

LUCAS SOUSA NEVES ANDRADE

**Identificação e Caracterização de clusters biossintéticos de
Micromonospora sp.**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo

2019

LUCAS SOUSA NEVES ANDRADE

**Identificação e Caracterização de clusters biossintéticos de
Micromonospora sp.**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração:
Microbiologia

Orientador:
prof. Dr. Gabriel Padilla Maldonado

São Paulo

2019

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Sousa Neves Andrade, Lucas
Identificação e Caracterização de clusters
biossintéticos de Micromonospora sp. / Lucas Sousa
Neves Andrade; orientador Gabriel Padilla
Maldonado. -- São Paulo, 2019.
92 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Antraciclinas. 2. Micromonospora sp.. 3.
Actinobacteria. 4. Metabólitos secundários. 5.
Antitumorais. I. Padilla Maldonado, Gabriel,
orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a):

Título da Dissertação/Tese:

Orientador:

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

Aprovado(a) **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

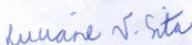


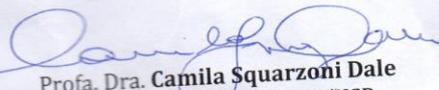
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB nº 898/2017 referente ao projeto intitulado: **"Análise de Clusters gênicos de compostos anti-tumorais produzidos por *Micromonospora sp. isolados da acídia Eudistoma vannamei (Millar, 1977)*"** sob a responsabilidade de **Lucas Sousa Neves Andrade** e orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) **Gabriel Padilla Maldonado**, do Departamento de Microbiologia, foi analisado pela **CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais** e pelo **CEPSH - Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos**, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº 466 de 2012.

São Paulo, 21 de agosto de 2017.


Profa. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Coordenadora CEUA ICB/USP


Profa. Dra. **Camila Squarzozi Dale**
Coordenadora CEPSH ICB/USP



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEUA.172.2018

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado de Isenção nº **898/2017**, emitido em 16/08/2017, e por solicitação do Prof. Dr. **Gabriel Padilla Maldonado**, do departamento de Microbiologia, informo que o título do projeto do aluno **Lucas Sousa Neves Andrade**, foi alterado para "**Identificação e caracterização de clusters biossintéticos com potencial biotecnológico de Micromonospora sp.**" por solicitação da banca de qualificação.

São Paulo, 13 de novembro de 2018.

Profa. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Coordenadora CEUA-ICB/USP

Profa. Dra. **Camila Squarzoni Dale**
Coordenadora CEPSh-ICB/USP

À todos aqueles que se posicionam ativamente
contra o império da ignorância.

AGRADECIMENTO

Agradeço a Deus que me dá a força pra me levantar a cada dia. À minha família que sempre me orientou a dar valor a busca do conhecimento. Aos meus irmãos de fé que me ajudaram a ser quem sou hoje e são minha segunda família.

Agradeço ao professor dr. Gabriel Padilla, por sua orientação, paciência, bons conselhos e tudo mais. Agradeço a todos os companheiros de laboratório que nunca negaram auxílio quando precisei. Ao Leandro Garrido, técnico do laboratório, por sempre compartilhar da sua vasta experiência. Assim como Ruth Castro, Luana Araújo, Vinicius Souza, Mariana Latarullo e à Vida, com seu notável senso estético.

Agradeço à professora Dr^a Leticia Lotufo e à toda equipe do Laboratório de Farmacologia Marinha do ICB, que cederam o material utilizado neste trabalho, o qual é continuidade de estudo iniciado pelo grupo. Particularmente à Karen Velasco que, durante seu período no grupo da professora Leticia Lotufo, sempre foi importante companheira de trabalho e boa amiga.

Agradeço formalmente à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro. A bolsa concedida pertenceu à cota institucional, vinculada ao Programa de Microbiologia. Agência CAPES, programa PROEX, processo 1732037, agosto de 2017 a julho de 2019.

O amor, o trabalho e o conhecimento são as fontes da nossa vida,
deviam também governá-la.

Willhelm Reich

RESUMO

ANDRADE, L.S.N. **Identificação e Caracterização de clusters biossintéticos de *Micromonospora sp.*** 2019. 93 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Bioprodutos de origem marinha tem sido intensamente explorados nas últimas décadas devido à grande diversidade de moléculas de tipos não encontrados em outros ambientes das quais muitas apresentam potencial farmacológico, destacando-se o potencial de descoberta de antitumorais. Em estudo conduzido por grupo de pesquisadores da Universidade Federal do Ceará, realizado na costa cearense, foram isoladas vinte cepas de microrganismos da áscidia *Eudistoma vannamei*, para realização de triagem de compostos antitumorais. Após testes de teor qualitativo, cinco cepas do gênero *Micromonospora sp.* se destacaram por seu potencial como antitumoral. Estas foram submetidas a um ensaio de MTT quantitativo, determinando-se o IC₅₀, que variou de 3.62 a 84 µg mL⁻¹. Posteriormente, o mesmo grupo realizou o fracionamento e caracterização de compostos a partir do extrato de EVA 0109, resultando em 4 complexos. Foi realizado novo ensaio MTT quantitativo, obtendo-se, para o composto 1, IC₅₀ de 12,7µM, para composto 4, 6,2 µM, enquanto os compostos 2 e 3 foram considerados inativos (IC₅₀ maior que 70 µM). Ao contrário do esperado, estes resultados foram menos expressivos que os obtidos com os extratos brutos. Em geral as antraciclinas são cerca de 100 vezes mais ativas que suas respectivas agliconas. Com a perspectiva de aumento de casos de câncer nas próximas décadas e ainda limitada efetividade das terapias atuais, é fundamental a obtenção e compreensão da atividade de novas moléculas, assim como a entendimento da biossíntese dos compostos para posterior interferência para obtenção de produtos melhorados. Este trabalho procurou, então analisar o genoma da linhagem BRA 006 A, cujo extrato bruto havia apresentado resultados mais relevantes nos testes de atividade antitumoral dos trabalhos anteriores, verificar se há cluster gênico completo para síntese de antraciclina e caracterizar a cepa através da construção de árvore fenética. BRA 006 A apresenta genoma com características típicas de *Micromonospora sp.* como tamanho do genoma

(aproximadamente 6,73 Mbp) e conteúdo GC (73%) dentro da média do gênero e presença de cluster de metabólitos secundários sempre encontrados em genomas de representantes do grupo como “sioxanthin”, “alkyl-o-dihydrogeranylmethohydroquinone” e “lymphostin”. Com base nos resultados da árvore fenética, construída a partir de MLSA, supõe-se que se trata de uma espécie ainda não identificada, cuja cepa conhecida mais próxima é *Micromonospora tulbaghia* DMS45142 e as características do genoma corroboram os resultados da árvore, estando dentro dos valores médios do subgrupo. Identificou-se através das diversas ferramentas de bioinformática utilizadas, um cluster completo de uma antraciclina que os levantamentos bibliográficos indicam que seja potencialmente nova. Os açúcares apresentam padrão de metilação também não encontrado em estruturas descritas, de acordo com a pesquisa bibliográfica. Além do cluster de antraciclina, foram encontrados outros clusters com potencial interesse para a investigação de moléculas de interesse farmacológico, como 2 clusters de lantipeptídeo, 1 de bacteriocinas, 6 terpenos, 7 NRPS's, 2 do tipo PKS 2 (incluindo o cluster de antraciclina) e 4 do tipo PKS I, incluindo cluster que apresenta similaridade com 44% dos genes do cluster de “Stambomycin”, composto com potencial antitumoral relatado.

Palavras-chave: *Micromonospora* sp. Antraciclina. Antitumorais. Microrganismos marinhos. Clusters biossintéticos.

ABSTRACT

ANDRADE, L.S.N. **Identification and characterization of biosynthetics clusters of *Micromonospora sp.*** 2019. 93 p. Dissertation (Master of Science in Microbiology) – Institute of Biomedical Science. University of São Paulo, São Paulo, 2020.

Marine bioproducts have been intensively explored in recent decades, due to the great diversity of molecules not found in other environments which may have pharmacological potential, highlighting the probability of an antitumoral new discovery. In a previous study conducted at Federal University of Ceará, carried out in the coast of Ceará state, twenty microorganisms strains were isolated from the ascidia *Eudistoma vannahmei* and screened for production of antitumor compounds. After qualitative tests five *Micromonospora sp.* strains showed antitumoral activity. These were subject to a quantitative MTT assay, determining the IC₅₀, which ranged from 3.62 to 84 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Subsequently, it was performed the fractionation and characterization of compounds from EVA 0109 extract, resulting in 4 complexes. A new quantitative MTT assay was performed, yielding 12.7 μM IC₅₀ for compound 4, while compounds 2 and 3 were considered inactive (IC₅₀ greater than 70 μM). Contrary to expectations, these results were less expressive than those obtained with crude extracts. In general anthracyclines are almost 100 times more active than their respective aglycones. With the prospect of increasing cancer cases in the coming decades, and still the limited effectiveness of current therapies, it is essential to obtain and understand the activity of new molecules, as well as understanding the biosynthesis of compounds for later inference to obtain improved products. This work analysed the genome of BRA 006A strain, whose crude extract had shown relevant results in the antitumor activity tests in previous work, and also to verify if there is a complete gene cluster for anthracycline synthesis and to characterize the strains through the construction of a phylogenetic tree. Several bioinformatics tools were used to identify a complete anthracycline cluster. The new potential encoded anthracycline has not been described in the literature. Sugars have also a methylation pattern no described. BRA 006 A presents genome with *Micromonospora sp.* typical characteristics such genome size (6.73 Mbp) and GC content (73%) with values in the range observed for the genus and the presence of several secondary metabolite cluster frequently found were present such as “sioxanthin”, “alkyl-o-dihydrogeranyl-methoxyhydroquinone” and “lymphostin”. Based in the results of the fenetic tree, built by MLSA, it is supposed that BRA 006 A is a unidentified species whose nearest known strain is *Micromonospora tulbaghia* DMS45142. The characteristics of the genome were validated with the results of the tree, because is observed the subgroup mean values. A complete anthracycline cluster was identified by several bioinformatics tools, the bibliographic surveys indicates that is a potential new compound. The sugars residues present methylation pattern not observed in the structures described in the consulted literature. In addition to the anthracycline cluster, other clusters with potential interest for

the investigation of molecules of pharmacological significance were found, such as two lantipeptide clusters, one of bacteriocins, seven of NRPS's, six of terpenes, two of PKS II (that include the anthracycline cluster) and four of PKS I, include one that present similarity with 44% of the genes of Stambomycin cluster, compound with related antitumoral potential.

Key words: *Micromonospora* sp. Anthracyclins. Antitumor. Marine microorganisms. Biosynthetic clusters.

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1 - Policetídeos.....	39
Figura 2 - Antraciclina e antraciclina.....	40
Figura 3 - Via sintética de antraciclina.....	42
Figura 4 - Complexos caracterizados por Souza <i>et al</i> (2013).....	45
Figura 5 - Árvore fenética de BRA 006 A.....	58
Figura 6 - Cromatografia de Camada Delgada (CCD).....	59
Figura 7 - Cluster biossintético tipo PKS 2 de BRA 006 A.....	76
Figura 8 - Formação da unidade iniciadora.....	78
Figura 9 - Formação da cadeia de β -cetoacil.....	79
Figura10 - Formação da aglicona.....	80
Figura 11 - Modificação da aglicona.....	81
Figura 12- Formação de dióxi-açúcares.....	83

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1 - Reagentes utilizados na PCR para amplificação do gene de 16S RNA.....	52
Tabela 2 - Parâmetros utilizados na PCR para amplificação do gene de 16S RNA.....	53
Tabela 3 - Reagentes utilizados na PCR para amplificação do trecho do cluster de antraciclina.....	53
Tabela 4 - Parâmetros utilizados na PCR para amplificação do trecho do cluster de antraciclina.....	54
Tabela 5 - Dados dos genomas de BRA 006 A, <i>Micromonospora tulbaghia</i> DSM 45142, <i>Micromonospora aurantiaca</i> ATCC 27029 e <i>Micromonospora sediminicola</i> DSM 45794.....	60
Tabela 6 - Análise de metabólitos secundários.....	66
Tabela 7 - Comparação de clusters de antraciclina.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS

NIH	National Institute of Health
NCI	National Cancer Institute
PKS	Polyketide Sintase
ACP	Acyl Carrier Protein
KS	Ketosynthase
CLF	Chain Length Factor
MAT	Malonil-CoA-ACP transacilase
KR	Ketoreductase
ARO	Aromatase
OXY	Oxygenase
CYC	Cyclase
MET	Methyltransferase
MTT	3-(4,5-dimetil-2 tiazolil)-2,5-diafenil-2H-tetrazolil brometo]
CCD	Cromatografia de Camada Delgada
MLSA	Multilocus Sequence Analysis
DNA	Deoxyribonucleic acid
RNA	Ribonucleic acid

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	29
1.1 <i>Fármacos de Origem Marinha</i>	30
1.2 <i>Antitumorais</i>	33
1.3 <i>Actinobacteria</i>	34
1.4 <i>Micromonospora sp.</i>	36
1.5 <i>Policetídeos</i>	38
1.6 <i>Antraciclinas e antraciclínonas</i>	40
1.7 <i>Via Biossintética das Antraciclínonas</i>	41
1.8 <i>Policetídeos de cepas de Micromonosporas sp. do litoral cearense</i>	43
2 JUSTIFICATIVA	47
3 OBJETIVOS	49
4 MATERIAL E MÉTODOS	51
4.1 <i>Cultivo</i>	51
4.2 <i>Extração do DNA</i>	51
4.3 <i>Eletroforese</i>	51
4.4 <i>Amplificação de genes por PCR</i>	52
4.4.1 <i>Amplificação do gene de 16S RNA</i>	52
4.4.2 <i>Amplificação de trecho do cluster de antraciclina</i>	53
4.5 <i>Sequenciamento</i>	54
4.6 <i>Montagem do genoma e anotação funcional</i>	54
4.6.1 <i>Montagem do genoma</i>	54
4.6.2 <i>Análise de sintenia para aprimoramento da montagem do genoma</i>	55
4.6.3 <i>Anotação funcional com software RAST v 2.0 (AZIZ et al, 2008)</i>	55
4.6.4 <i>Identificação de Cluster de PKS II e via biossintética</i>	55
4.7 <i>Construção de árvore fenética através de análise de multilocus de sequências</i>	55

<i>4.8 Verificação da presença de antraciclinonas no extrato bruto através de cromatografia de camada delgada (CCD)</i>	56
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
<i>5.1 Árvore fenética</i>	57
<i>5.2 Verificação da presença de antraciclinonas através de cromatografia de camada delgada (CCD)</i>	59
<i>5.3 Comparação dos dados genômicos</i>	60
<i>5.4 Metabólitos secundários</i>	62
<i>5.5 Análise do cluster tipo PKS II de BRA 006 A</i>	66
<i>5.5.1 Via biossintética da antraciclina supostamente codificada por BRA 006 A</i>	77
<i>5.5.1.1 Formação da unidade iniciadora</i>	77
<i>5.5.1.2 Formação da cadeia de β-cetoacil</i>	78
<i>5.5.1.3 Formação da aglicona</i>	79
<i>5.5.1.4 Modificação da aglicona</i>	80
<i>5.5.1.5 Ativadores de Glicosiltransferase</i>	81
<i>5.5.1.6 Formação de deóxi-açúcares</i>	82
<i>5.6 Confirmação do cluster único através de PCR</i>	83
6 CONCLUSÃO	85
7 REFERÊNCIAS	87

1 INTRODUÇÃO

Seres vivos de diferentes grupos têm servido de fonte para obtenção de produtos terapêuticos desde a antiguidade. De acordo com Dias *et al* (2012), usos destes produtos estão documentados em compêndios como papiros egípcios datados de 2900 A.C e tábuas de argilas encontradas na Mesopotâmia, de 2600 A.C. Ainda de acordo com Dias *et al* (2012) com o avanço da ciência conseguiu-se isolar produtos metabólicos destes organismos, e um dos primeiros exemplos documentados foi o isolamento da morfina a partir da papoula (*Papaver somniferum* L.), primeiramente descrita em 1803. Anos mais tarde, em 1929, a penicilina foi isolada por Fleming a partir de um fungo do gênero *Penicillium*. A divulgação dos primeiros dados clínicos referentes à penicilina G inspirou grandes esforços nas décadas seguintes na busca de produtos naturais com ação terapêutica. Os microrganismos, especialmente as bactérias da classe *Actinobacteria*, são as fontes mais exploradas na busca por antibióticos e outros compostos de interesse farmacológico (DIAS *et al.*, 2012).

Esses produtos são derivados do metabolismo dos organismos produtores. O metabolismo das bactérias é dividido em primário e secundário: enquanto o metabolismo primário inclui as reações básicas para o desenvolvimento e homeostase do organismo, o metabolismo secundário é ativado normalmente em condições excepcionais como escassez de nutrientes e outras situações de estresse, e é neste segundo tipo que tem origem os produtos naturais de interesse. O metabolismo primário e secundário normalmente tem origem em uma mesma via metabólica que se bifurca, sendo que em condições normais, diversos sistemas regulatórios induzem a continuidade da via no sentido do metabolismo primário. Na ausência de nutrientes fundamentais para o metabolismo básico e/ou na presença de diversas sinalizações, ocorre o metabolismo secundário. Ainda não se conhece totalmente a função da maioria dos metabólitos secundários para os organismos produtores em seus ambientes naturais. A função ecológica melhor caracterizada é a dos antibióticos. Essas moléculas apresentam grande vantagem em ambientes pobres em nutrientes, através da morte ou inibição de competidores. Porém, evidências indicam outras funções para produtos de metabolismo secundário, como compostos foto-protetores de cianobactérias,

ou pigmentos produzidos por *Rickettsiella* sp endossimbiontes de uma espécie de pulgão, que conferem ao hospedeiro proteção contra predadores (O'BRIEN, J. & WRIGHT, G.D., 2011). Os microrganismos têm se destacado como fonte de compostos terapêuticos para o tratamento de diversos tipos de doenças. O período entre os anos 40 e 60 foi considerado a era de ouro dos antibióticos. Nessa época houve um elevado número de descobertas, seguido por um período de baixa na quantidade de descobertas, devido a limitações tecnológicas e de inovações metodológicas. O avanço da tecnologia e novas metodologias de pesquisa deram novo fôlego à busca por fármacos de origem natural e também ao desenvolvimento de fármacos sintéticos, como os métodos de desenho racional de drogas. Os produtos naturais continuam sendo de grande importância, usados como base para o desenho de drogas semi-sintéticas ou totalmente sintéticas. Outra abordagem muito explorada é a da modificação genética do organismo produtor para melhoramento do produto de interesse (BÉRDY, 2012).

1.1 Fármacos de origem marinha

Os oceanos cobrem cerca de 71% da superfície terrestre. Por volta de 50% dessa área tem profundidade maior que 3000 m, sendo a profundidade média de 3800 m. Apenas 5 % do oceano profundo já foi explorado, sendo que menos de 0,01% do solo profundo já foi amostrado e estudado com detalhes (LLODRA *et al*, 2010). Segundo Costello e Chhaya (2017), as estimativas apontam que 2/3 das espécies marinhas já devem ter sido identificadas, mesmo número para espécies terrestres e, ao contrário do que se dizia anteriormente, não há evidência de uma maior biodiversidade nos oceanos que no ambiente terrestre e espera-se que, mesmo com a aceleração das descobertas de espécies marinhas, estas continuem sendo cerca de 16% do total de espécies. Supunha-se anteriormente que haveria uma grande variedade de microrganismos marinhos, porém se baseavam na grande variedade local, de acordo com a profundidade, características do sedimento, presença de hospedeiros etc, mas a variedade local não se reflete em variedade global. Os microrganismos são, particularmente ubíquos. Porém, o mesmo trabalho aponta a grande diversidade genética dos microrganismos marinhos, que, apesar de não significar necessariamente diversidade de espécies, deve indicar grande diversidade de linhagens e de

adaptações à situações particulares, o que é de grande interesse para a mineração de produtos com potencial farmacológico, dada a diversidade bioquímica decorrente disto.

