmente, os extratos foram dissolvidos em 500 μL de MeOH, filtrados a 0,22 μM e, em seguida, submetidos a análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (CL-EM/EM) (AmaZon SL ion-trap, Bruker), no modo automático de seleção para fragmentação, no qual foram selecionados os três íons mais intensos por espectro de massas inicial. Os dados de EM/EM de 21 extratos foram convertidos para o formato mzXML, utilizando o programa DataAnalysis (Bruker), e, em seguida, carregados na plataforma GNPS, através do endereço eletrônico “gnps.ucsd.edu”.

Na plataforma do GNPS, os dados foram filtrados para remoção dos espectros de EM/EM dentro da faixa de ± 17 Da do valor da massa (m/z) do íon

precursor. Os dados foram, então, agrupados utilizando o alinhamento de espectro estrutura-independente (MS-Cluster) de acordo com os seguintes parâmetros: tolerância de massa parental de 2,0 Da e tolerância de massa dos picos de íon fragmento de 0,5 Da para criação de um espectro de consenso; número mínimo de espectros de consenso igual a 2. A rede foi montada na qual as linhas representavam escore de similaridade (escore cosseno) mínimo de 0,7 com no mínimo cinco picos coincidentes.

Dessa forma, na rede molecular construída, as massas foram representadas por círculos (nós) e estes foram conectadas por linhas, indicando similaridade entre si. Dois ou mais nós que apresentaram relação de similaridade entre si formaram grupos moleculares (*clusters*) (figura 3.7).

Os espectros da rede molecular foram pesquisados nas bibliotecas espectrais do GNPS para permitir a identificação de classes de moléculas. Os critérios para correspondência entre os espectros da rede e os espectros da biblioteca foram: pontuação mínima de 0,6 e a presença de pelo menos seis picos correspondentes entre os espectros.

A análise da rede molecular foi realizada na plataforma do GNPS e pelo programa Cytoscape 3.6.0, que também foi utilizado para posterior visualização e formatação da rede molecular.

3.3.6 Desreplicação dos hits do extrato da *Actinomadura* sp. (BRA177)

A desreplicação é um processo que permite a identificação de substâncias correspondentes já conhecidas ou potencialmente inéditas em uma mistura, com um extrato orgânico, por exemplo. Tipicamente, esse processo combina métodos cromatográficos e espectroscópicos com pesquisa de banco de dados (NIELSEN et al., 2011)

A busca dos hits obtidos da BRA177 foi realizada nas bases de dados *Dictionary of Natural Products* (DNP) e AntiMarin utilizando os dados de massa molecular obtidos pela análise por espectrometria de massas de alta resolução (HR-ESI-MS). No caso, foi utilizada a massa molecular de menor erro, de acordo com o programa do espectrômetro de massas.

O DNP compila dados de todos os compostos naturais já isolados e permite uma busca online e gratuita, mediante acesso em rede de instituição

cadastrada, através do endereço eletrônico “dnp.chemnetbase.com”. A pesquisa nessa base de dados foi realizada utilizando dos seguintes parâmetros: a faixa de massa molecular do hit sem casas decimais (do valor de m/z $[M+H]^+$ menos 1 ao valor $[M+H]^+$ sugerido originalmente) e o número de átomos de carbono e nitrogênio previstos.

O AntiMarin é a fusão das bases de dados MarinLit, que contém dados de compostos naturais obtidos do ambiente marinho, e AntiBase, que contém dados de compostos naturais obtidos de micro-organismos, sejam eles marinhos ou terrestres. A busca no AntiMarin foi realizada com base na massa molecular com no mínimo duas casas decimais.

3.3.7 Cultivo em larga escala da *Actinomadura* sp. (BRA177)

A fim de se isolar os hits identificados pela cromatografia de bioafinidade, foi realizado o cultivo em larga escala da cepa *Actinomadura* sp. (BRA177). A BRA177 foi cultivada em 20 Erlenmeyers de 2 L contendo 500 mL de meio de cultura A1 suplementado (ver anexo V). Cada frasco foi inoculado com 50 mL da cultura pré-inóculo da bactéria. A cultura em larga escala foi cultivada por 10 dias a 28 ± 2 °C e 150 RPM de agitação. Após esse período, o caldo de cultura foi filtrado para separação do micélio e o filtrado obtido foi extraído com 2,5 L de AcOEt. O solvente foi rotaevaporado sob pressão reduzida a 35 °C para obtenção de 390,8 mg de extrato bruto.

3.3.8 Fracionamento químico do extrato da *Actinomadura* sp. (BRA177)

Esta etapa do trabalho foi realizada pela Dra. Maria da Conceição Menezes Torres no Laboratório de Plantas Medicinais do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, sob a supervisão da Profa. Dra. Otília Deusdênia Loiola Pessoa.

O extrato bruto da BRA177 (390,8 mg) foi submetido a cromatografia de adsorção em sílica gel usando como eluentes com hexano, AcOEt e MeOH em misturas de polaridade crescente. Após análise por cromatografia de camada delgada comparativa (CCD), foram obtidas 11 frações (Fr. A-K) (figura 3.8). A fração B (29,3 mg) foi submetida a cromatografia em coluna de sílica gel

utilizando gradientes de hexano e AcOEt, seguida de fracionamento por CLAE em coluna C18 semipreparativa, com fase móvel isocrática acetonitrila (CH₃CN):H₂O (9:1) para obtenção do composto **1** (5,4 mg, t_R 12,6 min, m/z 364,2383 [M + H]⁺). A fração C (97,7 mg) foi submetida a sucessivas cromatografias em coluna de sílica gel utilizando gradientes de hexano e AcOEt para obtenção do composto **2** (33,0 mg, m/z 364,2383 [M + H]⁺). A fração F (15 mg) foi purificada por CLAE utilizando coluna C18 semipreparativa e fase móvel isocrática de CH₃CN:H₂O (9:1) para obtenção do composto **3** (4 mg, t_R 10,8 min, m/z 366,2545 [M + H]⁺).

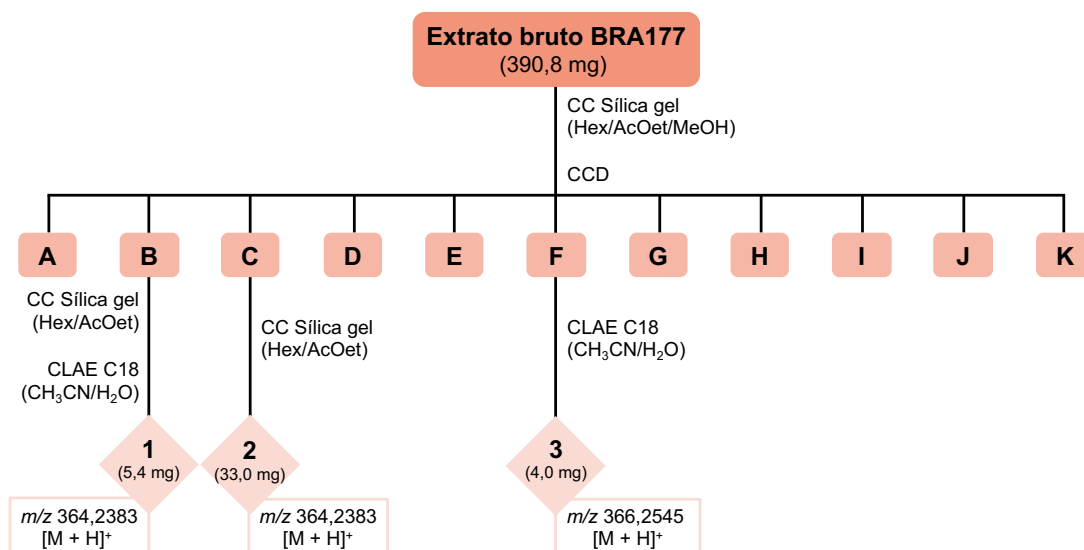


Figura 3.8. Fracionamento químico do extrato acetato de etila obtido do cultivo em larga escala da cepa *Actinomadura* sp. (BRA177).

A caracterização e da determinação das estruturas químicas das substâncias isoladas foram realizadas com bases nos dados de espectrometria de massas, ressonância nuclear magnética (RMN) de H¹ e C¹³, e confirmada por comparação com dados encontrados na literatura.

3.3.9 Cultivo de células tumorais e não tumorais

As linhagens celulares utilizadas nos experimentos de avaliação da atividade citotóxica e suas respectivas origens histológicas estão listadas na

tabela 3.4. As células foram cultivadas em garrafas de cultura (25 cm²) utilizando o meio de cultura RPMI 1640 (Gibco) preparado a partir do conteúdo em pó, e complementado com soro fetal bovino (10%) e antibióticos (1%, penicilina 100 U/mL e estreptomicina 100 µg/mL). As culturas foram manuseadas em câmaras de fluxo laminar vertical e mantidas em incubadora a 37 °C com atmosfera de CO₂ de 5% e umidade de 95%. O acompanhamento das culturas foi realizado com auxílio de microscópio óptico invertido e os repiques para meio de cultura novo foram feitos quando necessário. Para o desprendimento das células aderidas utilizou-se uma solução de tripsina-EDTA a 0,5% (Gibco) diluída 10X em PBS.

Tabela 3.4. Linhagens celulares humanas utilizadas no estudo da atividade citotóxica e respectivos tipos histológicos.

Linhagem	Tipo histológico
SK-Mel-147	Melanoma
MCF-7	Carcinoma de mama
HCT-116	Carcinoma de colón
MRC-5	Fibroblasto

3.3.10 Avaliação da atividade citotóxica – Ensaio do MTT

As substâncias isoladas foram, inicialmente, avaliadas quanto ao seu potencial citotóxico frente a células tumorais e não tumorais através do ensaio do MTT. Nesse ensaio, a citotoxicidade da amostra testada é determinada de forma indireta, através da análise colorimétrica da atividade metabólica das células, que se baseia na redução do MTT, um sal de cor amarela, a formazan, um precipitado roxo, pelas enzimas mitocondriais das células viáveis (MOSMANN, 1983).

As células foram plaqueadas em multiplacas de 96 poços na concentração de 5×10^4 células/mL para serem aderidas. As substâncias foram diluídas em DMSO (Sigma) e testadas em concentrações seriadas, em duplicata, com tempos de incubação de 24 e 72 h, a 37 °C e CO₂ 5 %. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e se adicionou 150 µL da solução de MTT (Sigma)

a 5 mg/mL em meio RPMI 1640 em todos os poços da placa, que foi incubada novamente por 3 h. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e o precipitado de cada poço foi ressuscitado em 150 µL de DMSO e agitado até sua completa dissolução, para leitura da absorbância em espectrofotômetro de placa no comprimento de onda de 595 nm.

Os experimentos foram analisados segundo suas médias e respectivos erros-padrão. Para determinação da concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo (CI_{50}), foi realizada uma regressão não-linear a partir dos dados normalizados, resultando em um gráfico de absorbância × concentração e seus respectivos intervalos de confiança de 95% (IC 95%) obtidos no programa GraphPad Prism (versão 5.0).

3.3.11 Avaliação da atividade citotóxica a longo prazo – Ensaio clonogênico

O efeito citotóxico das substâncias isoladas, a longo prazo, frente a linhagem SK-Mel-147 foi avaliado pelo ensaio clonogênico. O ensaio clonogênico permite a avaliação do efeito da amostra teste sobre a sobrevivência e proliferação celular com base na capacidade de células isoladas em formar colônias (FRANKEN et al., 2006).

As células SK-Mel-147 foram plaqueadas em placas de 35 mm² em baixa confluência (10^3 células) para serem aderidas. As células foram tratadas com as substâncias **2** e **3** em concentração cinco vezes menor do que as respectivas CI_{50} de 72 h, obtidas através do ensaio do MTT. O tratamento foi repetido a cada 72 h, após a troca do meio de cultura, ao longo de 14 dias. Após esse período, as células foram lavadas com PBS, em seguida, foram fixadas e coradas com solução corante (50 % de Metanol, 0,5 % de cristal violeta, 49,5 % de H₂O). As placas foram lidas pelo equipamento In-vivo MS FX PRO (Bruker) e as imagens foram analisadas pelo programa Image J (versão 1.8.0), que quantificou os dados referentes ao número de colônias e a área de preenchimento de cada placa. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, 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% ($p < 0,05$) no programa GraphPad Prism (versão 5.0).

3.4 RESULTADOS

3.4.1 Expressão heteróloga e purificação das IAPs recombinantes

A fim de serem empregadas como proteínas-alvo no ensaio de bioafinidade, as proteínas inibidoras da apoptose (IAPs) recombinantes foram obtidas através de expressão heteróloga em *Escherichia coli*. A survivina e a livina foram expressas em *E. coli* BL21(DE3), enquanto a cIAP2 foi expressa em *E. coli* BL21(Rosetta 2). A expressão das proteínas foi induzida com IPTG (500 μ M), que é responsável pela ativação do promotor *lac* e subsequente expressão da T7 RNA-polimerase nas células bacterianas. Uma vez que os plasmídeos das IAPs contêm um promotor T7, a T7 RNA-polimerase expressa inicia a transcrição do gene da IAP recombinante.

Na figura 3.9 estão apresentadas as amostras dos processos de expressão heteróloga e purificação por cromatografia de afinidade à íons metálicos (IMAC) das proteínas-alvo. A amostra correspondente à indução da expressão de survivina apresentou uma banda de forte intensidade logo acima do marcador de 17 kDa. Na amostra correspondente à expressão de livina, obteve-se uma banda intensa pouco abaixo do marcador de 34 kDa. Por sua vez, na amostra correspondente à cIAP2, é possível observar uma banda aproximadamente na altura do marcador molecular de 72 kDa (figura 3.9 A).

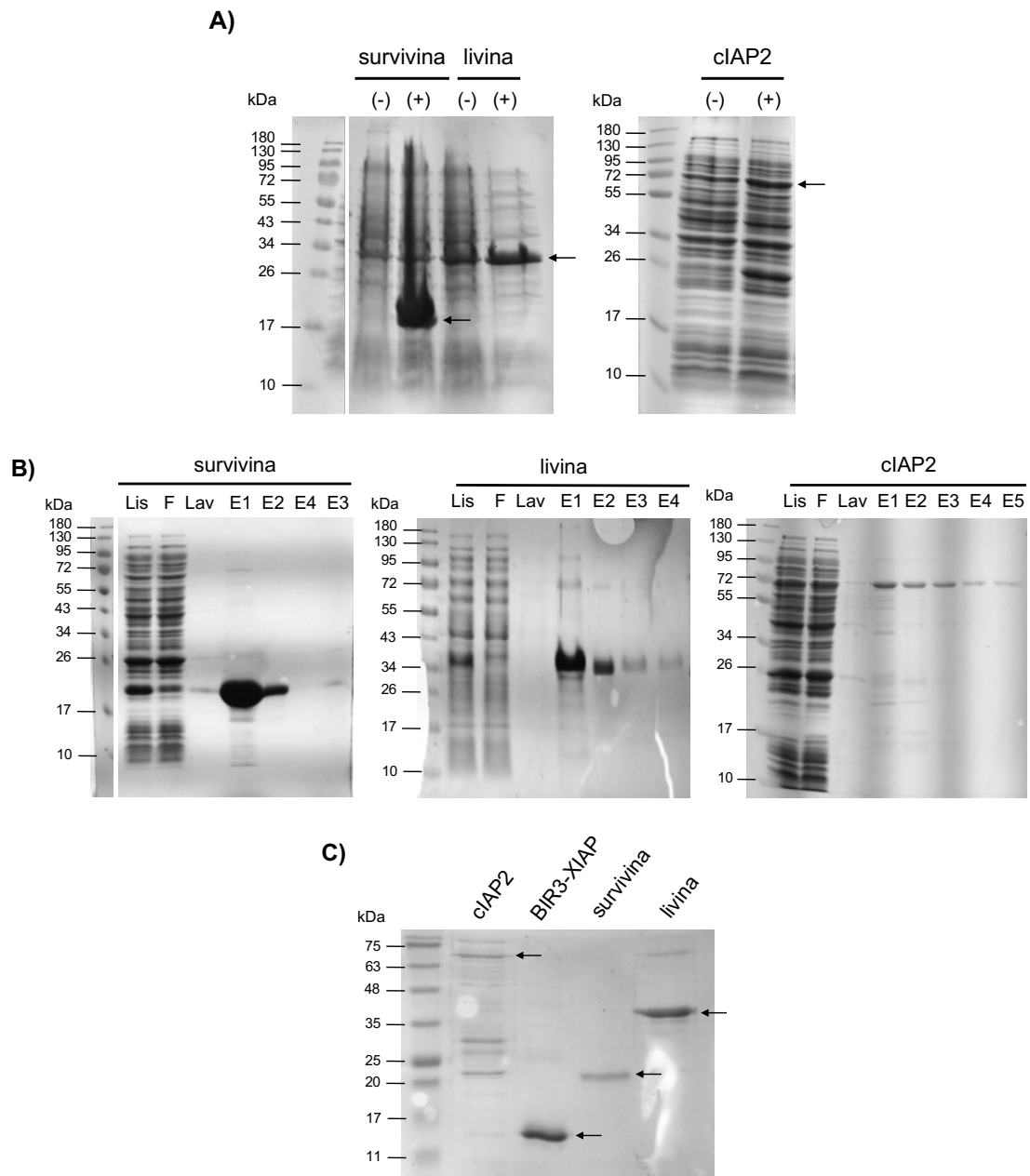


Figura 3.9. Amostras dos processos de expressão heteróloga e purificação das IAPs survivina, livina e cIAP2, e amostra purificada do domínio BIR3 da XIAP (BIR3-XIAP). A) Indução da expressão de survivina e livina, em *E. coli* BL21(DE3), e cIAP2, em *E. coli* BL21(Rosetta 2). B) Purificação da survivina, livina e cIAP2, por cromatografia de afinidade a íons metálicos (IMAC) utilizando coluna com íons Co^{2+} . Lisado celular (Lis); fração filtrada (F) após aplicação na coluna; lavagens I e II reunidas (Lav) e eluições (E1-E4/5) das proteínas com imidazol. C) Amostras das IAPs após diálise, na concentração de 1 mg/mL (proteína total). Todas as amostras foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) a 12%.

Uma vez confirmada a expressão através das respectivas cepas de *E. coli*, survivina, livina e cIAP2 foram expressas em larga escala. Após lise das células, as IAPs foram obtidas por meio de purificação dos respectivos lisados por IMAC utilizando coluna com íons Co^{2+} . As frações contendo as maiores quantidades das proteínas foram reunidas, dialisadas e concentradas por centrifugação. A determinação da concentração proteica foi calculada pelo método de Bradford. As amostras das etapas do processo de purificação (lisado, filtrado, lavagens e eluições) estão apresentadas na figura 3.9 B. As amostras purificadas de survivina e livina foram obtidas a partir das respectivas eluições E1 e E2, com concentrações de 3,9 e 1,5 mg/mL, respectivamente. Enquanto a cIAP2 foi obtida a partir das eluições E2 a E5, com concentrações de 0,25 mg/mL.

As amostras pós-diálise das proteínas survivina, livina e cIAP2 estão apresentadas na figura 3.9 C, bem como a amostra do domínio BIR3 da XIAP, que foi obtido do banco de proteínas do laboratório do prof. Eli Chapman. Como é possível observar, as proteínas BIR3-XIAP, com banda entre 11 e 17 kDa, survivina, com banda em torno 20 kDa, e livina, com banda em torno de 35 kDa, foram obtidas com bom grau de pureza. Por sua vez, a amostra relativa à cIAP2, banda entre 65 e 75 kDa, apresentou várias outras bandas ao longo do gel (figura 3.9 C).

3.4.2 Hits do ensaio de bioafinidade com as IAPs

A busca de moléculas moduladoras da cIAP2, survivina, livina e domínio BIR3 da XIAP, foi realizada através do ensaio de bioafinidade (EB). Nessa abordagem, as IAPs recombinantes acopladas à resina Affi-Gel 15 foram incubadas com os extratos selecionados, obtendo-se ao final, a eluição contendo as moléculas que foram retidas pela proteína-alvo. A detecção dos íons (m/z) dessas moléculas, ou seja, os *hits*, foi realizada através da análise das amostras por CL-EM de alta resolução, seguida de análise dos dados no programa Compass (Bruker). No entanto, a análise das amostras de EB com cIAP2 não foram consideradas, devido as impurezas apresentadas na amostra desta proteína (figura 3.9 C).

Determinado íon foi considerado como um *hit* quando o seu respectivo pico: (i) foi observado na amostra do EB com uma proteína-alvo; (ii) foi detectado na amostra do extrato correspondente; (iii) não foi detectado na amostra controle da análise CL-EM (branco) e (iv) não foi recorrente em todas as outras amostras de EB com a mesma proteína-alvo.

O EB foi realizada com 21 extratos de actinobactérias recuperadas de amostras (sedimento ou invertebrados) coletadas do litoral do Ceará e no Arquipélago São Pedro e São Paulo (ASPSP) (tabela 3.2). Os *hits* obtidos e seus respectivos valores de *m/z* e tempo de retenção, bem como a ocorrência do *hit* por IAP estão apresentados na tabela 3.5. Os cromatogramas indicando os picos dos *hits* e os respectivos espectros de massas estão reunidos no anexo IV.

Dos 21 extratos analisados, dois extratos, BRA154 e BRA166, não apresentaram *hits* (figura 3.10 A, tabela 3.5). Um total de 100 *hits* foram obtidos e, destes, 94 *hits* foram detectados para as três IAPs. Dos seis outros *hits* detectados para até duas IAPs, dois foram detectados apenas para uma IAP: *m/z* 415,2129 (BRA190), para a survivina, e *m/z* 299,0134 (BRA244), para a livina. Mais além, dois hits foram detectados para survivina e livina, *m/z* 215 (BRA234) e *m/z* 481,2228 (BRA258), e dois hits foram detectados para survivina e BIR3-XIAP, *m/z* 269,2 e *m/z* 304,2989 (BRA263) (figura 3.10 B, tabela 3.5).

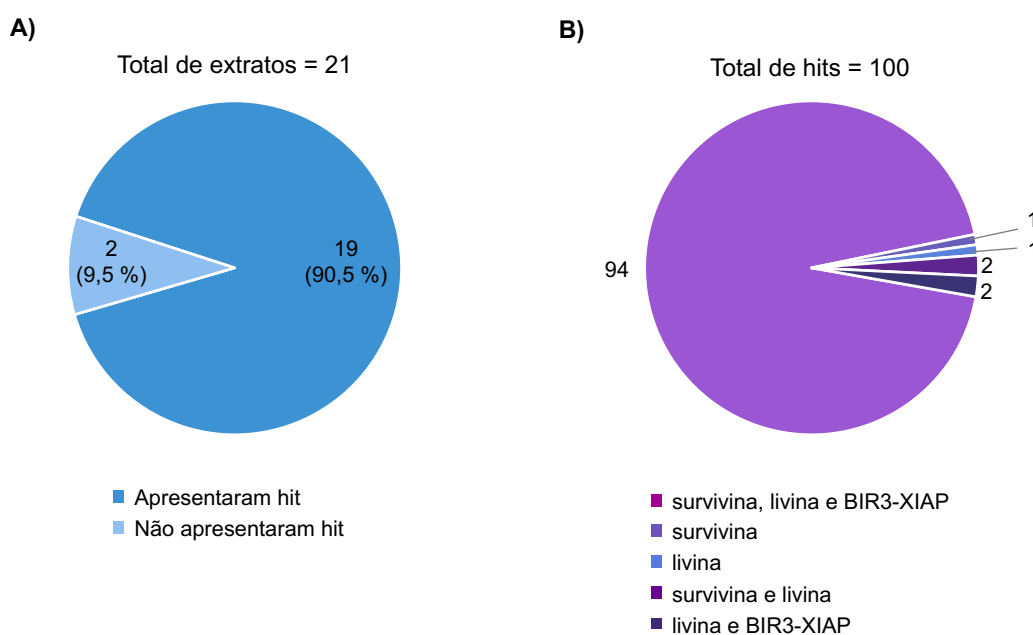


Figura 3.10. Análise da obtenção de *hits* do ensaio de bioafinidade com as IAPs. A) Ocorrência de *hits* entre os extratos os 21 extratos analisados. B) Ocorrência de *hits* por IAP.

Analisando os *hits* detectados, foi possível observar a ocorrência de *hits* semelhantes entre cepas diferentes. Por exemplo, os *hits* com m/z 297,108 e m/z 898,612 foram detectados nos extratos BRA227 e BRA234, com o mesmo tempo de retenção, 16,5 e 23,8 min, respectivamente. De forma similar, os *hits* m/z 481,22 e m/z 467,20 estão presentes nos extratos BRA249 e BRA258, como tempo de retenção praticamente idêntico. O mesmo ocorreu com *hit* m/z 304,299 do extrato BRA249 que também foi detectado no extrato BRA263 (tabela 3.5).

Tabela 3.5. Extratos de actinobactérias marinhas submetidos à cromatografia de bioafinidade com as IAPs e as respectivas m/z retidas (*hits*). As amostras foram analisadas por CL-EM e os *hits* encontrados foram posteriormente confirmados no extrato testado. A presença (★) ou a ausência (-) do *hit* estão indicadas para cada proteína-alvo (Survivina, Livina e BIR3-XIAP). t_R : Tempo de retenção. N. A.: Não se aplica.

Extrato	t_R (min)	m/z [M+H] ⁺	m/z [M+Na] ⁺	Proteínas-alvo		
				Survivina	Livina	BIR3-XIAP
BRA028	8,3	594,3575	---	★	★	★
		625,3949	---	★	★	★
	9,3	364,2390	---	★	★	★
	11,2	482,2995	---	★	★	★
	11,3	466,3073	---	★	★	★
	11,5	478,3052	---	★	★	★
	12,8	448,2999	---	★	★	★
	13,5	464,2900	---	★	★	★
	13,7	398,3414	---	★	★	★
	14,0	432,3005	---	★	★	★
	15,1	401,2677	---	★	★	★
	15,3	401,2675	---	★	★	★
	17,3	401,2675	---	★	★	★
	18,9	282,2063	---	★	★	★
	19,5	509,2748	---	★	★	★
	22,2	250,1804	---	★	★	★
	23,0	493,2802	---	★	★	★
	23,2	415,2845	---	★	★	★
	24,4	498,2858	---	★	★	★
	25,9	225,2434	---	★	★	★
27,0	498,2868	520,2686	★	★	★	

Extrato	t_R (min)	m/z [M+H] ⁺	m/z [M+Na] ⁺	Proteínas-alvo		
				Survivina	Livina	BIR3-XIAP
BRA093	11,7	297,1111	---	★	N. A.	★
	14,7	898,6106	---	★	N. A.	★
	14,9	898,6104	---	★	N. A.	★
	15,0	898,6107	---	★	N. A.	★
	15,3	912,6239	---	★	N. A.	★
	18,1	225,1486	---	★	N. A.	★
	20,8	944,1412	---	★	N. A.	★
	22,6	940,6228	---	★	N. A.	★
	23,5	683,4693	---	★	N. A.	★
	24,1	265,0835	---	★	N. A.	★
	24,3	279,0993	---	★	N. A.	★
	24,5	237,0882	---	★	N. A.	★
	25,0	835,5515	---	★	N. A.	★
	25,2	697,4839	---	★	N. A.	★
	25,7	745,4832	---	★	N. A.	★
	26,3	355,2477	---	★	N. A.	★
	26,5	507,2338	---	★	N. A.	★
	26,7	507,2351	---	★	N. A.	★
26,9	521,2507	---	★	N. A.	★	
27,2	237,0875	---	★	N. A.	★	
27,9	521,2514	---	★	N. A.	★	
BRA134	20,0	511,2347	---	★	★	★
	20,3	497,2192	---	★	★	★
BRA154	---	---	---	N. A.	N. A.	N. A.
BRA166	---	---	---	N. A.	N. A.	N. A.
BRA177	14,7	296,1384	---	★	★	★
	15,2	310,1546	---	★	★	★
	16,1	310,1543	---	★	★	★
	17,4	280,1427	---	★	★	★
	18,0	294,1591	---	★	★	★
	18,3	260,1739	---	★	★	★
	23,6	378,2172	---	★	★	★
	24,0	380,2331	---	★	★	★
	24,5	382,2486	---	★	★	★
	25,6	364,2378	---	★	★	★
	25,9	366,2539	---	★	★	★
	27,5	364,2386	---	★	★	★

Extrato	t _R (min)	m/z [M+H] ⁺	m/z [M+Na] ⁺	Proteínas-alvo		
				Survivina	Livina	BIR3-XIAP
BRA180	26,9	284,3308	---	★	★	★
	28,2	312,3625	---	★	★	★
BRA190	10,8	868,5029	---	★	★	N.A.
	10,9	852,5052	---	★	★	N.A.
	11,0	706,4540	---	★	★	N.A.
	11,5	483,2004	---	★	★	N.A.
	11,7	467,2083	---	★	★	N.A.
	14,5	274,2741	---	★	★	N.A.
	16,7	466,3147	---	★	★	N.A.
	22,1	415,2129	---	★	-	N.A.
BRA203	16,8	466,3164	---	★	★	★
	19,0	355,2654	---	★	★	★
	25,8	480,3080	---	★	★	★
BRA214	20,8	670,4050	---	★	★	★
	20,9	704,3900	---	★	★	★
	21,8	752,3892	---	★	★	★
	22,0	684,4204	---	★	★	★
	22,1	718,4053	---	★	★	★
	26,1	613,3350	635,3168	★	★	★
BRA220	27,8	261,1382	---	★	★	★
BRA227	16,5	297,1081	319,0912	★	★	★
	18,0	239,2474	---	★	★	★
	23,8	898,6125	945,0559	★	★	★
BRA232	15,3	385,2264	---	★	★	★
	19,0	355,2625	---	★	★	★
	20,2	414,2970	---	★	★	★
	30,7	387,2743	---	★	★	★
BRA233	18,9	331,2117	---	★	★	N.A.
	29,2	253,1426	---	★	★	N.A.
BRA234	16,5	297,1083	319,0911	★	★	★
	16,8	311,1249	333,1065	★	★	★
	23,6	215,1273	237,1083	★	★	-
	23,8	898,6115	920	★	★	★
BRA235	17,7	560,3956	---	★	★	N.A.
BRA244	28,0	299,0134	---	-	★	-

Extrato	t_R (min)	m/z [M+H] ⁺	m/z [M+Na] ⁺	Proteínas-alvo		
				Survivina	Livina	BIR3-XIAP
BRA249	19,5	481,2250	---	★	★	★
	19,7	467,2095	---	★	★	★
	20,4	497,2203	---	★	★	★
	24,5	304,2995	---	★	★	★
BRA250	28,2	520,3689	---	★	★	★
BRA258	19,4	481,2228	---	★	★	-
	19,6	467,2082	—	★	★	★
BRA263	20,4	269,2000	—	-	★	★
	24,6	304,2989	—	-	★	★

3.4.3 Rede molecular (*molecular networking*) dos extratos

A construção de redes moleculares (*molecular networking*) foi utilizada como uma ferramenta de análise global dos extratos avaliados pelo ensaio de bioafinidade, a fim de identificar a correlação entre os metabólitos presentes nesses extratos, inclusive os *hits*, a partir do agrupamento dos dados das massas desses extratos. Os dados de massas sequencial (EM/EM) dos 21 extratos de actinobactérias marinhas foram utilizados para construção de uma rede molecular através da plataforma GNPS.

As massas (m/z) dos extratos foram agrupadas quanto ao local em que as respectivas cepas foram obtidas, sendo divididos em dois grupos principais: 1) litoral do Ceará e 2) Arquipélago São Pedro e São Paulo (ASPSP). Além destes, as massas presentes em ambos os grupos também foram discriminadas como o terceiro agrupamento. A relação entre esses grupos de massas pode ser visualizada na figura 3.11.

É possível observar a formação de vários grupos de nós (*clusters*), com cuja maioria é composta por massas provindas de todos os três agrupamentos. Houve também a formação de *clusters* de massas provindas apenas de extratos do litoral do Ceará (verde), outros, apenas de extratos do ASPSP (azul), enquanto outros *clusters* foram formados por massas coincidentes em ambos os locais (rosa) (figura 3.11).

Algumas classes de moléculas identificadas pelo GNPS foram representadas na rede (contorno em linha preta) (figura 3.11). Dentre estas, foram identificados grupos de massas referentes as classes das desferrioxaminas, rifamicinas, prodigininas e salinicetais, formando apenas por massas oriundas de extratos do ASPSP. Um *cluster* referente à classe das estaurosporinas foi identificado e apresenta nós de massas cuja maioria advém de extratos do litoral do Ceará. Outro *cluster* formado apenas por extratos do Litoral do Ceará foi identificado como pertencente a classe das antimicinas. Mais além, outro *cluster* formado, em sua maioria, por massas similares presentes simultaneamente em ambos os locais foi identificado como pertencentes à classe das dicetopiperazinas.

As massas de alguns dos *hits* obtidos pelo ensaio de bioafinidade também foram identificados na rede molecular (sombreado cinza) (figura 3.11). É possível observar que alguns hits se agruparam em *clusters* isolados, como os hits das cepas BRA214 (m/z 670, 704, 752, 684 e 718) e BRA177 (m/z 382, 380, e 366), e para estes não foi atribuída uma classe de moléculas específica pelo GNPS. Para a BRA177, outros quatro *hits* se dividiram em pequenos agrupamentos, um grupo de três nós contendo dois hits (m/z 310 e 296) e dois grupos de dois nós cada um contendo um *hit* (m/z 280 e 378), que também não foram identificados pelo GNPS. Mais além, três *hits* foram identificados dentro do *cluster* das prodigininas. Dessa mesma forma, o *hit* de m/z 467 da BRA249 e BRA258 integrou o *cluster* da classe das estaurosporinas.

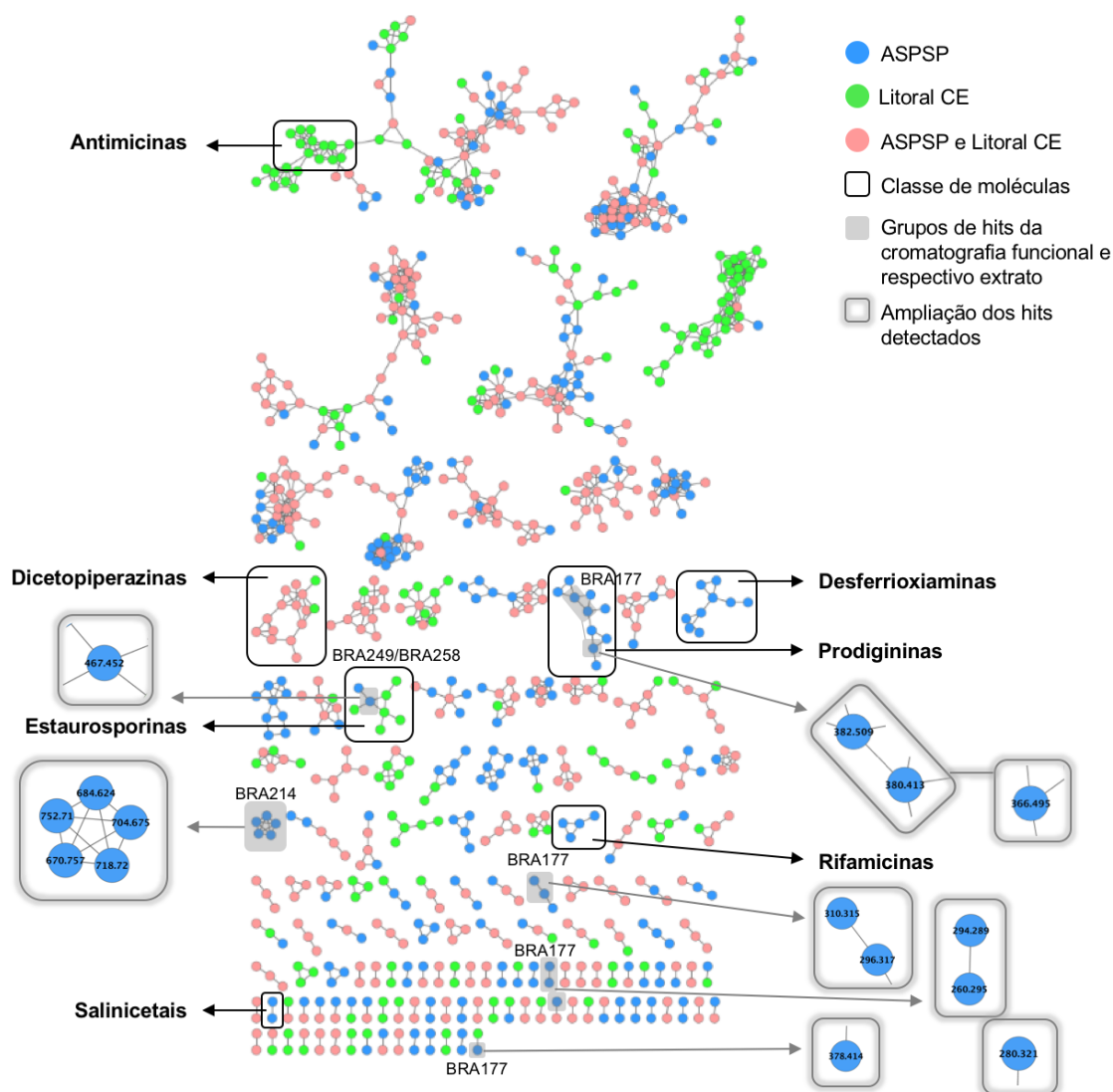


Figura 3.11. Rede molecular (*molecular network*) dos extratos submetidos ao ensaio de bioafinidade. Os dados de massa sequencial (EM/EM) de 21 extratos foram utilizados para construir a rede molecular através da plataforma GNPS (*Global Natural Products Social Molecular Networking*). As massas provenientes apenas de extratos do ASPSP (azul), apenas do litoral do Ceará (verde) ou de ambos os locais (rosa) foram agrupadas quanto a sua similaridade. Também foram identificadas algumas classes de moléculas pelo GNPS (contorno em linha preta) e alguns grupos de *hits* do ensaio de bioafinidade e seus respectivos extratos (sombreados cinza).

3.4.4 Análise e desrepliação dos hits do extrato da *Actinomadura* sp. (BRA177)

Considerando o potencial de diversidade dos *hits* da cepa BRA177 (*Actinomadura* sp.) revelado pela análise de rede molecular, os 12 hits obtidos para as três IAPs foram selecionados para uma análise mais detalhada, incluindo

a desreplicação utilizando duas outras bases de dados de produtos naturais: DNP e AntiMarin.

A identificação dos hits da BRA177 está ilustrada na figura 3.12 A, B e C, que estão sub-divididas em ampliações da corrida total do extrato, nas quais os picos dos *hits* estão indicados pelas setas pretas. Como se pode observar na figura 3.12, os picos dos seis primeiros hits identificados no extrato da BRA177, localizados entre os tempos 12 a 21 min, foram melhor visualizados quando o extrato bruto foi retirado do cromatograma. Os picos dos outros três *hits* subsequentes podem ser observados na ampliação do intervalo entre 21 e 21,5 min (figura 3.12 B). Na ampliação da corrida entre 25,5 a 30 min (figura 3.12 C), estão apontados os três últimos hits, que, nesse caso, podem ser observados na corrida total. Essa notável maior intensidade relativa dos picos 10, 11 e 12 indicam que estes *hits* podem ser também, os compostos majoritários do extrato bruto, pelos métodos aqui utilizados.

É notável, também, que houve um deslocamento dos picos da amostra correspondente a survivina (amarelo) para a direita. Contudo, os picos correspondentes aos *hits* para a amostra dessa proteína puderam ser localizados buscando-se pela massa (m/z) do *hit* no programa Compass (Bruker), e estes picos foram apontados pelas setas tracejadas. Da mesma forma, a corrida do extrato bruto da cepa BRA177 (vermelho) também se apresentou deslocada para a direita e a presença do pico no extrato bruto foi confirmada pela busca no referido programa. No entanto, apenas os picos 5 a 12 puderam ser identificados na corrida do extrato (setas vermelhas) apresentada na figura 3.12.

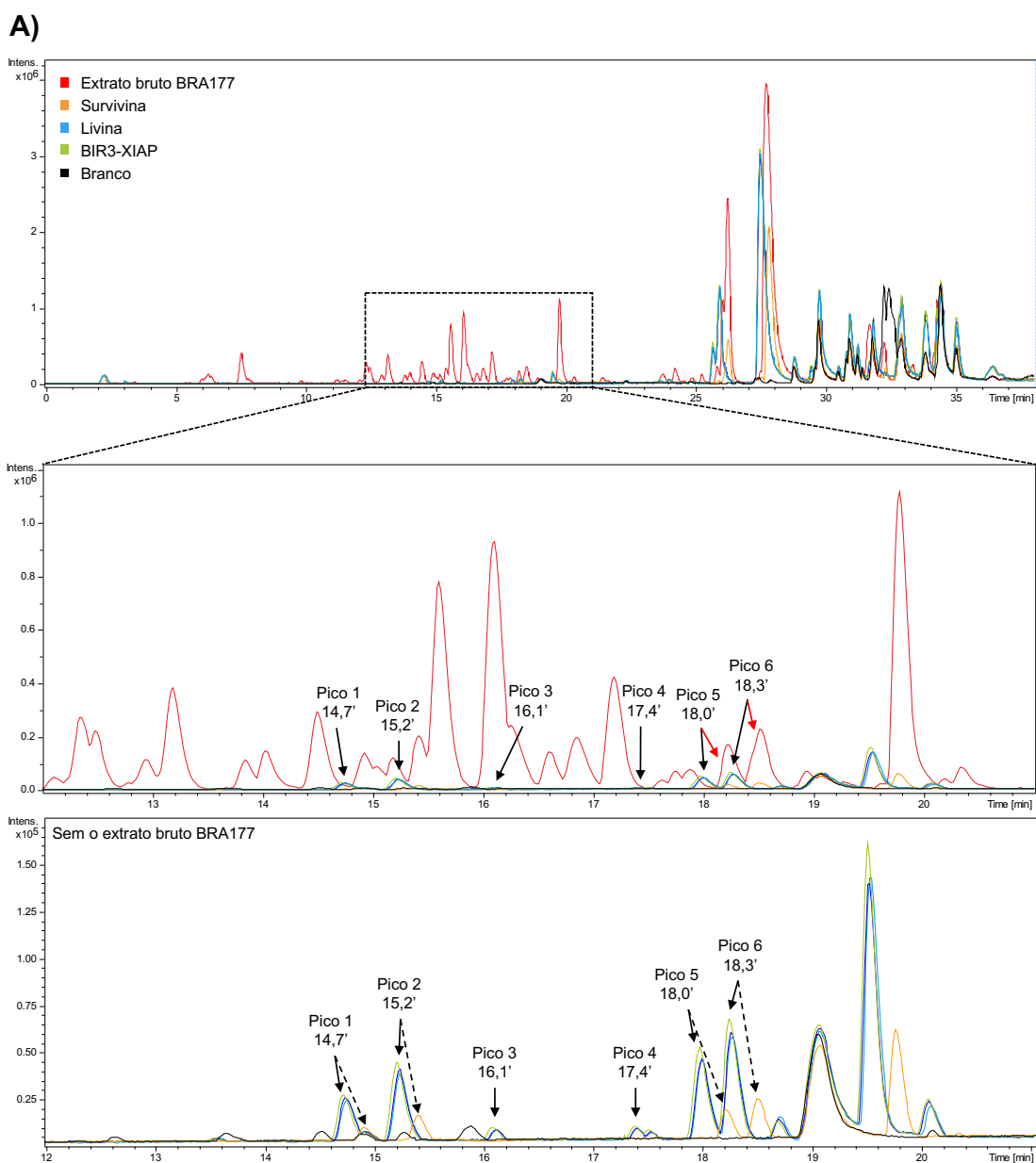


Figura 3.12. Análise do ensaio de bioafinidade do extrato da *Actinomadura* sp. (BRA177). As amostras foram analisadas por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas de alta resolução, modo de massas no íon positivo. A) Os picos dos *hits* detectados nas amostras das IAPs no intervalo de 12 a 21 min (setas pretas e setas pretas tracejadas). A indicação dos *hits* no extrato bruto da BRA177 está indicada pelas setas vermelhas, quando possível. (Continua)

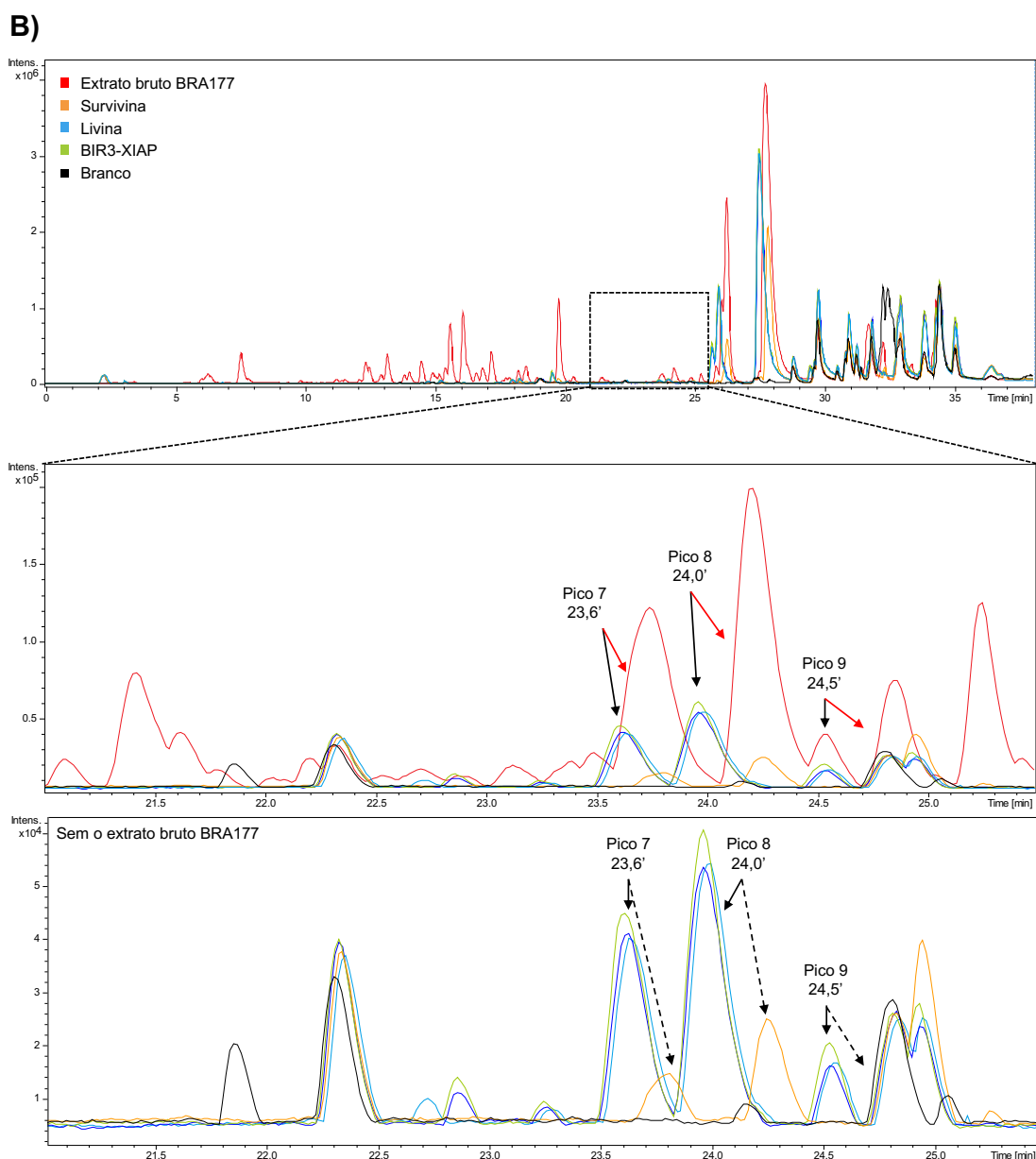


Figura 3.12. Análise do ensaio de bioafinidade do extrato da *Actinomadura* sp. (BRA177). As amostras foram analisadas por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas de alta resolução, modo de massas no íon positivo. B) Os picos dos *hits* detectados nas amostras das IAPs no intervalo de 21 a 21,5 min (setas pretas e setas pretas tracejadas). A indicação dos *hits* no extrato bruto da BRA177 está indicada pelas setas vermelhas, quando possível. (Continua)

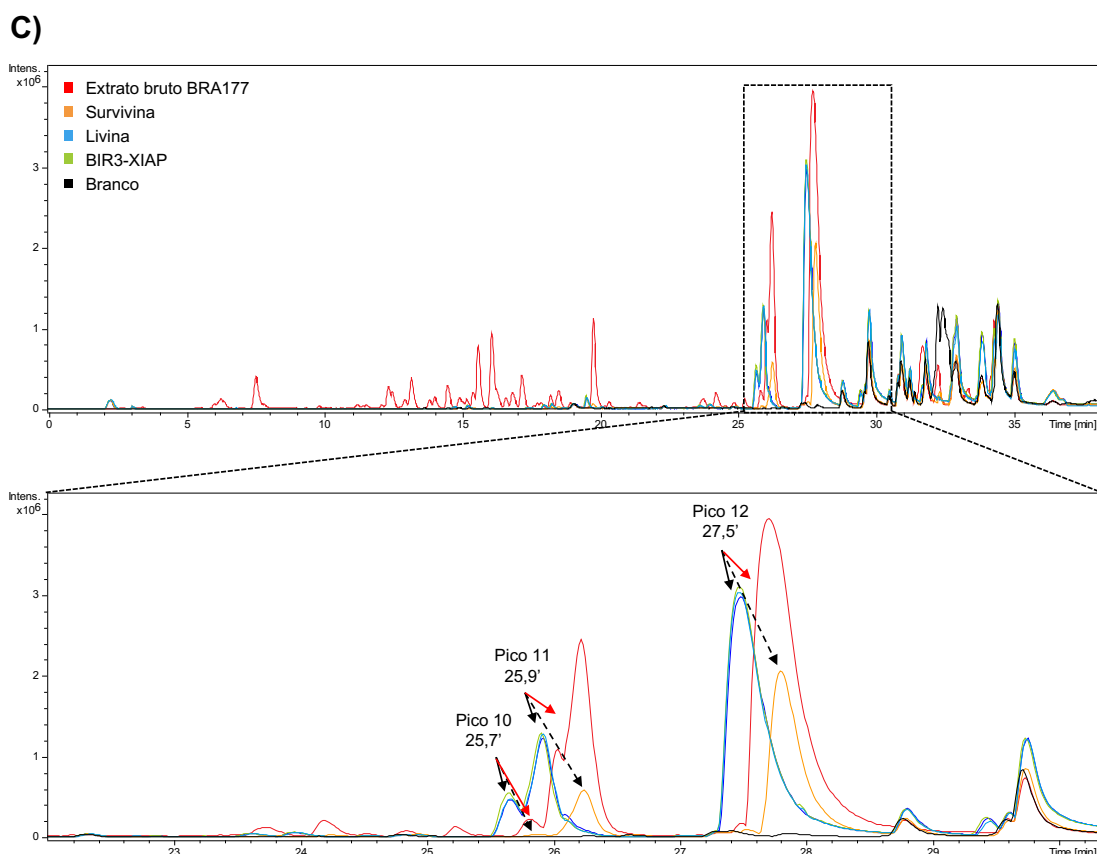


Figura 3.12. Análise do ensaio de bioafinidade do extrato da *Actinomadura* sp. (BRA177). As amostras foram analisadas por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas de alta resolução, modo de massas no íon positivo. C) Os picos dos *hits* detectados nas amostras das IAPs no intervalo de 25,5 a 30 min (setas pretas e setas pretas tracejadas). A indicação dos *hits* no extrato bruto da BRA177 está indicada pelas setas vermelhas, quando possível.

