



**Universidade Federal do Ceará**

**Faculdade de Medicina**

**Departamento de Fisiologia e Farmacologia**

**Paula Araújo de Abreu**

**Mecanismos envolvidos na citotoxicidade de uma ditiolpirrolona obtida de *Streptomyces* sp.  
isolado da Ascídia *Eudistoma vannamei*.**

**Fortaleza - CE  
2013**

**Mecanismos envolvidos na citotoxicidade de uma ditiolpirrolona obtida de *Streptomyces* sp. isolado da Ascídia *Eudistoma vannamei*.**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Farmacologia.

Aprovada em: 9 de abril de 2013

Banca Examinadora

---

Profa. Dra. Letícia Veras Costa Lotufo (Orientadora)

Universidade Federal do Ceará - UFC

---

Dra. Paula Christine Jimenez (Co-Orientadora)

Universidade Federal do Ceará - UFC

---

Profa. Dra. Gláucia Maria Machado Santelli

Universidade de São Paulo - USP

---

Prof. Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães

Universidade Federal do Ceará - UFC

Dedico esta Dissertação à minha mãe, que me enche de amor todos os dias.

## AGRADECIMENTOS

À Deus.

À minha mãe, a quem devo tudo. Obrigada por cuidar sempre de mim e me aguentar. Admiro sua determinação, seu bom humor (que eu não herdei) e sua atenção para com as pessoas. Espero ainda aprender muito com a senhora.

Ao meu pai por me direcionar constantemente pelos caminhos da vida e por sempre me apoiar e acreditar em mim.

À Georgia Santiago minha companheira de todas as horas. Agradeço pelo apoio, paciência e cuidado. Obrigada por sonhar os meus sonhos.

Às minhas amigas de infância, adolescência e vida Vera Lopes, Marisa Sombra e Jamille Elita. Vocês tiveram muita influência na pessoa que eu me tornei. Agradeço pelas inúmeras conversas, aprendizados e aventuras. Obrigada por me respeitarem e me amarem do jeito que eu sou.

Ao meu grande amigo Rafael Vieira por compartilhar comigo importantes momentos da vida e por estar sempre disposto a me ajudar.

À Profa. Letícia Veras Costa Lotufo, por confiar em mim para desenvolver esse trabalho e por me deixar fazer parte de sua vida durante esse tempo de aprendizado. Obrigada pelo puxões de orelha, pelo consolo quando precisei e por sua positividade contagiante.

À minha amiga e Co-Orientadora deste trabalho, Dra. Paula Christine Jimenez, que acompanhou de perto meu crescimento, tanto pessoal quanto científico. Este trabalho certamente não teria acontecido sem sua ajuda e dedicação.

Ao Diego Veras por ter tido paciência comigo quanto eu era sua IC, pelos ensinamentos na bancada, pela ajuda neste trabalho e por nunca desanimar. Enfim, por ser essa pessoa incrível e sempre disponível.

Aos amigos Delano Marinho e Ana Jérсия por todas as conversas filosóficas, congressos, viagens e ajuda nos experimentos.

Ao Bruno Soares por nunca ter me deixado na mão e me acompanhar desde os tempos da biologia. Admiro muito sua segurança e esse doce de pessoa.

Às grandes amigas do LOE e sempre ótimas companhias Aline Sbardeloto, Patrícia Marçal, Gabriela Cunha. Muito amadas e queridas.



Aos amigos da biologia Luína Benevides, Terezinha Souza, Luiz Carlos, Marcos André, Rafaela Carneiro, Felipe Bezerra, Gabriela Fernandes por todos os ótimos momentos de descoberta, crise existencial e principalmente ciência. Por tornarem a faculdade mais divertida.

Ao meu amigo Yuri di Cavalcanti, presente que a biologia me deixou e que me faz rir a cada encontro.

Aos amigos do ECOTOX por me ensinarem muito sobre harmonia e respeito: Marcionília Pimentel, pelas conversas no banco à tardinha, os lanches na hora da fome, e as piadas entre os experimentos. Enfim, por tornar meus dias mais felizes e me matar de saudades. Bianca del Bianco, pelos abraços apertados, cervejas geladas e pela ajuda. Larissa Guimarães pela admiração. Lourdes Larissa, Lívia Pitombeira, Lígia, Elthon, Álisson, Évila, Janaina, Breno, Renan Daku, Ivna.

Aos amigos do LOE: Danilo Rocha, Assuero, Daniel, Arinice, Evelyne, Deyse, Felipe, Igor, Marcos, Marcília, Treisy, Stefânio, Sarah, André.

Aos amigos de vida Marcílio Sabino, Gustavo Holanda, João Henrique, Artur Viana, Tiago Gondim, Bianca Macêdo, Allan Villanova, Ricardo Pinto, Mariza Marinho, Sara Maia, Lucivânia Ponte por fazerem minha vida mais colorida.

Ao Prof. James La Clair por me deixar ter o prazer de trabalhar com ele, por ser sempre atencioso e disposto a ajudar e principalmente pelas conversas na mesa de bar e suas histórias surreais.

À Aninha.

À Tia Fanca por me amar como filha.

Às tias Violeta, Marta, Fernanda, Leida, Fátima, Raimunda, Ione, e ao tio Luíz, por todo amor e carinho.

Aos primos Natália, Victor, Marc, Marcelo e Flávia, todos Abreu. E a Léa, Vevé, Louise, Beto e Liana.

À Adelânia Marinho, Silvana França, Erivanda França, Rogéria Montenegro, Aura Rhanes, Márcia Hermínia, Dona Graça e Sheyla Prado pelo apoio técnico.

Aos Proferrores Dr. Manoel Odorico de Moraes, Claudia Pessoa, Pedro Magalhães, Roberto César, Otília Pessoa, Marcellus Loiola.

## SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	7
Lista de Tabelas.....	9
Lista de Abreviaturas.....	10
Resumo.....	11
Abstract.....	12
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
1. Produtos Naturais Marinhos e Câncer.....	13
2. Ciclo celular.....	19
3. Ascídias – <i>Eudistoma vannamei</i> .....	22
4. Microorganismos marinhos.....	26
<b>OBJETIVOS</b> .....	31
1. Objetivo geral.....	31
2. Objetivos específicos.....	31
<b>MATERIAIS</b> .....	32
<b>MÉTODOS</b> .....	32
1. Cultivo do material.....	32
2. Curva de crescimento cinético.....	32
3. Fracionamento bioguiado.....	33
3.1. Obtenção do extrato bruto.....	33
3.2. Fracionamento do extrato Acetato.....	33
4. Determinação estrutural.....	34
5. Cultivo de células.....	36
6. Avaliação da atividade citotóxica em células tumorais <i>in vitro</i> – MTT....	37
7. Avaliação da atividade antiproliferativa através da exclusão por azul de tripan.....	38
8. Análise morfológica e determinação do índice mitótico.....	39
9. Determinação da integridade de membrana.....	40
10. Avaliação do tipo de morte celular.....	41
11. Avaliação do ciclo celular.....	42
12. Análise do citoesqueleto.....	44
13. Detecção de proteínas.....	45
<b>RESULTADOS</b> .....	49
1. Curva de crescimento cinético.....	49
2. Estudo da citotoxicidade e viabilidade celular <i>in vitro</i> .....	50
3. Análise morfológica e índice mitótico - Coloração por May-Grunwald-Giemsa.....	52
4. Estudos de mecanismos de ação.....	56
4.1. Morfologia e integridade da membrana.....	56
4.2 Análise do tipo de morte.....	58
4.3. Análise do ciclo celular.....	60
4.4. Análise do citoesqueleto.....	62
4.5. Detecção de proteínas.....	65
<b>DISCUSSÃO</b> .....	67
<b>CONCLUSÃO</b> .....	77
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	78

## LISTA DE FIGURAS

1.	Número de substancias isoladas a partir de produtos naturais entre 1965 a 2006 utilizadas no tratamento do câncer.....	9
2.	Número de substancias isoladas a partir de produtos naturais marinhos entre 1965 a 2006.....	10
3.	Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil.....	12
4.	Características adquiridas pelas células tumorais e seus respectivos alvos moleculares.....	13
5.	Figura esquemática do ciclo celular.....	16
6.	Figuras esquemática da formação do sulco no início da citocinese.....	17
7.	Ascídia <i>Eudistoma vannamei</i> .....	20
8.	<i>Streptomyces</i> sp isolado da ascídia <i>Eudistoma vannamei</i> .....	21
9.	Porcentagem de metabólitos bioativos isolados de microorganismos e de Actinomicetos.....	25
10.	Fracionamento bioguiado do extrato bruto de <i>Streptomyces</i> sp .....	30
11.	Cromatograma da sub-fração 1 isolada de <i>Streptomyces</i> sp.....	31
12.	Estrutura da ditiopirrolona isolada de actinomiceto <i>Streptomyces</i> sp... ..	32
13.	Fluxograma esquemático do trabalho.....	44
14.	Curva de crescimento de <i>Streptomyces</i> sp. versus atividade citotóxica .....	45
15.	Efeito da ditiolpirrolona na viabilidade celular determinado por exclusão de azul de tripan.... ..	47
13.	Morfologia de células PC-3M após 24h de incubação com ditiolpirrolona.....	49

17.	Morfologia de células PC-3M após 48h de incubação com ditiolpirrolona.....	50
18.	Efeito da ditiolpirrolona no índice mitótico de células PC-3M.....	51
19.	Avaliação da integridade de membrana em células PC-3M.....	52
20.	Avaliação morfológica por citometria de fluxo em células de PC-3M.....	53
21.	Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial em células de PC-3M.....	54
22.	Avaliação do tipo de morte utilizando dupla marcação com PI e rodamina123.....	55
23.	Análise do ciclo celular em células PC-3M com 24 horas de incubação.....	56
24.	Análise do ciclo celular em células PC-3M com 48 horas de incubação.....	57
25.	Análise por microscopia confocal de células PC-3M 24 horas de incubação.....	59
26.	Análise por microscopia confocal de células PC-3M 48 horas de incubação.....	60
27.	Detecção das proteínas: ciclina D2, ciclina E, de ciclina A, ciclina B1, ciclina H, Cdk1, Cdk1, Chk2, Plk-1, Prc-1, RhoA e $\alpha$ -actina, usada como controle positivo, feitas por western blot.....	62

**LISTA DE TABELAS**

1.	Compostos isolados de fontes marinhas aprovados ou em fase de testes clínicos.....	11
2.	Produtos naturais marinhos com potencial antitumoral, isolados de ascídia entre 2003-2004.....	19
3.	Potenciais produtos terapêuticos isolados de microorganismos marinhos.....	23
4.	Linhagens celulares tumorais utilizadas nos ensaios de citotoxicidade <i>in vitro</i> .....	32
5.	CI <sub>50</sub> da curva de crescimento isolada do extratos de <i>Streptomyces</i> sp .....	45
6.	CI <sub>50</sub> da ditiolpirrolona isolada do extrato de <i>Streptomyces</i> sp .....	46

### LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ANOVA</b>	Analisis of Variance
<b>AcOet</b>	Acetato de etila
<b>Cdk</b>	Cyclin dependent kinase
<b>Chk</b>	Checkpoint kinase
<b>CLAE</b>	Cromatografia líquida de alta eficiência
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>FSC</b>	Forward scater
<b>MTT</b>	3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo de tetrazolium
<b>PBS</b>	Phosphate Buffer Solution
<b>PI</b>	Iodeto de propídeo
<b>PKC</b>	Protein kinase C
<b>RPMI</b>	Roswell Parrk Memorial Institute Medium
<b>RMN <sup>13</sup>C</b>	Ressonância Magnética Nuclear de carbonos
<b>RMN <sup>13</sup>H</b>	Ressonância Magnética Nuclear de prótons
<b>SSC</b>	Side scater
<b>STP</b>	Estaurosporina
<b>TBS</b>	Tris Buffered Saline
<b><math>\Delta\Psi_m</math></b>	Potencial Transmembrânico de mitocôndria

## RESUMO

O câncer é caracterizado por ser um conjunto de doenças que envolve crescimento descontrolado, surgimento e espalhamento de células anormais, e é considerada uma das principais causas de morte por doença no mundo. Ascídias e microorganismos marinhos são profícuos produtores de substâncias com atividade citotóxica e antitumoral. Estudos preliminares com a ascídia *Eudistoma vannamei*, endêmica do nordeste brasileiro, identificaram uma potente atividade anticâncer de seu extrato e, a partir dele, isolaram-se esteuroporinas inéditas. Curiosamente, tais moléculas são comumente produzidas por bactérias. No presente trabalho, os extratos dos microorganismos isolados da ascídia foram testados quanto a sua citotoxicidade e o mais potente deles foi selecionado e indentificado como actinomiceto pertencente ao gênero *Streptomyces* sp. A partir da purificação desse extrato, foi isolada uma ditiolpirrolona citotóxica que apresentou valores de concentração inibitória média variando de 1,05 a 6,39  $\mu\text{M}$ , em diferentes linhagens tumorais. Estudos realizados em células de carcinoma prostático humano metastático indicaram que a ditiolpirrolona causou despolarização mitocondrial e induziu o aparecimento de figuras mitóticas, após 24 e 48 horas de tratamento. Além disso, detectou-se alteração no ciclo celular, como atraso nas fases final do ciclo, S e G2/M. A ditiolpirrolona alterou a expressão de algumas proteínas relacionadas ao ciclo celular e principalmente à citocinese, como Prc1, Plk-1 e RhoA, tais proteínas estão diretamente envolvidas com a formação do anel contrátil, imprescindível para a conclusão da divisão celular.

**Palavras chaves:** Ditiolpirrolona, citotoxicidade, células PC-3M, *Streptomyces* sp.

## Abstract

Ascidians and marine microorganisms are prolific producers of cytotoxic and antitumor compounds. As part of a study to examine Brazilian species, we examined microbiota associated with ascidian, *Eudistoma vannamei* as potential sources for active natural product leads. Earlier revisions with this specie showed a potent anticancer activity of its extract; and two unpublished staurosporines were isolated. Curiously, these classes of compounds are generally produced by bacteria. So, in order to evaluate the biomedical potential of these compounds the microbiota associated to the ascidian *Eudistoma vannamei* was investigated. From this effort we isolated a number of bacterial strains and after screening for cytotoxicity using a panel of tumor cell lines, we identified a *Streptomyces* sp., that presented significant bioactivity. Using bioactivity fractionation, we identified the active compound as, dithiopyrrolone *N*-(4,5-dihydro-5-oxo-1,2-dithiolo[4,3-*b*]pyrrol-6-yl)-*N*-methyl-formamide also know as VD846. The compound presented IC<sub>50</sub> values ranging from 1.1 to 6.4  $\mu$ M across a panel of cell lines. Further biological studies, indicated that this compound induced cell cycle arrest during mitosis, an observation that was confirmed by evaluating the effects on a series of cell lines using mitotic index analyses, flow cytometry, and confocal microscope. Western blot analyses indicated that cells treated with VD846 resulted in reduced expression of Plk1 and RhoA, proteins that are necessary for cleavage furrow assembly and exit from cytokinesis.

**Key words:** Dithiopyrrolone, cytotoxic, PC-3M cells, *Streptomyces* sp.



# INTRODUÇÃO

## 1. Produtos Naturais Marinhos e Câncer

Os produtos naturais fazem parte do arsenal terapêutico há milhares de anos, seja através do uso de “preparações” naturais por civilizações antigas, seja em sua utilização para fins terapêuticos na clínica, visto que compõem ou inspiram a maioria dos medicamentos atuais (Harvey, 2008). A contribuição dos produtos naturais se faz particularmente importante no caso do câncer, pois mais de 60% dos quimioterápicos introduzidos na clínica entre 1940 à 2010 foram obtidos a partir de fontes naturais (Figura 1) (Newman & Cargg, 2012).

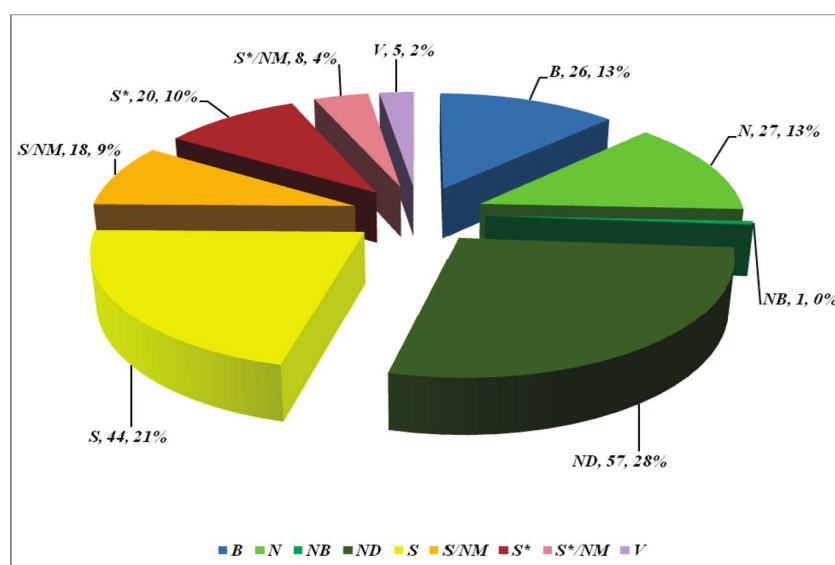


Figura 1 – Número de substâncias isoladas a partir de produtos naturais entre 1965 a 2006 utilizadas no tratamento do câncer. “B” Biológico, geralmente uma proteína isolada de um organismo ou produzido por meios biotecnológicos; “N” Produto natural; “NB” misturas definidas derivadas de planta ; “ND” derivado semi-sintético de produto natural; “S” totalmente sintético, normalmente modificada a partir de um agente pré-existente; “S\*” originado por síntese total mas com grupo farmacofórico de produto natural; “V” vacina; “NM” Mímico funcional de um produto natural (Newman & Cargg, 2012).

Historicamente, os produtos naturais marinhos levaram um pouco mais de tempo para deslancharem na indústria farmacêutica quando comparados àqueles extraídos de plantas, por

exemplo. Somente a partir da década de 50, o ambiente marinho foi efetivamente reconhecido como fonte de produtos naturais com potencial terapêutico e essa exploração tardia provavelmente se deu devido ao difícil acesso a esse ecossistema e a falta de equipamentos de mergulho capazes de explorá-lo de forma mais consistente (Gerwick & Moore, 2012). O desenvolvimento de equipamentos de mergulho mais modernos e seguros, como o *aqualung*, disponibilizado comercialmente em 1946, foi crucial para acessar às profundezas do mar e, conseqüentemente, seu potencial farmacológico. O trabalho de Bergmann e Feeney foi um dos pioneiros nesse assunto e revelou o isolamento dos arabinonucleosídeos espongotimidina e espongouridina da esponja caribenha *Cryptotethya crypta* (Tethyidae), (Bergman & Feeney, 1951). Estes compostos estes que serviram de protótipo para o desenvolvimento de uma nova classe de análogos, Ara-A (Vidarabina, Vidarabin Thilo<sup>®</sup>) e Ara-C (Citarabina, Alexan<sup>®</sup>, Udicil<sup>®</sup>), utilizados na clínica para tratamentos de infecção por vírus *Herpes simplex* e de câncer (Köning & Wright, 1996; Schwartzmann *et al.*, 2001).

Posteriormente, a pseudopterosina, substância isolada da gorgônia *Pseudopterogorgia elisabethae*, foi o primeiro registro de substância isolada de uma fonte marinha utilizada como cosmético. Ela tem atividade anti-inflamatória e é usada até os dias atuais a fim de abrandar reações alérgicas inflamatórias tópicas (Look *et al.*, 1986; Fenical, 2006). Em meio a adventos nas técnicas de pesquisa, equipamentos de mergulho mais seguros, avanços na tecnologia analítica e na química combinatória, os esforços canalizados para a pesquisa de produtos naturais marinhos, lançou o primeiro fármaco proveniente do mar, o Prialt<sup>®</sup> (ziconotida), somente muitos anos depois. Essa substância, extraída a partir do molusco *Conus magus*, é comercializada desde 2004 nos EUA e é utilizado na clínica para o tratamento de dor neuropática crônica moderada a grave (Molinski *et al.*, 2009; Mayer *et al.* 2010) No decorrer dos anos, o número de substâncias isoladas do ambiente marinho cresceu bastante (Figura 2), comprovando a consolidação desse ecossistema na pesquisa e na terapêutica.

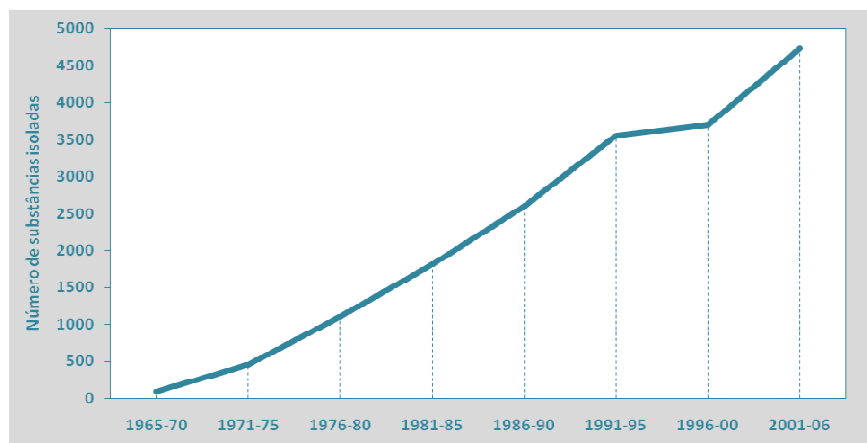


Figura 2 – Número de substâncias isoladas a partir de produtos naturais marinhos entre 1965 a 2006 (Costa-Lotufo *et al.* 2009).

Até então, diversos compostos foram descritos e muitos outros estão em fase de teste ou foram aprovadas para uso clínico, mostrados na Tabela 1 (Schwartzmann *et al.*, 2001; Mayer *et al.*, 2010). Como pode ser visto, grande parte dos compostos de origem marinha aprovados para uso ou em testes clínicos são indicados para tratamento de neoplasias.



Tabela 1 - Compostos isolados ou inspirados em fontes marinhas aprovados ou em fase de testes clínicos (Mayer *et al.*, 2010; Gerwick & Moore, 2012). \*NA – Não aplicável

Status clínico	Composto	Nome comercial	Suposto produtor	Classificação química	Doença tratada
<b>Aprovado</b>	Cytarabina, Ara-C	Cytosar-U1	Esponja/bactéria	Nucleosídeo	Câncer
	Vidarabina, Ara-A	Vira-A1	Esponja/bactéria	Nucleosídeo	Anti-viral
	Ziconotídeo	Prialt	Molusco	Peptídeo	Dor
	Mesilato de eribulina (E7389)	Halaven	Esponja/bactéria	Policetídeo	Câncer
	Omega-3 etil ester	Lovasa	Peixe	Ácido graxo	Hipertrigliceridemia
	Brentuximab vedotin (SGN – 35)	Adcetris	Molusco/cianobactéria	Anticorpo conjugado a droga	Câncer
	Trabectedina (ET-743)	Yondelis	Tunicado/bactéria	Alcalóide	Câncer
<b>Fase III</b>	Plitidepsina	Aplidina	Tunicado/bactéria	Depsipeptídeo	Câncer
	Soblidotina (TZT 1027)	NA	Bactéria	Peptídeo	Câncer
<b>Fase II</b>	Zalipsis (PM00104)	NA	Nudibrânquio/bactéria	Alcalóide	Câncer
	Glembatumumab vedotin (CDX-011)	NA	Molusco/cianobactéria	Anticorpo conjugado a droga	Câncer
	DMXBA (GTS-21)	NA	Minhoca	Alcalóide	Esquizofrenia
	Plinabulina (NPI-2358)	NA	Fungo	Diketopiperazina	Câncer
	Elisidepsina PM1004	Irvalec	Molusco/bactéria	Depsipeptídeo	Câncer
	Tasidotina	Zalipsis	Nudibrânquio	Alcalóide	Câncer
<b>Fase I</b>	SGN - 75	NA	Molusco/cianobactéria	Anticorpo conjugado a droga	Câncer
	ASG – 5ME	NA	Molusco/cianobactéria		Câncer
	Sintadotina (ILX-651)	NA	Bactéria	Peptídeo	Câncer
	Pseudopterosina	NA	Coral	Diterpeno glicosilado	Cicatrização
	Bryostatina 1	NA	Briozoário/bactéria	Policetídeo	Câncer, Alzheimer
	Hemiasterlina (E7974)	NA	Esponja/bactéria	Tripeptídeo	Câncer
	Salinosporamida A; NPI-0052	Marizomib	Bactéria	$\beta$ -lactona- $\gamma$ -lactâmico	Câncer

Apesar do arsenal terapêutico existente e do sucesso do tratamento em alguns tipos de câncer, a mortalidade devido a esta doença continua inaceitavelmente alta. Diversas pesquisas são feitas a fim de identificar compostos com mecanismos de ação inéditos, menos tóxicos e

mais seletivos para células neoplásicas (Radjasa *et al.*, 2011). Em meados da década de 60, o Instituto Nacional de Câncer dos Estados Unidos (NCI) deu início a um grande programa de *screening* em busca de possíveis candidatos a agentes antitumorais (Mann, 2002). A partir daí, a pesquisa voltada para o tratamento do câncer, baseado em produtos naturais, realizou descobertas inéditas, incluindo novos agentes antineoplásicos, como o taxol, a vimblastina e a vincristina, na clínica. Estima-se que cerca de metade dos fármacos utilizados na quimioterapia do câncer sejam provenientes de produtos naturais ou derivados, diretamente e indiretamente, deles (Newman & Cragg, 2012).

Segundo a Sociedade Americana de Câncer, o câncer é um conjunto de doenças que envolve crescimento descontrolado, surgimento e espalhamento de células anormais (<http://www.cancer.org/cancer/cancerbasics/what-is-cancer>, acessado em 28/03/2013). O processo de formação de células neoplásicas pode levar muitos anos e é resultado de um acúmulo de mutações não reparadas no DNA, mutações estas que afetam principalmente oncogenes, genes supressores de tumor e outros genes relacionados à proliferação celular (Rieger, 2004). No Brasil, a incidência de câncer é bastante relevante, com mais de 250 mil casos por ano tanto para homens quanto para mulheres (INCA, 2012). A Figura 3 mostra a distribuição dos 10 tipos de cânceres mais incidentes no país em 2012.

Localização primária	casos novos	percentual			Localização primária	casos novos	percentual		
Próstata	60.180	30,8%	Homens		Mama Feminina	52.680	27,9%		
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.210	8,8%			Mulheres		Colo do Útero	17.540	9,3%
Cólon e Reto	14.180	7,3%			Cólon e Reto	15.960	8,4%		
Estômago	12.670	6,5%			Glândula Tireoide	10.590	5,6%		
Cavidade Oral	9.990	5,1%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.110	5,3%		
Esôfago	7.770	4,0%			Estômago	7.420	3,9%		
Bexiga	6.210	3,2%			Ovário	6.190	3,3%		
Laringe	6.110	3,1%			Corpo do Útero	4.520	2,4%		
Linfoma não Hodgkin	5.190	2,7%			Sistema Nervoso Central	4.450	2,4%		
Sistema Nervoso Central	4.820	2,5%			Linfoma não Hodgkin	4.450	2,4%		

\* Número arredondado para 10 ou múltiplos de 10

Figura 3 – Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil estimados para 2012 por sexo. \*exceto não melanoma (<http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/tabelaestados.asp?UF=BR>)

Os maiores problemas encontrados na terapêutica do câncer são a falta de seletividade dos quimioterápicos para as células tumorais e a alta taxa de resistência à múltiplas drogas adquirida pelas células neoplásicas, enquanto que as células normais, permanecem sensíveis mesmo após tratamento prolongado (Duesberg *et al.*, 2007). Como as células neoplásicas são, de alguma maneira, semelhantes àsquelas normais, os quimioterápicos apresentam efeitos colaterais relevantes que, muitas vezes, inviabilizam a progressão do tratamento, principalmente naqueles tecidos que apresentam uma taxa maior de proliferação, como a pele, a mucosa do estômago e o folículo piloso. Isso acontece porque uma grande parte dos fármacos utilizados na quimioterapia age via ciclo celular, visto que células neoplásicas apresentam alta taxa de proliferação. Sendo assim, bons candidatos a drogas anti-neoplásicas devem ter como alvo principalmente as características mais marcantes das células tumorais (Figura 4), que são: auto-suficiência para os fatores de crescimento, evasão de supressores de crescimento, evasão do sistema imune, proliferação ilimitada, inflamação, invasão tecidual e metástase, angiogênese, instabilidade genômica e mutações, resistência a morte celular e desregulação metabólica (Hanahan & Weinberg, 2011).



Figura 4 – Características adquiridas pelas células tumorais e seus respectivos alvos moleculares (Adaptado de Hanahan & Weinberg, 2011).

## 2. Ciclo celular

O ciclo celular é um conjunto de processos que envolve o ciclo de divisão da célula. Ele se divide em mitose e interfase, estágio entre as divisões no qual a célula cresce, duplica o DNA e prepara-se para dividir. Nesse período é necessário que a célula duplique seu DNA a fim de, futuramente, transferi-lo igualmente para as células filhas. A replicação do material genético ocorre na fase S (síntese), que se intercala entre dois intervalos (do inglês - Gap) do ciclo, G1 e G2. Nessas etapas, a célula prepara-se para duplicação do DNA e para fase M (mitose), respectivamente, e é quando detectam e resolvem possíveis anormalidades no DNA duplicado, além conferir se as condições do meio externo são apropriadas para duplicação. A mitose, por sua vez, é basicamente composta por quatro fases: prófase, metáfase, anáfase e telófase. Na realidade a maior parte das células dos organismos multicelulares encontram-se em um estado quiescente chamado de G0, período esse no qual a célula não se divide e que pode ser reversível ou não (Vermeulen *et al.*, 2003; Fischer *et al.*, 2004; Williams & Stoeber, 2012).