Apesar de no início do século XIX organismos terem sido recuperados em profundidades relativamente baixas, apenas com as expedições Challenger (1872-) e Galata (1950-1952) - que extraiu animais vivos da costa das Filipinas, a 190 m de profundidade - chegou-se a conclusão que animais poderiam ser recuperados em qualquer profundidade, a não ser, talvez, em zonas anóxicas do Mar Negro (apesar de considerarem a possibilidade de encontrar animais nestas regiões, em cadeias alimentares baseadas em produtores primários quimiolitotróficos). Não há registro do início do uso de substâncias de origem marinha pela humanidade, mas aparentemente isso se deu na região da China ou do Japão. No Japão já é utilizada a muito tempo a toxina extraída do peixe baiacu (a tetrodoxina), para facilitar a pescaria, enquanto na China utilizam-se extratos de origem marinha em misturas da medicina tradicional chinesa. (NEWMAN *et al*, 2016)

Limitações tecnológicas adiaram a exploração dos bioprodutos marinhos. O primeiro equipamento moderno de mergulho individual, o aparato de mergulho autônomo, conhecido como SCUBA (Self Contained Underwater Breathing Apparatus) foi o Aqualung, criado em 1942 por Émile Gangnan e Jacques Costeau. Esse equipamento facilitou a coleta de amostras das profundezas marinhas. Nos anos 60, químicos dos Estados Unidos (como Paul Scheuer e Richard Moore), da Europa (como Luigi Minale e Ernesto Fattorusso, da Itália) e de um pequeno grupo do Japão, começaram a realizar coleta de espécies marinhas, incluindo esponjas, algas, entre outros, e explorar a sua diversidade química e, para sua surpresa, encontraram grande variedade de moléculas de tipos ainda desconhecidos, que desafiavam o entendimento que se tinha até o momento sobre biossíntese de moléculas. Estes químicos chegaram a conclusão de que os animais marinhos seriam uma fonte extremamente rica de novos compostos químicos. Durante os anos 70 novos grupos continuaram explorando este campo, tendo como grande feito o entendimento da fonte destes compostos e a extensão da diferença destes em relação aos compostos obtidos em meio terrestre. Foram encontrados, por exemplo, classes inteiramente novas de terpenóides, formados pela reação de halogênios, sendo que os halogênios só tinham sido

encontrados, até então, como substituintes em moléculas complexas. Também identificou-se nesse período moléculas com grupamentos não encontrados anteriormente, como os dicloridos carbonimidicos (WRATTEN e FAULKNER, 1977) e moléculas de tamanhos e complexidades nunca antes observadas, como a toxina brevetoxina B (LINS et al, 1981). Nesta época era difícil a obtenção de fundos para pesquisas explorando estes compostos, até por que os oceanógrafos da época não entendiam a relevância destas. Mas estes químicos pioneiros percebiam o grande potencial a ser investigado. Quanto à disponibilização de recursos financeiros, uma grande exceção era o “National Sea Grant Program” (Estados Unidos), que tiveram a sabedoria de antever a descoberta de drogas marinhas, e foram posteriormente recompensados com grandes sucessos. Posteriormente, a Divisão de Química e Ciências Oceanográficas da “U.S. National Science Foundation” também se envolveu neste novo campo de estudo. No início dos anos 80 um pequeno grupo estabeleceu um novo componente na ecologia marinha, chamado de ecologia química marinha, que estudava o complexo sistema de defesa e sinalização química de plantas e animais marinhos de corpo mole (Fenical, 2006).

Reconhecendo o potencial de novas descobertas no ambiente marinho, alguns cientistas, a partir da metade da década de 80, começaram a perceber como a complexidade química deste ambiente poderia ser aplicada para área da saúde humana. Pesquisadores acadêmicos buscaram colaboradores na indústria e requisitaram ao “National Institute of Health” (NIH) para apoiar os empreendimentos. O sucesso dos resultados neste período foi lento, porém contínuo. Com ajuda de cientistas da Estee Lauder (companhia de cosméticos) pesquisadores do Sea Grant (instituto de pesquisa do estado da Califórnia) desenvolveram, em 1986, a pseudopterosina, a partir de produto do coral mole *Pseudopteroergorgia elisabethae*, como pode ser visto em Look *et al* (1986). Um produto ainda utilizado atualmente que reduziu dramaticamente as respostas alérgicas a loções de pele que ocorrem em alguns indivíduos, além de apresentar propriedades antiinflamatórias. Foi o primeiro produto “cosmético” clinicamente testado de origem marinha.

O National Cancer Institute (NCI) iniciou nos anos 60 um programa de parceria com laboratórios acadêmicos, para triagem de antitumorais a partir de diversas fontes, incluindo

organismos marinhos, conforme Newman et al (2016). Segundo Fenical (2006), as amostras marinhas apresentam os maiores potenciais para descoberta de compostos anticâncer. Serviu como evidência do potencial de sucesso deste empreendimento o subsequente isolamento de mais de 500 moléculas com capacidade de inibir o crescimento de células cancerígenas, utilizando-se concentrações sub-micromolares. De acordo com Fenical (2006), tais moléculas foram encontradas principalmente em invertebrados marinhos, como esponjas, acídias e briozoários, os quais foram posteriormente reconhecidos como os mais quimicamente prolíficos entre os grupos de animais marinhos.

1.2 Antitumorais

Um ramo da pesquisa em biofármacos intensamente explorado é o que envolve a busca por fármacos antitumorais, devido à grande incidência, morbidade e mortalidade desta doença nos tempos atuais, relacionados a hábitos da modernidade e envelhecimento da população. Mundialmente, segundo o Global Burden of Disease Cause of Death de 2016 (GBD, 2016) uma em cada seis mortes são devidas ao câncer, sendo a segunda maior causa de morte, sendo que em torno 9,5 milhões de pessoas por ano morrem de algum tipo de câncer (em primeiro lugar estão as mortes devidas a doenças cardiovasculares. Segundo Sterwart e Wild (2014), 70% das mortes devido ao câncer ocorrem em países de baixa ou média renda. O relatório World Health Statistics de 2019 (WHS, 2019) aponta que doenças relacionadas ao consumo de tabaco causam mais morte em homens que em mulheres, mundialmente, devido ao tabagismo ser maior em homens, fazendo com que a taxa de morte por câncer de pulmão tenha sido em média de 31,3 para cada 100 mil habitantes para homens e de 14,4 para cada 100 mil habitantes para mulheres. Os impactos econômicos do câncer foram de cerca de 1,16 trilhão de dólares em 2010, também segundo Sterwart e Wild (2014). Com o diagnóstico cada vez mais precoce e o desenvolvimento de novas terapias, tem-se aumentado a sobrevida de pacientes de câncer. Cerca de metade dos pacientes dos 20 mais comuns tumores malignos e aproximadamente 80% dos pacientes de tumores de pulmão, linfomas, melanomas e câncer de útero, sobrevivem por mais 10 de anos. No Reino Unido a sobrevida dobrou para os adultos nos últimos 40 anos e triplicou entre os pacientes infantis desde 1960 Com este aumento na sobrevida de pacientes de

câncer, porém, aumenta a incidência de dos efeitos cardíacos adversos da terapia antitumoral, relacionados especialmente às antraciclinas, segundo McGowan (2017). Em um estudo de coorte nos Estados Unidos, realizado por Ning *et al* (2012), com 1807 pacientes de câncer observados por 7 anos, a mortalidade relativa a doenças cardíacas e a devida a câncer foram de 33% e 55% respectivamente. Em análise realizada por Swain *et al* (2003) demonstrou as porcentagens de injurias cardíacas devidas a tratamento com antraciclina de 7%, 18% e 65% para, respectivamente, as doses cumulativas de 150 mg/m², 350 mg/m² e 550 mg/m². A causa desse efeito colateral é multifatorial, um dos mais evidentes e bem estudados fatores é a ação das espécies reativas de oxigênio, geradas na interação de antraciclinas com co-enzimas redutoras, que causam danos ao DNA e disfunção mitocondrial. Outro fator que contribui para cardiotoxicidade é a interação de antraciclinas com a Topoisomerase II e o DNA, causando quebra na dupla fita e interrupção do ciclo celular, induzindo a apoptose (HENRIKSEN, 2017; MCGOWAN, 2017).

1.3 Actinobacteria

O filo *Actinobacteria* é um dos maiores grupos dentro do domínio Bacteria. Inclui microrganismos residentes nos mais diversos habitats, como solo (representando cerca de 95% da comunidade), água doce, água marinha, ar, endossimbiontes de plantas e de animais (alguns patógenos). Tem papel muito relevante nos ciclos biogeoquímicos, participando da decomposição de cadeias complexas de carboidratos. São bactérias Gram positivas, com alto conteúdo de citosina (C) e guanina (G) no DNA. A maioria das *Actinobacteria* são aeróbios, porém há exceções. Da mesma forma, podem-se encontrar representantes quimioautotróficos, porém a grande maioria são quimioheterotróficos, aptos a utilização de variada fonte de nutrientes, incluindo polissacarídeos complexos (BARKA *et al.*, 2016)

A maioria dos membros do grupo são saprofíticos que passam a maior parte do seu ciclo de vida em estado de latência, principalmente em situações de limitação nutricional. A faixa de temperatura ótima costuma ser entre 30 a 35°C, sendo que para actinobacterias termotolerantes a faixa varia entre 50 e 60°C. Sobrevivem em ambientes com pH entre 6 e 9, tendo melhor crescimento quanto mais próximo o ambiente estiver da neutralidade. Outro

fator importante para o grupo é a umidade, tendo seu crescimento limitado em solos muito secos (BARKA *et al*, 2016).

O filo *Actinobacteria* possui 6 classes, 5 subclasses, 6 ordens e 14 subordens. Das 53 famílias do filo, 43 estão incluídas em uma única classe, também chamada *Actinobacteria* (assim como o filo). Entre estas famílias está aquela que inclui as cepas em estudo, a família *Micromonosporaceae*, da ordem *Micromonosporales*. (LUDWING *et al*, 2012)

As actinobacterias formam micélios não septados, apresentando morfologia análoga à dos fungos. A maioria dos gêneros do grupo desenvolve ao longo do ciclo de vida dois tipos de micélios: micélio substrato e o micélio aéreo. Reproduzem-se por fissão binária ou pela formação de esporos ou conídeos. A esporulação das *Actinobacterias* ocorre através da segmentação, fragmentação ou pela formação de conídeos. A aparência da cultura em ágar é normalmente compacta, formando uma estrutura seca, muitas vezes coberta com micélio aéreo. O micélio aéreo, de acordo com Anandan *et al* (2016) é normalmente mais grosso que o micélio substrato, e apresenta características bastante diversas, permitindo dividir as espécies em grupos com diferentes “texturas” (algodonado, aveludado ou pulverulento) pela formação de anéis ou zonas concêntricas e pela pigmentação. O micélio substrato também pode ser diferenciado, pela forma, grossura ou coloração. Ainda quanto à morfologia, tem-se como critério de classificação a forma e arranjo do esporos (ANANDAN *et al*, 2016).

A classe *Actinobacteria* é um grupo muito explorado pelo interesse para a biotecnologia, principalmente relacionada à indústria farmacêutica. Grande parte dos antibióticos, antitumorais e outros medicamentos, em uso ou em fase de pesquisa, são isolados a partir de bactérias desse grupo. Mesmo o avanço do desenvolvimento de fármacos sintéticos não torna irrelevante a descoberta de compostos naturais, pois estes servem de base para formulação de produtos sintéticos ou de referência para criação de estruturas totalmente sintéticas. O gênero *Streptomyces* é o mais explorado na busca por novos fármacos, pela ampla produção de compostos relevantes e por metodologias padronizadas e bem estabelecidas para o seu estudo, desde o cultivo até as metodologias de

biologia molecular (ANANDAN *et al*, 2016)

A maior parte dos estudos já realizados envolvendo o isolamento de linhagens da classe *Actinobacteria* concentra-se em espécies de solo, em regiões facilmente acessíveis. Entretanto, recentemente, a coleta de linhagens em ambientes de difícil acesso, como o fundo do mar ou geleiras, tem crescido exponencialmente. Isto é motivado pela grande diversidade de novos compostos com grande potencial encontrados, o que ocorre devido às pressões ambientais diversas nesses locais, que, por sua vez, induzem à evolução de vias metabólicas diversas (ANANDAN *et al*, 2016)

1.4 *Micromonospora sp.*

As bactérias pertencentes ao gênero *Micromonospora sp.* possuem micélios ramificados, bem desenvolvidos, com média de 0,5 μm de diâmetro. Os esporos são imóveis, individuais, sésseis, ou em esporóforos curtos ou longos, que também podem ocorrer em grupos ramificados. Normalmente os esporóforos se desenvolvem de maneira monopodial (a partir da extremidade do micélio), mas algumas vezes simpodial (a partir de ramificações laterais do micélio). São raras as espécies que apresentam micélio aéreo, sendo os esporos originados diretamente do micélio de substrato. A parede é constituída de ácido meso-diaminopimérico (meso-DAP) e/ou derivados e glicina. Na hidrólise da célula encontra-se xilose e arabinose. Os fosfolípidos característicos são: fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol. Menaquinonas mais comuns são: MK-9 (H4), MK-10(H6) ou MK-12 (H6). A maioria das espécies é aeróbia, mas algumas são microaeróbias. São sensíveis a pH menor que 6, e o crescimento ocorre normalmente entre 20 e 40 °C. Fisiologicamente e bioquimicamente o grupo é muito diverso, porém, é bem definido em termos de morfologia, quimiotaxonômia e filogenia (GENILLOUD, 2012).

Em meio ágar, as colônias inicialmente tem a coloração entre amarelo pardo a laranja claro. Depois, normalmente adquirem cores como laranja, vermelho, verde azulado ou púrpura. Colônias maduras geralmente apresentam esporos em cores do preto ao marrom e adquirem consistência mucóide. Os pigmentos entre amarelo, laranja e vermelho possuem pequeno valor para reconhecimento de espécies. O desenvolvimento do micélio e a morfologia dos esporóforos também geralmente não têm muito valor para identificação de

espécies, pois estas podem variar de cultivo para cultivo, ou até aparecer de forma mista numa mesma cultura. O primeiro caso ocorre, por exemplo, em algumas espécies de *Micromonospora sp.* que eventualmente apresentam o esporóforo *simpodial* característico de *M. carbonacea*. (GENILLOUD, 2012)

O gênero foi primeiramente isolado como organismo endofítico, presente em nódulos de legumes. Posteriormente foi encontrado nos mais diversos habitats. De acordo com Berdy (2005), é o segundo gênero bacteriano com mais antibióticos reportados na literatura. Segundo Talukdar *et al* (2016) esse número é superior a 700 compostos, dentre os quais a maioria pertence ao grupo dos aminoglicosídeos, como a gentamicina e a sisomicina, que tem ação bactericida contra bactérias gram negativas. Ainda segundo Talukdar *et al* (2016), o segundo tipo mais comum de composto seriam os macrolídios, como a megalomicina, que possuem espectro similar ao da penicilina, porém um pouco mais amplo, e podem ser utilizados, por exemplo, em casos de infecção do aparelho respiratório em pacientes alérgicos à penicilina. Também de acordo com o mesmo trabalho há algumas antraciclinas produzidas por bactérias do gênero *Micromonospora sp.*, como doxorubicina e 11-deoxi-daunorubicina. Espécies do grupo possuem potencial ainda para serem aplicados como promotores de crescimento e biocontrole em plantas, além da produção de biocombustíveis (pela produção de enzimas que possibilitam a quebra da parede celular de vegetais), de acordo com Barka *et al* (2016).

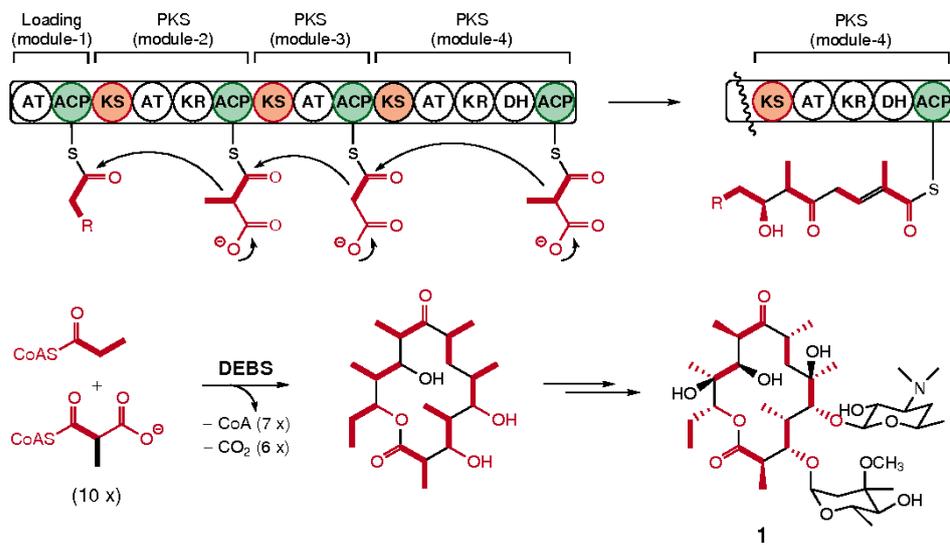
O gênero *Micromonospora* pertence à família *Micromonosporaceae*, ordem *Micromonosporales*, que está incluindo na classe *Actinobacteria*. As espécies deste gênero, na árvore filogenética baseada em rRNA, apresentada no Manual Bergey (LUDWING *et al*, 2012), não formam um clado próprio dentro da família *Micromonosporaceae*, *Micromonospora chalcea*, por exemplo, aparece em um clado contendo os gêneros: *Actinoplanes*, *Catellatospora*, *Longispora*, e *Planosporangium*. As espécies não são bem definidas apenas levando em conta a comparação de genes de 16S RNA, sendo necessário utilizar outros métodos complementarmente, como a análise de sequência de multilocus (Multilocus Sequence Analysis – MLSA), utilizada para o gênero *Micromonospora sp* em Carro *et al* (2012) que consiste na obtenção de sequências de genes filogeneticamente

conservados, conhecidos como “housekeeping genes” (exemplos: *gyrB* que codifica a subunidade B da girase; *rpoB*, da subunidade β da RNA polimerase; *atpD*, da subunidade β da ATP sintetase). As sequências dos “housekeeping genes” são então reunidas (concatenadas) em uma única sequência, isso é feito com todas as cepas a serem comparadas, posteriormente é feito o alinhamento destas sequências concatenadas e construída, a partir deste alinhamento, a árvore fenética correspondente. Além disso, utilizam-se critérios bioquímicos, como composição de ácidos graxos da parede, morfológicos, como a coloração dos micélios e fisiológicos, como os açúcares metabolizados (Carro *et al*, 2018)

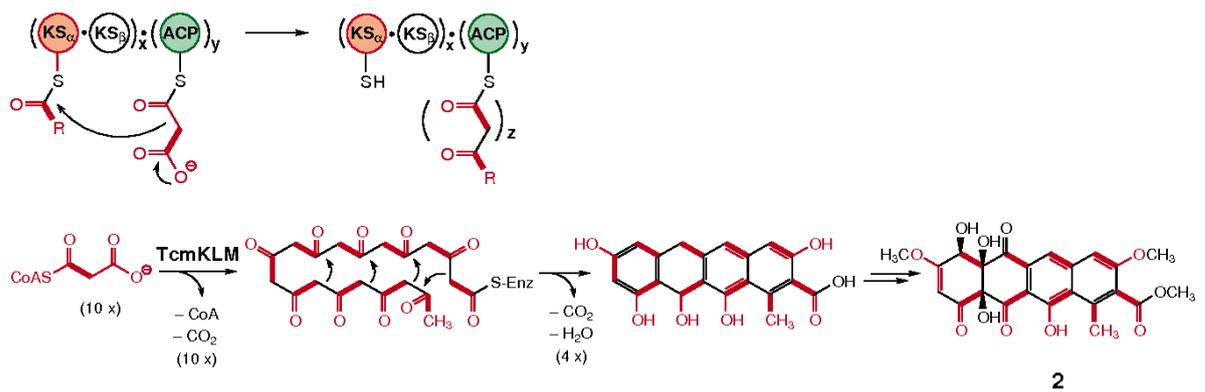
1.5 Policetídeos

Policetídeos, segundo Miyanaga (2017), são uma classe de compostos formados por enzimas similares às das vias biossintéticas dos ácidos graxos, que realizam a condensação de acetatos, formando uma cadeia policetídica (poli: vários, cetídeos: referente a acetatos). Posteriormente, essa cadeia sofre diversas modificações, podendo ser: ciclização, aromatização, redução, metilação, glicosilação etc. Os policetídeos são divididos em 3 grupos, os de tipo I são sintetizados por uma série de proteínas modulares, em uma ordem específica, cada uma realizando uma etapa da síntese (complexo multienzimático PKS I). Exemplo de policetídeo de tipo I são os antibióticos macrolactâmicos como a vicanistatin isolada de *Streptomyces halstedii* HC34. No caso dos policetídeos de tipo II, formados pelo complexo enzimático PKS tipo II, a cadeia policetídica é formada um grupo de enzimas (pks mínimo) que age reiteradamente, realizando as diversas condensações da cadeia, as antraciclinas (BROCKMANN, 1963) como a doxorubicina, são formados por este tipo de complexo enzimático. Já o complexo PKS III é formado por enzimas homodiméricas, um pouco diferentes das PKS I e II produz diversos policetídeos aromáticos como lipídios fenólicos e polifenólicos em plantas, fungos e bactérias. Outra característica da síntese dos policetídeos do tipo III é ausência das proteínas carreadoras de proteínas, em inglês acyl Carrier protein (ACP), sendo por isso chamadas de ACP-independent. Exemplo de composto, formado por complexo enzimático tipo PKS III, de acordo Yu *et al* (2012), é o “1,3,6,8-tetrahydroxynaphthalene” (THN), um precursor de “hexahydroxyperylenequinone melanin” de *Streptomyces griseus*.