O perfil de UV dos *hits* da BRA177 também pode ser observado pela análise de CL-UV acoplada a espectrometria de massas. Como pode ser observado na figura 3.13, os picos dos 6 primeiros *hits* puderam ser melhor observados no traçado de cromatograma de UV 390 nm (laranja) do que no cromatograma de massas do extrato bruto (preto). Confirmando que estes *hits* estão presentes no extrato bruto da BRA177, porém são notavelmente minoritários. Por outro lado, para os picos 7 a 11, a intensidade foi maior para o UV 250 nm do que para o 390 nm. Já o pico 12 (27,5 min, m/z 364), apresentou forte intensidade em ambos os cromatogramas de UV 250 e 390 nm, confirmando que este é o composto majoritário do extrato.

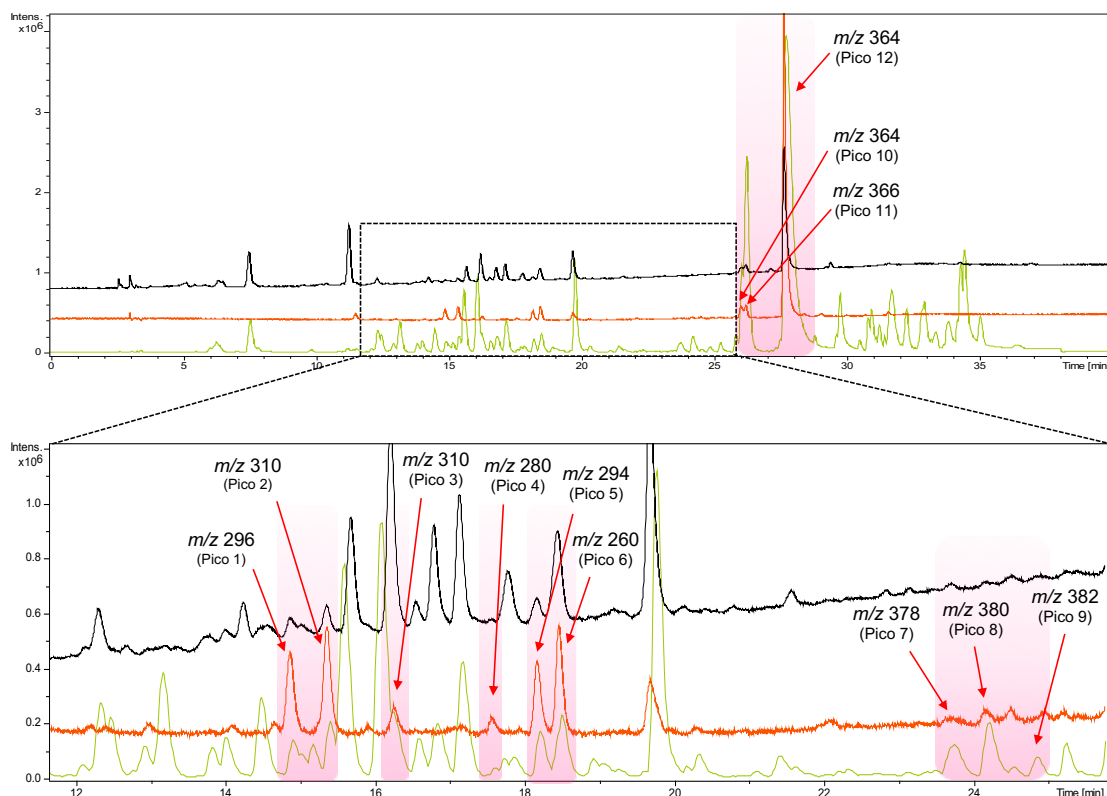


Figura 3.13. Cromatogramas do extrato bruto da *Actinomadura* sp. (BRA177) e respectivos *hits* detectados pelo ensaio de bioafinidade. Os picos dos *hits* e respectivos valores de *m/z* estão indicados pelas setas. Estão representados os cromatogramas de massas (verde), UV 390 nm (laranja) e UV 250 nm (preto).

O resultado da busca dos *hits* nas bases de dados DNP (produtos naturais) e AntiMarin (produtos naturais marinhos e produtos naturais de microorganismos) estão apresentados na tabela 3.6. Para o *hit* de *m/z* 296,13 (pico 1), as bases de dados identificaram diferentes compostos correspondentes, sendo a identificação como um derivado da anantina ou como isoaamina A, pelo DNP, e como decloro-auxarconjugatina B ou Sorafinol A, pelo AntiMarin, as correspondências que mais se aproximam da fórmula molecular sugerida pela análise de CL-EM.

Os *hits* de *m/z* 310,15 (picos 2 e 3) não apresentaram correspondência em ambas as bases de dados. Para o *hit* de *m/z* 280,14 (pico 4), as sugestões identificadas pelo DNP não apontaram diretamente para uma classe de compostos específica, enquanto que o AntiMarin não apresentou correspondências para este *hit*.

Para os *hits* de *m/z* 294,16 e *m/z* 260,17 (picos 5 e 6), ambas as bases de dados indicaram como pertencentes a classe das tambjamins.

Especificamente, o AntiMarin identificou o primeiro tambjamina F, e o segundo como tambjamina K ou primaquina. Para o *hit* de m/z 378,21 (pico 7), ambas as bases de dados sugeriram vários compostos de classes diferentes. Por sua vez, o m/z 380,23 (pico 8) obteve vários compostos correspondentes no DNP, mas não apresentou correspondências no AntiMarin. Já o *hit* de m/z 382,24 foi indicado pelo DNP como uma toxina *Aspergillus sclerotiorum*, enquanto que o AntiMarin o identificou como mellamida ou outro composto derivado deste.

Os três últimos *hits* da BRA177 foram identificados como pertencentes à classe das prodigininas por ambas as bases de dados. Os hits de m/z 364,23 (picos 10 e 12) foram atribuídos por ambas as bases de dados como ciclononilprodigiosina ou metilciclooctilprodigiosina. Já o hit de m/z 366,25 (pico 11) foi identificado como undecilprodigiosina pelo DNP, e nonilprodigiosina, pelo AntiMarin.

Tabela 3.6. Desrepliação dos *hits* provenientes do ensaio de bioafinidade com o extrato da *Actinomadura* sp (BRA177). Os dados de *m/z* e fórmula molecular foram obtidos da análise de CL-EM dos respectivos picos. Esses dados foram usados para pesquisa do *hit* nas bases de dados Dicionário de Produtos Naturais (DNP) e AntiMarin. t_R : Tempo de retenção. N.C.: Nenhuma correspondência. N.O.: Não obtido.

t_R (min)	<i>m/z</i> encontrada [M+H] ⁺	<i>m/z</i> calculada [M+H] ⁺	Erro (ppm)	Fórmula Molecular CL-EM	DNP				AntiMarin			
					[M+H] ⁺ Entrada	Nomes dos compostos encontrados	Fórmula molecular	Massa mol.	[M+H] ⁺ Entrada	Nomes dos compostos encontrados	Fórmula molecular	Massa mol.
14,9	296,1384	296,1394	3,3	C ₁₇ H ₁₈ N ₃ O ₂	295-296	Anantina; (R)-, N-Ac;	C ₁₇ H ₁₇ N ₃ O ₂	N.O.	296,13	1,6-dimetil-adenosina;	C ₁₂ H ₁₇ N ₅ O ₄	295,294
						N6,N6-dimetiladenosina;						
						Isonaamina A				Decloro-auxarconjugatina B;	C ₁₇ H ₁₈ N ₃ O ₂	295,332
										Sorafinol A		
15,4	310,1546	310,1550	1,4	C ₁₈ H ₂₀ N ₃ O ₂	309-310	N.C.	N.C.	-	310,15	N.C.	N.C.	-
16,3	310,1543	310,1550	2,3	C ₁₈ H ₂₀ N ₃ O ₂	309-310	N.C.	N.C.	-	310,15	N.C.	N.C.	-
17,6	280,1427	280,1444	6,3	C ₁₇ H ₁₈ N ₃ O	279-280	2-etil-11-metoxi-3-metil- 3H-[1,6]-nafiridino-[6,5,4 def]-quinoxalina;	C ₁₇ H ₁₇ N ₃ O	N.O.	280,14	N.C.	N.C.	-
						Triptofano; (S)-, anilida						
18,2	294,1591	294,1601	3,3	C ₁₈ H ₂₀ N ₃ O	293-294	Tambjamina A, 1''-N-(2- feniletíl);	C ₁₈ H ₁₉ N ₃ O	N.O.	294,16	Tambjamina F	C ₁₈ H ₁₉ N ₃ O	293,363
						Triptamina, N ^b -(2- metilaminobenzóil)						
18,5	260,1739	260,1757	7,0	C ₁₅ H ₂₂ N ₃ O	259-260	Tambjamina A, 1''-N-(3- metilbutíl);	C ₁₅ H ₂₁ N ₃ O	N.O.	260,175	Tambjamina K	C ₁₅ H ₂₁ N ₃ O	259,347
						Triptofano, (S)- dimetilamida				Primaquina; semissintético		

23,7	378,2172	378,2176	1,1	C ₂₃ H ₂₈ N ₃ O ₂	377-378	Ciclocelabenzina;	C ₂₃ H ₂₇ N ₃ O ₂	N.O.	378,21	Murrayaquinona C	C ₂₄ H ₂₇ NO ₃	377,476
						Isociclocelabenzina;				Paxinorol		
						Margaritarina;						
						R 39MF						
24,2	380,2331	380,2333	0,5	C ₂₃ H ₃₀ N ₃ O ₂	379-380	Dovyalicina A, N ^F -De-Me;	C ₂₃ H ₂₉ N ₃ O ₂	N.O.	380,23	N.C.	N.C.	-
						Lallemancina;						
						2-fenil-1,5,9-triazaciclotridecano-4-ona, (S)-, N ⁹ -benzoil;						
						2-fenil-1,5,9-triazaciclotridecano-4-one; (±)-, N ⁹ -Benzoyl						
						R 39SF						
24,9	382,2486	382,2489	0,8	C ₂₃ H ₃₂ N ₃ O ₂	381-382	Toxina de <i>Aspergillus sclerotiorum</i>	C ₂₃ H ₃₁ N ₃ O ₂	N.O.	382,2486	Mellamida (S,E)-3-metil-2-(N-metilacetamida)-N-(2-(7-(3-metilbut-2-enil)-1H-indol-3-il)vinil)butanamida	C ₂₃ H ₃₁ N ₃ O ₂	381,511
26,0	364,2378	364,2383	1,4	C ₂₃ H ₃₀ N ₃ O	363-364	Nonilprodigiosina;	C ₂₃ H ₂₉ N ₃ O	N.O.	364,238	Ciclononilprodigiosina;	C ₂₃ H ₂₉ N ₃ O	363,496
						Metilciclooctilprodigiosina				Metilciclooctilprodigiosina		
26,1	366,2539	366,2540	0,3	C ₂₃ H ₃₂ N ₃ O	365-366	Undecilprodigiosina; Lower homologue (n = 8)	C ₂₃ H ₃₁ N ₃ O	N.O.	366,254	Nonilprodigiosina	C ₂₃ H ₃₁ N ₃ O	365,512
27,1	364,2386	364,2383	0,7	C ₂₃ H ₃₀ N ₃ O	363-364	Nonilprodigiosina;	C ₂₃ H ₂₉ N ₃ O	N.O.	364,238	Ciclononilprodigiosina;	C ₂₃ H ₂₉ N ₃ O	363,496
						Metilciclooctilprodigiosina				Metilciclooctilprodigiosina		

Por meio da análise de massas sequencial (EM/EM) foi possível obter os espectros de fragmentação dos *hits* da BRA-177, que estão apresentados na figura 3.14, ordenados pelo tempo de retenção. O perfil de fragmentação de um íon é uma característica particular da sua estrutura química, que pode evidenciar a presença de certos grupos funcionais, além de permitir a identificação de íons-fragmentos característicos de certas classes de compostos.

Como pode ser observado na figura 3.14, os espectros de fragmentação dos *hits* de m/z 296 e m/z 310 (pico 2) apresentaram o íon m/z 190 como o íon majoritário em comum. Mais além, o *hit* m/z 310 (pico 2), assim como os *hits* m/z 260, m/z 294, apresentam semelhanças entre os respectivos perfis de fragmentação, em particular, quanto ao íon-fragmento majoritário de m/z 163 e os demais íons na faixa de m/z 130 a 200. O perfil de fragmentação do *hit* de m/z 280 também apresenta alguns íons-fragmentos semelhantes aos observados na mesma faixa dos espectros dos *hits* anteriores, porém com diferenças de intensidade. O perfil de fragmentação do *hit* de m/z 310 (pico 3) não foi obtido, pois este íon não foi selecionado pelo modo automático do equipamento para fragmentação.

Os espectros de fragmentação dos *hits* de m/z 378, 380 e 382 apresentaram, respectivamente, os íons m/z 360, 362 e 364 com íon-fragmento majoritário. Os *hits* de m/z 364 (pico 10 e 12) apresentaram algumas semelhanças nos respectivos perfis de fragmentação, em particular, na faixa de m/z 300 a 350. O *hit* de m/z 366 apresentou perfil de fragmentação diferentes dos dois *hits* supracitados, mas com alguns íons similares na referida faixa de m/z (figura 3.14).

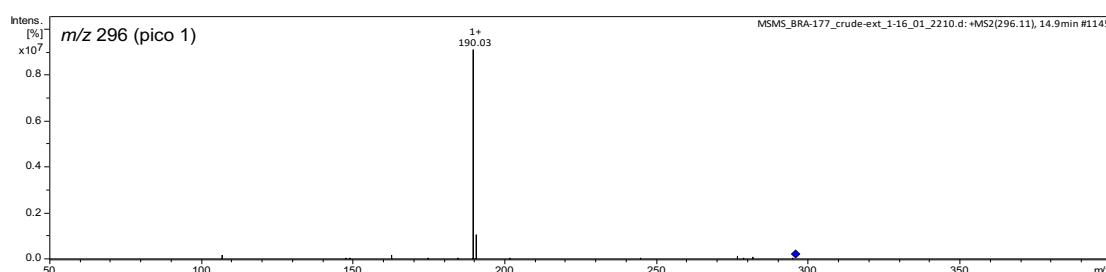


Figura 3.14. Perfil de fragmentação dos *hits* detectados pelo ensaio de bioafinidade no extrato da *Actinomadura* sp. (BRA177). (Continua)

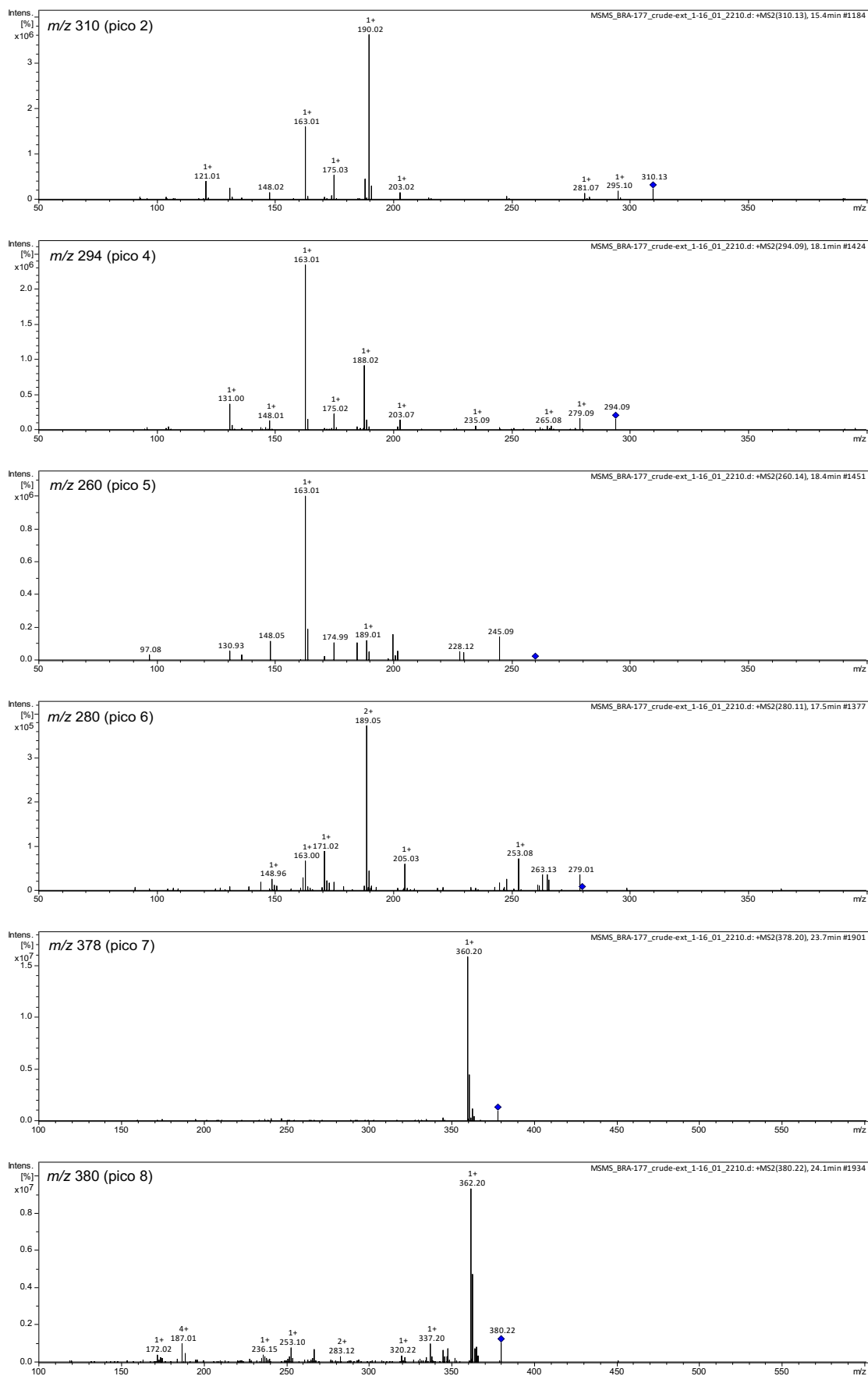


Figura 3.14. Perfil de fragmentação dos hits detectados pelo ensaio de bioafinidade no extrato da *Actinomadura* sp. (BRA177). (Continua)

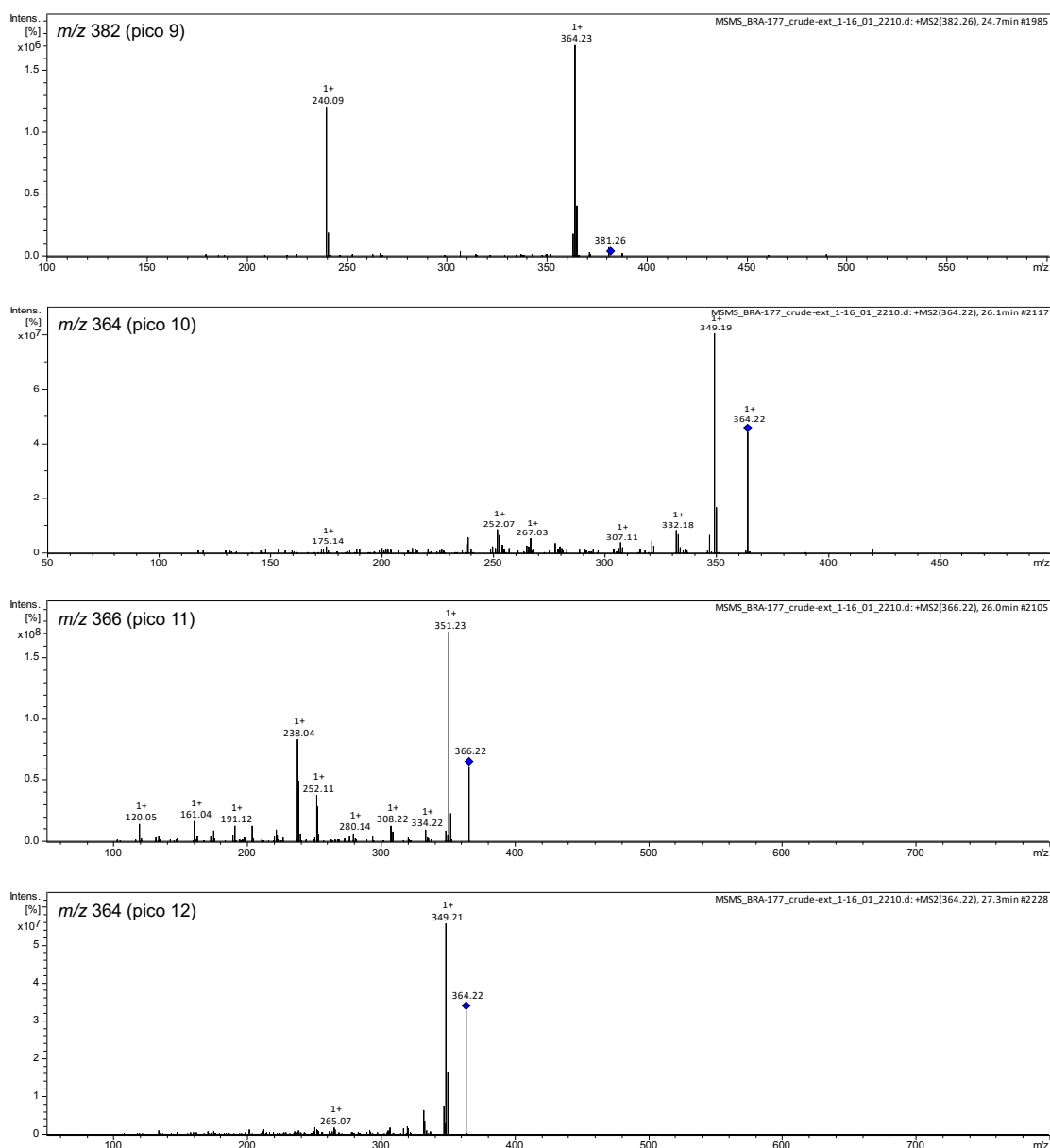


Figura 3.14. Perfil de fragmentação dos hits detectados pelo ensaio de bioafinidade no extrato da *Actinomadura* sp. (BRA177).

3.4.5 Isolamento dos *hits* do extrato da *Actinomadura* sp. (BRA177)

O cultivo em larga escala (10 L) da cepa *Actinomadura* sp. (BRA177) resultou na obtenção de 390,8 mg de extrato bruto. O respectivo extrato foi submetido ao fracionamento químico, guiado por espectrometria de massas, a fim de se isolar os *hits* identificados no ensaio de bioafinidade com as IAPs.

O fracionamento do extrato bruto levou ao isolamento de três compostos pertencentes a classe das prodigininas (figura 3.15). Os compostos

apresentaram coloração avermelhada ou alaranjada e bandas de absorção de luz ultravioleta visível (UV-Vis) em 530 nm. O composto **2** foi obtido em maiores quantidades, em relação aos compostos **1** e **3**, permitindo a sua determinação estrutural por meio de dados de HR-ESI-MS e de RMN H^1 e C^{13} (ver anexo V). A estrutura dos compostos **1** e **3**, foi realizada com base nos respectivos dados de HR-ESI-MS e RMN H^1 (anexo V) e comparados com os dados do composto **2**. Com base nos dados obtidos, os compostos **1**, **2** e **3** foram identificados como metilciclooctilprodigiosina ($[M+H]^+$ m/z 364,2383; $C_{23}H_{29}N_3O$), ciclonoilprodigiosina ($[M+H]^+$ m/z 364,2383; $C_{23}H_{29}N_3O$), e nonilprodigiosina ($[M+H]^+$ m/z 366,2545; $C_{23}H_{31}N_3O$), respectivamente. Estes compostos, por sua vez, correspondem aos três últimos hits, pico 10, 12 e 11 (figura 3.12 B, figura 3.13), respectivamente, identificados nas amostras do ensaio de bioafinidade do extrato BRA177.

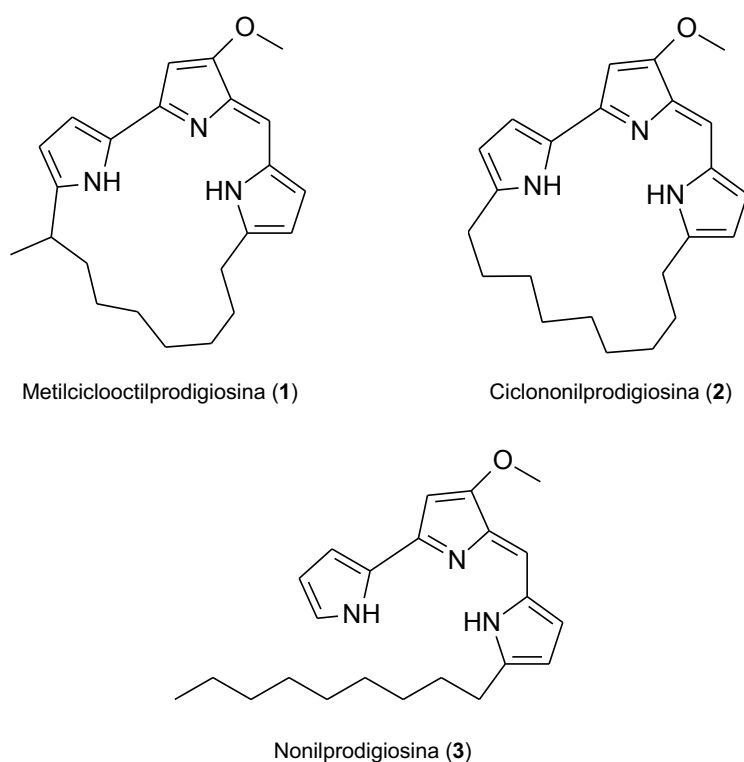


Figura 3.15. Estruturas das três prodigininas isoladas do extrato da *Actinomadura* sp. (BRA177): metilciclooctilprodigiosina, ciclonoilprodigiosina e nonilprodigiosina.

3.4.6 Atividade citotóxica dos hits da *Actinomadura* sp. (BRA177)

Inicialmente, a atividade citotóxica dos três *hits* isolados da BRA177 foi avaliada frente as linhagens celulares SK-Mel-147, MCF-7, HCT-116 e MRC-5, através do ensaio do MTT. Os valores de CI_{50} obtidos estão apresentados na tabela 3.7. Os compostos **2** e **3** apresentaram-se citotóxicos contra a maioria das linhagens celulares, com valores de CI_{50} variando entre 2,4 e 4,25 μ M. No entanto, estes compostos apresentaram maior citotoxicidade frente a linhagem não tumoral MRC-5 ($CI_{50} < 1 \mu$ M). O composto **1**, por sua vez, não apresentou valor de $CI_{50} < 5 \mu$ M para nenhuma das linhagens testadas. A doxorrubicina apresentou citotoxicidade superior ao demais compostos frente a todas as células testadas (tabela 3.7).

Tabela 3.7. Avaliação da atividade citotóxica dos *hits* (prodigininas) isolados da *Actinomadura* sp. (BRA177) frente a um painel de linhagens tumorais e não tumorais. Os compostos foram testados pelo ensaio do MTT com 72h de incubação e os valores de CI_{50} (μ M) e respectivos intervalos de confiança de 95% (IC 95%) foram obtidos através de regressão não-linear, a partir da média de dois experimentos independentes.

Linhagem celular	CI_{50} [μ M] (CI 95%)			
	1	2	3	DOX
SK-Mel-147	> 5	2,40 (1,70 - 3,39)	2,70 (1,35 - 5,38)	0,34 (0,19 - 0,50)
MCF-7	> 5	> 5	> 5	0,06 (0,02 - 0,16)
HCT-116	> 5	3,94 (2,50 - 6,20)	4,25 (3,22 - 5,62)	0,06 (0,03 - 0,12)
MRC-5	> 5	0,58 (0,44 - 0,80)	0,26 (0,10 - 0,68)	0,27 (0,07 - 1,03)

Desse modo, os compostos **2** e **3** foram selecionados para avaliação do efeito citotóxico mediante exposição a longo prazo frente à linhagem SK-Mel-147 através do ensaio clonogênico, utilizando concentrações correspondentes a CI_{10} (a partir do ensaio do MTT de 72 h). Neste ensaio, as células foram incubadas com os referidos compostos por ciclos de incubação de 72 h, ao longo de 14 dias e os resultados estão apresentados na figura 3.16. Os compostos **2**

e **3** ($0,5 \mu\text{M}$), assim como a doxorubicina (DOX, $0,07 \mu\text{M}$) reduziram fortemente a proliferação das células SK-Mel-147, como é possível observar nas imagens das placas (figura 3.16 A) e nos gráficos de número de colônias e da área (figuras 3.16 B e C), em relação ao controle negativo. Sendo o composto **2** o que apresentou efeito mais potente. A prodigiosina (PG, $0,1 \mu\text{M}$), utilizada como composto de referência, também reduziu de forma significativa a proliferação celular em relação ao controle negativo, porém de forma um pouco menos pronunciada do que as prodigininas **2** e **3** (Figura 3.16).

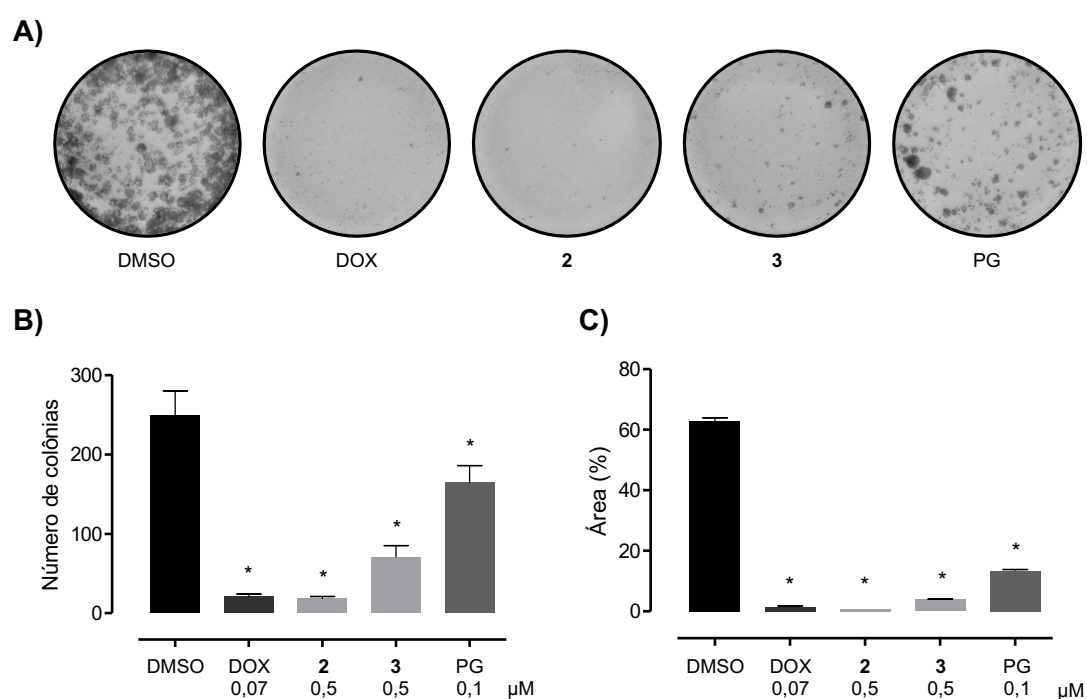


Figura 3.16. Avaliação do efeito citotóxico a longo prazo dos *hits* da *Actinomadura* sp. (BRA177) frente à linhagem SK-Mel-147. As células SK-Mel-147 foram submetidas a ciclos de incubação de 72 h, ao longo de 14 dias, com compostos **2** e **3** ($0,5 \mu\text{M}$), ou DMSO ($0,5 \%$) ou doxorubicina (DOX, $0,07 \mu\text{M}$) ou prodigiosina (PG, $0,1 \mu\text{M}$). As imagens das placas (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 por ANOVA seguido por teste de Dunnet.

3.5 DISCUSSÃO

O crescente conhecimento das bases moleculares do câncer tem permitido o melhor entendimento de fenótipos específicos das células tumorais, assim como a descoberta de novos alvos moleculares para a prospecção alvo-direcionada (MOFFAT; RUDOLPH; BAILEY, 2014). A resistência à morte celular por apoptose, um dos fenótipos clássicos das células tumorais, está associada ao aumento da expressão de proteínas de sobrevivência celular e como desenvolvimento de resistência às terapias anticâncer convencionais (BAI; WANG, 2014; PANDEY et al., 2016).

A família de proteínas inibidoras da apoptose (IAPs) estão entre as proteínas anti-apoptóticas que previnem a execução das vias apoptóticas através da interferência direta ou indireta da ativação das caspases. Além disso, as IAPs regulam outras vias de sobrevivência e possuem funções adicionais em outros processos celulares, como no ciclo celular e na migração. A superexpressão das proteínas IAPs é frequentemente detectada em diversos tipos de tumores e também tem sido vinculada à progressão tumoral, falha no tratamento e mau prognóstico (FULDA; VUCIC, 2012; OWENS et al., 2013).

Em vista disso, este trabalho realizou a busca por substâncias naturais moduladoras das IAPs cIAP2, survivina, livina e BIR3-XIAP, com consequente potencial anticâncer, em extratos de actinobactérias marinhas. Para tanto, um método baseado na afinidade, originalmente batizado de cromatografia funcional, descrito recentemente e aplicado a apenas poucas proteínas, abordadas na perspectiva de um novo alvo farmacológico (KANG et al., 2014; LAU et al., 2015b), foi empregado neste trabalho como estratégia de prospecção alvo-direcionada utilizando, neste caso, tais IAPs como proteínas-alvo.

O referido ensaio de bioafinidade se baseia em um conceito bioquímico bem estabelecido e largamente aplicado, que é a afinidade de ligação entre uma molécula ligante e sua proteína-alvo. A partir deste conceito, essa metodologia foi desenvolvida visando uma aplicação prática, aonde a proteína-alvo é acoplada a um suporte sólido (resina), em solução, como “isca” para reter moléculas em extratos orgânicos complexos (LAU et al., 2015b).

Contudo, este ensaio, na realidade, pode ser incluído em uma categoria de ensaios de captura e isolamento de ligantes – no inglês, denominada *ligand fishing assay* – que usam o mesmo princípio de funcionamento. Fundamentalmente, estes ensaios imobilizam biomoléculas-alvo na superfície de diferentes tipos de matrizes (biosensores, fibras, micro e nano-esferas) que são diretamente imersas numa mistura complexa, na qual os compostos ligantes se ligarão as biomoléculas enquanto os não-ligantes permanecerão na solução. Os compostos ligados, então, precisam ser eluídos para identificação (DE MORAES et al., 2016; ZHUO et al., 2016).

A padronização do ensaio de bioafinidade para uso com as IAPs, realizada no presente estudo, iniciou-se com a expressão das respectivas proteínas recombinantes contendo uma cauda 6His N-terminal em linhagens de *E. coli* BL21(DE3), para survivina e livina, e *E. coli* BL21(Rosetta 2), para cIAP2. A BIR3-XIAP foi obtida como proteína já purificada, previamente expressa em *E. coli* BL21(DE3) pelo laboratório do Dr. Eli Chapman. A purificação por cromatografia de afinidade à íons metálicos (IMAC) com íons cobalto resultou na obtenção das amostras de survivina (banda em torno 20 kDa) e livina (banda em torno de 35 kDa) com boa pureza. Da mesma forma, a amostra de BIR3-XIAP (banda entre 11 e 17 kDa), também apresentou pureza satisfatória. No entanto, a cIAP2 (banda entre 65 e 75 kDa) não foi obtida com pureza satisfatória, revelando a necessidade de melhoria e otimização dos seus processos de expressão e purificação.

As IAPs utilizadas neste estudo apresentaram-se com peso molecular aproximado ao calculado, por vezes um pouco acima, a partir das respectivas sequências de aminoácidos reportadas na literatura, incluindo a cauda 6His, a saber: 17,2 kDa para survivina (AMBROSINI; ADIDA; ALTIERI, 1997), 33,6 kDa para livina (KASOF; GOMES, 2001), 69,2 kDa para cIAP2 (ROTHER et al., 1995) e 14 kDa para BIR3-XIAP (SUN et al., 2000). Outros trabalhos também reportam a obtenção destas IAPs recombinantes com peso molecular aparente similar ao aqui observado. No trabalho de Schmitz e colaboradores (2000), a survivina recombinante, com cauda 6His, obtida através de expressão em *E. coli* M15[pREP4] e a purificação por IMAC com coluna de níquel, apresentou-se com uma banda em torno de 20 kDa em gel de poliacrilamida (SCHMITZ et al., 2000).

No estudo de Varfolomeev e colaboradores (2012) a livina recombinante, com cauda 6His, foi expressa em *E. coli* BL21-Gold (DE3) e purificada em coluna de níquel, resultando em uma banda majoritária em torno de 39 kDa em gel de poliacrilamida (VARFOLOMEEV et al., 2012). Zhou e colaboradores (2012), entretanto, obtiveram a livina recombinante, também com cauda 6His, através de expressão em *E. coli* rosetta 2 (DE3) e purificação em coluna de níquel, como uma banda entre 25 e 37 kDa (ZHOU et al., 2012).

Para as proteínas BIR3-XIAP e cIAP2, os estudos encontrados envolvendo o uso destas proteínas recombinantes não apresentaram as imagens do gel e nem reportaram o peso molecular. Outros estudos ainda obtiveram as proteínas purificadas comercialmente disponíveis, a partir do qual foi possível acessar as informações fornecidas por algumas empresas, onde BIR3-XIAP e cIAP2 foram apresentadas com peso molecular de 14,2 kDa e 71 kDa respectivamente (BIOLOGICALS, 2018; BIOSCIENCE, 2018; LEE et al., 2015). Mais além, Hu e colaboradores (2017), ao estudar a relação das IAPs com o fator de transcrição TRIP-Br1, obtiveram uma banda de 70 kDa referente a cIAP2, revelada por meio de western blot com amostras provenientes do experimento de *pull down* com a GST-TRIP-Br1 (HU et al., 2017).

Uma vez obtidas, as IAPs recombinantes foram ligadas à uma resina com afinidade a proteínas (Affi-gel 15), com base na sua capacidade de se ligar de forma espontânea e covalente às amins primárias. A eficiência da ligação à resina das IAPs aqui produzidas não foi calculada experimentalmente nesta ocasião, no entanto, outros trabalhos do nosso grupo de pesquisa comprovaram que estas proteínas são capazes de se ligar eficientemente à resina Affi-gel (dados não publicados). Mais além, os dois trabalhos publicados que empregam esta técnica demonstraram acoplamento das proteínas testadas (p97, HSC70, HSPA1A, MDH e FtsZ) sem prejuízos significativos para a função enzimática destas, revelando a adequabilidade dessa resina para o propósito do ensaio de bioafinidade (KANG et al., 2014; LAU et al., 2015b).

O fato de que o ensaio de bioafinidade ter sido inicialmente aplicado a proteínas com atividade enzimática permitiu a utilização dessa atividade bioquímica como estratégia para validação e estudo da atividade biológica dos *hits* obtidos frente ao alvo (KANG et al., 2014; LAU et al., 2015b). Diferentemente, as IAPs são um alvo proteico não enzimático, e, nessa

perspectiva, o ensaio de bioafinidade também se configurou como um método de prospecção-alvo direcionada aplicável a estes tipos de proteínas, porém a validação da atividade biológica traz desafios adicionais.

Considerando tal ensaio de bioafinidade como um ensaio de “*ligand fishing*”, é importante também diferenciá-lo de outras estratégias baseadas na bioafinidade, mas que usam um sistema cromatográfico e são denominadas cromatografias de bioafinidade. A cromatografia de bioafinidade é caracterizada pela imobilização do alvo biológico em uma coluna cromatográfica (fase estacionária) e tipicamente classificada de acordo com o modo de eluição dos ligantes, que pode ser zonal ou frontal. Ambas as estratégias tem sido aplicadas para a identificação de novas substâncias ligantes e ativas para o tratamento do câncer, além de diversas outras aplicações analíticas biomédicas e farmacêuticas (DE MORAES et al., 2016; HAGE et al., 2012).

A cromatografia de bioafinidade zonal envolve a injeção de pequenas quantidades do(s) ligante(s) através da coluna sob condições lineares de eluição e um detector on-line monitora o tempo de eluição ou o volume da amostra. Dessa forma, o fator de retenção do soluto (k) injetado é calculado e quantifica o nível de interação com a coluna de bioafinidade. Diferentemente, a cromatografia de bioafinidade frontal, é realizada sob condições de equilíbrio dinâmico, onde a amostra é continuamente infundida na coluna (geralmente, na fase móvel), e cada constituinte da amostra emerge em um tempo diferente, dependendo da sua concentração e afinidade com a fase estacionária (DE MORAES et al., 2016; HAGE et al., 2012).

Dessa forma, tais estratégias de cromatografia de bioafinidade também se diferenciam do ensaio de bioafinidade empregado neste estudo quando ao modo de detecção dos ligantes, visto que naquelas a imobilização da molécula alvo dentro do sistema cromatográfico permite a triagem por bioafinidade, a detecção e análise simultâneas (ou “*on-line*”). Enquanto que, no ensaio de bioafinidade, a etapa de triagem é realizada separadamente do sistema de detecção e análise (ou “*off-line*”) (HAGE, 1998; ZHUO et al., 2016). Este diferencial, todavia, confere certa independência quanto a realização do ensaio de triagem por bioafinidade, especialmente em laboratórios que não disponham de instrumentação cromatográfica imediata.

O ensaio de bioafinidade com survivina, livina e domínio BIR3-XIAP como proteínas-alvo, realizado com 21 extratos de actinobactérias marinhas, resultou na obtenção de 100 *hits*. Apenas dois extratos, BRA154 e BRA166, não apresentaram *hits*. A maioria dos *hits* (94 %) foram detectados para todas as proteínas-alvo, o que indica que estes compostos possivelmente não apresentam especificidade de interação entre survivina, livina e BIR3-XIAP. No entanto, houve seis *hits* que não foram detectados para todas as proteínas-alvo e dois *hits*, provindos de extratos diferentes, apenas para livina e survivina, abrindo perspectivas para avaliação da seletividade destes compostos para estas proteínas-alvo.