O ciclo celular é regido pela produção e degradação de proteínas chamadas ciclinas, que desempenham sua função através da ligação com proteínas constitutivas da célula, as quinases dependentes de ciclinas (Cdk – Cyclin dependent kinases). Essas, por sua vez, são ativadas em determinados momentos do ciclo através de proteínas ativadoras e inibidoras. Para que ocorra a progressão do ciclo celular e a transição adequada para cada fase, a ativação das Cdk é cuidadosamente regulada através do acoplamento com ciclinas específicas, juntamente com mecanismos de fosforilação (Vermeulen *et al.*, 2003; Fischer *et al.*, 2004). Essa fosforilação, normalmente um mecanismo inibitório, é realizada pela Cdk ativadora de quinase (CAK), comumente formada por um complexo trimérico: Cdk7 (subunidade catalítica), ciclina H (subunidade reguladora) e MAT1, que auxilia na montagem e na interação do complexo com seu substrato. CAK participa então da regulação e progressão do ciclo celular através da fosforilação de resíduos de treonina das Cdk (Tassan *et al.*, 1994; Nigg, 1996).

Fatores de crescimento estimulam a transcrição da ciclina D que, por sua vez, se liga a Cdk4 e Cdk6, formando um complexo que promove progressão para G1, aonde a célula se prepara para sintetizar o DNA. A formação do complexo ciclina E/Cdk2 permite a transição do ciclo de G1 para S. A progressão para a próxima fase, S, é marcada pela síntese da ciclina A,

que, por sua vez, se liga a Cdk2 e assim permanece até a fase G<sub>2</sub>. Após a degradação do envelope nuclear, a ciclina A é também degradada, facilitando a ligação da ciclina B a Cdk1 e esse complexo ativo é responsável pela entrada da célula na fase M do ciclo celular e, finalizando a divisão, a citocinese (Figura 5). Além da participação das ciclinas e Cdks, em células normais, o ciclo celular é rigidamente vigiado e reparado, quando necessário, pelos mecanismos dos *checkpoints* (pontos de checagem). Suas funções são garantir que o DNA seja fielmente duplicado e transferido para células filhas com sucesso e que todo esse processo ocorra somente em condições ideais a fim de garantir a integridade do material genético. Os *checkpoints* podem atrasar a progressão do ciclo celular a fim de reparar eventuais danos ao DNA e, se o dano não for reparável, a célula é induzida à morte. A ativação das proteínas Chk ocorre por fosforilação via ATM em decorrência a dano de DNA em fita dupla, consequentemente promovendo bloqueio no ciclo celular e eventualmente apoptose. O complexo ciclina B/Cdk1, mencionado anteriormente, é regulado pela proteína Cdc25C. A ativação de Chk1 e de Chk2 inativa Cdc25C que, por sua vez, deixa de ativar o complexo ciclina B/Cdk1, impedindo então a progressão do ciclo celular e entrada na mitose (Maddika *et al.*, 2007; Williams & Stoeber, 2012).

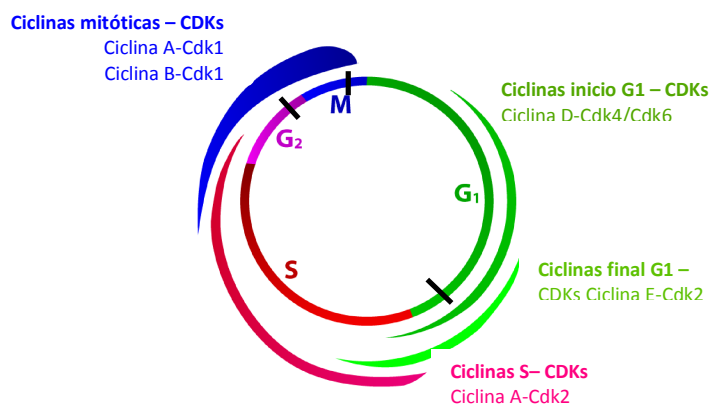
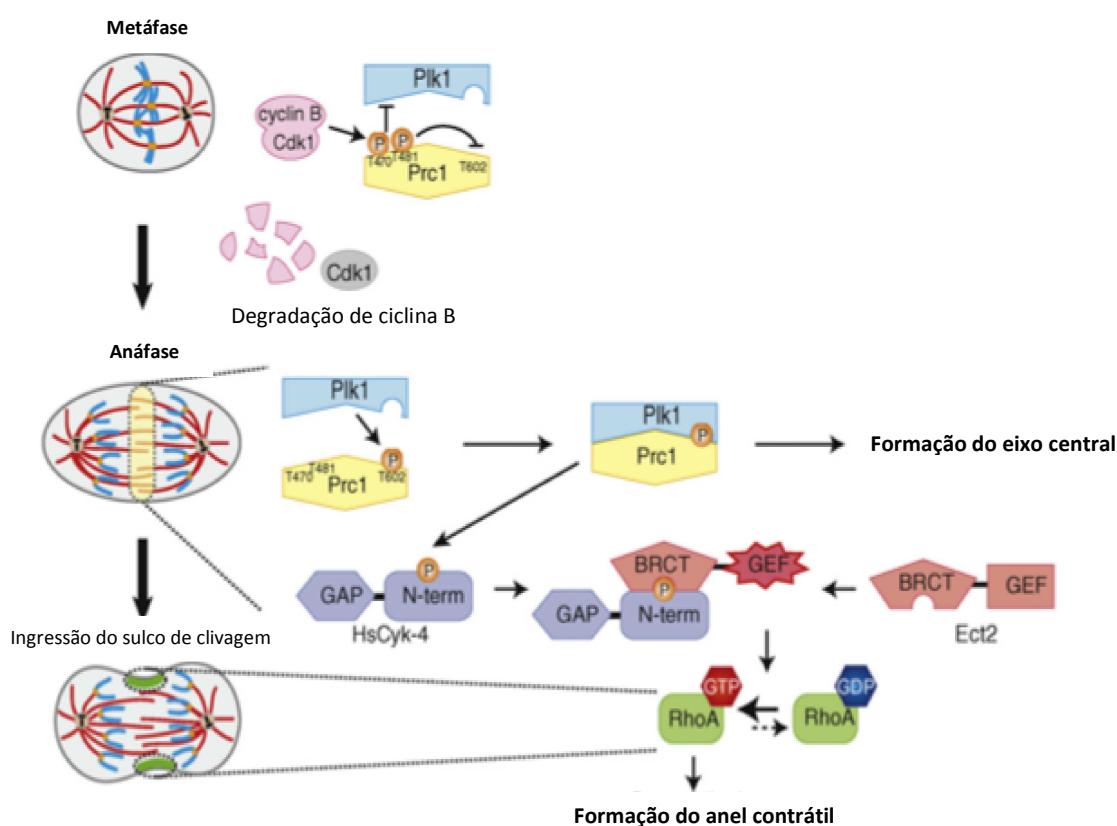


Figura 5 – Ciclo celular representando as respectivas ciclinas e Cdks ativadas em cada fase. Os mascadores pretos indicam os pontos de checagem do ciclo.

Com o funcionamento normal das vias que coordenam o ciclo celular e após o cumprimento das etapas citadas anteriormente, culminando com a separação dos cromossomos na anáfase e com a degradação da ciclina B pelo complexo APC, a célula finalmente encontra-se em condições de finalizar a divisão através da separação do citoplasma a fim de originar duas células-filhas com características idênticas, processo chamado de citocinese. Apesar de ser o



estágio final da mitose, a citocinese conta com etapas bastante complexas e interdependentes. Elas são coordenadas juntamente com os outros estágios da mitose, especificamente no início da anáfase, onde ocorre o estabelecimento do plano de clivagem da célula com a definição do eixo central, através do deslocamento e posicionamento de proteínas específicas, tais como Prc1 e MAP (proteína associada a microtúbulos). Nesse momento, Prc1, previamente inativada ainda no início da mitose via fosforilação pelo complexo ciclina B/Cdk1, é então desfosforilada e se liga a outra proteína importante para a determinação do eixo, onde irá se formar posteriormente o anel contrátil, a Plk-1 (*polo like kinase*) (Figura 6). Esse processo então desencadeará o recrutamento de proteínas para seus respectivos locais além da ativação da Rho, sendo a RhoA a mais importante em células animais. A RhoA tem papel crucial na separação das células, visto que é responsável por auxiliar no posicionamento e na formação da estrutura do anel contrátil, basicamente composto de actina e miosina. Em seguida, ocorre então o aprofundamento de um sulco, guiado pelo anel contrátil, culminando com a formação de uma secção central (*midbody*) e a completa separação das células filhas (Glotzer, 2003; 2007; Sagona & Stenmark, 2010).



Figura

6 – Figuras esquemática da formação do sulco no início da citocinese (Adaptado de Tadaki *et al.*, 2008)

### 3. Invertebrados marinhos - *Eudistoma vannamei*

A produção de metabólitos secundários, como substâncias para comunicação e para defesa química no oceano, é abundante dentre os invertebrados marinhos, sendo particularmente importantes àqueles que não dispõem da possibilidade de locomoção (Radjasa *et al.*, 2011). Mais de 200 alcalóides com atividade farmacológica interessante já foram isolados de tunicatos marinhos. Ascídias, em especial, são conhecidamente produtoras de substâncias com atividade citotóxica e antitumoral, além de serem relativamente acessíveis pois habitam abundantemente locais mais perto da costa, o que facilita a coleta de material. Alguns alcalóides isolados de ascídias demonstraram atividade promissora, tanto quanto agentes farmacológicos tanto quanto ferramentas bioquímicas (Bowned, 2000; Faulkner, 2000; Radjasa *et al.*, 2011).

Nos anos 80 a didemnina B, isolada da ascídia *Trididemnum solidum*, foi o primeiro produto natural marinho a entrar para testes clínicos. Porém, apesar de sua atividade promissora, os estudos foram interrompidos na fase II, pois ela apresentou toxicidade neuromuscular relevante. Entretanto, um análogo da didemnina B isolado da ascídia *Aplidium albicans*, a aplidina ou plitidepsina, atualmente encontra-se na fase III de testes com o nome de Aplidin® (Rinehart *et al.*, 1981; Costa-Lotufo *et al.*, 2009; Molinski *et al.*, 2009). Mais recentemente, em 2007, o Yondelis® (Ecteinascidina - 743), alcalóide isolado da ascídia caribenha *Ectenascidia turbinata*, foi aprovado para uso na clínica e é utilizado para o tratamento de sarcomas de tecidos moles, além de estar em fase de ensaios clínicos para tratamento de outros tipos de câncer (Erba *et al.*, 2001; D'Incalci *et al.*, 2003). A Tabela 2 mostra outros compostos com atividade antitumoral que foram isolados a partir de ascídias (Schwartzmann *et al.*, 2001).

Tabela 2 – Exemplos de produtos naturais marinhos com atividade citotóxica ou antitumoral isolados de ascídia (Adaptado de Bowden, 2000; Mayer & Gustafson, 2006)

COMPOSTO	CLASSE QUÍMICA
Aplinina	Disipeptideo
Ascididemina	Alcalóide
Bistratamida J	Peptideo
Biselida A	Policetídeo
Clavaminol	Policetídeo
Diazonamida A	Peptídeo
Didemnina B	Depsipeptideo
Ecteinascidina - 743	Alcalóide
Eudistominas	Alcalóide
Eudistomidinas	Alcalóide
Fucoxantíol	Carotenóide
Haouamida A	Alcalóide
Haterumaimida N-Q	Alcalóide
Isogranulatimida (sintético)	Alcalóide
Lamelarina	Alcalóide
Lissoclibadina	Alcalóide
Lissoclinotoxina A	Alcalóide
Ningalinas	Alcalóide
Shishijimicina A-C	Alcalóide
Varacina	Alcalóide

*Eudistoma vancouveri* (Figura 7) é uma das espécies de ascidia mais abundante no litoral cearense. Estudos preliminares demonstraram que seu extrato, do qual foram isolados duas estaurosporinas inéditas, apresentou potente atividade citotóxica frente a diversas linhagens neoplásicas. Estaurosporinas são alcalóides que possuem atividade antifúngica, hipotensiva e citotóxica via inibição da proteínas quinase C (PKC), causando parada em G2, além de inibir a invasão celular e o crescimento de células tumorais. Essa ação em PKC pode ser uma ferramenta útil na clínica, visto que a expressão dessa proteína encontra-se alterada em alguns tipos de neoplasias, tal fato está relacionado com a proliferação descontrolada de células e com aumento de resistência a drogas. Dois análogos da estaurosporina, UCN-01 e CGP 41251, já estão em

estudos de fase II e fase I, respectivamente, como possíveis candidatos a agentes anticâncer (Gescher, 2000; Jimenez *et al.*, 2008; Andréo *et al.*, 2012).



Figura 7 – Ascídia *Eudistoma vannamei* coletada na Praia da Taíba.

O primeiro relato de estaurosporinas foi em 1977, em espécies de bactérias do gênero *Streptomyces* terrestres. Posteriormente, alguns análogos e derivados de estaurosporina foram também isolados de organismos marinhos e apresentaram atividade igual ou superior à própria estaurosporina (Omura *et al.*, 1977; Tamaoki *et al.*, 1986; Gadbois *et al.*, 1992; Steube *et al.*, 2003).

Microorganismos podem viver em associação com outros animais marinhos. Alguns, inclusive, crescem melhor na presença de determinada bactéria, provavelmente devido a existência de certos metabólitos produzidos em decorrência de pressões ecológicas que os microorganismos sofrem para se adaptarem ao ambiente marinho (Villarreal-Gómez *et al.*, 2010). Diversos estudos mostram que a superfície de animais marinhos pode abrigar uma grande diversidade de espécies de bactérias, sendo elas detentoras de potencial de produção de substâncias bioativas. O microambiente criado pelo “hospedeiro” eucarioto gera condições de adaptação mais estáveis quando comparada àquelas condições enfrentadas por microorganismos planctônicos, o que pode resultar em comunidades únicas e específicas para cada espécie, além de favorecer uma resposta adaptativa mais específica e sofisticada por parte da microbiota associada (Muscholl-Silberhorn *et al.*, 2007; Penesyan *et al.*, 2010). Tal relação, hospedeiro e

microorganismos, pode se tornar tão próxima que as vias metabólicas podem ser confundidas, quando existe a tentativa de se descobrir qual organismo produziu determinado metabólito. De fato, estima-se que bactérias e cianobactérias são responsáveis por cerca de 80% dos compostos marinhos (ou derivados) que se encontram em testes clínicos ou que já foram aprovados como agentes terapêuticos (Gerwick & Moore, 2012).

Essas substâncias geralmente despertam grande interesse farmacológico nos pesquisadores devido ao enorme leque de possibilidades terapêuticas e de propriedades biológicas interessantes. Antes de serem explorados como potenciais drogas, os metabólitos secundários desempenham papel ecológico, tais como proteção contra predadores, comunicação entre espécies, competição por território, entre outros (Croteau *et al.*, 2000; Hunt *et al.*, 2006). Variações nos padrões de crescimento de microorganismos, como temperatura, concentração de gases, tipo de meio de cultura e até stress, podem afetar a produção desses metabólitos pelas bactérias. Além disso as fontes de nutrientes, carbono e nitrogênio disponíveis estão diretamente relacionados com o crescimento e com a produção de metabólitos bioativos. Em um estudo feito analisando diferentes condições de cultivo de *Spreptomyces staurosporeus*, bactéria produtora da estaurosporina, observou-se alterações em vários padrões, como morfologia da cultura e dos esporos, pigmentação e alteração na produção de metabólitos de acordo com as fontes de carbono e de nitrogênio disponibilizadas no meio de cultura (Omura *et al.*, 1977). Outro estudo com *Saccharothrix algeriensis*, uma bactéria produtora de ditiolpirrolona com propriedade antibiótica, observou-se que a adição de diferentes tipos de ácidos orgânicos no meio de cultura alterou a produção dessa substância para mais ou para menos, de acordo com o tipo de ácido orgânico disponibilizado no meio (Bouras *et al.*, 2007).

Dito isso, a presença de um composto conhecido produzido por microorganismo, como as estaurosporinas encontrado na ascídia *E. vannamei* sugere que a produção dessas substâncias pode estar relacionada à microbiota associada ao invertebrado. Tal sugestão ganhou força quando Andréo e colaboradores (2012), reportaram o isolamento de uma cepa de *Streptomyces* sp. (Figura 8) associada à *E. vannamei* e a ocorrência de estaurosporina no extrato orgânico da bactéria.



Figura 8 – *Streptomyces* sp isolado da ascídia *Eudistoma vannamei*. A parte marrom representa o actinomiceto e a parte branca mostra os esporos produzidos por ele.

#### 4. Microorganismos marinhos

Os microorganismos carregam um importante legado de possuírem compostos com estruturas interessantes e singulares. Atualmente, mais de dez mil produtos naturais derivados de microorganismos são conhecidos, dentre eles, centenas de fármacos que fazem parte do arsenal terapêutico, como doxorubicina, ciclosporina A, eritomicina, mitomicina, bleomicina, actinomicina D e tantos outros (Bérdy, 2004; Olano *et al.*, 2009; Zotchev, 2011).

A sustentabilidade é um fator relevante em termos de pesquisa de medicamentos, visto que são necessários diversos testes para pesquisar e lançar qualquer medicamento no mercado, desde a elucidação da estrutura, passando pelas fases de testes pré-clínicos e clínicos. Alguns microorganismos podem ser facilmente ser cultivados em laboratório e manipulados em grandes bioreatores, resolvendo assim o problema de falta de material. O mesmo não acontece com os invertebrados marinhos já que as vezes faz-se necessário a coleta de uma grande quantidade de material para a identificação de substâncias, principalmente moléculas peculiares, já que muitas vezes a complexidade das estruturas inviabiliza a síntese química dos compostos isolados.

Microorganismos marinhos estão presentes em quase todos os tipos de habitats, desde águas congeladas de regiões polares, mangues, praias, águas profundas, limpas ou poluídas, até águas escaldantes de fontes termais. Estima-se que a abundância microbiológica marinha é cerca de  $10^6$  bactérias/ml de água do mar e esse número sobe para  $10^9$  bactérias/ml de água do mar

quando consideramos sedimentos do fundo oceânico. Em ecossistemas como esses, ou em recifes de corais, por exemplo, a diversidade microbiológica marinha pode chegar a ser maior do que a das florestas tropicais (Fenical & Jensen, 2006; Lam, 2006). Dentre as atividades farmacológicas dos produtos do metabolismo de microorganismos marinhos pode-se citar atividade antibiótica, antituberculósica, antiviral, antiparasitária, antimalária, anticoagulante, anti-inflamatória, antidiabética e antitumoral (Tabela 3) (Sayed, 2000; El Sayed *et al.*, 2000; Kaiser *et al.*, 2002; Donia & Hamann, 2003; Mayer *et al.*, 2007; Mayer *et al.*, 2010; Waters *et al.*, 2010).

Tabela 3 – Potenciais produtos terapêuticos isolados de microorganismos marinhos (Adaptado de Williams, 2008; Imhoff et al, 2011)

<b>Composto</b>	<b>Atividade biológica</b>	<b>Uso terapêutico</b>
<b>Cianobactéria</b>		
<b>Apratoxina A</b>	Antiproliferativo	Câncer
<b>Apratoxina D</b>	Antiproliferativo	Câncer
<b>Coibamida A</b>	Antiproliferativo	Câncer
<b>Curacina A</b>	Antimitótico	Câncer
<b>Criptoficina</b>	Inibição da polimerização da tubulina	Câncer
<b>Largazola</b>	Inibição de histone deacilase	Câncer, epilepsia
<b>Actinomicetos</b>		
<b>Marinomicina</b>	Citotóxico	Câncer
<b>Abissomicina</b>	Antibiótico	Doenças infecciosas
<b>Proximicina</b>	Antiproliferativo	Câncer
<b>SS-228 Y</b>	Antibiótico	Doenças infecciosas
<b>Tiocoralina</b>	Anti-proliferativo e anti-tumoral	Câncer, doenças infecciosas
<b>Salinosporamida A</b>	Inibidor de proteossoma	Câncer, Alzheimer
<b>Proteobactéria</b>		
<b>Briostatina</b>	Modulação da Proteína quinase C	Câncer

Mais de 33.000 metabólitos secundários bioativos já foram isolados a partir de microorganismos, dos quais, quase a metade são produzidos por actinomicetos (filo *Actinobacteria*) (Figura 9). Os actinomicetos, bactérias gram-positivas e filamentosas, são uma fonte importantíssima de novas moléculas com atividade terapêuticas, sendo, sem dúvida, a

ordem detentora da maioria dos produtos naturais isolados de microorganismos. Dentre os 140 generos pertencentes a ordem *Actinomycetales*, o gênero *Streptomyces* é responsável por aproximadamente de 80% dos produtos naturais provenientes de actinomicetos reportados na literatura (Figura 9) (Jensen *et al.*, 2005; Imhoff *et al.*, 2011).

O gênero *Streptomyces*, pertencente a esse filo, é responsável por cerca de 7600 compostos desse grupo com diversas atividades biológicas, cerca de metade dos antibióticos conhecidos é proveniente desse grupo (Subramani & Aalbersberg, 2010). Esse gênero foi primeiramente descrito em 1943 por Waksman & Henrici e, desde então, vem colecionando trabalhos a seu respeito. Os representantes de *Streptomyces* sp. são capazes de povoar os mais diversos e adversos ambientes, sendo eles terrestres ou marinhos. Esses microorganismos podem ser encontrados em circunstâncias extremas desde solos gelados da Antártica, como é o caso de *Streptomyces fildesensis*, até habitats quase inabitados como é o caso de *Streptomyces deserti*, descoberto recentemente no árido deserto do Atacama (Li *et al.*, 2011; Santhanam *et al.*, 2012).

Atualmente, contam-se milhares de publicações envolvendo o gênero *Streptomyces*, evidenciando uma ampla variedade de atividades interessantes desses representantes microbiológicos. Mais de 85% dos antibióticos naturais descobertos são provenientes dessas bactérias, além da descoberta de outras atividades como antifúngica, antimalária, antituberculósica e anticâncer (Bérdy, 2005; Euzéby 2011; Arasu *et al.*, 2012; Igarashi *et al.*, 2012; Supong *et al.*, 2012). A estreptomicina foi isolada a partir de *Streptomyces griseus* em 1943 e é um antibiótico de amplo espectro ainda bastante utilizado na clínica, inclusive no tratamento contra tuberculose (Schatz *et al.*, 1944; Hinshaw *et al.*, 1947). A citotoxicidade de substâncias isoladas de *Streptomyces* sp. é um atributo já reportado exhaustivamente na literatura. As antraciclinas, por exemplo, são uma classe de compostos consagrada na clínica e são usadas no tratamento contra diversos tipos de câncer. Alguns membros dessa família como a daunorubicina e a doxorubicina, ambas produzidas por *Streptomyces peucetius*, tiveram sua aplicação clínica como fármaco antitumoral estabelecida na década de 60 e demonstram potente atividade citotóxica, com mecanismo de ação envolvendo clivagem de DNA via topoisomerase II, além de indução de espécies reativas de oxigênio (Olano *et al.*, 2009).

Entre os estreptomicetos de ambiente marinho, a produção de substâncias citotóxicas também é amplamente conhecida, como o *Streptomyces avidinii*, isolado de sedimento marinho e



produtor de compostos citotóxicos contra linhagem de carcinoma de laringe (Sudha *et al.*, 2012). Mais recentemente, um grupo da China isolou de um *Streptomyces* sp. marinho a cromomicina B, um ácido aureólico inédito pertencente a família de antibióticos também com atividade antitumoral (Lu *et al.*, 2012).

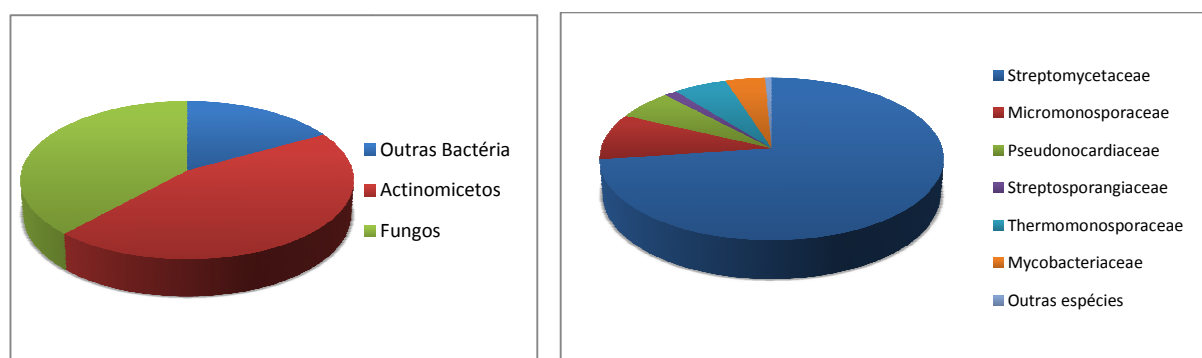


Figura 9 – Porcentagem de metabólitos bioativos isolados a partir de microorganismos e número de metabólitos bioativos produzidos por *Actinomycetales* (Adaptado de Bérdy, 2005).

Por algum tempo acreditou-se que os actinomicetos marinhos eram muito similares aos terrestres, provavelmente devido àqueles que eram levados ao mar pela água das chuvas que escoava para os oceanos. Porém, a presença constante de actinomicetos no ecossistema marinho sugere que tal fato deva ser algo mais do que mero acaso (Zotchev, 2011). Em 1975, foi isolado, por Okazaki e colaboradores, o primeiro composto bioativo, chamado de SS-228Y, a partir de um actinomiceto marinho, *Chainia purpurogena*, que apresentou atividade antibiótica.

Em 2005, Maldonado e colaboradores identificaram novas espécies de actinomicetos estritamente marinhas, *Salinispora arenicola* e *Salinispora tropica*, pertencente a família *Micromonosporaceae*, que requerem água do mar para crescer. O extrato desse microorganismo apresentou potente atividade anticâncer e, em 2003, Fenical e colaboradores identificaram a substância responsável pela a atividade, Salinosporamida A, uma  $\beta$ -lactona inédita cuja atividade citotóxica envolve a inibição seletiva da função catalítica do proteossoma. O sistema proteossoma trata-se de um complexo protéico capaz de degradar diversos tipos de proteínas intra-celulares, dentre elas proteínas indesejadas ou mal-funcionantes. Esse sistema tem participação relevante em processos celulares fundamentais, como modulação do sistema auto-imune, resposta inflamatória, regulação do ciclo celular, divisão celular e apoptose. Inclusive, o proteossoma já foi reconhecido como alvo importante na quimioterapia do câncer. Atualmente já

existem no mercado medicamentos que agem nessa via, como é o caso da bortezomida (Velcade), que inibe o proteossoma 26S e é utilizado no tratamento de mieloma múltiplo. A salinosporamida A foi um dos compostos que passaram mais rapidamente pelas fases de pesquisa e de testes, com a sua descoberta e elucidação estrutural, em 2003, até o ingresso na fase I de testes clínicos, em 2007 (Abayomi *et al.*, 2007; Maldonato, 2007; Fenical *et al.* 2008; Ande *et al.*, 2009).

Diante da importância de novas moléculas e alvos inéditos para o tratamento mais eficaz do câncer, os produtos naturais marinhos, especialmente aqueles provenientes de microorganismos, mostram-se fontes prolíficas de metabólitos secundários bioativos. O presente trabalho visou a investigação farmacológica de compostos produzidos por *Streptomyces* sp., com foco no isolamento, determinação estrutural e principalmente caracterização do mecanismo de ação em células neoplásicas. A substância bioativa isolada foi posteriormente indentificada como sendo uma ditiolpirrolona.

## OBJETIVOS

### 1. Geral:

Fracionamento bioguiado e estudo farmacológico do actinomiceto marinho *Streptomyces* sp. isolado da ascídia *Eudistoma vannamei* visando o isolamento de substâncias com potencial anticâncer.

### 2. Específicos:

- Realizar o fracionamento químico do extrato de *Streptomyces* sp. e monitorando a atividade antiproliferativa das amostras obtidas em células tumorais *in vitro*;
- Estudar o mecanismo de ação envolvido na atividade citotóxica de uma ditiolpirrolona isolada do microorganismo selecionado da ascidia *Eudistoma vannamei*.

## MATERIAIS E MÉTODOS

As especificações detalhadas dos equipamentos, reagentes e soluções utilizados encontram-se no Anexo I□.

### 1. Cultivo e obtenção do material

A partir de espécies de ascidia *Eudistoma vannamei*, coletadas no litoral do estado do Ceará, na praia da Taiba (S 03°34 125': W 038°54 469'), as bactérias foram isoladas e selecionadas em diferentes meios de cultura: SCA (amido caseína), SWA (água do mar) e TM (metais traços). Àquelas cujas características assemelhavam-se as de actinomicetos foram então isoladas e crescidas em meio A1 (amido, extrato de levedura, peptona e H<sub>2</sub>O do mar 70% qsp). Finalmente, uma cepa foi selecionada devido sua atividade biológica e identificada através do sequenciamento do rRNA 16S como pertencente ao gênero *Streptomyces* sp. Para a obtenção de material para purificação do composto ativo, a bactéria foi cultivada em meio A1 (10g amido + 4g extrato de levedura + 2g peptona, H<sub>2</sub>O qsq 1L) durante 7 dias.

### 2. Curva de crescimento

Foi feita uma curva de crescimento de *Streptomyces* sp. isolado de *Eudistoma vannamei* a fim de determinar o perfil de crescimento da bactéria. O experimento foi feito em triplicata, com 100 ml de meio A1 para cada erlenmeyer, totalizando 15 erlemeyers. As extrações foram feitas com acetato de etila (1:1) em intervalos de dois dias (0, 2, 4, 6, 8, 10). A biomassa referente a cada dia de experimento foi centrifugada, lavada com 5 ml de água destilada e centrifugada novamente durante 5 minutos, 5000 RPM. O material foi seco em estufa a 50 °C para determinação do seu peso seco. Juntamente com o estudo de crescimento cinético, foi feito a avaliação da atividade citotóxica em células HCT-8 para todos os dias de extração, a fim de analisar a atividade biológica. O ensaio utilizado para avaliar a citotoxicidade foi o MTT,

descrito no item 6. A partir deste experimento definiu-se o melhor dia para extração e isolamento dos princípios ativos do extrato.