(a) Type I PKS (noniterative)



(b) Type II PKS (iterative)



(c) Type III PKS (ACP-independent & iterative)

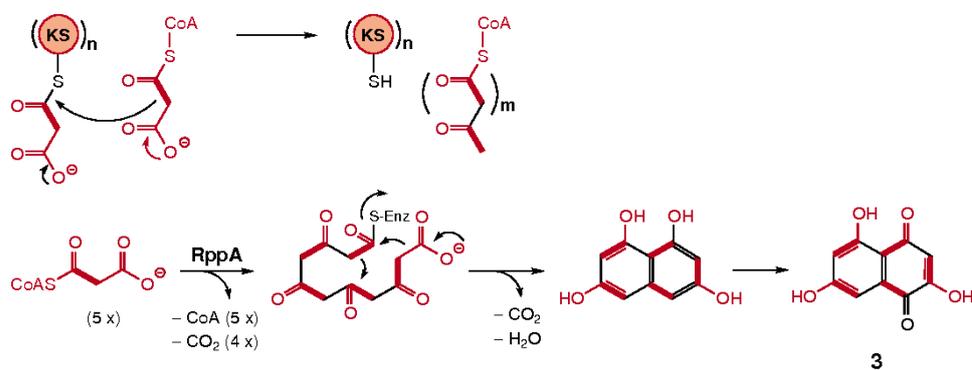


Figura 1 Pòlicetídeos. (a) tipo I, modular; (b) tipo II, iterativo; (c) tipo III, independente de ACP e iterativo.

Fonte: SHEN, 2003.

1.6 Antraciclina e antraciclina

Antraciclina é a forma como se denomina a aglicona das antraciclina, ou seja, a estrutura sem as cadeias laterais de açúcar (YU *et al*, 2012). O nome **antraciclina** foi dado por Brockman *et al.* (1950), ao ser identificado um corante opticamente ativo, vermelho-amarelado ou vermelho. O nome foi dado devido à semelhança com o cromóforo antraquinona. A partir de então, o nome antraciclina passou a ser utilizado para se referir aos produtos microbiológicos que contém um motivo de antraciclina (a antraciclina seria a estrutura sem as cadeias laterais de açúcar presentes nas antraciclina, ou seja, as agliconas). A estrutura básica da antraciclina é 7,8,9,10-tetrahidro-5,12-naftacenequinona. A diversidade estrutural se dá a partir de diferentes modificações o esqueleto central policetídeo tetracíclico (aglicona), e também pelos passos de glicosilação. As substituições na aglicona são normalmente catalisadas pelas enzimas “tailoring” (finalizadoras da cadeia), que agem de forma subsequente à PKS (também chamadas, por isso, de enzimas pós-PKS), com diversas funções: hidroxilação, redução, metilação e glicosilação. Exemplos de antraciclina cujas estruturas tridimensionais já foram definidas são: daunorrubicina, nogalimicina, aclacinomicina A e B. As antraciclina, pertencem ao grupo dos policetídeos tipo II, os policetídeos aromáticos, construídos pelo complexo PKS tipo II (SULTANA, 2006; YU *et al*, 2012)

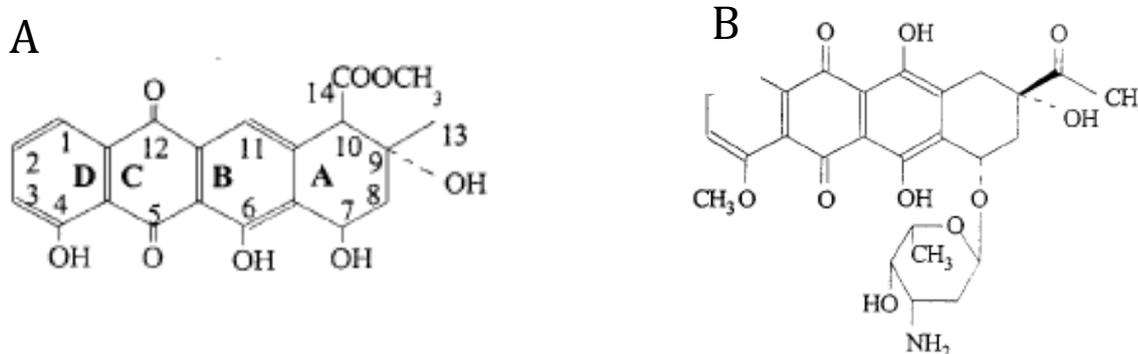


Figura 2 Antraciclina e antraciclina. A – auramicinona, exemplo de antraciclina; B – daunomicina, exemplo de antraciclina. Fonte: KANTOLA *et al*, 2000.

As primeiras antraciclina com efeito antibiótico descobertas foram a rodomicina,

identificada por Brockman (1963), a daunorrubicina, descoberta independentemente pelos laboratórios Farmitalia e Rhône-Poulenc (Grein et al, 1963; Dubost et al, 1963). Antraciclina foram amplamente utilizadas devido à suas propriedades antitumorais. Doxorrubicina é utilizada principalmente contra tumores sólidos, enquanto daunorrubicina e aclacinomicina são utilizadas no tratamento da leucemia. Os compostos exibem esses efeitos antitumorais através de diversos mecanismos. A maioria dos efeitos está relacionada à sua forte (mas não covalente) intercalação com moléculas de DNA, através, por exemplo, de interações de van-der Waals e pontes hidrogênio. As cadeias de açúcares também afetam a ligação com o DNA, pela ligação com o sulco menor. A inibição da topoisomerase II atua no controle do crescimento das células cancerígenas, e esta inibição pode ser causada por algumas antraciclina através da estabilização de um complexo antraciclina-DNA-topoisomerase II e quebra do DNA. As partes flexíveis dos açúcares podem interagir com a topoisomerase II facilitando a formação do complexo (MCGOWAN, 2017). O uso das antraciclina para o tratamento de tumores é limitado por diversos efeitos colaterais que, por exemplo, acabam limitando a dose máxima de uso. O efeito mais relevante é a cardiotoxicidade (MCGOWAN, 2017).

1.7 Via Biossintética das Antraciclina

As proteínas carreadoras de acetil (Acetil Carrier Protein – ACP), juntamente com a cetossíntase (Ketosynthase α – KS – α ou simplesmente KS) e o fator de alongação da cadeia (Chain Length Factor -CLF ou Ketosynthase β – KS – β), formam o PKS mínimo (minPKS), o complexo responsável pela síntese da cadeia policetílica. A síntese começa normalmente com a descarboxilação, catalizada pela KS, do primeiro malonil ligado ao ACP, seguida pela transferência do acetil formado para o resíduo de cisteína da KS (alguns policetídeos do tipo II, com unidades iniciadoras específicas, iniciam a síntese da cadeia com a ligação da unidade iniciadora com o complexo KS-CLF). Com a descarboxilação do segundo malonil, forma-se um intermediário de acetil carregado negativamente, o qual ataca o grupo carbonil do primeiro acetil ligado ao KS, formando um dicetídeo de quatro carbonos ligado ao ACP. Este é transferido para o resíduo de cisteína da KS e o próximo malonil-ACP é descarboxilado. Esse mesmo tipo de condensação (conhecido como condensação de Claisen) é repetido até

chegar a uma cadeia policetílica do tamanho “correto”. Os resíduos de malonil da síntese de policetídeos são ativados pela transferência deles a partir de malonil-CoA para a ACP, processo catalisado pela malonil-CoA-ACP transacilase (MAT). O dímero KS-CLF determina o comprimento da cadeia (através da determinação do túnel do sítio ativo, dado pela interface do dímero) e também a correta ciclização do primeiro anel da antraciclina (figura 3 – 1). O carbono 9 é reduzido por uma enzima cetorreductase (Ketoreductase – KR) (fig.3 – 2), posteriormente, uma aromatase (ARO) transforma o primeiro anel em um anel aromático (fig.3 – 3), através da ação de uma enzima 12-monooxigenase (OXY) é formado o primeiro intermediário estável (fig.3 – 4), em seguida um grupo metil é adicionado ao grupo ácido carboxílico por uma metiltransferase (MET) (fig.3 – 5), uma ciclase (CYC) realiza o fechamento do anel A (fig.3 – 6) e uma redutase reduz um grupo ceto no carbono 7 (fig.3 – 7) permitindo a posterior ligação de um resíduo de açúcar, através de uma enzima glicosiltransferase (GTF) (fig.3 – 8). (OJA, 2012)

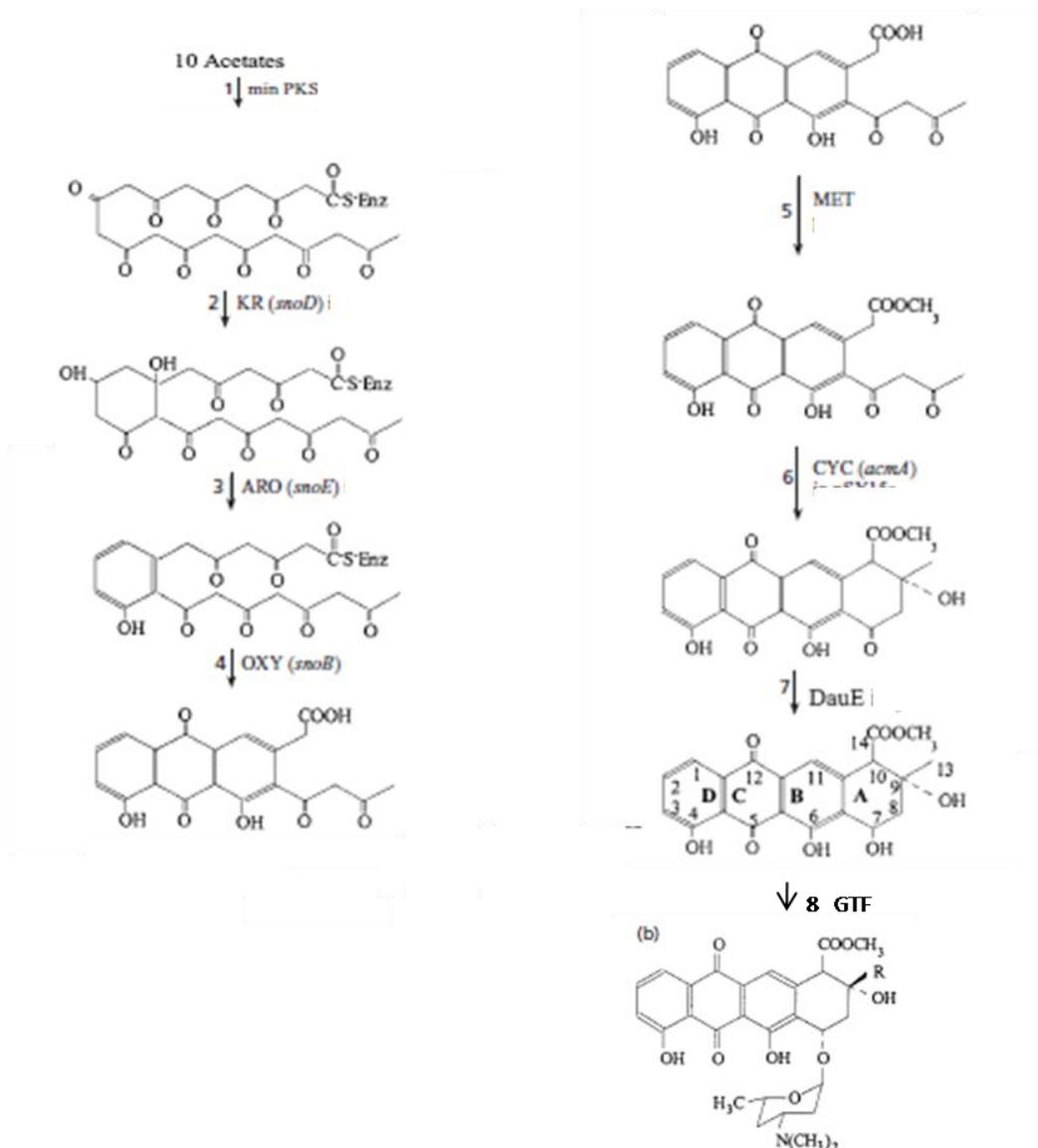


Figura 3 Via sintética de antraciclina.. 1- minPKS (PKS mínimo); 2 – KR (Ketoreductase ou cetorredutase); 3 – ARO (aromatase); 4 – OXY (monooxigenase); 5 – MET (metiltransferase); 6 – CYC (ciclase); 7 DauE (uma redutase) e 8 – GTF (glicosiltransferase). Fonte: adaptado de KANTOLA *et al* (2000)

1.8 Policetídeos de cepas de *Micromonosporas sp. do litoral cearense*

Em estudo conduzido por grupo de pesquisadores da Universidade Federal do Ceará, realizado na costa cearense, foram isoladas vinte cepas de microrganismos da áscidia *Eudistoma vannamei*, para realização de triagem de compostos antitumorais, recebendo a classificação EVA 0101 até EVA 0120, das quais onze foram selecionadas para avaliação de citotoxicidade para células tumorais. Após primeiros testes, de teor qualitativo, utilizando-se o ensaio colorimétrico de MTT [3-(4,5-dimetil-2 tiazolil)-2,5-diafenil-2H-tetrazolil brometo]

com quatro diferentes tipos de células tumorais, cinco cepas se destacaram por seu potencial como antitumoral (EVA 0102, EVA 0103, EVA 0106, EVA 0109 e EVA 0113). Estas foram submetidas a um ensaio de MTT quantitativo, determinando-se o IC 50. A massa do extrato de EVA 0103 foi insuficiente para realização dos ensaios. Para as outras cepas a IC50 variou de 3.62 a 84 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Foram utilizados quatro diferentes tipos de células tumorais nos testes: HL-60 (leucemia promielocítica), MDA-MB-435 (melanoma), SF-295 (glioblastoma) e HCT-8 (carcinoma de colón) (JIMENEZ et al, 2013).

Os cinco complexos, em caracterização química preliminar, foram comparados através de cromatografia de camada delgada (CCD) com detecção por exposição a luz UV (312 e 365 nm) e por spray com solução de vanilina/ácido perclorídrico/EtOH seguido por aquecimento à 100°C. Os extratos também foram analisados por espectroscopia ^1H NMR, apresentando resultados muito similares nessa caracterização inicial. Grupos hidroxil quelados, hidrogênios aromáticos e (ou) lipofílicos, hidrogênios ligados a carbonos oxigenados e prótons metileno, metano e metilo foram identificados. Tais dados são compatíveis com a presença de quinonas ou metabólitos secundários relacionados (JIMENEZ et al, 2013).

Posteriormente, Sousa et al. (2013) realizaram o fracionamento e caracterização de compostos a partir do extrato de EVA 0109. A estrutura dos compostos foi estabelecida por espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (Magnetic Nuclear Resonance – MNR) 1D e 2D, e por espectrometria de massa de ionização por eletro-spray de alta resolução (High-Resolution Electrospray Ionization Mass Spectra – HRESIMS). Os compostos identificados foram: composto 1, isolado como um pó vermelho, de fórmula molecular $\text{C}_{21}\text{H}_{13}\text{O}_5$, caracterizado como 4,6,11- triidroxi-9-propiltetraceno-5,12-diona; composto 2, isolado como um pó laranja, de fórmula molecular $\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{O}_3$, denominado 4-metoxi-9-propiltetraceno-6,11-diona; composto 3, isolado como um pó amarelo, de fórmula molecular $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_4$, caracterizado como 7,8,9,10-tetraidro-9-hidroxi-4-metoxi-9-propiltetra-ceno-6,11- diona e composto 4, obtido também como um pó amarelo, fórmula molecular $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{O}_8$, caracterizado como 10 β -metoxicarbonil-7,8,9,10- tetraidro-4,6,7 α ,9 α ,11- pentaidroxi-9-propil-tetraceno-5,12-diona (estrutura dos compostos na figura 4). Todos foram caracterizados como antracilinas, moléculas semelhantes à antracilinas, porém com ausência dos grupos glicosídicos. No mesmo estudo foi realizado

novo ensaio MTT quantitativo, utilizando-se a linhagem tumoral HCT-8, obtendo-se, para o composto 1, IC50 de 12,7 μ M, para composto 4, 6,2 μ M, enquanto os compostos 2 e 3 foram considerados inativos (IC50 maior que 70 μ M). Ao contrário do esperado, estes resultados foram menos expressivos que os obtidos no estudo de Jimenez et al (2013), com extratos brutos. Muitas vezes, no fracionamento de extratos contendo antraciclinas, os açúcares são quebrados, isolando-se assim antraciclínonas, o que talvez tenha acontecido neste segundo trabalho, o que explicaria a diferença nos resultados do MTT, tendo em vista que as antraciclinas são normalmente muito mais citotóxicas que suas antraciclínonas análogas. Outra possibilidade é a existência de outro composto antitumoral no extrato bruto, não identificado em tal trabalho.

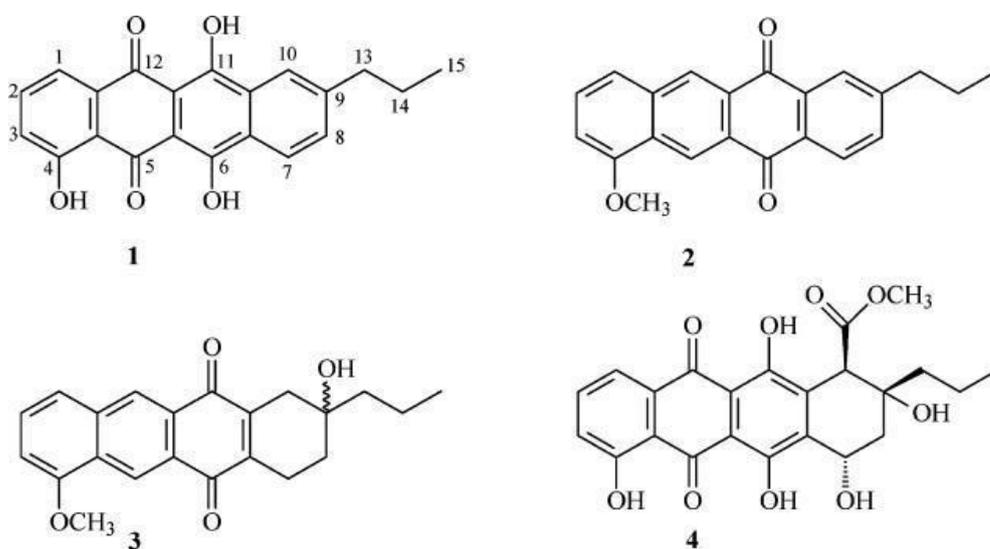


Figura 4 Complexos caracterizados por Souza *et al* (2013). 1: complexo 1; 2: complexo 2; 3: complexo 3; 4: complexo 4.

