LUCIANA COSTA FURTADO

Potencial anticâncer de substâncias isoladas de *Streptomyces* sp. recuperada da ascídia *Euherdmania* sp.

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

São Paulo
2019

LUCIANA COSTA FURTADO

Potencial anticâncer de substâncias isoladas de *Streptomyces* sp. recuperada da ascídia *Euherdmania* sp.

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

Área de concentração: Farmacologia

Orientador(a): Profa. Dra. Leticia Veras Costa Lotufo

Versão original.

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)

Costa Furtado, Luciana
Potencial anticâncer de substâncias isoladas de Streptomyces sp. recuperada da ascídia Euherdmania sp. / Luciana Costa Furtado; orientadora Leticia Veras Costa Lotufo. -- São Paulo, 2019.
104 p.

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

1. Micro-organismos marinhos. 2. Substâncias citotóxicas. 3. Proteassoma. 4. Glioblastoma. I. Veras Costa Lotufo, Leticia , orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Luciana Costa Furtado

Titulo da Dissertação: Potencial anticâncer de substâncias isoladas de *Streptomyces* sp. recuperada da ascídia *Euherdmania* sp.

Orientador(a): Profa. Dra. Leticia Veras Costa Lotufo

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

( ) Aprovada ( ) Reprovada

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

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

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB nº **875/2017** referente ao projeto intitulado: ***"Potencial anticâncer de substâncias isoladas de Streptomyces sp. recuperada da ascídia Euherdmania sp."*** sob a responsabilidade de ***Luciana Costa Furtado*** e orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) ***Letícia Veras Costa Lotufo***, do Departamento de Farmacologia, 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, 18 de abril de 2017.

Prof. Dr. **Anderson de Sá Nunes**
Coordenador CEUA ICB/USP

Prof. Dr. **Paolo Marinho A. Zanotto**
Coordenador CEPSH ICB/USP

À todas as mulheres que bravamente fazem ciência nesse país.

AGRADECIMENTOS

À **Dra. Leticia Lotufo** pela supervisão durante esse período de aprendizado que o mestrado me proporcionou. Por cada momento que sentamos e discutimos, por cada sugestão dada, pelo entusiasmo a cada resultado e empolgação de sempre descobrir o novo e pelos momentos descontraídos. Por ter sido tão próxima tantas vezes, mostrando que também existe muito amor junto da pesquisa. Pela confiança, pelo respeito e, principalmente, pelo abraço amigo. Leticia, gratidão!.

À **Dra. Paula Jimenez** (Paulinha) por ter sido tão presente durante esse momento da minha vida, passando seus valiosos conhecimentos. Não teria como não agradecer as conversas sobre pesquisa, sobre a vida, os conselhos, os skypes tão longos e tão compromissados em me passar o melhor. Obrigada pela acolhida e pelos momentos de alegria. Isso tem todo um diferencial na caminhada.

Ao **Dr. João Agostinho** por ter me dado a oportunidade de aprender com os seus ensinamentos e trabalhar junto na bancada, por discutir comigo dados, por me incentivar a buscar respostas científicas, por compatilhar do seu entusiasmo a cada resultado. João, obrigada!

À **Dra. Anelize Bauermeister** pelo conhecimento químico repassado, por todas as análises que solicitei (muitas delas com urgência), por ter sido tão atenciosa comigo se dispondo a me ajudar em tantos momentos de dúvida, pelos conselhos, pelas nossas conversas sobre o mundo científco, por toda a sua em vibração com cada resultado e pelo incentivo em abraçar os projetos que a vida me apresentou. Ane, muito obrigada!

À **família LaFarMar** que me apresentou e presenteou com pessoas de nobre coração. **Paola, Paula, Bianca, Karen, Helory, Larissa, Gabriel, Amanda, Catarina, Cristine, Dhiego, Jaime, Anny, Charles, Gabriela, Letícia, Vanessa, Giovanna, Bruna e Simone,** obrigada por fazerem nossos dias mais leves, com sorrisos, brincadeiras e boas discussões científicas.

À **Dra. Daniela Trivella** e ao **Dr. Rafael de Felício** pela colaboração que proporcionou os belos resultados de cristalografia e identificação de grupos químicos que ajudaram a guiar esse trabalho.

Ao **Dr. Diego Wilke** por ter cedido os micro-organismos que foram usados nesse trabalho. Pela torcida pelo meu sucesso, por ter me apresentado a Profa. Leticia e, mais profundamente, pela sua amizade.