### 3. Fracionamento Bioguiado

#### 3.1 Obtenção dos extratos brutos

A bactéria foi crescida durante 8 dias e, após 24 horas de cultivos, foram adicionados 10g da resina Amberlite® XAD 16 (Sigma)/500ml de meio de cultura A1, procedimento este realizado em 14 L de meio de cultura. O material adsorvido à resina foi extraído com acetato de etila (AcOEt 1:1). Os extratos permaneceram no agitador por 3-5 horas na presença do AcOEt e o processo foi repetido três vezes. Posteriormente, o extrato AcOEt foi evaporado em evaporador rotativo, resultando na obtenção de 371,9 mg de extrato bruto.

#### 3.2 Fracionamento do extrato AcOEt

O fracionamento bioguiado da *Streptomyces* sp. isolada de *Eudistoma vannahae* (Figura 10) foi realizado em parceria com o Departamento de Química da UFC, pelas doutorandas Thiciana Sousa e Patricia Freitas sob orientação da Profa. Dra. Otília Pessoa. O meio utilizado para o crescimento da bactéria foi o meio A1 e as extrações foram realizadas no 8º dia de crescimento através da eluição da resina XAD16 com acetato de etila (AcOEt).

O extrato obtido a partir da concentração de 14 L de AcOEt obtido da extração do meio de cultura, foi inicialmente cromatografado em Sephadex LH-20, usando como eluente DCM:AcOEt 1:1, originando cinco frações. Essas frações foram testadas em células HCT-8 e os valores de  $CI_{50}$  estão apresentados na tabela 1 do anexo II.

A fração 3 foi a mais ativa e, por isso, foi recromatografada em cartucho de sílica C-18 (SPE), obtendo-se 6 sub-frações. A sub-fração 2 mais ativa foi purificada por CLAE usando coluna RP-C18 (250 mm x 10 mm i.d. x 5 µm) no modo isocrático, usando ACN:H<sub>2</sub>O (7:3; v/v) com fluxo de 4.5 mL min<sup>-1</sup>, resultando no isolamento de um pigmento laranja.

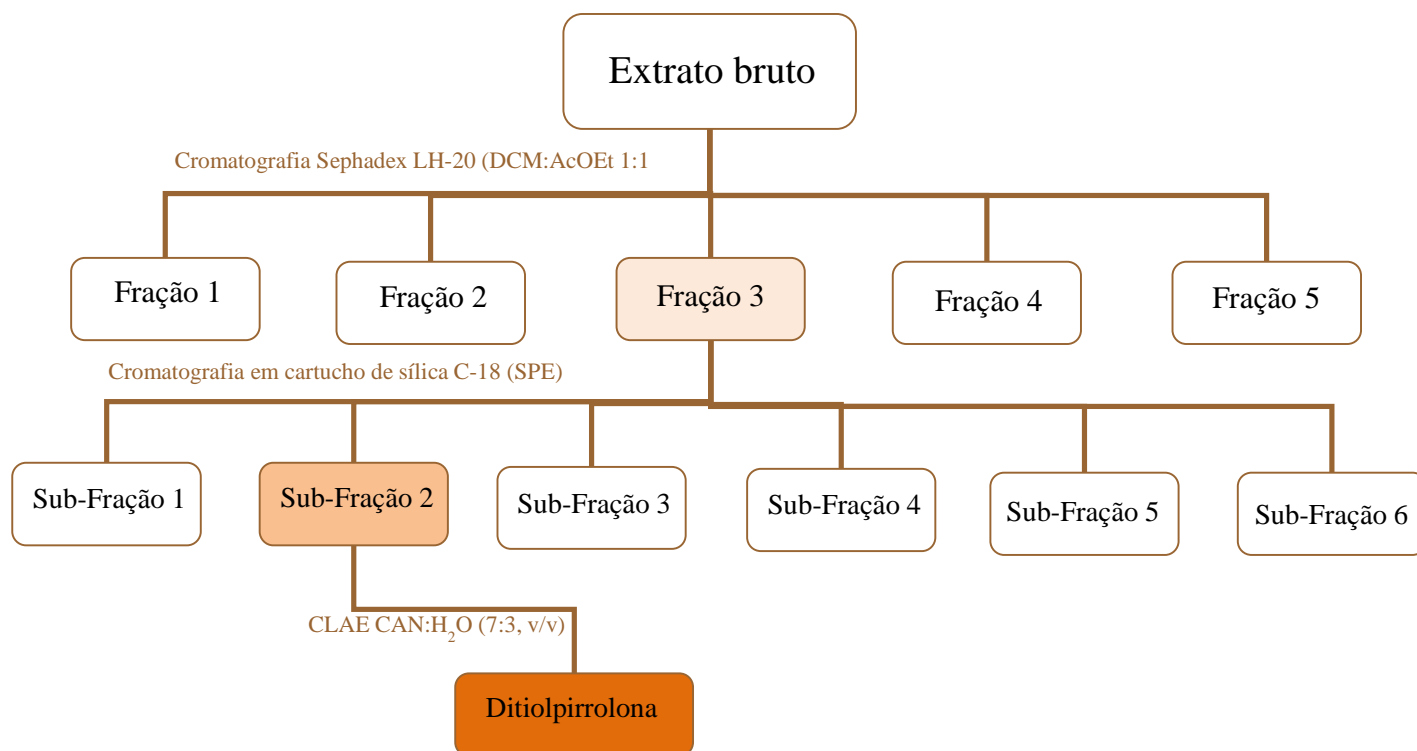


Figura 10: Fracionamento bioguiado do extrato bruto de *Streptomyces* sp. isolada de *Eudistoma vannamei*.

#### 4. Determinação estrutural

A determinação da estrutura da molécula isolada de *Streptomyces* sp. foi realizada no Laboratório de Fitoquímica de Plantas Medicinais II no Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará pela doutoranda Thiciana Sousa, sob a supervisão da Profa. Dra. Otilia Pessoa. Para a determinação estrutural foram utilizados o espectro de massas de alta resolução, obtido com ionização por *electrospray*, o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -CPD [125 MHz, piridina], o espectro de RMN  $^1\text{H}$  [500 MHz, piridina] e o espectro bidimensional HMBC.

O composto **1** isolado (97% de pureza) corresponde ao pico 3 do cromatograma da Figura 11. O composto corresponde a cristais alaranjados com as seguintes características químicas: mp 142-143°C; IR (KBr) 3131, 3065, 2962, 2754, 1648, 1576, 1305, 1270, 1108, 821

cm<sup>-1</sup>; positivo HREIMS  $m/z$  214.9949 (calcd)  $[M + H]^+$  (calcd for C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S<sub>2</sub>, 214.9949); MSMS  $m/z$  187.0008 (-CO, calcd  $m/z$  186.9999), 171.9774 (-CH<sub>2</sub>, calcd  $m/z$  171.9765).

(**1a**): <sup>1</sup>H NMR (C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, 500 MHz) δ 12.40 (1H, br s), 9.08 (1 H, s), 7.28 (1 H, s), 3.22 (3 H, s, NCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, 125 MHz) δ 170.3 (C-5), 162.9 (C-8), 141.8 (C-3a), 136.0 (C-6a), 119.9 (C-6), 110.7 (C-3), 30.3 (C-9). (**1b**): <sup>1</sup>H NMR (C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, 500 MHz) δ 12.22 (1H, br s), 8.22 (1 H, s), 7.18 (1 H, s), 3.59 (3 H, s, NCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, 125 MHz) δ 170.3 (C-5), 162.3 (C-8), 143.0 (C-3a), 136.0 (C-6a), 117.3 (C-6), 110.7 (C-3), 34.2 (C-9).

A estrutura correspondente ao composto está apresentada na Figura 12 e mais detalhes do isolamento encontram-se no Anexo II. Esse metabólito secundário, que pertence a classe das pirrotinas, foi previamente isolado de *Streptomyces* sp, por Daehne (1969).

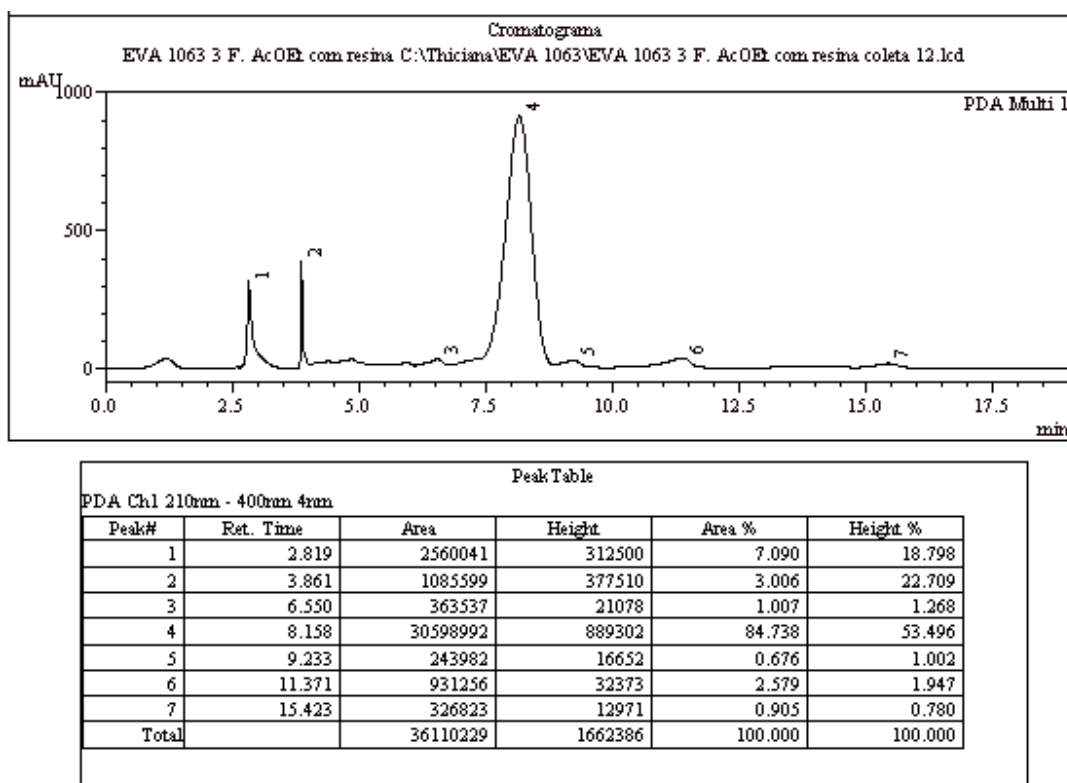


Figura 11: Cromatograma da sub-fração 1 isolada de *Streptomyces* sp.

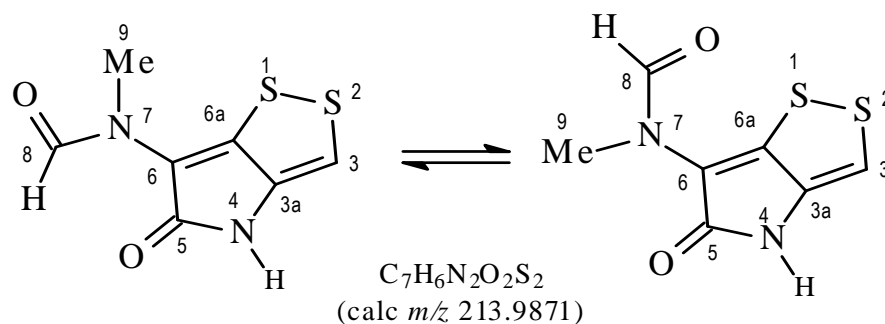


Figura 12 – Estrutura da ditiopirrolona N-(4,5-dihidro-5-oxo-1,2-ditiolo[4,3-b]pirrol-6-il)-N-metil-formamida isolada a partir do extrato acetato do actinomiceto *Streptomyces* sp., coletado da ascídia *Eudistoma vannamei*.

## 5. Cultivo das células

Nesse trabalho foram utilizadas seis linhagens celulares descritas Tabela 4. As células foram cultivadas em frascos plásticos para cultura (Corning, 25 cm<sup>2</sup>, volume de 50 mL para células aderidas e 75 cm<sup>2</sup>, volume de 250 mL para células em suspensão), utilizando o meio de cultura RPMI 1640 complementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (100UI penicilina/100µg/ml estreptomicina). As células foram mantidas em estufa a 37 °C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e 95 % de umidade, seguido da observação do crescimento celular com auxílio de microscópio invertido diariamente.

Tabela 4- Linhagens celulares tumorais utilizadas nos ensaios de citotoxicidade *in vitro*.

Linhagem Celular	Procedência	Tipo Histológico do Câncer/Origem	Concentração de Plaqueamento (cels/mL)
HCT-116	ATCC	Carcinoma de cólon	5 x 10 <sup>4</sup>
HCT-8	ATCC	Carcinoma de cólon	5 x 10 <sup>4</sup>
OVCAR-8	NCI-USA	Carcinoma ovariano	5 x 10 <sup>4</sup>
NCI H358	NCI-USA	Carcinoma bronqueo alveolar	1 x 10 <sup>5</sup>
PC-3M	NCI-USA	Carcinoma prostático metastático	5 x 10 <sup>4</sup>
HL-60	NCI-USA	Leucemia promielocítica	5 x 10 <sup>4</sup>
SF-295	NCI-USA	Glioblastoma	5 x 10 <sup>4</sup>



## 6. Avaliação da atividade citotóxica em células tumorais *in vitro* – MTT

O método do MTT consiste em uma análise colorimétrica indireta, baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H brometo de tetrazólio (MTT), de cor amarela, para o formazan, composto de cor azul-arroxeadada. Essa conversão do MTT em formazan ocorre apenas em células viáveis e metabolicamente ativas, através da ação da enzima succinil-desidrogenase presente nas mitocôndrias, desta forma a quantificação indireta da porcentagem de células vivas pode ser mensurada por espectrofotômetro e a partir desses dados, calcula-se a  $CI_{50}$ .

### Procedimento experimental

As células foram plaqueadas em placas de 96 poços e tratadas com a ditiolpirrolona durante 72 horas, em concentrações variando de 0,016 a 5  $\mu$ M, sob as mesmas condições de cultivo já descritas. Três horas antes do fim do tempo de incubação o sobrenadante foi descartado e, em seguida, em cada poço foi adicionado 150  $\mu$ L da solução de MTT 10% em meio RPMI 1640, e novamente incubada por 3 horas. Após esse período o sobrenadante foi descartado, permanecendo somente o precipitado azul de formazan. Esse precipitado foi então ressuspenso em 150  $\mu$ L de DMSO e agitado por cerca de 10 minutos até sua completa dissolução. As absorbâncias foram medidas no espectrofotômetro de placa, no comprimento de onda de 595 nm.

### Análise dos dados

As amostras foram testados em diluição seriada, em duplicata, e suas  $CI_{50}$  (concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo) e respectivos intervalos de confiança de 95% (IC 95%) foram determinados a partir de regressão não-linear utilizando o programa Prism versão 4.0 (GraphPad Software).

## **7. Avaliação da atividade antiproliferativa através da exclusão por azul de Tripan**

Este ensaio consistiu em avaliar a cinética de crescimento de células PC-3M tratadas com a ditiolpirrolona em estudo e assim poder avaliar o efeito antiproliferativo desta substância após 24 e 48 horas de incubação.

O ensaio com azul de Tripan permite a distinção individual das células viáveis das não-viáveis, onde o corante penetra em todas as células, porém somente as células viáveis conseguem bombear o azul de Tripan para fora, fazendo com que as células mortas apresentem uma coloração azulada.

### **Procedimento experimental**

Células PC-3M foram plaqueadas em placas de 24 poços, na concentração de  $5 \times 10^4$  células/mL, e incubadas com ditiolpirrolona nas concentrações de 1; 2,5 ; 5,0 e 10  $\mu\text{M}$ . A estaurosporina (0,5  $\mu\text{M}$ ) foi utilizada como controle positivo. Após o período de incubação, foi retirada uma alíquota de 90  $\mu\text{L}$  da suspensão de células e adicionado a 10  $\mu\text{L}$  do azul de Tripan. Em seguida uma alíquota de 10  $\mu\text{L}$  foi colocada em uma câmara de Neubauer e as células puderam ser diferenciadas entre viáveis e não viáveis, e contadas.

### **Análise dos dados**

O número de células contadas em cada experimento foi expresso como a média  $\pm$  erro padrão da média de três experimentos independentes. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os grupos, os dados em triplicata foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Dunnet, com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

## **8. Análise morfológica - Coloração por May-Grunwald-Giemsa e determinação do Índice mitótico**

A coloração por May-Grunwald-Giemsa baseia-se em interações eletrostáticas entre os corantes e moléculas-alvo. Ela possui azul de metileno (corante básico), eosina (corante ácido), entre outros componentes básicos que permitem distinguir o citoplasma e o núcleo, sendo possível analisar morfológicamente a célula quanto a sua integridade nuclear, bem como alterações no citoplasma.

Com o propósito de quantificar e verificar diferenças no número de figuras mitóticas induzidas pela ditiolpirrolona em células PC-3M, foi feita a contagem do índice mitótico utilizando as lamínas coradas por May-Grunwald-Giemsa. Células com um núcleo bem definido, formato alongado ou triangular e sem condensação de DNA, foram consideradas em interfase. Já as células arredondadas, com DNA condensado ou mais de um núcleo, foram consideradas figuras mitóticas. Células em processo mitótico foram contadas e agrupadas em suas respectivas fases da mitose: prófase, metáfase, anáfase e telófase.

### **Procedimento experimental**

Células PC-3M foram plaqueadas em placas de 24 poços, na concentração de  $5 \times 10^4$  células/mL, e incubadas por 24 e 48 horas com a ditiolpirrolona nas concentrações de 1; 2,5; 5,0 e 10  $\mu\text{M}$ . O controle negativo foi tratado apenas do DMSO e a estaurosporina (0,5  $\mu\text{M}$ ) foi usada como controle positivo. Para observar a morfologia das células, lâminas foram preparadas e coradas com May-Grunwald, por 10 segundos, seguido de Giemsa por 10 segundos. As lamínas prontas foram fixadas e montadas com balsamo do Canadá.

### **Análise dos dados**

Para avaliação da morfologia celular, as lâminas coradas foram levadas ao microscópio e comparadas ao controle negativo. O registro das alterações celulares foi feito através de fotografias com um aumento de 400X.

Para determinação do índice mitótico, foram contadas 1000 células por lâmina em duplicata. Os dados foram comparados pelo teste do qui-quadrado, com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ) a fim de verificar diferenças significativas entre os grupo.

## **9. Determinação da Integridade da Membrana por citometria de fluxo**

A citometria de fluxo é uma técnica versátil e pode ser utilizada na investigação de inúmeras alterações e características de eventos biológicos. O citômetro possui um feixe de luz (*laser*) e um detector que é capaz de distinguir o desvio da luz causado pelas células que o atravessam. As alterações morfológicas das células podem ser quantificadas através da análise das alterações no espalhamento frontal (FSC), que está relacionado ao tamanho relativo entre as células em conjunto com as alterações no espalhamento lateral ou *side scatter* (SSC) que está relacionado com a complexidade interna, ou granulosidade relativa entre as células. As células com tamanho reduzido em relação ao grupo controle negativo estabelecido pela população sem tratamento são consideradas apoptóticas.

É comum a utilização de corantes que se ligam a moléculas específicas e, quando excitados pelo laser, emitem fluorescência vermelha capaz de ser detectada pelo citômetro, como é o caso do iodeto de propídio que se ligam ao DNA. Para determinação da integridade de membrana utilizou-se iodeto de propídio. Este método consiste na capacidade dos corantes de se ligarem ao DNA de células cuja membrana plasmática esteja rompida, como nos casos de apoptose tardia e necrose, emitindo uma alta fluorescência quando excitado pelo laser. Nas células cuja membrana permanece íntegra (células viáveis), o iodeto de propídio não consegue penetrar e, portanto emite uma fluorescência mais baixa, com isso as células vivas podem ser diferenciadas das não viáveis.

### **Procedimento Experimental**

Células PC-3M foram plaqueadas em placas de 24 poços, na concentração de  $5 \times 10^4$  células/mL, e incubadas por 24 e 48 horas com a ditiolpirrolona nas concentrações de 1; 2,5; 5,0 e 10,0  $\mu\text{M}$  e comparadas ao controle negativo. A estaurosporina (0.5  $\mu\text{M}$ ) foi usada como controle positivo. Após o período de incubação uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  da suspensão de células

foi transferida para um tubo de microcentrífuga de 1,5ml e incubada por mais 30 minutos com 10  $\mu$ L de iodeto de propídio (50  $\mu$ g/mL). Em seguida, as amostras foram analisadas em citômetro de fluxo (EasyCyte da Guava Technologies). As células da população padrão foram selecionada através de um *gate*, a saber, “Gated cells”, e analisadas quanto ao tamanho (FSC – *Forward scatter*) e granulosidade (SSC – *Side scatter*).

### **Análise dos dados**

Em cada experimento foram contados 10000 eventos. Os dados foram expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em triplicata. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Dunnet, com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

## **10. Avaliação do tipo de morte celular via potencial Transmembrânico de Mitocôndria e viabilidade de membrana**

A mitocôndria tem um papel central da via de apoptose intrínseca. Em condições normais, há uma diferença de cargas na face interna e externa da membrana mitocôndrial que faz com que se estabeleça um gradiente elétrico essencial para a realização de suas funções. A formação de poros na membrana externa da mitocôndria permite a saída de fatores pró-apoptóticos, tais como citocromo c, que irá contribuir para o desdobramento de rotas apoptóticas. Através destes poros também ocorre um efluxo de íons  $H^+$ , induzindo uma alteração no potencial transmembrânico da mitocôndria. A rodamina 123, um corante fluorescente nucleofílico, é seqüestrado para dentro da mitocôndria quando esta apresenta seu potencial transmembrânico inalterado. Assim, as células viáveis emitirão alta fluorescência verde devido à maior quantidade de rodamina ligada às cargas positivas internas enquanto que as mitocôndrias das células apoptóticas terão menos afinidade pelo corante, gerando eventos que emitirão menor fluorescência. Como descrito anteriormente no item 9, através da utilização de corantes que se ligam ao DNA, como o iodeto de propídeo (PI), pode-se traçar o perfil da integridade da membrana plasmática da célula. Sendo assim, células com alta fluorescência verde e baixa

florescência vermelha caracterizam células viáveis, enquanto que àquelas que apresentam baixa fluorescência verde e vermelha caracterizam células apoptóticas. A apoptose tardia e a necrose são caracterizadas pelo aumento de fluorescência vermelha (PI), podendo ser diferenciadas através da fluorescência verde, baixa em apoptose tardia e alta em necrose. É possível então, através de dupla marcação com esse corantes, unir essas informações e investigar o perfil de morte celular como sendo, apoptose, apoptose tardia ou necrose.

### **Procedimento Experimental**

Células PC-3M foram plaqueadas em placas de 24 poços, na concentração de  $5 \times 10^4$  células/mL, e incubadas por 24 e 48 horas com a ditiolpirrolona nas concentrações de 1; 2,5; 5 e 10  $\mu\text{M}$  e comparadas ao controle negativo (C-). A estaurosporina (0.5  $\mu\text{M}$ ) foi usada como controle positivo. Após o período de incubação uma alíquota de 50  $\mu\text{L}$  da suspensão de células foi transferida para um tubo eppendorf e incubada por mais 15 minutos com 200  $\mu\text{L}$  de uma solução de rodamina 123 (1  $\mu\text{g/mL}$  em álcool), na ausência de luz e a 37 °C. Após o período de incubação as células foram centrifugadas e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi ressuspenso em solução de PI (50  $\mu\text{g/mL}$ ), e reincubado por mais 30 minutos e analisadas por citometria de fluxo (EasyCyte da Guava Technologies).

### **Análise dos dados**

Em cada experimento foram contados 5000 eventos. Os dados foram expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em triplicata. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Dunnet, com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

## **11.Avaliação do ciclo celular**

Esse método consiste na capacidade do iodeto de propídeo (PI) se ligar ao DNA das células, cuja membrana plasmática foi primeiramente lisada por um detergente para permitir a entrada do corante no núcleo. O ciclo celular é constituído pelas seguintes fases: G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> e M.

Durante o período de crescimento celular (fase  $G_1$ ) uma célula diplóide apresenta um conteúdo  $2n$  ( $n$  – conteúdo de um conjunto haplóide de cromossomos) em DNA nuclear. Durante a fase S ocorre a duplicação do genoma nuclear ( $2-4n$ ) e na fase seguinte (fase  $G_2$ ) ocorre o segundo período de crescimento celular, durante o qual o conteúdo em DNA nuclear é mantido no nível  $4n$ . Em seguida ocorre a mitose (fase M,  $4n$ ) na qual a célula se divide, originando duas células filhas, cada uma com um conteúdo  $2n$  em DNA. As células que não se encontram em divisão celular ( $G_0$ ) apresentam um conteúdo  $2n$  em DNA. Assim, as diferentes fases do ciclo celular podem ser determinadas a partir do conteúdo de DNA que elas apresentam (Fischer *et al.*, 2004; Foster, 2008).

Quando as células se apresentam com a cromatina condensada e/ou DNA fragmentado (sub- $G_1$ ), a quantidade de PI incorporada é menor, e, portanto emitem uma fluorescência mais baixa.

### **Procedimento Experimental**

Células PC-3M foram plaqueadas em placas de 24 poços, na concentração de  $5 \times 10^4$  células/mL, e incubadas por 24 e 48 horas com a ditiolpirrolona nas concentrações de 1; 2,5; 5 e 10  $\mu\text{M}$  e comparadas ao controle negativo (C-). A estaurosporina (0.5  $\mu\text{M}$ ) foi usada como controle positivo. Após o período de incubação uma alíquota de 50  $\mu\text{L}$  da suspensão de células foi transferida para um tubo eppendorf e incubada por mais 30 minutos com 100  $\mu\text{L}$  de uma solução de lise contendo PI (50  $\mu\text{g/mL}$ ), Triton X-100 (0,1%) e citrato de sódio (0,1%). Em seguida as amostras foram analisadas em citômetro de fluxo (EasyCyte da Guava Technologies), onde foram obtidas histogramas representando a quantidade de células em cada fase do ciclo celular ( $G_1$ , S e  $G_2/M$ ) e a quantidade de células com DNA fragmentado.

### **Análise dos dados**

Em cada experimento foram contados 10000 eventos. Os dados foram expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em triplicata. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos,

os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Dunnet, com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

## 12. Análise do citoesqueleto - Microscopia Confocal

O microscópio confocal de fluorescência por varredura a laser capta fluorescência para a aquisição das imagens. A fluorescência é um tipo de emissão de luz na qual um corpo absorve luz e após um curto intervalo de tempo emite essa luz. Compostos químicos chamados fluoróforos ou fluorocromos são usados para produzir a fluorescência do material em estudo.

A grande vantagem da microscopia confocal é a possibilidade de se obter luz exclusivamente a partir de um único plano, onde um orifício, chamado “*pinhole*”, consegue separar apenas a luz proveniente do ponto focado, impedindo assim que a luz refletida/emitada por outros pontos fora de foco chegue até o detector.

O microscópio de varredura a laser varre a amostra sequencialmente ponto a ponto e linha a linha em diferentes planos focais da amostra, gerando imagens com alto contraste e alta resolução nos eixos X, Y e Z. Todas essas informações são então processadas por um computador e assim imagens tridimensionais podem ser geradas e manipuladas digitalmente.

### Procedimento experimental

Células PC-3M foram plaqueadas sobre lamínulas, em placas de 6 poços na densidade de  $5 \times 10^4$  células/mL. A ditiolpirrolona foi incubada por 24 e 48 h, nas concentrações de 1 e 5  $\mu\text{M}$ , em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  e 95 % de umidade.

Após o período de incubação, o meio foi retirado, as células foram lavadas com PBS, fixadas em paraformaldeído (4,7 % em PBS) e, em seguida, permeabilizadas com Triton X-100 (0,25 % em PBS). Após esses procedimentos, as células foram incubadas com marcadores específicos para actina (faloidina/Alexa Fluor® 488) e tubulina (Anti  $\alpha$ -Tubulina/Alexa Fluor® 643) (Molecular Probes, Life Technologies Corporation). O núcleo foi corado com DAPI e após extensas lavagens com PBS o material foi montado sobre lamínulas utilizando VectaShield e analisados em microscópio confocal LSM 710 (Carl Zeiss).



### 13. Detecção de proteínas - Western blot

*Western blot* é uma técnica utilizada para detectar uma determinada proteína em uma amostra. Neste estudo, esta metodologia foi utilizada para verificar a expressão aumentada ou diminuída de proteínas-chave associadas ao ciclo celular e a vias de sinalização celular relacionadas à citocinese.

O protocolo de *western blot* é realizado em diversas etapas onde constam: a extração e posterior quantificação de proteínas totais das células submetidas a cada tratamento, a separação das proteínas desnaturadas de acordo com o peso molecular em eletroforese vertical de poliacrilamida, a eletrotransferência das proteínas na disposição em que separaram no gel para uma membrana com capacidade de ligar proteínas e a detecção da proteína específica através de sondas do anticorpo respectivo, que será posteriormente revelado de modo colorimétrico, baseado na reação da enzima fosfatase alcalina sobre o substrato NBT/BCIP produzindo um precipitado púrpura que marca a membrana (adaptado do método original de Towbin *et al.*, 1979).

Para os experimentos de *western blot* foram empregados os seguintes anticorpos primários: ciclina A e ciclina B1, RhoA, Prc1, Plk-1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.); ciclina D2, ciclina E2, ciclina H, Chk1, Chk2, Cdk1, Cdk2 (Cell Signalling). A marcação com  $\beta$ -actina (Abcam) foi usada como controle positivo. Os anticorpos secundários anti-mouse IGg (Cell Signalling) ou anti-rabbit IGg (Cell Signalling) ligados à enzima fosfatase alcalina foram utilizados na etapa de detecção.

#### Extração de proteínas

Células PC-3M tratadas com DMSO, estaurosporina, ditiolpirrolona (1 e 5  $\mu$ M) foram incubadas por 24 e 48 horas antes da extração de proteínas totais. Inicialmente, as células foram lavadas 2 vezes com PBS e foi adicionado o tampão RIPA Lysis Buffer (Sigma). As células foram deixadas em gelo por 40 minutos, homogeneizando as amostras a cada 20 minutos. Foi utilizada a proporção aproximada de 1mL de tampão RIPA completo para cada  $10^7$  células/mL. Ao final da incubação, as amostras foram centrifugadas (Hettich, modelo Rotina 380) a 5000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado, aliquoteado e armazenado a -70°C.