Jimenez et al. (2013) realizaram a identificação e classificação filogenética dos microrganismos isolados, a partir da comparação das sequências de genes de expressão da subunidade 16S do rRNA das 5 cepas selecionadas para o ensaio MTT quantitativo. O clado EVA foi considerado como um grupo irmão de um clado formado por: *Micromonospora echinospora*, *M. marina*, *M. aurantiaca*, *M. halophytica*, *M. humi*, *M. purpureochromogenes*, *M. coxensis*, *M. chalcea* e *M. tulbaghiae*. O gênero *Micromonospora* faz parte da família *Micromonosporaceae*, ordem *Micromonosporales*, classe *Actinobacteria*, filo *Actinobacteria*. EVA 0109,0113, 0102 e 0106 mostraram grande grau de similaridade,

sendo gerado um único acesso no NCBI para todos eles no banco de dados GenBank do NCBI, sob o número de acesso: JN 797618. A sequência de EVA 0103, ligeiramente diferente das outras, foi depositada sob o número de acesso: JN767618. As linhagens receberam, posteriormente, novos nomes, na ocasião de reorganização do acervo do grupo de pesquisa. A linhagem explorada neste trabalho é anteriormente denominada EVA 0109, agora dividida em BRA 006 A. Escolheu-se esta linhagem por ter apresentado resultados mais notáveis nos testes de atividade antitumoral. Daqui em diante, será utilizada a denominação atual da cepa.

2 JUSTIFICATIVA

Os complexos 1 e 4 indicados na figura 4, anteriormente isolados, (JIMENEZ, 2013), que demonstraram atividade antitumoral, apresentaram IC50 de 12,7 e 6,2 μM respectivamente. Em geral as antraciclinas são cerca de 100 vezes mais ativas que suas respectivas agliconas. Com a perspectiva de aumento de casos de câncer nas próximas décadas e ainda limitada efetividade das terapias atuais, é fundamental a obtenção e compreensão da atividade de novas moléculas, assim como a entendimento da biossíntese dos compostos para posterior interferência (através, por exemplo, da engenharia genética) para obtenção de produtos melhorados.

3 OBJETIVOS

- Analisar o genoma da linhagem BRA 006 A.
- Verificar se há cluster gênico completo para síntese de antraciclina.
- Caracterizar a cepa através da construção de árvore fenética.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Material biológico

Amostra de micélio da cepa BRA 006 A do gênero *Micromonospora sp.*, conservada em glicerol (20%) a -20°C.

4.1 Cultivo

As cepas isoladas foram cultivadas em meio líquido A1 (10% amido solúvel, 4 % extrato de levedura, 2% peptona, 75% água do mar), em “Erlenmeyers” de 250 mL contendo 50 mL de meio. Foram incubadas por 5 dias em agitador automático a 180 RPM e 30°C. Ambas foram também inoculadas em meio sólido A1 (mesma composição que o A1 líquido, acrescentando-se 15g de ágar por mL), em placas de Petri de 9 cm de diâmetro. O cultivo foi realizado em duplicata. As placas foram encubadas por 14 dias em estufa a 30°. Ao final, obteve-se fotografias das placas. Observou-se a morfologia da colônia, sua coloração e também a coloração do substrato (JIMENEZ et al, 2013).

4.2 Extração do DNA

Para extração do DNA genômico, utilizou-se o Kit Wizard[®] Genomic DNA Purification (Promega), conforme instruções do fabricante.

4.3 Eletroforese

Foi realizada corrida em gel de agarose com amostras dos produtos da extração de DNA, para verificar a presença de DNA genômico. Preencheu-se uma cubeta com 90 mL de gel de agarose (0,7%). O gel precisou ser aquecido para ser depositado na cubeta, e depois de seu resfriamento foi adicionado SyBRTM Green Master Mix (Termofisher) na concentração de 2,5 µL/50mL de gel. Foram aplicados µL de amostra do DNA, com adição de 1 µL do corante Blue 6X. Aplicou-se as amostras nos poços do gel, e no poço de uma das extremidades, 5µL de ladder 1K, o marcador de baixo peso molecular, utilizado como padrão para análise da amostra. (OLIVEIRA, 2015)

4.4 Amplificação de genes por PCR

A reação em cadeia de polimerase (Polimerase chain reaction – PCR) foi utilizada para amplificação de trechos do genoma, seguindo os parâmetros descritos abaixo.

4.4.1 Amplificação do gene de 16S RNA

Para amplificação do gene de 16S RNA, utilizou-se os reagentes descritos na tabela 1, com as concentrações indicadas. A tabela 2 apresenta os parâmetros utilizados para a PCR. A amplificação foi confirmada através de eletroforese em gel de agarose, conforme protocolo do item 4.3.2. Foram utilizados os primers padrão para amplificação de gene de 16S RNA: 27F (forward) (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1492R (reverse) (5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3').

Tabela 1 Reagentes utilizados na PCR para amplificação do gene de 16S RNA.

Reagentes	Volume
GoTaqMaster Mix© (Promega)	25 µL
Primer 27F (10 µM)	2 µL
Primer "Reverse" 16S RNA (10 µM)	2 µL
extrato de DNA (concentração: 100 ng/mL)	1 µL
água "Milliq"	15 µL

Tabela 2 Parâmetros utilizados na PCR para amplificação do gene de 16S RNA.

Etapa	Temperatura	Tempo	Ciclos
desnaturação inicial	95° C	2 min.	-
desnaturação	95° C	1 min.	
anelamento dos primers	62°C	1 min.	40 ciclos
extensão	72°C	1 min.	
extensão final	72°C	10 min.	-
Final	4°C	indefinido	-

4.4.2 Amplificação de trecho do cluster de antraciclina

Para amplificação de trecho do cluster de antraciclina, utilizou-se os reagentes descritos na tabela 3, com as concentrações indicadas. A tabela 4 apresenta os parâmetros utilizados para a PCR. A amplificação foi confirmada através de eletroforese em gel de agarose, conforme protocolo do item 4.3.2. Os primers foram desenhados utilizando-se o software Pimer3 na plataforma Geneious ver. 11. Sequência do primer Forward:.. Sequência do primer reverse.

Tabela 3 Reagentes utilizados na PCR para amplificação de trecho do cluster de antraciclina

Reagentes	Volume
EasyPFU	2,5 µL
Primer "Forward"	0,5 µL
Primer "Reverse"	0,5 µL
extrato de DNA (concentração: 70 ng/mL)	1 µL
10X <i>EasyPfu</i> Buffer	2 µL
dNTP's (2,5 mM)	2,5 µL
DMSO (2,5%)	2,5 µL
água "Milliq"	13,5 µL

Tabela 4 Parâmetros utilizados na PCR para amplificação de trecho do cluster de antraciclina

Etapa	Temperatura	Tempo	Ciclos
desnaturação inicial	98° C	3 min.	
desnaturação	98° C	30 s	
anelamento dos primers	56-76°C (gradiente)	30 s	35 ciclos
extensão	72°C	1 min.	
extensão final	72°C	5min.	
Final	4°C	indefinido	

4.5 Sequenciamento

As amostras foram sequenciadas no laboratório Macrogen (Coréia do Sul, Seul). Utilizou-se a plataforma MiSeq da Illumina para o sequenciamento.

4.6 Montagem do genoma e anotação funcional

Após obtida a sequencia genômica, foi realizada a montagem e anotação funcional da mesma, conforme descrito a seguir.

4.6.1 Montagem do genoma

As sequências foram pareadas, mapeadas, pré-processadas (filtrando sequencias de baixa qualidade com a opção "trimmer"). A montagem denovo do genoma foi realizada com o software Geneious ver. 11 (Biomaters, NZ).

4.6.2 Análise de sintenia para aprimoramento da montagem do genoma

Baseado na análise multilocus de sequência, escolheu-se o genoma completo mais similar ao da cepa BRA 006 A para servir de referência para análise de sintenia, utilizando-se o software Medusa (BOSI *et al*, 2015) para aprimoramento da sequência.

4.6.3 Anotação funcional com software RAST v 2.0 (AZIZ *et al*, 2008)

Para anotação funcional rápida dos genomas de BRA 006 A, *Micromonospora tulbaghia*, *Micromonospora aurantiaca* e *Micromonospora sediminicola* utilizou-se o programa RAST v. 2.0 (Rapid Annotation using Subsystem Technology) (AZIZ *et al*, 2008). Utilizou-se o protocolo “default” do programa, acrescentando apenas a criação de mapas metabólicos.

4.6.4 Identificação de Cluster de Antraciclina e Via biossintética

O software AntiSmash (BLIN *et al*, 2019) foi utilizado para a busca por cluster de metabólitos secundários no genoma de BRA 006 A. O programa BLASTp foi utilizado para busca por similaridade no banco de dados de proteínas do NCBI, a partir das ORF's indicadas pelo AntiSmash 5.0 (BLIN *et al*, 2019). O software Kegg foi utilizado para determinação da via biossintética codificada pelo cluster de Antraciclina.

4.7 Construção de árvore fenética através de análise de multilocus de sequências

A estratégia conhecida como Multilocus Sequence Analysis (MLSA) - protocolo adaptada do procedimento utilizado por Carro *et al* (2012) – foi utilizada para obtenção de árvore fenética. Os housekeeping genes utilizados foram *gyrB* (gene da subunidade B da girase), *atpD* (gene da subunidade b da ATP-sintase) e *recA*. O alinhamento de cada tipo de gene foi realizado com a ferramenta ClustaW, através da plataforma Geneious 7.1.9 (Biomatters, NZ), utilizando-se os parâmetros “default”. Através também do Geneious 7.1.9 as extremidades das sequências alinhadas foram deletadas, para obtenção de sequências de mesmo tamanho. Os genes foram concatenados utilizando a ferramenta de concatenação de sequências da plataforma Geneious 7.1.9. A árvore fenética foi construída utilizando-se o programa MEGA com o método de “maximum likelihood”, com 500 replicatas, exibindo valor de bootstrap.

4.8 Verificação da presença de antraciclinonas no extrato bruto através de cromatografia de camada delgada (CCD)

Para verificar a presença dos complexos isolados em Souza *et al* (2013) no extrato bruto das cepas, utilizou-se o método de cromatografia em camada delgada (CCD). Utilizou-se amostras dos extratos brutos de BRA 006 A e BRA 008 A e, para comparação, amostras dos 4 complexos isolados por Souza *et al* (2013). Utilizou-se placa de sílica-gel em folha de alumínio (10x10 cm) e acetato de etila (etOAc) (1:1) como solvente.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir, os resultados obtidos:

5.1 *Árvore fenética*

As bactérias do gênero *Micromonospora* não são bem diferenciadas comparando somente a sequência do gene de 16S RNA, sendo necessário, para construção de árvore fenética, utilizar a estratégia conhecida como Multilocus Sequence Alignment (MLSA). Seguiu-se para isso, neste trabalho, versão adaptada do procedimento utilizado por Carro *et al* (2012). Para seleção das linhagens para o alinhamento, a sequência do gene de 16S de RNA de BRA 006 A foi submetida a alinhamento com o banco de dados de genes de 16S RNA BioCloud, gerando uma lista das linhagens mais próximas. Procurou-se obter as sequências dos housekeeping genes das 20 cepas mais próximas porém para muitas linhagens estas sequências não estavam disponíveis, não podendo ser utilizadas. Optou-se então por realizar levantamento no banco de dados do NCBI das linhagens do gênero *Micromonospora sp.* com tais sequências gênicas disponíveis, certificando-se, porém, que ao menos as 3 cepas mais próximas à BRA 006 A no alinhamento do BioCloud estivessem presentes (estavam presentes algumas outras da lista também). Os housekeeping genes utilizados foram *gyrB* (gene da subunidade B da girase), *atpD* (gene da subunidade b da ATP-sintase) e *recA*. Não utilizou-se *rpoB* (gene da RNA polimerase), utilizado no protocolo de Carro *et al* (2012) por apenas este gene ter não sido encontrado para a linhagem mais próxima à BRA 006A no alinhamento de gene de 16S RNA do banco de dados do BioCloud, o que iria comprometer os resultados. O fato de alguns dos housekeeping genes não terem sido encontrados em algumas cepas se deve ao fato de não haver o genoma completo de muitas e, em outros casos, os trechos relacionados a estes genes não estarem completos nas sequências (certamente por erros no processo de sequenciamento e montagem dos genomas, já estes genes estão conservados em todas as espécies). Foi obtida árvore com 20 espécies, porém observou-se que utilizando-se apenas as 11 linhagens mais próximas à BRA 006 A a informação ficaria mais clara. Os valores de bootstrap nos clados que envolvem *Micromonospora siamensis*, *Micromonospora sediminicola*, *Micromonospora aurantiaca*, *Micromonospora tulbaghiae* e BRA 006 A, sugerem que as relações estabelecidas entre estas linhagens são confiáveis (valores de 100 ou, no caso do clado que envolve BRA 006 A e

Micromonospora tulbaghia, 92). Porém, o valor de bootstrap de 92 entre BRA 006 A e *Micromonospora tulbaghia* indica que, embora sejam próximas, e *Micromonospora tulbaghia* seja a linhagem mais próxima à deste trabalho, entre as disponíveis nos bancos de dados acessados, certamente não pertencem a mesma espécie, podendo BRA 006 A ser uma espécie nova (o que precisaria ser confirmado através de parâmetros bioquímicos, morfológicos e fisiológicos). A figura 5 apresenta árvore fenética construída a partir do alinhamento através do software MEGA pelo método de “maximum likelihood”.

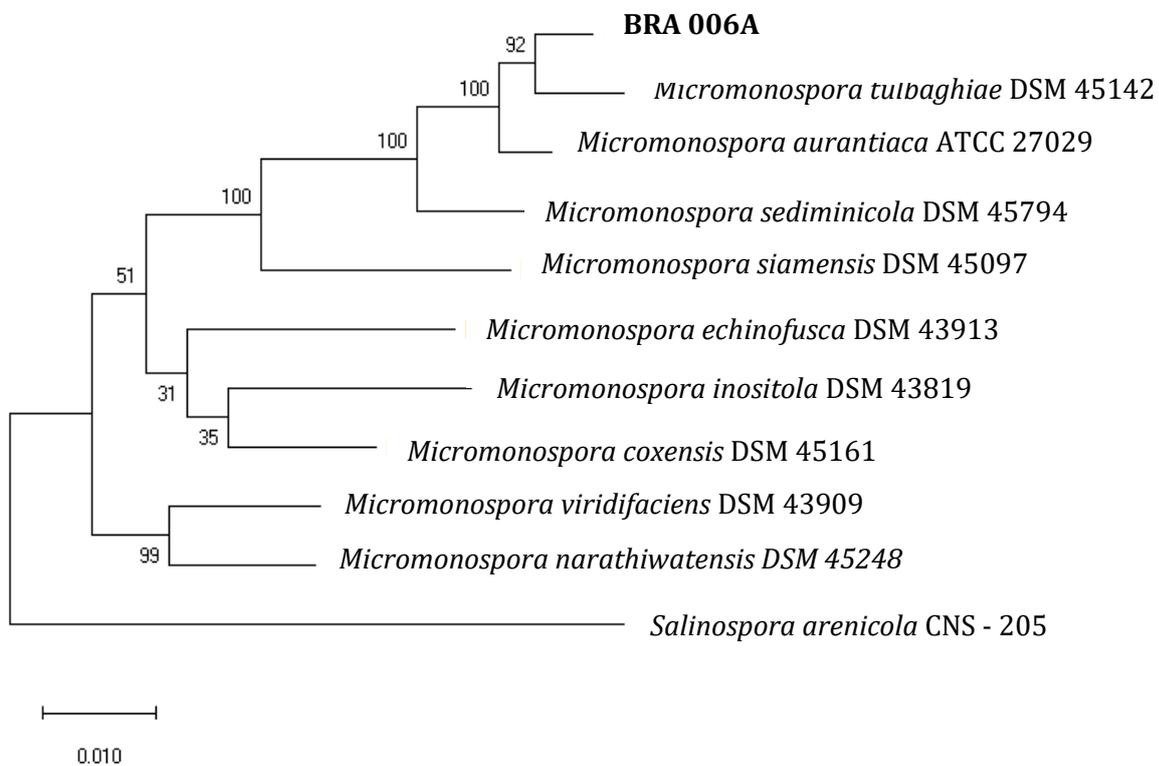


Figura 5 Árvore fenética de BRA 006 A. Software Mega. Maximum likelihood.

5.2 Verificação da presença de antraciclínonas através de cromatografia de camada delgada

Para verificar a presença nos extratos brutos de BRA 006 A e BRA 008 A dos complexos isolados por Souza *et al* (2013), realizou-se o procedimento de cromatografia de camada delgada. Jimenez *et al* (2012) realizam o mesmo procedimento durante a triagem de antitumorais, posteriormente realizando a análise por espectroscopia ^1H NMR, porém não indica o valor do fator de retenção (RF) obtido. A única referência para determinar a possível presença dos complexos é a RF destes no presente experimento. Observa-se na figura 12 que as alturas onde estão os complexos é justamente onde há coloração mais forte nas colunas dos extratos brutos, certamente onde ficou maior volume de extrato retido. A altura dos complexos 1 e 2, em relação a linha de partida é de 6 cm, com RF respectivo de 0,75 (altura final da solvente é igual a 8 cm a partir da linha de partida), enquanto a altura dos complexos 3 e 4 é de 5 cm em relação a linha de partida, tendo o valor de RF de 0,625.

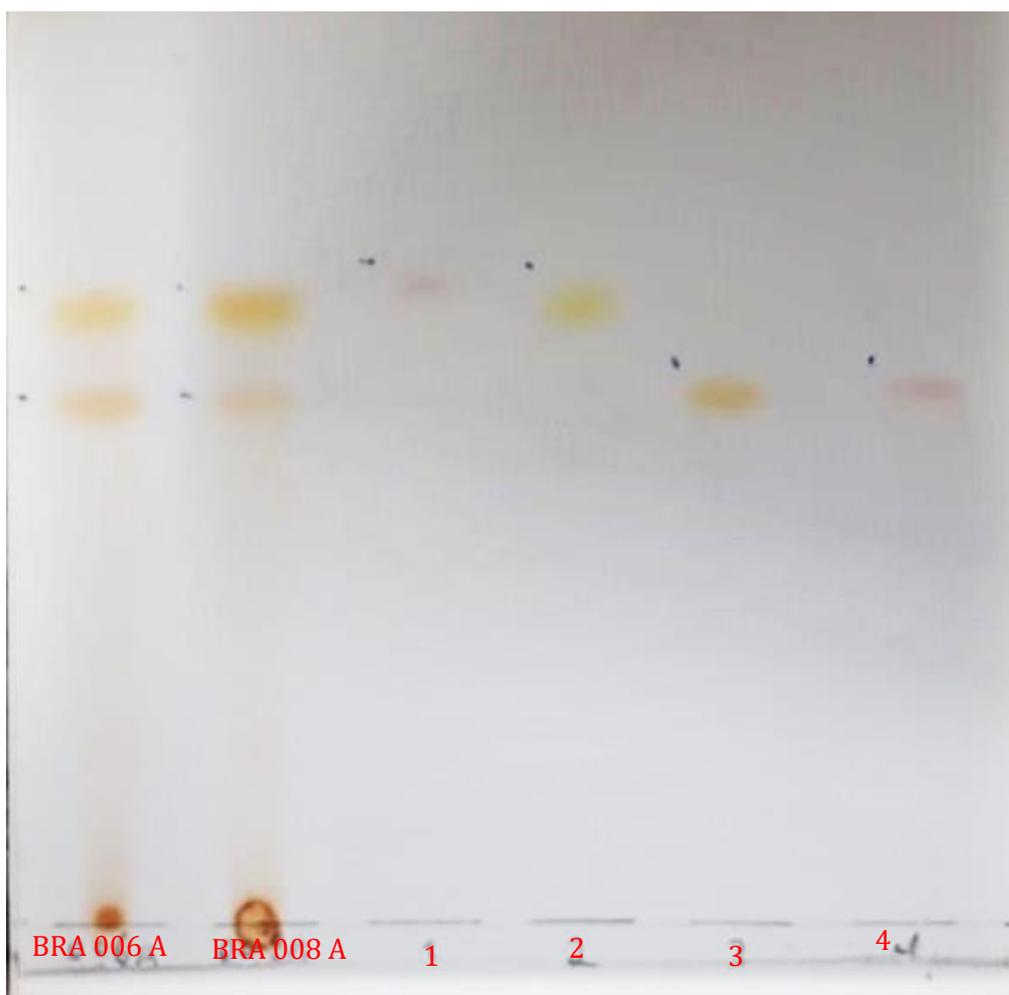


Figura 6 Cromatografia de camada delgada (CCD). Extratos brutos de BRA 006 A e BRA 008 A. Amostra dos complexos 1, 2, 3 e 4 isolados por Souza *et al* (2013)

5.3 Comparação dos dados genômicos

A partir da montagem e análise funcional (através do software RAST ver. 2.0) do genoma, se obtiveram os dados apresentados na coluna BRA 006 A na tabela 5, porém, devido ao surgimento da hipótese de que um cluster de antraciclina (descrito na seção 5.4) havia se dividido em dois Contigs na montagem obtida, utilizou-se o método de análise de síntena com o software Medusa, tendo como referência o genoma da linhagem *Micromonospora tulbaghia* DSM 45142, que seria, de acordo com árvore fenética apresentada na seção 5.1, a linhagem mais próxima geneticamente à BRA 006 A. Através da anotação funcional realizada a partir da nova montagem obtida gerou-se os dados descritos na coluna BRA 006 A*. Também realizou-se a anotação funcional dos genomas de *Micromonospora tulbaghia* DSM 45142, *Micromonospora aurantiaca* ATCC 27029 e de *Micromonospora sediminicola* DSM 45794, para comparação com os resultados de BRA 006 A, cujos dados também se encontram na tabela 5.