Ao **Dr. Marcelo Pena** que me ajudou em diversos momentos durante o mestrado, disponibilizando seu laboratório e seu tempo para me fazer entender as cromatografias.

Ao **Meu Melhor Grupo** por ter feito eu me sentir no Ceará durante essa estadia em São Paulo, aliviando a saudade de casa e os momentos de cansaço com nossa troca de mensagens. **Allan**, **Allyson**, **Daku**, **Elthon**, **Evelyne**, **Évila**, **Larissa**, **Marcionília** e **Paulinha**, vocês enchem meus dias de amor e risadas. Ninguém solta a mão de ninguém.

Aos amigos mais próximos, **Bruna, Leonardo, Guacira**, que na convivência do dia a dia proporcionaram momentos felizes, descontraídos e ofertaram o ombro amigo.

Aos amigos da UFC, **Patrícia, Raquel e Jônatas** que se fizeram tão presentes durante esse período por meio de mensagens carinhosas e de incentivo.

À **minha família** pelo apoio incondicional de sempre. Meu mais sincero agradecimento a vocês.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Agradeço especialmente à agencia de fomento Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa através do processo nº 2017/18235-5 pelo período de 01/05/2018 a 28/02/2019 (Luciana Costa Furtado) e pelo auxílio à pesquisa com o financiamento do processo nº 2015/17177-6 durante o período de 01/05/2017 a 30/04/2022 (Letícia Veras Costa-Lotufo).

Agradeço também gentilmente ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudos concedida via Programa de Pós-graduação em Farmacologia durante o período de 01/03/2017 a 31/04/2018.

RESUMO

FURTADO, L C**. Potencial anticâncer de substâncias isoladas de *Streptomyces* sp. recuperada da ascídia *Euherdmania* sp.** 2019. 104 p. Mestrado em Farmacologia – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Os produtos naturais de origem marinha despontam como uma fonte de potencial farmacológico inestimável. Dentro dessa perspectiva, o fornecimento sustentável de metabólitos bioativos a partir do cultivo de micro-organismos marinhos figura como uma atrativa solução para a prospecção racional dessas substâncias. Um *screening* inicial com cinco extratos de bactérias marinhas (BRA-339, BRA-341, BRA-346, BRA-374 e BRA-386) mostrou que, além de alto potencial citotóxico, um deles (BRA-346) inibia a atividade catalítica da subunidade ChTL do proteassoma. A bactéria BRA-346 isolada da ascídia endêmica brasileira, *Euherdmania* sp., mostrou-se uma promissora fonte de substâncias citotóxicas. Essa cepa, pertencente ao gênero *Streptomyces,* produz extrato com atividade citotóxica significativa, apresentando CI_{50} de 30 ng/mL em células humanas de carcinoma de cólon, HCT-116. O teste alvo-direcionado em proteassoma purificado de *S. cerevisiae* inibiu a atividade catalítica da enzima a uma concentração média de 0,42 μg/mL, para o extrato, e 0,045 μg/mL, para sua fração enriquecida (BRA-346ADC). Os ensaios cristalográficos detectaram a presença de uma substância pertencente a classe das epóxi-cetonas ligado à subunidade catalítica ChTL. Análises em espectrometria de massas identificaram o íon TMC-86A e dihidroeponemicina na fração. Os inibidores de proteassoma são utilizados clinicamente no tratamento de mieloma múltiplo, mas vêm sendo testados com resultados promissores em outros tipos de cânceres, incluindo gliobastomas. Esse câncer ainda carece de terapia mais efetiva que permita uma maior sobrevida dos pacientes. Testes com a fração enriquecida BRA-346ADC revelaram alta citotoxicidade nas linhagens celulares HOG (oligodendroglioma) e T98G (glioblastoma), CI_{50}= 25,4 e 37,3 ng/mL, respectivamente. A análise da expressão proteica e de genes direcionados para via do proteassoma e estresse do retículo mostraram aumento de ubiquitinação e de genes relacionados a resposta ao estresse do retículo induzidos pelo tratamento com a fração BRA-346 ADC. Esses resultados demonstram a importância das substâncias produzidas pela bactéria Streptomyces sp. BRA-346 frente a modelos de Glioblastoma.

Palavras-chave: Micro-organismos marinhos. Substâncias citotóxicas. Proteassoma.
.