Por serem proteínas da mesma família, as semelhanças estruturais entre survivina, livina e BIR3-XIAP, poderiam explicar a detecção da maioria dos *hits* para todas estas proteínas. À primeira vista, o domínio BIR é a característica em comum entre survivina e livina, e BIR3-XIAP é um dos três domínios BIR da XIAP. Alguns trabalhos os consideram como pertencentes ao mesmo grupo de domínio BIR, o grupo do tipo II. No geral, os domínios BIR do tipo II apresentam capacidade de se ligar a um sítio específico presente em caspases e antagonistas endógenos, chamado IBM (do inglês, *IAP binding motif*) (GYRD-HANSEN; MEIER, 2010; SILKE; VAUX, 2001). Essa propriedade foi confirmada para BIR3-XIAP, que se liga à caspase-9 inibindo a sua dimerização, e essa interação já foi observada tanto por estudos bioquímicos com células tumorais (SRINIVASULA et al., 2001), como por cristalografia (SHIOZAKI et al., 2003).

O domínio BIR da livina é principalmente reconhecido pela sua capacidade de se ligar a Smac/DIABLO (MA et al., 2006) e sua capacidade de ligação às caspases-3 e -9 tem sido acessada de forma indireta, através de estudos bioquímicos em células tumorais (PANDEY et al., 2016; VUCIC et al., 2000). Já o domínio BIR da survivina costuma ser referido como um tipo de domínio BIR diferente do domínio BIR da livina e BIR3 da XIAP. As evidências de que o domínio BIR se liga diretamente às caspases ainda são controversas na literatura e o mecanismo de inibição da ativação das caspases pela survivina ainda precisa ser melhor esclarecido (ALTIERI, 2015; LACASSE et al., 2008).

É preciso considerar, também, que um *hit* detectado pelo ensaio de bioafinidade pode interagir de forma diferente com os diferentes domínios BIR das IAPs testadas ou, ainda, pode interagir com diferentes níveis de afinidade

com este domínio ou com outras regiões da proteína-alvo. No entanto, para a comprovação experimental da seletividade e afinidade dos *hits* encontrados é necessário agregar outros métodos que permitam o estudo físico-químico dessa interação proteína-ligante. Dentre os ensaios existentes para tal fim, estão o ensaio de ligação por calorimetria de titulação isotérmica, o ensaio de ligação por termoforese em microescala, e, também, a cromatografia de bioafinidade frontal (DE MORAES et al., 2016; JERABEK-WILLEMSSEN et al., 2014), contudo, estes requerem o isolamento do *hit*. Ademais, é válido ressaltar que a realização do ensaio de bioafinidade com outra proteína que não pertença à mesma classe das proteínas-alvo é um controle experimental para ligações não específicas que deve ser adotado.

O ensaio de bioafinidade também permitiu a identificação de *hits* com tempo de retenção de massa (m/z) semelhantes. As duas duplas de cepas e seus *hits* semelhantes, BRA227 e BRA234 (m/z 297 e 898), e BRA249 e BRA 258 (m/z 481 e 467) compartilham também o mesmo local de origem. Este resultado indica que o método foi capaz de reproduzir a captura de *hits* semelhantes em amostras diferentes.

A construção da rede molecular dos 21 extratos de actinobactérias, através da plataforma GNPS, permitiu a visualização panorâmica da similaridade espectral dos compostos presentes nos extratos analisados. Nessa visão, foi possível notar as relações entre os grupos formados (*clusters*) quanto ao local de origem do extrato e, sobretudo, localizar alguns *hits* do ensaio de bioafinidade e desreplicar algumas famílias de moléculas naturais.

Na rede molecular, cada nó representa – a m/z ou “massa” de – uma única entidade química presente em um ou mais extratos. Os grupos de nós conectados compõem famílias moleculares cujas massas parentais podem diferir, mas cujos espectros de EM/EM são mais semelhantes entre si do que qualquer outro espectro do conjunto de amostras (FLOROS et al., 2016; NGUYEN et al., 2013).

A identificação de massas presentes simultaneamente em extratos oriundos de cepas recuperadas do Arquipélago São Pedro e São Paulo (ASPSP) e do litoral do Ceará indicam a produção de compostos semelhantes por estas cepas. Estes compostos em comum podem ser resultantes do metabolismo das actinobactérias durante o cultivo sob condições laboratoriais similares.

Entretanto, a formação de alguns grupamentos de massas de extratos provenientes apenas do ASPSP ou apenas do litoral do Ceará indicam a produção de metabólitos potencialmente exclusivos dos extratos das cepas desses dois ambientes marinhos tão distintos. De fato, os extratos utilizados neste trabalho foram provenientes de actinobactérias recuperadas de amostras que diferem tanto quanto à localização geográfica na qual foram coletadas, como, também, quanto ao tipo de amostra. A maioria das cepas, 19 das 21, foram recuperadas de amostras do sedimento, sendo que dessas, dez cepas foram obtidas a partir do sedimento do ASPSP e oito cepas, do sedimento de diferentes praias do litoral do Ceará. As amostras de sedimento do ASPSP foram coletadas através de mergulho com SCUBA há cerca de 16 m de profundidade (FERREIRA, 2014; FERREIRA et al., 2016). Já a maioria das amostras de sedimento do litoral do Ceará foram coletadas na zona entre-marés, durante a maré baixa, nas praias da Taíba, Paracuru e Mucuripe (GUIMARÃES, 2013; VASCONCELOS, 2017). Apenas duas cepas do sedimento foram provenientes do sedimento da dragagem do Porto do Mucuripe (VASCONCELOS, 2017). Por fim, as outras duas cepas restantes, que não provem de amostras de sedimento, foram recuperadas de invertebrados coletados no ASPSP, sendo uma amostra de ascídia (não identificada) e a outra, do zoantídeo *Palythoa caribaeorum*. Tal diversidade de amostras precursoras implica em uma diversidade no repertório químico das cepas de actinobactérias dali recuperadas e a rede molecular permitiu a visualização de tal diversidade.

É importante considerar, no entanto, que nem todos os compostos presentes em todos os extratos compuseram a rede aqui construída e isto pode ser explicado por dois fatores principais. Primeiro, nem todos os íons foram selecionados para fragmentação na análise por CL-EM/EM, visto que esta foi realizada no modo automático do equipamento, que selecionou os íons a serem fragmentados com base na sua intensidade (os três mais intensos por espectro de massas inicial). Dessa forma, não foram obtidos espectros de fragmentação dos íons com intensidade abaixo da linha de corte. Segundo, a construção da rede molecular requer o agrupamento de pelo menos dois espectros de fragmentação similares de determinado íon. Logo, se um íon apresentou um espectro de fragmentação único, este não foi apresentado na rede molecular elaborada no GNPS.

De acordo com Floros e colaboradores (2016), a aquisição de dados de fragmentação não direcionada, ou seja, com base na intensidade, permite capturar um inventário imparcial dos metabólitos mais abundantes presentes em cada cultura. Além disso, o critério de agrupamento de dois ou mais espectros de fragmentação para a rede molecular no GNPS remove grande parte dos espectros de ruído, resultantes de artefatos presentes na corrida, e espectros quiméricos, resultantes da fragmentação simultânea de dois ou mais íons com massa similar, da análise, visto que suas “impressões digitais” espectrais não foram reproduzidas (FLOROS et al., 2016).

A rede molecular resultou na desreplicação de sete diferentes classes conhecidas de produtos naturais. Dessas, quatro classes – desferrioxaminas, rifamicinas, prodigininas e salinicetais – foram encontradas apenas em extratos de actinobactérias do ASPSP, ao passo que uma classe – antimicinas – foi identificada apenas nos extratos do litoral do Ceará. Mais além, diferentes compostos das classes das estaurosporinas apresentaram-se tanto em extratos do ASPSP como do litoral do Ceará, enquanto que a classe das dicetopiperazinas apresentou compostos semelhantes em extratos de ambos os locais.

No trabalho de Ferreira e colaboradores, o estudo pioneiro do nosso grupo de pesquisa para prospecção de produtos naturais a partir do sedimento coletado no ASPSP, um total de 268 cepas foram recuperadas e, destas, 94 cepas foram cultivadas em meio líquido e submetidas à extração química com três solventes (acetato de etila, metanol e butanol). Dos 224 extratos testados, 41 foram capazes de inibir mais que 70% da proliferação celular de células HCT-116 pelo ensaio do MTT. A caracterização química de 17 extratos ativos através de análise por CL-EM/EM combinada com busca na base de dados AntiMarin permitiu a identificação de diversos compostos, como salinicetais A e B, estaurosporina e os seus derivados, N-metil-estaurosporina e hidroximetil-estaurosporina, N-carbomil-estaurosporina, salinisporamicina A, rifamicinas B e S, dentre outros (FERREIRA, 2014; FERREIRA et al., 2016).

Dentre os extratos ativos desreplicados no estudo de Ferreira, estão os extratos das cepas BRA166 (*Actinomadura* sp.) e BRA190 (*Salinispora arenicola*), que também fazem parte do presente estudo. Especificamente, foram anotadas a presença de estaurosporina e hidroximetil-estaurosporina para o

extrato da BRA166, e salinictais A e B, salinisoramicina A e rifamicina B, e, também, estaurosporina e hidroximetil-estaurosporina, para o extrato da BRA190 (FERREIRA, 2014; FERREIRA et al., 2016).

Noutro trabalho do nosso grupo com actinobactérias do sedimento do ASPSP, Pires (2016) realizou o estudo de mineração genômica e de metabolômica de cepas do gênero *Salinispora*. Neste estudo, foi realizada a construção da rede molecular na plataforma GNPS com 130 extratos, sendo 119 cepas de *Salinispora* da coleção do *Scripps Institution of Oceanography* (UCSD) e 21 de cepas de *Salinispora* coletadas no ASPSP, incluindo BRA134, BRA190 e BRA258, também empregadas neste estudo. Nessa análise, foi possível identificar cinco grupos de compostos conhecidos presentes nos extratos das cepas brasileiras, representados por desferrioxaminas, enterocina, estaurosporina, salinictais e rifamicina. Especificamente para a cepa BRA134, foi detectado a presença de salinictal B e rifamicina W; para BRA190, salinictal A e B; e para BRA258, salinictal B. Mais além, a rede molecular também revelou a presença de alguns compostos no extratos das cepas do ASPSP não compartilhados com outras estirpes do mesmo gênero, indicando o potencial das cepas brasileiras na produção de novos produtos naturais (PIRES, 2016).

Crüsemann e colaboradores (2016) também analisaram a ocorrência de famílias moleculares conhecidas através de rede molecular com extratos de actinobactérias marinhas. Os autores produziram 603 extratos a partir do cultivo de 120 cepas do gênero *Salinispora* em meio A1 sólido seguida de extração sequencial com três solventes (acetato de etila, butanol e metanol); e do cultivo de 26 cepas do gênero *Streptomyces* em três meios de cultura sólidos (A1, MS e R5) seguido do mesmo esquema de extração. A rede molecular permitiu a identificação de 15 famílias moleculares conhecidas através da plataforma GNPS, das quais quatro – desferrioxaminas, estaurosporinas, rifamicinas, rosamicinas – foram detectadas em extratos de ambos os gêneros *Salinispora* e *Streptomyces* (CRÜSEMANN et al., 2016).

Diante do exposto, fica evidente o potencial da análise metabolômica por meio da rede molecular através da plataforma GNPS, permitindo a desreplicação de compostos a partir de grande número de amostras, com grande diversidade e complexidade. Aqui neste trabalho, a rede molecular foi aplicada, também, para a identificação de alguns *hits* detectados no ensaio de

bioafinidade. Interessantemente, cinco dos seis hits da BRA214 formaram um agrupamento único, indicando que estes pertençam a mesma classe de compostos, no entanto, não foi identificada pelo GNPS. O *hit* de m/z 476 de ambas as cepas BRA249 e BRA258 é, de acordo com o GNPS, um composto correspondente a classe das estaurosporinas.

Dos 12 *hits* detectados no extrato da BRA177, três, m/z 382, 380, e 366, foram identificados como prodigininas na base de dados do GNPS. Entretanto, o agrupamento de três nós formado pelos *hits* de m/z 296 e 310, e o agrupamento formado pelos *hits* de m/z 294 e 260, isoladamente, indica que ambos os grupos de *hits* fazem parte de duas diferentes classes de compostos, que, no entanto, não apresentaram correspondência no GNPS.

Partindo dessa visão panorâmica fornecida pela rede molecular e diante da interessante diversidade química dos hits da cepa BRA177, o estudo prosseguiu para a investigação mais detalhada destes *hits* e a desreplicação individualizada de cada um. Os picos correspondentes a cada *hit* (picos 1 a 12) foram apontados nos cromatogramas de CL-EM das amostras do ensaio de bioafinidade das três proteínas-alvo e localizados no cromatograma do extrato bruto da BRA177. Apenas os *hits* de m/z 296 (pico 1), 310 (pico 2 e 3) e 280 (pico 4) não puderam ser claramente apontados na referida corrida do extrato bruto (figura 3.12 A), mas puderam ser visualizados nos cromatogramas de CL-UV em 390 nm (figura 3.13). A baixa abundância relativa destes compostos no extrato bruto é a principal hipótese para a dificuldade de visualização desses *hits* no cromatograma do extrato, porém a co-eluição com outros compostos presentes no extrato é outro importante fator a ser considerado, visto que é possível observar outros picos, que não os dos *hits*, no mesmo tempo de retenção destes (figura 3.12 A e figura 3.13). Por outro lado, os *hits* m/z 364 (pico 10), 366 (pico 11) e 364 (pico 12) foram detectados como os compostos majoritários do extrato da BRA177, sendo o *hit* de m/z 364 (pico 12) o composto mais abundante do extrato, sendo o seu pico facilmente visualizado, inclusive, na corrida sem ampliação do extrato bruto (figura 3.12 e figura 3.13).

A desreplicação individual de cada *hit* através das bases de dados DNP e AntiMarin foi realizada utilizando os respectivos valores de m/z encontrados e as fórmulas moleculares previstas pela análise por CL-EM. A identificação dos *hits* de m/z 294 (pico 4) e m/z 260 (pico 5) como tambjaminas

pelo DNP e, mais especificamente, como tambjamins F e tambjamins K pelo AntiMarin, corrobora com o agrupamento único que estes dois compostos formaram na rede molecular no GNPS e com a semelhança apresentada entre os respectivos espectros de fragmentação, com destaque para os íons-fragmento de m/z 131, 148, 163 e 175.

Pereira e colaboradores (2012) realizaram o estudo dos metabólitos secundários produzidos por invertebrados marinhos dos grupos dos nudibrânquios e briozoários, coletados em Cabo Frio, no Rio de Janeiro, que levou a isolamento de várias tambjamins. Dentre estas, a tambjamina K (figura 3.17) foi detectada em extratos metanólicos do briozoário *Bugula dentata* e do seu predador natural, o nudibrânquio *Tambja stegosauriformis*. O espectro de fragmentação da tambjamina K ($[M+H]^+$ m/z 260) apresentou íons-fragmento de m/z 95, 131, 148, 163, 175, 188 e 190 dentre os íons mais intensos. Os autores também propuseram a rota de fragmentação da tambjamina C ($[M+H]^+$ m/z 246) com base nos dados de EM/EM, cujos íons-fragmentos mais intensos apresentaram m/z 95, 131, 148, 175 e 188 (PEREIRA et al., 2012). Inclusive, o referido trabalho foi o primeiro a estudar a fragmentação das tambjamins, e foi, também, o único do tipo encontrado.

A tambjamina K foi isolada pela primeira vez, recentemente, por Carbone e colaboradores (2010), a partir do nudibrânquio *Tambja ceutae* coletado no arquipélago de Açores, em Portugal, e apresentou pico molecular de $[M+H]^+$ m/z 260,1758 e fórmula molecular $C_{15}H_{21}N_3O$ (CARBONE et al., 2010). Por sua vez, a tambjamina F (figura 3.17) foi isolada na década de 90, por Lindquist e Fenical (1991), a partir da ascídia *Ataposa sp.* e do nudibrânquio *Nembrotha sp.*, coletados em várias ilhas no centro das Filipinas e do oeste do Pacífico, e o pico observado apresentou massa de $[M]^+$ m/z 293,1543 e fórmula molecular $C_{18}H_{19}N_3O$ (LINDQUIST; FENICAL, 1991).

Dessa forma, os dados de massas e fórmula molecular obtidos para os *hits* de m/z 260 e 294 ($[M+H]^+$) estão de acordo com os encontrados na literatura, mais além a presença dos íons-fragmento de m/z 131, 148, 163 e 175 no espectro de fragmentação destes *hits* corrobora com a sugestão de que estes compostos correspondam as tambjamins F e K.

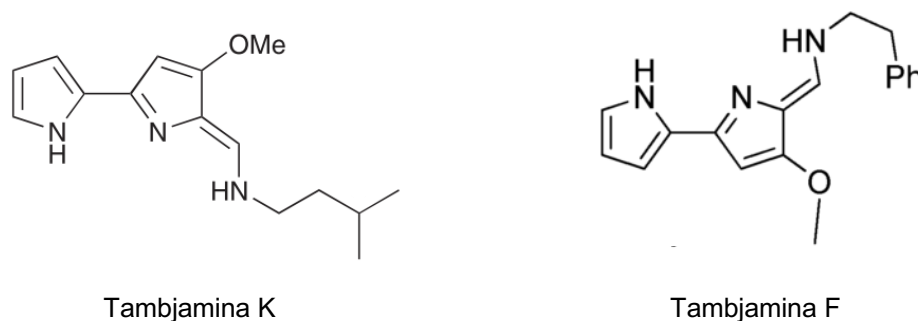


Figura 3.17. Estruturas químicas das tambjaminsas K e F. Fonte: PEREIRA et al., 2012; HERNÁNDEZ et al., 2012.

A ausência de correspondência nas bases de dados DNP e AntiMarin para os *hits* de m/z 310 (pico 2 e 3) indica que estes devem se tratar de dois novos compostos, que, pelo agrupamento espectral no GNPS, pertencem à mesma classe do *hit* m/z 296 (pico 1). O espectro de fragmentação do m/z 310 (pico 2) também apresentou os íons-fragmento m/z 148, 163 e 175, indicando que este composto possui parte da sua estrutura semelhante à estrutura das tambjaminsas supracitadas, ou ainda, que seja uma tambjamina inédita. Seguindo nessa linha, o *hit* de m/z 296 pode também ser considerado como um possível novo integrante dessa classe de compostos. No entanto, a desreplcação do *hit* m/z 296 em ambas as bases de dados foram distintas, sugerindo que este *hit* se assemelha a compostos como derivado da anantina, isoamina A, decloro-auxarconjugatina B ou sorafinol A

As tambjaminsas são alcalóides bipirrólicos que apresentam um perfil de UV característico, com uma banda intensa em 390 e 410 nm (CARTE; FAULKNER, 1983; PEREIRA et al., 2012). O pico intenso observado no cromatograma de UV em 390 nm (figura 3.13) para os *hits* de m/z 294, 260, 310 e 296 está de acordo com a sugestão de que estes *hits* possam pertencer a essa classe de compostos.

O *hit* m/z 280 (pico 6), pode ser um novo composto de origem marinha, devido a não correspondência encontrada no AntiMarin. O seu espectro de fragmentação, que apresentou os íons-fragmento m/z 148 e 163, assim como a maioria dos *hits* anteriores, sendo o íon-fragmento majoritário o m/z 189, que está presente no espectro do *hit* de m/z 260, aqui proposto como tambjamina K. Juntamente destes dados, o pico apresentado pelo *hit* de m/z 280 no cromatograma de UV em 390 nm (pico 4, figura 3.13), o que indica que este

possa corresponder, também, a um composto da classe das tambjamins, apesar do *hit* tem se agrupado em separado na rede molecular e apesar das duas sugestões distintas sugeridas pelo DNP.

De forma similar, o *hit* de m/z 378 (pico 7) também se agrupou separadamente e também pode ser um novo composto marinho, segundo a pesquisa no AntiMarin. No entanto, as várias sugestões apresentadas pelo DNP se tratam de compostos de diferentes classes, e alguns deles são tipicamente produzidos em outros organismos terrestres, como, por exemplo, os alcaloides ciclocelabenzina e margaritarina, isolados de plantas das espécies *Maytenus Mossambicensis* (SCHULTZ; HESSE, 1996) e *Margaritaria indica* (ARBAIN et al., 1991), respectivamente. Tais sugestões estão de acordo como fato de o DNP ser uma base de dados que reúne dados de compostos orgânicos naturais das mais variadas fontes, em especial de origem vegetal (WETZEL et al., 2007).

Os *hits* de m/z 380 (pico 8) e 382 (pico 9) apresentaram resultados correspondentes a compostos de diversas outras classes de compostos no DNP e no AntiMarin. Para o *hit* m/z 382, ambas as bases de dados indicam que este pode ser semelhante a compostos previamente reportados para fungos do gênero *Aspergillus*, como, por exemplo, a mellamida, uma indolamida isolada pela primeira vez a partir de *Aspergillus melleus*, que demonstrou atividade inseticida moderada (ONDEYKA et al., 2003). No entanto, estes *hits* (m/z 380 e 382) se agruparam no grupo das prodigininas na rede molecular, indicando a semelhança de seus espectros de fragmentação e, logo, sugerindo, que estes correspondam também a compostos dessa classe.

A identificação dos dois *hits* de m/z 364 (pico 10 e 12) como ciclononilprodigiosina ou metilciclooctilprodigiosina por ambos DNP e AntiMarin, e a identificação do *hit* de m/z 366 (pico 11) como undecilprodigiosina, pelo DNP, e nonilprodigiosina, pelo AntiMarin, corroboram com a atribuição dos *hits* ao grupo das prodigininas pelo GNPS.

No estudo de mineração genômica da cepa BRA177 realizado pelo nosso grupo, Silva e colaboradores (2016) confirmou a identificação molecular desta cepa como *Actinomadura madurae* e identificou sequências do grupo de genes biossintéticos (BCGs) de prodigininas. Este BCG, no entanto, apresentou duas enzimas com características bioquímicas únicas para a biossíntese de derivados cíclicos da nonilprodigiosina, como a ciclononilprodigiosina e

metilciclooctilprodigiosina. Mais além, tais enzimas divergiram filogeneticamente das enzimas correspondentes do BGC responsável pela biossíntese da undecilprodigiosina em *Streptomyces* sp., e os derivados cíclicos foram considerados uma assinatura química da *Actinomadura madurae* (SILVA et al., 2016).

As prodigininas são alcaloides tripirrólicos estruturalmente relacionados as tambjamins. Ambos os grupos de moléculas compartilham o mesmo sistema de anéis bipirrólico, 4-methoxi-2,2'-bipirrol (KANCHARLA; REYNOLDS, 2013; MELVIN et al., 1999). As vias biossintéticas de ambas as classes de compostos também apresentam características em comuns. De fato, Burke e colaboradores (2007) identificaram que 12 das 19 proteínas da via de biossíntese das tambjamins apresentaram sequencias com alta similaridade a proteínas das vias das de biossíntese das prodigininas undecilprodigiosina e prodigiosina (BURKE et al., 2007). A biossíntese do intermediário 4-metoxi-2,2'-bipirrol-5-carbaldeído, ou MBC, é considerada o ponto em comum das vias de biossíntese das tambjamins e prodigininas (BURKE et al., 2007; DARSHAN; MANONMANI, 2015; KANCHARLA; REYNOLDS, 2013).

Diante deste cenário, os esforços em direção ao isolamento dos *hits* da cepa BRA177 levaram ao isolamento dos três dos cinco *hits* previstos para a classe das prodigininas, a metilciclooctilprodigiosina (**1**) de m/z 364,2383 (pico 10), a ciclonoilprodigiosina (**2**) de m/z 364,2383 (pico 12), e a nonilprodigiosina (**3**) de m/z 366,2545 (pico 11). Os demais *hits* identificados pelo ensaio de bioafinidade do extrato da BRA177 não puderam ser isolados devido a quantidade muito menor em que se encontraram no respectivo extrato em relação aos *hits* que foram isolados.

A avaliação da atividade citotóxica dos três *hits*, pelo ensaio do MTT 72 h, revelou que os *hits* **2** e **3** apresentaram-se efeito citotóxico frente as linhagens tumorais de melanoma SK-Mel-147 e carcinoma de cólon HCT-116, mas também frente à linhagem não tumoral MRC-5, com valores de CI_{50} de 2,40, 3,94 e 0,58 μ M, respectivamente. Enquanto que o *hit* **1** não apresentou citotoxicidade em concentrações menos que 5 μ M para nenhuma das linhagens testadas. Mais além, nenhum dos *hits* demonstrou efeito citotóxico frente as células de carcinoma de mama MCF-7 nas concentrações aqui testadas.

Através do ensaio clonogênico foi possível observar o significativo e potente efeito dos *hits 2* e *3* (0,5 µM) na redução da proliferação das células SK-Mel-147 mediante exposição a longo prazo, na qual o *hit 2* reduziu quase por completo a proliferação celular. Os *hits 2* e *3* se apresentaram, ainda, cerca de nove e duas vezes mais potentes, respectivamente, do que a prodigiosina (0,1 µM) quando a redução do número de colônias. Entretanto, deve-se considerar que a concentração dos *hits*, aqui testada, foi cinco vezes maior do que a da prodigiosina.

As prodigininas são caracterizadas pelo grupamento pirrolidipirometano, podem apresentar-se como derivados lineares ou cíclicos e, em geral, possuem intensa pigmentação avermelhada ou alaranjada. As prodigioninas são tipicamente produzidas por bactérias dos gêneros *Serratia*, *Pseudomonas*, *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas*, incluindo os gêneros de actinobactérias *Streptomyces* e *Actinomadura* (ARTHAUD et al., 2012; DARSHAN; MANONMANI, 2015; WILLIAMSON et al., 2006).

As prodigininas obtidas neste trabalho foram isoladas pela primeira vez por Nancy Gerber, na década de 1970, a partir do cultivo da cepa de *Actinomadura madurae*. Primeiramente, a nonilprodigiosina foi isolada e os espectros de fragmentação mostraram picos de *m/z* 252 e 283 (GERBER, 1969). Estes íons-fragmentos também estão presentes no espectro de fragmentação correspondente a este composto (pico 11, figura 3.14). A ciclonoilprodigiosina e a metilciclooctilprodigiosina foram isoladas em outros dois trabalhos posteriores, junto com outros derivados minoritários da mesma classe (GERBER, 1970, 1973; HU et al., 2016).

Diversas propriedades farmacológicas têm sido descritas para compostos da classe das prodigininas como atividades antibacteriana, antimalárica, antitumoral e imunossupressora (D'ALESSIO et al., 2000; IBRAHIM et al., 2014; PAPIREDDY et al., 2011; PÉREZ-TOMÁS et al., 2003). O potencial antitumoral da prodigiosina, um dos derivados mais estudados, 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 µM (MANDERVILLE, 2001), que se aproxima dos valores de CI_{50} obtidos para os derivados aqui isolados.

A indução de apoptose está entre os cinco principais mecanismos de ação propostos para as prodigininas, além deste estão: acidificação celular, dano ao DNA sob condições oxidativas, inibição do ciclo celular e regulação de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) (DARSHAN; MANONMANI, 2015; PÉREZ-TOMÁS et al., 2003; WILLIAMSON et al., 2006). Vários estudos tem demonstrado a capacidade da prodigiosina em induzir apoptose em diversas linhagens tumorais hematopoiéticas (MONTANER et al., 2000), assim como em linhagens de carcinoma de cólon, pulmão e gástrico (LLAGOSTERA et al., 2003; MONTANER; PÉREZ-TOMÁS, 2001; PEREZ-TOMAS; VINAS, 2010).

Alguns estudos têm investigado a propriedade pro-apoptótica da prodigiosina e correlacionado com redução da expressão de survivina. O trabalho de Ho e colaboradores (2009) foi o primeiro a demonstrar que a prodigiosina (50 e 100 nM) foi capaz de induzir apoptose e reduzir a expressão de survivina à nível proteico e transcricional, com redução de ambos os níveis de mRNA e da atividade do respectivo promotor, de forma concentração-dependente, em linhagens de carcinoma de mama (HO et al., 2009). Estudos posteriores também demonstraram que a prodigiosina diminuiu os níveis protéicos de survivina em linhagem de leucemia mieloide aguda (SAM; POURPAK, 2018) e os níveis de mRNA da survivina em células de carcinoma hepatocelular (YENKEJEH; SAM; ESMAEILLOU, 2017) e colorretal (HASSANKHANI et al., 2015). Porém, nenhum dos estudos encontrados investigou a interação direta entre prodigininas e survivina. Entretanto, dados preliminares de um estudo do nosso grupo, Branco e colaboradores observaram a ligação entre a prodigiosina e survivina recombinante por meio de termoforese em microescala (dados não publicados).

As tambjamins também apresentam diversas atividades biológicas como antimicrobiana, antitumoral e imunossupressora, além de, aparentemente, desempenharem função de defesa química de organismos marinhos contra seus predadores (CARBONE et al., 2010; CARTE; FAULKNER, 1983; CAVALCANTI et al., 2008; PEREIRA et al., 2012; PINKERTON et al., 2010; TANIGAKI et al., 2002). O estudo de Manuel-Manresa e colaboradores (2017) foi o único encontrado relacionando a atividade antitumoral de tambjamins e as IAPs, no caso, a survivina. No referido estudo, dois novos análogos sintéticos de

tambjamins apresentaram atividade citotóxica frente a linhagens de carcinoma de pulmão, com valores de com valores de CI_{50} entre 6 e 11 μM . Os análogos sintéticos foram capazes de induzir apoptose e causar redução da expressão de BIRC5/Survivina e outros genes anti-apoptóticos, como Bcl-2 e Mcl-1. A diminuição da expressão de survivina também foi demonstrada a nível proteico e apresentou perfil concentração-dependente (MANUEL-MANRESA et al., 2017).

Desse modo, estes estudos abrem perspectivas para que demais compostos das classes das prodigininas e tambjamins possam também modular a atividade da survivina, induzindo a apoptose em células tumorais. No contexto deste trabalho, considerando que os 12 *hits* do extrato da BRA177 foram detectados a partir do ensaio de bioafinidade com as IAPs survivina, livina e BIR3-XIAP, e que, dentre estes estão, provavelmente, pelo menos quatro tambjamins e pelo menos cinco prodigininas, sendo que destas, três foram isoladas, é possível sugerir que estes *hits* apresentam um grande potencial de modulação direta desta proteínas-alvo. Contudo, a desreplicação dos compostos aqui realizada precisa ser confirmada a partir do isolamento destes *hits* e de dados de RMN. Da mesma forma, o potencial modulador das prodigininas aqui isoladas sobre as IAPs precisa ser investigado, bem como a provável atividade pró-apoptótica decorrente desta interação, frente as células tumorais.

Mais além, este estudo foi um dos primeiros a aplicar esse ensaio de bioafinidade para prospecção de produtos naturais marinhos pelo nosso grupo pesquisa. Por fim, pode-se afirmar que este ensaio se apresentou como um método capaz de prospectar vários compostos potencialmente ligantes das IAPs, que dificilmente seriam detectados por outros métodos convencionais de prospecção.

3.6 CONCLUSÕES

O ensaio de bioafinidade (EB) executado neste trabalho se configura como uma estratégia de prospecção alvo-direcionada que se aplica a proteínas-alvo recombinantes como survivina, livina, BIR3-XIAP e cIAP2.

A análise por CLAE-EM dos 21 extratos de actinobactérias analisados marinhos indicam que estes contêm um total de 100 *hits* potenciais, a maioria detectada para três proteínas-alvo (survivina, livina, BIR3-XIAP). A rede molecular dos 21 extratos analisados apresenta sete *clusters* como correspondentes a diferentes classes de produtos naturais conhecidas.

A desreplcação dos 12 *hits* da BRA177 (*Actinomadura* sp.) através das bases de dados DNP e AntiMarin, juntamente com a comparação dos espectros de fragmentação dos respectivos *hits* com a literatura, sugere que pelo menos quatro *hits* correspondam a compostos da classe das tambjaminas, e cinco *hits*, da classe das prodigininas.

O extrato bruto da BRA177 contém três prodigininas: metilciclooctilprodigiosina (**1**), ciclonoilprodigiosina (**2**) e nonilprodigiosina (**3**), que foram isoladas e correspondem aos *hits* obtidos no EB (para survivina, livina, BIR3-XIAP) e, são os compostos majoritários do respectivo extrato.

Os *hits* **2** e **3** apresentam atividade citotóxica frente as linhagens tumorais HCT-116 e SK-Mel-147 e à linhagem não tumoral MRC-5, enquanto o hit **1** possui menor potencial citotóxico. Nenhum dos compostos apresenta citotoxicidade frente à linhagem MCF-7 nas condições e concentrações aqui testadas. Por fim, os *hits* **1** e **2** possuem potencial de redução do número de colônias de células SK-Mel-147, mediante exposição a longo prazo.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho consistiu na utilização de duas estratégias principais de estudo de produtos naturais marinhos tendo o alvo molecular como perspectiva-chave. A primeira – a abordagem de marcação de fluorescência de imunoafinidade (IAF) aplicada à clorizidina A, isolada de *Streptomyces* sp. – partiu da molécula natural em direção elucidção do seu alvo. A segunda – o ensaio de bioafinidade (EB) aplicado a extratos de actinobactérias marinhas, tendo às IAPs como proteínas-alvo – partiu do alvo molecular em direção a identificação das substâncias ligantes.

A abordagem IAF é uma estratégia capaz de identificar, efetivamente, o alvo molecular, fornecer informações sobre o tráfego celular e a localização subcelular de um determinado produto natural. A capacidade de agregar tais informações em um processo padronizado de experimentos é uma das principais vantagens da abordagem IAF. Além disso, a abordagem IAF direciona os experimentos subsequentes com base nas vias bioquímicas nas quais o alvo identificado está envolvido.

Entretanto, a aplicação da abordagem IAF depende do isolamento da substância natural e da síntese química da respectiva sonda IAF, que podem apresentar vários desafios inerentes a estes processos, como baixo rendimento e inespecificidade do acoplamento do marcador IAF. Mais além, os ensaios de imunoprecipitação podem revelar a interação da substância natural com várias proteínas, que, então, requer etapas adicionais para confirmação das proteínas identificadas como alvo molecular.

Por sua vez, o EB pode ser considerada uma estratégia de prospecção alvo-direcionada com efetiva capacidade de capturar moléculas com base na sua bioafinidade a proteínas-alvo recombinantes previamente purificadas. Uma das principais vantagens do EB é o grande potencial de captura moléculas ligantes, mesmo que em quantidade minoritária em extratos complexos, de forma relativamente prática e versátil. Além de extratos brutos, frações e substâncias purificadas podem ser submetidos ao EB, permitindo também, a investigação da seletividade da ligação à proteína-alvo estudada. Além disso, o EB oferece um protocolo experimental que pode ser padronizado para outros tipos de proteínas-alvo, enzimáticas ou não-enzimáticas, com

potencial terapêutico em outras patologias, ou mesmo em outras áreas de pesquisa.

Entretanto, as etapas envolvidas nesse método oferecem alguns desafios e limitações. Primeiramente, a obtenção de proteínas-alvo com pureza satisfatória pode necessitar de etapas de otimização dos processos de expressão e purificação das proteínas recombinantes. Segundo, a validação da atividade moduladora das substâncias detectadas pelo EB, frente uma proteína-alvo, requer o isolamento desta substância por métodos convencionais, como a utilização de cromatografia à base de sílica gel. Nessa etapa, o isolamento de *hits* minoritários ainda permanece como um desafio, podendo demandar mais tempo e recursos. Mais além, os *hits* obtidos através do EB podem não apresentar seletividade entre proteínas-alvo testadas, e a utilização de proteína diferentes da família das proteínas-alvo, pode auxiliar na identificação de não especificidade. Por fim, a validação do envolvimento da proteína-alvo na atividade biológica dos *hits* isolados requer a utilização demais técnicas de estudo das vias nas quais as proteínas-alvo estão envolvidas.

Finalmente, é válido enfatizar que a aplicação de ambas as estratégias, abordagem IAF e EB, reforça o grande valor da realização de estudos multidisciplinares e a importância da colaboração entre grupos de pesquisa com diferentes expertises, porém complementares, na pesquisa de produtos naturais marinhos.

REFERÊNCIAS

- ADIDA, C. et al. Developmentally regulated expression of the novel cancer anti-apoptosis gene survivin in human and mouse differentiation. **The American journal of pathology**, v. 152, n. 1, p. 43–49, 1998.
- ADRAIN, C.; CREAGH, E. M.; MARTIN, S. J. Apoptosis-associated release of Smac/DIABLO from mitochondria requires active caspases and is blocked by Bcl-2. **EMBO Journal**, v. 20, n. 23, p. 6627–6636, 2001.
- AFTAB, U.; ZECHEL, D. L.; SAJID, I. Antitumor compounds from *Streptomyces* sp. KML-2, isolated from Khewra salt mines, Pakistan. **Biological Research**, v. 48, p. 1–10, 2015.
- ALEXANDER, M. D. et al. A central strategy for converting natural products into fluorescent probes. **ChemBioChem**, v. 7, n. 3, p. 409–416, 2006.
- ALFAROUK, K. O. et al. Glycolysis, tumor metabolism, cancer growth and dissemination. A new pH-based etiopathogenic perspective and therapeutic approach to an old cancer question. **Oncoscience**, v. 1, n. 12, p. 777, 2014.
- ALTIERI, D. C. Targeting survivin in cancer. **Cancer Letters**, v. 332, n. 2, p. 225–228, 2013.
- ALTIERI, D. C. Survivin – The inconvenient IAP. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 39, p. 91–96, mar. 2015.
- ALVAREZ-MICO, X. et al. Chlorizidine, a Cytotoxic 5 H -Pyrrolo[2,1- a]isoindol-5-one-Containing Alkaloid from a Marine *Streptomyces* sp. **Organic Letters**, v. 15, n. 5, p. 988–991, 13 mar. 2013.
- ÁLVAREZ-MICÓ, X. et al. The Hybrid Pyrroloisoindolone-Dehydropyrrolizine Alkaloid (–)-Chlorizidine A Targets Proteins within the Glycolytic Pathway. **ChemBioChem**, v. 16, n. 14, p. 2002–2006, 2015.
- AMBROSE, A. J. et al. Ritterostatin GN1N, a Cephalostatin–Ritterazine Bis-steroidal Pyrazine Hybrid, Selectively Targets GRP78. **ChemBioChem**, v. 18, n. 6, p. 506–510, 2017.
- AMBROSINI, G.; ADIDA, C.; ALTIERI, D. C. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. **Nature medicine**, v. 3, n. 8, p. 917–21, 1 ago. 1997.
- ARBAIN, D. et al. The alkaloids of *Margaritaria indica*. Part 2. The structures of 4-epiphyllanthine, margaritarine and the structural revision of securinol A. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, n. 8, p. 1863, 1991.
- ARTHAUD, I. D. B. et al. Studies on the secondary metabolites of a *Pseudoalteromonas* sp. isolated from sediments collected at the northeastern coast of Brazil. **Chemistry & biodiversity**, v. 9, n. 2, p. 418–27, fev. 2012.

AUSUBEL, J. H.; CRIST, D.; WAGGONER, P. (EDS.). **First Census of Marine Life 2010. Highlights of a Decade of Discovery.** [s.l: s.n.].

BAI, L.; WANG, S. Targeting Apoptosis Pathways for New Cancer Therapeutics. **Annual Review of Medicine**, v. 65, n. 1, p. 139–155, 14 jan. 2014.

BAKER, B. J. **Marine biomedicine: from beach to bedside.** Boca Raton: CRC Press, 2015.

BAO, Y. et al. Energy Management by Enhanced Glycolysis in G1-phase in Human Colon Cancer Cells In Vitro and In Vivo. **Molecular Cancer Research**, v. 11, n. 9, p. 973–985, 2013.

BÉRDY, J. Bioactive microbial metabolites. **The Journal of antibiotics**, v. 58, n. 1, p. 1–26, jan. 2005.

BERGMANN, W.; FEENEY, R. J. CONTRIBUTIONS TO THE STUDY OF MARINE PRODUCTS. XXXII. THE NUCLEOSIDES OF SPONGES. I. 1. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 16, n. 6, p. 981–987, jun. 1951.

BERTHELET, J.; DUBREZ, L. Regulation of Apoptosis by Inhibitors of Apoptosis (IAPs). **Cells**, v. 2, n. 1, p. 163–187, 2013.

BEUZER, P.; LA CLAIR, J. J.; CANG, H. Color-Coded Super-Resolution Small-Molecule Imaging. **ChemBioChem**, v. 17, n. 11, p. 999–1003, 2016.

BHARDWAJ, V. et al. Pyrrole: a resourceful small molecule in key medicinal hetero-aromatics. **RSC Adv.**, v. 5, n. 20, p. 15233–15266, 2015.

BHATNAGAR, I.; KIM, S.-K. Immense essence of excellence: marine microbial bioactive compounds. **Marine drugs**, v. 8, n. 10, p. 2673–701, jan. 2010.

BIO-RAD LABORATORIES, I. **Affi-Gel® 10 and 15 Activated Affinity Media.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_1085.pdf>. Acesso em: 11 abr. 2018.

BIOLOGICALS, N. **Recombinant Human cIAP-2 (HIAP-1) Protein, CF.** Disponível em: <https://www.novusbio.com/products/recombinant-human-ciap-2-hiap-1-protein-cf_817-p2#datasheet>. Acesso em: 8 maio. 2018.

BIOSCIENCE, B. **XIAP (Bir3), His-tag.** Disponível em: <<http://bpsbioscience.com/apoptosis-proteins-xiap-bir3-75001>>. Acesso em: 8 maio. 2018.

BLUNT, J.; BUCKINGHAM, J.; MUNRO, M. Taxonomy and Marine Natural Products Research. In: FATTORUSSO, E.; GERWICK, W. H.; TAGLIALATELA-SCAFATI, O. (Eds.). **Handbook of Marine Natural Products.** Dordrecht: Springer Netherlands, 2012. p. 1–4.

BLUNT, J. W. et al. Marine natural products. **Natural product reports**, v. 30, n.

2, p. 237–323, fev. 2013.

BUDHIDARMO, R.; DAY, C. L. IAPs: Modular regulators of cell signalling. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 39, p. 80–90, 2015.

BURKE, C. et al. The use of functional genomics for the identification of a gene cluster encoding for the biosynthesis of an antifungal tambjamine in the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*: Brief report. **Environmental Microbiology**, v. 9, n. 3, p. 814–818, 2007.

CAO, X.; SUN, H. Overexpression of Livin promotes migration and invasion of colorectal cancer cells by induction of epithelial – mesenchymal transition via NF- κ B activation. p. 1011–1021, 2016.

CAPPELLO, P. et al. Alpha-Enolase (ENO1), a potential target in novel immunotherapies. **Frontiers in bioscience (Landmark edition)**, v. 22, n. 5, p. 944–959, 2017.

CARBONE, M. et al. A new cytotoxic tambjamine alkaloid from the Azorean nudibranch *Tambja ceutae*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, n. 8, p. 2668–2670, 2010.

CAREW, J. S. et al. Mitochondrial defects in cancer. **Molecular cancer**, v. 1, n. 1, p. 9, 2002.

CARLSON, E. E. Natural products as chemical probes. **ACS Chem Biol**, v. 5, n. 7, p. 639–653, 2010.

CARTE, B.; FAULKNER, D. J. Defensive metabolites from three nembrothid nudibranchs. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 48, n. 14, p. 2314–2318, jul. 1983.

CAVALCANTI, B. C. et al. Cytotoxic and genotoxic effects of tambjamine D, an alkaloid isolated from the nudibranch *Tambja eliora*, on Chinese hamster lung fibroblasts. **Chemico-Biological Interactions**, v. 174, n. 3, p. 155–162, 2008.

CERUTI, P. et al. Three are better than one: plasminogen receptors as cancer theranostic targets. **Experimental Hematology & Oncology**, v. 2, n. 1, p. 12, 2013.

CHANG, G.-C. et al. Identification of alpha-enolase as an autoantigen in lung cancer: its overexpression is associated with clinical outcomes. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 12, n. 19, p. 5746–54, 1 out. 2006.

CHANG, H.; SCHIMMER, A. D. Livin/melanoma inhibitor of apoptosis protein as a potential therapeutic target for the treatment of malignancy. **Molecular cancer therapeutics**, v. 6, n. 1, p. 24–30, 2007.

CHATER, K. F. Recent advances in understanding *Streptomyces*. **F1000Research**, v. 5, n. 0, p. 2795, 2016.

CHEN, X. et al. Lysosomal Targeting with Stable and Sensitive Fluorescent Probes (Superior LysoProbes): Applications for Lysosome Labeling and Tracking during Apoptosis. **Scientific Reports**, v. 5, p. 1–10, 2015.

CHENG, Y. J. et al. XIAP-mediated protection of H460 lung cancer cells against cisplatin. **European Journal of Pharmacology**, v. 627, n. 1–3, p. 75–84, 2010.

CLINICAL TRIALS. **A Phase III Trial of With Marizomib in Patients With Newly Diagnosed Glioblastoma - Full Text View - ClinicalTrials.gov.**

Disponível em: <<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03345095>>. Acesso em: 9 maio. 2018.

COLELL, A.; GREEN, D. R.; RICCI, J. E. Novel roles for GAPDH in cell death and carcinogenesis. **Cell Death and Differentiation**, v. 16, n. 12, p. 1573–1581, 2009.

COSTANTINO, L.; BARLOCCO, D. Privileged Structures as Leads in Medicinal Chemistry. **Current Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 1, p. 65–85, 2006.

COUMAR, M. S. et al. Treat cancers by targeting survivin: Just a dream or future reality? **Cancer Treatment Reviews**, v. 39, n. 7, p. 802–811, nov. 2013.

CRAGG, G. M.; GROTHAUS, P. G.; NEWMAN, D. J. Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. **Chemical reviews**, v. 109, n. 7, p. 3012–43, jul. 2009.

CROOK, N. E.; CLEM, R. J.; MILLER, L. K. An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. **Journal of virology**, v. 67, n. 4, p. 2168–2174, 1993.

CRÜSEMANN, M. et al. Prioritizing Natural Product Diversity in a Collection of 146 Bacterial Strains Based on Growth and Extraction Protocols. **Journal of Natural Products**, p. acs.jnatprod.6b00722, 2016.

CUEVAS, C.; FRANCESCH, A. Development of Yondelis (trabectedin, ET-743). A semisynthetic process solves the supply problem. **Natural product reports**, v. 26, n. 3, p. 322–337, 2009.

D'ALESSIO, R. et al. Synthesis and immunosuppressive activity of novel prodigiosin derivatives. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 13, p. 2557–2565, 2000.