### **Quantificação de proteínas**

A quantificação do extrato total de proteínas foi realizada por método colorimétrico similar à dosagem proposta por Lowry *et al.*, 1951, valendo-se do kit DC Protein Assay (BioRad Laboratories) e executado como descrito pelo fabricante em microplacas de 96 cavidades. Uma curva padrão com BSA (0,2 – 2mg; Sigma) diluído em tampão RIPA completo foi preparada para a calibração do método. O tampão RIPA foi utilizado para marcar o branco experimental. Em seguida, 5 $\mu$ L de cada amostra foi plaqueado em duplicatas e adicionado 25 $\mu$ L do reagente A' (20 $\mu$ L do reagente S para cada 1mL do reagente A) seguido por 200 $\mu$ L do reagente B. As amostras foram incubadas por 10 minutos, sob agitação leve e lidas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 620nm.

A concentração de proteínas em cada amostra foi determinada a partir da curva gerada pelo BSA, tendo sido plotado o gráfico absorbância vs. quantidade de proteínas. A curva foi gerada a partir de regressão linear no programa GraphPad Prism 4.0 e os valores de absorbância obtidos para cada amostra foram substituídos na equação da curva para determinar as respectivas concentrações de proteína dos tratamentos.

### **Eletroforese em gel de poliacrilamida**

Para a separação das proteínas do extrato total baseado no peso molecular, as amostras foram submetidas à eletroforese vertical em gel de poliacrilamida descontínuo (Laemmli, 1970, com modificações). Após a montagem do sistema vertical (Amershan Biosciences, modelo miniVE completo) o gel de resolução foi confeccionado para uma concentração final de 12,5% ou 7,5% de poliacrilamida em tampão Tris-HCl 1,5M, pH 8,8. O gel de concentração foi montado sobre este, com 5% de poliacrilamida em tampão Tris-HCl 0,5M, pH 6,8.

De cada amostra, 15 $\mu$ g de proteína total carregada com o tampão Blue Juice 5X (5:1 v/v; Invitrogen) foi aplicado nos poços do gel de concentração 12,5%. O marcador de peso molecular Full-Range Rainbow Marker (12 – 225 kDa; GE Healthcare) foi usado sempre no primeiro poço à esquerda e no 5º poço da esquerda para direita para monitorar a separação das proteínas. A corrida eletroforética foi realizada a uma voltagem constante de 100 V e 30 mA

(para duas placas; fonte elétrica Amershan Biosciences, modelo ES301) à temperatura ambiente, utilizando o tampão de corrida para eletroforese. O tempo de corrida foi de 2h.

### **Eletrotransferência**

As proteínas separadas foram transferidas para membrana de PVDF Hybond-P (GE Healthcare). Para tanto, o gel foi colocado em contato com a membrana previamente lavada em MeOH entre esponjas e papéis de filtro banhados na solução de transferência. A eletrotransferência foi realizada pelo modo de imersão (Amershan Bioscience, blot module para miniVE) à voltagem constante de 100 V e 300 mA por 1h20 a 4 °C (fonte elétrica Amershan Biosciences, modelo ES301).

### **Imunodeteção**

Após a transferência, as membranas foram bloqueadas por 1h em solução de NFDM 5% em TBS. Em seguida, foram lavadas (3 vezes, 10 minutos cada lavagem) com TBS-Tween 0,1% (TBS-T) e incubadas sob agitação *overnight* a 4 °C com o anticorpo primário diluído em solução de BSA 5% 1:1000, em TBS-T. Após lavagem com TBS-T (3 vezes, 10 minutos cada lavagem), as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário (1:2000) acoplado à enzima fosfatase alcalina diluído em solução de NFDM 2,5% em TBS-T por 2h, sob agitação. Após lavagem com TBS-T (3 vezes, 10 minutos cada lavagem) em seguida, as membranas foram reveladas com NBT (0,33mg/mL; Sigma) e BCIP (0,168mg/mL; Usb Corporation). A reação foi suprimida com banho da membrana em água destilada.

### **Análise dos dados**

A documentação das membranas reveladas foi realizada em captador de imagens (GE Healthcare, modelo ImageQuant® 300) utilizando, para aquisição e edição, o programa ImageQuant® 300 (GE Healthcare).

O fluxograma de desenvolvimento deste trabalho está ilustrado na Figura 13.

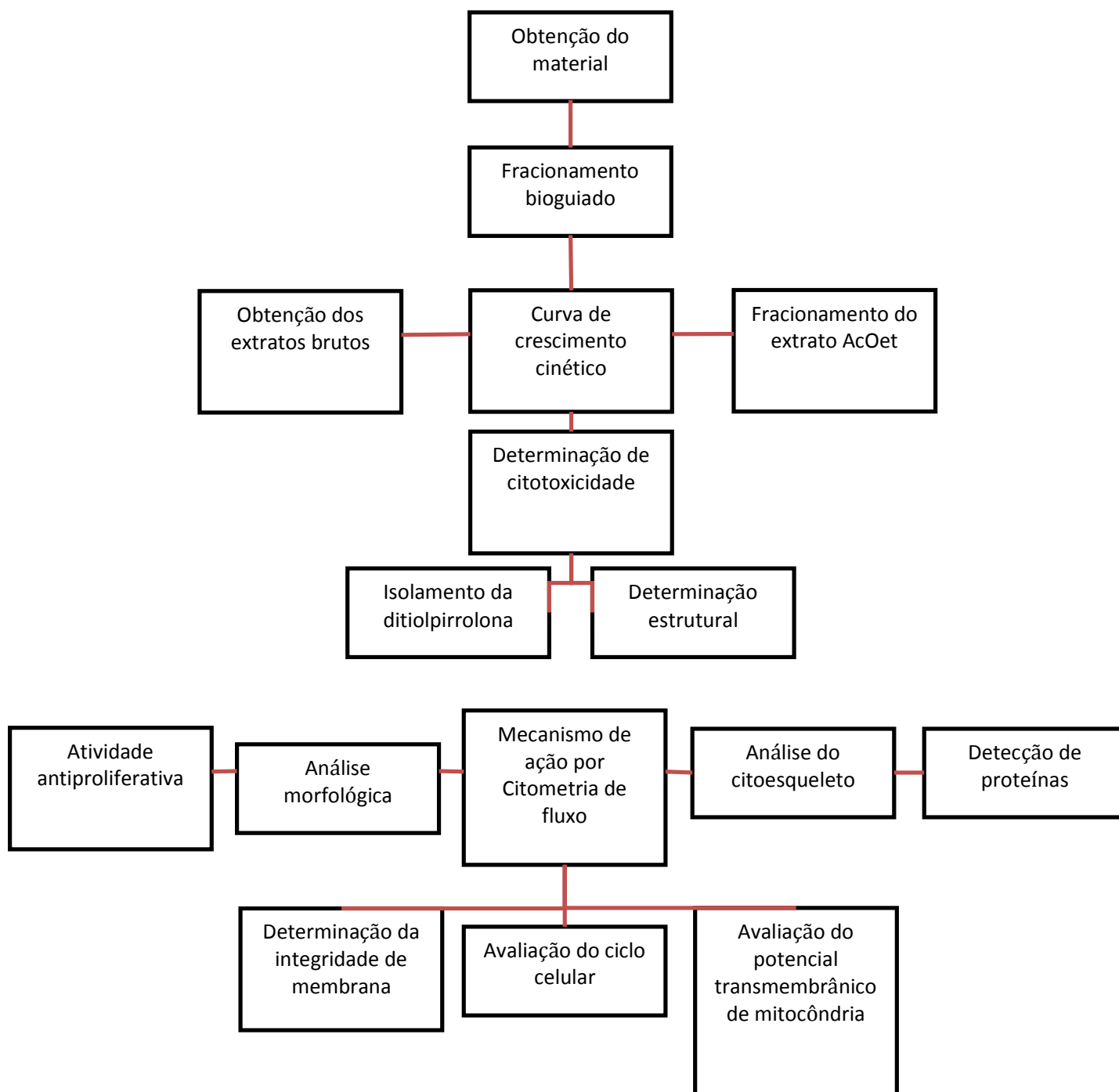


Figura 13 – Fluxograma esquemático do trabalho

## RESULTADOS

### 1. Curva de crescimento cinético

Inicialmente, realizou-se um estudo do crescimento da bactéria *Streptomyces* sp. em condições de cultura no laboratório para determinação do tempo ótimo de crescimento para isolamento do(s) princípio(s) ativo(s) (Figura 14). Observa-se a fase de crescimento exponencial ocorrendo do dia 0 ao dia 4. A partir daí, entre os dias 4 e 6, observa-se um platô que poderia ser descrito como fase estacionária, seguindo então com a diminuição da biomassa do sexto dia ao décimo dia de experimento. A linha pontilhada representa os valores de  $CI_{50}$  ( $\mu\text{g/ml}$ ) obtidos pelo ensaio do MTT (Tabela 5). Pode-se observar uma redução no valor da  $CI_{50}$  com o decorrer dos dias, ou seja, um aumento de citotoxicidade, que parece se estabilizar a partir do oitavo dia de experimento. O menor valor de  $CI_{50}$  foi no dia 8 (1,78  $\mu\text{g/ml}$ ) e, por isso, as demais extrações foram realizadas nesse dia. O estudo químico do extrato da bactéria levou ao isolamento de uma ditiolpirrolona como descrito na secção de material e métodos, este estudo foi realizado pelo grupo da Prof. Dr. Otilia Pessoa do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da UFC.

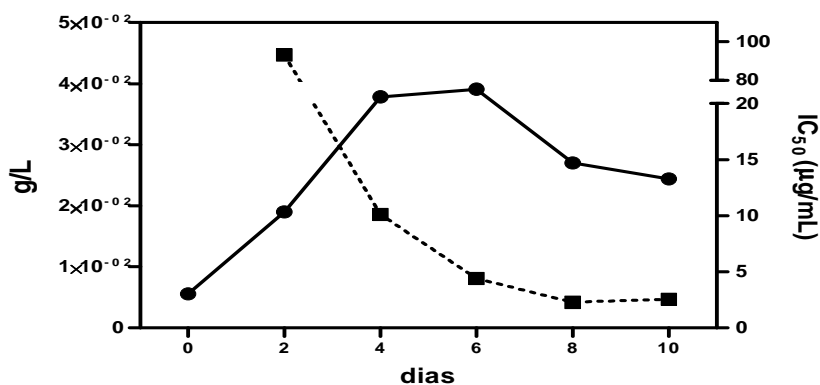


Figura 14 – Curva de crescimento de *Streptomyces* sp. (linha contínua) em g/L versus atividade citotóxica do extrato bruto (linha pontilhada) através dos valores de  $CI_{50}$  ( $\mu\text{g/ml}$ ) em células HCT-8 com 72 horas de incubação.

Tabela 5 – Valores de  $CI_{50}$  ( $\mu\text{g/ml}$ ) da curva de crescimento de *Streptomyces* sp. em células HCT-8 com 72 horas de incubação

$CI_{50}$ 72h					
Dias	2	4	6	8	10
$\mu\text{g/ml}$	>50	9,9 9,15 - 10,7	3,34 2,2 - 5,06	1,78 1,42 - 2,25	2,69 1,78 - 4,07

## 2. Estudo de citotoxicidade e viabilidade celular *in vitro*

A ditiolpirrolona isolada do extrato de *Streptomyces* sp. apresentou-se citotóxica frente as linhagens testadas. Os valores de  $CI_{50}$  foram determinados através do ensaio do MTT e variaram de 1,05 a 6,39  $\mu$ M, após 72 horas de incubação, sendo bastante ativa para as linhagens de próstata metastática (PC-3M) e carcinoma de ovário (OVCAR-8) (Tabela 6). A linhagem PC-3M foi escolhida para o prosseguimento do estudo da atividade da ditiolpirrolona por ser uma linhagem de alta incidência e violenta devido sua capacidade metastática. Além disso, a ditiolpirrolona mostrou-se bastante cototóxica para essa linhagem.

Tabela 6 –  $CI_{50}$  da ditiolpirrolona isolada a partir do extrato de *Streptomyces* sp. avaliada em linhagens tumorais pelo tese de MTT. Os resultados apresentados como valores de  $CI_{50}$  tem intervalo de confiança de 95% de confiança determinados por regressão não linear pelo programa GraphPad Prism 5.0.

<b>Linhagem celular</b>	<b>PC-3M</b>	<b>HCT-116</b>	<b>OVCAR-8</b>	<b>NCI H358</b>	<b>HL-60</b>	<b>SF-295</b>
<b><math>\mu</math>g/ml</b>	0,356 0,24 – 0,53	0,490 0,44 – 0,54	0,226 0,18 – 0,27	0,447 0,42 – 0,48	1,369 0,78 – 2,38	0,327 0,23 – 0,45
<b><math>\mu</math>M</b>	1,66 1,1 – 2,47	4,67 2,06 – 5,5	1,05 0,87 – 1,27	2,1 1,9 – 2,2	6,39 3,66 – 11,1	1,52 1,09 – 2,12

A fim de avaliar o efeito da ditiolpirrolona na viabilidade e no número de células, foi realizado o ensaio do azul de Tripán com 24 e 48 horas de incubação nas concentrações de 1; 2,5; 5 e 10  $\mu$ M (Figura 15), em PC-3M. O controle positivo utilizado a foi a estaurosporina (0,5  $\mu$ M). De acordo com os experimentos, a ditiolpirrolona diminui o número de células viáveis de maneira concentração dependente, a partir da concentração de 1  $\mu$ M. Esse efeito mostrou-se intensificado com o aumento do tempo de tratamento (48h). No entanto, o número de células não viáveis não sofreu alteração significativa, com exceção da concentração de 10  $\mu$ M, com 24 de incubação, que aumentou significativamente.

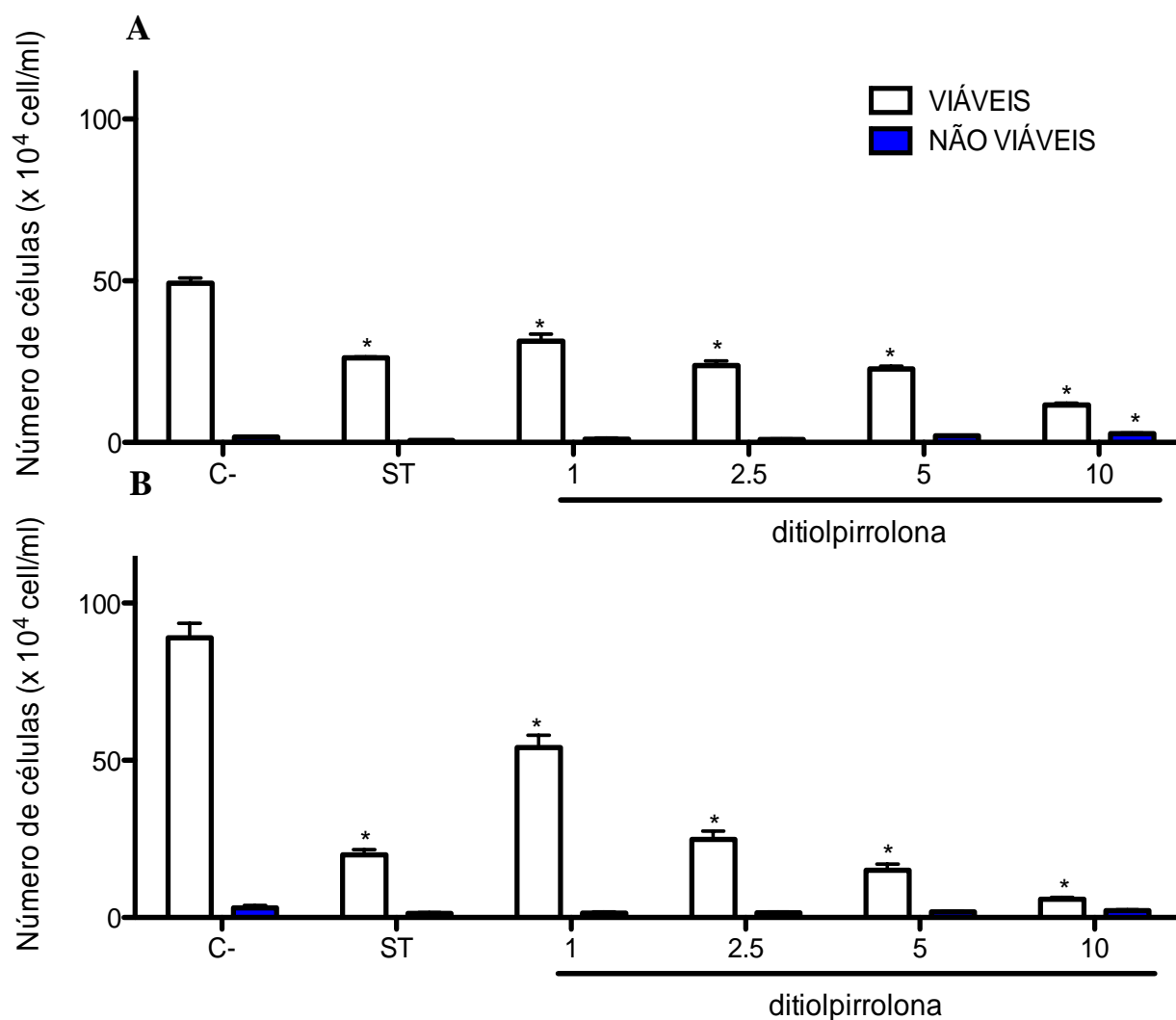


Figura 15 – Efeito da ditiolpirrolona na viabilidade de células PC-3M determinado por exclusão de azul de tripan após 24 (A) e 48 (B) horas de incubação. O controle negativo (C-) foi tratado apenas com o veículo utilizado para a diluição da substância (DMSO 1,6 %). A estaurosporina (ST), 0,5  $\mu$ M foi utilizada como controle positivo. As barras brancas correspondem ao número de células viáveis e as barras azuis correspondem ao número de células não-viáveis. Os dados correspondem a média  $\pm$  E.P.M. de experimentos independentes (n = 3). \* p < 0,001 comparado ao controle por ANOVA seguido por Student Newman-Keuls test.

### **3. Análise morfológica e índice mitótico - Coloração por May-Grunwald-Giemsa.**

As alterações morfológicas foram avaliadas através da coloração por May-Grunwald-Giemsa em células PC-3M, com 24 e 48 horas de tratamento com a ditiolpirrolona nas concentrações de 1; 2,5; 5 e 10  $\mu\text{M}$ .

As células de carcinoma prostático normalmente são grandes e apresentam prologamentos, ramificações do citoplasma, o que resulta em um formato alongado ou triangular. Elas contêm um único núcleo bem definido, como pode ser observado no controle negativo (C-) das Figuras 16 e 17, caracterizando morfologia normal para essa linhagem. A grande parte das células tratadas com a estaurosporina (ST 0,5 $\mu\text{M}$ ) apresentaram, em grande número, mais de um núcleo por célula, além de algumas figuras mitóticas, nos dois tempos de incubação. Houve também é a diminuição do número de células, que se intensificou após 48 horas de tratamento.

Quando tratadas com a ditiolpirrolona, as células apresentaram um significativo aumento do número de figuras mitóticas em todas as concentrações, com 24 e 48 horas de incubação (Figura 13 e 14). Além disso, algumas células exibiram variação do número de núcleos, algumas vezes com até mais de 3. Acrescido a isso, houve uma diminuição da quantidade de células de maneira concentração dependente. Com o aumento do tempo de tratamento para 48 horas, ainda haviam figuras mitóticas, porém a grande maioria das células tratadas exibiam anormalidade na quantidade de núcleos. Na concentração de 10  $\mu\text{M}$ , com 48 horas de incubação, pode-se perceber grande diminuição na quantidade de células (Figura 14).



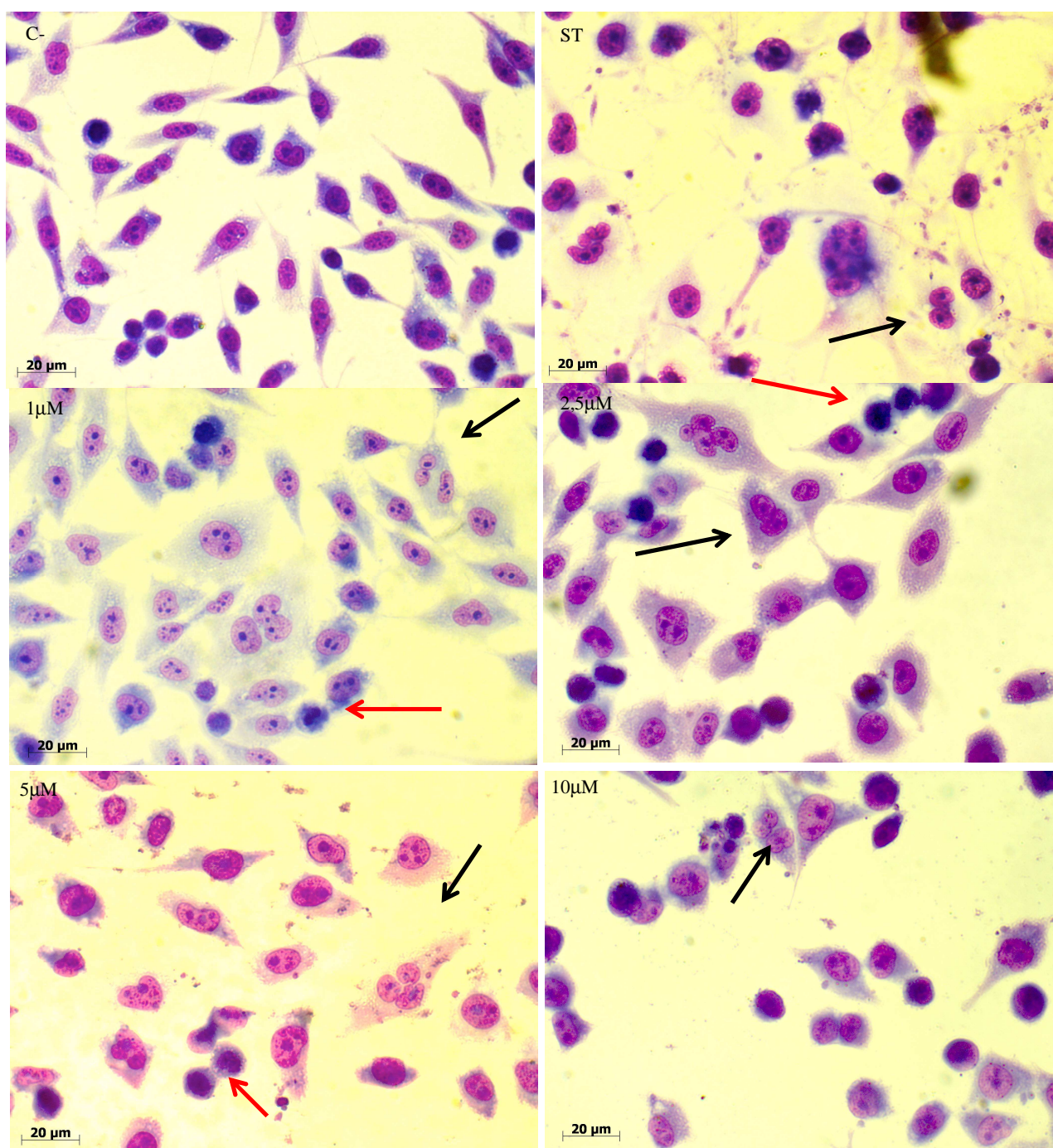


Figura 16 – Morfologia de células da linhagem PC-3M após 24h de incubação com ditolpirrolona, coradas por May-Grunwald-Giemsa e visualizadas por microscopia óptica. As células do controle negativo (C-) foram tratadas com o veículo utilizado para a diluição da substância (DMSO 1,6 %), a estaurosporina (0,5  $\mu$ M) foi utilizada como controle positivo e a ditolpirrolona foi utilizada nas concentrações de 1; 2,5; 5 e 10  $\mu$ M. Aumento = 400x. As setas pretas evidenciam células polinucleadas e as setas vermelhas evidenciam figuras mitóticas.

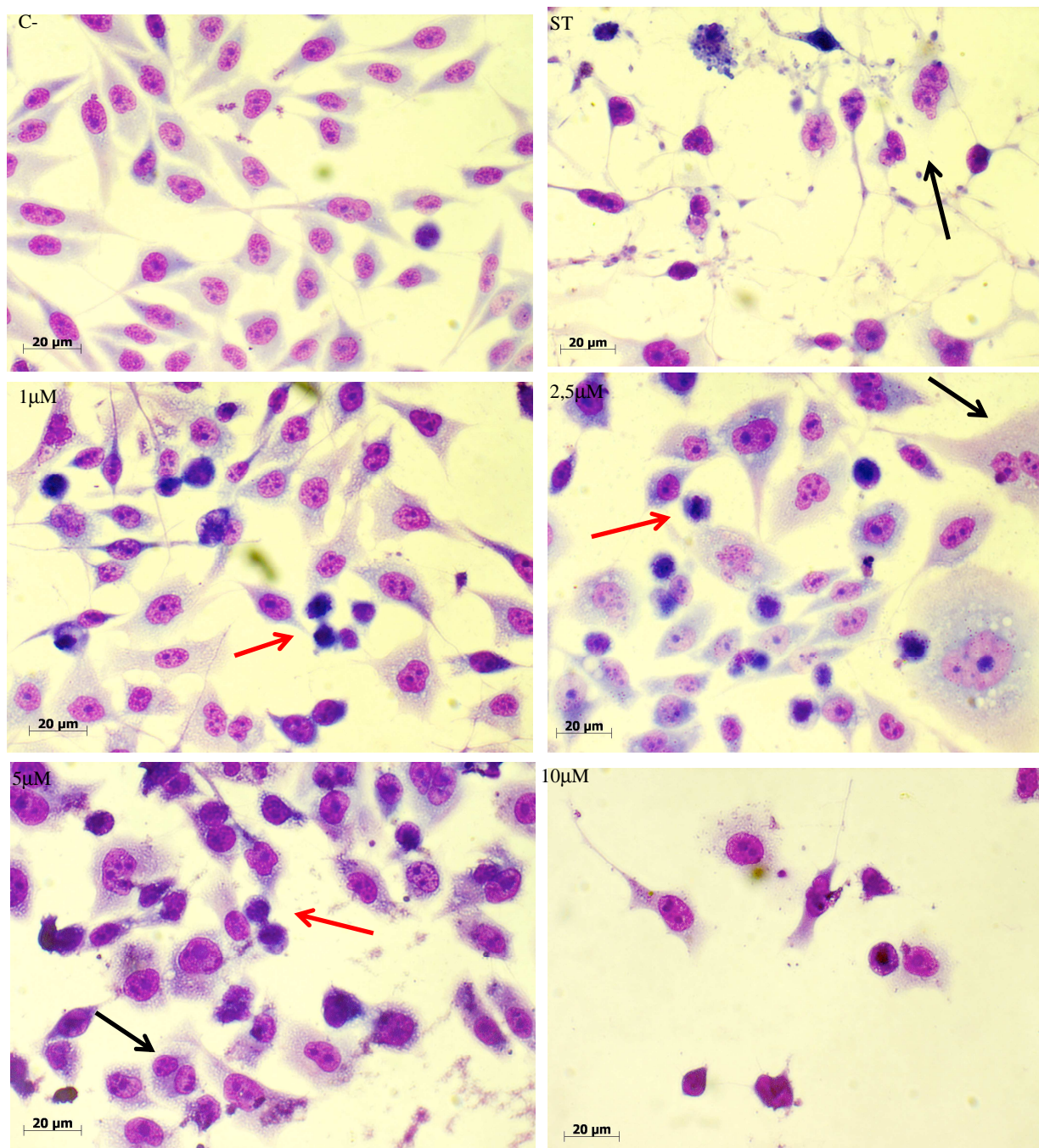


Figura 17 – Morfologia de células da linhagem PC-3M após 48h de incubação com ditolpirrolona, coradas por May-Grunwald-Giemsa e visualizadas por microscopia óptica. As células do controle negativo (C-) foram tratadas com o veículo utilizado para a diluição da substância (DMSO 1,6 %), a estaurosporina (0,5 μM) foi utilizada como controle positivo e a ditolpirrolona foi utilizada nas concentrações de 1; 2,5; 5 e 10 μM. Aumento = 400x. As setas pretas evidenciam células polinucleadas e as setas vermelhas evidenciam figuras mitóticas.



Os dados obtidos a partir da contagem do índice mitótico mostram claramente um aumento no número de figuras mitóticas em todas as concentrações avaliadas (Figura 18), com 24 e 48 h de tratamento. Na contagem diferencial das fases da mitose observa-se principalmente um aumento no número de células em prófase e em telófase. Além de um notável aumento do número de células poliplóides com 48 horas de tratamento. A estaurosporina (0,5  $\mu\text{M}$ ) foi utilizada como controle positivo. No tempo de 48 horas não foi possível contar as células tratadas com 5  $\mu\text{M}$ , pois o número de células mortas já era muito grande.