ABSTRACT

FURTADO, L C**. Potencial anticâncer de substâncias isoladas de *Streptomyces* sp. recuperada da ascídia *Euherdmania* sp.** 2019. 104 p. Master thesis in Pharmacology – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Marine natural products emerge as a source of inestimable pharmacological potential. In this perspective, the sustainable supply of bioactive metabolites from the cultivation of marine microorganisms appears as an attractive solution for the rational exploration of these substances. An initial screening with five marine bacterial extracts (BRA-339, BRA-341, BRA-346, BRA-374 and BRA-386) showed that, besides of the high cytotoxic potential, one of them (BRA-346) inhibited the catalytic activity of the ChTL subunit of the proteasome. The bacterium BRA-346 isolated from the Brazilian endemic ascidian, Euherdmania sp., was shown to be a promising source of cytotoxic substances. This strain, belonging to the genus Streptomyces, produces extract with significant cytotoxic activity, presenting IC50 of 30 ng/mL in human colon carcinoma cells, HCT-116. The enzymatic assay using purified S. cerevisiae proteasome showed an inhibition with an average concentration of 0.42 µg/mL for the extract and 0.045 µg/mL for its enriched fraction (BRA-346ADC). The crystallographic assays detected the presence of a compound belonging to the epoxy-ketone class bounded to the catalytic subunit ChTL. Mass spectrometric analysis identified the TMC-86A ion and dihydroeponemycin in the fraction. Proteasome inhibitors are used clinically in the treatment of multiple myeloma, but they have been tested with promising results in other types of cancers, including gliobastomas. This cancer still needs more effective therapy that allows a greater survival of the patients. Tests with the enriched fraction BRA-346 exhibited high cytotoxicity in the cell lines HOG (oligodendroglioma) and T98G (glioblastoma), IC50= 25.4 and 37.3 ng/mL, respectively. Analysis of the protein and genes expression related to the proteasome pathway and reticulum stress showed an increase of the ubiquitination and reticulum stress response genes induced by the BRA-346ADC fraction in the treatments. Together these results reinfornce the importance of the compounds present in the Streptomyces sp. BRA-346 in Glioblastoma models.

Keywords: Marine microrganisms. Cytotoxic substances. Proteasome. Glioblastoma.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Figura esquemática da estrutura do proteassoma 26S. 24
Figura 2 - Inibidores do proteassoma.. 26
Figura 3 - Desenho ilustrativo do fluxograma de desenvolvimento do trabalho. 34
Figura 4 - Fotos de bactérias utilizadas no presente estudo.. 35
Figura 5 - Ensaio de inibição da atividade catalítica da subunidade ChtL (quimiotripsina-like) pelos extratos de bactérias isoladas da ascídia Euherdmania sp.. 46
Figura 6 - Perfil cromatográfico (HPLC-UV, 190-700 nm) dos extratos das 5 bactérias estudadas neste trabalho.. 47
Figura 7 - Perfil cromatográfico (HPLC-MS, 50-1500 Da) do extrato das 5 bactérias estudadas neste trabalho.. 47
Figura 8 - Molecular networking com os extratos brutos das cinco bactérias investigadas neste trabalho.. 49
Figura 9 - Ensaio de inibição da atividade da subunidade catalítica ChTL pelo extrato da BRA- 346. 50
Figura 10 - Ensaio de avaliação de inibição do proteassoma pelas frações obtidas do extrato BRA-346.. 51
Figura 11 - Imagem cristalográfica da ligação do composto inibidor do proteassoma.. 52
Figura 12 - Rede molecular com cluster dos deravados da eponemicina apresentando também vários análogos. 53
Figura 13 - Fluxograma do fracionamento do primeiro fermentado biológico em grande quantidade do extrato bruto da BRA-346 guiado pela atividade biológica.. 54
Figura 14 - Avaliação da citotoxicidade das frações obtidas do extrato da BRA-346 em células HCT-116......55
Figura 15 - Cromatogramas das frações BRA-346 ADA – ADE......56
Figura 16 - Cromatogramas (LC-MS) dos padrões adquiridos para este trabalho. 57
Figura 17 - Espectros de fragmentação dos padrões escolhidos para esse trabalho. 58