DANG, C. V.; SEMENZA, G. L. Oncogenic alterations of metabolism. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 24, n. 2, p. 68–72, 1999.

DARSHAN, N.; MANONMANI, H. K. Prodigiosin and its potential applications. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 9, p. 5393–5407, 2015.

DE ALMAGRO, M. C.; VUCIC, D. The inhibitor of apoptosis (IAP) proteins are critical regulators of signaling pathways and targets for anti-cancer therapy. **Experimental Oncology**, v. 34, n. 3, p. 200–211, 2012.

DE MORAES, M. C. et al. Targeting Anti-Cancer Active Compounds: Affinity-Based Chromatographic Assays. **Current pharmaceutical design**, v. 22, n. 39, p. 5976–5987, 2016.

DEVERAUX, Q. L.; REED, J. C. IAP family proteins - Suppressors of apoptosis. **Genes and Development**, v. 13, n. 3, p. 239–252, 1999.

DIAS, D. A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery. **Metabolites**, v. 2, n. 4, p. 303–336, 2012.

DÍAZ-RAMOS, À. et al. α -enolase, a multifunctional protein: Its role on pathophysiological situations. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, 2012.

DOMÍNGUEZ, H. J. et al. Stereochemistry of complex marine natural products by quantum mechanical calculations of NMR chemical shifts: Solvent and conformational effects on okadaic acid. **Marine Drugs**, v. 12, n. 1, p. 176–192, 2014.

EUSTÁQUIO, A. S. et al. The discovery of salinosporamide K from the marine bacterium “*Salinispora pacifica*” by Genome mining gives insight into pathway evolution. **ChemBioChem**, v. 12, n. 1, p. 61–64, 2011.

FADAKA, A. et al. Biology of glucose metabolism in cancer cells. **Journal of Oncological Sciences**, v. 3, n. 2, p. 45–51, 2017.

FARNAES, L.; LA CLAIR, J. J.; FENICAL, W. Napyradiomycins CNQ525.510B and A80915C target the Hsp90 paralogue Grp94. **Organic & biomolecular chemistry**, v. 12, n. 3, p. 418–23, 2014.

FELING, R. H. et al. Salinosporamide A: a highly cytotoxic proteasome inhibitor from a novel microbial source, a marine bacterium of the new genus *salinispora*. **Angewandte Chemie (International ed. in English)**, v. 42, n. 3, p. 355–7, 20 jan. 2003.

FENICAL, W.; JENSEN, P. R. Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria. **Nature chemical biology**, v. 2, n. 12, p. 666–73, dez. 2006.

FERNALD, K.; KUROKAWA, M. Evading apoptosis in cancer. **Trends in Cell Biology**, v. 23, n. 12, p. 620–633, dez. 2013.

FERREIRA, E. G. **DIVERSIDADE E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE ACTINOMICETOS RECUPERADOS DO SEDIMENTO MARINHO COLETADO NO ARQUIPELAGO SÃO PEDRO E SÃO PAULO, BRASIL.** [s.l.] Universidade Federal do Ceará, 2014.

FERREIRA, E. G. et al. Prospecting Anticancer Compounds in Actinomycetes Recovered from the Sediments of Saint Peter and Saint Paul’s Archipelago, Brazil. **Chemistry and Biodiversity**, v. 13, n. 9, p. 1149–1157, 2016.

FERREIRA, L. G.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. From Medicinal

Chemistry to Human Health: Current Approaches to Drug Discovery for Cancer and Neglected Tropical Diseases. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 0, p. 645–661, 2018.

FLOROS, D. J. et al. A metabolomics guided exploration of marine natural product chemical space. **Metabolomics**, v. 12, n. 9, 2016.

FLYGARE, J. A. et al. Discovery of a potent small-molecule antagonist of inhibitor of apoptosis (IAP) proteins and clinical candidate for the treatment of cancer (GDC-0152). **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 9, p. 4101–4113, 2012.

FOSTER, I. Cancer: A cell cycle defect. **Radiography**, v. 14, n. 2, p. 144–149, maio 2008.

FOUAD, Y. A.; AANEI, C. Revisiting the hallmarks of cancer. **American Journal of Cancer Research**, v. 7, n. 5, p. 1016–1036, 2017.

FRANKEN, N. A. P. et al. Clonogenic assay of cells in vitro. **Nature Protocols**, v. 1, n. 5, p. 2315–2319, 2006.

FULDA, S.; VUCIC, D. Targeting IAP proteins for therapeutic intervention in cancer. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 11, n. 4, p. 331–331, 2012.

GANAPATHY-KANNIAPPAN, S.; GESCHWIND, J.-F. H. Tumor glycolysis as a target for cancer therapy: progress and prospects. **Molecular Cancer**, v. 12, n. 1, p. 152, 2013.

GERBER, N. N. Prodigiosin-like pigments from *Actinomadura* (*Nocardia*) *pelletieri* and *Actinomadura madurae*. **Applied microbiology**, v. 18, n. 1, p. 1–3, 1969.

GERBER, N. N. A novel, cyclic, tripyrrole pigment from *actinomadura* (*nocardia*) *madurae*. **Tetrahedron Letters**, v. 11, n. 11, p. 809–812, 1970.

GERBER, N. N. Minor prodiginine pigments from *actinomadura madurae* and *actinomadura pelletieri*. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, v. 10, n. 6, p. 925–929, dez. 1973.

GERWICK, W. H.; FENNER, A. M. Drug discovery from marine microbes. **Microbial ecology**, v. 65, n. 4, p. 800–6, maio 2013.

GERWICK, W. H.; MOORE, B. S. Lessons from the past and charting the future of marine natural products drug discovery and chemical biology. **Chemistry & biology**, v. 19, n. 1, p. 85–98, 27 jan. 2012.

GIDDINGS, L.-A.; NEWMAN, D. J. Microbial natural products: molecular blueprints for antitumor drugs. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 40, n. 11, p. 1181–210, nov. 2013.

GIVAN, A. L. Flow Cytometry. In: HAWLEY, T. S.; ROBERT G HAWLEY (Eds.). **Methods in Molecular Biology: Flow Cytometry Protocols**. 2^a ed. Totowa:

Humana Press, 2004. v. 263p. 434.

GOUBRAN, H. A. et al. Regulation of Tumor Growth and Metastasis: The Role of Tumor Microenvironment. **Cancer Growth and Metastasis**, v. 7, p. CGM.S11285, 2 jan. 2014.

GRANCHI, C.; FANCELLI, D.; MINUTOLO, F. An update on therapeutic opportunities offered by cancer glycolytic metabolism. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, n. 21, p. 4915–4925, 2014.

GRANCHI, C.; MINUTOLO, F. Anticancer Agents That Counteract Tumor Glycolysis. **ChemMedChem**, v. 7, n. 8, p. 1318–1350, 2012.

GUIMARÃES, L. A. **Potencial anticâncer de actinomicetos recuperados do sedimento da praia da Pedra Rachada, Paracuru, Ceará.** [s.l.] Universidade Federal do Ceará, 2013.

GYRD-HANSEN, M.; MEIER, P. IAPs: from caspase inhibitors to modulators of NF-kappaB, inflammation and cancer. **Nature reviews. Cancer**, v. 10, n. 8, p. 561–74, ago. 2010.

HAGE, D. S. Survey of recent advances in analytical applications of immunoaffinity chromatography. **Journal of Chromatography B: Biomedical Applications**, v. 715, n. 1, p. 3–28, 1998.

HAGE, D. S. et al. Pharmaceutical and biomedical applications of affinity chromatography: Recent trends and developments. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 69, p. 93–105, 2012.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57–70, 7 jan. 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HASSAN, S. S. UL; SHAIKH, A. L. Marine actinobacteria as a drug treasure house. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 87, p. 46–57, mar. 2017.

HASSANKHANI, R. et al. Prodigiosin isolated from cell wall of *Serratia marcescens* alters expression of apoptosis-related genes and increases apoptosis in colorectal cancer cells. **Medical Oncology**, v. 32, n. 1, p. 1–8, 2015.

HENNIPMAN, A. et al. Glycolytic Enzyme Activities in Breast Cancer Metastases. **Tumor Biology**, v. 9, n. 5, p. 241–248, 1988.

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

HO, T.-F. et al. Prodigiosin down-regulates survivin to facilitate paclitaxel sensitization in human breast carcinoma cell lines. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 235, n. 2, p. 253–260, mar. 2009.

HOELDER, S.; CLARKE, P. A.; WORKMAN, P. Discovery of small molecule cancer drugs: Successes, challenges and opportunities. **Molecular oncology**, v. 6, n. 2, p. 1–22, 2012.

HU, D. X. et al. Structure, Chemical Synthesis, and Biosynthesis of Prodiginine Natural Products. **Chemical Reviews**, v. 116, n. 14, p. 7818–7853, 27 jul. 2016.

HU, W. et al. The complex of TRIP-Br1 and XIAP ubiquitinates and degrades multiple adenylyl cyclase isoforms. **eLife**, v. 6, p. 1–25, 2017.

HUGHES, C. C. et al. Marinopyrrole A target elucidation by acyl dye transfer. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 34, p. 12094–12096, 2009a.

HUGHES, C. C. et al. Ammosamides A and B Target Myosin. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 48, n. 4, p. 728–732, 12 jan. 2009b.

IBRAHIM, D. et al. Prodigiosin - an antibacterial red pigment produced by *Serratia marcescens* IBRL USM 84 associated with a marine sponge *Xestospongia testudinaria*. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 4, n. 10, p. 1–6, 2014.

IMHOFF, J. F.; LABES, A.; WIESE, J. Bio-mining the microbial treasures of the ocean: New natural products. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 5, p. 468–482, 2011.

IMRAN, A. et al. Role of Molecular Biology in Cancer Treatment: A Review Article. **Iranian journal of public health**, v. 46, n. 11, p. 1475–1485, nov. 2017.

ISLAM, A et al. High expression of Survivin, mapped to 17q25, is significantly associated with poor prognostic factors and promotes cell survival in human neuroblastoma. **Oncogene**, v. 19, n. 5, p. 617–623, 2000.

JENSEN, P. R.; MOORE, B. S.; FENICAL, W. The marine actinomycete genus *Salinispora*: a model organism for secondary metabolite discovery. **Natural Product Reports**, v. 32, n. 5, p. 738–751, 2015.

JERABEK-WILLEMSEN, M. et al. MicroScale Thermophoresis: Interaction analysis and beyond. **Journal of Molecular Structure**, v. 1077, p. 101–113, dez. 2014.

JUNG, D.-W. et al. A Unique Small Molecule Inhibitor of Enolase Clarifies Its Role in Fundamental Biological Processes. **ACS Chemical Biology**, v. 8, n. 6, p. 1271–1282, 21 jun. 2013.

JUNG, H. J.; KWON, H. J. Target deconvolution of bioactive small molecules: The heart of chemical biology and drug discovery. **Archives of Pharmacal Research**, v. 38, n. 9, p. 1627–1641, 2015.

KANCHARLA, P.; REYNOLDS, K. A. Synthesis of 2,2'-bipyrrrole-5-carboxaldehydes and their application in the synthesis of B-ring functionalized

prodiginines and tambjamines. **Tetrahedron**, v. 69, n. 39, p. 8375–8385, set. 2013.

KANG, M. J. et al. Isolation, structure elucidation, and antitumor activity of spirohexenolides A and B. **Journal of Organic Chemistry**, v. 74, n. 23, p. 9054–9061, 2009.

KANG, M. J. et al. Functional Chromatography Reveals Three Natural Products that Target the Same Protein with Distinct Mechanisms of Action. **ChemBioChem**, v. 15, n. 14, p. 2125–2131, 22 set. 2014.

KASOF, G. M.; GOMES, B. C. Livin, a Novel Inhibitor of Apoptosis Protein Family Member. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 5, p. 3238–3246, 2001.

KEPP, O. et al. Cell death assays for drug discovery. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 10, n. 3, p. 221–237, 2011.

LA CLAIR, J. J. Natural product mode of action (MOA) studies: a link between natural and synthetic worlds. **Natural Product Reports**, v. 27, n. 7, p. 969, 2010.

LA CLAIR, J. J.; FENICAL, W.; COSTA-LOTUFO, L. V. Elucidating the mode of action of marine natural products through an Immunoaffinity Fluorescent (IAF) approach. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 8, p. 1346–1354, 2016.

LABEDA, D. P. et al. Phylogenetic study of the species within the family Streptomycetaceae. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 101, n. 1, p. 73–104, 2012.

LACASSE, E. C. et al. IAP-targeted therapies for cancer. **Oncogene**, v. 27, n. 48, p. 6252–6275, 2008.

LADBURY, J. E.; CHOWDHRY, B. Z. Sensing the heat: The application of isothermal titration calorimetry to thermodynamic studies of biomolecular interactions. **Chemistry and Biology**, v. 3, n. 10, p. 791–801, 1996.

LAU, E. C. et al. Supporting Information. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 13, n. 8, p. 2255–2259, 2015a.

LAU, E. C. et al. Functional chromatographic technique for natural product isolation. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 13, n. 8, p. 2255–2259, 2015b.

LAUBER, K. et al. Dying cell clearance and its impact on the outcome of tumor radiotherapy. **Frontiers in Oncology**, v. 2, n. September, p. 1–15, 2012.

LEE, E. W. et al. USP11-dependent selective cIAP2 deubiquitylation and stabilization determine sensitivity to Smac mimetics. **Cell Death and Differentiation**, v. 22, n. 9, p. 1463–1476, 2015.

- LEW, C. R.; TOLAN, D. R. Targeting of several glycolytic enzymes using RNA interference reveals aldolase affects cancer cell proliferation through a non-glycolytic mechanism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 51, p. 42554–42563, 2012.
- LI, F. et al. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. **Nature**, v. 396, n. 6711, p. 580–584, 1998.
- LINDQUIST, N.; FENICAL, W. New tamjamine class alkaloids from the marine ascidian *Atapozoa* sp. and its nudibranch predators. Origin of the tambjamines in *Atapozoa*. **Experientia**, v. 47, n. 5, p. 504–506, maio 1991.
- LIU, G. et al. Molecular Regulation of Antibiotic Biosynthesis in *Streptomyces*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 77, n. 1, p. 112–143, 2013.
- LLAGOSTERA, E. et al. Prodigiosin Induces Apoptosis by Acting on Mitochondria in Human Lung Cancer Cells. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1010, p. 178–181, 2003.
- LOPEZ, J.; MEIER, P. To fight or die-inhibitor of apoptosis proteins at the crossroad of innate immunity and death. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 22, n. 6, p. 872–881, 2010.
- LUO, J.; SOLIMINI, N. L.; ELLEDGE, S. J. Principles of Cancer Therapy: Oncogene and Non-oncogene Addiction. **Cell**, v. 136, n. 5, p. 823–837, 2009.
- MA, L. et al. Livin promotes Smac/DIABLO degradation by ubiquitin-proteasome pathway. **Cell Death and Differentiation**, v. 13, n. 12, p. 2079–2088, 2006.
- MACFARLANE, M. et al. Proteasome-mediated degradation of Smac during apoptosis: XIAP promotes Smac ubiquitination in vitro. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 39, p. 36611–36616, 2002.
- MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Cell cycle, CDKs and cancer: A changing paradigm. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 3, p. 153–166, 2009.
- MANDERVILLE, R. A. Synthesis, Proton-Affinity and Anti-Cancer Properties of the Prodigiosin- Group Natural Products. **Synthesis**, p. 195–218, 2001.
- MANIVASAGAN, P. et al. Marine actinobacterial metabolites: Current status and future perspectives. **Microbiological research**, v. 168, n. 6, p. 311–332, 19 jul. 2013.
- MANTOVANI, S. M.; MOORE, B. S. Flavin-linked oxidase catalyzes pyrrolizine formation of dichloropyrrole-containing polyketide extender unit in chlorizidine A. **Journal of the American Chemical Society**, v. 135, n. 48, p. 18032–5, 4 dez. 2013.
- MANUEL-MANRESA, P. et al. Novel Indole-based Tambjamine-Analogues Induce Apoptotic Lung Cancer Cell Death through p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Activation. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 16, n. 7, p. 1224–1235, jul. 2017.

MAYER, A. et al. Marine Pharmacology in 2012–2013: Marine Compounds with Antibacterial, Antidiabetic, Antifungal, Anti-Inflammatory, Antiprotozoal, Antituberculosis, and Antiviral Activities; Affecting the Immune and Nervous Systems, and Other Miscellaneous Mechanisms of . **Marine Drugs**, v. 15, n. 9, p. 273, 29 ago. 2017.

MAYER, A. M. S. et al. The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective. **Trends in pharmacological sciences**, v. 31, n. 6, p. 255–65, jun. 2010.

MAYER, A. M. S. **The Global Marine Pharmaceuticals Pipeline**. Disponível em: <<http://marinepharmacology.midwestern.edu/>>. Acesso em: 9 fev. 2018.

MELVIN, M. S. et al. DNA binding by 4-methoxypyrrolic natural products. Preference for intercalation at AT sites by tambjamine E and prodigiosin. **Journal of Organic Chemistry**, v. 64, n. 18, p. 6861–6869, 1999.

MIAO, V.; DAVIES, J. Actinobacteria: the good, the bad, and the ugly. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 98, n. 2, p. 143–50, ago. 2010.

MOFFAT, J. G.; RUDOLPH, J.; BAILEY, D. Phenotypic screening in cancer drug discovery — past, present and future. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 13, n. 8, p. 588–602, 18 jul. 2014.

MONTANER, B. et al. Prodigiosin from the supernatant of *Serratia marcescens* induces apoptosis in haematopoietic cancer cell lines. **British Journal of Pharmacology**, v. 131, n. 3, p. 585–593, out. 2000.

MONTANER, B.; PÉREZ-TOMÁS, R. Prodigiosin-induced apoptosis in human colon cancer cells. **Life sciences**, v. 68, n. 17, p. 2025–2036, 2001.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 16 dez. 1983.

NAGEL, R.; SEMENOVA, E. A.; BERNS, A. Drugging the addict: non-oncogene addiction as a target for cancer therapy. **EMBO reports**, v. 17, n. 11, p. 1516–1531, 2016.

NAHM, D. H. et al. Identification of α -enolase as an autoantigen associated with severe asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 118, n. 2, p. 376–381, 2006.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. **Targeted Cancer Therapies Fact Sheet**. Disponível em: <<https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/targeted-therapies/targeted-therapies-fact-sheet>>. Acesso em: 8 abr. 2018.

NELSON, DAVID L.; M. COX, M. **Principios de Bioquímica de Lehninger**. [s.l: s.n.].

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629–661, 2016.

NGUYEN, D. D. et al. MS/MS networking guided analysis of molecule and gene cluster families. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 28, p. E2611-20, 9 jul. 2013.

NICHOLLS, C. et al. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) induces cancer cell senescence by interacting with telomerase RNA component. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 33, p. 13308–13313, 2012.

NIELSEN, K. F. et al. Dereplication of microbial natural products by LC-DAD-TOFMS. **Journal of natural products**, v. 74, n. 11, p. 2338–48, 28 nov. 2011.

NIGAM, N. et al. Targeting mortalin by embelin causes activation of tumor suppressor p53 and deactivation of metastatic signaling in Human Breast Cancer Cells. **PLoS ONE**, v. 10, n. 9, p. 1–15, 2015.

NIKOLOVSKA-COLESKA, Z. et al. Discovery of Embelin as a Cell-Permeable, Small-Molecular Weight Inhibitor of XIAP through Structure-Based Computational Screening of a Traditional Herbal Medicine Three-Dimensional Structure Database. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 10, p. 2430–2440, 2004.

OH, B. Y. et al. Silencing the livin gene enhances the cytotoxic effects of anticancer drugs on colon cancer cells. **Annals of Surgical Treatment and Research**, v. 91, n. 6, p. 273, 2016.

OLANO, C.; MÉNDEZ, C.; SALAS, J. A. Antitumor compounds from marine actinomycetes. **Marine drugs**, v. 7, n. 2, p. 210–48, jan. 2009.

OLIVER, L.; VALLETTE, F. M. The role of caspases in cell death and differentiation. **Drug Resistance Updates**, v. 8, n. 3, p. 163–170, 2005.

OLIVERA, B. M. et al. Peptide neurotoxins from fish-hunting cone snails. **Science (New York, N.Y.)**, v. 230, n. 4732, p. 1338–43, 20 dez. 1985.

ONDEYKA, J. G. et al. Isolation and insecticidal activity of mellamide from *Aspergillus melleus*. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 30, n. 4, p. 220–4, 2003.

OUYANG, L. et al. Programmed cell death pathways in cancer: A review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. **Cell Proliferation**, v. 45, n. 6, p. 487–498, 2012.

OWENS, T. W. et al. Inhibitor of Apoptosis Proteins: Promising Targets for Cancer Therapy. **Journal of carcinogenesis & mutagenesis**, v. Suppl 14, 27 maio 2013.

PAGLIARO, L.; KERR, K.; TAYLOR, D. L. Enolase exists in the fluid phase of cytoplasm in 3T3 cells. **Journal of cell science**, v. 94, n. 2, p. 333–342, 1989.

PANDEY, M. et al. Targeting Cell Survival Proteins for Cancer Cell Death. **Pharmaceuticals**, v. 9, n. 1, p. 11, 2016.

PAPIREDDY, K. et al. Antimalarial activity of natural and synthetic prodiginines. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, n. 15, p. 5296–5306, 2011.

PEREIRA, F. R. et al. Metabólitos secundários dos nudibrânquios tambja stegosauriformis, hypselodoris lajensis e okenia zoobotryon e dos briozoários zoobotryon verticillatum e bugula dentata da costa do brasil. **Química Nova**, v. 35, n. 11, p. 2194–2201, 2012.

PÉREZ-TOMÁS, R. et al. The prodigiosins, proapoptotic drugs with anticancer properties. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, n. 8, p. 1447–1452, 2003.

PEREZ-TOMAS, R.; VINAS, M. New Insights on the Antitumoral Properties of Prodiginines. **Current Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 21, p. 2222–2231, 2010.

PIERZYŃSKA-MACH, A.; JANOWSKI, P. A.; DOBRUCKI, J. W. Evaluation of acridine orange, LysoTracker Red, and quinacrine as fluorescent probes for long-term tracking of acidic vesicles. **Cytometry Part A**, v. 85, n. 8, p. 729–737, ago. 2014.

PINKERTON, D. M. et al. Antimicrobial and cytotoxic activities of synthetically derived tambjamines C and E - J, BE-18591, and a related alkaloid from the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*. **Chemistry & biodiversity**, v. 7, n. 5, p. 1311–24, maio 2010.

PIRES, K. **PROSPECÇÃO GENÔMICA DE ACTINOBACTÉRIAS DO GÊNERO SALINISPORA ISOLADAS DE SEDIMENTO DO ARQUIPÉLAGO DE SÃO PEDRO E SÃO PAULO**. [s.l.] Universidade Federal do Ceará, 2016.

PLATI, J.; BUCUR, O.; KHOSRAVI-FAR, R. Apoptotic cell signaling in cancer progression and therapy. **Integrative Biology**, v. 3, n. 4, p. 279, abr. 2011.

POMMIER, Y. et al. DNA sequence- and structure-selective alkylation of guanine N2 in the DNA minor groove by ecteinascidin 743, a potent antitumor compound from the Caribbean tunicate *Ecteinascidia turbinata*. **Biochemistry**, v. 35, n. 41, p. 13303–9, 15 out. 1996.

POON, I. K. H. et al. Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 3, p. 166–180, 2014.

PYE, C. R. et al. Retrospective analysis of natural products provides insights for future discovery trends. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 22, p. 5601–5606, 2017.

QI, G. et al. Intracellular localization of survivin determines biological behavior in colorectal cancer. **Oncology Reports**, v. 22, n. 3, p. 557–562, 2009.

QUAIL, D. F.; JOYCE, J. A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. **Nature Medicine**, v. 19, n. 11, p. 1423–1437, 2013.

RADJASA, O. K. et al. Highlights of marine invertebrate-derived biosynthetic products: their biomedical potential and possible production by microbial associants. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 19, n. 22, p. 6658–74, 15

nov. 2011.

RAMANATHAN, A.; WANG, C.; SCHREIBER, S. L. Perturbational profiling of a cell-line model of tumorigenesis by using metabolic measurements.

Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 102, n. 17, p. 5992–5997, 2005.

RATH, C. M. et al. Meta-omic characterization of the marine invertebrate microbial consortium that produces the chemotherapeutic natural product ET-743. **ACS chemical biology**, v. 6, n. 11, p. 1244–56, 18 nov. 2011.

REED, K. A. et al. Salinosporamides D-J from the marine actinomycete *Salinispora tropica*, bromosalinosporamide, and thioester derivatives are potent inhibitors of the 20S proteasome. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 2, p. 269–276, 2007.

RODEL, F. et al. Survivin as a Prognostic/Predictive Marker and Molecular Target in Cancer Therapy. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 22, p. 3679–3688, 2012.

ROTHER, M. et al. The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. **Cell**, v. 83, n. 7, p. 1243–1252, 1995.

ROY, K. et al. Competitive inhibition of survivin using a cell-permeable recombinant protein induces cancer-specific apoptosis in colon cancer model. **International journal of nanomedicine**, v. 10, p. 1019–43, 2015.

SAM, M.; POURPAK, R. Regulation of p53 and survivin by prodigiosin compound derived from *Serratia marcescens* contribute to caspase-3-dependent apoptosis in acute lymphoblastic leukemia cells. **Human & Experimental Toxicology**, v. 37, n. 6, p. 608–617, 6 jun. 2018.

SCATENA, R. et al. Glycolytic enzyme inhibitors in cancer treatment. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 17, n. 10, p. 1533–1545, 2008.

SCHIMMER, A. D. Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice. **Cancer research**, v. 64, n. 20, p. 7183–90, 15 out. 2004.

SCHMITZ, M. et al. Generation of Survivin-specific CD8 + T Effector Cells by Dendritic Cells Pulsed with Protein or Selected Peptides Generation of Survivin-specific CD8 + T Effector Cells by Dendritic Cells Pulsed with Protein or Selected Peptides 1. **Peptides**, p. 4845–4849, 2000.

SCHULTZ, K.; HESSE, M. Total Synthesis of (+)-(8S,13R)-Cyclocelabenzine. **Helvetica Chimica Acta**, v. 79, n. 5, p. 1295–1304, 7 ago. 1996.

SHILOV, I. V. et al. The Paragon Algorithm, a Next Generation Search Engine That Uses Sequence Temperature Values and Feature Probabilities to Identify Peptides from Tandem Mass Spectra. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 6, n. 9, p. 1638–1655, 2007.

- SHIM, H. et al. A unique glucose-dependent apoptotic pathway induced by c-Myc. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 4, p. 1511–1516, 1998.
- SHIOZAKI, E. N. et al. Mechanism of XIAP-Mediated Inhibition of Caspase-9. v. 11, p. 519–527, 2003.
- SILKE, J.; VAUX, D. L. Two kinds of BIR-containing protein - inhibitors of apoptosis, or required for mitosis. **Journal of cell science**, v. 114, n. Pt 10, p. 1821–1827, 2001.
- SILVA, A. et al. Bioprospecting Anticancer Compounds from the Marine-Derived Actinobacteria *Actinomadura* sp. Collected at the Saint Peter and Saint Paul Archipelago (Brazil). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 3, p. 465–474, 2016.
- SORENSEN, C. E.; NØVAK, I. Visualization of ATP release in pancreatic acini in response cholinergic stimulus: Use of fluorescent probes and confocal microscopy. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 35, p. 32925–32932, 2001.
- SRINIVASULA, S. M. et al. A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. **Nature**, v. 410, n. 6824, p. 112–116, 2001.
- STAUBER, R. H.; MANN, W.; KNAUER, S. K. Nuclear and cytoplasmic survivin: Molecular mechanism, prognostic, and therapeutic potential. **Cancer Research**, v. 67, n. 13, p. 5999–6002, 2007.
- SUBRAMANI, R.; AALBERSBERG, W. Marine actinomycetes: An ongoing source of novel bioactive metabolites. **Microbiological research**, v. 167, n. 10, p. 571–80, 20 dez. 2012.
- SUBRAMANI, R.; AALBERSBERG, W. Culturable rare Actinomycetes: diversity, isolation and marine natural product discovery. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 97, n. 21, p. 9291–321, 22 nov. 2013.
- SUDEK, S. et al. Identification of the putative bryostatin polyketide synthase gene cluster from “*Candidatus Endobugula sertula*”, the uncultivated microbial symbiont of the marine bryozoan *Bugula neritina*. **Journal of natural products**, v. 70, n. 1, p. 67–74, jan. 2007.
- SUDHAKAR, A. History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. **Journal of Cancer Science & Therapy**, v. 01, n. 02, p. i–iv, 2009.
- SUN, C. et al. NMR structure and mutagenesis of the third Bir domain of the inhibitor of apoptosis protein XIAP. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 43, p. 33777–33781, 2000.
- SUZUKI, F.; UMEDA, Y.; KATO, K. Rat brain enolase isozymes. Purification of three forms of enolase. **Journal of biochemistry**, v. 87, n. 6, p. 1587–94, jun. 1980.

TANG, Z. et al. Over-expression of GAPDH in human colorectal carcinoma as a preferred target of 3-bromopyruvate propyl ester. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 44, p. 117–125, 2012.

TANIGAKI, K. et al. BE-18591 as a new H(+)/Cl(-) symport ionophore that inhibits immunoproliferation and gastritis. **FEBS letters**, v. 524, n. 1–3, p. 37–42, 31 jul. 2002.

TRISTAN, C. et al. The diverse functions of GAPDH: Views from different subcellular compartments. **Cellular Signalling**, v. 23, n. 2, p. 317–323, 2011.

TRZOSS, L. et al. Seriniquinone, a selective anticancer agent, induces cell death by autophagocytosis, targeting the cancer-protective protein dermcidin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 41, p. 14687–92, 2014.

URRUTICOECHEA, A. et al. Recent Advances in Cancer Therapy: An Overview. **Current Pharmaceutical Design**, v. 16, n. 1, p. 3–10, 2010.

VAN DER MEIJ, A. et al. Chemical ecology of antibiotic production by actinomycetes. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 41, n. 3, p. 392–416, 2017.

VARFOLOMEEV, E. et al. IAP Antagonists Induce Autoubiquitination of c-IAPs, NF- κ B Activation, and TNF α -Dependent Apoptosis. **Cell**, v. 131, n. 4, p. 669–681, 2007.

VARFOLOMEEV, E. et al. Characterization of ML-IAP protein stability and physiological role in vivo. **The Biochemical journal**, v. 447, n. 3, p. 427–436, 2012.

VASCONCELOS, I. M. B. **AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL DE EXTRATOS OBTIDOS DE ACTINOMICETOS RECUPERADOS DE SEDIMENTOS DO LITORAL DO CEARÁ, BRASIL**. [s.l.] Universidade Federal do Ceará, 2017.

VENTURA, M. et al. Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 71, n. 3, p. 495–548, set. 2007.

VIZIN, T.; KOS, J. Gamma-enolase: A well-known tumour marker, with a less-known role in cancer. **Radiology and Oncology**, v. 49, n. 3, p. 217–226, 2015.

VOGELSTEIN, B. et al. Cancer Genome Landscapes. **Science**, v. 339, n. 6127, p. 1546–1558, 2013.

VÖPEL, T.; MAKHATADZE, G. I. Enzyme activity in the crowded Milieu. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, p. 3–8, 2012.

VUCIC, D. et al. ML-IAP, a novel inhibitor of apoptosis that is preferentially expressed in human melanomas. **Current biology : CB**, v. 10, n. 21, p. 1359–1366, 2000.

- WALSH, J. L.; KEITH, T. J.; KNOLL, H. R. Glycolytic enzyme interactions with tubulin and microtubules. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Protein Structure and Molecular**, v. 999, n. 1, p. 64–70, 1989.
- WANG, K.; LIN, B. Inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) as regulatory factors of hepatic apoptosis. **Cellular signalling**, v. 25, n. 10, p. 1970–80, out. 2013.
- WANG, M. et al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. **Nature Biotechnology**, v. 34, n. 8, p. 828–837, 2016.
- WETZEL, S. et al. Cheminformatic Analysis of Natural Products and their Chemical Space. **CHIMIA International Journal for Chemistry**, v. 61, n. 6, p. 355–360, 2007.
- WILLIAMSON, N. R. et al. The biosynthesis and regulation of bacterial prodiginines. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, n. 12, p. 887–899, dez. 2006.
- WONG, C. H. et al. Simultaneous induction of non-canonical autophagy and apoptosis in cancer cells by ROS-dependent ERK and JNK activation. **PLoS ONE**, v. 5, n. 4, 2010.
- WU, T. Y. H. et al. Development and characterization of nonpeptidic small molecule inhibitors of the XIAP/caspase-3 interaction. **Chemistry and Biology**, v. 10, n. 8, p. 759–767, 2003.
- WU, W. et al. Identification and validation of metastasis-associated proteins in head and neck cancer cell lines by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. **Clinical & experimental metastasis**, v. 19, n. 4, p. 319–26, 2002.
- WYGRECKA, M. et al. Enolase-1 promotes plasminogen-mediated recruitment of monocytes to the acutely inflamed lung. **Blood**, v. 113, n. 22, p. 5588–5598, 2009.
- YAN, B. Research progress on Livin protein: An inhibitor of apoptosis. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 357, n. 1–2, p. 39–45, 2011.
- YENKEJEH, R.; SAM, M.; ESMAEILLOU, M. Targeting survivin with prodiginosin isolated from cell wall of *Serratia marcescens* induces apoptosis in hepatocellular carcinoma cells. **Human & Experimental Toxicology**, v. 36, n. 4, p. 402–411, 22 abr. 2017.
- YOUNG, I. S.; THORNTON, P. D.; THOMPSON, A. Synthesis of natural products containing the pyrrolic ring. **Natural Product Reports**, v. 27, n. 12, p. 1801, 2010.
- YU, W.-L. et al. Spirohexenolide A Targets Human Macrophage Migration Inhibitory Factor (hMIF). **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 5, p. 817–823, 24 maio 2013.

YU, W. L. et al. An optimized immunoaffinity fluorescent method for natural product target elucidation. **Journal of Natural Products**, v. 73, n. 10, p. 1659–1666, 2010.

ZHANG, L.; CILLEY, R. E.; CHINOY, M. R. Suppression subtractive hybridization to identify gene expressions in variant and classic small cell lung cancer cell lines. **Journal of Surgical Research**, v. 93, n. 1, p. 108–119, 2000.

ZHENG, N. et al. The subcellular distribution of small molecules: From pharmacokinetics to synthetic biology. **Molecular Pharmaceutics**, v. 8, n. 5, p. 1619–1628, 2011.

ZHOU, J. et al. Immunity to the melanoma inhibitor of apoptosis protein (ML-IAP; livin) in patients with malignant melanoma. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 61, n. 5, p. 655–665, 2012.

ZHUO, R. et al. Ligand fishing: A remarkable strategy for discovering bioactive compounds from complex mixture of natural products. **Molecules**, v. 21, n. 11, 2016.

ZOTCHEV, S. B. Marine actinomycetes as an emerging resource for the drug development pipelines. **Journal of biotechnology**, v. 158, n. 4, p. 168–75, 30 abr. 2012.

ANEXOS

ANEXO I

Produtos naturais em fase de testes clínicos

Tabela S1. Produtos naturais marinhos em fase de testes clínicos (adaptado de GERWICK; MOORE, 2012; MAYER *et al.*, 2010; WATERS *et al.*, 2010) atualizado de acordo com o “Marine Pharmaceuticals: The Clinical Pipeline” (MIDWESTERN UNIVERSITY, 2017). N.A., não aplicável.

Situação clínica	Composto	Nome comercial	Organismo fonte/ Provável produtor	Classe química	Aplicação terapêutica
Fase III	Plitidepsina	Aplidin	Ascídia/bactéria	Depsipeptídeo	Câncer
	Plinabulina, NPI-2358	N.A.	Fungo	Diceto-piperazina	Câncer
	Lactato de esqualamina, OHR-102	N.A.	Tubarão	Aminosterol	Degeneração macular
	Tetrodoxina	Tectin	Peixe	Alcaloides guanidínicos	Dor crônica
	Glembatumumab Vedotin, CDX-011	N.A.	Molusco/ cianobactéria	Anticorpo conjugado ao fármaco	Câncer
	Lurbinetedina, PM01183	N.A.	Ascídia	Alcaloide	Câncer
Fase II	Depatuxizumab, ABT-414	N.A.	Molusco/ cianobactéria	Anticorpo conjugado ao fármaco	Câncer
	DMXBA, GTS-21	N.A.	Nemertíneo	Alcaloide	Esquizofrenia, Alzheimer, Transtorno de déficit de atenção, Sepsis
	Denintuzumab mafodotin, SGN-CD19A	N.A.	Molusco/ cianobactéria	Anticorpo conjugado ao fármaco	Câncer
	ASG-16CF3	N.A.	Molusco/ cianobactéria	Anticorpo conjugado ao fármaco	Câncer
	Polatuzumab vedotin (DCDS-4501A)	N.A.	Molusco/ cianobactéria	Anticorpo conjugado ao fármaco	Câncer
	PM184	N.A.	Esponja	Policetídeo	Câncer
	Tisotumab Vedotin	HuMax-TF-ADC	Molusco/ cianobactéria	Anticorpo conjugado ao fármaco	Câncer
	Enfortumab Vedotin, ASG-22ME	N.A.	Molusco/ cianobactéria	Anticorpo conjugado ao fármaco	Câncer
	GSK2857916	N.A.	Molusco/ cianobactéria	Anticorpo conjugado ao fármaco	Câncer
	ABBV-085	N.A.	Molusco/ cianobactéria	Anticorpo conjugado ao fármaco	Câncer
ABBV-399	N.A.	Molusco/ cianobactéria	Anticorpo conjugado ao fármaco	Câncer	

ABBV-221	N.A.	Molusco/ cianobactéria	Anticorpo conjugado ao fármaco	Câncer
ASG-67E	N.A.	Molusco/ cianobactéria	Anticorpo conjugado ao fármaco	Câncer
ASG-15ME	N.A.	Molusco/ Cianobactéria	Anticorpo conjugado a droga	Câncer
Briostatina 1	N.A.	Briozoário/ proteobactéria	Macrolídeo	Câncer
Salinosporamida A, NPI-0052	Marizomib	Bactéria	β -lactona- γ - lactâmico	Câncer
SGN-LIV1A	N.A.	Molusco/ Cianobactéria	Anticorpo conjugado a droga	Câncer

ANEXO II

Síntese da sonda IAF da clorizidina A

Os procedimentos para síntese da sonda IAF da clorizidina está descrito abaixo e ilustrado na figura S1.

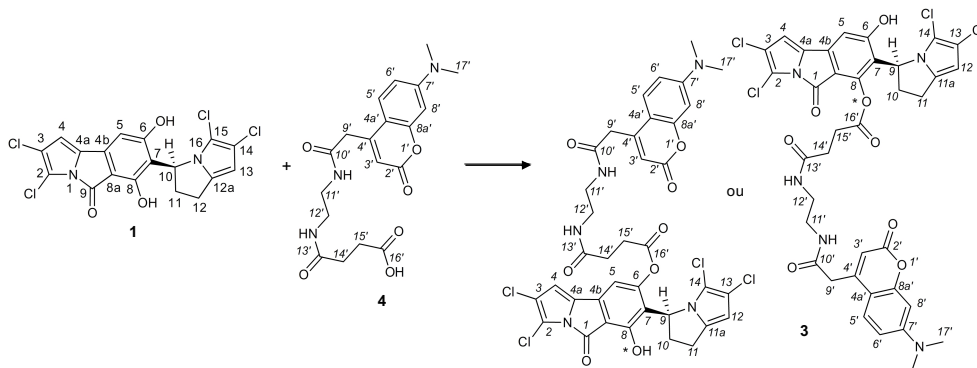


Figura S1. Reação de síntese da sonda IAF da clorizidina A.

EDC (22,7 mg, 0,118 mmol), DMAP (0,5 mg) e marcador IAF **4** (10,5 mg, 0,0270 mmol) foram sequencialmente adicionados a clorizidina A **1** (13,3 mg, 0,030 mmol) dissolvida em DMF seco (2,0 mL). A solução foi agitada a temperatura ambiente durante 5 h e depois diluída com água (4 mL). Adicionou-se uma solução aquosa saturada de NH_4Cl (4 mL) e a mistura foi extraída com EtOAc (2 x 5 mL). As camadas orgânicas combinadas foram lavadas com *brine* (2 mL), secas com MgSO_4 , filtradas e concentradas. O produto, sonda IAF **3**, foi purificado por CLAE de fase reversa (55% de $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$, $t_R = 18$ min, C8 (2) Phenomenex Luna, 3 mL min⁻¹) para proporcionar 2,4 mg (10% de rendimento) de **3**. O baixo rendimento foi atribuído à instabilidade de **1** durante as condições de reação.

Sonda IAF **3**: espectro UV-Visível (CH_3CN aq. A 30%) $\lambda_{\text{máx}}$ 273, 380 nm; $[\alpha]_D = 92$ (c 0,12, 30% aq. CH_3CN); HRESI-FT-MS (Orbit-Trap-MS) m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculado. para $\text{C}_{37}\text{H}_{32}^{35}\text{Cl}_4\text{N}_5\text{O}_8$: 814,1005, m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ encontrado: 814,0995.

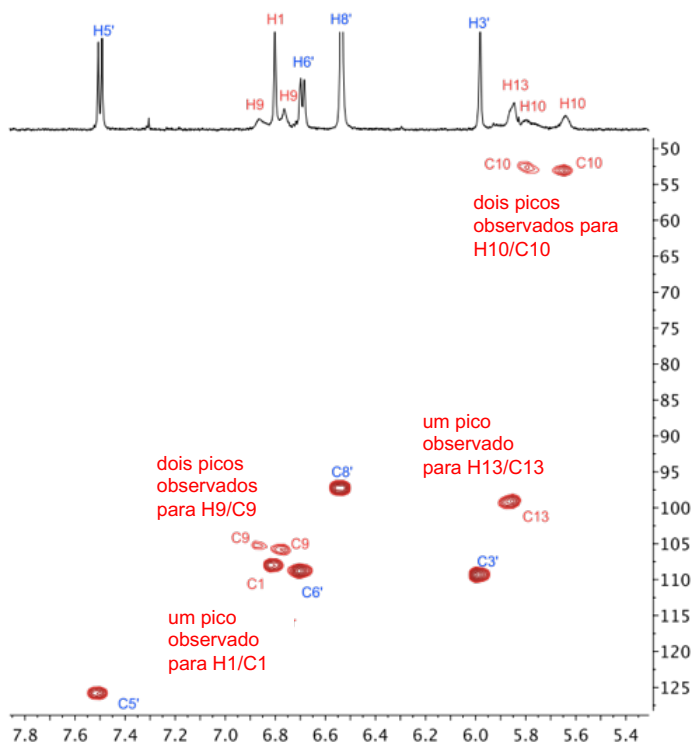


Figura S2. Espectro de HSQC H₁, C₁₃ da sonda IAF **3** em $\text{DMSO}-d_6$ a 23 °C com picos assinalados. Picos de prótons e carbonos da sonda IAF em azul e prótons e carbonos da clorizidina A em vermelho.

ANEXO III

Expressão heteróloga e purificação da enolase 1

A hENO1 recombinante foi preparada usando métodos estabelecidos. Resumidamente, células de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas com pET14b-ENO1 foram cultivadas em meio LB contendo 100 µg/mL de ampicilina a 37 ° C até uma OD₆₀₀ de 0,8, seguido de indução da expressão com 0,5 mM de isopropil β-D -1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) por 4 h a 37 °C. As células foram recolhidas por centrifugação (7000 x g durante 10 min), ressuspensas em 40 mL de tampão de lise (HEPES 50 mM, pH 7,4, KCl 150 mM, MgCl₂ 5 mM, glicerol a 5%, β-mercaptoetanol 2 mM (BME), coquetel inibidor de protease livre de EDTA (Roche) por 50 mL de meio de cultura, e lisado por passagem única através de microfluidificador M110-T (Microfluidics). O lisado foi clarificado por centrifugação (118.834 x g, 1 h, 4 ° C) e o sobrenadante resultante foi incubado durante 1 h a 4 ° C com resina de afinidade de metal Talon (Clontech) equilibrada em HEPES 50 mM, pH 7,4, 150 mM. KCl, MgCl₂ 5 mM. A resina e o sobrenadante foram então carregados numa coluna descartável de 25 ml (BioRad), lavados com 10 volumes de coluna de tampão de lavagem (HEPES 50 mM, pH 7,4, KCl 150 mM, MgCl₂ 5 mM, BME 2 mM, imidazol 5 mM). seguido por 10 volumes de coluna de tampão de lavagem rigoroso (HEPES 50 mM, pH 7,4, KCl 1 M, MgCl₂ 5 mM, BME 2 mM, imidazole 20 mM) e eluíã com tampão (HEPES 50 mM, pH 7,4, KCl 1 M MgCl₂ 5 mM, BME 2 mM, imidazole 250 mM). As frações foram analisadas por SDS-PAGE a 12% e aquelas contendo hENO1 foram reunidas e dialisadas em tampão de armazenamento (HEPES 20 mM, KCl 150 mM, MgCl₂ 5 mM, glicerol a 5%, BME 2 mM, pH 7,4), concentradas utilizando um filtro de ultracentrifugação de 10 kDa (Amicon) para obter uma solução de hENO1 a 9,1 mg/mL, a qual foi alíquotada, congelada em N₂ líquido e armazenada a - 80 ° C até sua utilização.