Tabela 5 Dados dos genomas de BRA 006 A, *Micromonospora tulbaghia* DSM 45142, *Micromonospora aurantiaca* ATCC 27029 e *Micromonospora sediminicola* DSM 45794

Dados	BRA 006 A	BRA 006 A *	<i>M. tulbaghia</i> DSM 45142	<i>Micromonospora aurantiaca</i> ATCC 27029	<i>M. sediminicola</i> DSM 45794
Tamanho (pares de base)	6.730.972	6.734.372	6.488.171	7.025.559	6.885.700
Conteúdo GC (%)	73	73	73	72,8	73,6
Nº de contigs	79	10**	6070	6.506	5
N50	151.079	297.938	431.781	-	4.643.122
L50	15	1	6	1	1
Nº de CDS's	6.293	6.272	6.070	6.506	6.529
Nº de genes de RNA's	57	57	66	61	77
Nº de clusters de metabólitos secundários	36	30	20	29	22
Nº pares de base de metabólitos secundários	1.129.055	1.006.036	1.011.071	1.844.316	826.244
% Metabolismo Secundário	16,77	16,42	15,58	26,25	12

BRA 006^a*: resultados utilizando a montagem obtida após análise de sintenia. ** Apenas 1 dos contigs cobre mais de 90% do genoma, sendo o único utilizado para as análises de metabólitos secundários.

Carro et al (2018) obtiveram, a partir do genoma de 40 linhagens tipo do gênero *Micromonospora sp.* e 2 duas linhagens não-tipos, árvore filogenética baseada em genes conservadas (housekeeping genes). A partir disto, comparou-se diversas características do genoma, para verificar se havia relação entre estas características e a topologia da árvore, e se poderiam ser definidos grupos de espécie de acordo com estas. De fato, as espécies foram divididas em 5 grupos (I, II, III, IV e V), sendo o grupo I o maior deles, subdividido em Ia e Ib. As características observadas para o genoma de BRA 006 A foram comparadas com as descritas como gerais para o gênero *Micromonospora sp.* e com as relacionadas ao grupo Ia, ao qual pertencem as espécies próximas à BRA 006 A de acordo com a árvore filogenética obtida (*Micromonospora tulbaghiaie*, *Micromonospora aurantiaca*, *Micromonospora sediminicola*), sendo os dados obtidos através da anotação funcional destas linhagens também comparados com os resultados de BRA 006 A e com os apresentados por Carro et al (2018). O tamanho médio do genoma do gênero *Micromonospora sp.*, de acordo com o trabalho citado, seria de $7\pm 0,4$ Mbp, faixa que inclui o observado para BRA 006 A de aproximadamente 6,7 Mbp, assim como o genoma de *Micromonospora tulbaghiaie* DSM 45142, com cerca de 6,5 Mbp, de *Micromonospora aurantiaca* ATCC 27029 com aproximadamente 7 Mbp e o genoma de *Micromonospora sediminicola* DSM 45794 de aproximadamente 6,88 Mbp. Os genes codificantes de RNA representariam em média 1 a 2% das sequências codificantes. Em relação ao número de CDS observadas para BRA 006 A, supostas sequências codificantes de RNA representam aproximadamente 0,9% do genoma, os genomas das outras linhagens analisadas neste trabalho também tem tal característica. Segundo Carro et al (2018), estas características não seriam conservadas filogeneticamente, de acordo com o “tip permutation test” (que compara a variação das características ao acaso com a que existe entre as amostras, com o que foi demonstrado que não há influência do quesito espécie para a variação das características). O conteúdo GC observado in silico é em média de 71,1 a 73,8% para o gênero *Micromonospora sp.* em geral, sendo que para o grupo Ia a faixa seria mais restrita, entre 72,8 e 73,6%. O conteúdo observado para BRA 006 A, e para as outras três linhagens estariam dentro deste critério. Porém, segundo o mesmo levantamento, nenhuma das espécies marinhas observadas possuiriam ramnose em sua parede celular e, de acordo com a anotação obtida com o software RAST ver. 2.0, BRA 006 A e as 3 linhagens próximas anotadas possuiriam supostas sequenciadas relacionadas à síntese deste açúcar para a parede. Através do RAST ver. 2.0 realizou-se a busca da via biossintética

que poderia estar relacionada à ramnose e foi observado que ela faz parte das vias dos dioxiaçúcares antraciclinas, então a informação dada no gráfico inicial do RAST ver. 2.0, de que seria um açúcar de parede celular, parece estar equivocada. O N50 que aparece na tabela seria o número tal que metade dos scaffolds formados na montagem teriam tamanho igual ou menor a esse valor. É um valor relacionado à qualidade da montagem do genoma, afinal é desejável que se consiga definir a maior extensão possível de sequências contínuas. Percebe-se, por exemplo o valor de N50 de BRA 006 A após a análise de sintenia, que é quase o dobro do anterior a esta análise. Foi justamente a obtenção de scaffolds maiores que possibilitou a junção das duas partes do cluster de antraciclina, anteriormente encontradas em scaffolds diferentes. Já o L50 seria o menor número de contigs cuja soma comporia metade do genoma.

5.4 Metabólitos secundários

Através do software AntiSmash 5.0 (BLIN et al, 2019) , obtive a relação de clusters biossintéticos de metabólitos secundários de BRA 006 A, descrita na tabela 6, porém, levantou-se a suspeita de que dois dos três cluster de PKS tipo II descritos eram na realidade um cluster só, separados em dois Contigs diferentes devido à limitações do procedimento de montagem. Como dito anteriormente, isto foi resolvido a partir da obtenção de nova montagem através da análise de sintenia e, através desta nova montagem, foi realizada nova análise com o AntiSmash 5.0 (BLIN et al, 2019) , obtendo-se os dados descritos também na tabela 6, na coluna BRA 006 A*. Nota-se que na nova análise observou-se apenas dois clusters, sendo um formado por dois dos obtidos anteriormente de PKS tipo II, formando um cluster de antraciclina, o qual é descrito na seção 5.4. No total foram observados 30 clusters biossintéticos, enquanto na primeira análise haviam sido levantados 36 clusters. Também foi feita análise com o AntiSmash 5.0 (BLIN et al, 2019) dos genomas das 3 linhagens mais próximas de BRA 006 A na árvore fenética, para comparação (resultados na tabela 6). Para as 4 cepas foram encontrados os clusters que, de acordo com Carro et al (2018), estariam presentes em todas as espécies do gênero *Micromonospora sp.*, que seriam os clusters similares aos que codificam para “Lymphostin”, grupo de alcalóides que costumam apresentar propriedades imunossupressoras de acordo com Nagata et al (2002), que em média tem similaridade de 40% , segundo Carro et al (2018) e no caso das linhagens deste estudo, a similaridade foi de 33% para todas e “alkyl-o-dihydrogeranyl

methoxyhydroquinone”, que tem similaridade em média de 70%, e para as 4 cepas similaridade também foi igual, de 71%. Apenas para BRA 006 A foi indicada a presença de cluster com 100% de similaridade ao de sioxanthin, composto responsável pela pigmentação alaranjada dos micélios, o qual, segundo Carro *et al* (2018), estaria presente em todas as espécies do gênero, exceto *Micromonospora inositola* e *Micromonospora pallida*, portanto os dados obtidos nas análises do presente trabalho confrontam esta afirmação. Para as 4 cepas foram descritos clusters de terpenos, peptídeos não ribossomais (NRPS) e PKS tipos I, II e III. Estes tipos de clusters são especialmente abundantes em cepas do gênero, de acordo com Carro *et al.* (2018), enquanto bacteriocinas, lantipeptídeos e sideróforos seriam comuns, porém não tão frequentes como aqueles, o que é corroborado pelas análises do presente trabalho, já que tais clusters aparecem cada um em apenas duas das linhagens analisadas. Também segundo Carro *et al.*, (2018), a quantidade de clusters encontrados e a proporção de cada tipo de cluster nos genomas são dados muito variáveis, não sendo possível estabelecer padrões. Naquele trabalho os genomas analisados variaram de menos de 10 até cerca de 50 clusters. As linhagens aqui analisadas apresentam de 20 a 30 clusters, tal faixa um pouco mais estreita pode estar relacionada à proximidade filogenética das mesmas.

Além da “sioxanthin”, mais dos clusters de BRA 006 A foram indicados como tendo genes apresentando similaridade com 100% dos genes de outros cluster já conhecidos. Um deles é um cluster de sideróforo, que teria 100% de similaridade com o cluster de desferrioxamina, compostos presente no genoma tanto de *Streptomyces griseus* (OHNISHI *et al.*, 2008) como o de *S. coelicolor* (BARONA-GOMEZ *et al.* 2004), que apresenta notável afinidade por Fe(III), tendo aplicação farmacológica para patologias relacionadas ao acúmulo de metal em tecidos. Análogos de desferrioxamina tem sido ainda estudados, na busca de novos efeitos farmacológicos, segundo Cood *et al* (2018), porém, por apresentar similaridade com 100% dos genes de cluster já bem conhecido de composto largamente utilizado, este cluster parece não ser de grande relevância. Outro cluster apresentou similaridade com 100% dos genes de cluster micromonolactam, um tipo de “polyene macrocyclic lactam”, família de composto pouco explorado que inclui representantes com atividade antibacteriana e citotóxica de acordo com Skellam *et al* (2013) no trabalho que descreve a identificação do micromonolactam e aponta sua origem em linhagens marinhas do gênero *Micromonospora sp.*

A partir da busca com os scaffolds obtidos com o a análise de sintenia, o software AntiSmash continuou identificando 9 clusters do tipo PKS I, porém, para análise de metabólitos secundários, optou-se por excluir 5 destes clusters, que pertenciam a scaffolds com poucos genes (alguns com apenas 1 ou 2 genes) que não apresentavam similaridade com clusters conhecidos, sendo, aparentemente, sequencias pequenas de má qualidade, que certamente são “resíduos” do processo de montagem. Devido a isso, na tabela 6, no tópico BRA006A*, referente à análise feita com os scaffolds gerados pelo Medusa, só estão descritos 4 clusters do tipo PKS I. Há um cluster de cerca de 70 mil nucleotídeos, que apresenta similaridade com 44% dos genes do cluster de “Stambomycin”, um policetídeo críptico isolado de *Streptomyces ambofaciens*, por Laureti *et al* (2011), que, segundo os autores, apresentaria potencial de atividade antitumoral (de acordo apenas com análises da estrutura da molécula, não foram realizados testes de atividade antitumoral). O composto era, segundo os autores, pelo menos até o momento daquele trabalho, o maior já descrito do tipo PKS I, contendo 9 módulos de PKS. O cluster da cepa em estudo que apresentou similaridade com 44% dos genes deste, apresenta 6 genes relacionados à módulos de PKS I, que estão relacionados à formação da cadeia policetídica, apresenta também genes de resistência e genes de regulação, porém não apresenta, ao contrário do cluster de “Stambomycin”, genes relacionados à formação de açúcares. Certamente, então codificaria uma estrutura de policetídeo tipo I sem cadeias laterais. Há também outro cluster do tipo PKS I, com cerca de 100 mil nucleotídeos, apresenta similaridade com 25% dos genes do cluster de “niphimycin E”, policetídeo que, segundo Hu *et al* (2018) apresenta atividade antibacteriana, por exemplo contra *Staphylococcus aureus* MRSA, uma cepa multirresistente. O cluster da BRA 006 A que apresenta estas similaridades com este último, além de 4 módulos de PKS I e uma redutase, apresenta genes relacionados à regulação e à resistência, ainda que apenas os de módulos de PKS I tenham similaridade com os genes do cluster de “niphimycin E”. Uma terceira região relacionada pelo programa com o PKS tipo I apresenta na verdade 2 subregiões diferentes, uma que apresenta similaridade com 23% dos genes do cluster de “dynemicin”, incluindo sintetases de peptídeos não ribossomais, metiltransferases, proteínas carreadoras de acil, entre outros. O cluster apresenta supostos genes de síntese de PKS I, porém não similares aos genes de “dynemicin”. “Dynemicin” é um membro do tipo “fundido com antraquinona” da família de antitumorais com anéis de 10 elementos, “enedyne”, isolado de *Micromonospora chersina* ATCC53710 por Gao e Thorson

(2008). Não há como afirmar que BRA 006 A possa produzir composto semelhante pois a grande maioria (77%) dos genes não apresentam qualquer semelhança. A outra subregião apresenta similaridade com 25% dos genes do cluster de “Tiancimycin”, também membro do grupo “enedyne”, isolado da cepa *Streptomyces sp. CB03234* por Yan *et al* (2016). Porém isso se refere a um único módulo de PKS1, uma metiltransferase e genes de regulação e resistência. A maior parte desta região de BRA 006 A não está relacionada à nenhuma sequência conhecida, mesmo realizando busca com o software BLAST.

O cluster do tipo PKS 2 que não foi incluído no provável cluster de antraciclina apresenta similaridade com 25% dos genes do cluster “paramagnetoquinone1/paramagnetoquinone 2”, grupo de compostos com grande potencial antibacteriano isolados de uma cepa do gênero *Actinoallomurus sp.* por Iorio *et al* (2017). Porém a similaridade foi encontrada apenas em 3 genes relacionados a subunidades de acetil-CoA carboxilase, uma ciclase, 2 relacionados à beta-cetoacil-sintase e 2 proteínas hipotéticas. Então não se pode afirmar de que possa produzir algum composto com estrutura semelhante. O cluster de BRA 006 A, apresentou outros genes, não similares aos de “paramagnetoquinone1/paramagnetoquinone 2”, mas descritos como ciclases, acetiltransferases, aminotransferases, genes reguladores e genes de resistência, além de diversos genes não relacionados a nenhum tipo conhecido. Pela estrutura proposta para o cluster, aparentemente seria um cluster capaz de codificar a síntese de algum composto do tipo policetídeo, mas não há embasamento, com os dados obtidos, para levantar hipóteses sobre a estrutura deste composto.

Interessante do ponto de vista do entendimento do metabolismo da espécie é a presença de cluster indicado como sendo de “N-acetylglutaminylglutamine amide”, dipeptídeo encontrado em *Pseudomonas aureginosa* que, segundo D’Souza-Ault *et al* (1993) tem papel na adaptação da bactéria a situações de estresse osmótico.

Tabela 6 Análise de metabólitos secundários

Tipos de Clusters	Quantidade de cluster do tipo por genoma				
	BRA 006 A	BRA 006 A *	<i>M. tulbaghiae</i> DSM 45142	<i>M. aurantiaca</i> ATCC 27029	<i>M. sediminicola</i> DSM 45794
PKS tipo I	9	4	1	4	3
PKS tipo II	3	2	1	2	2
PKS tipo III	1	1	1	\	1
terpeno	6	5	5	7	5
NRPS	7	4	5	6	4
Sideróforos	2	2	1	1	2
bacteriocina	1	1	1	1	1
Ladderane	1	1			1
NAGGN	1		1	1	1
LAP	\	\	\	\	1
Tiopeptídeo	\	\	\	\	1
oligossacarídeo	2	1	\	2	\
lantipeptídeo	2	2	1	2	\
Arypolyene	1	1	1	\	\
Trans-AT PKS	\	\	1	1	\
PKS-like	\	\		2	\
blactam	\	\	1	\	\
Outros	1	\	\	\	\

BRA 006^a*: resultados utilizando a montagem obtida após análise de sintenia.

5.5 Análise do cluster de antraciclina de BRA 006 A

As ORF's do Cluster de PKS tipo II indicadas pelo software AntiSmash 5.0 (BLIN et al, 2019) que possui estrutura de um cluster de antraciclina foram alinhadas com arquivos MultiFasta obtidos dos clusters de aclacinomicina e cosmomicina (os clusters identificados mais similares com o cluster de PKS 2 de BRA 006 A) e de "Galtamycin", policetídeo tipo II produzido pela espécie *Micromonospora sp* Tu6368 (tabela 7). Foi avaliada a similaridade das ORF's com os genes destes compostos e também foi comparado o tamanho das sequencias de aminoácidos. O objetivo seria verificar se há embasamento para a hipótese de que os genes do cluster de BRA 006 A são de fato genes característicos de cluster do tipo PKS 2. Por não haver clusters de antraciclina produzidas por espécies do gênero *Micromonospora sp*. disponíveis nos bancos de dados consultados, utilizou-se outro composto do tipo PKS 2, devido a importância de se comparar com genes de *Micromonospora sp*, que poderiam ter características exclusivas. Foi possível observar a

ausência nos 3 clusters comparados com o BRA 006 A, das sequências supostamente relacionadas a síntese de butiril-CoA e à utilização deste no início da síntese da cadeia polipeptídica, o que reforçou a hipótese de estarem relacionadas a esta função (que estaria ausente na via biossintética dos outros compostos). Não se observaram diferenças pronunciadas no tamanho das sequências de mesma função de *Micromonospora sp.* e *Streptomyces sp.* Enquanto as funções das ORF's 4,6,42 e 45 na via biossintética permanecem pouco esclarecidas. A figura 7 apresenta a organização do cluster.