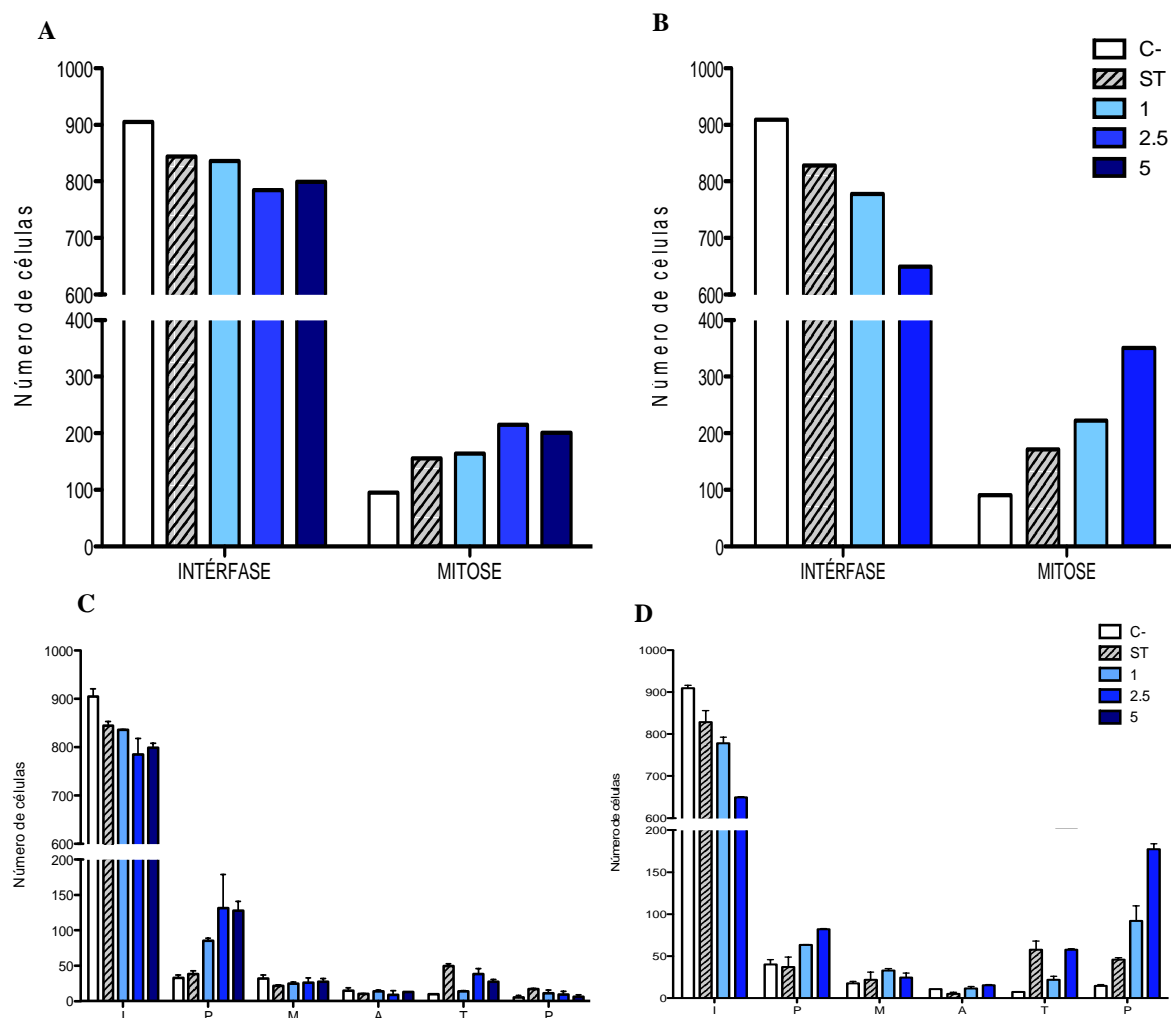


Figura 18 – Efeito da ditiolpirrolona no índice mitótico de células PC-3M nas concentrações de 2,5; 5; e 10  $\mu\text{M}$  da ditiolpirrolona, após 24 (A e C) e 48 (B e D) h de incubação. O controle negativo (C) foi tratado apenas com o veículo utilizado para a diluição da substância (DMSO 1,6 %) e a estaurosporina (0,5  $\mu\text{M}$ ) foi utilizada como controle positivo. Foram contadas 1000 células para cada tratamento.

## 4. Estudos do Mecanismo de ação.

### 4.1 Morfologia e Integridade de Membrana por citometria de fluxo.

O número de células e a integridade de membrana foram determinados por citometria de fluxo utilizando o corante PI. As células PC-3M foram tratadas por 24 e 48 horas com 1; 2,5; 5; e 10  $\mu\text{M}$  da ditiolpirrolona. A estaurosporina (0,5  $\mu\text{M}$ ) foi usada como controle positivo. Como pode ser observado na Figura 19, não houve alteração significativa da integridade de membrana com 24 horas de tratamento. Com 48 de incubação a ditiolpirrolona diminuiu significativamente a integridade da membrana de maneira concentração dependente a partir da concentração de 2,5  $\mu\text{M}$ . A estaurosporina 0,5  $\mu\text{M}$  não alterou a integridade de membrana em nenhum dos tempos testados, entretanto.

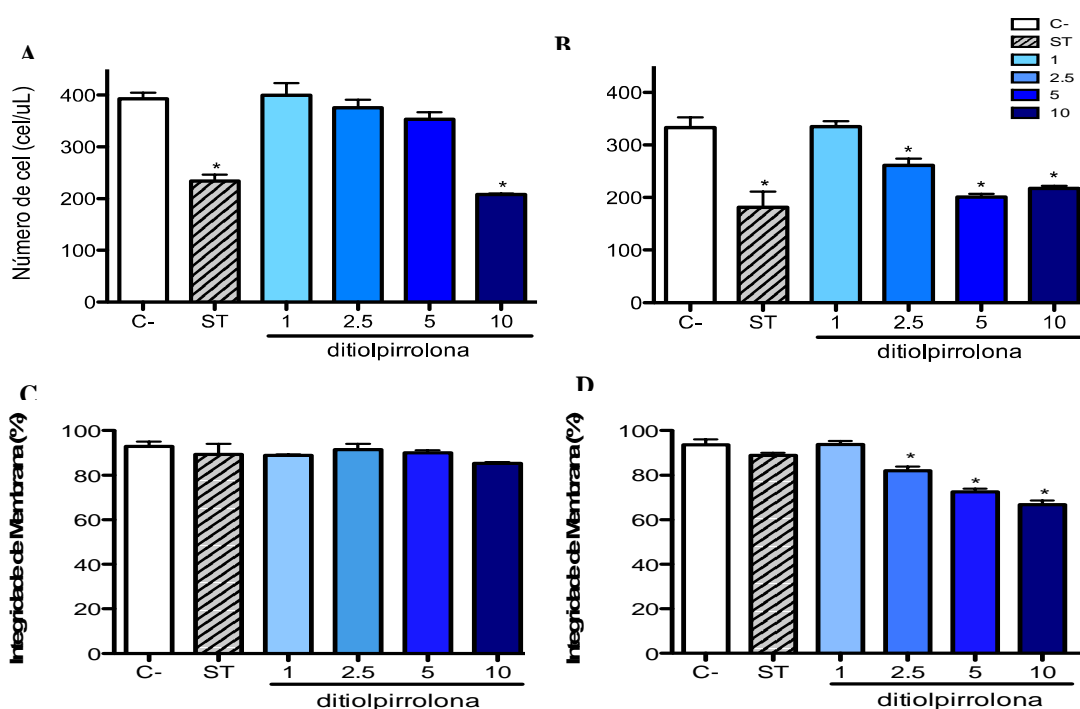


Figura 19 – Número de células e avaliação da integridade de membrana em células de PC-3M nas concentrações de 1; 2,5; 5; e 10  $\mu\text{M}$  da ditiolpirrolona, após 24 (A e C) e 48 (B e D) h de incubação. O controle negativo (C-) foi tratado apenas com o veículo utilizado para a diluição da substância (DMSO 1,6 %) e a estaurosporina (ST) (0,5  $\mu\text{M}$ ) foi utilizada como controle positivo. A análise foi realizada por citometria de fluxo com 10000 eventos, utilizando PI. Os dados estão apresentados com os valores de média  $\pm$  erro E.P.M. de experimentos independentes (n = 3). \* p < 0,05 comparado com o controle por ANOVA seguido por Student Newman-Keuls.

A morfologia celular foi analisada por citometria de fluxo utilizando o iodeto de propídeo (PI) e os parâmetros de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC). As células PC-3M foram tratadas por 24 e 48 horas com 1; 2,5; 5; e 10  $\mu\text{M}$  da ditiolpirrolona. A estaurosporina (0,5  $\mu\text{M}$ ) foi usada como controle positivo. Como mostrado na Figura 20, a maior parte da população de células encontra-se dentro do “gate” no controle negativo, mais de 90%. Quando foram tratadas com estaurosporina houve um deslocamento da população de células para esquerda e para baixo, e esse efeito se intensificou com 48 de tratamento. As células foram então incubadas com as concentrações de ditiolpirrolona e houve também deslocamento da população para a esquerda e para baixo do gráfico de maneira concentração dependente, ou seja, diminuição do FSC e do SSC.

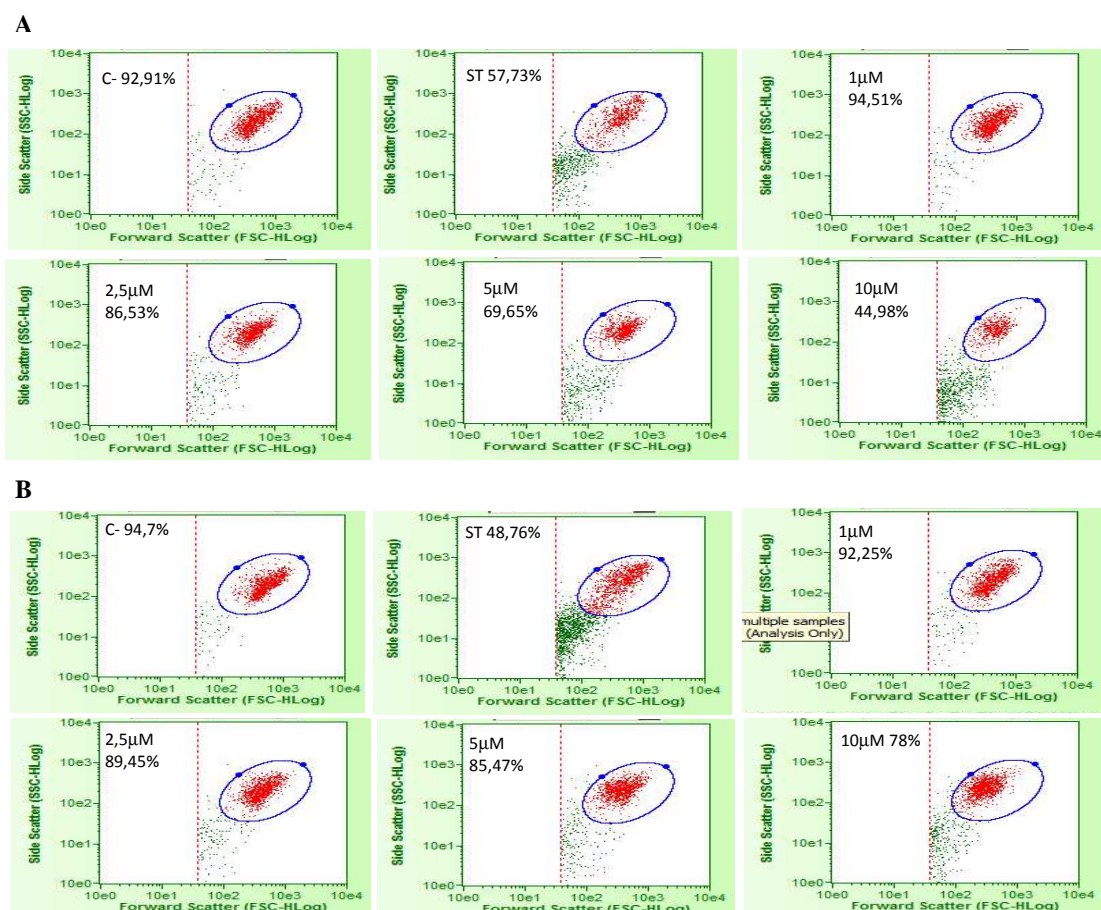


Figura 20 – Avaliação morfológica por citometria de fluxo em células de PC-3M nas concentrações de 1; 2,5; 5; e 10  $\mu\text{M}$  da ditiolpirrolona, após 24 e 48 h de incubação. O controle negativo (C-) foi tratado apenas com o veículo utilizado para a diluição da substância (DMSO 1,6 %) e estaurosporina (0,5  $\mu\text{M}$ ) foi utilizada como controle positivo. O experimento foi realizado por citometria de fluxo, utilizando PI.

## 4.2 Avaliação do tipo de morte celular via potencial Transmembrânico de Mitocôndria ( $\Delta\Psi_m$ ).

O tratamento com ditiolpirrolona em células PC-3M alterou significativamente o potencial transmembrana mitocondrial, aumentando a despolarização com 24 e 48 horas de incubação, exceto nas concentrações de 1 e 2,5 $\mu$ M, no menor tempo (Figura 21).

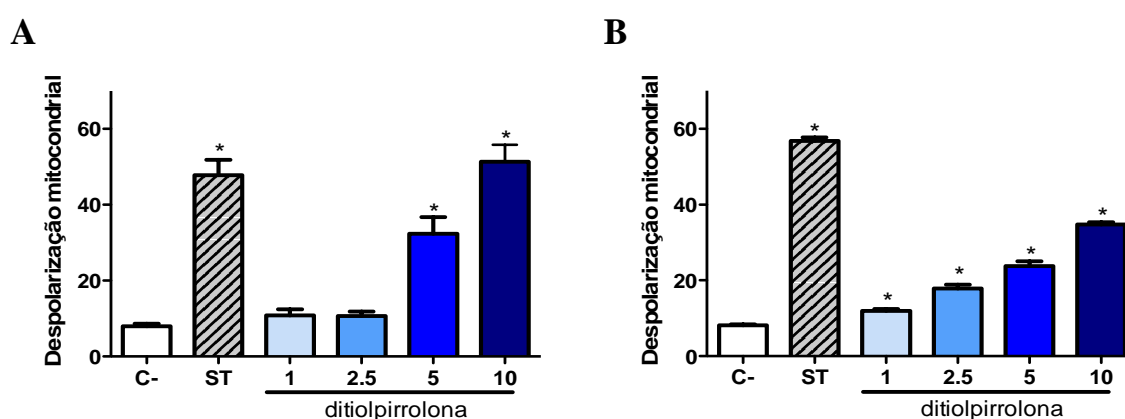


Figura 21 – Avaliação do potencial transmembrana mitocondrial em células de PC-3M nas concentrações de 1; 2,5; 5; e 10  $\mu$ M da ditiolpirrolona, após 24 (A) e 48 (B) h de incubação. O controle negativo (C-) foi tratado apenas com o veículo utilizado para a diluição da substância (DMSO 1,6 %) a estaurosporina (ST) (0,5  $\mu$ M) foi utilizada como controle positivo. A análise foi realizada por citometria de fluxo com 5000 eventos, utilizando PI e rodamina 123. Os dados estão apresentados com os valores de média  $\pm$  erro E.P.M. de experimentos independentes (n = 3). \* p < 0,05 comparado com o controle por ANOVA seguido por Student Newman-Keuls.

A dupla marcação com PI e rodamina123 (Figura 22) mostrou que houve diminuição significativa do número de células viáveis em todos os tratamentos, com 24 e 48 horas de incubação, exceto com 1 $\mu$ M de diolpirrolona em 48 horas. A estaurosporina induziu o aumento de apoptose nos dois tempos de tratamento e de apoptose tardia apenas com 48 horas de incubação. O tratamento com a ditiolpirrolona induziu o aumento de morte celular, principalmente de apoptose tardia. Na menor concentração (1 $\mu$ M), houve apenas aumento de apoptose com 48 horas de tratamento. Já na concentração 2,5 $\mu$ M houve aumento de apoptose e de apoptose tardia com 48 horas de incubação. Com 5 $\mu$ M e 10 $\mu$ M de ditiolpirrolona, houve aumento nos três tipos de morte avaliados: apoptose, apoptose tardia e necrose, com 24 e 48 horas de incubação, mostrando alta citotoxicidade.

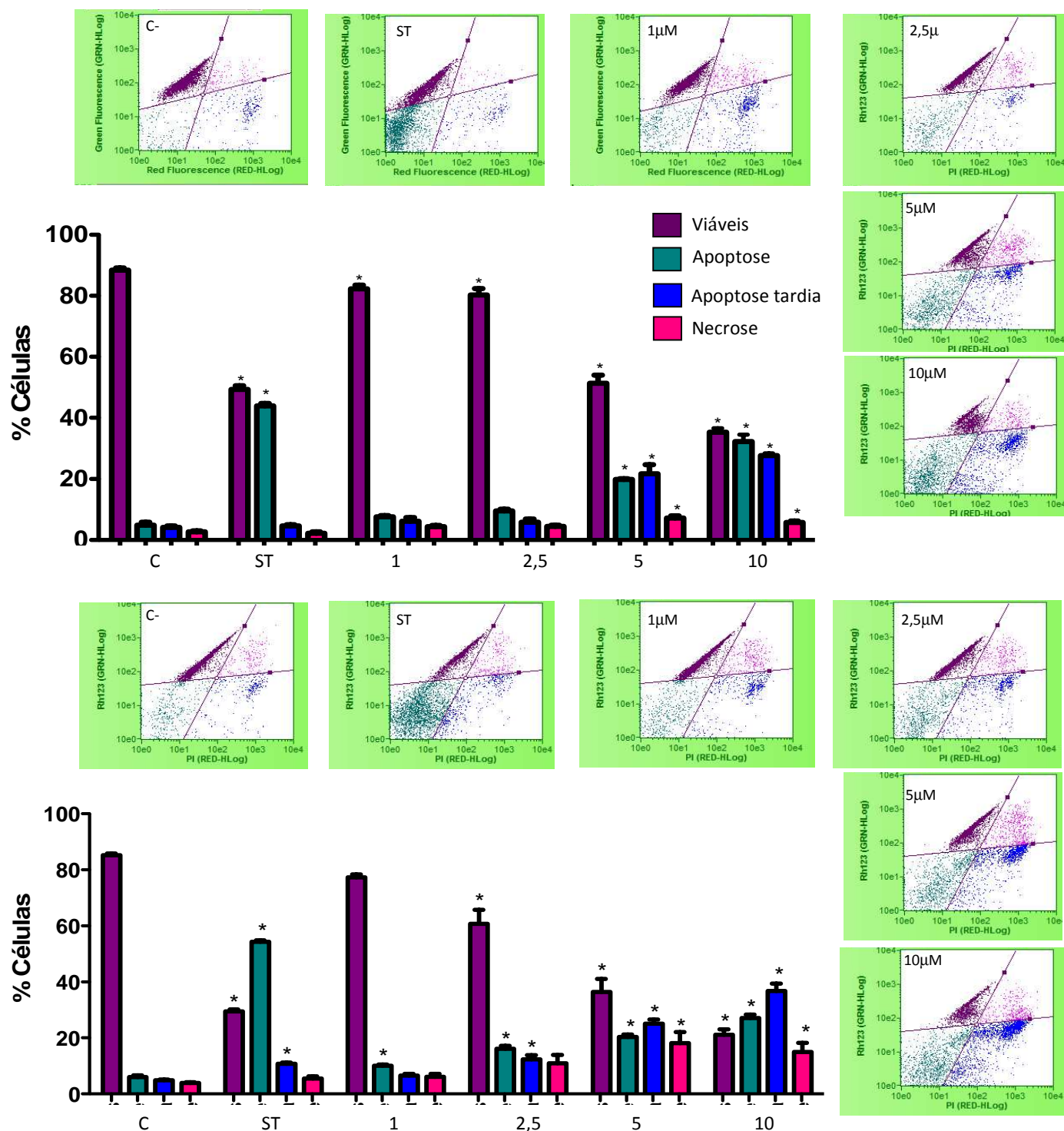


Figura 22 – Avaliação do tipo de morte utilizando dupla marcação com PI e rodamina123 em células de PC-3M nas concentrações de 1; 2,5; 5; e 10  $\mu\text{M}$  da ditiolpirrolona, após 24 (A) e 48 (B) h de incubação. O controle negativo (C-) foi tratado apenas com o veículo utilizado para a diluição da substância (DMSO 1,6 %) e estaurosporina (0,5  $\mu\text{M}$ ) foi utilizada como controle positivo.

### 4.3 Avaliação do ciclo celular.

Para determinar se a ditiolpirrolona (1; 2,5; 5 e 10  $\mu\text{M}$ ) induz alterações na progressão do ciclo celular, células PC-3M foram avaliadas por citometria de fluxo, utilizando o iodeto de propídeo (PI), com 24 e 48 horas de incubação (Figura 23 e 24).

Com 24 horas de incubação, houve diminuição da quantidade de células em G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> e aumento da porcentagem de células em S, exceto na menor concentração. Apenas a concentração de 5  $\mu\text{M}$  de ditiolpirrolona foi capaz de alterar o percentual de células em G<sub>2</sub>/M. Observa-se também aumento significativo de fragmentação celular (Figuras 23, B) nas duas maiores concentrações (5 e 10  $\mu\text{M}$ ). O percentual de células poliploides não sofreu alteração significativa com o tratamento com a ditiolpirrolona (Figura 23, C).

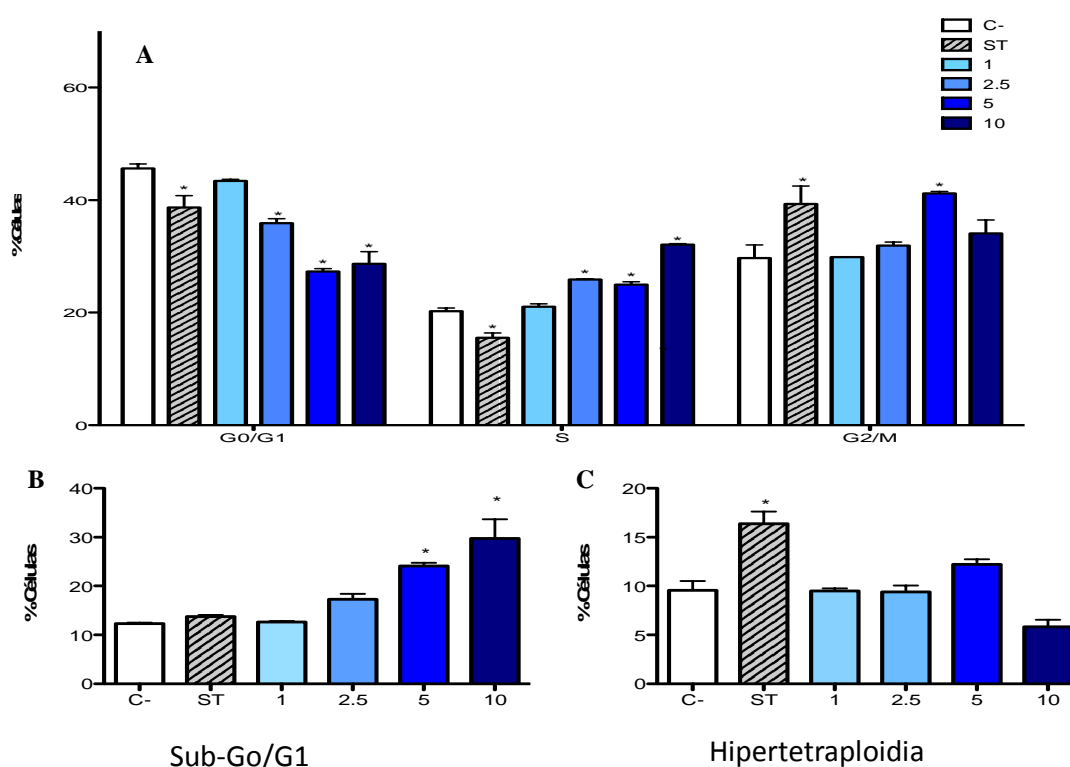


Figura 23 – (A) Análise do ciclo celular em células PC-3M nas concentrações de 1; 2,5; 5; e 10  $\mu\text{M}$  da ditiolpirrolona, após 24 horas de tratamento (B) Fragmentação celular (C) Poliploidia. O controle negativo (C-) foi tratado apenas com o veículo utilizado para a diluição da substância (DMSO 1,6 %) a staurosporina (ST) (0,5  $\mu\text{M}$ ) foi utilizada como controle positivo. A análise foi realizada por citometria de fluxo com 10000 eventos, utilizando PI. Os dados estão apresentados com os valores de média  $\pm$  erro E.P.M. de experimentos independentes (n = 3). \* p < 0,05 comparado com o controle por ANOVA seguido por Student Newman-Keuls.



Com 48 horas de tratamento o efeito foi semelhante ao tratamento de 24 horas, porém mais acentuado, em relação a G0/G1 e S, com diminuição do percentual de células em G0/G1 e aumento em S, com exceção da concentração de 1  $\mu\text{M}$ . Em relação ao G2/M, apenas a menor concentração não alterou significativamente o percentual de células, ao passo que todas as outras induziram aumento do percentual de células em G2/M. Somente as concentrações de 5 e 10  $\mu\text{M}$  induziram aumento de fragmentação com 48 horas de incubação (Figura 24, B). A ditiolpirrolona induziu também o aumento do percentual de células poliplóides com 2,5; 5 e 10  $\mu\text{M}$  (Figura 24, C).

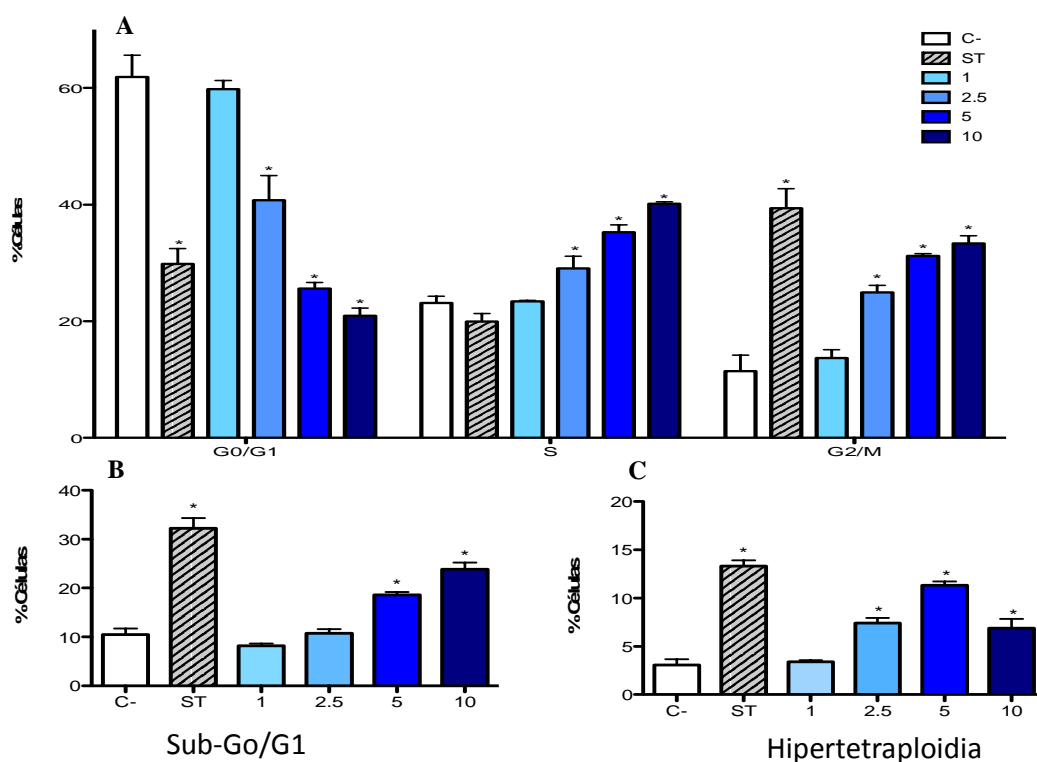


Figura 24 – (A) Análise do ciclo celular em células PC-3M nas concentrações de 1; 2,5; 5; e 10  $\mu\text{M}$  da ditiolpirrolona, após 48 horas de tratamento (B) Fragmentação celular (C) Poliploidia. O controle negativo (C-) foi tratado apenas com o veículo utilizado para a diluição da substância (DMSO 1,6 %) a estaurosporina (ST) (0,5  $\mu\text{M}$ ) foi utilizada como controle positivo. A análise foi realizada por citometria de fluxo com 10000 eventos, utilizando PI. Os dados estão apresentados com os valores de média  $\pm$  erro E.P.M. de experimentos independentes (n = 3). \* p < 0,05 comparado com o controle por ANOVA seguido por Student Newman-Keuls.

#### **4.4 Microscopia confocal.**

Com o intuito de avaliar se as alterações observadas anteriormente no ciclo celular são de caráter estrutural ou bioquímico, foi feita a análise das células PC-3M através da microscopia confocal. Os marcadores utilizados (DAPI, Anti  $\alpha$ -tubulin e faloidina) permitiram a distinção do núcleo, da actina e da tubulina. A tubulina é uma proteína indispensável para a manutenção da forma da célula, pois participa da composição do citoesqueleto. Além disso, ela é a proteína que compõe o fuso mitótico, que participam da separação dos cromossomos durante a divisão celular. Sendo assim, alterações na tubulina podem levar a defeitos no ciclo celular.

As análises por microscopia confocal, mostradas nas Figuras 25 e 26, mostraram figuras mitóticas e células polinucleadas, característica já observada nos experimentos anteriores, porém a actina e a tubulina encontram-se bem organizadas e espalhadas normalmente por toda a célula, não apresentando nenhuma alteração quando comparada com o controle negativo. A estaurosporina, usada como controle positivo, apresentou alterações na actina e no formato da célula. Com 24 horas de incubação, na menor concentração, pode-se observar figuras mitóticas (quadrado branco) e o aumento do número de núcleos. Nas concentrações de 2,5 e 5  $\mu$ M, além de células polinucleadas, é possível notar uma diminuição da densidade celular. Em 48 horas de tratamento, as figuras mitóticas persistem e há a ocorrência de células grandes com vários núcleos.