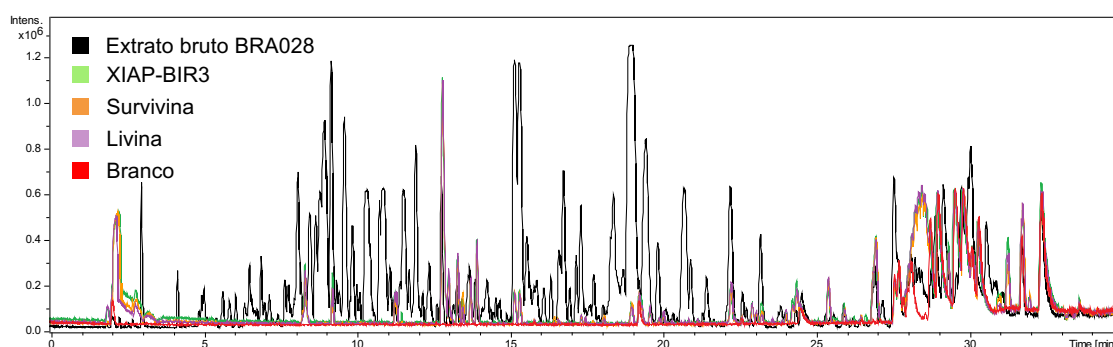
ANEXO IV

Análises do ensaio de bioafinidade dos demais extratos

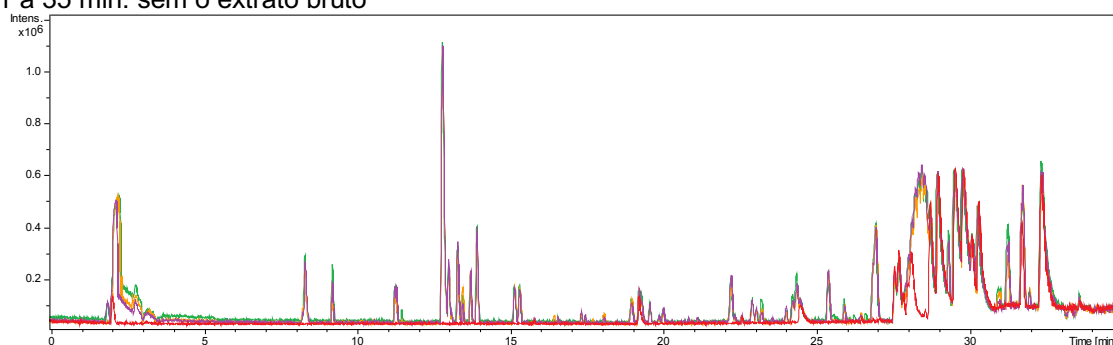
FIGURA S3	Análise da CF do extrato da cepa BRA028.....	156
FIGURA S4	Análise da CF do extrato da cepa BRA093.....	180
FIGURA S5	Análise da CF do extrato da cepa BRA134.....	185
FIGURA S6	Análise da CF do extrato da cepa BRA154.....	186
FIGURA S7	Análise da CF do extrato da cepa BRA166.....	186
FIGURA S8	Análise da CF do extrato da cepa BRA180.....	186
FIGURA S9	Análise da CF do extrato da cepa BRA190.....	187
FIGURA S10	Análise da CF do extrato da cepa BRA203.....	190
FIGURA S11	Análise da CF do extrato da cepa BRA214.....	192
FIGURA S12	Análise da CF do extrato da cepa BRA220.....	194
FIGURA S13	Análise da CF do extrato da cepa BRA227.....	194
FIGURA S14	Análise da CF do extrato da cepa BRA232.....	195
FIGURA S15	Análise da CF do extrato da cepa BRA233.....	197
FIGURA S16	Análise da CF do extrato da cepa BRA234.....	198
FIGURA S17	Análise da CF do extrato da cepa BRA235.....	200
FIGURA S18	Análise da CF do extrato da cepa BRA244.....	200
FIGURA S19	Análise da CF do extrato da cepa BRA249.....	202
FIGURA S20	Análise da CF do extrato da cepa BRA250.....	202
FIGURA S21	Análise da CF do extrato da cepa BRA258.....	203
FIGURA S22	Análise da CF do extrato da cepa BRA263.....	204

BRA028

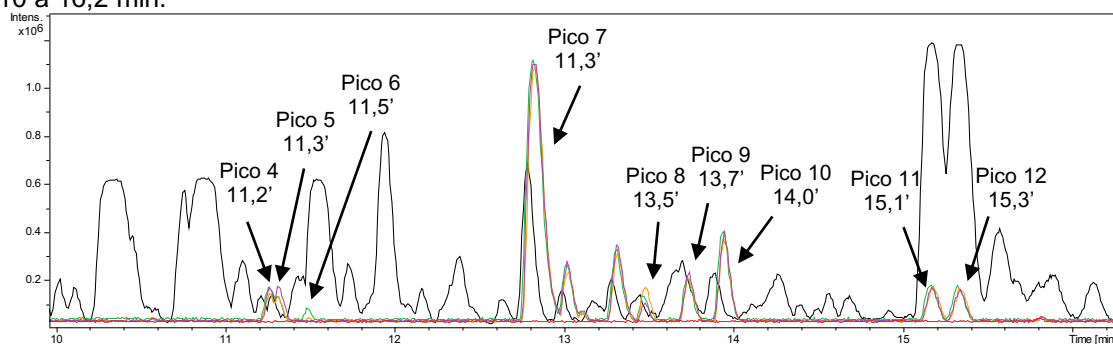
A)



1 a 35 min: sem o extrato bruto



10 a 16,2 min:



14,9 a 20,2 min:

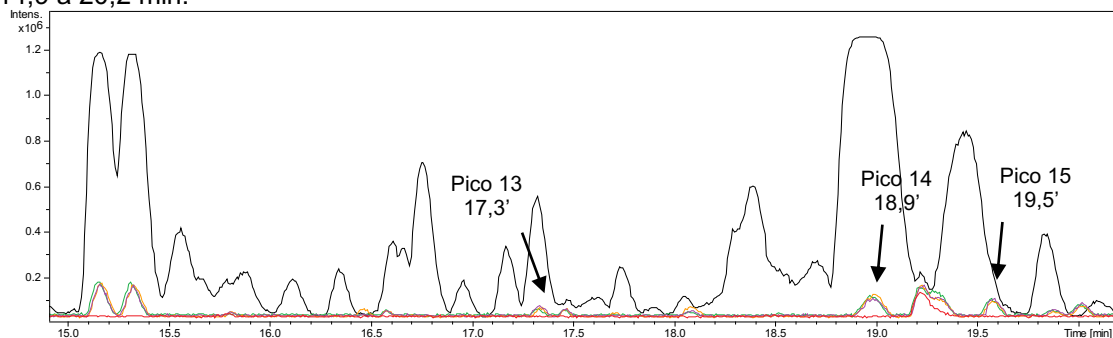
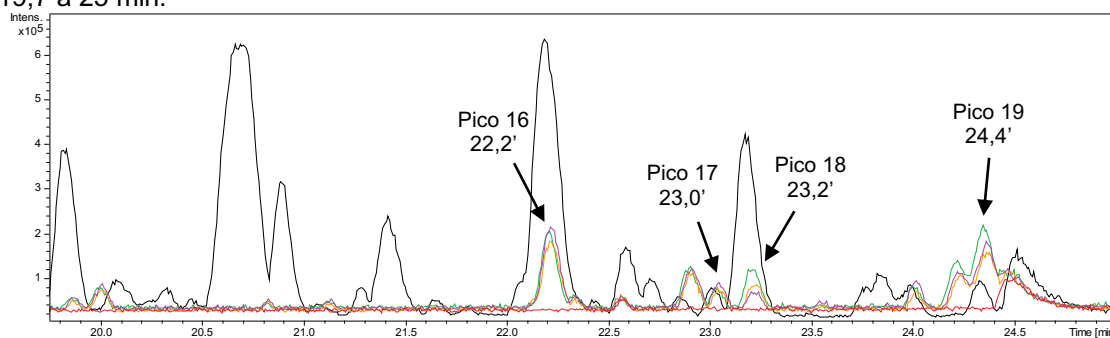
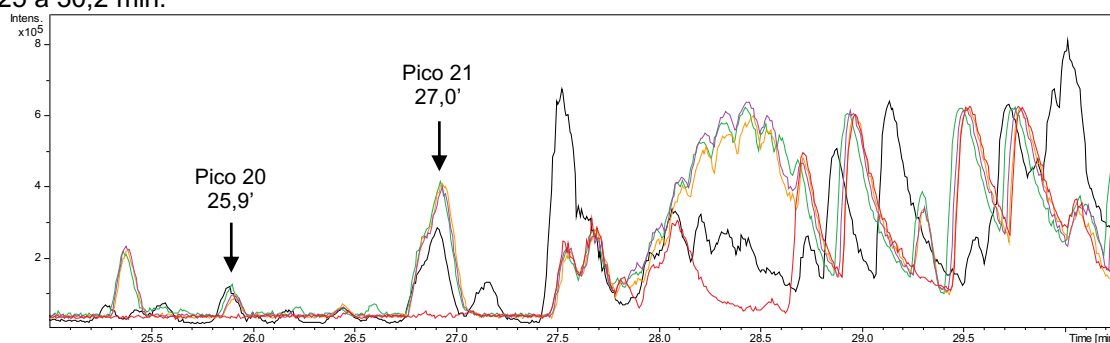


Figura S3. Análise do ensaio de bioafinidade do extrato da cepa BRA028. A) Cromatograma do extrato bruto e amostras das proteínas-alvo (BIR3-XIAP, survivina e livina) e cromatogramas com ampliações das faixas de tempo contendo os hits detectados, indicados pelas setas. B) Espectros de massa dos hits detectados. (continua)

19,7 a 25 min:



25 a 30,2 min:



B)

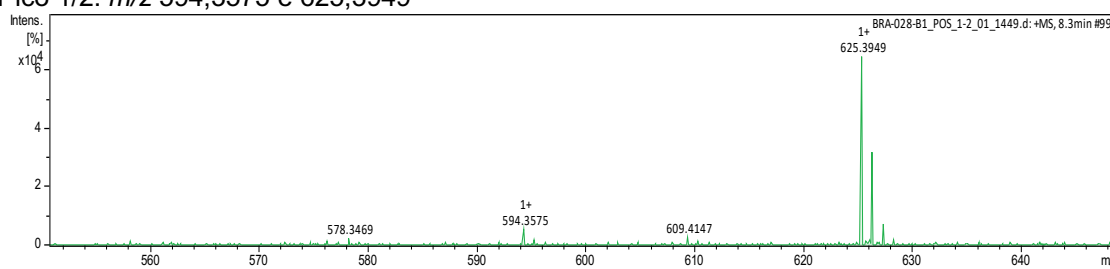
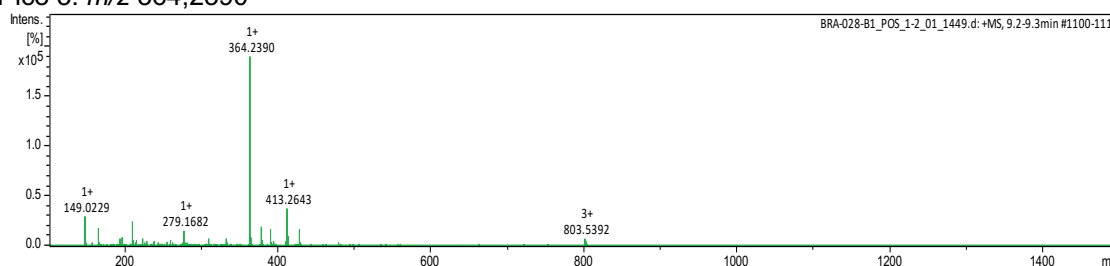
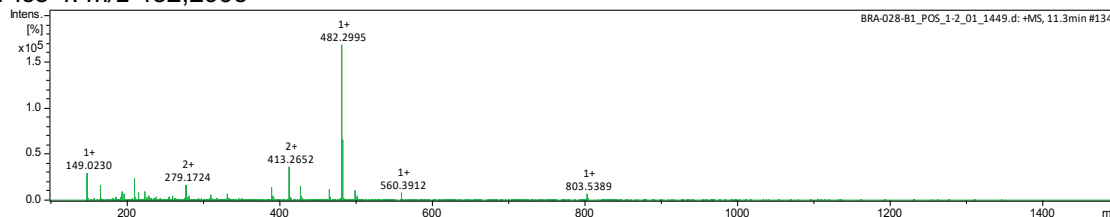
Pico 1/2: m/z 594,3575 e 625,3949Pico 3: m/z 364,2390Pico 4: m/z 482,2995

Figura S3. Análise do ensaio de bioafinidade do extrato da cepa BRA028. A) Cromatograma do extrato bruto e amostras das proteínas-alvo (BIR3-XIAP, survivina e livina) e cromatogramas com ampliações das faixas de tempo contendo os hits detectados, indicados pelas setas. B) Espectros de massa dos hits detectados. (continua)

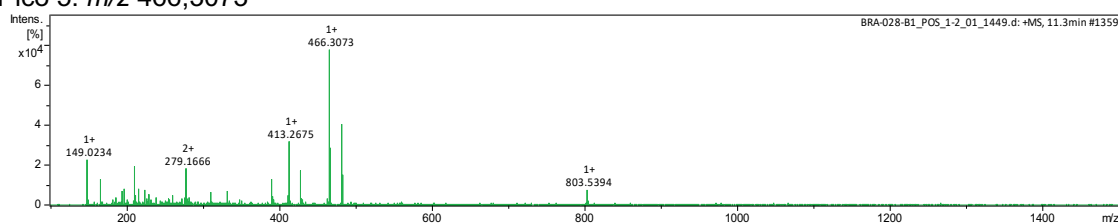
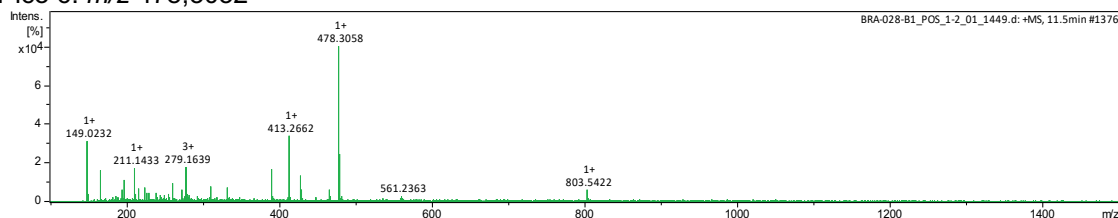
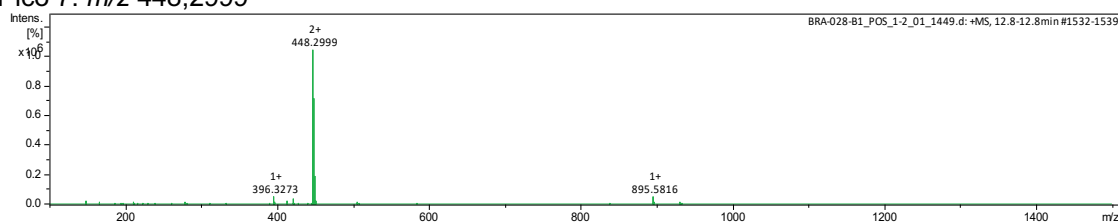
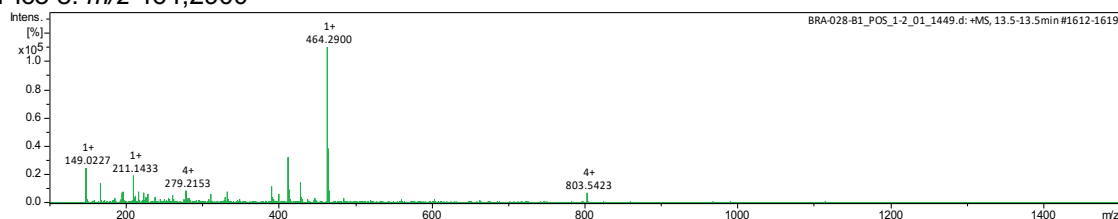
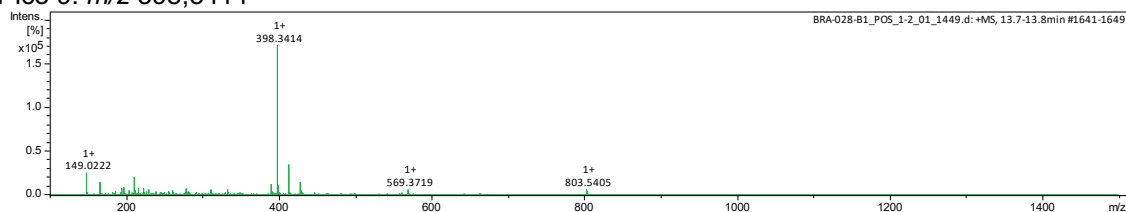
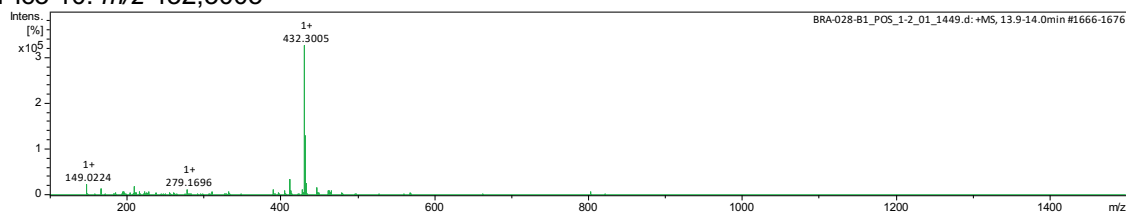
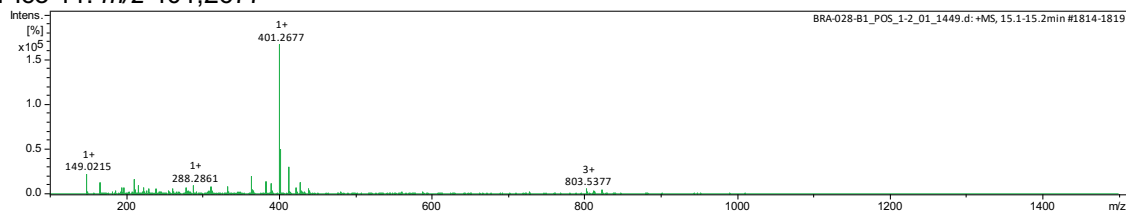
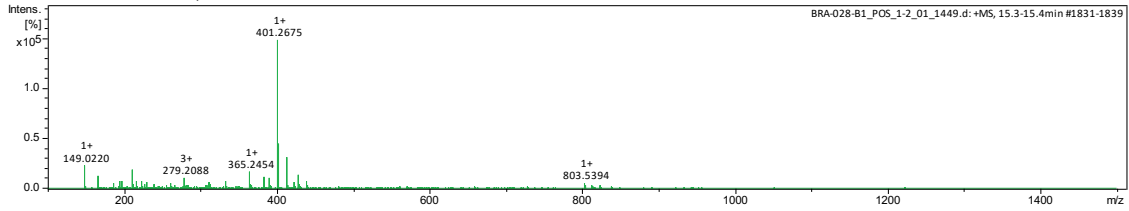
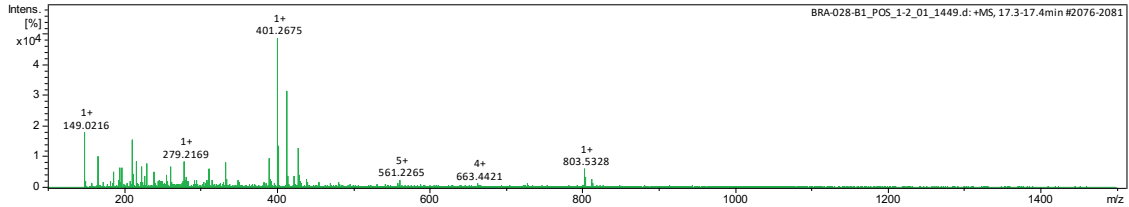
Pico 5: m/z 466,3073Pico 6: m/z 478,3052Pico 7: m/z 448,2999Pico 8: m/z 464,2900Pico 9: m/z 398,3414Pico 10: m/z 432,3005Pico 11: m/z 401,2677

Figura S3. Análise do ensaio de bioafinidade do extrato da cepa BRA028. A) Cromatograma do extrato bruto e amostras das proteínas-alvo (BIR3-XIAP, survivina e livina) e cromatogramas com ampliações das faixas de tempo contendo os hits detectados, indicados pelas setas. B) Espectros de massa dos hits detectados. (continua)

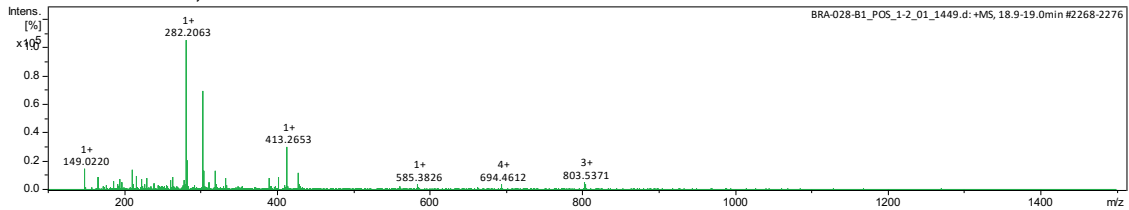
Pico 12: m/z 401,2675



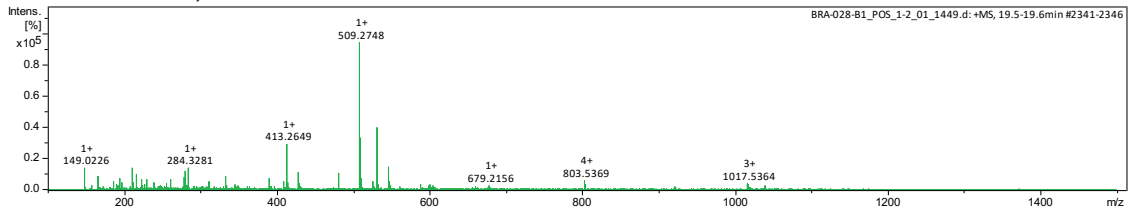
Pico 13: m/z 401,2675



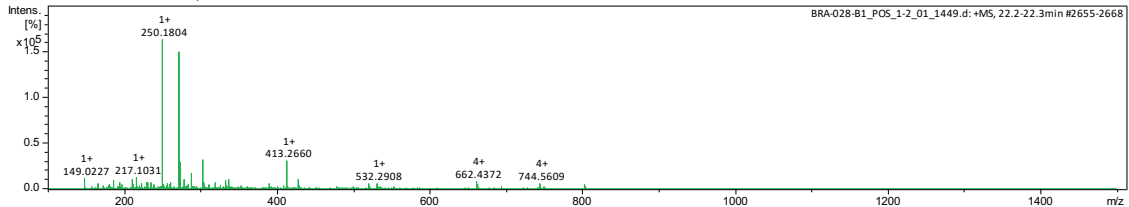
Pico 14: m/z 282,2063



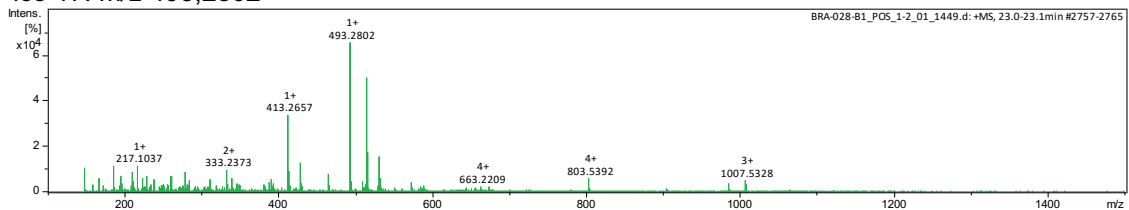
Pico 15: m/z 509,2748



Pico 16: m/z 250,1804



Pico 17: m/z 493,2802



Pico 18: m/z 415,2845

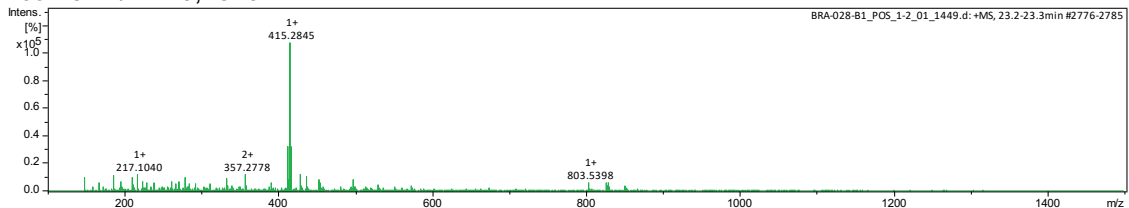


Figura S3. Análise do ensaio de bioafinidade do extrato da cepa BRA028. A) Cromatograma do extrato bruto e amostras das proteínas-alvo (BIR3-XIAP, survivina e livina) e cromatogramas com ampliações das faixas de tempo contendo os hits detectados, indicados pelas setas. B) Espectros de massa dos hits detectados. (continua)

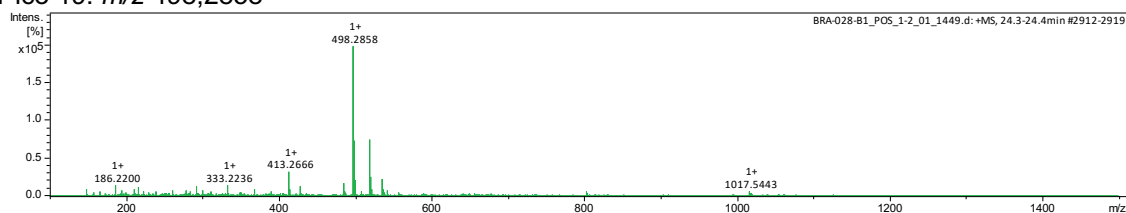
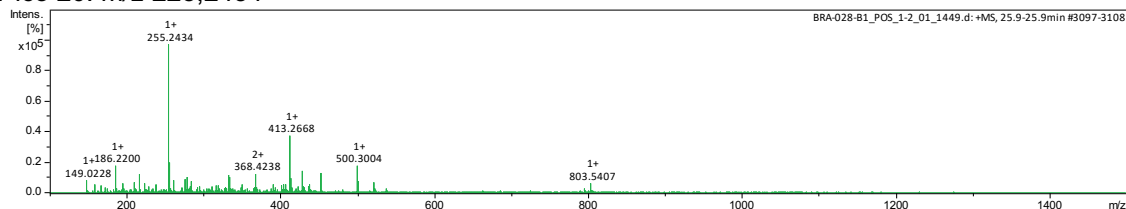
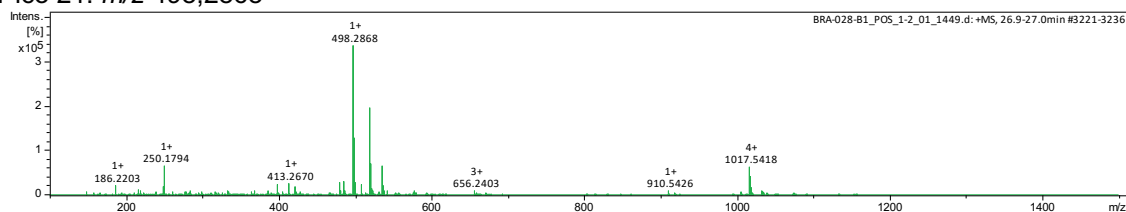
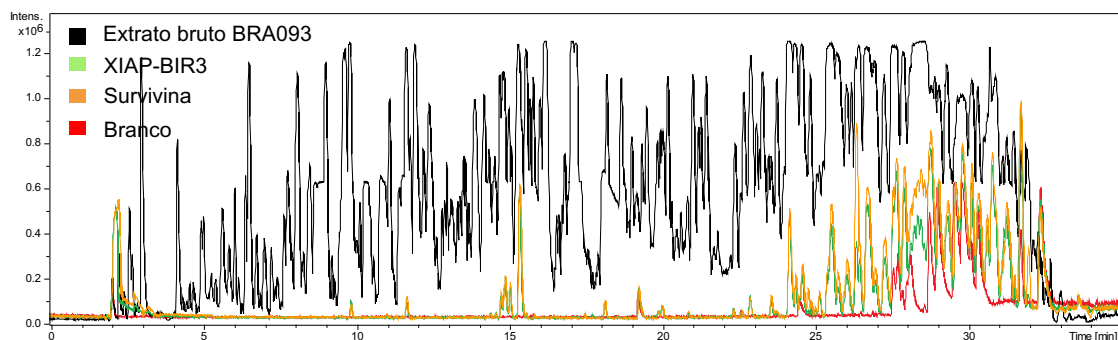
Pico 19: m/z 498,2858Pico 20: m/z 225,2434Pico 21: m/z 498,2868

Figura S3. Análise do ensaio de bioafinidade do extrato da cepa BRA028. A) Cromatograma do extrato bruto e amostras das proteínas-alvo (BIR3-XIAP, survivina e livina) e cromatogramas com ampliações das faixas de tempo contendo os hits detectados, indicados pelas setas. B) Espectros de massa dos hits detectados.

BRA093

A)



Sem o extrato bruto:

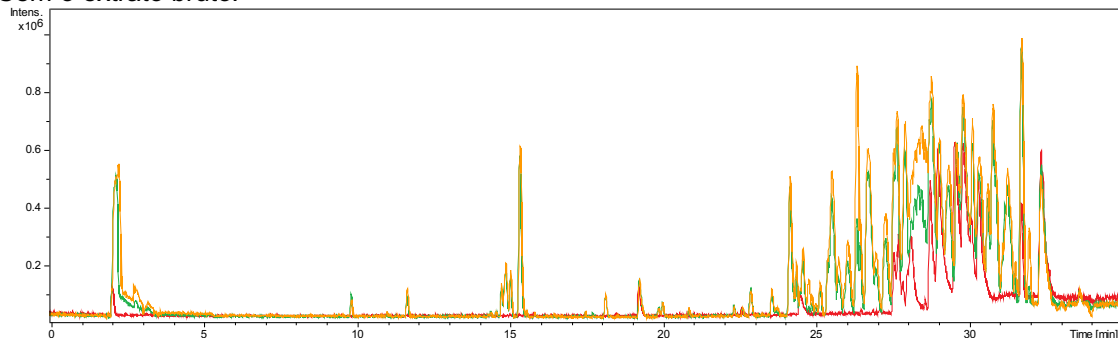
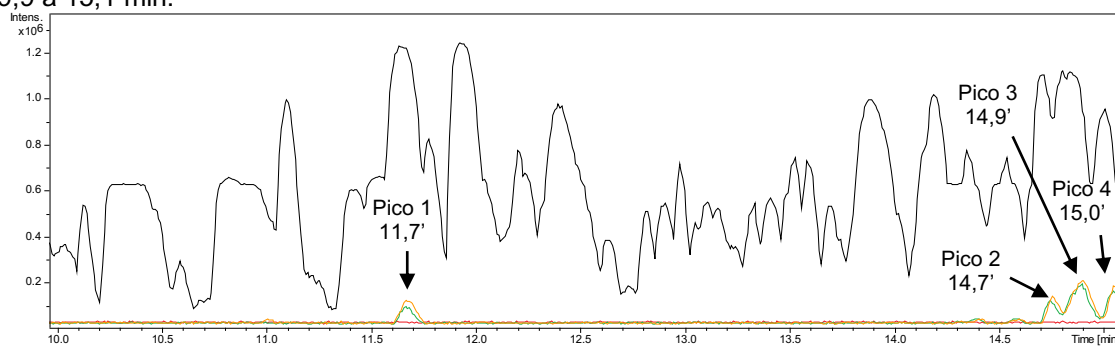
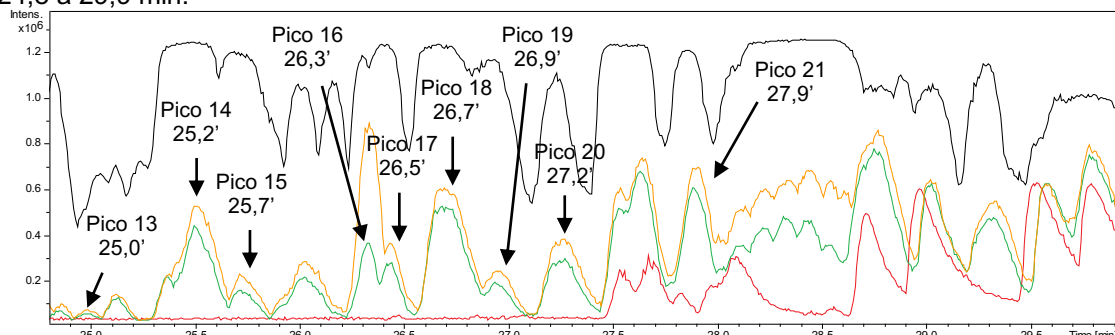


Figura S4. Análise do ensaio de bioafinidade do extrato da cepa BRA093. A) Cromatograma do extrato bruto e amostras das proteínas-alvo (BIR3-XIAP e survivina) e cromatogramas com ampliações das faixas de tempo contendo os hits detectados, indicados pelas setas. B) Espectros de massa dos hits detectados. (continua)

9,9 a 15,1 min:



24,8 a 29,9 min:



B)

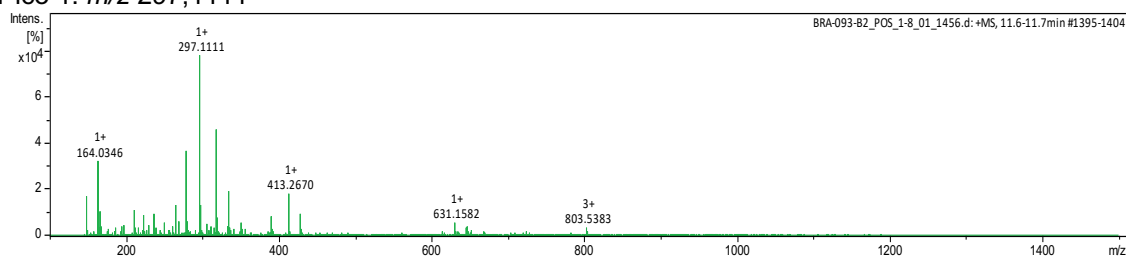
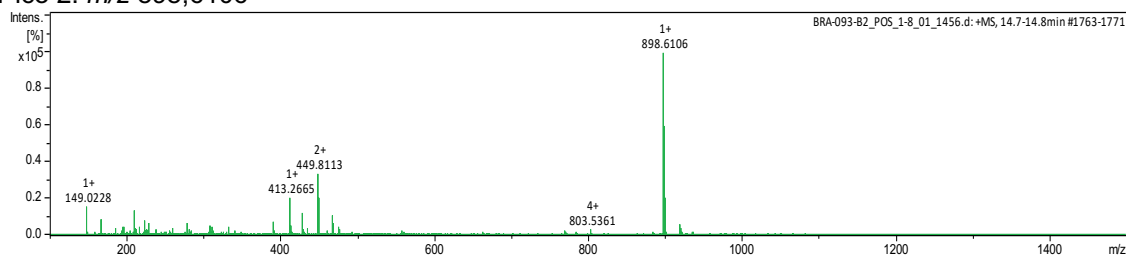
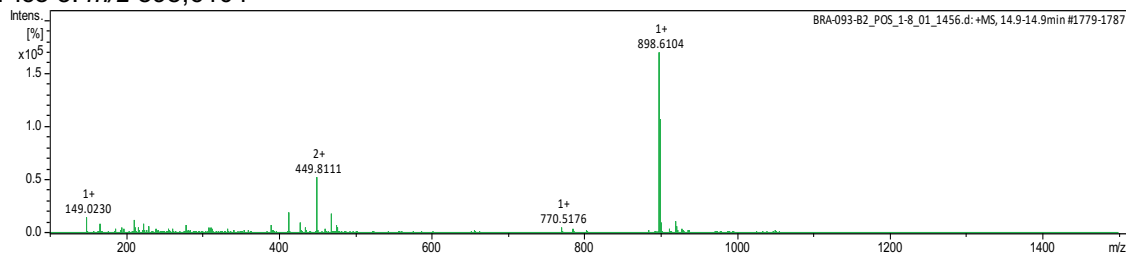
Pico 1: m/z 297,1111Pico 2: m/z 898,6106Pico 3: m/z 898,6104

Figura S4. Análise do ensaio de bioafinidade do extrato da cepa BRA093. A) Cromatograma do extrato bruto e amostras das proteínas-alvo (BIR3-XIAP e survivina) e cromatogramas com ampliações das faixas de tempo contendo os hits detectados, indicados pelas setas. B) Espectros de massa dos hits detectados. (continua)

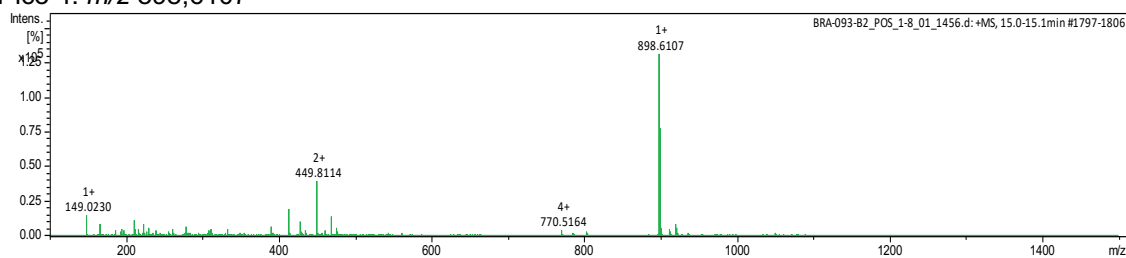
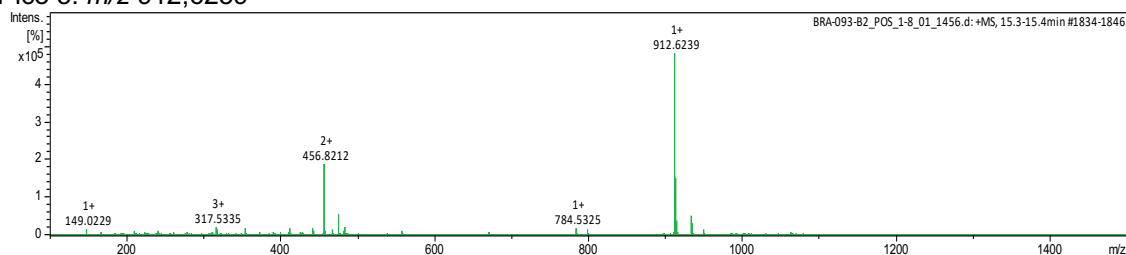
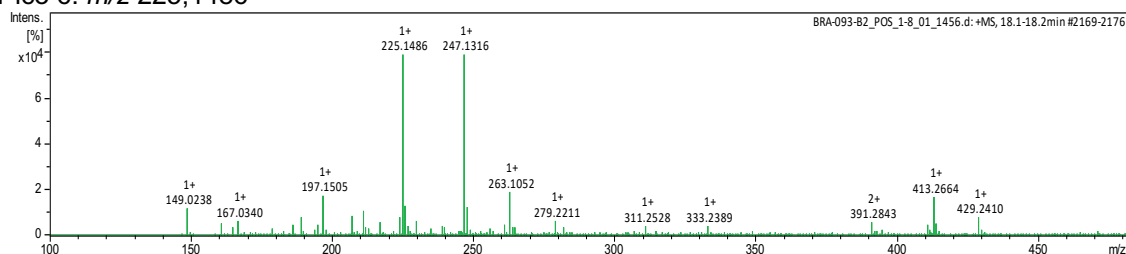
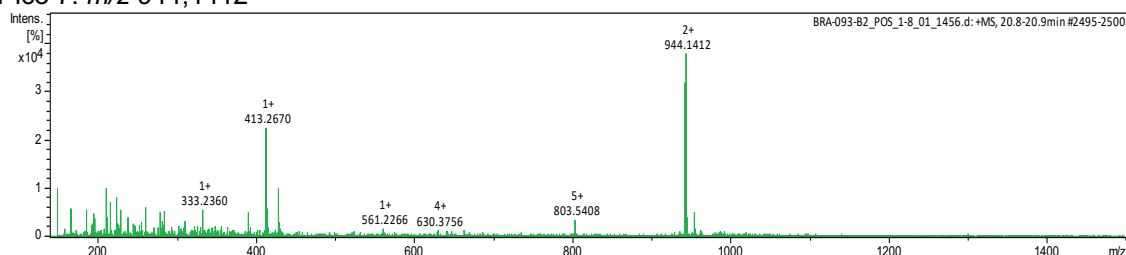
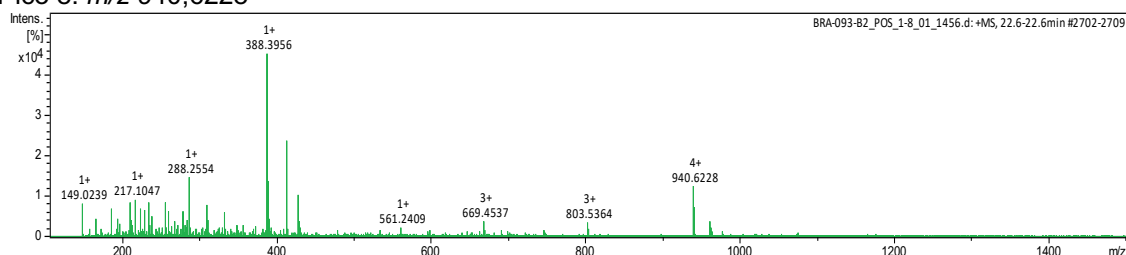
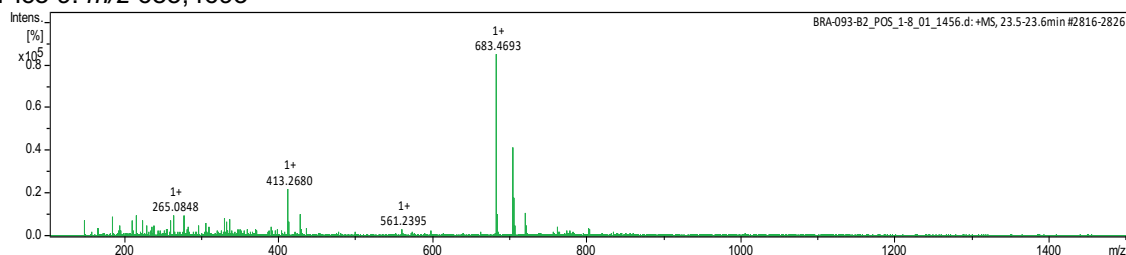
Pico 4: m/z 898,6107Pico 5: m/z 912,6239Pico 6: m/z 225,1486Pico 7: m/z 944,1412Pico 8: m/z 940,6228Pico 9: m/z 683,4693

Figura S4. Análise do ensaio de bioafinidade do extrato da cepa BRA093. A) Cromatograma do extrato bruto e amostras das proteínas-alvo (BIR3-XIAP e survivina) e cromatogramas com ampliações das faixas de tempo contendo os hits detectados, indicados pelas setas. B) Espectros de massa dos hits detectados. (continua)

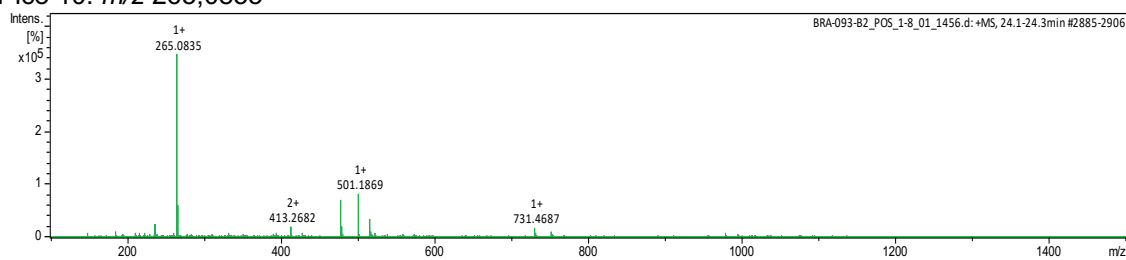
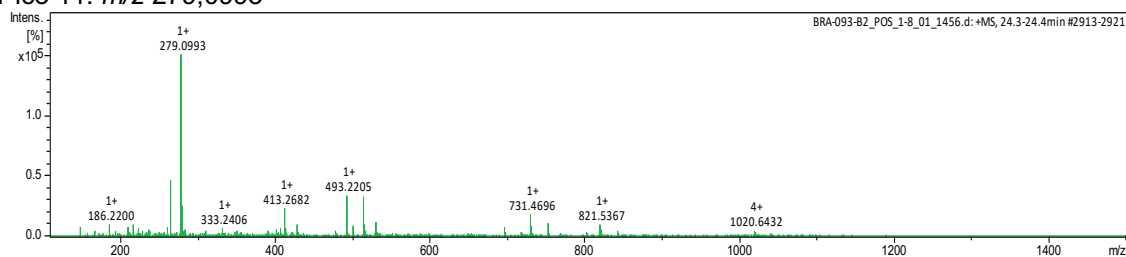
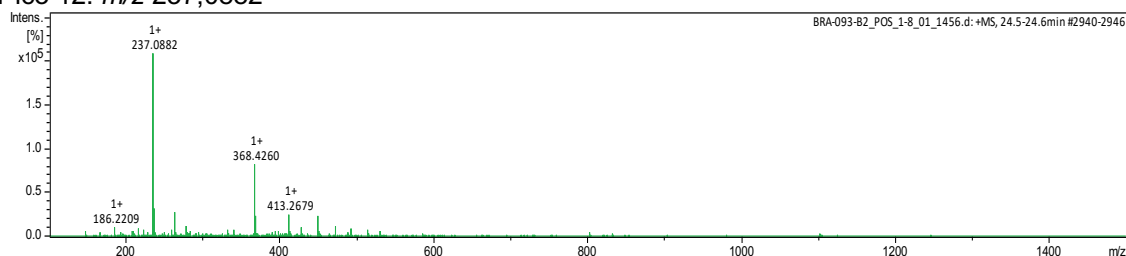
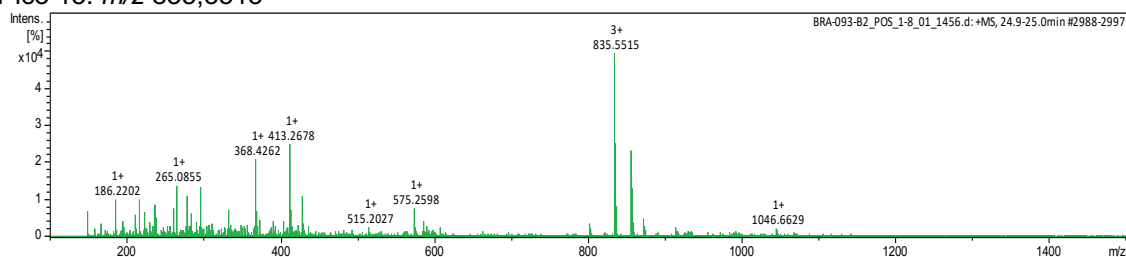
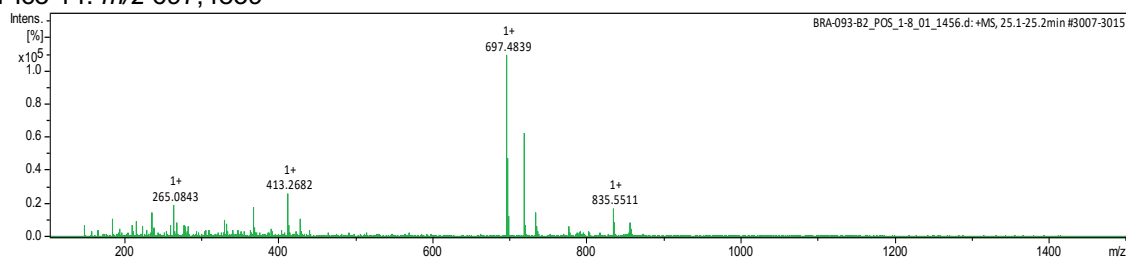
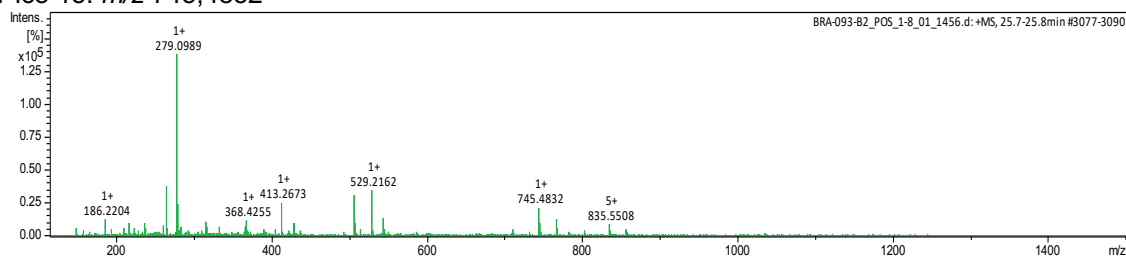
Pico 10: m/z 265,0835Pico 11: m/z 279,0993Pico 12: m/z 237,0882Pico 13: m/z 835,5515Pico 14: m/z 697,4839Pico 15: m/z 745,4832