Tabela 7 Comparação de clusters de antraciclina

ORF	Função suposta	Localização	a.a	nº de bases	Aclacinomicina <i>Streptomyces galilaeus</i>	Cosmomicina <i>Streptomyces olidensis</i>	D	Galtamycin <i>Micromonospora sp. Tu 6368</i>
1	Oxidoreductase	5,327,920 - 5,329,485	521	1565	aknoX / acIO- aa 52,47%	545	284 (ORF 55) (não similar)	saqW 498 aa (fad-binding)
2	Proteína de membrana do transportador ABC	5,329,549 - 5,330,412	287	863	acrW 284 aa 57,93%	cosJ 30,70% id - 77% cover - 1290 nt 276 aa	N	N
3	Proteína de ligação ao ATP do Transportador ABC	5,330,409 - 5,331,407	332	998	acrV 345 aa 63,84%	cosI 51, 61% 1485 nt 353 aa	n	n
4	hidroxilase	5,331,695 - 5,332,516	273	821	aclQ 226 aa 79%	46, N	N	n
5	O-metiltransferase	5,332,671 - 5,333,816	381	1145	N	N	N	n

Continua

ORF	Função suposta	Localização	a.a	nº de bases	Aclacinomicina <i>Streptomyces galilaeus</i>	Cosmomicina D <i>Streptomyces olidensis</i>	Galtamycin <i>Micromonospora sp. Tu 6368</i>
6	KR	5,333,813 - 5,334,649	278	836	aclQ 226 aa 55,69%	N	n
7	N,N- dimetiltransferase / aminometilase	5,334,658 - 5,335,407	249	749	aclP 243 aa 56,41%	ORF 36 50,41% 765 nt 242 aa / ORF 47 58,65% 950 nt 247 aa	n
8	C-12 hidroxilase	5,335,404 - 5,336,969	521	1565	N	ORF 46 60,04% 2044 nt 531 aa	saqE 29,60% 490 aa Fad-bindin
9	Glicosiltransferase (família MGT)	5,337,027 - 5,338,295	422	1268	aclK 440 aa 44,19%	cosgG 68,65% 1809 nt 426 aa/ cosK 43,88% 1734 nt 430 aa / ORF 43,88% 43 1658 nt 439 aa	saqGT1 45,07% 424 aa saqGT2 42,73% 443 aa
10	esterase	5,338,306 - 5,340,456	716	2150	N	ORF48 68% id 41% cover 1209 nt 298 aa	n

Continua

ORF	Função suposta	Localização	a.a	nº de bases	Aclacinomicina <i>Streptomyces galilaeus</i>	Cosmomicina <i>Streptomyces olidensis</i>	D	Galtamycin <i>Micromonospora sp. Tu 6368</i>
11	C-10 hidroxilase (rdmB)	5,340,456 - 5,341,532	358	1076	n	ORF 49 59,05% 1189 nt 367 aa	n	
12	Ciclase C2-C19	5,341,581 - 5,342,018	145	437	aknH 66,21%	144 ORF 50 79,31% 572 nt 135 aa	n	
13	Metiltransferase dependente de SAM	5,342,213 - 5,343,067	284	854	aknG 68,09%	286 aa ORF 51 68,09% 777 nt 254 aa	n	
14	Malonyl CoA ACP transacylase	5,343,046 - 5,344,014	322	968	aknF 60,61%	341aa cosE 61,69% 922 nt 344 aa	n	
15	ACP	5,344,011 - 5,344,265	84	254	aknD 52,44%	91aa ORF 53 - 48,15% 223nt84 aa	saqC 90 aa 45% id	

Continua

ORF	Função suposta	Localização	a.a	nº de bases	Aclacinomicina <i>Streptomyces galilaeus</i>	Cosmomicina D <i>Streptomyces olidensis</i>	Galtamycin <i>Micromonospora sp. Tu 6368</i>
16	CLF / β – KS	5,344,290 - 5,345,498	402	1208	aknC 62,34%	407aa cosC 62,84% 1474 nt 414 aa	saqB 60,30% 407 aa
17	KS - α	5,345,495 - 5,346,763	422	1268	aknB 72,01%	473aa cosB - 72,27% 1773 nt 422 aa	70,19% 407 422aa
18	monoxigenase	5,346,760 - 5,347,065	101	305	aknX 59,79%	122 aa cosX - 111 aa - 57,29%	n
19	KR C9	5,347,235 - 5,348,020	261	785	aknA 75,78%	261 aa ORF 41 - 261 aa - 71,26%	saqD 69,69% 254 aa
20	aromatase	5,348,031 - 5,348,969	312	938	aknE1 57,52%	450 aa ORF 40 56,54%	saqL 57,76% 314 aa

Continua

ORF	Função suposta	Localização	a.a	nº de bases	Aclacinomicina <i>Streptomyces galilaeus</i>	Cosmomicina D <i>Streptomyces olidensis</i>	Galtamycin <i>Micromonospora sp. Tu 6368</i>
21	KR C-7	5,349,029 - 5,349,778	249	749	aknA 261 aa 31,47%	ORF 39- 248 - 57,20%	n
22	Hydroxyacil-CoA dehydrogenase	5,349,814 - 5,350,245	143	431	aknE1 450 aa 43,41%	ORF 38 (?) - 145 aa - 54,62%	n
23	N,N- dimetiltransferase / aminometilase	5,350,359 - 5,351,096	245	737	aclP 243 aa 43,47%	ORF 36 - 242 aa - 57,2%	n
24	GTF superfamília MGT	5,351,378 - 5,352,688	436	1310	aclK 440 aa 62,61%	cosgG (426) - 46,87% / cosK (430) - 60,42% / ORF 43 1658 - 48,48%	saqGT1 46,08% 424 aa saqGT2 47,38% 443 aa
25	GTF superfamília MGT	5,352,685 - 5,353,986	433	1301	aclK 440 aa 61,63%	cosgG (426) - 46,17% / cosK (430) - 60,88% / ORF 43 1658 - 49,19%	saqGT1 45,98% 424 aa saqGT2 43,79% 443 aa

Continua

ORF	Função suposta	Localização	a.a	nº de bases	Aclacinomicina <i>Streptomyces galilaeus</i>	Cosmomicina D <i>Streptomyces olidensis</i>	Galtamycin <i>Micromonospora sp. Tu 6368</i>
26	GTF superfamília MGT	5,353,986 - 5,355,284	432	1298	aclK 440 aa 59,49%	cosgG (426) - 48,61% / cosK (430) - 55,22% / ORF 43 1658 - 48,61%	saqGT1 43,90% 424 aa saqGT2 45,79% 443 aa
27	GTF superfamília MGT	5,355,281 - 5,356,573	430	1292	aclK 440 aa 44,16%	cosgG (426) - 44,99% / cosK (430) - 42,14% / ORF 43 1658 - 58,08%	saqGT1 46,08% 424 aa saqGT2 47,38% 443 aa
28	Ativador de GTF derivado de P-450	5,356,570 - 5,357,673	367	1103	aknT 443aa 29,86%	cosT 28,77% 83% cover 1753 nt 416 aa	n
29	Regulador transcricional - SARP	5,357,754 - 5,358,509	251	755	aclI 280 aa 70,12% (ativador transcricional)	ORF 52 - 67,60% 771 nt 39 aa	n
30	Enoyl-CoA-hidratase / MaoC desidratase	5,358,809 - 5,359,261	150	452	N	N	n

Continua

ORF	Função suposta	Localização	a.a	nº de bases	Aclacinomicina <i>Streptomyces galilaeus</i>	Cosmomicina D <i>Streptomyces olidensis</i>	Galtamycin <i>Micromonospora sp. Tu 6368</i>
31	AlnI starter unit ketoacyl synthase	5,359,258 - 5,360,232	324	974	N	N	n
32	Aminotransferase	5,360,366 - 5,360,620	84	254	aknD 40%	91aa N	saqC 90 aa 41,98% id
33	Aminotransferase	5,360,640 - 5,361,749	369	1109	aclZ 369 74,25%	aa ORF 35 - 369 aa - 75%	saqQ 26,85% 436 aa
34	NDP - hexose - 2,3 - desidratase	5,361,802 - 5,363,241	479	1439	aclN 450 57,33%	aa ORF 34 - 481 aa - 60,68%	saqS 51,48% 467 aa
35	4-redutase	5,363,238 - 5,364,167	309	929	aclM 297 50,50%	aa CosM (?) 320 aa - 53,97%	saqZ3 35,53% 322 aa (epimerase/desidratase)

Continua

ORF	Função suposta	Localização	a.a	nº de bases	Aclacinomicina <i>Streptomyces galilaeus</i>	Cosmomicina D <i>Streptomyces olidensis</i>	Galtamycin <i>Micromonospora sp. Tu 6368</i>
36	3,5 epimerase	5,364,155 - 5,364,760	201	605	aclL 65,33%	201 cosL 212aa 63,18%	saqZ1 38,97% 199 aa
37	Acil-CoA desidrogenase	5,364,776 - 5,365,981	401	1205	N	N	n
38	Ciclase C5- C14/C3-C16	5,366,144 - 5,366,923	259	779	N	ORF 37 259 aa 69,55%	n
39	C3- metiltransferase	5,366,965 - 5,368,176	403	1211	N	N	n
40	Epimerase/ desidratase dependente de NAD	5,368,184 - 5,369,074	296	890	aclM 297 aa 44,56%	comM (?) 320 aa 44,59% -	saqZ3 34,20% 322 aa (epimerase/desidratase)

Continua

ORF	Função suposta	Localização	a.a	nº bases	de	Aclacinomicina <i>Streptomyces galilaeus</i>	Cosmomicina <i>Streptomyces olidensis</i>	D	Galtamycin <i>Micromonospora Tu 6368</i>
41	3,5 epimerase	5,369,241 - 5,369,870	209	629		aclL 201 43,88% aa	cosL 212 43,30% aa		saqZ1 42,4 199 aa
42	Aminotransferase	5,369,867 - 5,370,976	369	1109		aclZ 369 27,93% aa	ORF 35 - 369 aa - 33,72% (69% cover)		saqQ 28,39% aa
43	G-1-P-timidiltransferase (rmlA)	5,370,978 - 5,371,868	296	890		aclY 75,69%	ORF 54 291 70,45% aa		saqG 35,32 79% cover aa
44	Excinuclease ABC - subunidade A / ABC- ATPase UvrA	5,372,006 - 5,374,534	842	2528		N	761 (ORF 17) 39,86%		n
45	Short-chain dehydrogenase/redctase (KR?)	5,374,581 - 5,375,405	274	824		aclQ 226 45,95% aa	N		n
46	Flavin reductase domain protein FMN-biding	5,375,576 - 5,376,097	173	521		N	N		n
47	4,6 desidratase	5,376,094 - 5,377,155	353	1061		N	cosH 327 60,87% aa		saqH 61,45% aa

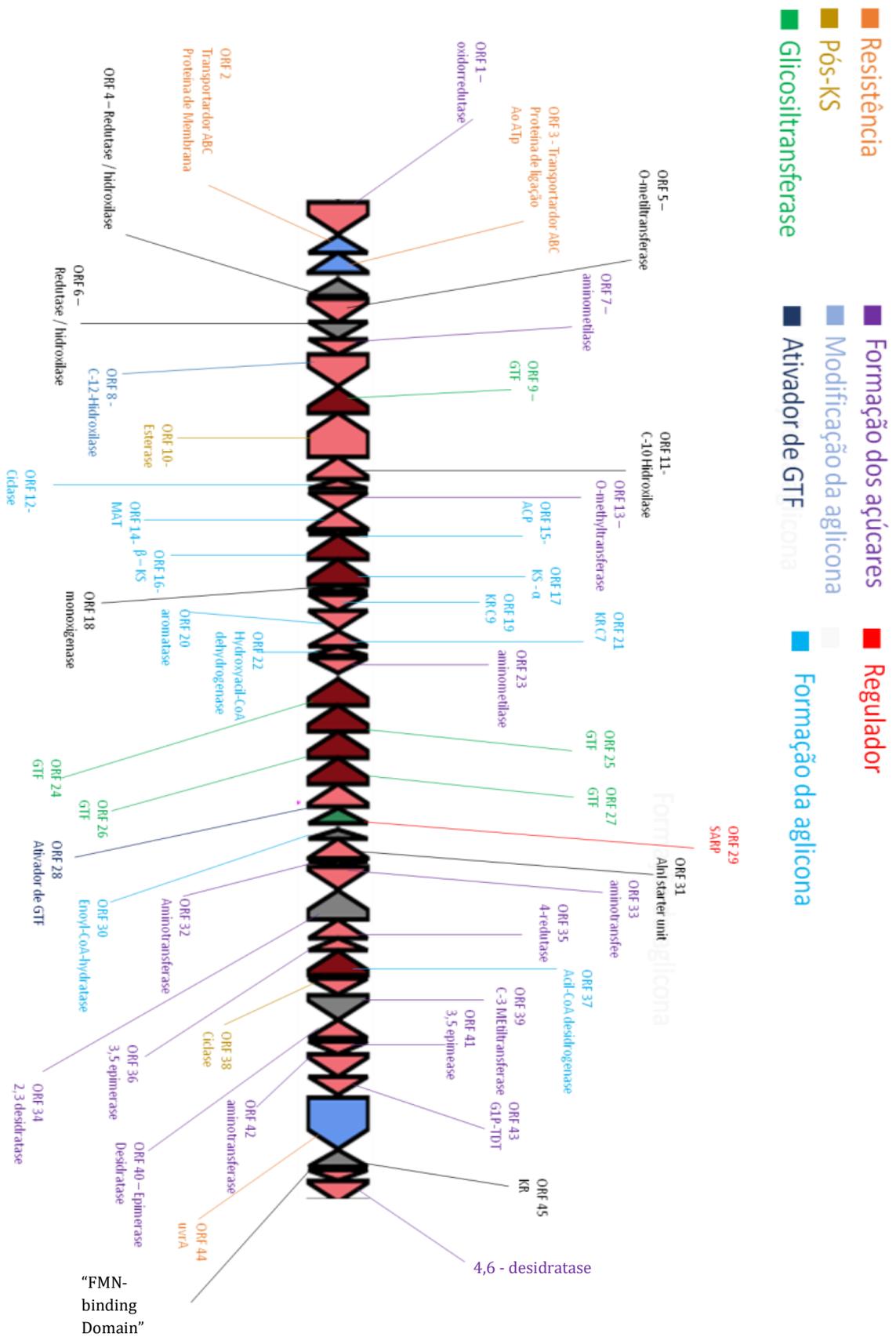


Figura 7 Cluster biossintético tipo PKS 2 de BRA 006 A.

5.5.1 Via Biossintética da antraciclina supostamente codificada por BRA 006 A

A seguir via biossintética potencialmente codificada pelo cluster de antraciclina do genoma de BRA 006 A.

5.5.1.1 Formação da unidade iniciadora

O suposto cluster observado apresenta ORF's similares a genes encontrados no cluster de "alnumycin" (OJA, 2012) e "frenolicin" (TANG, 2013), que estão relacionados à síntese de unidade inicial de butiril-CoA. A ORF 31 (figura 8 – III) apresenta 68% de similaridade em relação à proteína frnI da "frenolicin e a alnI da "alnumycin" e a ORF 32 (figura 8 – III) é similar à sequência da proteína alnJ da "alnumycin" e à frnJ da "frenolicin" 62%. A frnI apresenta função semelhante à da enzima β -cetoacil-ACP sintase III (KSIII), que catalisa a condensação descarboxilativa de malonil-ACP com acetil-CoA, formando acetoacetil-CoA, na síntese de ácidos graxos (WHITE et al, 2005). A ORF 14 (figura 8 – II) apresenta sequência similar à que codifica a enzima malonil-CoA:ACP-acil-transferase (MAT), enzima que realiza a transferência de grupo malonil de malonil-CoA para o braço fosfopanteteinil da frnJ. A ação das enzimas codificadas pelas ORF's 14, 31 e 32, formaria então uma molécula composta por um grupo de acetoacetil ligado a uma ACP de unidade inicial similar à frnJ, esta suposta molécula será chamada, daqui em diante de acetoacetil-ACPi (Figura 8 – A e B). Na síntese da "frenolicin" (semelhante a de "alnumycin"), após esta condensação inicial, ocorrem passos de desidratação e redução, que geraram uma unidade iniciadora butiril-frnJ, passos que, de acordo com Tang et al (2013), seriam realizadas por enzimas ainda não identificadas, possivelmente compartilhadas com a via de síntese de ácidos graxos. No cluster em estudo há três ORF's que supostamente codificariam enzimas similares àquelas que, na biossíntese de ácidos graxos, formam butiril-CoA a partir de acetoacil-CoA: a ORF 22, similar a sequência da 3-hidroxiacil-CoA desidrogenase, que reduziria o oxigênio duplamente ligado ao terceiro carbono da molécula acetoacetil-ACPi, a ORF 30 codificaria enzima similar à Enoil-CoA-hidrolase, que formaria crotonoil-ACPi a partir de hidroxibutanoil-ACPi, com a retirada de uma molécula de H₂O, e a ORF 37 estaria relacionada à enzima similar à cotronoil-CoA redutase, que nesta reação formaria butiril-ACPi, a partir da redução do crotonoil-ACP.

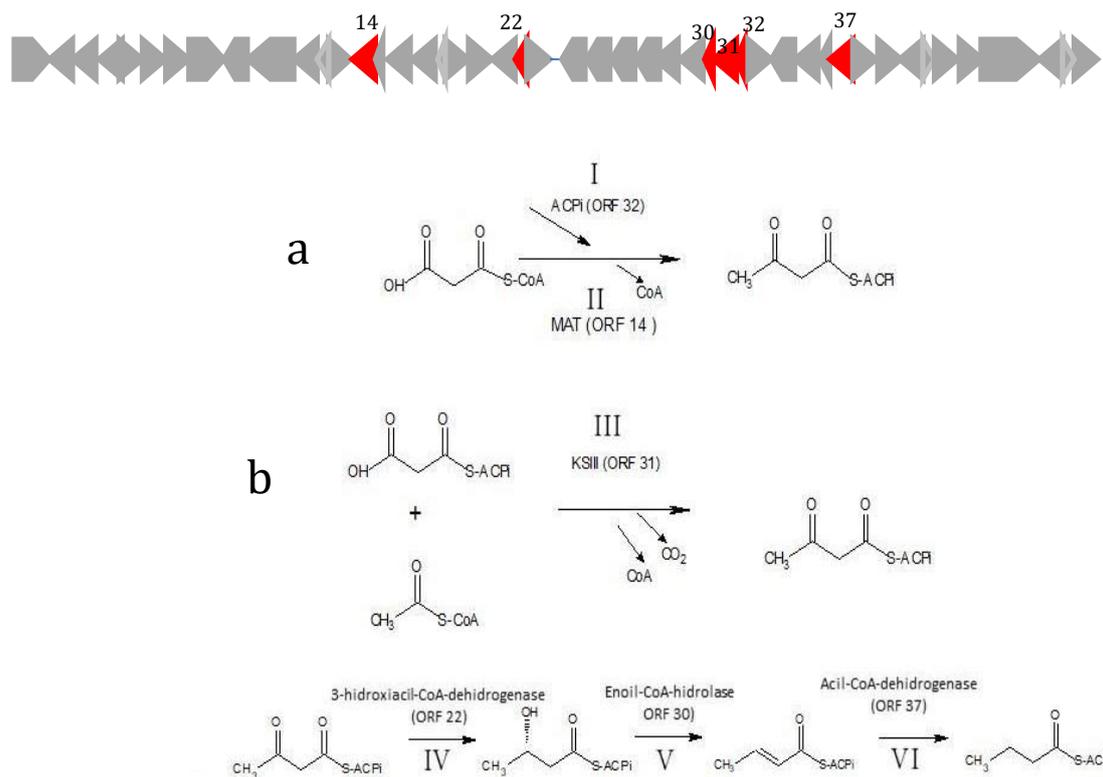


Figura 8 Formação da unidade iniciadora. A: Localização dos genes envolvidos na Formação da Unidade Iniciadora. B: Via sintética da formação da unidade iniciadora, sendo a: Formação de malonil-ACPi a partir de malonil-CoA. MAT= malonil-CoA:ACP-acil-transferase codificada pela ORF 14. ACPi = Proteína carreadora de acil específica para a formação da unidade iniciadora, codificada pela ORF 15; b: Formação de acetoacetyl-ACPi a partir de malonil-ACPi e acetil-CoA; c: Formação de butiril-ACPi a partir de acetoacetyl-ACPi.

5.5.1.2 Formação da cadeia de β -cetoacil

O butiril-ACPi formado se ligaria ao grupo cisteína do complexo KS-CLF, através de uma ligação tioéster. Na síntese de “alnumycin” há a troca do grupo ACPi por uma ACP de PKS mínimo, catalisada pela enzima zhuC, uma MAT específica, que atua apenas neste passo. Como não foi encontrada ORF com sequência similar ao gene de zhuC, supõe-se que ocorra esta ligação tioéster direta, formando KS-CLF-butyryl (Figura 9 – I). A cetossíntase seria codificada pelo gene da ORF 17, e a CLF pelo gene da ORF 16 (Figura 9 – II) (Tang et al, 2004).