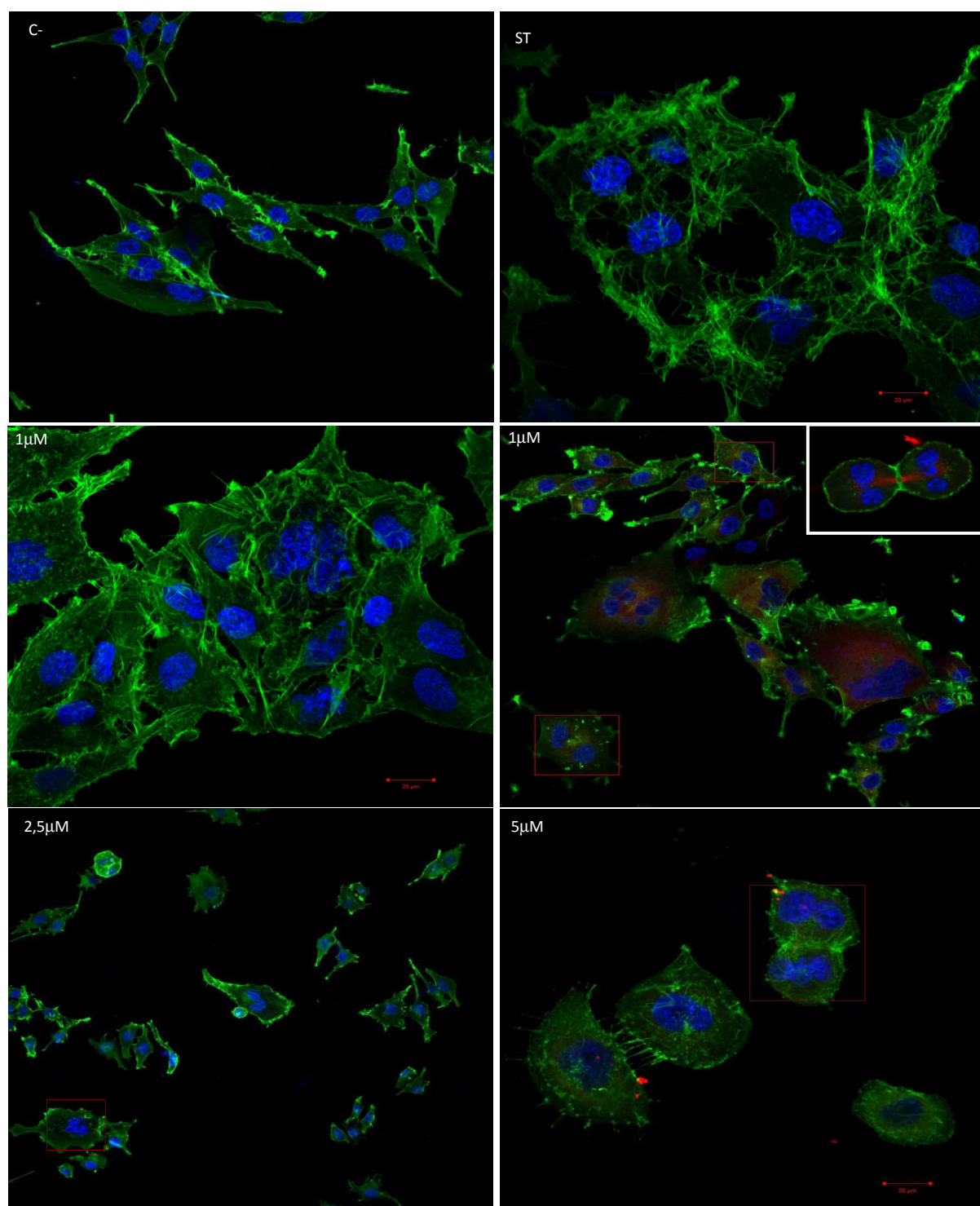


Figura 25 – Análise por microscopia confocal de células PC-3M sem tratamento (C-) e tratadas com 1; 2,5 e 5μM de ditiopirrolona com 24 horas de incubação. A estaurosporina (ST) (0,5 μM) foi utilizada como controle positivo. Observa-se em azul o DNA, corado por DAPI, em verde a actina corada por faloidina, em vermelho a tubulina. O quadrado evidencia uma célula em divisão e os quadrados vermelhos mostram células polinucleadas.

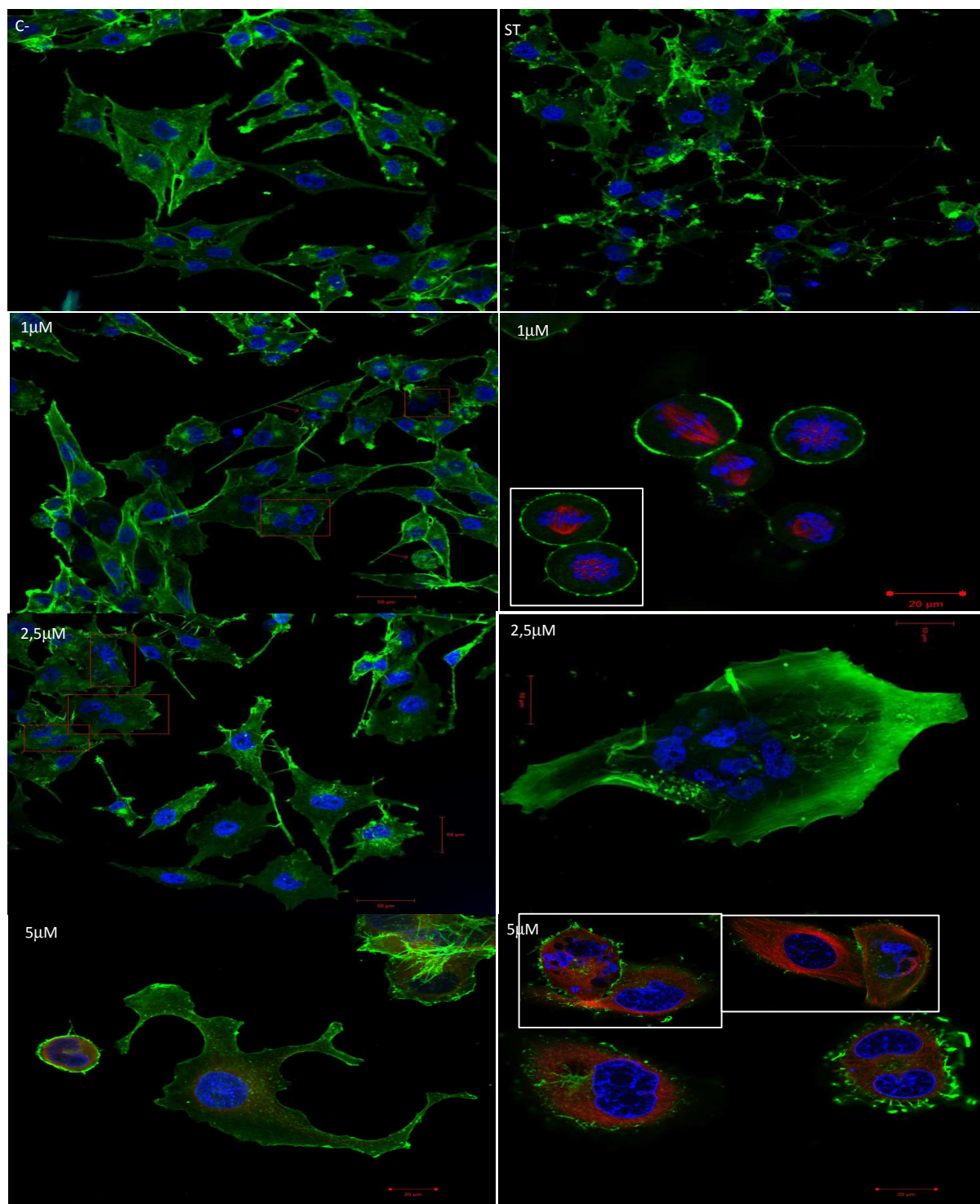


Figura 26 – Análise por microscopia confocal de células PC-3M sem tratamento (C-) e tratadas com 1; 2,5 e 5 μM da ditiopirrolona com 48 horas de incubação. A estaurosporina (ST) (0,5 μM) foi utilizada como controle positivo. Observa-se em azul o DNA, corado por DAPI, em verde a actina corada por faloidina, em vermelho a tubulina. Os quadrados brancos evidenciam células polinucleadas e figuras mitóticas.

#### 4.5 Western blot.

As proteínas avaliadas por western blot foram ciclina A, ciclina B1, ciclina D1, ciclina D2, ciclina E2, ciclina H, Cdk1, Cdk2, Chk1, Chk2, que participam da regulação do ciclo celular e PLK-1, Prc-1 e RhoA, que estão relacionadas à citocinese.

Pode ser observado na Figura 27 a expressão de proteínas de células PC-3M tratadas com 1 e 5 $\mu$ M da ditiolpirrolona durante 24 e 48 horas de tratamento. A expressão de Cdk1 apresentou um discreto aumento nas duas concentrações da ditiolpirrolona em 24 horas e apenas na menor concentração com 48 horas de tratamento. A expressão da ciclina A diminuiu em todos os tratados, principalmente com 48 horas de incubação. As outras proteínas quantificadas referentes ao ciclo celular, ciclina H, ciclina D1, ciclina E, ciclina B1 e Cdk2 praticamente não sofreram alteração.

Nesse trabalho avaliou-se também a expressão da proteína Chk2, que participa de vias de resposta ao dano em DNA. De acordo com a Figura 24, a expressão de Chk2 não se mostrou alterada quando células PC-3M foram tratadas com 1 e 5  $\mu$ M da ditiolpirrolona após 24 e 48 horas. (Figura 27).

Em relação as proteínas relacionadas diretamente à citocinese, a expressão de Prc-1 mostrou-se aumentada, exceto com 5 $\mu$ M em 48 horas de tratamento. Ao passo que a expressão de Plk-1 e de RhoA diminuíram em ambos os tempos de incubação, principalmente com 24 horas de tratamento.

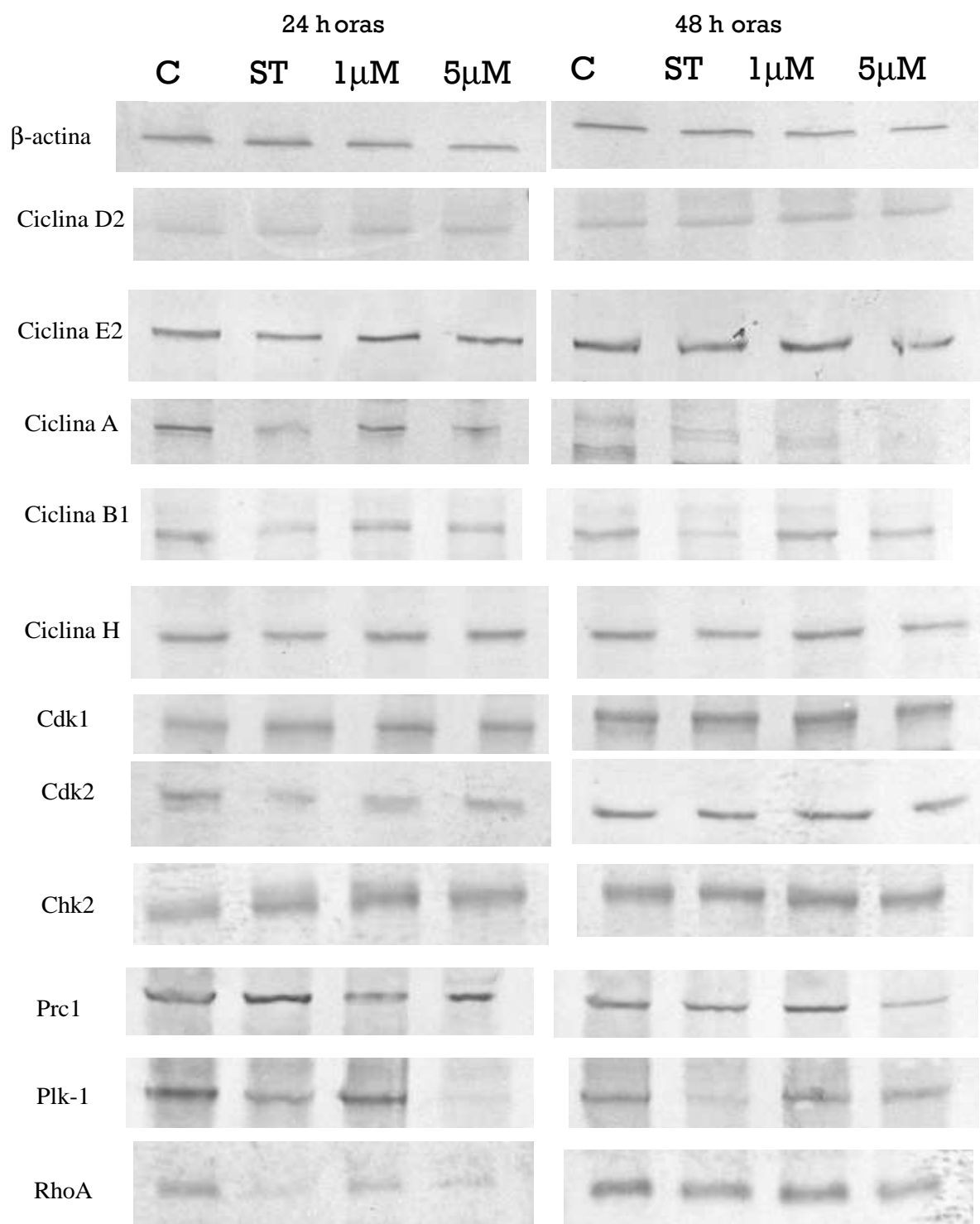


Figura 27 –Western blot mostrando a expressão de ciclina A, ciclina B1, ciclina D2, ciclina E2, ciclina H, Cdk1, Cdk2, Chk2, Prc-1, Plk-1 e  $\beta$ -actina, usada como controle positivo. As células PC-3M foram tratadas durante 24 e 48 horas com a ditolpirrolona (1 e 5  $\mu$ M).

## DISCUSSÃO

Os produtos naturais marinhos ganharam destaque nos últimos anos e tem despertado cada vez mais interesse dos pesquisadores e da indústria devido aos achados inéditos e promissores. O estado do Ceará pode se beneficiar bastante por ter uma privilegiada costa e acesso a uma grande biodiversidade marinha. *Eudistoma vannamei*, a espécie de ascídia da qual foi isolada cepa de *Streptomyces* sp. desse estudo, é um exemplo disso. Essa espécie é endêmica do Ceará e tem apresentado resultados animadores até então (Jimenez *et al.*, 2003; Jimenez *et al.*, 2008; Andreo *et al.*, 2012).

No presente trabalho investigou-se o extrato de *Streptomyces* sp. isolado da ascidia *Eudistoma vannamei* e identificou-se, através de fracionamento bioguiado e do ensaio do MTT, uma ditiolpirrolona com potente atividade citotóxica em linhagens tumorais, a N-(4,5-dihidro-5-oxo-1,2-ditiolo[4,3-b]pirrol-6-il)-N-metil-formamida, com  $CI_{50}$  na ordem de  $\mu M$ . As ditiolpirrolonas são conhecidas de longa data, quando, principalmente por sua atividade antibiótica, porém existem poucos estudos referentes a sua citotoxicidade em células tumorais. Elas são tipicamente constituídas de um núcleo bissulfeto, sendo esse núcleo formado por um anel pirrólico e um anel ditiólico, podendo ser agrupadas em duas famílias, pirrotinas ou holotinas, de acordo com a natureza do grupamento ligado ao nitrogênio do anel pirrólico.

Um dos primeiros registros de ditiolpirrolona ocorreu na década de 50, quando Tanner e colaboradores isolaram a molécula tiolutina, a partir de culturas de *Streptomyces albus* (Walter *et al.*, 1955). Outras ditiolpirrolonas foram encontradas também em extratos de bactérias dos gêneros *Xenorhabdus*, *Alteromonas*, e em actinomicetos do gênero *Saccharothrix* e *Streptomyces* (Shiozawa *et al.*, 1993; Paik *et al.*, 2001; Merrouche *et al.*, 2010; Merrouche *et al.*, 2011). Na década de 90, pesquisadores relataram a ocorrência de ditiolpirrolonas no ambiente marinho em bactérias da espécie *Alteromonas rava*, indentificada como tiomarinol. Pouco tempo depois, esse mesmo grupo encontrou diversas variações da molécula de tiomarinol, a saber, A, B, C, D, E, F e G (Shiozawa *et al.*, 1993; Shiozawa *et al.*, 1995; Shiozawa *et al.*, 1997)

Outros antibióticos pirrolínicos como aureotricina, holotina, holomicina, tiolutina, demonstraram atividade não só bactericida, como também atividade contra fungos e

protozoários. Essa classe de moléculas apresenta ainda atividade anti-alérgica e anti-agregante plaquetária e, mais recentemente, estudos reportaram que as ditiolpirrolonas tem capacidade de estimular a produção de globulos brancos, podendo ser útil no tratamento de HIV, doenças sanguíneas e na recuperação de pacientes mielossuprimidos que passaram por quimioterapia (Ninomiya *et al.*, 1980; Stahl *et al.*, 1988; Guo *et al.*, 2008; Guoping & Quanhai, 2009; Guoping *et al.*, 2010; Merrouche *et al.*, 2010; Merrouche *et al.*, 2011). As atividades biológicas das ditiolpirrolonas podem variar de acordo com a natureza dos radicais que podem ligar-se aos anéis pirrólico e ditióico. Em 2007, Li e colaboradores fizeram substituições aromáticas no nitrogênio do anel pirrólico de uma ditiolpirrolona isolada de *Xenorhabdus* sp. com o intuito de observar alterações relacionadas à estrutura e atividade e se depararam com o aumento da citotoxicidade contra células de câncer de pulmão. Outras ditiolpirrolonas mostraram-se citotóxicas frente a linhagens tumorais humanas, como linhagens de câncer de mama e de cólon (Webster *et al.*, 2000). Porém, o conhecimento em relação a atividade antitumoral das ditiolpirrolonas é relativamente pequeno e, dentre elas, a tiolutina é uma das mais estudadas. Além de ser citotóxica para linhagens neoplásicas, essa substância é um potente inibidor de RNA polimerase em bactérias e leveduras, outros estudos indicam ainda que essa substância tem efeitos preventivos na malignização das células, como a supressão da angiogênese (Jimenez *et al.*, 1973; Tipper, 1973; Webster *et al.*, 2000; Folkman, 2002).

Além da citotoxicidade comprovada pelo ensaio do MTT, analisou-se o efeito antiproliferativo da ditiolpirrolona através do teste de exclusão pelo azul de Tripán em linhagens PC-3M, confirmando a diminuição no número de células sem praticamente alterar o número de células com membrana não íntegra, ou seja, não viáveis. Curiosamente, os dados da citometria referentes à integridade de membrana mostraram diminuição da integridade nas concentrações de 2,5; 5 e 10  $\mu$ M, com 48 horas de incubação, fato que não foi observado pelo teste do Tripán.

A integridade da membrana pode ser relacionada ao tipo de morte sofrida pela célula. A morte celular é um processo rigidamente controlado e indispensável para a homeostase dos organismos multicelulares. Isso porque a perpetuação de células defeituosas pode estar associada a diversas patologias, inclusive câncer (Munoz *et al.*, 2005; Krysko *et al.*, 2008). Dentre os tipos mais estudados de morte, estão a necrose e a apoptose, que diferem entre si de forma molecular, bioquímica e morfológica.



As células necróticas apresentam algumas características peculiares. Durante o processo há um inchaço das organelas, conseqüentemente da célula como um todo, resultando em ruptura do núcleo, mitocôndria e membrana plasmática. O extravasamento do conteúdo citoplasmático para os tecidos alerta o sistema imune do organismo, podendo desencadear inflamação. (Searle *et al.*, 1982; Mckall, 2010). Por outro lado, células apoptóticas diminuem de tamanho, o DNA se condensa e não há rompimento da membrana plasmática nem de outras organelas, ao invés disso, a célula vai se compartimentalizando em pequenos corpos apoptóticos, que serão futuramente englobados por células vizinhas e macrófagos do sistema imune do organismo. Conseqüentemente, esse tipo de morte não causa inflamação. Entretanto, quando a apoptose não ocorre em condições *in vivo*, ou seja, fora do organismo, essa “limpeza” dos constituintes celulares deixa de acontecer e, ao final do processo, a membrana plasmática da célula termina por se romper. Alguns autores chamam esse fenômeno de apoptose tardia ou “necrose secundária” (Proskuryakov *et al.*, 2003; Faddel & Orrenius, 2005). Além da integridade de membrana, outra característica que pode ser investigada em relação a apoptose é o potencial transmembrânico da mitocôndria, visto que alterações nesse potencial (depolarização), ocasionadas por mudanças na permeabilidade da membrana mitocondrial, marcam um ponto sem volta em direção a morte celular programada. Essa organela pode fornecer informações relevantes, pois tem papel fundamental no desenrolar de vias apoptóticas, especialmente na via intrínseca, através da liberação de fatores pró-apoptóticos, como citocromo c (Green & Reed, 2005; Indran *et al.*, 2011).

Graças as essas diferenças morfológicas entre necrose e apoptose, é possível detectar variações no tamanho e na granulidade das células através do padrão de espalhamento da luz emitida, via citometria de fluxo. Os fotodetectores do equipamento percebem alterações no padrão da luz e processam essa informação, que são representadas pelo FSC (*Forward Scatter*), interpretado como sendo o tamanho da célula e SSC (*Side Scatter*), interpretado como granulidade celular. Em estágios iniciais de apoptose, o FSC diminui enquanto que o SSC pode aumentar ou ficar inalterado. Em caso de necrose, o FSC aumenta e o SSC diminui, representando então o inchaço celular nas células necróticas e a retração nas apoptóticas (Vernes *et al.*, 2000).

Somadas a esses resultados, as análises de integridade de membrana e as análises do potencial transmembrânico de mitocôndria em células PC-3M tratadas com ditiolpirrolona com 24 e 48 horas de incubação, pode-se ter uma ideia do tipo de morte sofrida. O citômetro de fluxo mensura essas características por meio de corantes seletivos e detecção de fluorescência. Os resultados observados neste trabalho podem sugerir então morte por apoptose devido a mudança no tamanho da célula, exibida pela diminuição do FSC e do SSC, concentração e tempo dependente, somada à manutenção da integridade da membrana e à despolarização mitocondrial. Sendo assim esses resultados poderiam estar sugerindo apoptose tardia no maior tempo de tratamento com a ditiolpirrolona, o que corrobora com os resultados obtidos através das análises de dupla coloração (PI+RODA), por citometria de fluxo. A indução de vias apoptóticas é um dos mecanismos pelos quais grande parte dos agentes quimioterápicos age, sendo essa via, muitas vezes, responsável pela ação citotóxica de algumas drogas antitumorais. É importante lembrar que defeitos ou desregulações nas vias apoptóticas podem levar a um prognóstico ruim devido à ineficácia do tratamento e a resistência das células à quimioterapia (Lowe & Lin, 2000; Johnstone *et al.*, 2002).

Além da indução da apoptose, outro alvo bastante explorado na terapêutica do câncer é o ciclo celular, pois, devido ao acúmulo de mutações diversas, células neoplásicas apresentam taxas de proliferação bem superiores que àquelas de células normais, além de, muitas vezes, não precisarem receber estímulos externos para entrarem no processo de divisão celular. O câncer é caracterizado, dentre outros aspectos, por ter uma taxa de proliferação excedente a de morte celular, o que desregula a homeostase do tecido e pode resultar na formação de tumores. Essas particularidades das células tumorais são resultantes do mal funcionamento e da desregulação do ciclo celular. Em células neoplásicas, o estímulo de crescimento é constante e auto-suficiente, ou seja, elas não requerem necessariamente um sinal externo para iniciarem o ciclo e, conseqüentemente, entram em G1. Além disso, vias de sinalização de detecção e eliminação de danos também podem estar comprometidas em células tumorais, com isso, o dano não é reparado e é passado então para a próxima geração, resultando em acúmulo de mutações diversas (Foster, 2007).

A compreensão do ciclo celular em células neoplásicas é de extrema importância e, felizmente, está relativamente bem estabelecida. É sabido que a desregulação da divisão celular

no câncer é responsável por lhe conferir características que o fazem escapar das defesas do organismo, porém as diferenças nas taxas de proliferação entre células neoplásicas e normais é algo que pode ser explorado como alvo terapêutico. Atualmente, existem diversas drogas utilizadas na quimioterapia do câncer que agem primariamente no ciclo celular. De fato, grande parte delas dispõe desse mecanismos de ação. A cisplatina, por exemplo, é um agente alquilante indicado para o tratamento de vários tipos tumores. Ela se intercala no DNA, interferindo na divisão celular na fase S e G2 e culminando em apoptose. Produtos isolados de fontes marinhas, como a trabectedina (Yondelis), também estão no grupo de drogas que agem no ciclo celular, bloqueado especificamente a fase G2, sendo inclusive utilizada em associação com outras drogas (NCI; D’Incalci *et al.*, 2003; Mayer & Gustafson, 2008; Williams & Stoeber, 2012).

No presente trabalho, tanto as lâminas das células PC-3M tratadas com ditiolpirrolona e coradas por May-Grunwald-Giemsa quanto a contagem do índice mitótico exibem claramente células binucleadas e muitas figuras mitóticas, sugerindo que a substância em estudo estaria alterando, de alguma maneira, a progressão do ciclo celular, suspeita que foi comprovada através da avaliação direta do ciclo celular por citometria de fluxo. Tal fato fez com que a pesquisa fosse direcionada, de forma mais aprofundada, para a investigação de algumas vias que participam ou influenciam a divisão celular.

Existem relatos na literatura de substâncias isoladas a partir de *Streptomyces* sp. que são capazes de interferir no ciclo celular de forma similar revelada pela ditiolpirrolona, é o caso da estaurosporina, utilizada como controle positivo nesse trabalho. Dependendo da concentração utilizada, essa molécula bloqueia a entrada na mitose o que resulta em acúmulo de células poliplóides ou tetraploides. Outro feito interessante da estaurosporina seria a indução de bloqueio na telófase. Falhas na citocinese devido ao bloqueio na saída da divisão celular, resultaria em acúmulo de células nessa fase (M), culminando em apoptose. Inclusive, análogos da estaurosporina estão em fase de teste clínicos para serem potenciais agentes anticâncer. Dentre outros mecanismos de ação dessa molécula, pode-se citar as alterações causadas no citoesqueleto. Em 2009, Sarkar e colaboradores demonstraram que a estaurosporina altera a rede de filamentos de tubulina, proteínas que compõem os microtúbulos, e que isso pode contribuir para o bloqueio em G2/M no ciclo celular (Swe & Sit, 1997; Gesher, 2000).

Os microtúbulos são formados pela polimerização reversível da tubulina e têm o importante papel de compor o citoesqueleto, e essa dinâmica precisa funcionar perfeitamente. Inclusive, mutações nos genes que codificam moléculas de tubulina podem acarretar em defeitos na citocinese. Nas células eucarióticas o citoesqueleto desempenha funções essenciais, tais como mobilidade, sinalização celular, distribuição de substâncias, manutenção da forma da célula e participação na divisão. Durante a mitose, a rede de microtúbulos que forma o citoesqueleto é desmontada para dar lugar ao fuso mitótico, armação na qual os cromossomos duplicados irão se ancorar. Essa estrutura serve pra orientar os cromossomos no equador da célula durante a metáfase, a fim de que eles sejam igualmente distribuídos para as células filhas nas fases seguintes da mitose (Jordan & Wilson, 1998; Zhou *et al*, 2002). Algumas substâncias antitumorais agem exatamente nesse alvo. Drogas como o taxol e a vimblastina podem ligar-se a tubulina ou aos microtubulos, suprimindo a dinâmica do citoesqueleto e inviabilizando a progressão do ciclo celular através de ação no fuso mitótico. Bloqueios persistentes nessa fase da divisão levam a formação de células polinucleadas e a indução de apoptose, como mecanismo de contenção de dano celular (Jordan *et al.*, 1993; Jordan *et al.*, 1996; Almeida *et al.*, 2005).

Apesar de os dados da microscopia confocal corroborarem com aqueles mostrados previamente, sugerindo que a ditiolpirrolona estaria alterando o ciclo celular e aumentando a quantidade de figuras mitóticas e de células polinucleadas, ela não parece alterar o comportamento da tubulina e da actina nas células PC-3M. Isso sugere que o mecanismo de ação da ditiolpirrolona em estudo não estaria relacionado a alterações diretas nessas proteínas.

A progressão para cada fase do ciclo celular é coordenada através da expressão das ciclinas e interações com as Cdks. Dentre as diversas mutações acumuladas em células neoplásicas, várias acometem o ciclo celular de alguma maneira (Foster, 2008; Malumbres & Barbacid, 2009). De acordo com os dados obtidos pela dosagem de proteínas por *western blot*, pode ser proposto que a ditiolpirrolona (1 e 5 $\mu$ M) não alterou o início do ciclo, visto que a expressão de ciclina D2, ciclina E, que são proteínas que participam dessas fases, encontram-se em níveis normais. Nota-se ainda um discreto atraso em S, G2 e M devido a diminuição da expressão de ciclina A (em 1 $\mu$ M) e leve aumento de Cdk1, que modulam essas fases, respectivamente. A diminuição da expressão de ciclina A pode estar causando o atraso em S,

observado no ciclo celular, visto que essa proteína, ligada à Cdk1, é necessária para a transição de S para G2/M.

Os dados anteriores mostram claramente que as células PC-3M tratadas com ditiolpirrolona não encontraram dificuldade de duplicar seu material genético. Corroborando com esses dados, foi visto um leve aumento de Cdk1, proteína importante nas fases finais do ciclo, na transição de G2 para M. Em condições normais, os níveis de ciclina B1, ativadora de Cdk1, devem começar a cair no final da mitose, mais precisamente na anáfase, haja vista que esse evento está intimamente relacionado a inativação do complexo ciclinaB/Cdk1, crucial para saída da mitose. Wolf e colaboradores, (2006) analisaram os efeitos de diferentes concentrações de ciclina B1 não degradável em diferentes linhagens celulares humanas e, interessadamente, acharam que variadas concentrações de ciclina B1 causam bloqueio em fases distintas da mitose. Altos níveis de expressão constante dessa proteína acarretam acúmulo de células em metáfase enquanto que níveis baixos, porém persistentes de ciclina B1, bloqueiam apenas os estágios finais da mitose, causando um atraso em telófase.

A ativação completa das quinases dependentes de ciclina se dá pelas interações com suas respectivas ciclinas acrescida de fosforilação nos resíduos de treonina pelo complexo ativador de quinases (CAK = Cdk7 + Ciclina H + Mat1). Experimentos mostraram que a inibição seletiva de Cdk7 em G1 impede a ligação de ciclinas à Cdk2, atrasando a fase S. Essa mesma inibição, dessa vez em G2, foi capaz de desfazer a ligação do complexo ciclina/Cdk, bloqueando a entrada da célula na mitose (Larochelle *et al.*, 2007). Imprescindivelmente, a degradação da ciclina B deve ocorrer no final da anáfase e início da telófase, sendo indispensável para a inativação de Cdk1, o que promoveria então a saída da mitose. A degradação da ciclina B é então desencadeada pelo complexo APC (*Anaphase promoting complex*), que marca essa ciclina via ubiquitinação de forma que ela seja posteriormente reconhecida e destruída por outras proteínas (Irniger, 2002).