Figura S4. Análise do ensaio de bioafinidade do extrato da cepa BRA093. A) Cromatograma do extrato bruto e amostras das proteínas-alvo (BIR3-XIAP e survivina) e cromatogramas com ampliações das faixas de tempo contendo os hits detectados, indicados pelas setas. B) Espectros de massa dos hits detectados. (continua)

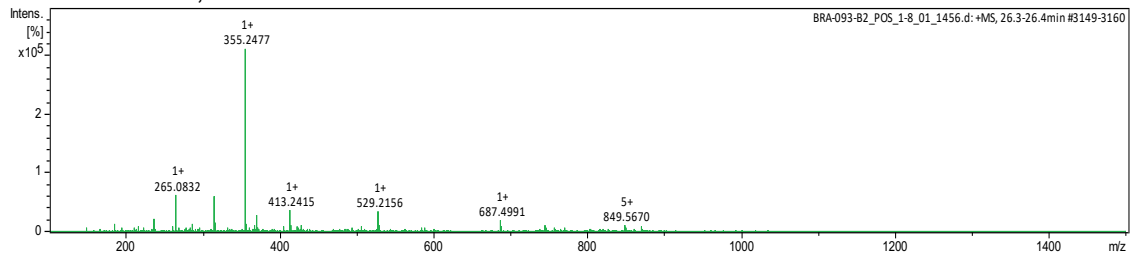
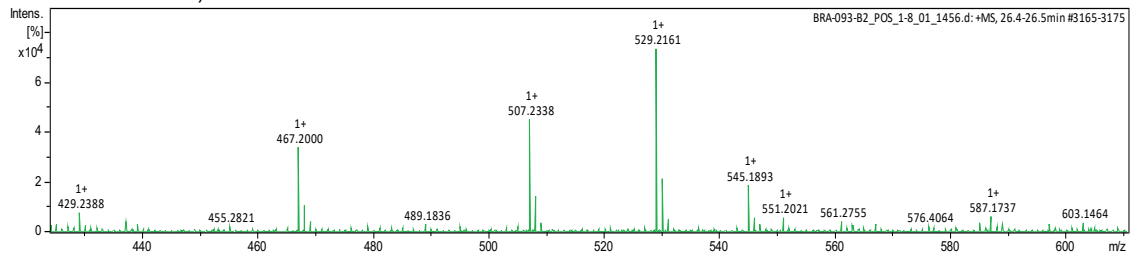
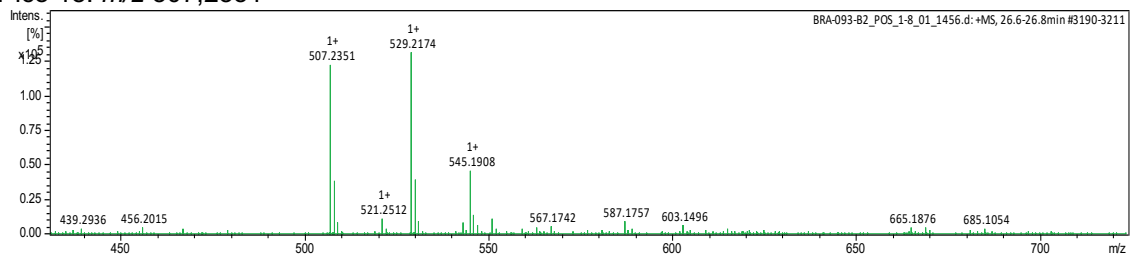
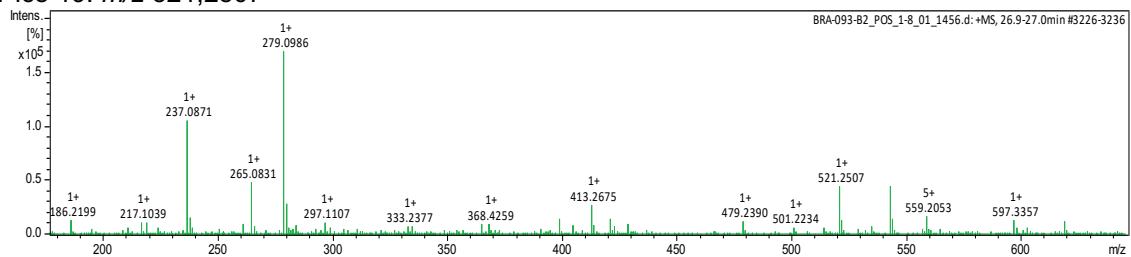
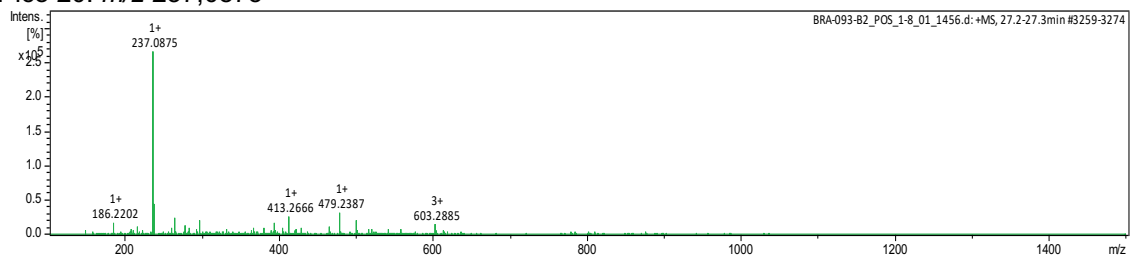
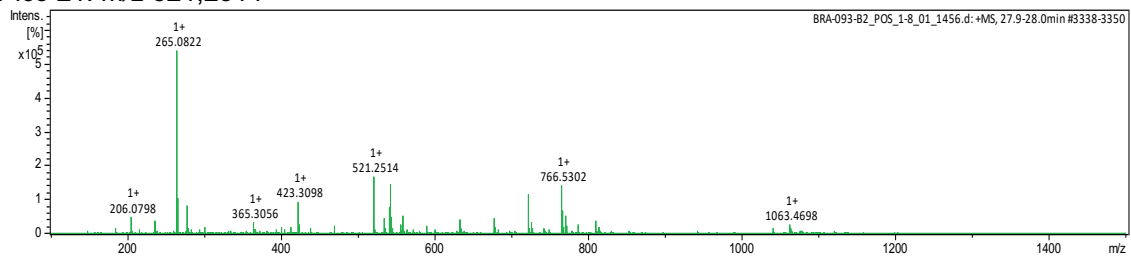
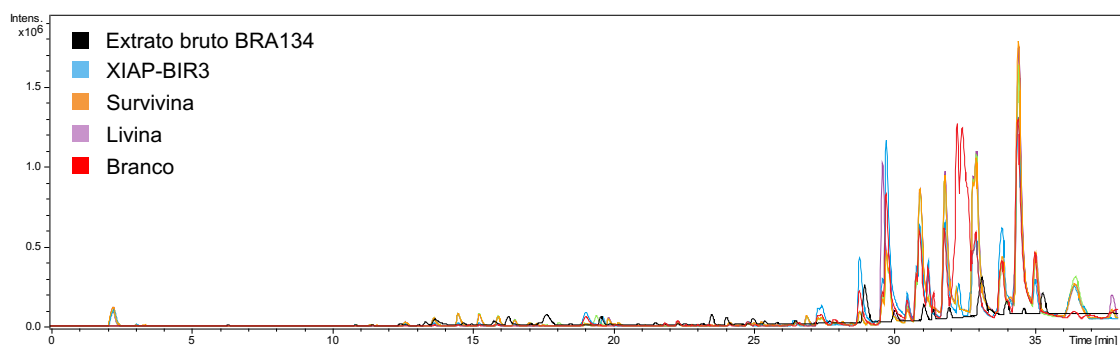
Pico 16: m/z 355,2477Pico 17: m/z 507,2338Pico 18: m/z 507,2351Pico 19: m/z 521,2507Pico 20: m/z 237,0875Pico 21: m/z 521,2514

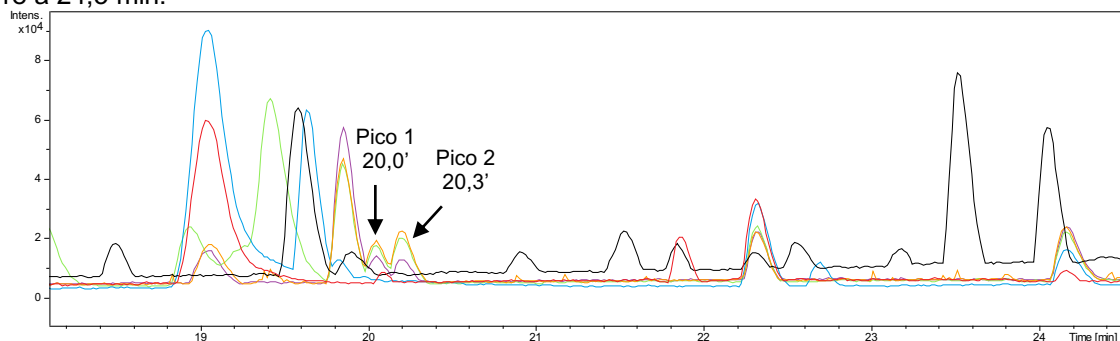
Figura S4. Análise do ensaio de bioafinidade do extrato da cepa BRA093. A) Cromatograma do extrato bruto e amostras das proteínas-alvo (BIR3-XIAP e survivina) e cromatogramas com ampliações das faixas de tempo contendo os hits detectados, indicados pelas setas. B) Espectros de massa dos hits detectados.

BRA134

A)



18 a 24,5 min:



B)

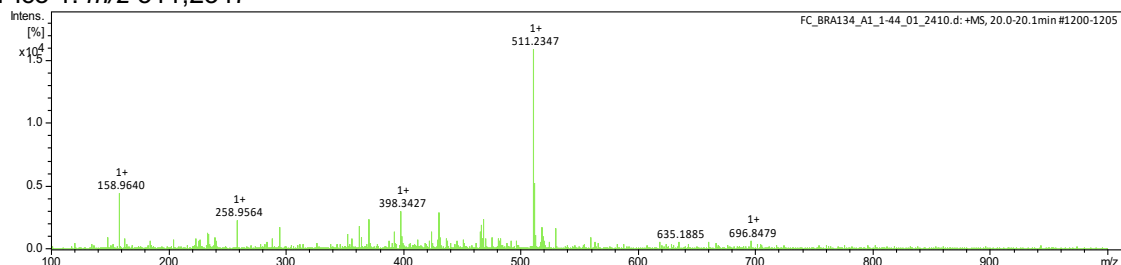
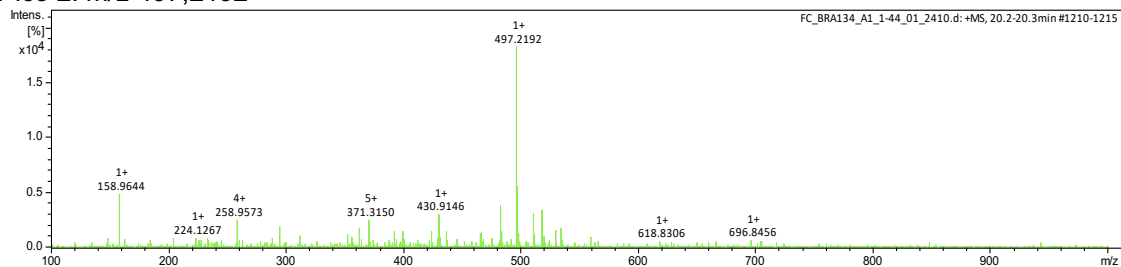
Pico 1: m/z 511,2347Pico 2: m/z 497,2192

Figura S5. Análise do ensaio de bioafinidade do extrato da cepa BRA134. A) Cromatograma do extrato bruto e amostras das proteínas-alvo (BIR3-XIAP, survivina e livina) e cromatogramas com ampliações das faixas de tempo contendo os hits detectados, indicados pelas setas. B) Espectros de massa dos hits detectados.

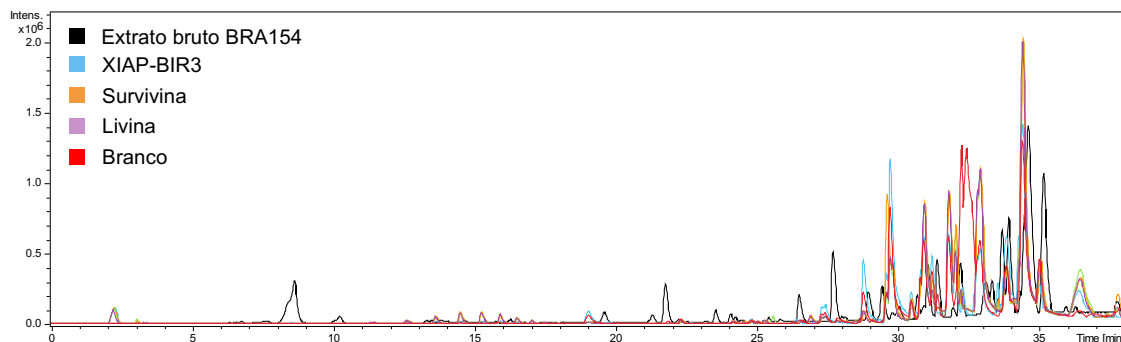
BRA154

Figura S6. Análise do ensaio de bioafinidade do extrato da cepa BRA154. Cromatograma do extrato bruto e amostras das proteínas-alvo (BIR3-XIAP, survivina e livina), nas quais não foram detectados hits.

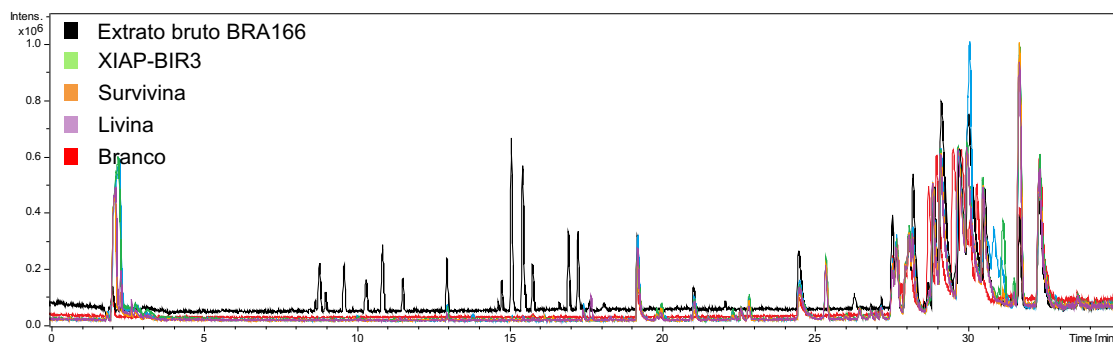
BRA166

Figura S7. Análise do ensaio de bioafinidade do extrato da cepa BRA166. Cromatograma do extrato bruto e amostras das proteínas-alvo (BIR3-XIAP, survivina e livina) e cromatogramas com ampliações nos quais não foram detectados hits.

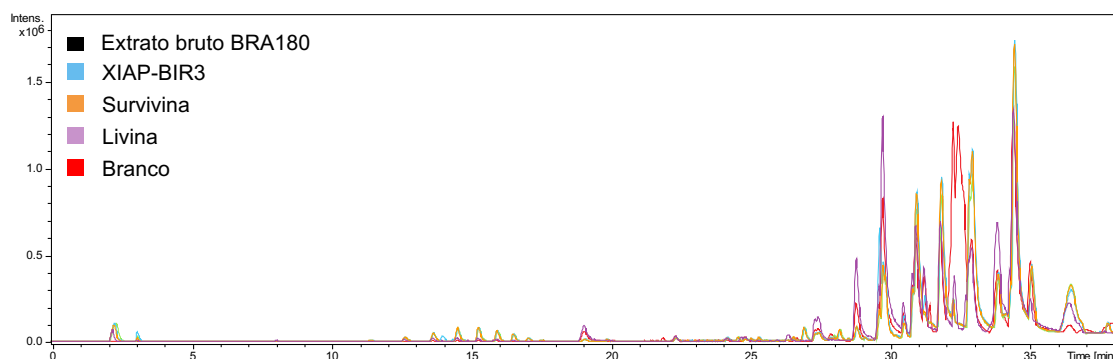
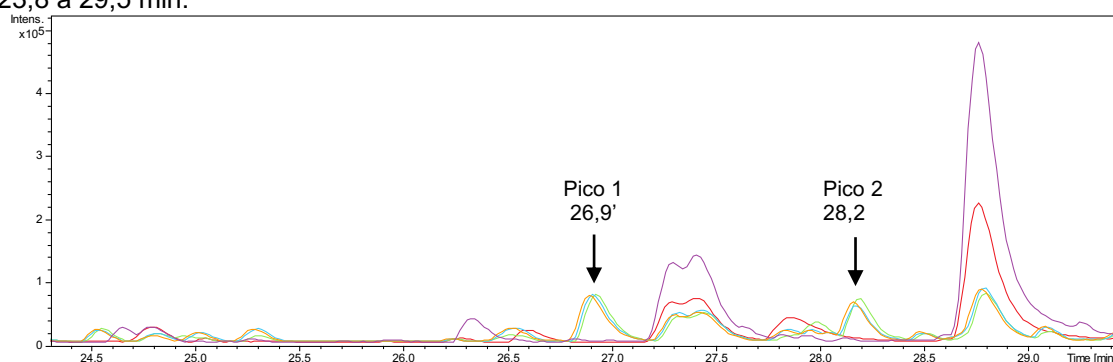
BRA180**A)**

Figura S8. Análise do ensaio de bioafinidade do extrato da cepa BRA180. A) Cromatograma do extrato bruto e amostras das proteínas-alvo (BIR3-XIAP, survivina e livina) e cromatogramas com ampliações das faixas de tempo contendo os hits detectados, indicados pelas setas. B) Espectros de massa dos hits detectados. (continua)

23,8 a 29,5 min:



B)

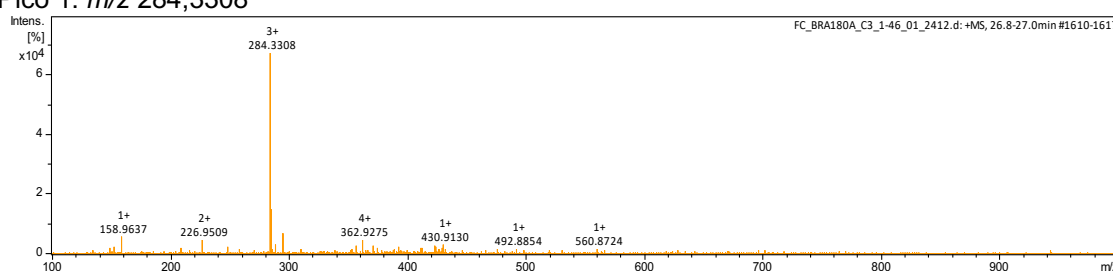
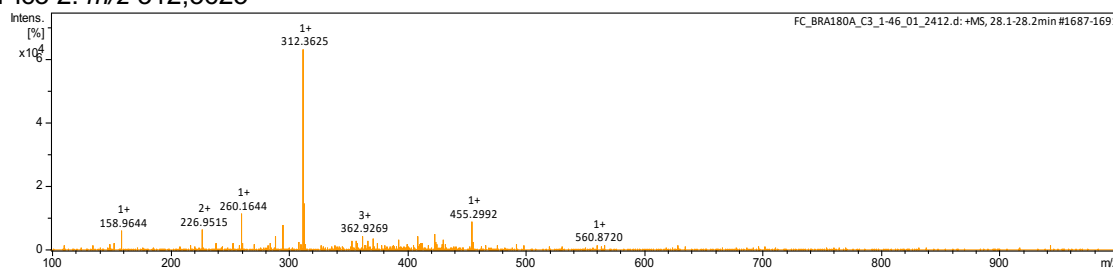
Pico 1: m/z 284,3308Pico 2: m/z 312,3625

Figura S8. Análise do ensaio de bioafinidade do extrato da cepa BRA180. A) Cromatograma do extrato bruto e amostras das proteínas-alvo (BIR3-XIAP, survivina e livina) e cromatogramas com ampliações das faixas de tempo contendo os hits detectados, indicados pelas setas. B) Espectros de massa dos hits detectados.

BRA190

A)

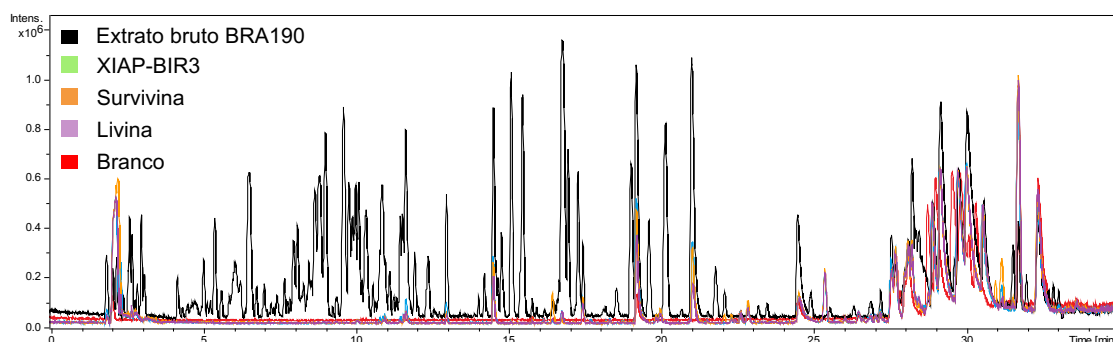
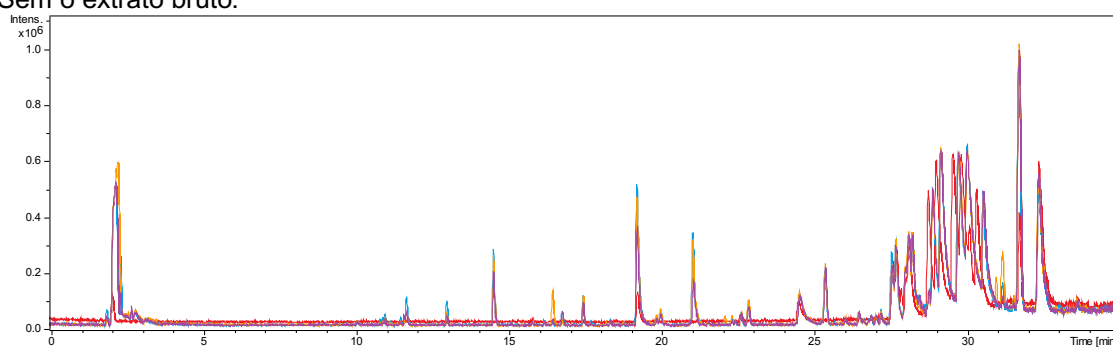
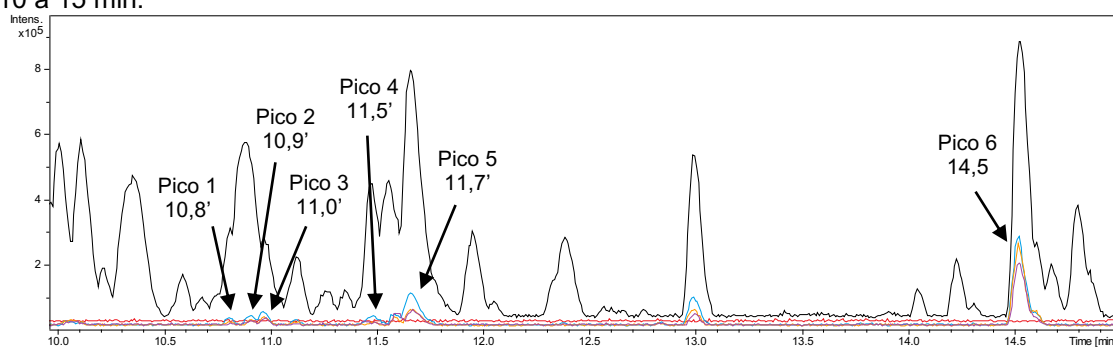


Figura S9. Análise do ensaio de bioafinidade do extrato da cepa BRA190. A) Cromatograma do extrato bruto e amostras das proteínas-alvo (BIR3-XIAP, survivina e livina) e cromatogramas com ampliações das faixas de tempo contendo os hits detectados, indicados pelas setas. B) Espectros de massa dos hits detectados. (continua)

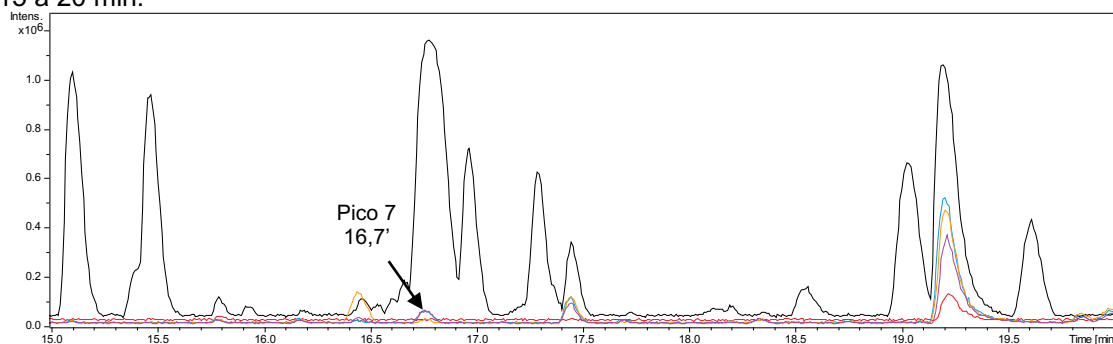
Sem o extrato bruto:



10 a 15 min:



15 a 20 min:



20 a 25 min:

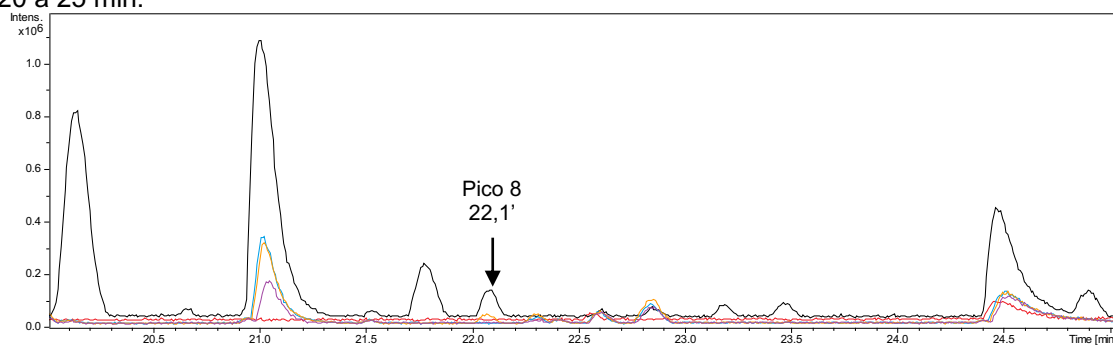


Figura S9. Análise do ensaio de bioafinidade do extrato da cepa BRA190. A) Cromatograma do extrato bruto e amostras das proteínas-alvo (BIR3-XIAP, survivina e livina) e cromatogramas com ampliações das faixas de tempo contendo os hits detectados, indicados pelas setas. B) Espectros de massa dos hits detectados. (continua)

B)

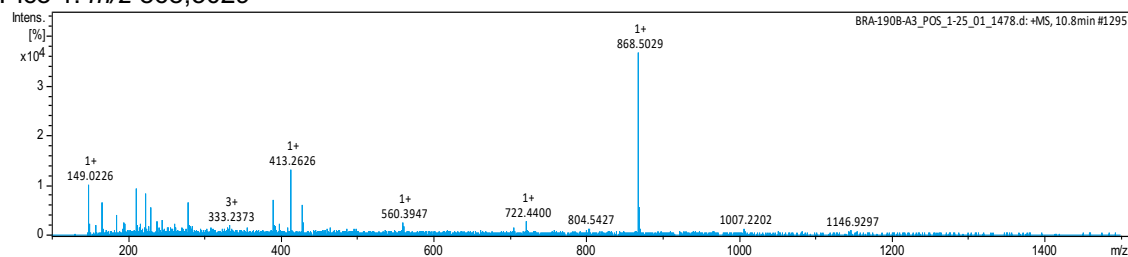
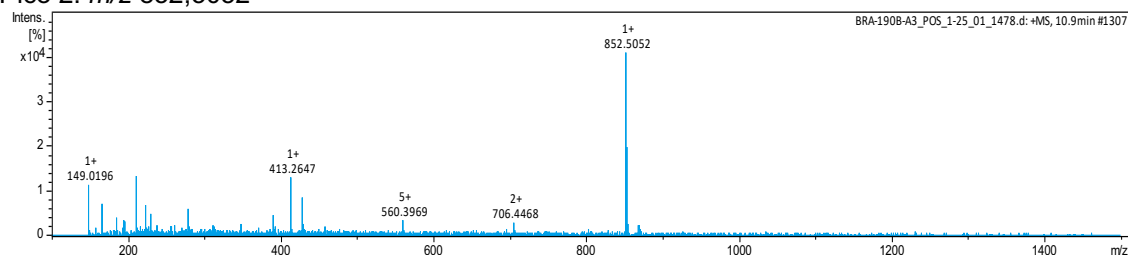
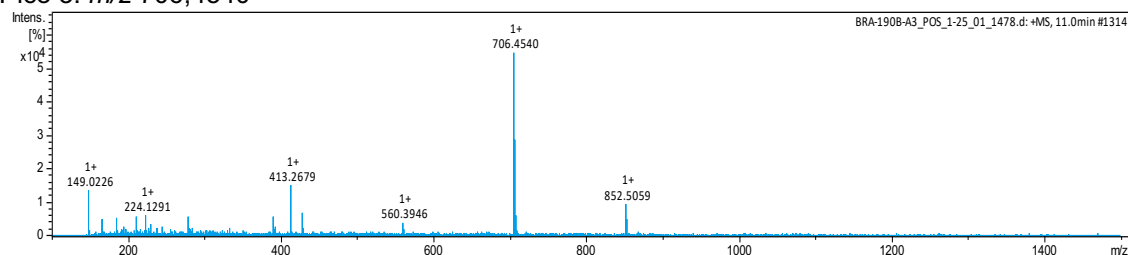
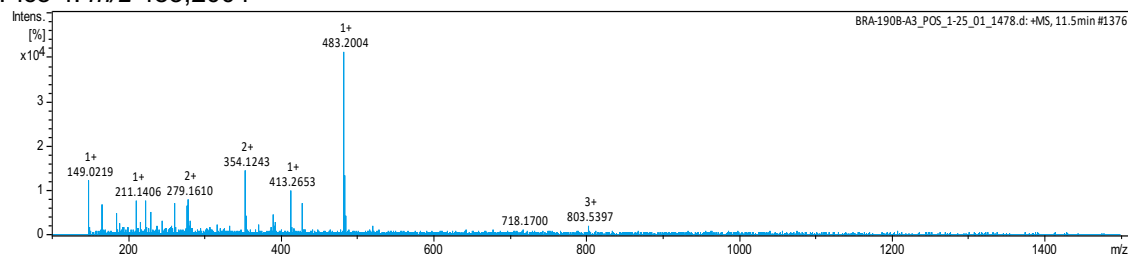
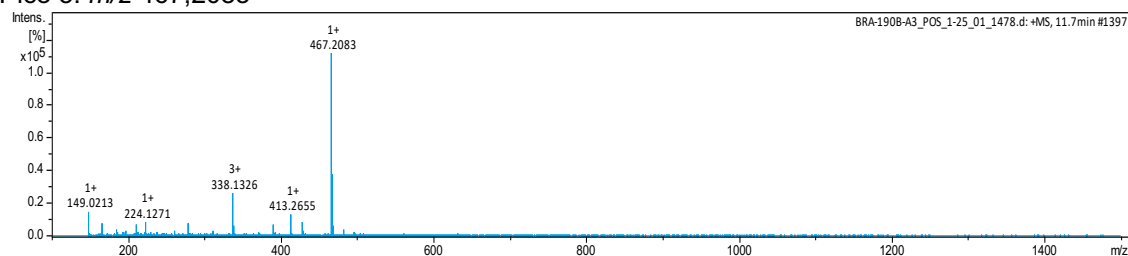
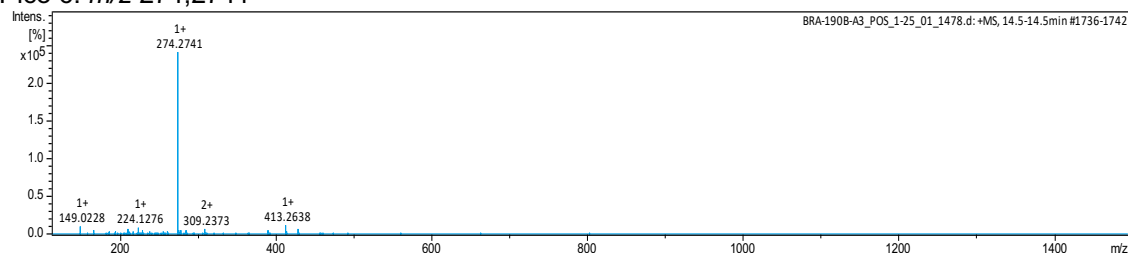
Pico 1: m/z 868,5029Pico 2: m/z 852,5052Pico 3: m/z 706,4540Pico 4: m/z 483,2004Pico 5: m/z 467,2083Pico 6: m/z 274,2741

Figura S9. Análise do ensaio de bioafinidade do extrato da cepa BRA190. A) Cromatograma do extrato bruto e amostras das proteínas-alvo (BIR3-XIAP, survivina e livina) e cromatogramas com ampliações das faixas de tempo contendo os hits detectados, indicados pelas setas. B) Espectros de massa dos hits detectados. (continua)

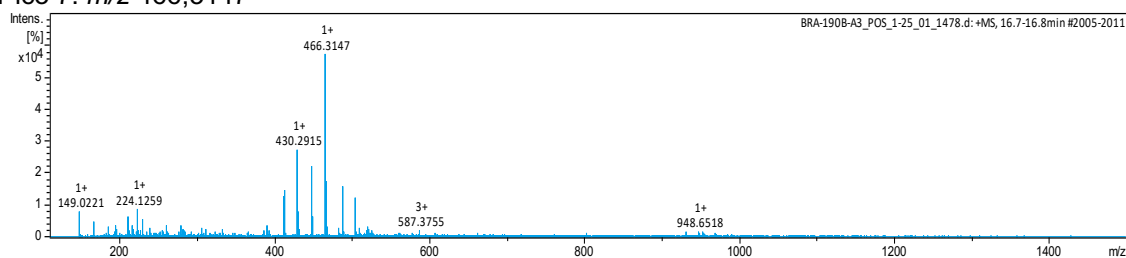
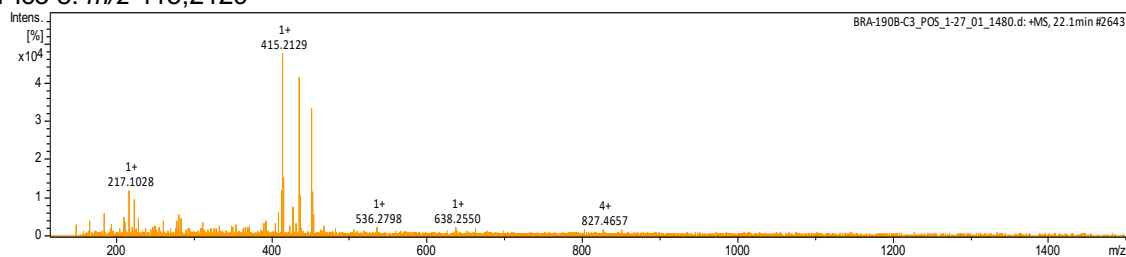
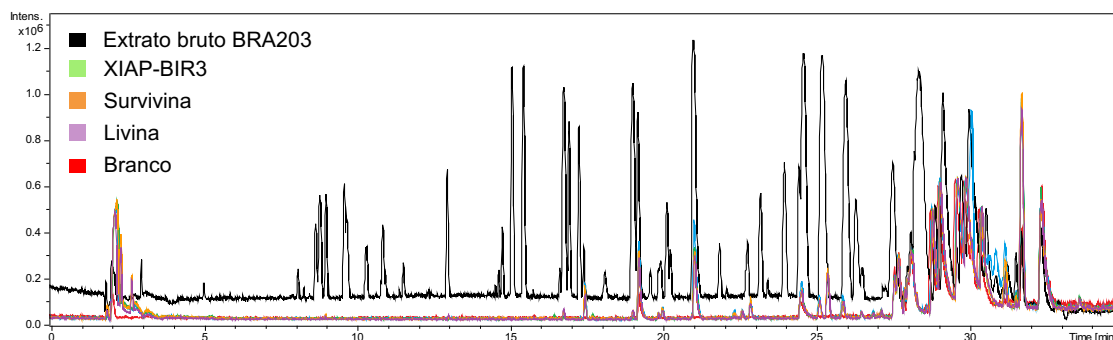
Pico 7: m/z 466,3147Pico 8: m/z 415,2129

Figura S9. Análise do ensaio de bioafinidade do extrato da cepa BRA190. A) Cromatograma do extrato bruto e amostras das proteínas-alvo (BIR3-XIAP, survivina e livina) e cromatogramas com ampliações das faixas de tempo contendo os hits detectados, indicados pelas setas. B) Espectros de massa dos hits detectados.

BRA203

A)



Sem o extrato bruto:

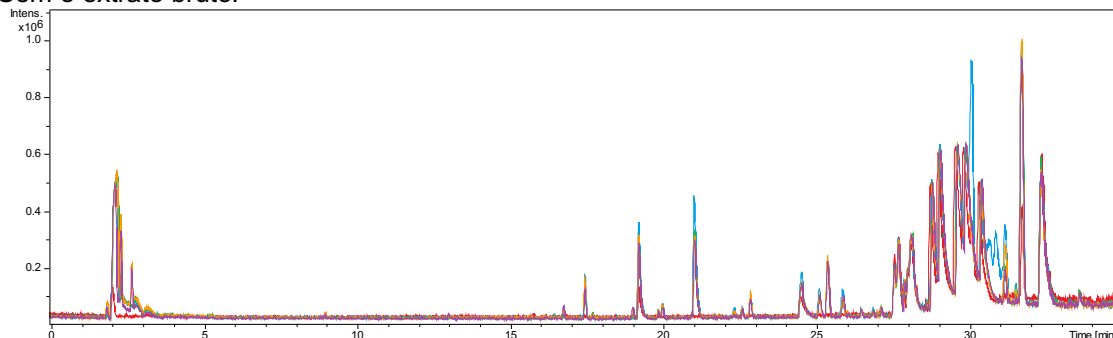
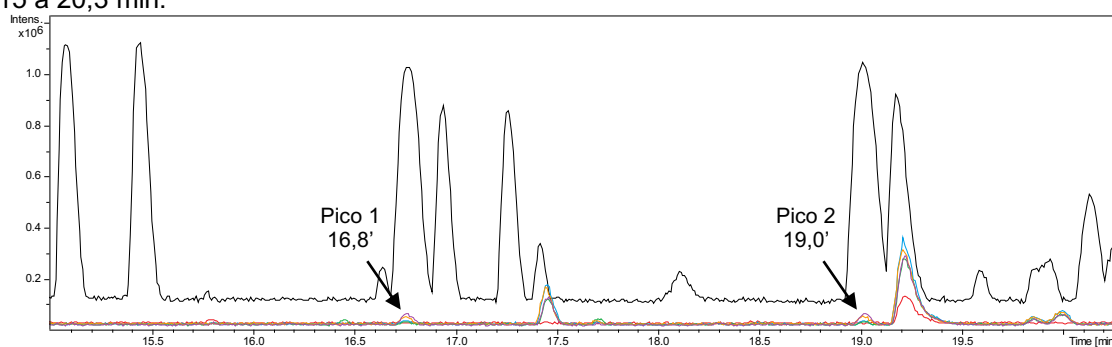
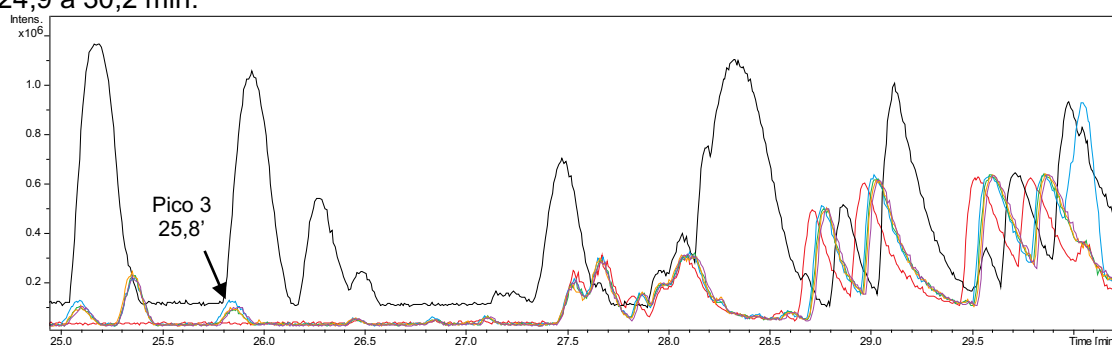


Figura S10. Análise do ensaio de bioafinidade do extrato da cepa BRA203. A) Cromatograma do extrato bruto e amostras das proteínas-alvo (BIR3-XIAP, survivina e livina) e cromatogramas com ampliações das faixas de tempo contendo os hits detectados, indicados pelas setas. B) Espectros de massa dos hits detectados. (continua)

15 a 20,3 min:



24,9 a 30,2 min:



B)

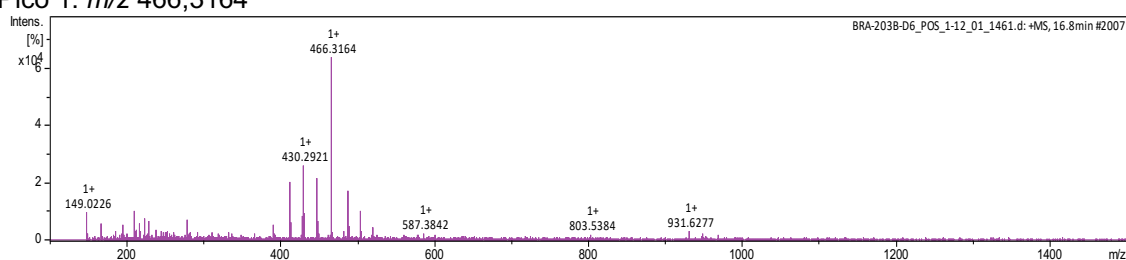
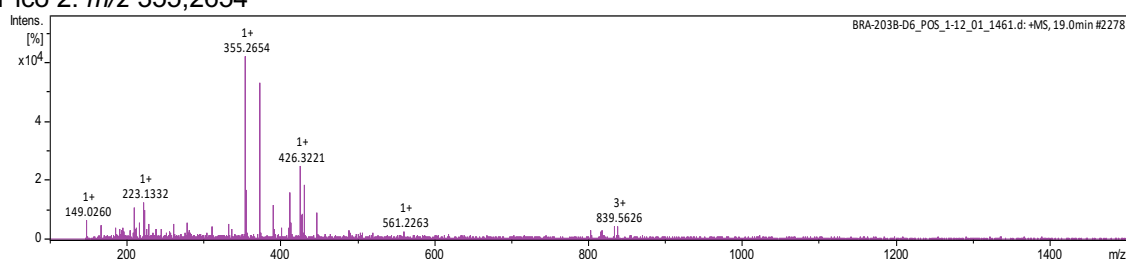
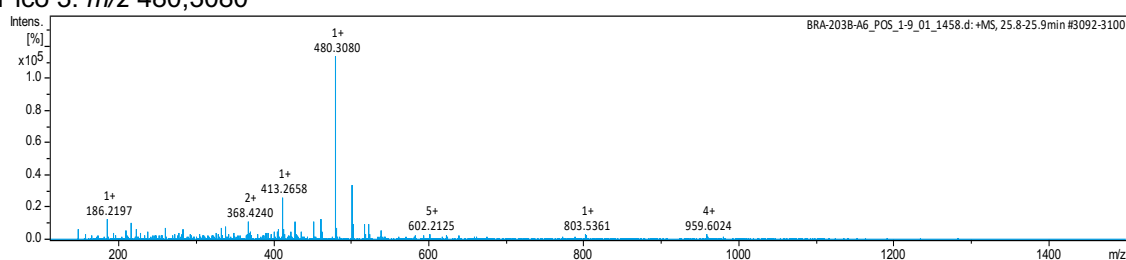
Pico 1: m/z 466,3164Pico 2: m/z 355,2654Pico 3: m/z 480,3080

Figura S10. Análise do ensaio de bioafinidade do extrato da cepa BRA203. A) Cromatograma do extrato bruto e amostras das proteínas-alvo (BIR3-XIAP, survivina e livina) e cromatogramas com ampliações das faixas de tempo contendo os hits detectados, indicados pelas setas. B) Espectros de massa dos hits detectados.