Ocorreria então a condensação do butiril e 9 acetatos, obtidos a partir de malonil-CoA, carregadas por uma ACP de PKS mínimo, a qual seria codificada pelo gene da ORF 15(Figura 9 – II), formando um decaacetídeo de 22 carbonos. As condensações seriam catalisadas pela atividade do complexo KS-CLF (figura 6, I e II). (TANG et al, 2003)

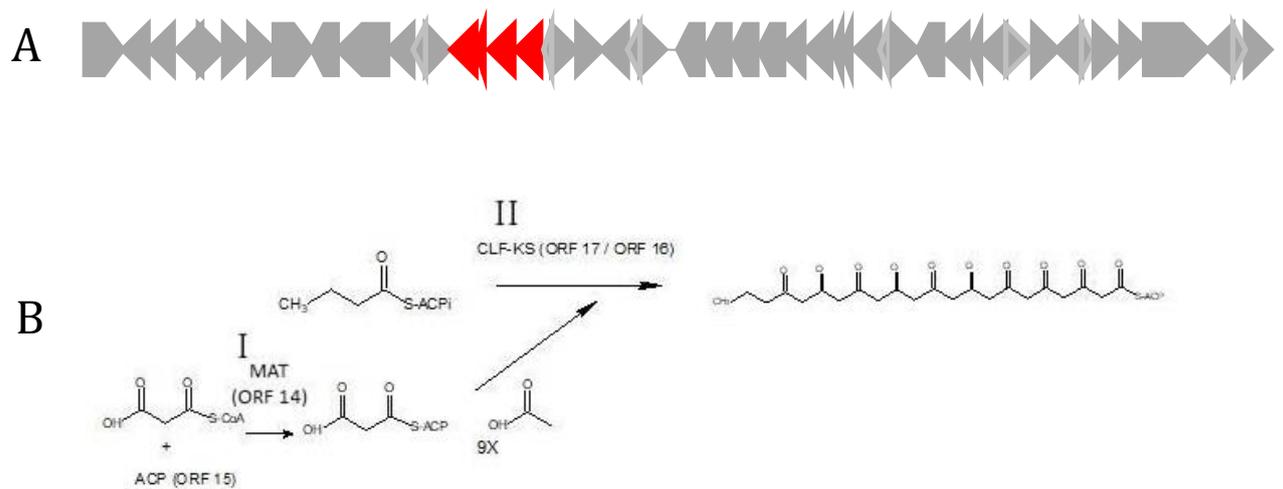


Figura 9 Formação da cadeia de β -cetoacil. A: localização, no cluster, dos genes envolvidos na formação da cadeia de β -cetoacil. B: via sintética da cadeia de β -cetoacil.

5.5.1.3 Formação da aglicona

O próximo passo é a redução do carbono 9 do decacetídeo, que inicia-se pela ação de cetorreductase, supostamente codificada pela ORF 19 (Figura 10 – I), que apresenta 75,78% de similaridade com *aknA* de *Streptomyces galilaeus*, enzima que apresenta esta função na via biossintética da aclacinomicina. O grupo OH então ligado ao carbono 9 e o ligado ao carbono 7 são retirados pela ação de desidratação da aromatase que seria codificada pela ORF 20 (Figura 10 – II), que tem similaridade de 58,88% com a *dpsF* da daunorrubicina, composto produzido por bactérias da espécie *Streptomyces peucetius*. A ciclase que seria codificada pelo gene da ORF 38 (Figura 10 – III) realizaria o fechamento do segundo e do terceiro anel. ORF 38 tem similaridade de 78,76% com *Arm3*, ciclase do composto “arimetamycin A” de uma bactéria não cultivada, e apresenta trecho com alta similaridade com a região conservada típica de enzimas do tipo ciclase. A ORF 18 realizaria a oxigenação do carbono 12 (Figura 9 – IV), tal qual a enzima *aknX* na via biossintética da aclacinomicina (RÄTY et al, 2002)

O grupo carboxila da estrutura resultante seria esterificado por uma O-metiltransferase codificada pela ORF 13 (figura 10 – V), que tem similaridade de 68,8% com a *aknG* da aclacinomicina, que desempenha esta função. O substrato metilado resultante sofre então a ação de uma ciclase, codificada pela ORF 12 (figura 10 – VI), uma “acid methyl

Ester cyclase”, que tem 66,21% de identidade em relação à ciclase *aknH* *S. galilaeus*, e realiza o fechamento do quarto anel da aglicona. (NIEMI;MÄNTSÄLÄ, 1995)

Uma redutase, análoga à *aknU* da síntese de aclacinomicina, codificada pelo gene da ORF 21 (figura 10 – VII) , catalisaria a redução do grupo ceto carbono 7 da estrutura semelhante à aclaviketona formada no passo anterior, formando uma molécula similar à aclavinona.

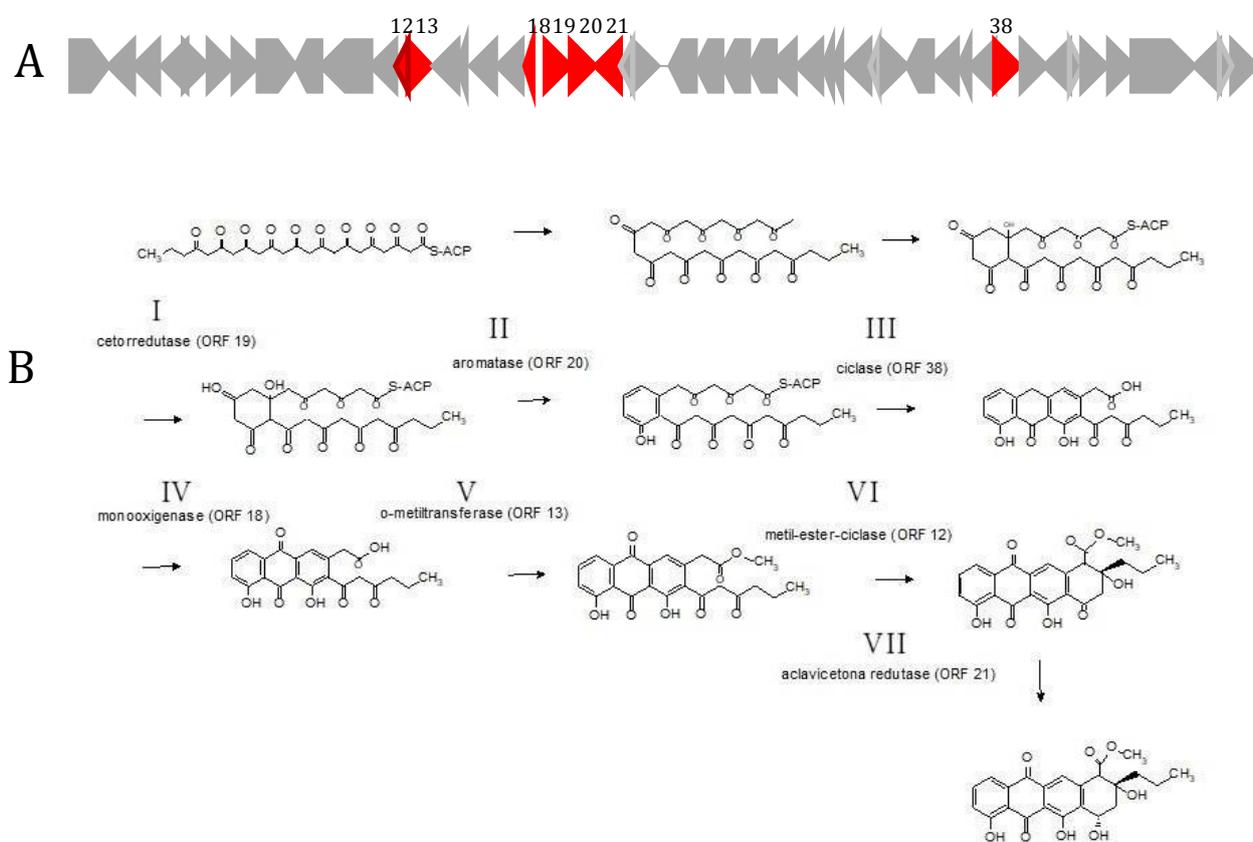


Figura 10 Formação da aglicona. A: localização, no cluster, dos genes envolvidos na formação da aglicona. B: via sintética da formação da aglicona.

5.5.1.4 Modificação da aglicona

Ao carbono 11 é adicionado um grupo hidroxil, pela ação da enzima codificada pela ORF 8 (Figura 11 – I), que tem 61,08% de similaridade com a *rdmE*, da via biossintética da rodomicina. A partir daí, o C7 sofreria ação de glicosil-transferase (figura 11 – II). A ORF 9,

que codificaria uma glicosiltransferase, está ao lado da ORF 10 que apresenta 47% de similaridade com as sequências de *aknT* e *costT*, relacionadas ao fator de ativação das glicosiltransferase e, de acordo com busca realizada com BLASTp, apresenta os domínios típicos deste tipo de sequência. Já as ORF's 24,25,26 e 27, que também codificam para glicosiltransferase, estão adjacentes à ORF 28 que, como dito anteriormente, certamente não codificaria o ativador de glicosiltransferase, pois aparentemente a sequência está incompleta, não apresentando o domínio completo de ativador de glicosiltransferase. Supõe-se, então que apenas a glicosiltransferase codificada pela ORF 9 seria sintetizada e, certamente apenas um açúcar seria ligado à aglicona.

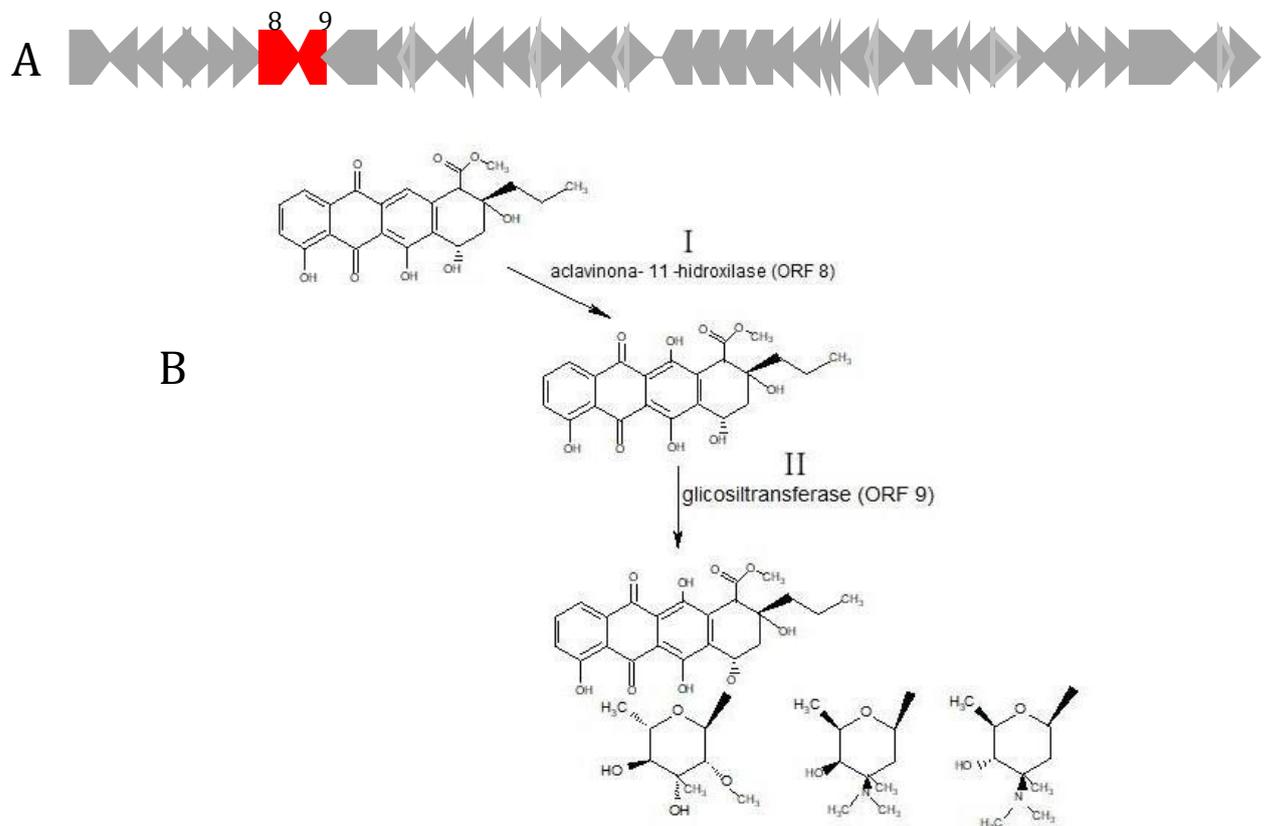


Figura 11 Modificação da aglicona. A: localização, no cluster, dos genes envolvidos na modificação da aglicona. B: via sintética da modificação da aglicona.

5.5.1.5 Ativadores de Glicosiltransferase

A ORF 28 apresenta apenas 29,86% de similaridade com *aknT* e 28,77% com *costT* com apenas 83% de cobertura. Não apresenta similaridade significativa com outras

sequências de ativadores de glicosiltransferase, e possuiria apenas 367 aminoácidos, enquanto todas sequencias descritas observadas possuem mais de 400 aminoácidos. aknT possui 443 aminoácidos e costT possui 416. Isto poderia ser indício de falha no sequenciamento e montagem das sequências, ou de mutação deste gene. Nesta última hipótese, certamente as GTF's codificadas pelas ORF's 24, 25, 26 e 27 não ficariam ativas. A ORF 10, porém, apresenta sequencia com 47% de similaridade em relação aos fatores de ativação de GTF aknT e costT e apresenta os domínios conservados típicos do grupo, aparentemente íntegros (de acordo com o observado pela busca com BLASTp), o que indicaria que a GTF codificada pela ORF 9 poderia ser ativada.

5.5.1.6 Formação de deóxi-açúcares

A ORF 43 codifica a enzima glicose-1-P-timidiltransferase (TTP), que ativa a glicose-1-P através da transferência de uma timidina di-fosfato ao C1 (figura 12 – I). Posteriormente, sobre o açúcar ativado, age a enzima NDP-hexose-4,6-dehidratase, codificada pelo gene da ORF 47, formando o açúcar TDP-4-ceto-6-desoxi-D-glicose (figura 12 – II). A partir deste açúcar a via pode seguir por dois caminhos diferentes, no primeiro uma dTDP-6-deoxi-d-xilo-4-hexulose-3,5-epimerase análoga à rmlC (que poderia ser codificada tanto pela ORF 36 como pela 41) que promove ação de epimerase nos carbonos das posições 5 e 3 do anel de açúcar (figura 12 – III), formando uma TDP-4-ceto-6-desoxi-D-manose, como descrito por GIRAUD *et al* (2000). A ORF 35 apresenta alguma similaridade com sequencia codificadora de 4-redutase (28,89% de identidade, mas apenas 52% de cobertura). Caso seja codificada realmente esta enzima, ela agiria sobre a TDP-4-ceto-6-desoxi-D-manose, com atividade de redução, adicionando um hidrogênio ao oxigênio ligado ao carbono 4 (figura 12 – IV). O Segundo caminho possível a partir da TDP-4-ceto-6-desoxi-D-glicose, prosseguiria com a ação da enzima NDP-hexose-2,3-dehidratase, codificada pela ORF 34, que retira um hidroxila do carbono 2 e um hidrogênio do carbono 3, liberando uma molécula de água (figura 12 – V). Posteriormente haveria novamente duas possibilidades de vias: em um caso, ocorreria a ação da aminotransferase codificada pela ORF 33 (figura 12 – VI), as aminometilases relacionadas às ORF's 7 e 23 (figura 11 – VII), a 3,5-epimerase codificada pela ORF 36 ou 41 (figura 12 – VIII) e da 4-redutase, codificada pelo gene da ORF 35 (figura 12 – IX), formando-se uma TDP-L-megosamina. Na outra possibilidade, haveria a ação da 4 redutase (ORF 35) (figura 12 -X), posteriormente da aminotransferase (ORF 42) (figura 12 – XI) e, por fim, das

aminometilases (ORF's 7 e 23), gerando a Tdp-D-angolosamina (figura 12 – XII). A ORF 5 codificaria uma C2-O-metiltransferase (figura 12 – XIII), e a ORf 39 uma C3-metiltransferase (figura 12 – XIV), estas enzimas poderiam agir sobre os açúcares formados, adicionando grupos metil.

A

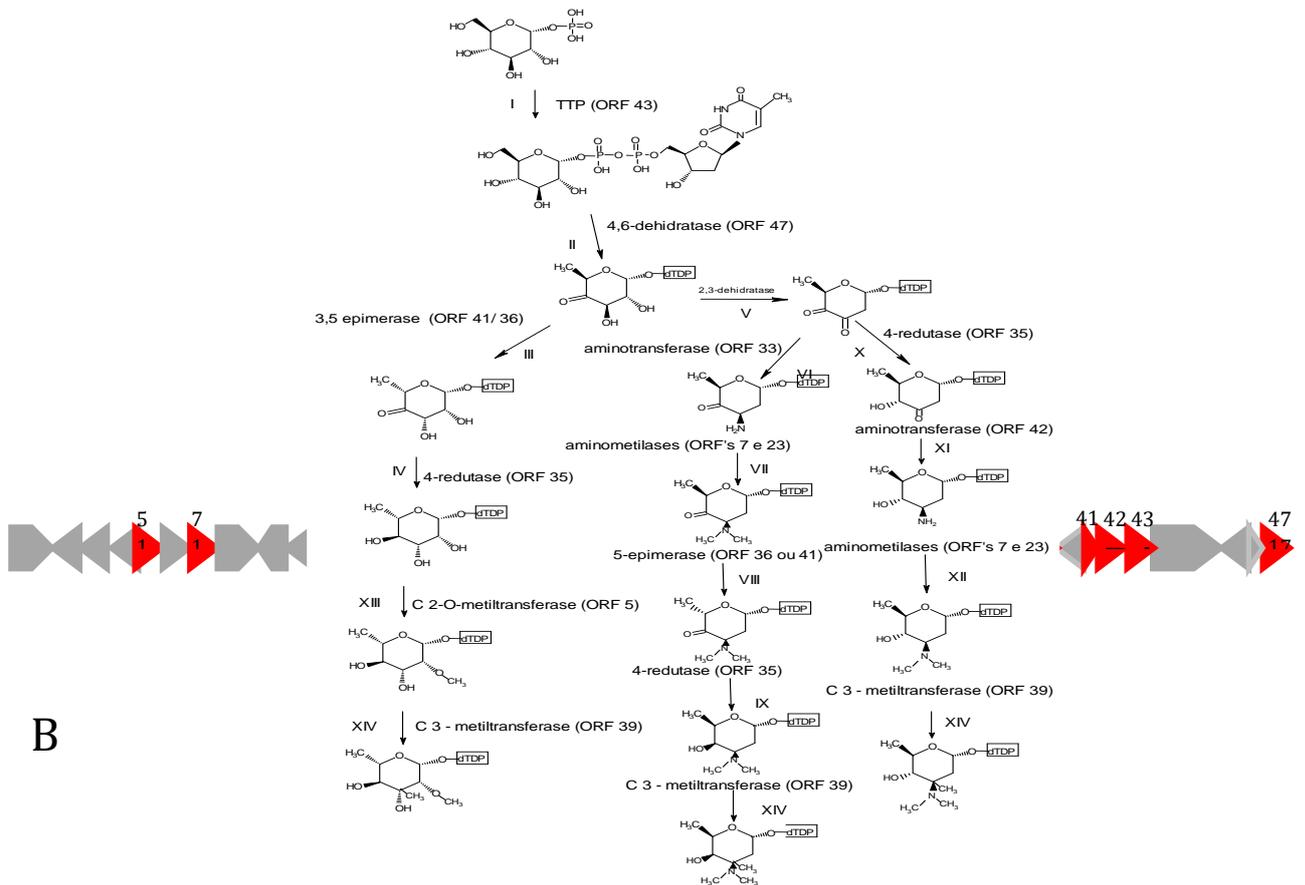


Figura 12 Formação de dióxiaçúcares. A: localização, no cluster, dos genes envolvidos na formação de dióxiaçúcares. B: via sintética da formação de dióxiaçúcares.

5.6 Confirmação do cluster único através de PCR

A sequência obtida após a análise de sintonia utilizando o software Medusa gerou Scaffold com algumas regiões indefinidas que, na montagem eram preenchidas com letras “n”, o que ocorreu entre os dois trechos do suposto cluster de PKS tipo II. Além disso, foi observado a presença de erros de leituras nas extremidades convergentes dos dois trechos (havia repetição de trechos da sequência). Para solucionar a questão, determinando a sequência completa e confirmar a união dos dois trechos no genoma, formando um cluster único de antraciclina, se desenharam primers para as extremidades dos dois trechos, de modo a cobrir a área da ligação entre eles e procedeu-se a amplificação do trecho através de

PCR. Foi necessário deletar trechos repetidos da sequência para, a partir do que seria sequência correta, desenhar os primers. Os amplicons obtidos através da PCR foram sequenciados pelo método de Sanger. As sequências obtidas foram alinhadas através do programa ClustalW na plataforma Geneious 7.1.9 com a sequência do genoma de BRA 006 A, com o scaffold obtido após a análise de sintonia. O alinhamento completo entre as sequências demonstra a contiguidade entre as duas sequências obtidas inicialmente em contigs separados e corrobora os resultados da análise de sintonia e a posterior correção realizada no trecho de ligação entre as duas sequências (sequências repetidas apagadas). Comprova-se, assim, a presença de cluster único e completo de antraciclina no genoma de BRA 006 A.