Para que a mitose se complete com sucesso, é necessária a formação de um anel contrátil que irá separar as duas células filhas durante a citocinese. Essa fase é bastante complexa e conta com a participação de pelo menos 20 proteínas. Algumas dessas proteínas já começam a se mobilizar no início da anáfase e é exatamente a ativação de quinases mitóticas, como a Cdk1, que assegura que o início da citocinese ocorra no momento preciso. O controle é feito através de

inativação via fosforilação de proteínas chaves da citocinese, mediada por Cdk1. A degradação proteolítica da ciclina B, culminando em inativação de quinases mitóticas, ativa então as proteínas responsáveis pela montagem do eixo central, local no qual o anel contrátil irá se posicionar. Sendo assim, Cdk1 precisa estar desativada e a ciclina B, degradada, caso contrário, diversos eventos da citocinese são impedidos, tais como formação do eixo central e agregação de microtúbulos (Glotzer, 2005; Normand & King, 2010). Experimentos com células de rim de rato mostraram que a inativação de Cdk1 é essencial para o início da citocinese, no entanto sua inativação precoce pode prejudicar o andamento do ciclo celular. Em 2007, Paulson mostrou que quando Cdk1 é inibida em células FT210 de rato estabilizadas em metáfase, as células são capazes de retornar ao estado interfásico. Ele observou que houve descondensação dos cromossomos sem que ocorresse a segregação e a citocinese, porém o material genético estava duplicado haja visto que as outras fases da mitose foram cumpridas. Curiosamente, as células resultantes desse experimento foram capazes de completar um novo ciclo celular, duplicando novamente seu DNA. Outros estudos mostraram ainda que a ativação persistente de Cdk1 não causa bloqueio em metáfase, mas sim uma concentração de células no final da anáfase, sem que a separação dos cromossomos fosse inibida (Holloway *et al.* 1993; Wheatley *et al.* 1997). Esses efeitos celulares são similares aos que foram aqui observados quando as células PC-3M foram tratadas com a ditiolpirrolona em estudo, o que sugere que essa substância esteja modulando vias moleculares das fases finais do ciclo celular.

Além de depender do sucesso das fases anteriores e do correto posicionamento de proteínas que orquestram a formação do anel contrátil, outras proteínas modulam os processos da citocinese. Os dados desse trabalho mostraram que a expressão de Plk-1 apresentou-se diminuída, e, posteriormente, o mesmo ocorre com Prc1, com 48 horas de tratamento. Tal fato se dá, provavelmente, devido a interação entre Prc1 e Plk1 no final da mitose (Rape, 2007). A Prc1 é inibida durante o início da mitose através de fosforilação, por Cdk, em dois sítios de ação: T470 e T481, inclusive, mutações nesses sítios provocam o recrutamento prematuro de Plk-1 por Prc1, ocasionando arraste em prometáfase e bloqueio na progressão da mitose (Neef *et al.*, 2007). Entretanto, experimentos com microinjeção de anti-Prc1 demonstraram que a separação celular é bloqueada, sem influenciar a separação nuclear, ou seja, que essa proteína é necessária para a separação celular (Jiang *et al.*, 1998). Além disso, Plk-1 possibilita seu próprio acoplamento em Prc1 através de fosforilação no sítio T602. Essa ligação irá desencadear, dentre

outros processos, a ativação de outras proteínas importantes para a formação e ingressão do sulco e do anel contrátil, dentre elas a RhoA. Sua presença estimula o recrutamento e a organização dos filamentos de actina e sua inibição bloqueia o aprofundamento do sulco (Drechsel, 1996).

Grande parte das proteínas envolvidas na fase final da mitose tem um tempo exato de funcionamento, ou seja, desempenham seu papel antes da anáfase, ou depois dela. Para àquelas que agem em ambas as fases, faz-se necessário uma modulação mais complexa, temporal e apropriada, como é o caso da Plk-1, que está envolvida com diversas outras funções no decorrer do ciclo celular, além de seu papel como reguladora da citocinese. Vale ressaltar que essa proteína encontra-se superexpressa em diversos tipos de tumores, estando relacionada a um prognóstico ruim e sendo então considerada um alvo terapêutico particularmente interessante (Takai *et al.*, 2005).

Dentre outras funções, a Plk-1 está associada à entrada da mitose, à bipolarização dos microtúbulos, à segregação dos cromossomos, à modulação do deslocamento de proteínas para a formação do eixo central da célula, crucial para a formação do anel contrátil composto por miosina e actina e, conseqüentemente, à citocinese. Além dos diferentes papéis exercidos pela Plk-1, sua regulação varia dependendo do momento do ciclo e de sua localização na célula (Sumara *et al.*, 2002; Yoshida *et al.*, 2006; Petronczki *et al.*, 2008). A inibição de Plk-1 ocasiona um atraso na entrada da mitose seguido de arraste prometáfase (Sumara *et al.*, 2004; Burkard *et al.*, 2006). Entretanto, Brennan e colaboradores (2007) também utilizaram inibidores de Plk-1, desta vez após metáfase, e demonstraram que a inibição dessa proteína bloqueiou a formação do anel contrátil e do sulco de clivagem devido a defeitos na localização de RhoA, ao passo que a segregação dos cromossomos ocorreu normalmente. Interessantemente, tal fato não impede a saída da mitose e o retorno das células ao estado interfásico. De fato, diversos trabalhos revelam que a inibição de Plk-1 prejudica a ligação de RhoA com outras proteínas, tais como Ect2, que participam da finalização da citocinese. Conseqüentemente, células com inibição de Plk-1 apresentam defeitos na citocinese (Burkard *et al.*, 2006; Petronczki *et al.*, 2007; Wolfe *et al.*, 2009).

De acordo com os dados obtidos, pode-se sugerir que a diminuição da ciclina A e da ciclina B1, associada à diminuição da expressão de Plk-1, Prc1 e RhoA, estão relacionadas com arraste no final do ciclo celular e bloqueio no final da mitose. Sendo assim, a célula passa pela

transição de G2 para mitose, porém não consegue concluir a citocinese, pois níveis baixos de Prc1, Plk-1 e RhoA inviabilizam a formação do eixo central, sulco e anel contrátil. Como as células PC-3M não conseguem concluir a citocinese, o resultado são células polinucleadas que irão eventualmente sofrer morte por necrose e, predominantemente, por apoptose.



## CONCLUSÃO

A ditiolpirrolona isolada de *Streptomyces* sp. mostrou potente atividade citotóxica frente a linhagens tumorais, em especial células PC-3M. Essa molécula aumentou claramente o número de figuras mitóticas nas lâminas, sugerindo alteração no ciclo celular, provavelmente por vias bioquímicas, haja vista que não houve alteração na tubulina. Além disso, a substância parece alterar a expressão de proteínas essenciais para a conclusão da citocinese. Entretanto, é necessária a elucidação mais aprofundada e completa dos mecanismos de ação da ditiolpirrolona do presente trabalho.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abayomi, E. A., Sissolak, G., Jacobs P. Use of novel proteasome inhibitors as a therapeutic strategy in lymphomas current experience and emerging concepts. *Transfusion and Apheresis Science* Volume 37, Issue 1, Pages 85–92, 2007.

Almeida, V. L., Leitão, A., Reina, L. C. B., Montanari, C. A., Donnici, C. L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o dna: uma introdução. *Quim. Nova*, Vol. 28, No. 1, 118-129, 2005.

Ande, S. R., Chen, J., Maddika, S. The ubiquitin pathway: An emerging drug target in cancer therapy. *Volume 625, Issues 1–3, 25, Pages 199–205*, 2009.

Andréo, M. A., Vessecchi, R., Jimenez, P. C., Siebra, J. B. C. N., Costa-Lotufo, L. V., Vessecchi, R., Niehues, M. Lopes, J. L. C., Lopes, N. P. A Systematic UPLC-ESI-MS/MS Study on the Occurrence of Staurosporine and Derivatives in Associated Marine Microorganisms from *Eudistoma vannamei*. *J. Braz. Chem. Soc.*, Vol. 23, No. 2, 335-343, 2012.

Arasu, M. V., Duraipandiyar, V., Ignacimuthu, S. Antibacterial and antifungal activities of polyketide metabolite from marine *Streptomyces* sp. AP-123 and its cytotoxic effect. *Chemosphere*, 2012.

Ata, A., Kerr, R. G., Moyab, C. E., Jacobs, R. S. Identification of anti-inflammatory diterpenes from the marine gorgonian *Pseudopterogorgia elisabethae*. *Tetrahedron* 59 4215–4222, 2003.

Bérdy, J. J. Bioactive Microbial Metabolites. *Antibiot.* 58(1): 1–26, 2005.

Bergman, W. & Feeney, R. J. Nucleosides of sponges. *Journal of Organic Chemistry* 16: 981-987, 1951.

Berlinck, R. G. S., Hajdu, E., Rocha, R. M., Oliveira, J. H. H. L., Hernández, I. L. C., Selegim, M. H. R., Granato, A. C., Almeida, E. V. R., Nuñez, C. V., Muricy, G., Peixinho, S., Pessoa, C., Moraes, M. O., Cavalcanti, B. C., Nascimento, G. G. F., Thiemann, O., Silva, M., Souza, A. O.,

Silva, C. L., Minarini, P. R. R. Challenges and Rewards of Research in Marine Natural Products Chemistry in Brazil. *Journal of Natural Products* 67: 510-522, 2004.

Bouras, N., Mathieu, F., Sabaou, N., Lebrihi, A. Influence on dithiopyrrolone antibiotic production by organic acids in *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. *Process Biochemistry* 42 925–933. 2007.

Bowder B. Aromatic alkaloids from ascidians. *Studies in Natural Products Chemistry*, Vol 23, 2000.

Brennan, I.M.; Peters, U.; Kapoor, T. M.; Straight, A. F. Polo-Like Kinase Controls Vertebrate Spindle Elongation and Cytokinesis. *Plus one | Issue 5 | e409*, 2007.

Burkard, M.E. Randall, C. L.; Larochele, S.; Zhang, C.; Shokat, K. M.; Fisher, R. P.; Jallepalli, P. V. Chemical genetics reveals the requirement for Polo-like kinase 1 activity in positioning RhoA and triggering cytokinesis in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 4383–4388, 2007.

Clare, A. S. Marine natural products antifoulants: status and potential. *Biofouling*, 9: 211-229, 1996.

Costa-Lotufo, L.V., Wilke, D. V., Jimenez, P. C. Organismos Marinhos Como Fonte De Novos Fármacos: Histórico e Perspectivas. *Quim. Nova*, Vol. 32, No. 3, 703-716, 2009.

Croteau, R., Kutchan, T. M., Lewis, N. G. *Natural Products (Secondary Metabolites). Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, B. Buchanan, W. Gruissem, R. Jones, Eds. © American Society of Plant Physiologists, 2000.

D’Incalci M., Colombo T., Ubezio P., Nicoletti I., Giavazzi R., Erba E., Ferrarese L., Mecoc D., Riccardi R., Sessad C., Cavallini E., Jimeno J., Faircloth G. T. The combination of yondelis and cisplatin is synergistic against human tumor xenografts. *European Journal of Cancer* 39, 1920–1926, 2003.

Davidson, B. S. Ascidians: producers of amino acid derived metabolites. *Chemical Review* 93:1771-1791, 1993.

Davis, A. R., Targett, N. M., McConnel, O. J., Young C. M. Epibiosis of marine algae and benthic invertebrates: natural products chemistry and other mechanisms inhibiting settlement and overgrowth. *Bioorg. Mar. Chem.*, 3: 85-114, 1989.

D'Incalcia, M., Colombo, T., Ubezio, P., Nicoletti, I., Giavazzi, R., Erba, E., Ferrarese, L., Meco, D., Riccardi, R., Sessa, C., Cavallini, E., Jimeno, J., Faircloth, G. T. The combination of yondelis and cisplatin is synergistic against human tumor xenografts. *European Journal of Cancer* 39 1920–1926, 2003.

Drechsel, D. N.; Hyman, A. A.; Hall, A.; Glotzer, M. A requirement for Rho and Cdc42 during cytokinesis in *Xenopus* embryos. *Current Biology*, 7:12–23, 1996.

Donia, M., Hamann, M. T. Marine natural products and their potential applications as anti-infective agents. *Lancet Infect Dis*; 3:338–48, 2003.

El Sayed, K. A. Natural products as antiviral agents. *Stud Nat Prot Chem* 2000;24:473–572. □El Sayed KA, Bartyzel P, Shen X, Perry TL, Zjawiony JK, Hamann MT. Marine natural products as anti-tuberculosis agents. *Tetrahedron*; 56:949–53, 2000.

Erba, E., Bergamaschi, D., Bassano, L., Damia, G., Ronzoni, S., Faircloth, G. T., D'Incalci M. Ecteinascidin-743 (ET-743), a natural marine compound, with a unique mechanism of action. *European Journal of Cancer* 37, 97±105, 2001.

Faddel, B., Orrenius, S. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. *Journal of Internal Medicine*; 258: 479–517, 2005.

Faulkner, D. J. *Marine Pharmacology*. *Antonie van Leeuwenhoek* 77: 135-145, 2000a.

Fenical, W., Jensen, P. R., Palladino, M. A., Lam, K. S., Lloyd, G. K., Potts, B. C. Discovery and development of the anticancer agent salinosporamide A (NPI-0052). *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2008.

Fenical, W. New pharmaceuticals from marine organism. *Trends in Biotechnology* 15(9): 15(9):339–341, 1997.

Fenical, W. Marine Pharmaceuticals Past, Present, and Future. *Oceanography* Vol. 19, No. 2, Junho, 2006.

Fischer, P. M., Glover, D. M., Lane, D. P. Targeting the cell cycle. Vol. 1, No. 4 2004.

Folkman, J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. Volume 29, Issue 6, Supplement 16, Pages 15–18, 2002.

Foster, I. Cancer: A cell cycle defect. *Radiography* xx,1-6, 2007.

Garson, M. J. The biosynthesis of sponge secondary metabolites: Why is it important. In: Van Soest RWM, Van Kempen TMG, Braekman JC (Eds.) *Sponges in time and space*. Balkema, Rotterdam, p. 427-440, 1994.

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* 19, January 27, 2012.

Gescher, A. Staurosporine analogues – pharmacological toys or useful antitumour agents? *Crit Rev Oncol Hematol* 34(2):127–35, 2000.

Glotzer, M. Cytokinesis: progress on all fronts. *Cell Biology*, 15:684–690, 2003.

Glotzer, M. The Molecular Requirements for Cytokinesis. *Science* vol 307, 2005.

Guo, Y., Chen, G. and Li, B. Dithiopyrrolone compounds and their therapeutic applications. Patent WO2008038175, 2008.

Guoping, W. and Quanhai, L. Dithiopyrrolone compounds, the preparation and the use thereof. Patent WO2009033396. 19 de Março, 2009.

Guoping, W. and Quanhai, L., Sun, H., Wu, W., Hou, J., Yao, L., Li, C., Liu, M., Li, F., Wu, X., Zhao, S. Dithiopyrrolone compounds, the preparation and the use thereof. Patent 20100210856. 19 de Agosto, 2010.

Hanahan, D.; Weinberg, R. A. *Hallmarks of Cancer: The Next Generation*. Cell 144, Elsevier Inc. a2011.

Harper, M. K., Bugni, T. S., Copp, B. R., James, R. B., Lindsay, B. S., Richardson A. D. Introduction to the chemical ecology of marine natural products. *Marine Chemical Ecology*. In: McClintock, JB & Baker BJ (EDs). CRS Press: 3-69, 2001.

Hinshaw, H. C., Pyle, M. M., Feldman, W. H. Streptomycin in tuberculosis. *American Journal of Medicin*, 1947.

Holloway, S. L., Glotzer, M., King, R. W., Murray, A. W. Anaphase is initiated by proteolysis rather than by the inactivation of maturation-promoting factor. *Cell* 73:1393–402, 1993.

Hunt, B. & Vincent, A. C. J. Scale and Sustainability of Marine Bioprospecting for Pharmaceuticals. *Ambio* Vol. 35, No. 2, 2006.

Imhoff, J. F., Labes, A., Wiese, J. Bio-mining the microbial treasures of the ocean: New natural products. *Biotechnology Advances*, 2011.

Irniger, S. Cyclin destruction in mitosis: a crucial task of Cdc20. *FEBS Letters* 532 7-11, 2002.

Jimenez, A. *Antimicrob. Ag. Chemother.* 729-738, 1973.

Jiang, W.; Jimenez, G.; Wells, N. J.; Hope, T. J.; Wahl, G. M.; Hunter, T; Fukunaga, R. PRC1: A Human Mitotic Spindle–Associated CDK Substrate Protein Required for Cytokinesis. *Molecular Cell*, Vol. 2, 877–885, 1998.

Jimenez, P. C., Fortier, S. C., Lotufo, T. M. C., Pessoa, C., Moraes, M. E. A., Moraes, M. O., Costa-Lotufo, L. V. Biological activity in extracts of ascidians (Tunicata, Ascidiacea) from the northeastern Brazilian coast. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 287 93–101, 2003.

Jimenez, P. C., Wilke, D. V., Takeara, R., Lotufo, T. M. C., Pessoa, C., Moraes, M. O., Norberto, N. P., Costa-Lotufo, L. V. Cytotoxic activity of a dichloromethane extract and fractions obtained from *Eudistoma vannahmei* (Tunicata: Ascidiacea). *Biochemistry and Physiology, Part A* 151 391–398, 2008.

Jimeno, J.; Faircloth, G.; Sousa-Faro, J. M. F.; Scheuer, P.; Rinehart, K. New marine derived anticancer therapeutics: a journey from the sea to clinical trials. *Marine Drugs* 1: 14-29, 2004.

Johnstone, R. W., Ruefli, A. A., Lowe, S. W. Apoptosis: A Link between Cancer Genetics and Chemotherapy. *Cell*, Vol. 108, 153–164, January 25, 2002.

Jordan, M. A., Toso, R. J., Thrower, D., Wilson, L. Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by taxol at low concentrations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 1993.

Jordan, M. A., Wendell, K., Gardiner, S., Derry, W. B., Copp, H., Leslie Wilson, L. Mitotic Block Induced in HeLa Cells by Low Concentrations of Paclitaxel (Taxol) Results in Abnormal Mitotic Exit and Apoptotic Cell Death. *Cancer Research* 56:816-825, 1996.

Jordan, M. A., Wilson, L. Microtubules and actin filaments: dynamic targets for cancer chemotherapy. *Cell Biology* 10:193-130, 1998.

Kayser, O., Kiderlen, A. F., Croft, S. L. Natural products as potential antiparasitic drugs. *Stud Nat Prot Chem*; 26:779–848, 2002.

König, G. M. & Wright, A. D. Marine natural products research: current directions and future potential. *Planta Medica* 62:193–211, 1996.

Krysko, D. V., Berghe, T. V., D'Herde, K., Vandenabeele, P. *Methods* 44 205–221, 2008.

Larochelle, S., Merrick, K. A., Terret, M. E., Wohlbold, L., Barboza, N. M., Zhang, C., Shokat, K. M., Jallepalli, P. V., Fisher, R. P. Requirements for Cdk7 in the assembly of Cdk1/cyclin B and activation of Cdk2 revealed by chemical genetics in human cells. *Molecular Cell*. 25(6): 839–850, 2008.

Li, B., Lyle, M. P. A., Chen, G., Li, J., Hu K., Tang, L., Alaoui-Jamalià, M. A., Webster, J. Substituted 6-amino-4H-[1,2]dithiolo[4,3-b]pyrrol-5-ones: Synthesis, structure–activity relationships, and cytotoxic activity on selected human cancer cell lines. *Bioorg. Med. Chem.*, 2007.

Li, J., Tian, X. P., Zhu, T. J., Yang, L. L., Li, W. J. *Streptomyces fildesensis* sp. nov. a novel streptomycete isolated from Antarctic soil. *Antonie van Leeuwenhoek* 100:537–543, 2011.

Lowe, S.W., Lin, A.W. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* 21, 485–495, 2000.

Lu, J., Ma, Y., Liang, J., Xing, Y., Xi, T., Lu, Y. Aureolic acids from a marine-derived *Streptomyces* sp. WBF16. *Microbiological Research* 167 590–595, 2012.

Madigan, T. M., Martinko, J. M., Parker, J. *Microbiologia de Brock*. 12. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2010.

Maddika, S.; Ande, S. R.; Panigrahi, S.; Paranjothy, T.; Weglarczyk, K.; Zuse, A.; Eshraghi, M; Manda, K. D.; Wiechec, E.; Los, M. Cell survival, cell death and cell cycle pathways are interconnected: Implications for cancer therapy. *Drug Resistance Updates* 10, 13–29, 2007.

Maldonato, M. Proteasome. *Encyclopedia of Stress (Second Edition)*, Pages 266–271, 2007.

Mann, J. Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. *Nature Reviews, Cancer*. Volume 2, 2002.

Malumbres, M., Barbacid, M. Cell cycle, Cdks and cancer: a changing paradigm. *Nature reviews | Cancer*, volume 9, 2009.

Martins, D. L. & Epifanio, R.A. A new Germacrane Sesquiterpene from the Brazilian Endemic Gorgonian *Phyllogorgia dilatata* Esper. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. v.9, n.6, 1998.

Mayer, A. M., Glaser, K. B., Cuevas, C., Jacobs, R. S., Kem, W., Little, R. D. The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective. *Trends Pharmacol Sci*; 31: 255–65, 2010.

Mayer, A. M., Rodriguez, A. D., Berlinck, R. G., Fusetani, N. Marine pharmacology in 2007–8: marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the immune and nervous system, and other miscellaneous mechanisms of action. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*; 153:191–222, 2007.

Mayer, A. M. S., Jacobson, P. B., Fenical, W., Jacob, R. S., Glasei, K. B. Pharmacological Characterization of the Pseudopterosins: Novel Anti-inflammatory Natural Products isolated from the caribbean soft coral, *Pseudopterogorgia elisabethae*. *Life sciences* vol.62, No 26 pp PL401-407, 1998.



Mayer, A. M. S., Gustafson, K. R. Marine pharmacology in 2005–2006: Antitumour and cytotoxic compounds. *European journal of cancer* 44, 2357–2387, 2008.

Minamiguchi, K., Kumagai, H., Masuda, T., Kawada, M., Ishizuka, M., Takeuchi, T. Thiolutin, an inhibitor of huvec adhesion to vitronectin, reduces paxillin in huvecs and suppresses tumor cell-induced angiogenesis. *Int. J. Cancer*: **93**, 307–316, 2001.

Molinski, T. F., Dalisay, D. S., Lievens, S. L., Saludes, J. P. Drug development from marine natural products. *Nat Rev Drug Disc* 8, 69 – 85, 2009.

Munoz, L.E., Gaipf, U.S., Franz, S., Sheriff, A., Voll, R.E., Kalden, J.R., Herrmann, M. *Rheumatology* 44 1101–1107, 2005.

Munro, M. H.G.; Blunt, J. H.; Dumdei, E. J.; Hickford, S. J.H.; Lill, R. E.; Li, S.; Battershill, C. N.; Duckworth, A. R. The discovery and development of marine compounds with pharmaceutical potential. *Journal of Biotechnology*, 70: 15–25, 1999.

Neef, R.; Gruneberg, U.; Kopajtich, R.; Li, X.; Nigg, E. A.; Sillje, H.; Barr, F. A. Choice of Plk1 docking partners during mitosis and cytokinesis is controlled by the activation state of Cdk1. *Nature Cell Biology* Volume 9, Number 4, 2007.

Newman, D. J.; Cragg, G. M. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products*. 75, 311–335, 2012.

Nigg, E. A. Cyclin-dependent kinase 7: at the cross-roads DNA repair and cell cycle control? *Cell Biology*, 8:312-317, 1996.

Ninomiya, Y.T., Yamada, Y., Shirai, H., Onitsuka, M., Suhara, Y. and Maruyama, H.B. Biochemically active substances from microorganisms. V. Pyrrothines, potent platelet aggregation inhibitors of microbial origin. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 28, 3157-3162, 1980.

Normand, G., King, R. W. Understanding Cytokinesis Failure. *Adv Exp Med Biol* 676:27-55, 2010.

Omura, S., Iwai, Y., Hirano, A., Nakagawa, A., Awaya, J., Tsuchiya, H., Takahashi, Y., Masuma, R. New alkaloid am-2282 of streptomyces origin taxonomy, fermentation, isolation

and preliminary characterization. *The Journal of Antibiotics* vol. XXX NO. 4, 1977.

Okazaki, T., Kitahara, T., Okami, Y. Studies on marine microorganisms. IV. A new antibiotic SS-228 Y produced by *Chainia* isolated from shallow sea mud. *J Antibiot (Tokyo)* ;28:176–84, 1975.

Olano, C., Méndez, C., Salas, J. A. Antitumor compounds from actinomycetes: from gene clusters to new derivatives by combinatorial biosynthesis. *Nat. Prod. Rep.*, 26, 628–660 | 629, 2009.

Paulson, J. R. Inactivation of Cdk1/Cyclin B in metaphase-arrested mouse FT210 cells induces exit from mitosis without chromosome segregation or cytokinesis and allows passage through another cell cycle. *Chromosoma* 116:215–225, 2007.

Petronczki, M.; Glotzer, M.; Kraut, N.; Peters, J. M. Polo-like Kinase 1 Triggers the Initiation of Cytokinesis in Human Cells by Promoting Recruitment of the RhoGEF Ect2 to the Central Spindle. *Developmental Cell* 12, 713–725, 2007.

Petronczki, M.; Lénárt, P., Peters, J. M. Polo on the Rise—from Mitotic Entry to Cytokinesis with Plk1. *Developmental Cell* 14, 2008.

Proskuryakov, S. Y., Konoplyannikov, A. G., Gabai G. V. L. Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Experimental Cell Research* 283 1–16, 2003.

Radjasa, O. K., Vaske, Y. V., Navarro, G., Vervoort, H. C., Tenney, K., Linington, R. G., Crews, P. Highlights of marine invertebrate-derived biosynthetic products: Their biomedical potential and possible production by microbial associants. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 19 6658–6674, 2011.

Rape, M. Cell Cycle: On-Time Delivery of Plk1 during Cytokinesis. *Current Biology* Vol 17 No 13, 2007.

Rieger, P.T. The biology of Cancer genetics. *Seminars in Oncology Nursing*, Vol 20, No 3: pp 145-154, 2004.

Rinehart, K., Gloer, J. B., Cook, J. C. J. *American. Chemical. Society.* 1981, 103, 1857.

- Sagona, A. P.; Stenmark, H. Cytokinesis and cancer. *FEBS Letters* 584, 2652–2661, 2010.
- Santamaria, A. Neef, R.; Eberspacher, U.; Eis, K.; Husemann, M.; Mumberg, D.; Prechtel, S.; Schulze, V.; Siemeister, G.; Wortmann, L.; Barr, F. A.; Nigg, E. A. Use of the novel Plk1 inhibitor ZK- thiazolidinone to elucidate functions of Plk1 in early and late stages of mitosis. *Mol. Biol. Cell* 18, 4024–4036, 2007.
- Stahl, P., Seidel, H., Von der Eltz, H., Wilhelms, O-H. and Roesch, A. Pyrrothine derivatives and pharmaceutical use thereof. Patent US4760077. 26th July 1988.
- Santhanam, R., Okoro, C. K., Rong, X., Huang, Y., Bull, A. T., Andrews, B. A., Asenjo, J. A., Weon, H. Y., Goodfellow, M. *Streptomyces deserti* sp. nov., isolated from hyper-arid Atacama Desert soil. *Antonie van Leeuwenhoek* 101:575–581, 2012.
- Schwartzmann, G.; Rocha, A. B.; Berlinck, R. G. S.; Jimeno, J. Marine organisms as a source of new anticancer agents. *Lancet Oncology* 2: 221-225, 2001.
- Searle, J., Kerr, J.F., Bishop, C.J. Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance. *Pathol Annu*, 17(Part 2):229-259, 1982.
- Shiozawa, H., Kagasaki, T., Kinoshita, T., Haruyama, H., Domon, H., Utsui, Y., Kodama, K. and Takahashi, S. Thiomarinol, a new hybrid antimicrobial antibiotic produced by a marine bacterium. Fermentation, isolation, structure, and antimicrobial activity. *J Antibiot (Tokyo)* 46, 1834-1842, 1993.
- Shiozawa, H., Kagasaki, T., Torikata, A., Tanaka, N., Fujimoto, K., Hata, T., Furukawa, Y. et Takahashi, S. Thiomarinols B and C, new antimicrobial antibiotics produced by a marine bacterium. *J Antibiot (Tokyo)* 48, 907-909, 1995.
- Shiozawa, H., Shimada, A. Takahashi, S. Thiomarinols D, E, F and G, new hybrid antimicrobial antibiotics produced by a marine bacterium; isolation, structure, and antimicrobial activity. *J Antibiot (Tokyo)* 50, 449-452, 1997.
- Subramani, R., Aalbersberg, W. Marine actinomycetes: An ongoing source of novel bioactive metabolites. *Microbiological Research*, Volume 167, Issue 10, Pages 571–580, 2012.

Supong, K., Thawai, C., Suwanborirux, K., Choowong, W., Supothina, S., Pittayakhajonwut, P. *Phytochemistry Letters* 5 651–656, 2012.

Sudha, S., Masilamani, S. M. Characterization of cytotoxic compound from marine sediment derived actinomycete *Streptomyces avidinii* strain SU4. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 770-773, 2012.

Sumara, I., Vorlaufer, E., Stukenberg, P.T., Kelm, O., Redemann, N., Nigg, E.A., and Peters, J.M. The dissociation of cohesin from chromosomes in prophase is regulated by Polo-like kinase. *Mol. Cell* 9, 515–525, 2002.