BRA214

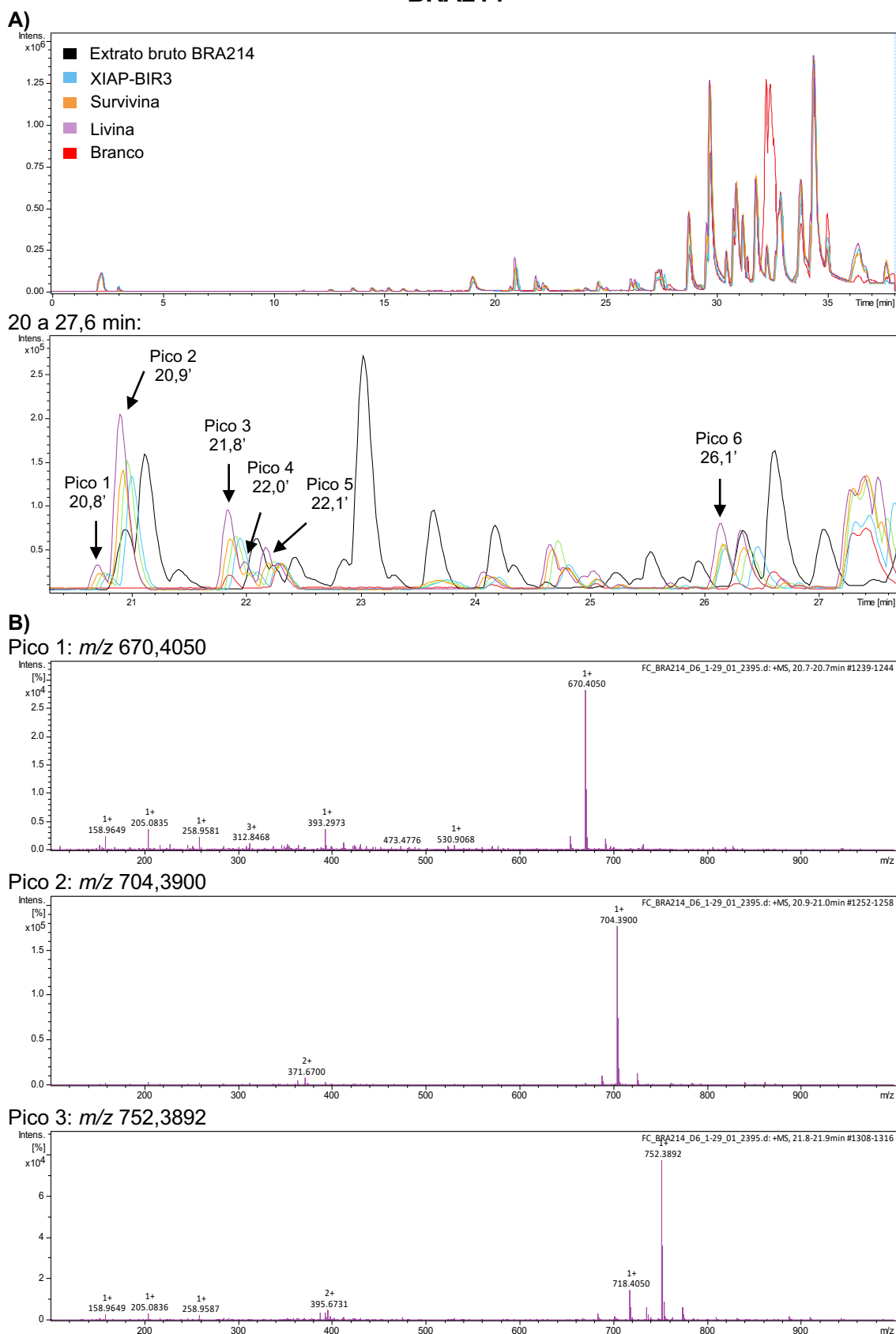


Figura S11. Análise do ensaio de bioafinidade do extrato da cepa BRA214. A) Cromatograma do extrato bruto e amostras das proteínas-alvo (BIR3-XIAP, survivina e livina) e cromatogramas com ampliações das faixas de tempo contendo os hits detectados, indicados pelas setas. B) Espectros de massa dos hits detectados. (continua)

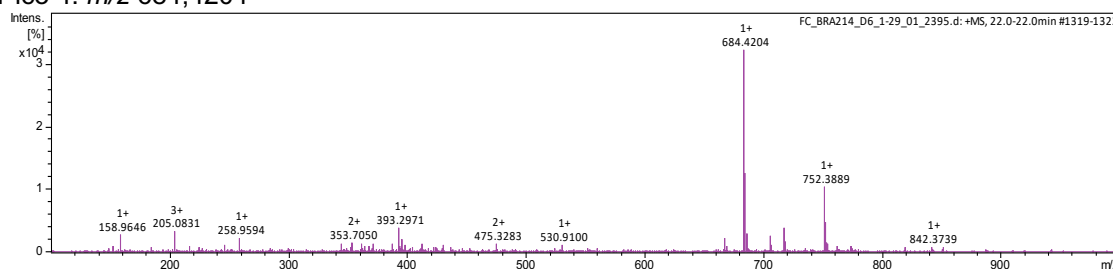
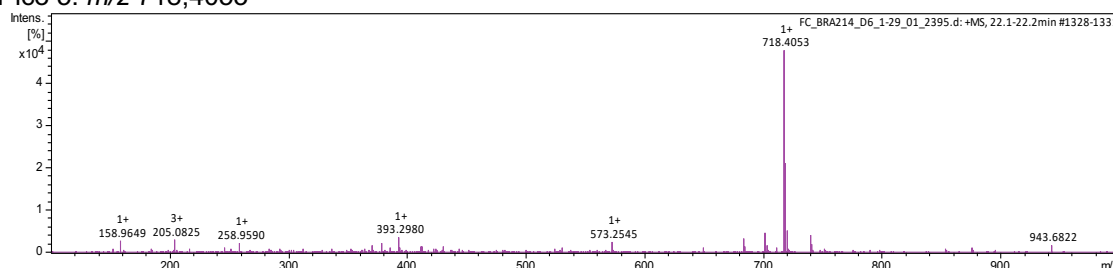
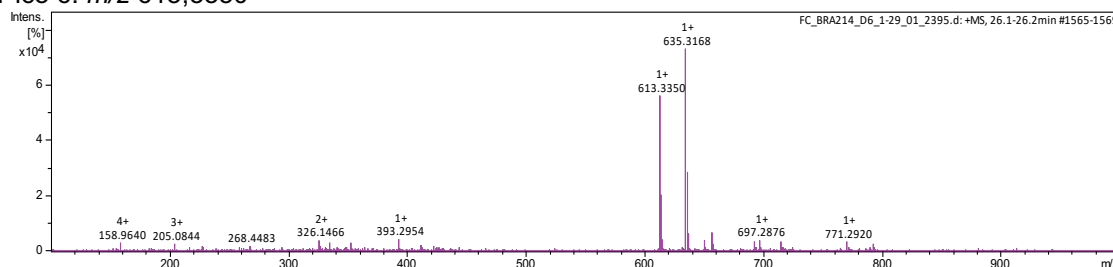
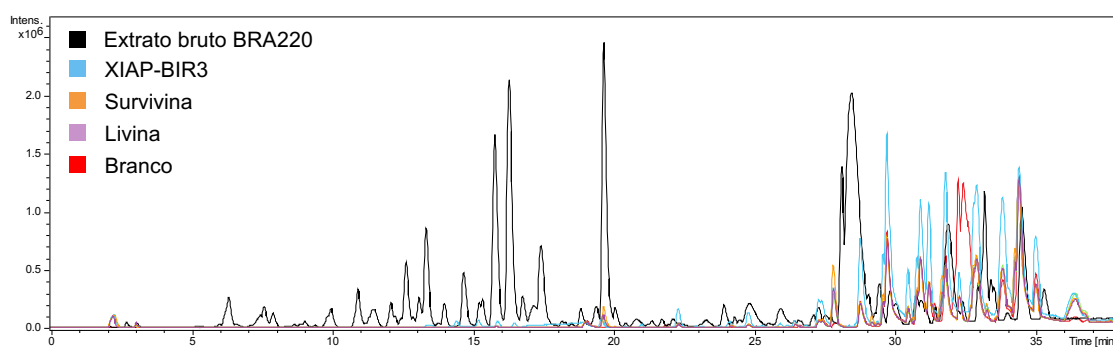
Pico 4: m/z 684,4204Pico 5: m/z 718,4053Pico 6: m/z 613,3350

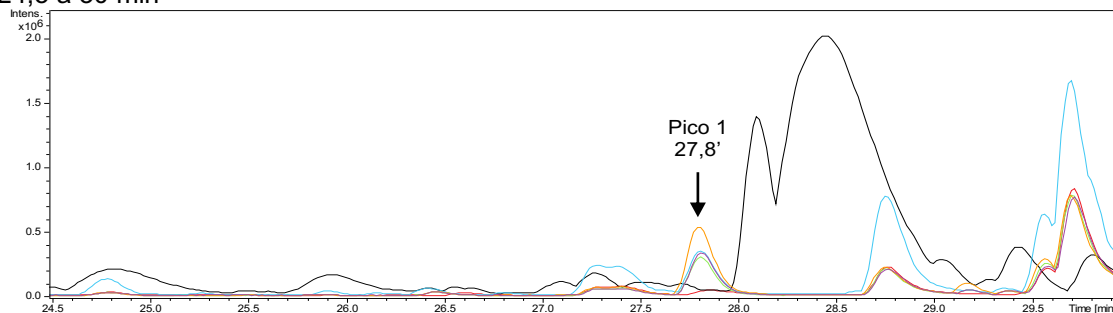
Figura S11. Análise do ensaio de bioafinidade do extrato da cepa BRA214. A) Cromatograma do extrato bruto e amostras das proteínas-alvo (BIR3-XIAP, survivina e livina) e cromatogramas com ampliações das faixas de tempo contendo os hits detectados, indicados pelas setas. B) Espectros de massa dos hits detectados.

BRA220

A)



24,5 a 30 min



B)

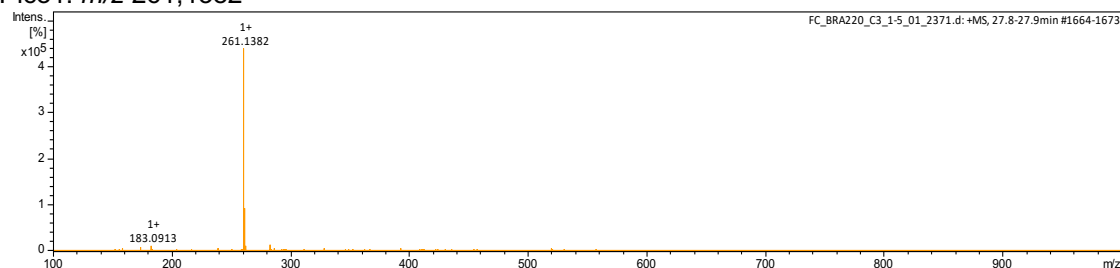
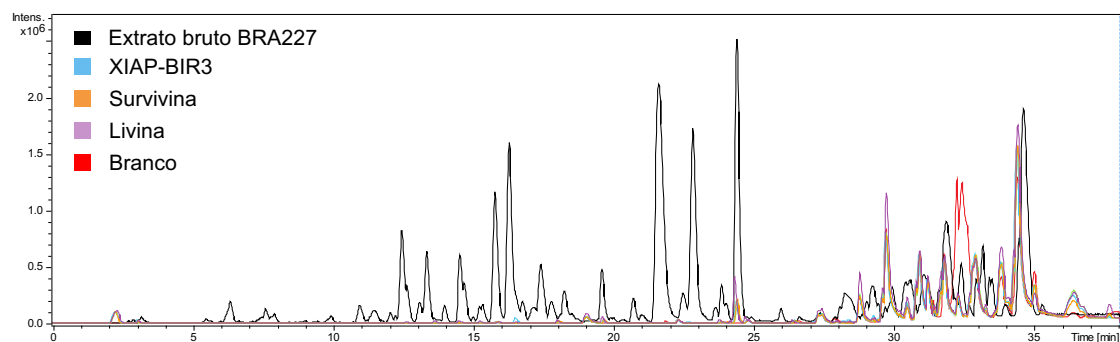
Pico1: m/z 261,1382

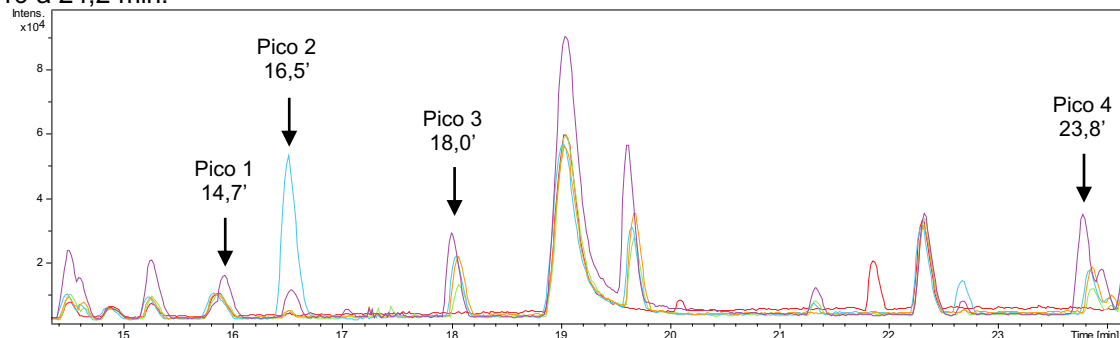
Figura S12. Análise do ensaio de bioafinidade do extrato da cepa BRA220. A) Cromatograma do extrato bruto e amostras das proteínas-alvo (BIR3-XIAP, survivina e livina) e cromatogramas com ampliações das faixas de tempo contendo os hits detectados, indicados pelas setas. B) Espectros de massa dos hits detectados.

BRA227

A)



19 a 24,2 min:



B)

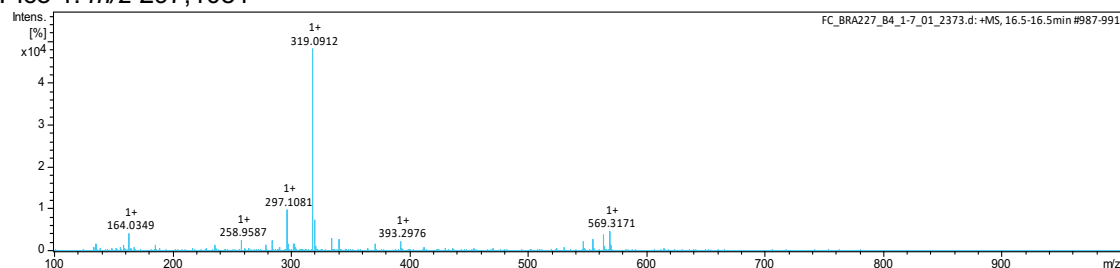
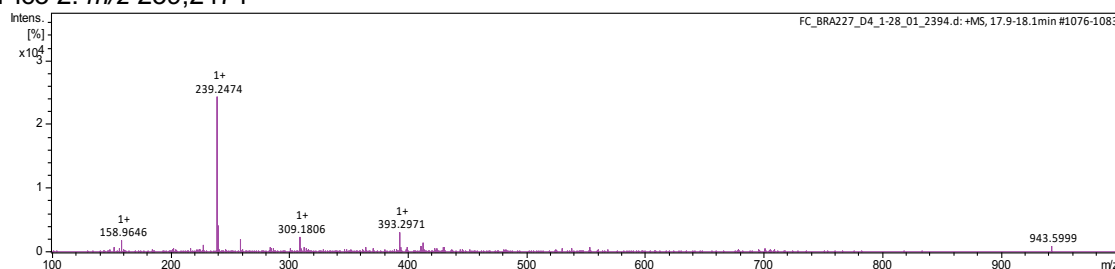
Pico 1: m/z 297,1081

Figura S13. Análise do ensaio de bioafinidade do extrato da cepa BRA227. A) Cromatograma do extrato bruto e amostras das proteínas-alvo (BIR3-XIAP, survivina e livina) e cromatogramas com ampliações das faixas de tempo contendo os hits detectados, indicados pelas setas. B) Espectros de massa dos hits detectados. (continua)

Pico 2: m/z 239,2474



Pico 3: m/z 898,6125

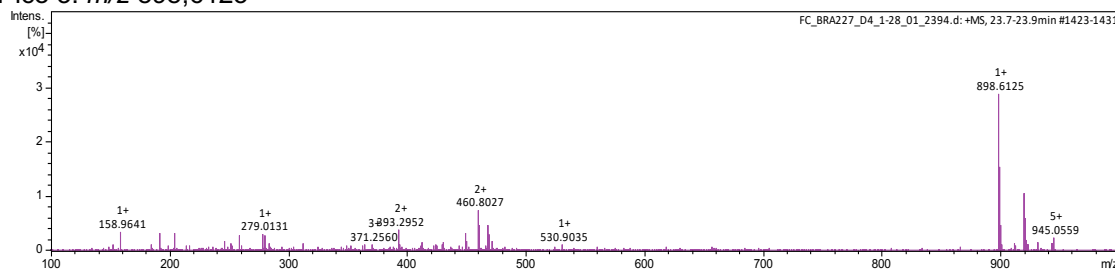
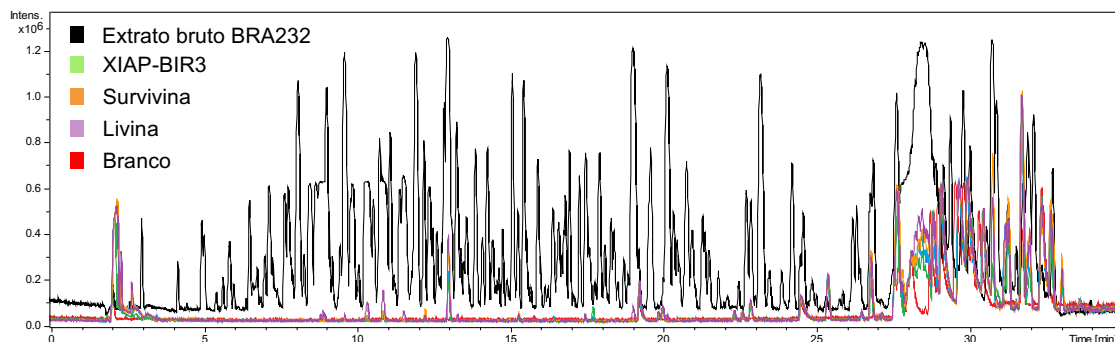


Figura S13. Análise do ensaio de bioafinidade do extrato da cepa BRA227. A) Cromatograma do extrato bruto e amostras das proteínas-alvo (BIR3-XIAP, survivina e livina) e cromatogramas com ampliações das faixas de tempo contendo os hits detectados, indicados pelas setas. B) Espectros de massa dos hits detectados.

BRA232

A)



14,9 a 20,4 min:

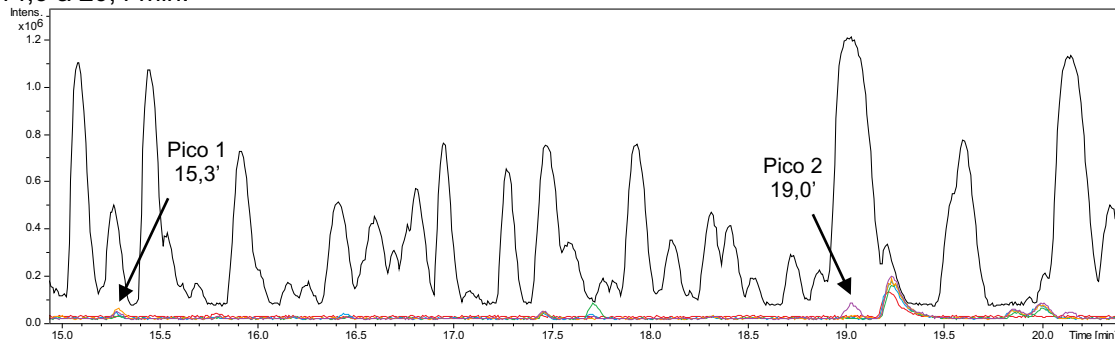


Figura S14. Análise do ensaio de bioafinidade do extrato da cepa BRA232. A) Cromatograma do extrato bruto e amostras das proteínas-alvo (BIR3-XIAP, survivina e livina) e cromatogramas com ampliações das faixas de tempo contendo os hits detectados, indicados pelas setas. B) Espectros de massa dos hits detectados. (continua)

B)

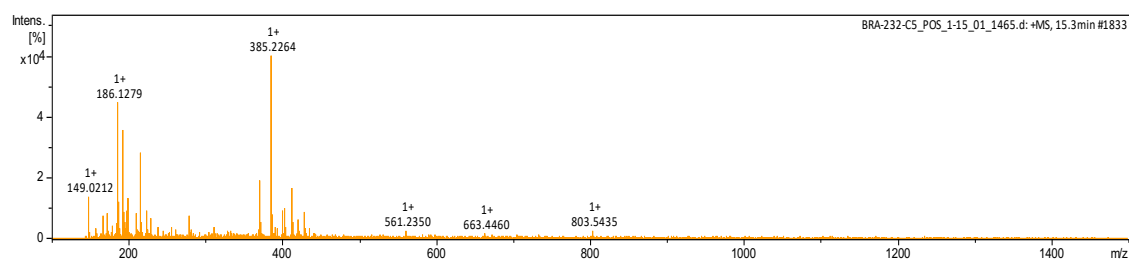
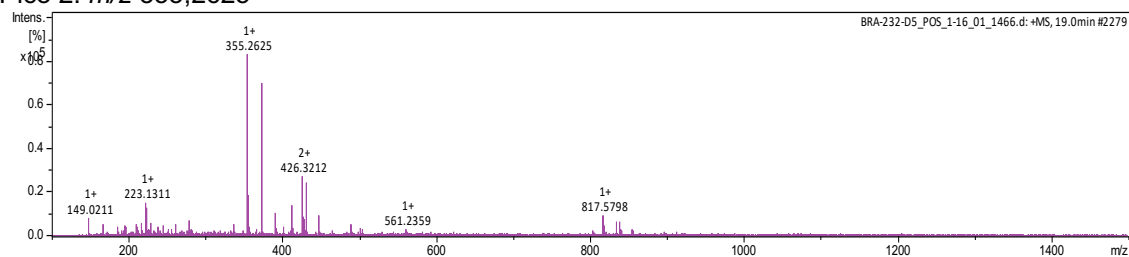
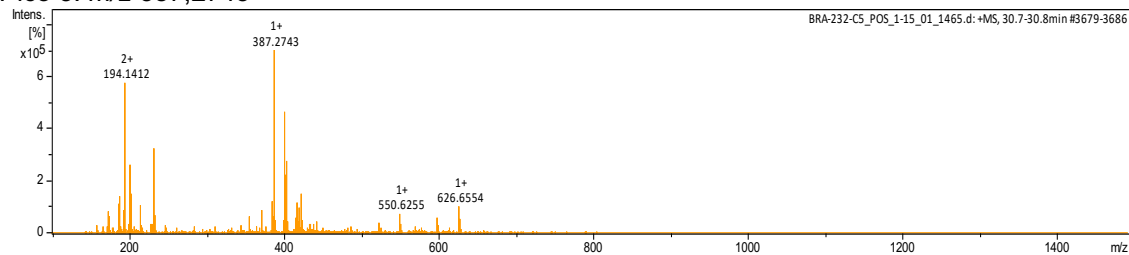
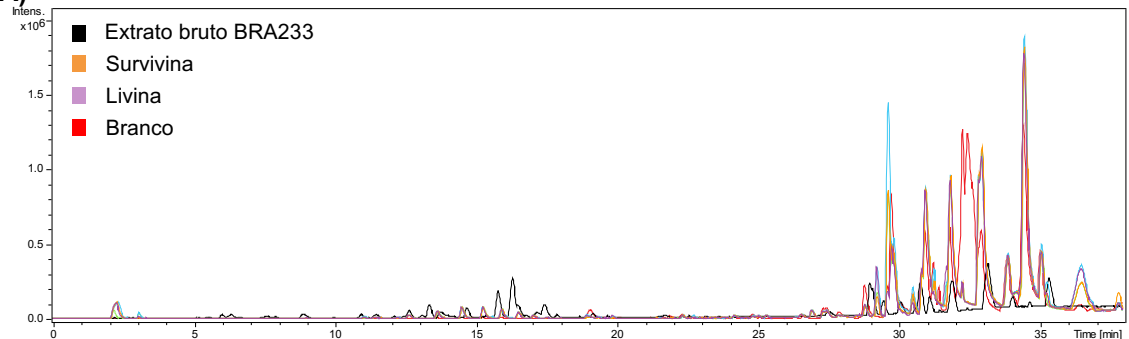
Pico 1: m/z 385,2264Pico 2: m/z 355,2625Pico 3: m/z 387,2743

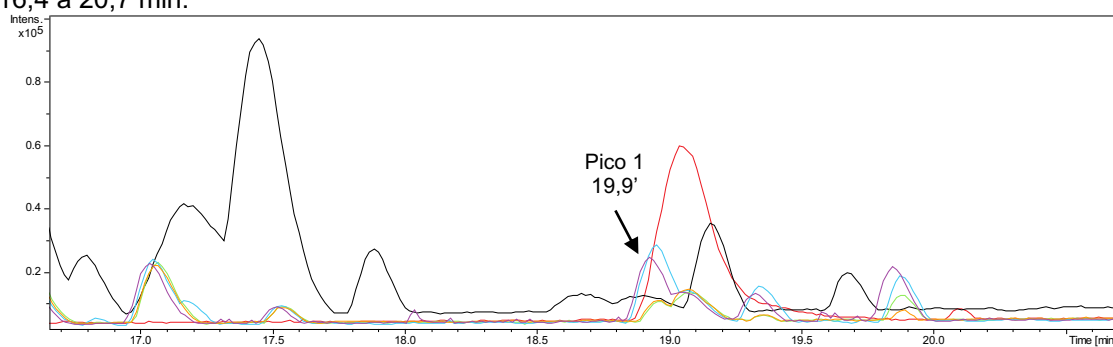
Figura S14. Análise do ensaio de bioafinidade do extrato da cepa BRA232. A) Cromatograma do extrato bruto e amostras das proteínas-alvo (BIR3-XIAP, survivina e livina) e cromatogramas com ampliações das faixas de tempo contendo os hits detectados, indicados pelas setas. B) Espectros de massa dos hits detectados.

BRA233

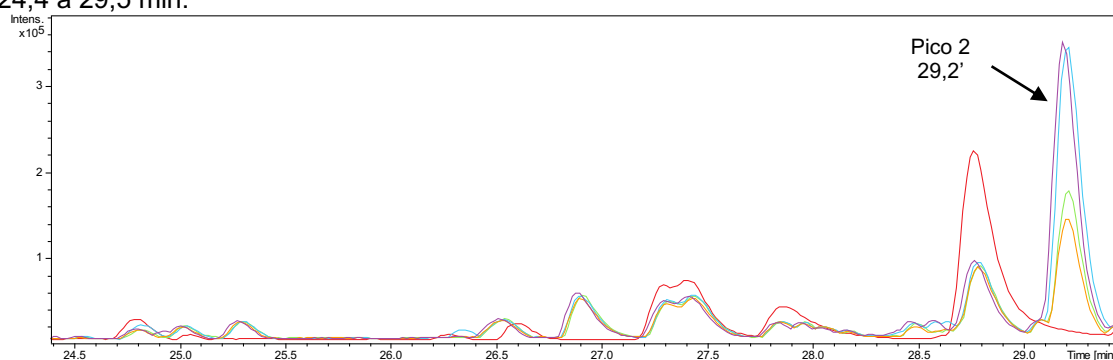
A)



16,4 a 20,7 min:



24,4 a 29,5 min:



B)

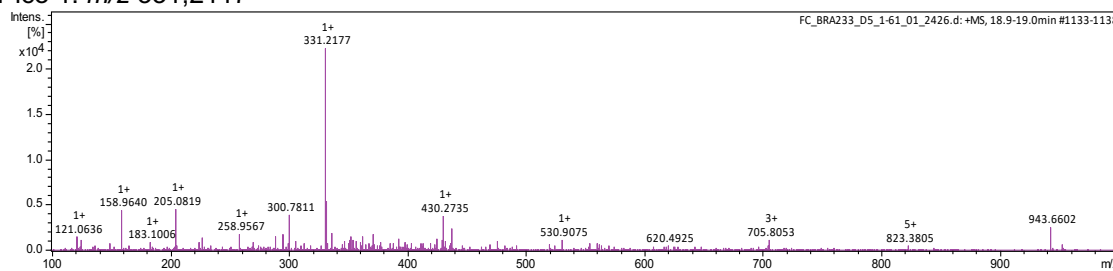
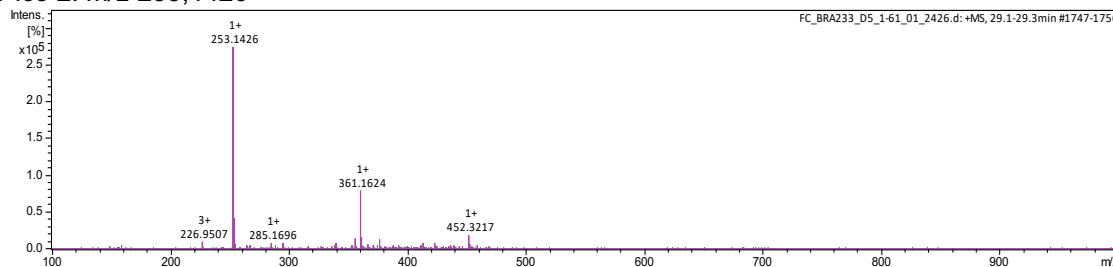
Pico 1: m/z 331,2117Pico 2: m/z 253,1426

Figura S15. Análise do ensaio de bioafinidade do extrato da cepa BRA233. A) Cromatograma do extrato bruto e amostras das proteínas-alvo (survivina e livina) e cromatogramas com ampliações das faixas de tempo contendo os hits detectados, indicados pelas setas. B) Espectros de massa dos hits detectados.

BRA234

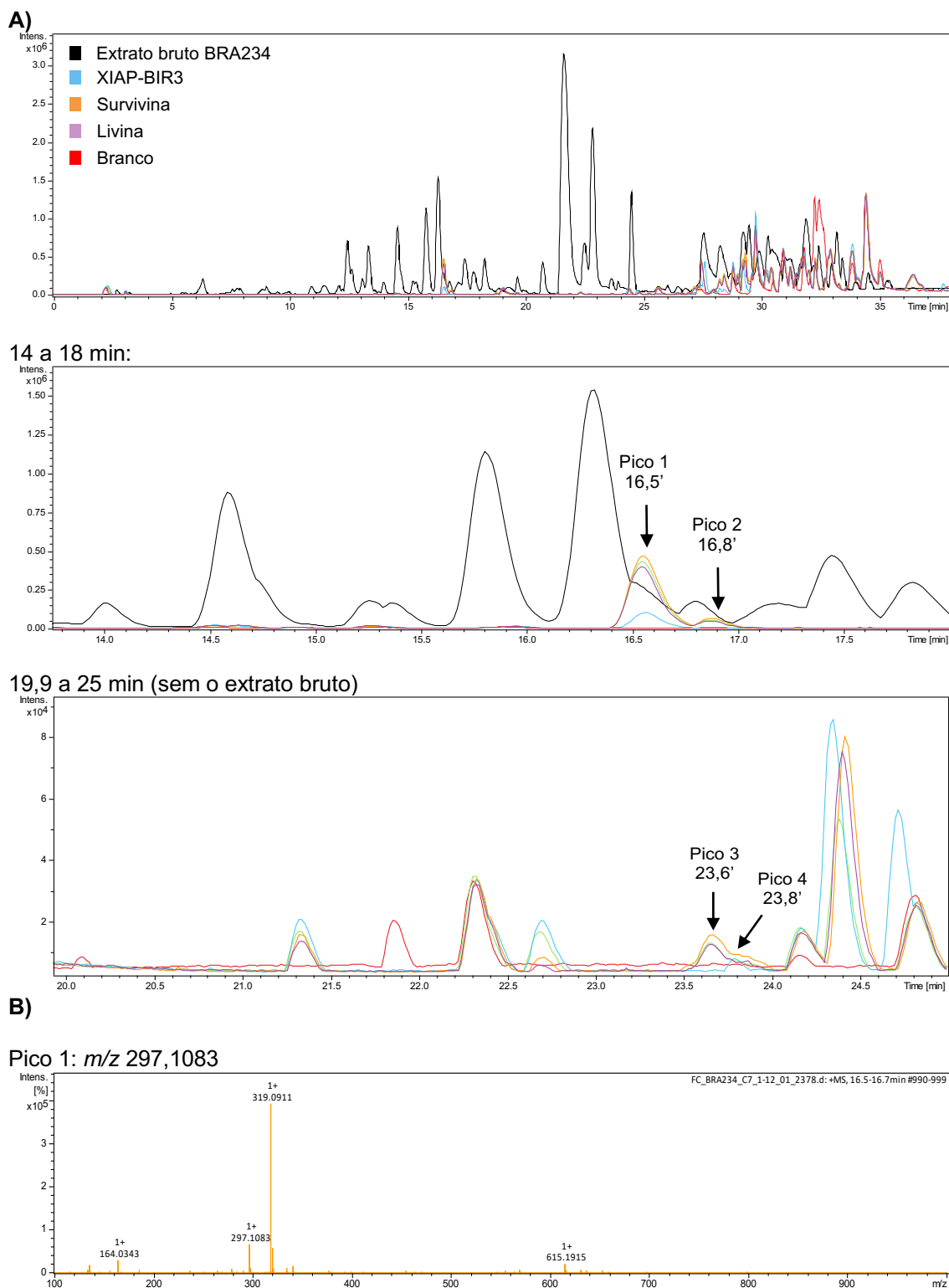


Figura S16. Análise do ensaio de bioafinidade do extrato da cepa BRA234. A) Cromatograma do extrato bruto e amostras das proteínas-alvo (BIR3-XIAP, survivina e livina) e cromatogramas com ampliações das faixas de tempo contendo os hits detectados, indicados pelas setas. B) Espectros de massa dos hits detectados. (continua)

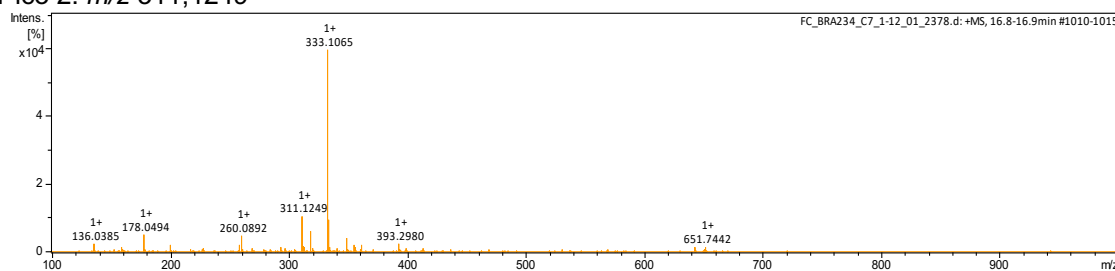
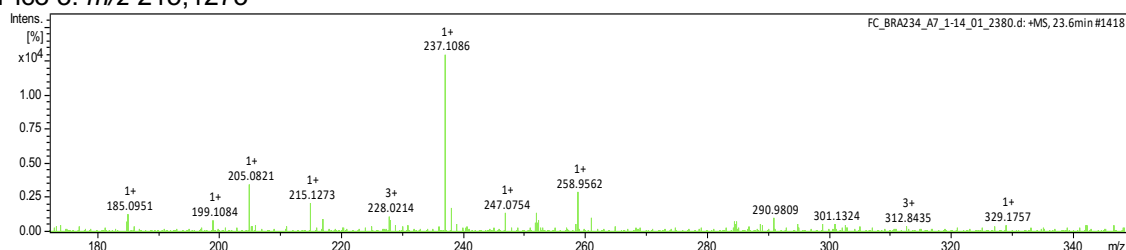
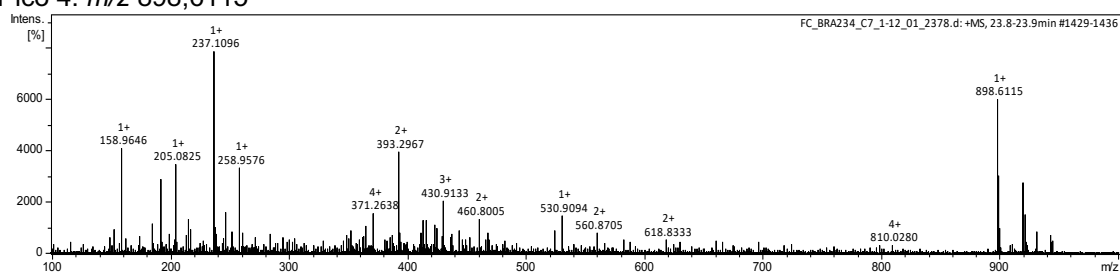
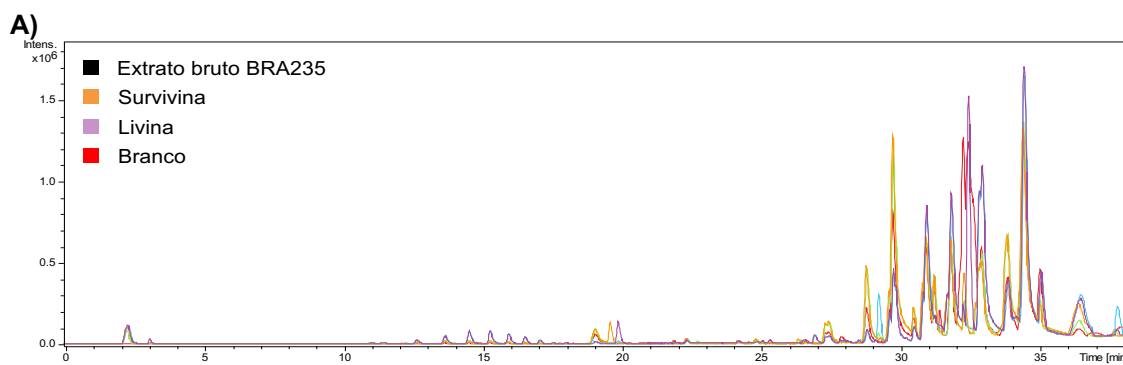
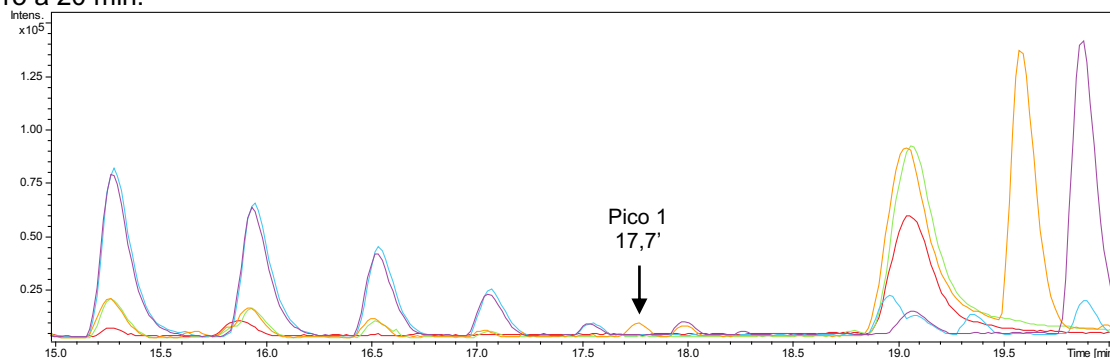
Pico 2: m/z 311,1249Pico 3: m/z 215,1273Pico 4: m/z 898,6115

Figura S16. Análise do ensaio de bioafinidade do extrato da cepa BRA234. A) Cromatograma do extrato bruto e amostras das proteínas-alvo (BIR3-XIAP, survivina e livina) e cromatogramas com ampliações das faixas de tempo contendo os hits detectados, indicados pelas setas. B) Espectros de massa dos hits detectados.

BRA235



15 a 20 min:



B)

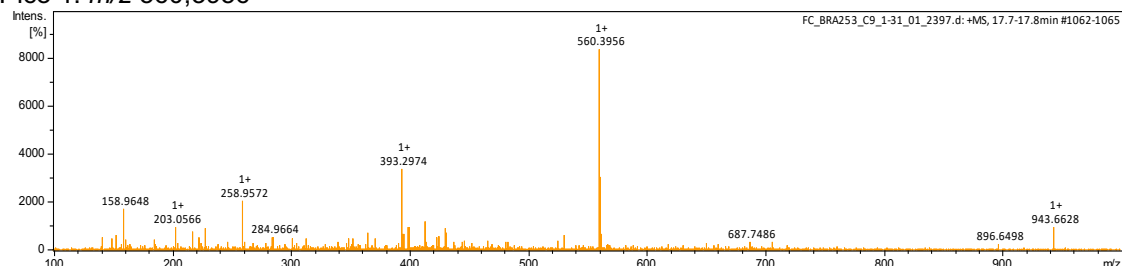
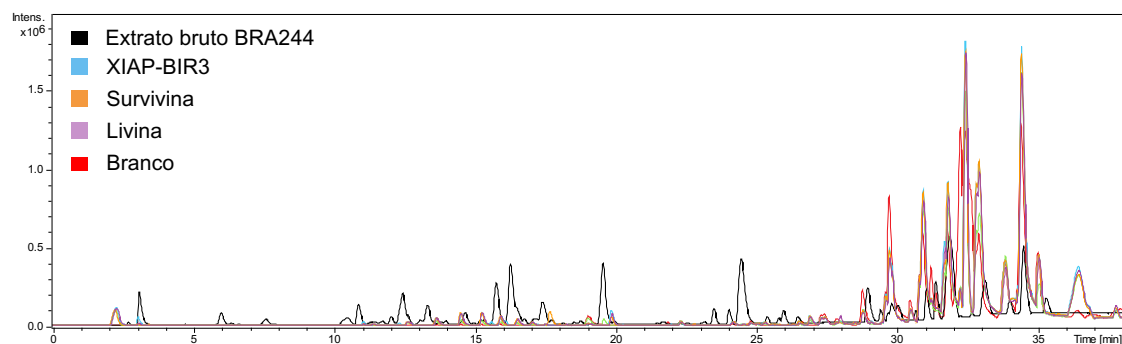
Pico 1: m/z 560,3956

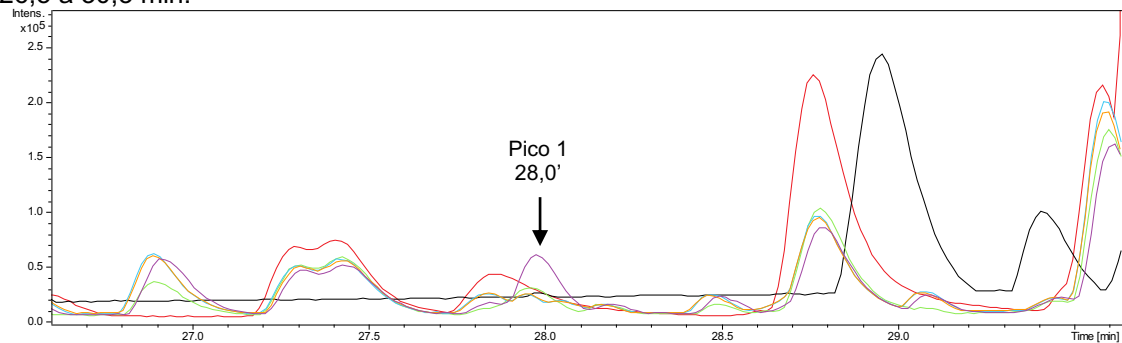
Figura S17. Análise do ensaio de bioafinidade do extrato da cepa BRA235. A) Cromatograma do extrato bruto e amostras das proteínas-alvo (survivina e livina) e cromatogramas com ampliações das faixas de tempo contendo os hits detectados, indicados pelas setas. B) Espectros de massa dos hits detectados.

BRA244

A)



26,5 a 30,3 min:



B)

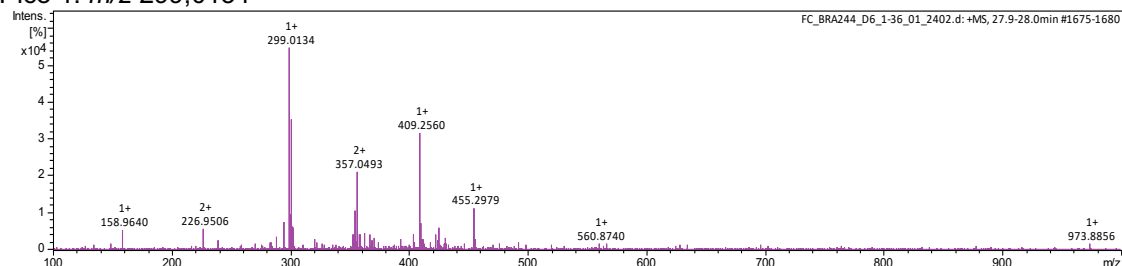
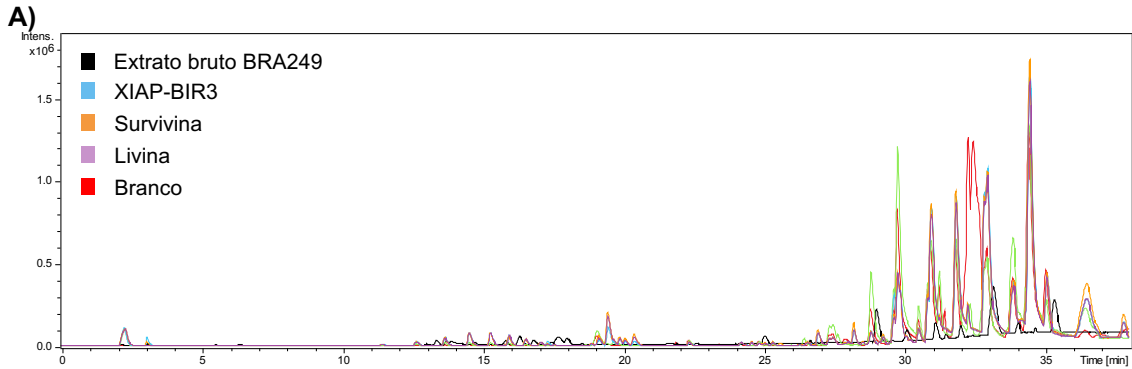
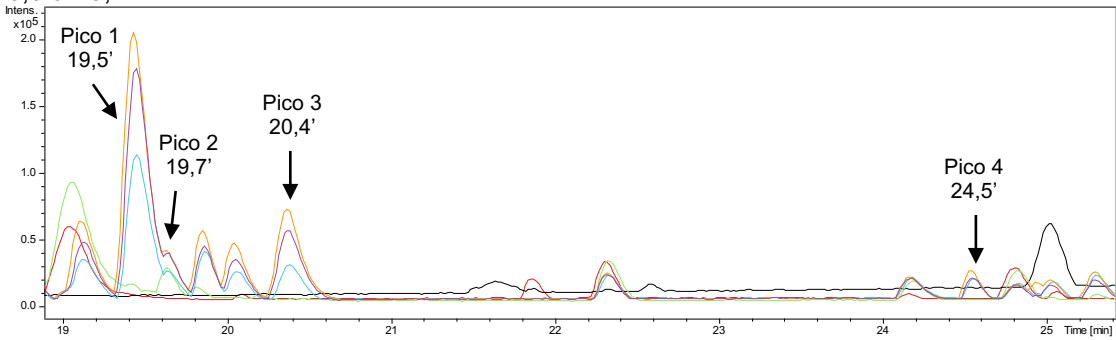
Pico 1: m/z 299,0134

Figura S18. Análise do ensaio de bioafinidade do extrato da cepa BRA244. A) Cromatograma do extrato bruto e amostras das proteínas-alvo (BIR3-XIAP, survivina e livina) e cromatogramas com ampliações das faixas de tempo contendo os hits detectados, indicados pelas setas. B) Espectros de massa dos hits detectados.