Com base no observado neste trabalho, a cepa BRA 006 A pertence ao gênero *Micromonospora sp*, e na classificação proposta por Carro *et al* (2018), pertenceria ao grupo Ia. Com base nos resultados da árvore fenética, construída a partir de MLSA, supõe-se que se trata de uma espécie ainda não identificada, cuja cepa conhecida mais próxima é *Micromonospora tulbaghiae* DMS45142. Trabalho posterior para identificação da espécie necessitaria de outros experimentos padrão para identificação, como a análise de ácidos graxos de parede. A análise dos metabólitos secundários indicou a presença de clusters de compostos que pertencem a grupos de interesses farmacológicos, os quais poderiam ser futuramente explorados, como o cluster do tipo PKS I que apresenta similaridade com 44% dos genes do cluster de "Stambomycin". Foi identificado, após experimentos para confirmação, a presença de cluster completo de uma antraciclina ainda não identificada. Pelo menos uma das GTF's do cluster seria ativa, e há genes para produção de pelo menos 3 tipos diferentes de açúcares metilados. A aglicona da antraciclina supostamente produzida seria semelhante ao observado nos complexos isolados por Souza *et al* (2013). Ou seja, ergue-se a hipótese de que no trabalho citado houve quebra dos açúcares laterais da antraciclina produzida, por isso foram identificadas apenas agliconas. É necessário novo procedimento para isolar a antraciclina e, posteriormente, realizar testes de atividade antitumoral e outros testes de atividade biológica.

6 CONCLUSÃO

- Identificou-se através das diversas ferramentas de bioinformática utilizadas, um cluster completo de antraciclina.

- A antraciclina potencialmente codificada apresenta estrutura ainda não encontrada na literatura. Das estruturas com mesma unidade iniciadora, nenhuma das descritas anteriormente apresentam 4 anéis.

- Os açúcares apresentam padrão de metilação também não encontrado em estruturas descritas.

- BRA 006 A apresenta genoma com características típicas de *Micromonospora sp.* como tamanho do genoma (aproximadamente 6,73 Mbp) e conteúdo GC (73%) dentro da média do gênero e presença de cluster de metabólitos secundários sempre encontrados em genomas de representantes do grupo como “sioxanthin”, “alkyl-o-dihydrogeranylmethohydroquinone” e “lymphostin”. Com base nos resultados da árvore fenética, construída a partir de MLSA, supõe-se que se trata de uma espécie ainda não identificada, cuja cepa conhecida mais próxima é *Micromonospora tulbaghia* DMS45142 e as características do genoma corroboram os resultados da árvore, estando dentro dos valores médios do subgrupo.

- Além do cluster de antraciclina, foram encontrados outros clusters com potencial interesse para a investigação de moléculas de interesse farmacológico, como clusters de lantipeptídeo, bacteriocinas, terpenos NRPS's e PKS's do tipo I e III.

REFERÊNCIAS

1. Anandan,R.; Dharumadurai, D.; Manogaran, G.P. An Introduction to Actinobacteria, Actinobacteria Dharumadurai Dhanasekaran and Yi Jiang. **IntechOpen**, fev. 2016.
2. Arnaud-Haond, S.; Arrieta, J.M.; Duarte, C.M. Marine Biodiversity and gene Patents. **Science**, v. 331(6024), p. 1521-1522, 2011
3. Aziz, R.K.; Bartels, D.; Best, A.A.; DeJongh, M.; Disz, T.; Edwards, R.A.; Formsma, K.; Gerdes, S.; Glass, E.M.; Kubal, M.; Meyer, F.; Olsen, G.J.; Olson, R.; Osterman, A.L.; Overbeek, R.A.; McNeil, L.K.; Paarmann, D.; Paczian, T.; Parrello, B.; Pusch, G.D.; Reich, C.; Stevens, R.; Vassieva, O.; Vonstein, V.; Wilke, A.; Zagnitko, O. *The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology*. **BMC Genomics**, v.9:75. P.1-15 2008
4. Barka EA, Vatsa P, Sanchez L, Gaveau-Vaillant N, Jacquard C, Klenk H-P, Clément C, Ouhdouch Y, van Wezel GP. Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. **Microbiol Mol Biol Rev**, v.80, p.1– 43, 2016.
5. Barona-Gómez, F.; Wong, U.; Giannakopoulos, A.; Derrick, P.; Challis, G. Identification of a cluster of genes that directs desferrioxamine biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* M145. **J Am Chem Soc**, v. 126, p. 16282–16283, 2004
6. Bérdy, J. Bioactive Microbial Metabolites. **The Journal of Antibiotics**, v. 58, p. 1–26, 2005
7. Bérdy, J. Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading. **The Journal of Antibiotics**. v. 65, p. 385–395, 2012
8. Blin, K.; Shaw, S.; Steinke, K.; Villebro, R.; Ziemert, N.; Lee, S.Y.; Medema, M.H.; Weber, T. antiSMASH 5.0: updates to the secondary metabolite genome mining pipeline. **Nucleic Acids Research**, v. 47 (W1) p.W81-W87, 2019
9. Bosi, E.; Donati, B.; Galardini, M.; Brunetti, S.; Sagot, M.F.; Lió, P.; Crescenzi, P.; Fani, R.; Fondi, M. MeDuSa: a multi-draft based scaffolder. **Bioinformatics**, v. 31(15), p. 2443-51, 2015.
10. Braud, A.; Jezequel, K.; Leger, M. A.; Lebeau, T. Siderophore production by using free and immobilized cells of two pseudomonads cultivated in a medium enriched with Fe and/or toxic metals (Cr, Hg, Pb). **Biotechnology and Bioengineering**, v.94, p.1080-1088, 2006
11. Brockmann, H. Anthracyclinone und anthracycline. **Fortschr. Chem. Organ. Naturst**, v. 21, p. 121-182, 1963
12. Brockmann, H.; Bauer, K. Rhodomycin, ein rotes antibioticum aus actinomyceten, **Naturewissenschaften**, v. 37, p. 492-493, 1950

13. Carro, L.; Spröer, C.; Alonso, P.; Trujillo, M.E. Diversity of Micromonospora strains isolated from nitrogen fixing nodules and rhizosphere of *Pisum sativum* analyzed by multilocus sequence analysis. **Syst Appl Microbiol**, v. 35, p. 73-80, 2012
14. Carro,L.; Nouioui,I.; Sangal,V.; Meier-Kolthof , J.P.;Trujillo, M.E; Montero-Calasanz, M.C.; Sahin ,N.; Smith, D.L.; Kim,K.E; Peluso, P.; Deshpande, S.; Woyke,T.; Shapiro, N.; Kyrpides, N.C.; Klenk, H.; Göker, M.; Goodfellow, M. Genome-based classification of micromonosporae with a focus on their biotechnological and ecological potential. **Scientific Reports** v. 8, p. 525, 2018
15. Codd, R.; Richardson-Sanchez, T.; Telfer, T.; Gotsbacher, M. Advances in the Chemical Biology of Desferrioxamine B (DFOB). **ACS Chemical Biology** v. 13(1), 2017
16. Costello, M.J.; Chaudhaary, C. Marine Biodiversity; Biogeography; Deep-Sea Gradients; and Conservation. **Current Biology**, v. 27 (11), p. 5, 2017
17. Dias, D.A; Urban, S.; Roessner, U. A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery. **Metabolites**, v. 2, p. 303-336, 2012.
18. D'Souza-Ault, M.R; Smith, L.T.; Smith, G.M. Roles of N-acetylglutaminyglutamine amide and glycine betaine in adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to osmotic stress. **Appl Environ Microbiol**, v. 59(2), p. 473-8, 1993
19. Dubost, M.; Gauter, P.; Maral, R.; Ninet, L.; Pinnert, S.; Preud'homme, J.; Werner, G. H. Un nouvel antibiotique a proprietes cytostatiques: la rubidomycine. **C. R. Acad. Sci. Paris**, v. 257, p. 1813-1815, 1963
20. Elshikh, M.; Ahmed, S.;Funston, S.; Dunlop,P.; McGaw, M.; Marchant, R.; Banat, I.M. Resazurin-based 96-well plate microdilution methodfor the determination of minimum inhibitory concentrationof biosurfactants. **Biotechnol Lett**, v.38 p.1015–1019, 2016
21. Fenical, W. Oceanography Marine Pharmaceuticals Past, Present, and Future. **The Oceans and Human Health**, v. 19, p. 11-119, 2006
22. Gao, Q.; Thorson, J.S. The biosynthetic genes encoding for the production of the dynemicin enediyne core in *Micromonospora chersina* ATCC53710. **FEMS Microbiology Letters**, v. 2828 (1), 2008.
23. GBD Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex specific mortality for 264 causes of death, 1980–2016: a systematic analysis for the global burden of disease study 2016.**Lancet**. v.390, p.1151–1210, 2017.
24. Genilloud, O.; Genus I. Micromonospora. In: GOODFELLOW, M. et al. (Eds.). . **Bergey's manual of systematic bacteriology: The Actinobacteria**. 2nd editio ed.Athens: Springer, p. 1039–1057, 2012

25. Giraud, M.F.; Leonard, G.A.; Field, R.A.; Berlind, C.; Naismith, J.H. RmlC, the third enzyme of dTDP-l-rhamnose pathway, is a new class of epimerase. **Nat Struct Biol**, v. 7, p. 398–402, 2000
26. Grein, A.; Spalla, C.; Di Marco, A.; Canevazzi, G. Descrizione e classificazione di un attionamicette (*Streptomyces peucetius* sp. nova) produttore di una sostanza ad attivite antitumorale: la daunomicina. **Giorn. Microbiol**, v. 2, p. 109-118, 1963
27. Henriksen P.A. Anthracycline cardiotoxicity: An update on mechanisms. Monitoring and prevention. **Heart** , v. 104, p. 971-977, 2017
28. Hirsch, A.M.; Valdés, M. Micromonospora: An important microbe for biomedicine and potentially for biocontrol and biofuels. **Soil Biology & Biochemistry** v.42, 2010.
29. Hu, Y.; Wang, M.; Wu, C.; Tan, Y.; Li, J.; Hao, X.; Duan, Y.; Guan, Y.; Shang, X.; Wang, Y.; Xiao, C.; Gan, M. Identification and Proposed Relative and Absolute Configurations of Niphimycins C-E from the Marine-Derived *Streptomyces* sp. IMB7-145 by Genomic Analysis. **J Nat Prod**, v. 81(1), p. 178-187, 2018
30. Iorio, M.; Cruz, J.; Simone, M.; Bernasconi, A.; Brunati, C.; Sosio, M.; Donadio, S.; Maffioli, S. Antibacterial Paramagnetic Quinones from *Actinoallomurus*. **J Nat Prod**, v.80(4), p.819-827, 2017
31. Jimenez, P.C.; Ferreira, E.G.; Araújo, L.A.; Guimaraes, L.A.; Sousa, T.S.; Pessoa, O.D.L.; Lotufo, T.M.C.; Lotufo, L.V.C. Cytotoxicity of actinomycetes associated with the ascidian *Eudistoma vancouveri* (Millar, 1977), endemic of northeastern coast of Brazil. **Lat. Am. J. Aquat. Res**, v. 41(2), p. 335-343, 2013.
32. Kantola, J.; Kunnari, T.; Hautala, A.; Hakala, J.; Ylihonko, K.; Mäntsälä, P. Elucidation of anthracyclinone biosynthesis by stepwise cloning of genes for anthracyclines from three different *Streptomyces* spp. **Microbiology**, v. 146, p. 155-63, 2000
33. Laureti, L.; Song, L.; Huang, S.; Corre, C.; Leblond, P.; Challis, G.L.; Aigle, B. Identification of a bioactive 51-membered macrolide complex by activation of a silent polyketide synthase in *Streptomyces ambofaciens*. **Proc Natl Acad Sci**. 108(15) p. 6258-63, 2011
34. Look, S.A.; Fenical, W.; Jacobs, R.S.; Clardy, J. The pseudopterosins: anti-inflammatory and analgesic natural products from the sea whip *Pseudopterogorgia elisabethae*. **PNAS**, v. 83 (17), p. 6238-6240, 1986
35. Lotufo, L.V.C.; Wilke, D.V.; Jimenez, P.C. Organismos marinhos como fonte de novos fármacos: histórico e perspectivas. **Quimica Nova**, v. 32(3), p. 703-716, 2009.
36. Ludwig W, Euzéby J, Schumann P, Buss HJ, Trujillo ME, Kämpfer P, Whiteman WB. Road map of the phylum Actinobacteria, In Goodfellow M, Kämpfer P, Busse HJ, Trujillo ME, Suzuki KI, Ludwig W, WhitemanWB(ed), **Bergey's manual of systematic bacteriology**, vol 5, p 1–28, 2012

37. McGowan , J.V.; Chung, R.; Maulik, A. Piotrowska, I.; Walker, J.M.; Yellon, D.M. Anthracycline Chemotherapy and Cardiotoxicity. **Cardiovasc Drugs Ther**, v.3, p. 63–75, 2017.
38. Miyanaga, M. Structure and function of polyketide biosynthetic enzymes: various strategies for production of structurally diverse polyketides. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 81, p. 2227-2236, 2017
39. Nagata, H.; , Yano, H.; Sasaki, K.; Sato, S.; Nakanishi,S.; Takahashi, I.; Tamaoki, T. Inhibition of Lymphocyte Kinase Lck and Phosphatidylinositol 3-kinase by a Novel Immunosuppressant, Lymphostin. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 66 (3), p. 501-507, 2002
40. NCCLS. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition**. NCCLS document M7-A6 [ISBN 1-56238-486-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003
41. Newman, D. J. ; Cragg, G. M. Drugs and Drug Candidates from Marine Sources: An Assessment of the Current “State of Play”. **Planta Med** v. 82 p. 775-789, 2016
42. Niemi, J.; Mantsälä, P. **J Bacteriol** p.177:2942,1995
43. Ning, Y.; Shen, Q.; Herrick, K. Cause of death in cancer survivors [abstract]. **Cancer Res** 2012;72:LB-339
44. O'Brien, J.; Wright, G.D. An ecological perspective of microbial secondary metabolism. **Curr Opin Biotechnol** v.22, p.552–558, 2011
45. Ohnishi, Y.; Ishikawa, J.; Hara, H.; Suzuki, H.; Ikenoya, M.; Ikeda, H.; Yamashita, A.; Hattori, M.; Horinouchi, S. Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. **J Bacteriol**, v. 190(11), p. 4050-60, 2008
47. Oja, T.; Klika, K.D.; Appassamy, L.; Sinkkonen,J.; Mäntsälä, P.; Niemi, J.; Metsä-Ketelä,M. Biosynthetic pathway toward carbohydrate-like moieties of alnumycins contains unusual steps for C-C bond formation and cleavage. **PNAS**, v. 16, p. 6024-6029, 2012
48. Oliveira, B.F.R. **Análise das atividades antimicrobiana e citotóxica de actinobactérias isoladas de diversos habitats**. 172 f. Tese (mestrado em Biologia da Relação Parasita-Hospedeiro). Universidade Federal de Goiás. Goiás, 2015
49. Ostrensky, A.; Borghetti, J.R.; Soto, E.D. Estudo setorial para consolidação de uma aquicultura sustentável no Brasil. Curitiba, 2007.

50. Rätty, K.; Kantola, J.; Hautala, A.; Hakala, J.; Ylihonko, K.; Mäntsälä, P. Cloning and characterization of *Streptomyces galilaeus* aclacinomycins polyketide synthase (PKS) cluster. **Gene**, v. 293 p. 115-122, 2002
51. Richter, T.K.; Hughes, C.C.; Moore, B.S. Sioxanthin, a novel glycosylated carotenoid, reveals an unusual subclustered biosynthetic pathway. **Environ Microbiol.** v.17(6), p.2158-71, 2015.
52. Rosano, G.L.; Ceccarelli, E.A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. **Front Microbiol**, v.17, p.5-172, 2014.
53. Shen, B. Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms. **Curr Opin Chem Biol**, v. 7(2), p. 285-95, 2003.
54. Skellam, E.; Stewart, A.; Strangman, W. Identification of micromonolactam, a new polyene macrocyclic lactam from two marine *Micromonospora* strains using chemical and molecular methods: clarification of the biosynthetic pathway from a glutamate starter unit. **J Antibiot**, v. 66, p. 431–441, 2013
55. Sousa, T.S.; Jimenez, P.C.; Ferreira, E.G.; Silveira, E.R.; Braz-Filho, R.; Pessoa, O.D.L.; Lotufo, L.V.C. Anthracyclines from *Micromonospora*. *Journal of Natural Products*. v. 75 (3), p. 489–493, 2012. Toldo S.; Goehle R.W.; Lotrionte M.; Mezzaroma E.; Sumner ET. et al. Comparative Cardiac Toxicity of Anthracyclines In Vitro and In Vivo in the Mouse. **PLoS ONE**, v. 8(3): e58421, 2013.
56. Stewart, B.W.; Wild, C.P.; World Cancer Report 2014. **International Agency for Research on Cancer**, 2014
57. Sultana, A. **Mechanistic insights into the biosynthesis of polyketide antibiotics**. 2006. 73f. Thesis (Ph. D. Thesis Biological Science) – Institutionen för medicinsk biokemi och biofysik (MBB)/ Department of Medical Biochemistry and Biophysics, Stockholm, 2006.
58. Swain, S.M.; Whaley, F.S.; Ewer, M.S. Congestive heart failure in patients treated with doxorubicin: a retrospective analysis of three trials. **Cancer** v.97, p.2869–79, 2003
59. Talukdar, M.; Duarah, A.; Talukdar, S.; Bura Gohain, M. ; DEBNATH, R.; Yadav, A.; Jha, D.; Bora, T.. Bioprospecting *Micromonospora* from Kaziranga National Park of India and their anti-infective potential. **World journal of microbiology & biotechnology**, v. 28, p. 2703-12, 2012
60. Tang, Y.; Lee, T.K.; Kobayashi, S.; Khosla, C. *Ketosynthases in the Initiation and Elongation Modules of Aromatic Polyketide Synthases Have Orthogonal Acyl Carrier Protein Specificity*. **Biochemistry** v. 42, p. 6588-6595, 2003

61. Tsai, T.S. A Fine Balancing Act of Type III Polyketide Synthase. **Chemistry & Biology**, v. 11, p. 1177–1178, 2004.
62. Tuteja, N.; Phana, T.; Tuteja, R.; Ochem, A.; Falaschi, A. Inhibition of DNA Unwinding and ATPase Activities of Human DNA Helicase II by Chemotherapeutic Agents. v. 236, p. 636-640, 1997
63. Wang, X.; Shaaban, K.A.; Elshahawi, S.I.; Ponomareva, L.V.; Sunkara, M.; Zhang, Y.; Copley, G.C.; Hower, J.C.; Morris, A.J.; Kharel, M.K.; Thorson, J.S. Frenolicins C–G, Pyranonaphthoquinones from *Streptomyces* sp. RM-4-15. **Journal of Natural Products**, v. 76 (8), p. 1441-1447, 2013
64. White, S.W.; Zheng, J.; Zhang, Y.M.; Rock. The structural biology of type II fatty acid biosynthesis. **Annu Rev Biochem**, v. 74, p.791-831, 2005
65. World health statistics overview 2019: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals. **World Health Organization**, 2019
66. Wratten, S.; Faulkner, D.J. Metabolites of the red alga *Laurencia subopposita*. **J. Org. Chem.** V. 42 (21), p. 3343-3349
67. Yan, X.; Ge, H.; Huang, T. *et al.* Strain Prioritization and Genome Mining for Eneidyne Natural Products. **MBio**, 2016
68. Yu, D.; Xu, F.; Zeng, J.; Zhan, J. Type III Polyketide Synthases in Natural Product Biosynthesis. **IUBMB Life**, v.64(4), p.285–295, 2012