Sumara, I.; Giménez-Abián, J.F.; Gerlich, D.; Hirota, T.; Kraft, C.; de la Torre, C.; Ellenberg, J.; Peters, J. M.; Roles of Polo-like Kinase 1 in the Assembly of Functional Mitotic Spindles. *Current Biology*, Vol. 14, 1712–1722, 2004.

Tanner, F. W., Means, J. A. and Davisson, J. W. Thiolutin, an antibiotic produced by certain strains of *Streptomyces albus*. 118th Meeting, American Chemical Society. 7-8, 1950.

Takai, N., Hamanaka, R., Yoshimatsu, J., and Miyakawa, I. Polo-like kinases (Plks) and cancer. *Oncogene* 24, 287–291, 2005.

Tassan, J. P.; Schultz, S. J.; Bartek, J.; Nigg, R. A. Cell Cycle Analysis of the Activity, Subcellular Localization, and Subunit Composition of Human CAK (CDK-activating Kinase). *The Journal of Cell Biology*, Volume 127, Number 2, 467—478, 1994.

Tataki T.; Trenz, K.; Costanzo V.; Petronczki M. Polo-like kinase 1 reaches beyond mitosis—cytokinesis, DNA damage response, and development. *Current Opinion in Cell Biology*, 20:650–660, 2008.

Tipper, D. J. *J. Bacteriology*. 116:245-256, 1973.

Vermes, I., Haanen, C., Reutelingsperger, C. Flow cytometry of apoptotic cell death. *Journal of Immunological Methods* 243 167–190, 2000.

Vermeulen, K., Bockstaele, D. R. V., Berneman, Z. N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.* 36, 131–149, 2003.

Waters, A. L., Hill, R. T., Place, A. R., Hamann, M. T. The expanding role of marine microbes in pharmaceutical development. *Curr Opin Biotechnol*; 21:780–6, 2010.

Webster, J. M., Li, J., Chen, G. Anticancer property of dithiolopyrrolones. U.S. Patent 6,020,360, 2000.

Williams, P. G. Panning for chemical gold: marine bacteria as a source of new therapeutics. *Trends in Biotechnology* Vol.27 No.1., 2008.

Williams, G. H. & Stoeber, K. The cell cycle and cancer. *J Pathol*; 226: 352–364, 2012.

Wheatley SP, Hinchcliffe EH, Glotzer M, Hyman AA, Sluder G, Wang Y. CDK1 inactivation regulates anaphase spindle dynamics and cytokinesis in vivo. *J. Cell Biol.* 138:385–93, 1997.

Wolf, F., Wandke, C., Isenberg, N., Geley, S. Dose-dependent effects of stable cyclin B1 on progression through mitosis in human cells. *The EMBO Journal* 25, 2802–2813, 2006.

Wolfe, B.A. Takaki, T.; Petronczki, M.; Glotzer, M. Polo-like kinase 1 directs assembly of the HsCyk-4 RhoGAP/Ect2 RhoGEF complex to initiate cleavage furrow formation. *PLoS Biol.* 7, e1000110, 2009.

Yoshida, S., Kono, K., Lowery, D.M., Bartolini, S., Yaffe, M.B., Ohya, Y., and Pellman, D. Polo-like kinase Cdc5 controls the local activation of Rho1 to promote cytokinesis. *Science* 313, 108–111, 2006.

Zhang, L., An, R., Wang, J., Sun, N., Zhang, S., Hu, J., Kuai, J. Exploring novel bioactive compounds from marine microbes. *Current Opinion in Microbiology* 8:276–281, 2005.

Zhou, J., Shu, H. B., Joshi H. C. Regulation of Tubulin Synthesis and Cell Cycle Progression in Mammalian Cells by  $\alpha$ -Tubulin-Mediated Microtubule Nucleation. *Journal of Cellular Biochemistry* 84:472±483, 2002.

## ANEXO I

### Equipamentos

- Agitador de tubo, Donner AD 8850□
- Câmara de fluxo unidirecional Filtracom Mini Flow I
- Centrífuga Centimicro, FANEN Modelo 212□
- Citômetro de fluxo, Guava EasyCyte mini
- Citômetro de fluxo, BD Acuri
- Espectrofotômetro de placa DTX-880, Beckman Coulter
- Fluxo laminar, VECO
- Fluxo laminar, Esco Labculture Class II Type A2 Biological Safety Cabinet
- Incubadora de células, (CO2 Water-Jacket Incubator) NUAIRE TS Autoflow
- Incubadora de células, (CO2 Multi-gas Incubator) SANYO
- Máquina fotográfica digital, Olympus C-7070
- Microscópio óptico de inversão, Nikon Diaphot
- Microscópio confocal LSM 710 (Carl Zeiss)
- Microscópio de fluorescência, Olympus
- pHmetro, Micronal B474
- Pipetas automáticas, Gilson

## Reagentes e soluções

### **Cultura de células**

- PBS (Phosphate buffered saline, Sigma.)
- RPMI 1640 (Gibco)

### **Estudos por citometria de fluxo**

- Solução PI-ciclo
  - Iodeto de propídeo (Sigma).....50mg/ml em PBS
  - Citrato de sódio.....0,2%
  - Triton X-100.....0,1%
- Solução de Rodamina 123
  - Solução estoque:
    - Rodamina 123 (Sigma).....1mg/ml em EtOH
    - Solução de uso.....1:1000 em PBS

### **Análise da morfologia celular**

- Kit Panótipo rápido (Centerkit)
- 

### **Western blot**

- Acrilamida 30% (Bio-rad)
- Tampão de corrida 10x Tris/Glycina (Bio-Rad Laboratories)
- Tampão de transferência 10x SSC (Bio-Rad Laboratories)
- Solução de revelação NBT/BCIP (Bio-Rad Laboratories)
- Tampão RIPA (Sigma)
- Tampão *Blue Juice* (10X, Invitrogen)
- Kit para dosagem de proteínas DC *Protein Assay* (Bio-Rad Laboratories)

## ANEXO II

Tabela 1:  $CI_{50}$  das frações de *Streptomyces* sp. em células HCT-8 com 72 horas de incubação.

Amostra	$CI_{50}$ $\mu\text{g/ml}$
Extrato Bruto	33,7 (28,1 – 40,43)
Fração 1	6,38 (4,98 – 8,16)
Fração 2	6,05 (4,59 – 7,96)
Fração 3	1,07 (0,99 - 1,16)
Fração 4	6,18 (5,22 – 7,32)
Fração 5	>50

Tabela 2:  $CI_{50}$  das Sub-frações de *Streptomyces* sp. em células HCT-8 com 72 horas de incubação.

Amostra	$CI_{50}$ $\mu\text{g/ml}$
Sub-fração 1	22,7 (17,3 – 29,9)
Sub-fração 2	1,29 (0,99 – 1,69)
Sub-fração 3	9,58 (6,89 – 13,3)
Sub-fração 4	17,35 (13,2 – 22,8)
Sub-fração 5	1,31 (0,86 – 1,99)
Sub-fração 6	18,16 (8,06 – 41,1)



## Determinação estrutural da ditiolpirrolona em estudo (S-1)

O fracionamento por CLAE do extrato AcOEt da cultura de *Streptomyces* sp. resultou no isolamento de 49,0 mg de cristais laranjas com ponto de fusão na faixa de 142-143 °C, e com absorções máximas de 218 e 368 nm no espectro de UV, denominado de S-1

O espectro de absorção na região do IV (Fig. 3) apresentou absorção em 3131 cm<sup>-1</sup>, típica de deformação axial de ligação N-H; absorção em 2962 cm<sup>-1</sup> característica de vibrações de deformação axial de ligação C-H; absorções referentes à deformação axial de ligação C=O em 1648 cm<sup>-1</sup> e ainda absorção em 1576 cm<sup>-1</sup>, correspondentes à deformação axial de ligação C=C.

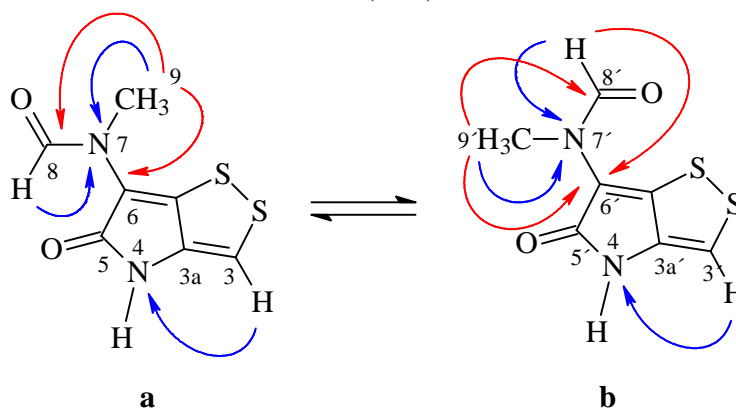
O espectro de massas de alta resolução (Fig. 4) obtido com ionização *electrospray* e no modo positivo, mostrou um pico referente a molécula protonada [M+ H]<sup>+</sup> em *m/z* 214,9953 (calculada 214,9948) indicando a fórmula molecular C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S<sub>2</sub>. Adicionalmente foi observado um pico em *m/z* 236,9764 (calculada 236,9768) referente ao aduto de sódio da molécula [M+ Na]<sup>+</sup>. No modo negativo foi observado o pico referente à molécula desprotonada em *m/z* 212,9837 (calculada 212,9792).

O espectro de RMN <sup>1</sup>H [500 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N] (Fig. 5), mostrou sinais para dois prótons formamida em δ<sub>H</sub> 9,08 (s, H-8) e 8,26 (s, H-8') e dois sinais para hidrogênios olefínicos em δ<sub>H</sub> 7,27 (s, H-3) e 7,18 (s, H-3'). Exibiu também sinais singletos integrados para três hidrogênios em δ<sub>H</sub> 3,29 (s, N-Me) e 3,57 (s, N-Me'), caracterizando dois grupos metilas. Os sinais em δ<sub>H</sub> 12,41 (s) e 12,23 (s) foram atribuídos a hidrogênios nitrogenados.

O espectro de RMN <sup>13</sup>C-CPD [125 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N] (Fig. 6), apresentou 12 linhas espectrais, sendo o sinal em aproximadamente δ<sub>C</sub> 136,0 coberto pelo solvente. Através da comparação deste com o espectro bidimensional HSQC (Fig. 7), foi possível inferir a molécula a presença de dois grupos metilas em δ<sub>C</sub> 34,4 (C-9') e 30,3 (C-9), dois carbonos metínicos sp<sup>2</sup> em δ<sub>C</sub> 110,6 (C-3 e C-3') e seis carbonos não hidrogenados em δ<sub>C</sub> 117,2 (C-6'), 119,9 (C-6), 136,0 (C-6a e C-6a'), 141,8 (C-3a), 143,0 (C-3a') e 170,3 (C-5 e C-5'). Os sinais em δ<sub>C</sub> 162,3 (C-8') e 162,9 (C-8) foram atribuídos a carbonilas de amida. Observa-se que o número de carbonos exibido no espectro de RMN <sup>13</sup>C não corresponde com a fórmula molecular proposta pelo espectro de massas. A presença de dois grupos metilas e dois prótons nos levam a sugerir que o metabólito S-1 trata-se de uma mistura de dois isômeros configuracionais.

Essa mistura foi confirmada através do experimento de correlação heteronuclear HMBC. O grupo metila na cadeia lateral da amida foi confirmado pelas correlações entre os prótons metílicos  $\delta_H$  3,59 (trans) e 3,22 (cis) com os carbonos nas  $\delta_C$  162,3 (C-8') e 162,9 (C-8), respectivamente. Observou-se também dos prótons metílicos com os carbonos  $\delta_C$  117,2 (C-6') e 119,9 (C-6). O experimento HMBC ( $^1H$ - $^{15}N$ ) mostrou correlações dos prótons n-metil e dos prótons formamida com o nitrogênio em  $\delta$  90,2 (N-7) e ainda exibiu a correlação dos hidrogênios em  $\delta_H$  7,18 e 7,27 com o nitrogênio em  $\delta$  104,3 (N-4). Essas correlações são exibidas na Figura 1 abaixo.

Figura 1: Importantes correlações observadas nos experimentos de HMBC  $^1H$ - $^{13}C$  (preto) e  $^1H$ - $^{15}N$  (azul).



As correlações acima mencionadas foram cruciais na determinação da estrutura completa de S-1, a qual foi estabelecida como 5-oxo-6-(*N*-metilformamida)-4,5- dihidro-1,2-ditiol[4,3-b]pirrol (Figura 2).

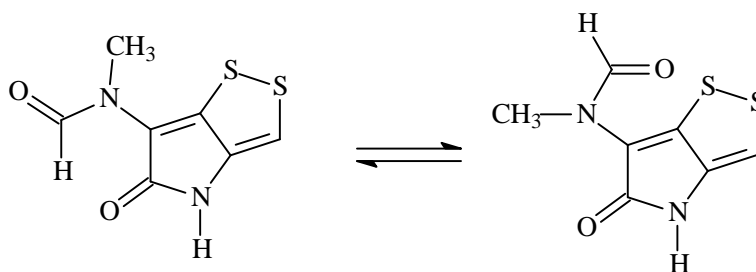


Figura 2: 5-oxo-6-(*N*-metilformamida)-4,5- dihidro-1,2-ditiol[4,3-b]pirrol

Tabela 3: Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  dos metabólitos S-1a e S-1b em  $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$ 

S-1a			S-1b		
C	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (multip, $J_{\text{H,H}}$ )	C	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (multip, $J_{\text{H,H}}$ )
1	-		1'	-	
2	-		2'	-	
3	110,6	7,27 (s)	3'	110,6	7,27 (s)
3a	141,8		3a'	143,0	
4	-		4'	-	
5	170,3		5'	170,3	
6	119,9		6'	117,2	
6a	136,0		6a'	136,0	
7	-		7'	-	
8	162,9	9,08 (s)	8'	162,3	8,26 (s)
9	30,3	3,29 (s)	9'	34,4	3,57 (s)

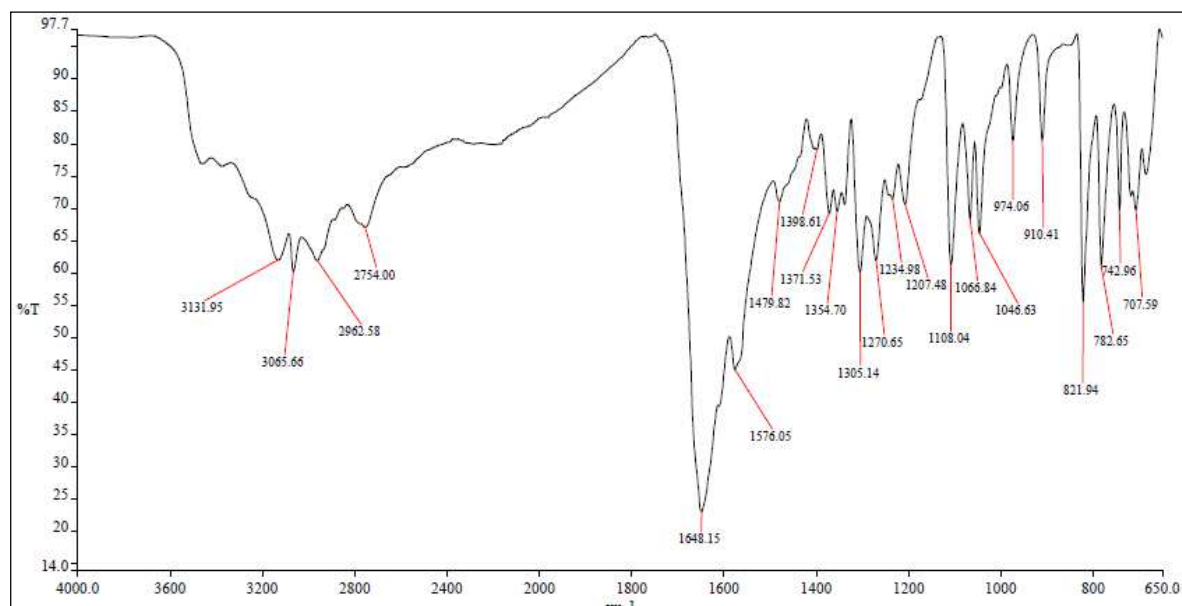


Figura 3: Espectro de absorção na região do infravermelho de S-1

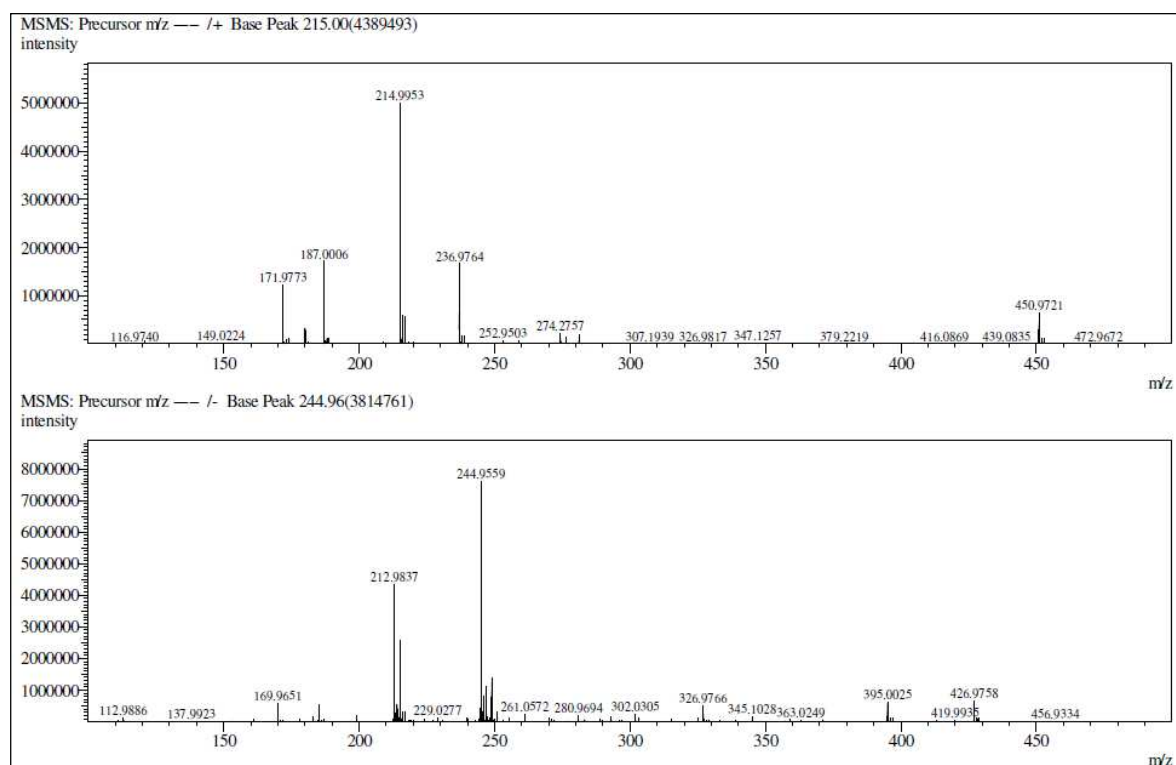


Figura 4: Espectro de massa de alta resolução no modo positivo e negativo de S-1

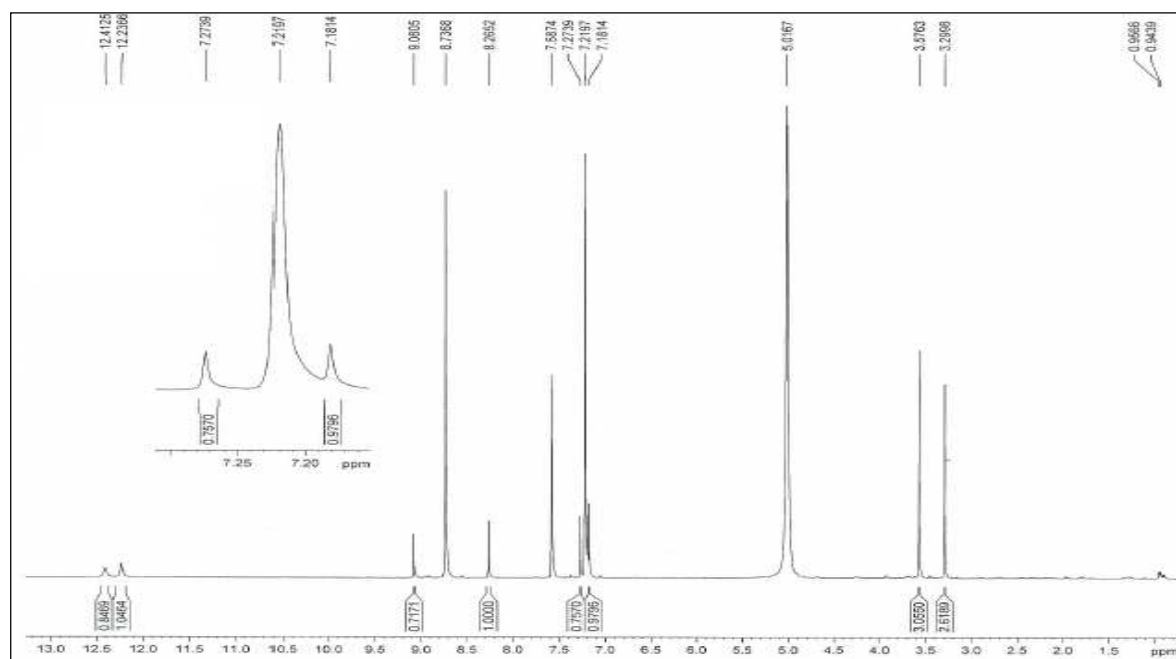


Figura 5: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$ ) de S-1

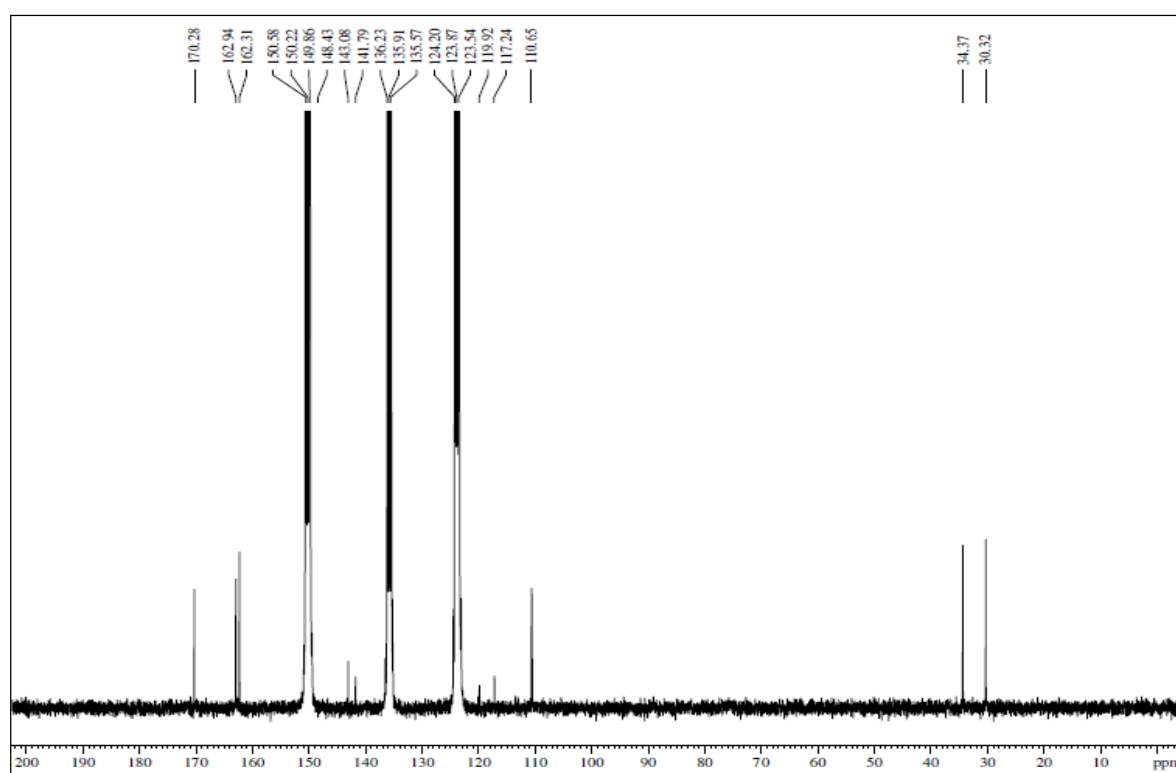


Figura 6: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$ ) de S-1

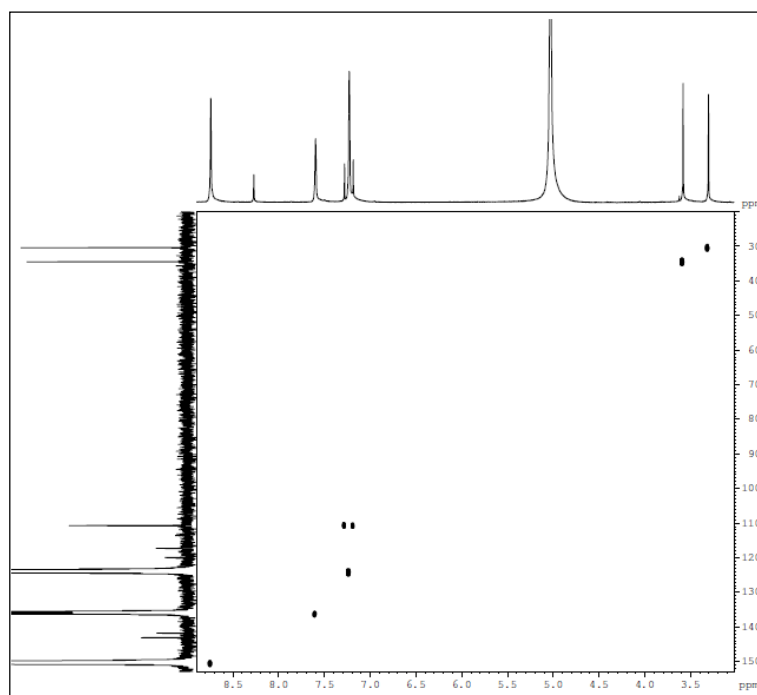


Figura 7: Espectro de RMN HSQC (125 MHz,  $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$ ) de S-1

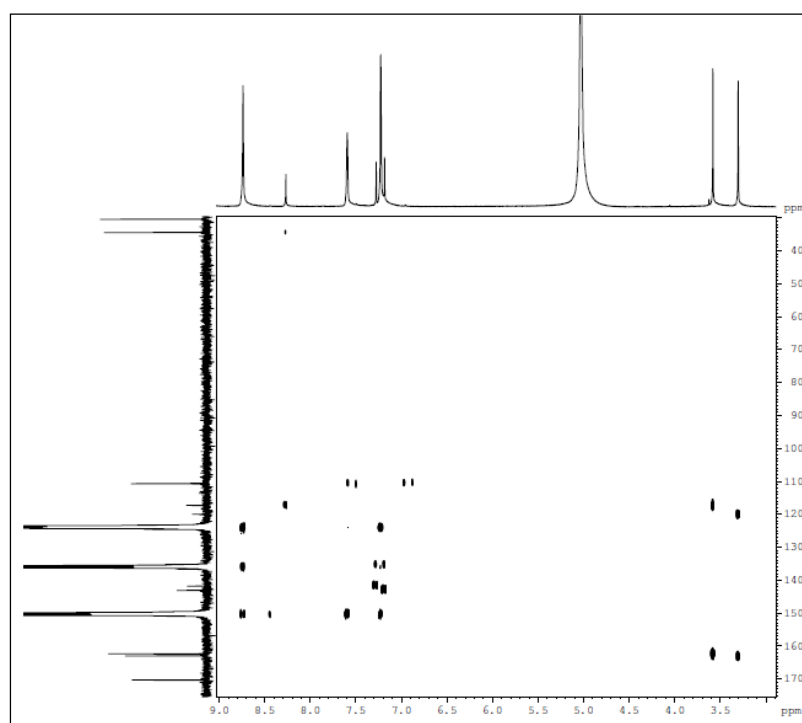


Figura 8: Espectro de RMN HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$ ) de S-1

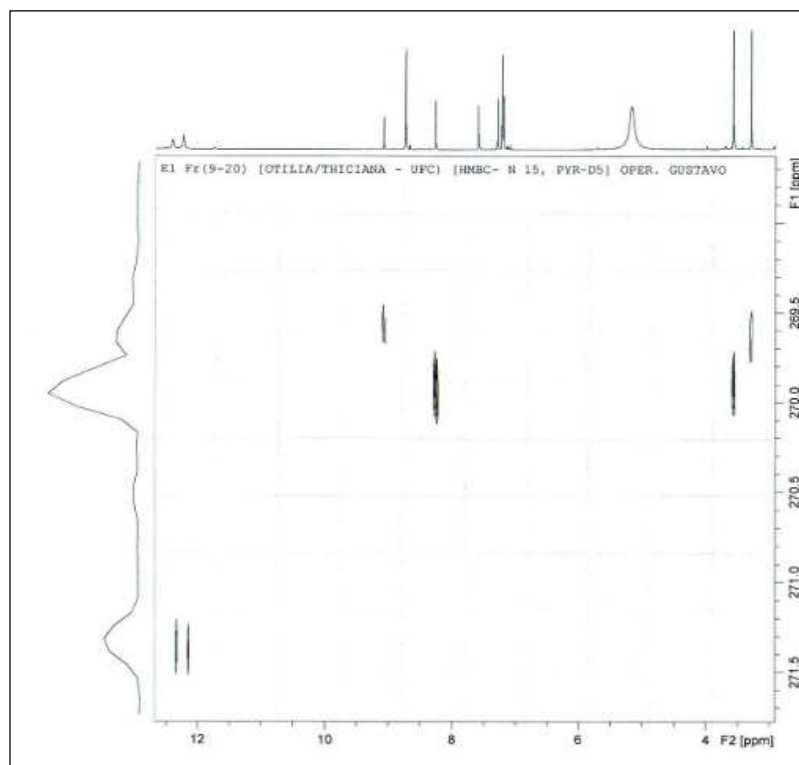


Figura 9: Espectro de RMN HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{N}$ (50 MHz,  $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$ ) dde S-1