BRA249

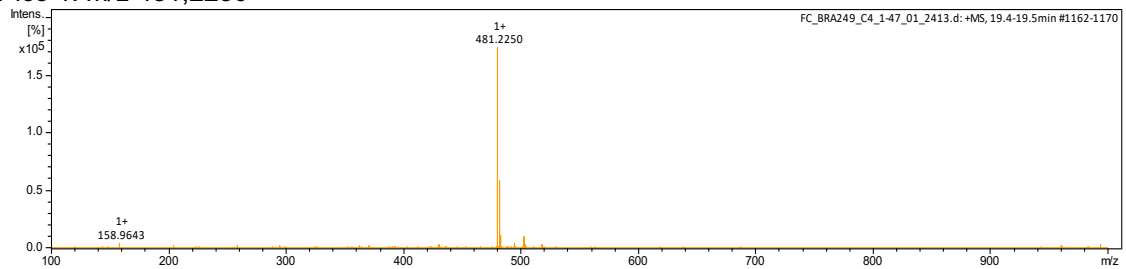


18,9 a 25,4 min:

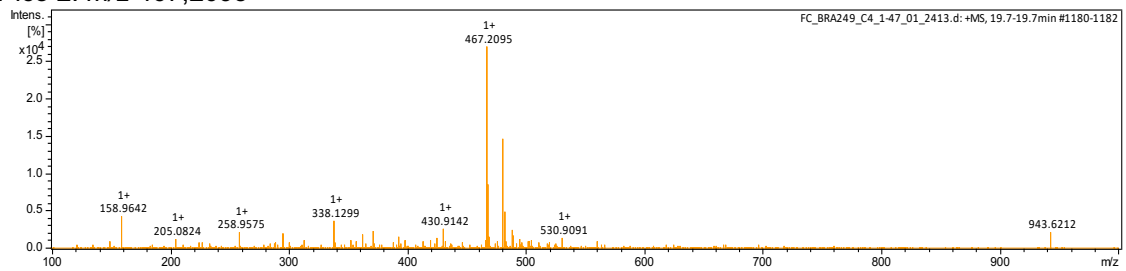


B)

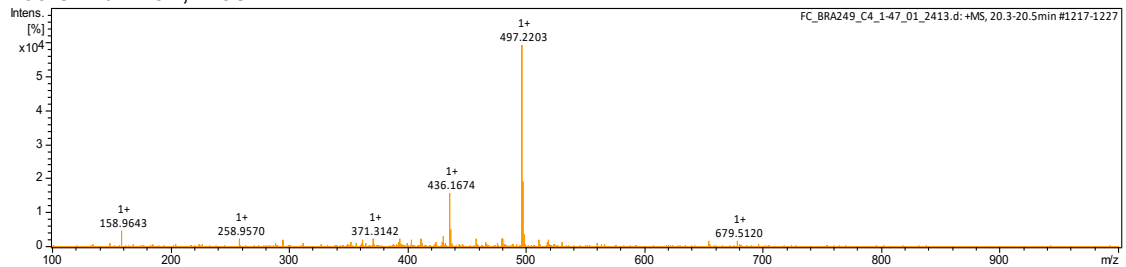
Pico 1: *m/z* 481,2250



Pico 2: *m/z* 467,2095



Pico 3: *m/z* 497,2203



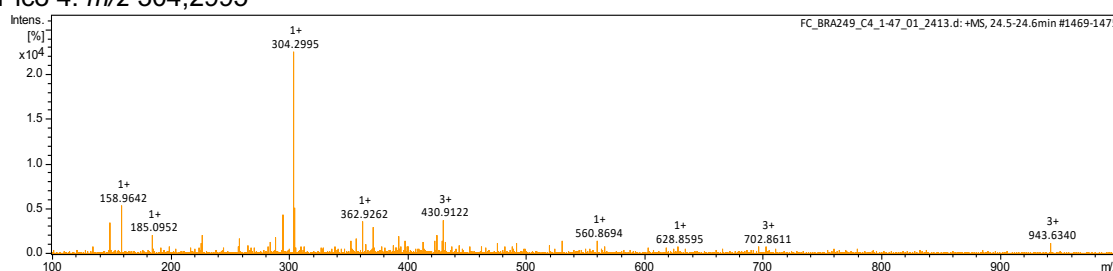
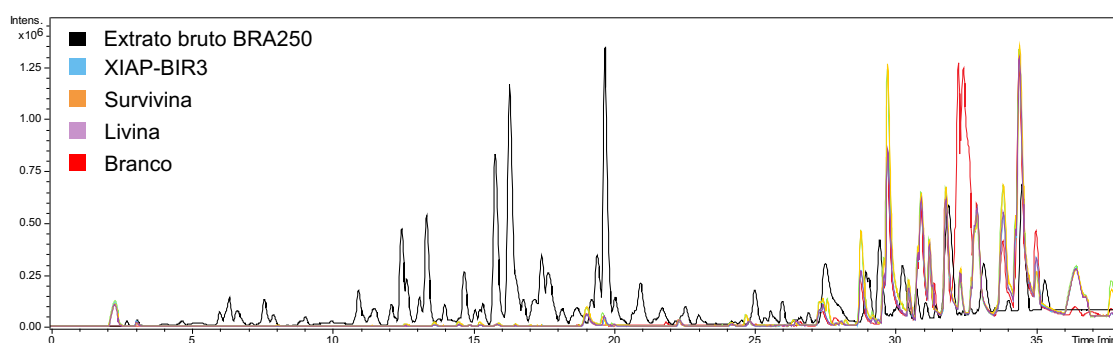
Pico 4: m/z 304,2995

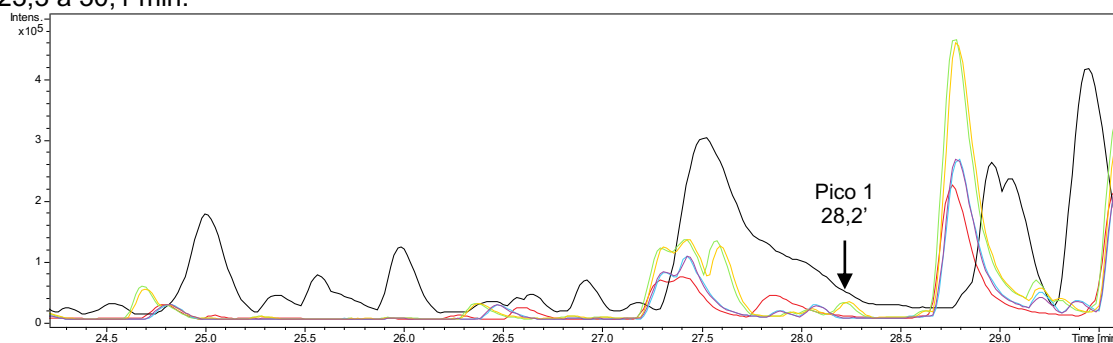
Figura S19. Análise do ensaio de bioafinidade do extrato da cepa BRA249. A) Cromatograma do extrato bruto e amostras das proteínas-alvo (BIR3-XIAP, survivina e livina) e cromatogramas com ampliações das faixas de tempo contendo os hits detectados, indicados pelas setas. B) Espectros de massa dos hits detectados.

BRA250

A)



23,3 a 30,1 min:



B)

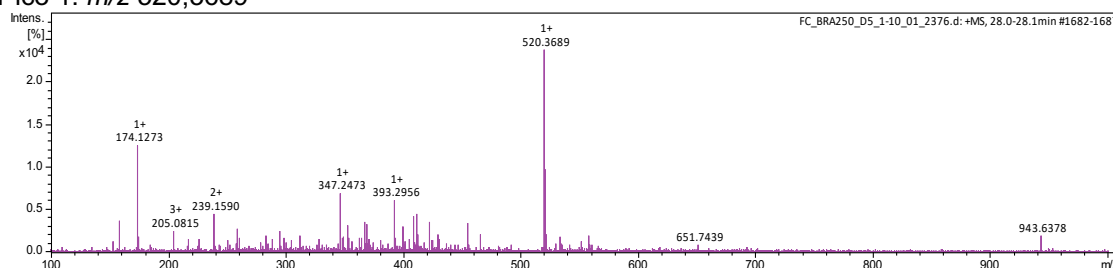
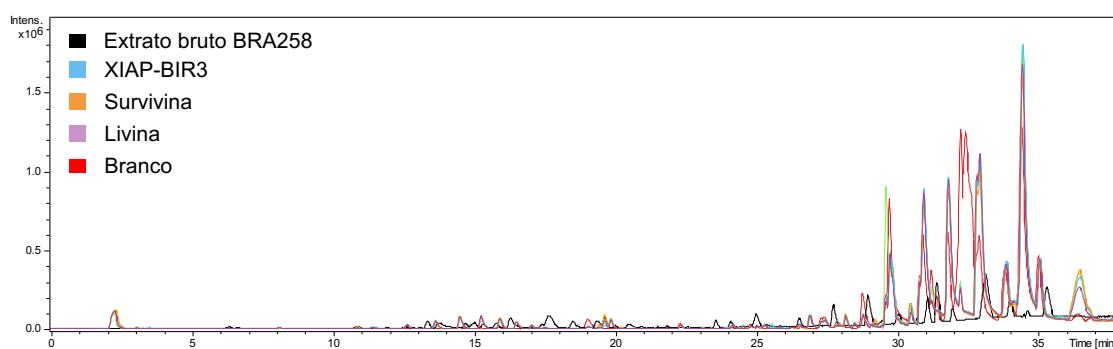
Pico 1: m/z 520,3689

Figura S20. Análise do ensaio de bioafinidade do extrato da cepa BRA250. A) Cromatograma do extrato bruto e amostras das proteínas-alvo (BIR3-XIAP, survivina e livina) e cromatogramas com ampliações das faixas de tempo contendo os hits detectados, indicados pelas setas. B) Espectros de massa dos hits detectados.

BRA258**A)**

17 a 20,7 min:

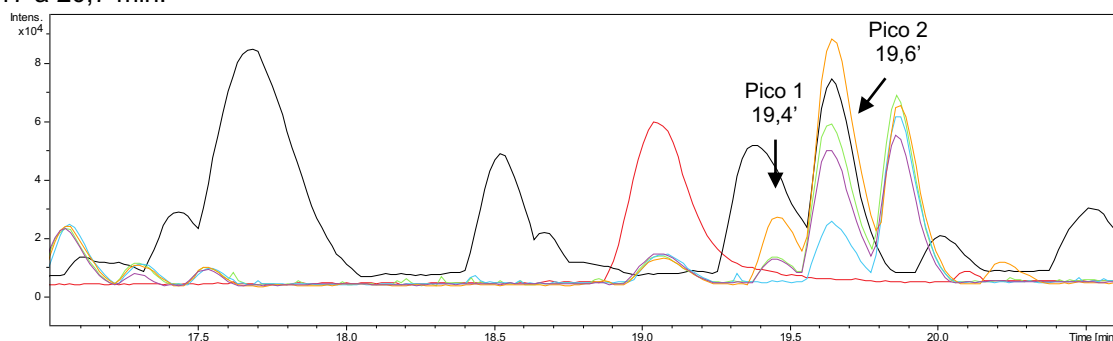
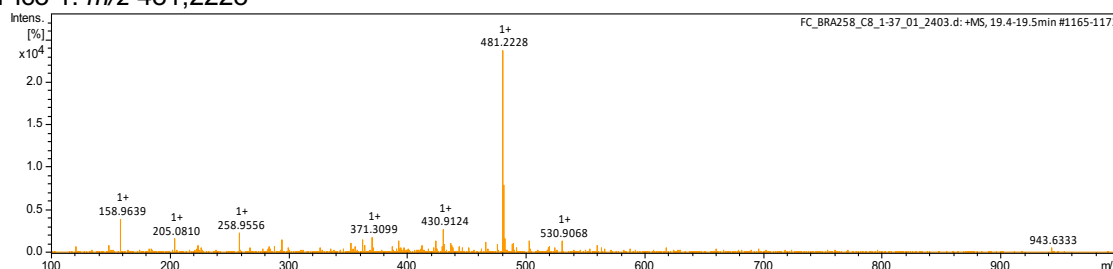
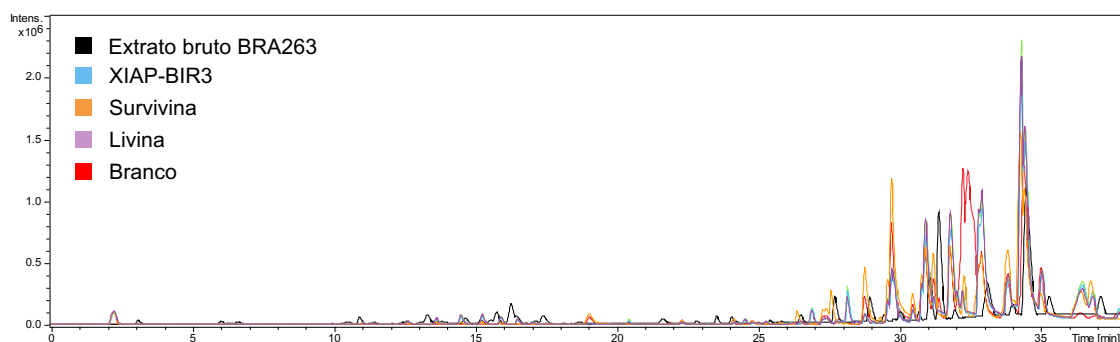
**B)**Pico 1: m/z 481,2228

Figura S21. Análise do ensaio de bioafinidade do extrato da cepa BRA258. A) Cromatograma do extrato bruto e amostras das proteínas-alvo (BIR3-XIAP, survivina e livina) e cromatogramas com ampliações das faixas de tempo contendo os hits detectados, indicados pelas setas. B) Espectros de massa dos hits detectados.

BRA263**A)**

19,7 a 29,2 min:

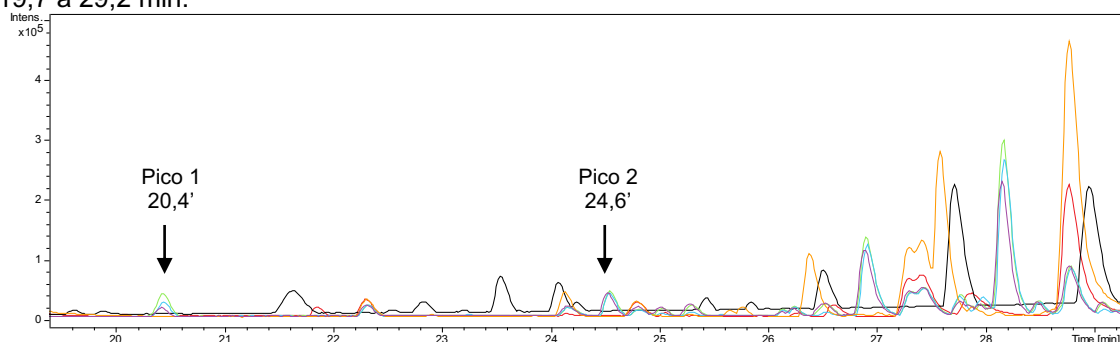
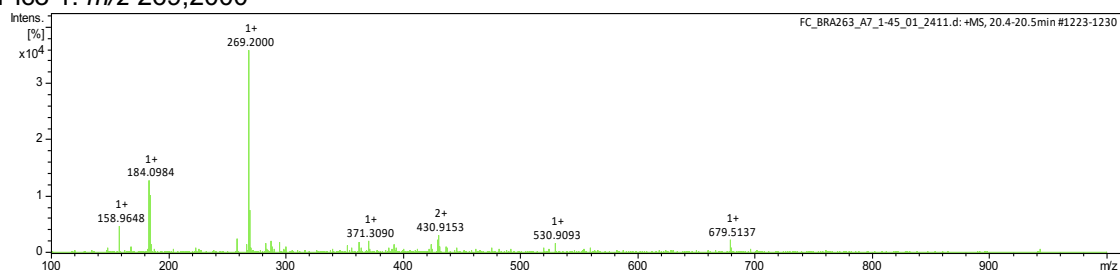
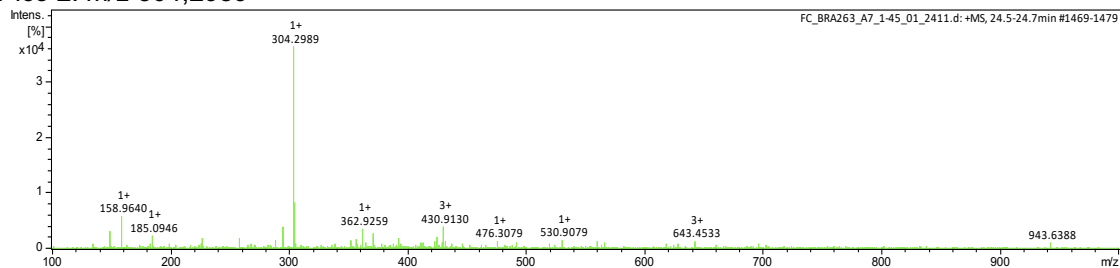
**B)**Pico 1: m/z 269,2000Pico 2: m/z 304,2989

Figura S22. Análise do ensaio de bioafinidade do extrato da cepa BRA263. A) Cromatograma do extrato bruto e amostras das proteínas-alvo (BIR3-XIAP, survivina e livina) e cromatogramas com ampliações das faixas de tempo contendo os hits detectados, indicados pelas setas. B) Espectros de massa dos hits detectados.

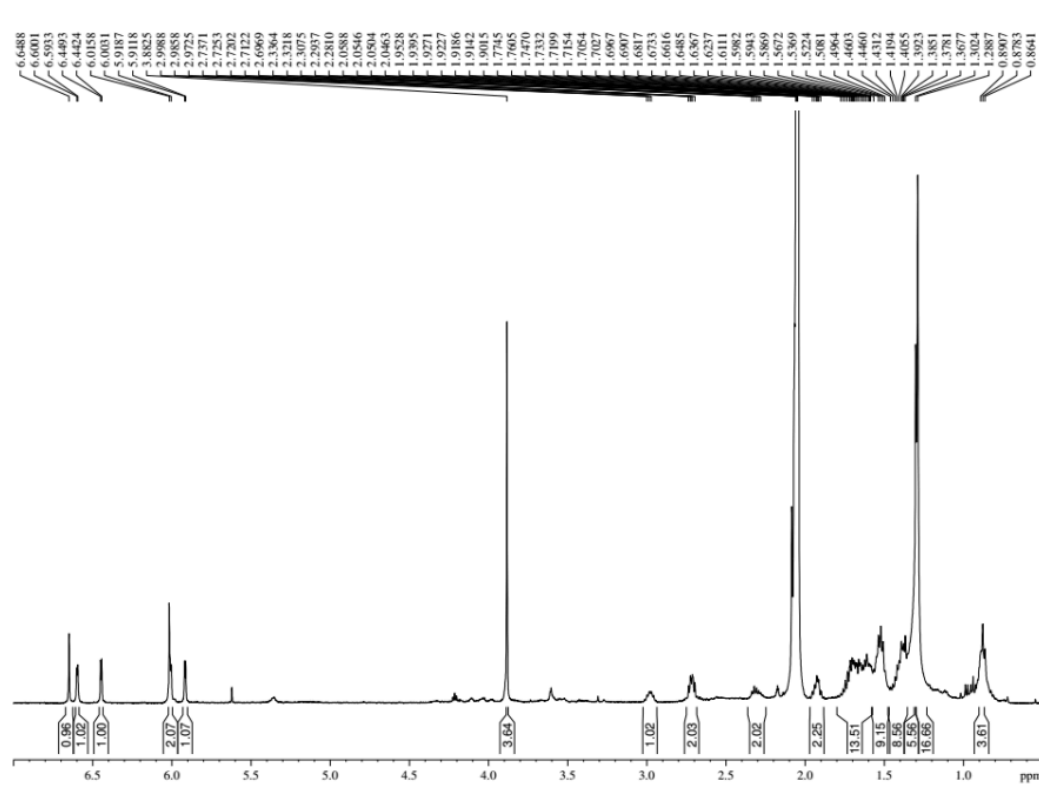
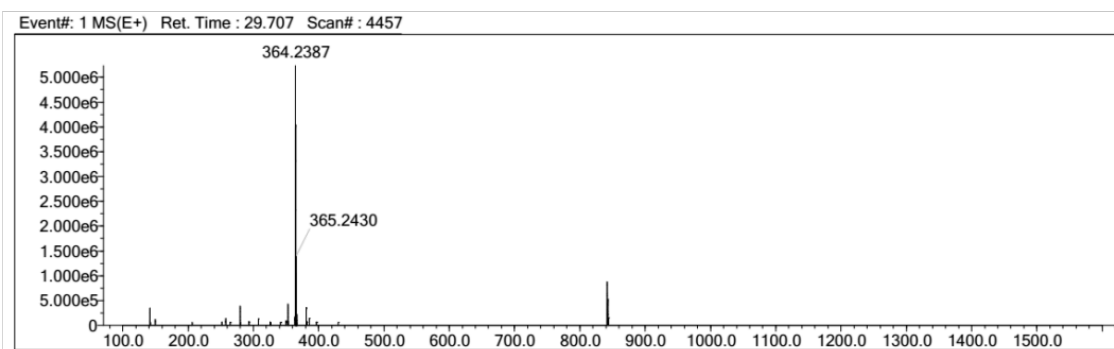
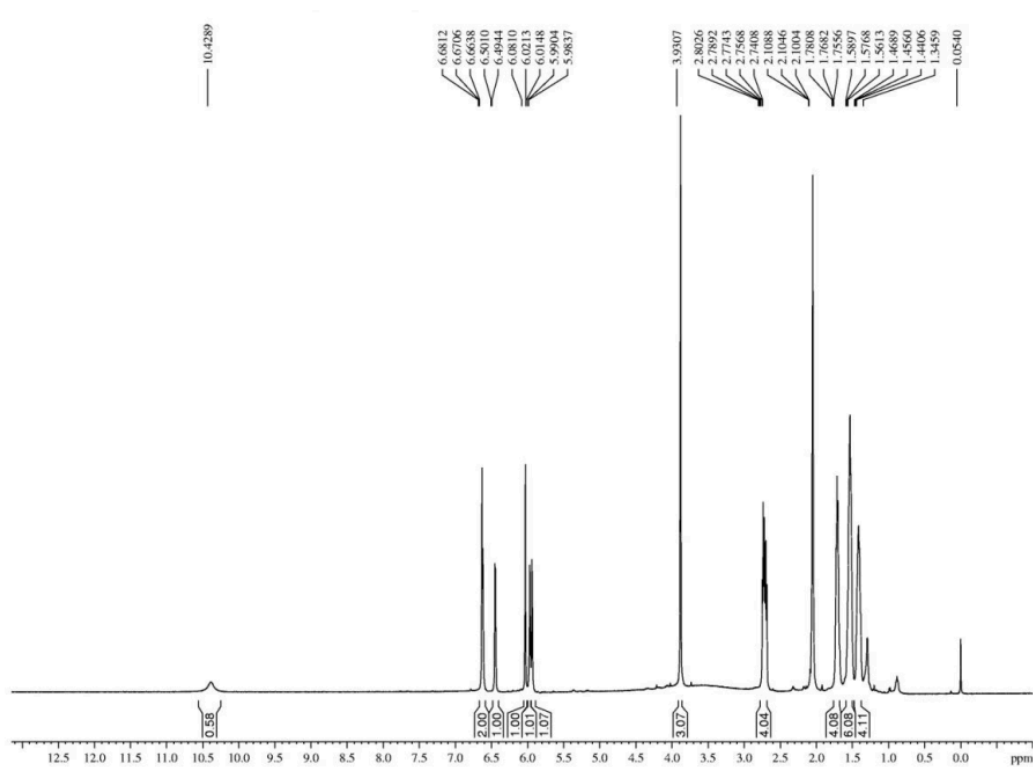
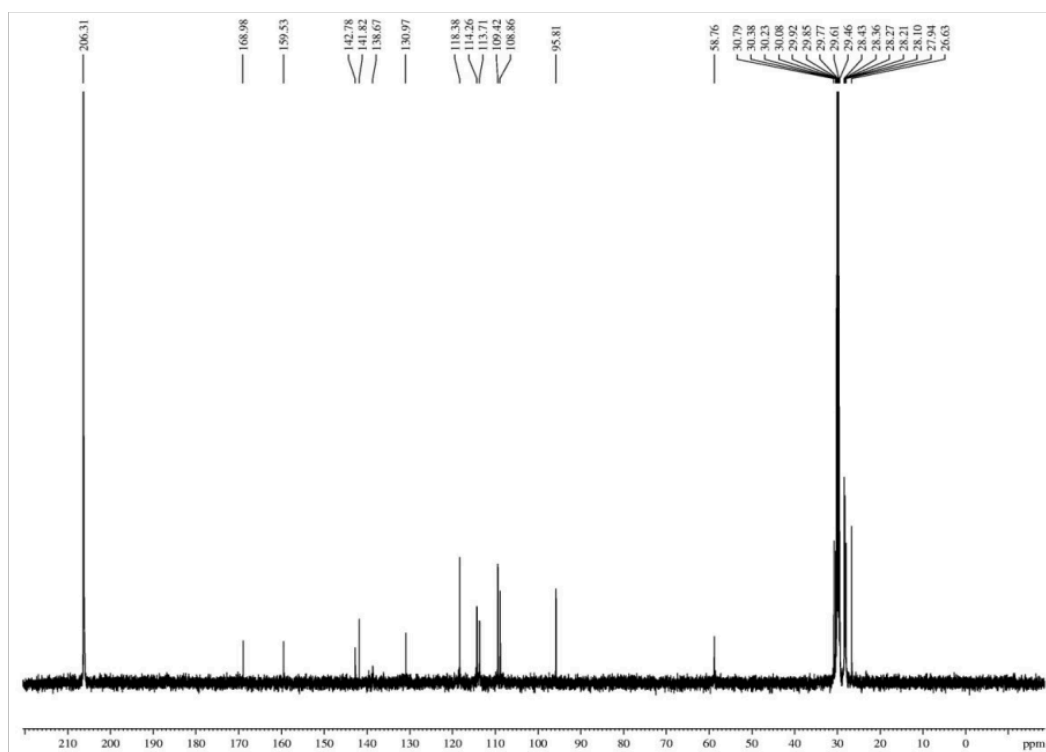
Elucidación estructural dos compostos (*hits*) isoladosFigura S23. Espectro de RMN H¹ (500 MHz, (CD₃)₂CO) do composto 1.

Figura S24. Espectro de HRESIMS do composto 1.

Figura S25. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) do composto **2**.Figura S26. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) do composto **2**.

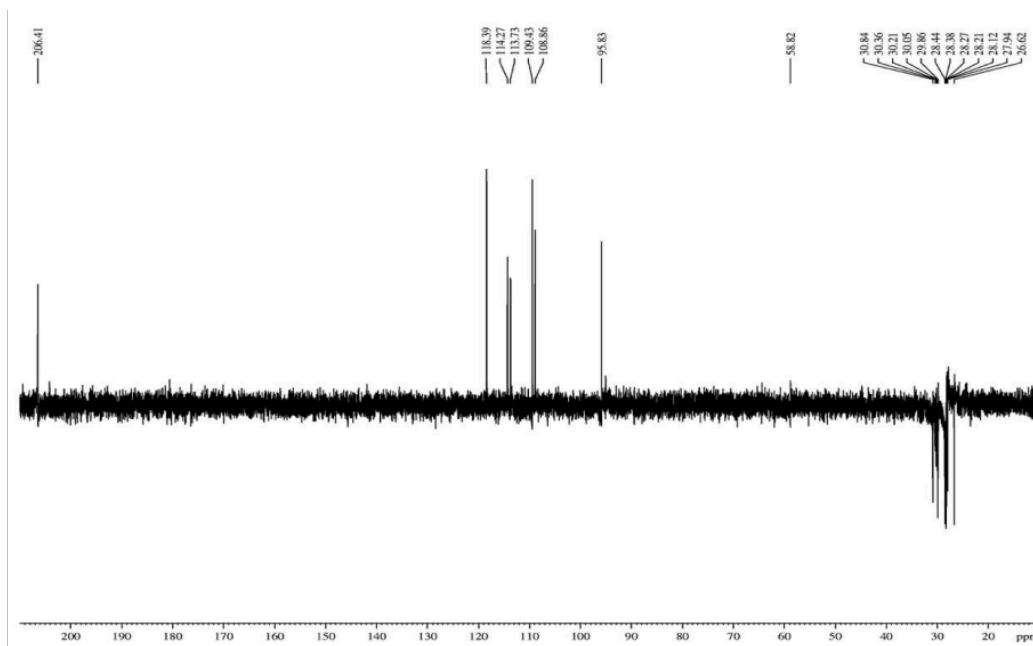


Figura S27. Espectro de RMN C^{13} DEPT 135° (125 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) do composto 2.

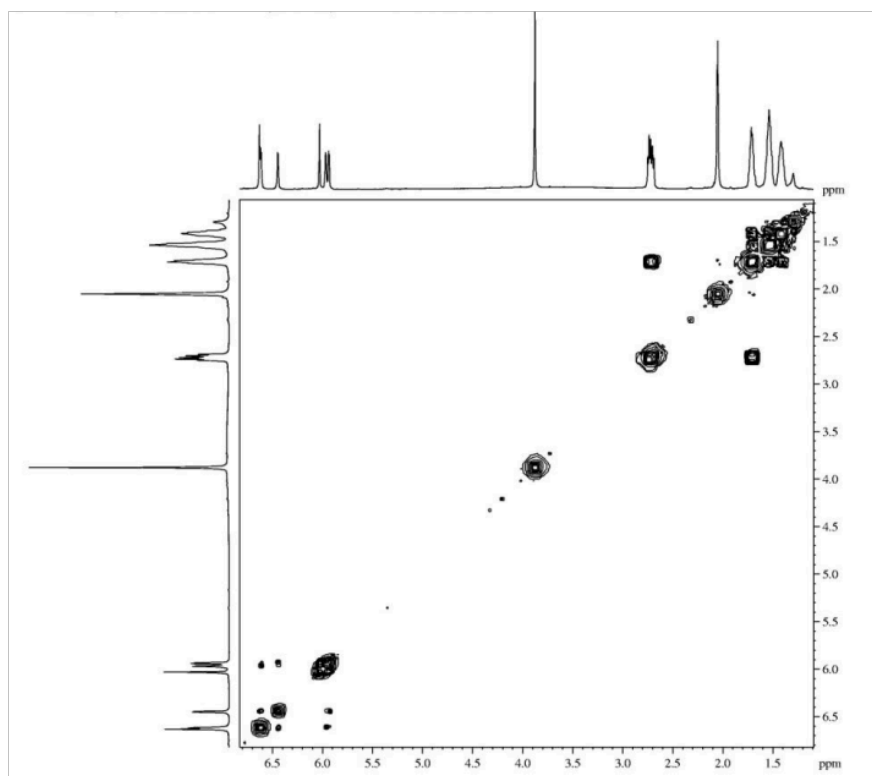


Figura S28. Espectro de COSY do composto 2.

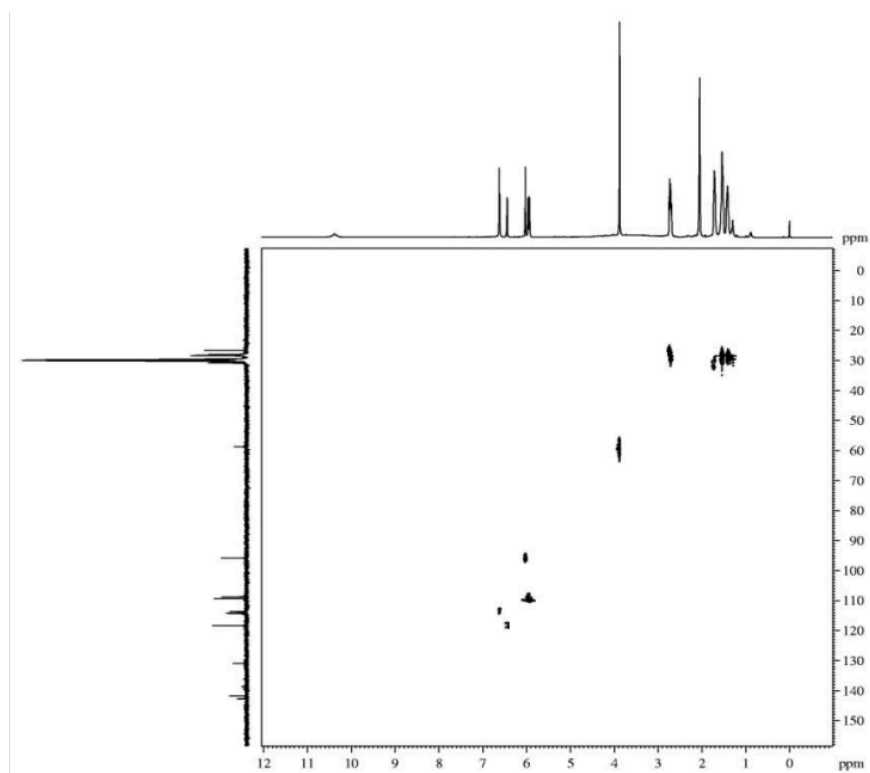


Figura S29. Espectro de HSQC do composto 2.

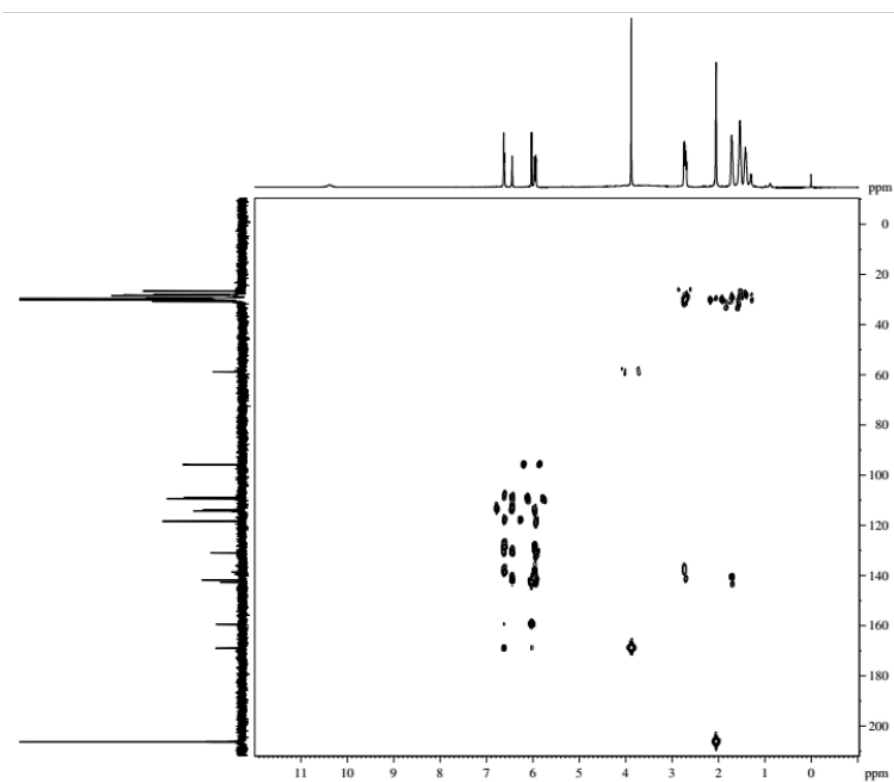


Figura S30. Espectro de HMBC do composto 2.

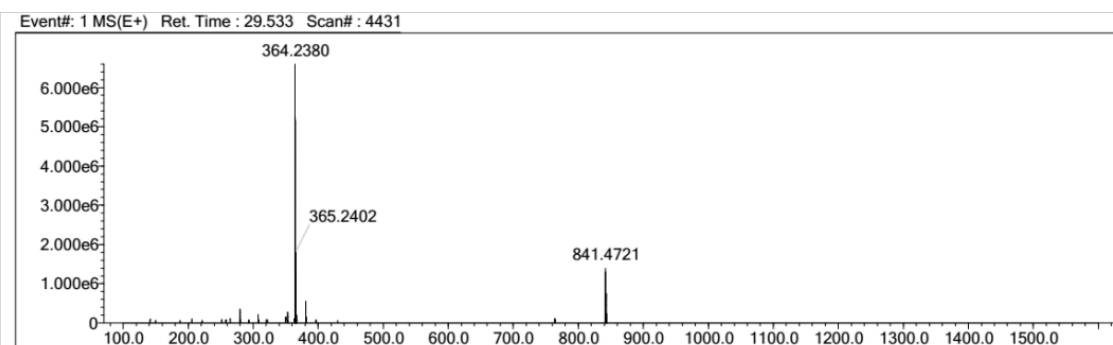


Figura S31. Espectro de HRESIMS do composto 2.

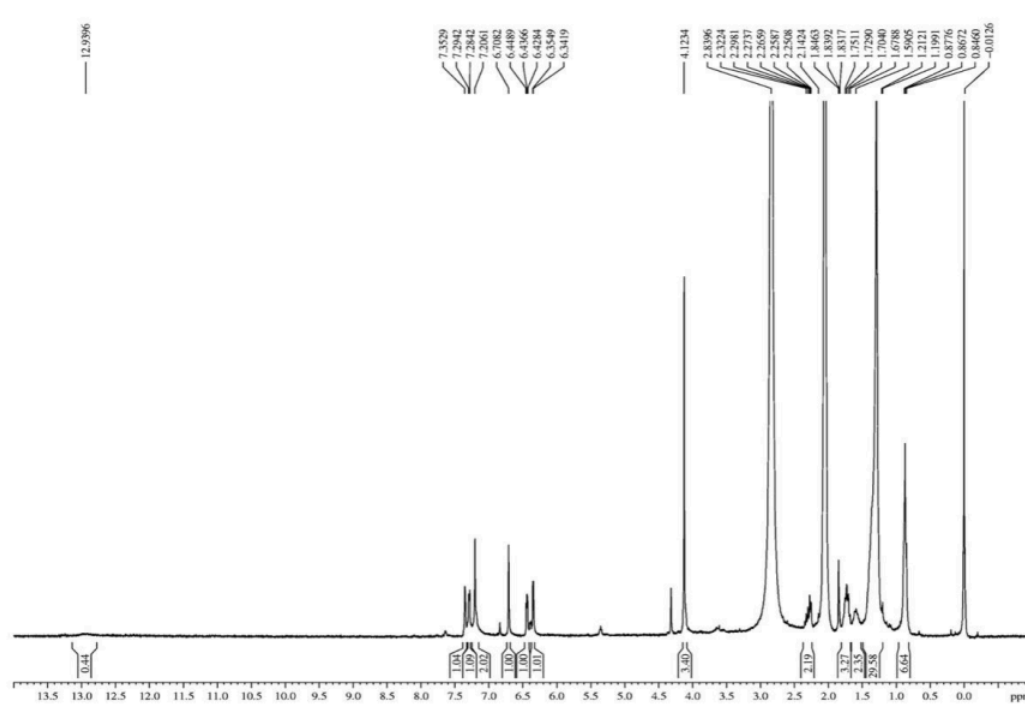
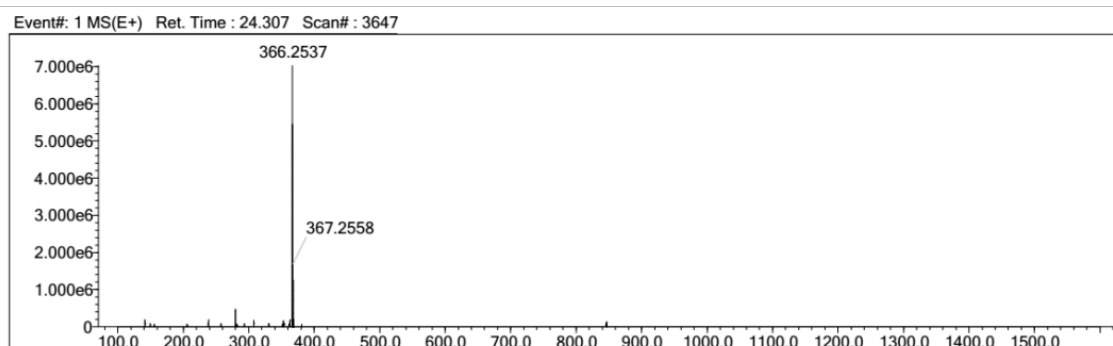
Figura S32. Espectro de RMN H¹ (300 MHz, (CD₃)₂CO) do composto 3.

Figura S33. Espectro de HRESIMS do composto 3.

ANEXO V
Meios de cultura para microbiologia

Meio A1	Amido.....	10 g/mL
	Extrato de levedura.....	4 g/L
	Peptona.....	2 g/L
Suplemento para meio A1	CaCO ₃	0,5 g/L
	Fe ₂ (SO ₄) ₃	5 g/L
	KBr.....	5 g/L
Meio LB (<i>Luria-Bertani</i>)	Triptona.....	10 g/L
	Extrato de levedura.....	5 g/L
	NaCl.....	5 g/L
Meio SOC	Triptona.....	20 g/L
	Extrato de levedura.....	5 g/L
	NaCl 5M.....	2 mL/L
	KCl 2M.....	1,25 mL/L
	MgSO ₄ 10mM.....	*depois de autoclavar e esfriar

ANEXO VI

Artigo publicado



DOI: 10.1002/cbic.201500229

CHEMBIOCHEM
 Communications

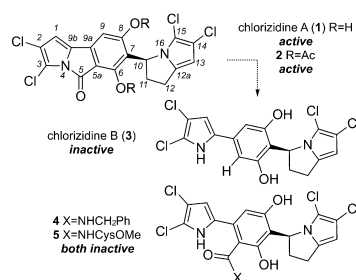
The Hybrid Pyrroloisoindolone–Dehydropyrrolizine Alkaloid (–)-Chlorizidine A Targets Proteins within the Glycolytic Pathway

 Xavier Álvarez-Micó,^[a] Danilo D. Rocha,^[b] Larissa A. Guimarães,^[b] Andrew Ambrose,^[d]
 Eli Chapman,^[d] Leticia V. Costa-Lotufo,^[b, c] James J. La Clair,^{*,[e]} and William Fenical^{*,[a]}

The cytotoxic activity of (–)-chlorizidine A, a marine alkaloid containing a unique fusion between a pyrroloisoindolone and dehydropyrrolizine, was explored by using a combination of cellular and molecular methods. Our studies began by applying preliminary SAR evidence gathered from semisynthetic bioactivity evaluations to prepare an active immunofluorescent (IAF) probe. This probe was then used to identify two cytosolic proteins, GAPDH and hENO1, as the targets of (–)-chlorizidine A.

As part of an effort to identify bioactive natural products from marine microbes,^[1–3] we recently described the isolation and structure elucidation of (–)-chlorizidine A (**1**, Scheme 1) a cytotoxic alkaloid from cultures of a *Streptomyces* sp., strain CNH-287, which was obtained from deep ocean sediments collected off the coast of San Clemente, California.^[4] After optimization, we were able to identify conditions to reproducibly produce (–)-chlorizidine A (**1**) from cultures of the strain on a 20 L scale (~1 mg L⁻¹). The isolated natural product was then used to examine the structural requirements for activity.

As described during the isolation efforts,^[4] methylation of the phenols of **1** resulted in a bis-methyl ether that lacked cytotoxicity in the in vitro HCT-116 colon carcinoma assay (IC₅₀ value > 50 μM). Acetylation, on the other hand, provide the



Scheme 1. Structures of chlorizidine A (**1**), chlorizidine A bis-acetate (**2**), chlorizidine B (**3**) and adducts **4** and **5**. Conversion of **1** to an inactive congener **3** arose by hydrolysis followed by decarboxylation. In addition, nucleophiles readily added to **1** to give adducts, such as **4** or **5**, that also displayed a loss of activity in HCT-116 cells.^[4]

more stable bis-acetate **2** (Scheme 1), which offered an increase in activity (IC₅₀ = 1.8 ± 1.2 μM for **2** and 4.0 ± 0.9 μM for **1**),^[4] thus suggesting that the low activity of **1** might arise from instability in cells or a lack of cellular penetration. This observation was further supported by the fact that we also obtained samples of a hydrolyzed and decarboxylated product (–)-chlorizidine B (**3**, Scheme 1) during the isolation effort.^[4] Further studies indicated that the C5 carbonyl was indeed subject to nucleophilic attack, as demonstrated by the addition of benzylamine and cysteine-O-methyl ester producing **4** and **5**, respectively (Scheme 1).^[4] Additional analyses demonstrated that the congener (–)-chlorizidine B (**3**) was inactive in HCT-116 bioassays; this indicated that the C5 amide was key to the activity observed in **1**.^[4]

We then applied an immunofluorescent (IAF) protocol developed in our laboratories to characterize the activity of **1** in tumor cells.^[5–7] Merging our SAR data^[4] with the functionally-diverse IAF tags,^[8] we targeted the C6 and C8 phenols to install the acid-terminal immunofluorescent (IAF) tag **6**. By using carbodiimide coupling (Scheme 2), a monolabeled probe **8** was prepared by esterification of **1** with acid **6**.^[9] NMR analysis indicated that, although probe **8** was pure (purity was also confirmed by LC/MS and HPLC analyses), it was likely a mixture of the C6 and C8 isomers (Supporting Information). We have previously observed a similar lack of selectivity in labeling polyphenolic natural products.^[10] Biological analyses indicated that probe **8** retained activity in HCT-116 cells with an

[a] Dr. X. Álvarez-Micó, Prof. W. Fenical
 Center for Marine Biotechnology and Biomedicine, Scripps Institution of Oceanography
 University of California San Diego
 La Jolla, CA 92093-0204 (USA)
 E-mail: wfenical@ucsd.edu

[b] Dr. D. D. Rocha, L. A. Guimarães, Prof. L. V. Costa-Lotufo
 Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará
 Fortaleza, CE, 60.430-270 (Brazil)

[c] Prof. L. V. Costa-Lotufo
 Departamento de Farmacologia, Universidade de São Paulo
 São Paulo, SP, 05508-900 (Brazil)

[d] A. Ambrose, Prof. E. Chapman
 Department of Pharmacology and Toxicology
 College of Pharmacy, University of Arizona
 1703 East Mabel Street, P.O. Box 210207, Tucson, AZ 85721 (USA)

[e] Dr. J. J. La Clair
 Department of Chemistry and Biochemistry, University of California San Diego
 La Jolla, CA 92093-0358 (USA)
 E-mail: jlaclair@ucsd.edu

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/cbic.201500229>.