Figura 18 - Molecular networking com as frações e o extrato bruto da BRA-346 e os padrões dihidroeponemicina e epoxomicina. 59
Figura 19 - Gráfico de avaliação da inibição da atividade do proteassoma......61
Figura 20 - Gráfico comparativo da inibiçao da atividade do proteassoma pelos inibidores comerciais - dihidroeponemicina, epoxomicina, salinosporamida A (concentração única de 30 µM) – e pela fração enriquecida BRA 346 ADC (1 µg/mL). 61
Figura 21 - Heatmap da avaliação de expressão gênica na linhagens de glioma e glioblastoma tratadas com inibidores do proteassoma purificados e a fração BRA-346ADC em relação ao controle DMSO. 64
Figura 22 - Gráficos comparativos da expressão relativa dos níveis de mRNA dos genes ATF4, ATF6, CALR, DDIT3, HSPA5 e XBP1 em HOG tratada com os inibidores do proteassoma e a fração BRA-346ADC.. 65
Figura 23 - Gráficos comparativos da expressão relativa dos níveis de mRNA dos genes ATF4, ATF6, CALR, DDIT3, HSPA5 e XBP1 em T98G tratada com os inibidores do proteassoma e a fração BRA-346ADC.. 66
Figura 24 - Gráficos de expressão relativa de proteínas ubiquitinadas em relação nos tratamentos com inibidores purificados do proteassoma e a fração ADC.. 69
Figura 25 - Gráficos de expressão relativa de proteína Hsp70 em relação a tubulina para o tratamento com inibidores purificados do proteassoma e a fração ADC......70
Figura 26 - Gráficos de expressão relativa das proteínas NF-kB (105 kDa) e NF-kB (52/50 kDa) em relação a tubulina paras os tratamentos com os inibidores purificados do proteassoma e a fração ADC.. 71
Figura 27 - Gráficos de expressão relativa das proteínas NF-κB (105 kDa) e NF-kB (52/50 kDa) em relação a tubulina paras os tratamentos com os inibidores purificados do proteassoma e a fração ADC. 72
Figura 28 - *Immunoblotting* de proteinas ubiquitinadas, Hsp-70, NFkB (105 e 52/50 kDa) e alfa-tubulina.. 74
Figura 29 - Esquema da ativação da via UPR após estresse do retículo endoplasmático (RE)......83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Atividade citotóxica dos extratos orgânicos obtidos em cultura de células HCT-116 avaliadas pelo ensaio do MTT após 72hs de incubação. 35
Tabela 2. Sistema de solventes e gradiente cromatográfico utilizado para análise LC-MS/MS......39
Tabela 3. Parâmetros utilizados na plataforma online GNPS para construção da rede molecular......40
Tabela 4. Células utilizadas no presente trabalho......41
Tabela 5. Sequência de primers usados na qPCR. 45
Tabela 6. Atividade citotóxica da fração BRA-346-ADC em linhagens celulares HOG, T98G e U87MG, por meio do ensaio do MTT. 60
Tabela 7. Avaliação da inibição do crescimento celular das linhagens HOG e T98G tratadas com os inibidores do proteassoma purificados e a fração BRA-346ADC......62
Tabela 8. Resumo da análise qualitativa das alterações moleculares identificadas nas linhagens após os tratamentos......87

LISTA DE SIGLAS

ACTB – gene *Actin Beta*

AcOEt – Acetato de Etila

AMFR – gene *Autocrine Motility Factor Receptor*

ATF4 – gene *Activating Transcription Factor 4*

ATF6 – gene *Activating Transcription Factor 6*

BAX – gene *BCL2-Associated X Protein*

BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool*

BSA – *Bovine Serum Albumine*

B-16 – Linhagem celular de melanoma murino

CALR – gene *Calreticulin*

CANX – gene *Calnexin*

CCIT7 – gene

CEM – Linhagem celular de leucemia humana

CFZ - Carfilzomibe

CHOP - proteína homóloga C/EBP

ChTL - Quimiotripsina-Like

CI_{50} – Concentração Inibitória Média

CIT - Concentração Inibitória Total

CL - *Caspase-Like*

CL_{50} - Concentração Letal Média

CT - *Cycle Threshold*

DDIT3 – gene *DNA Damage Inducible Transcript 3*

DMSO - Dimetilsulfóxido

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

EGFR - Fator de crescimento epidérmico

ER – Estresse do retículo

ERAD - Degradação Proteica Associada ao Retículo Endoplasmático

ESI-QqTOF - *Electrospray-Ionization Quadrupole Time-Of-Flight*

FDA - *Food and Drug Administration*

GBM – Glioblastoma Multiforme

GNPS - *Global Natural Product Social Molecular Networking*

GRP78 - proteína regulada pela glicose 78

HCT-116 – Linhagem celular de câncer de cólon

H**ERPUD1** – gene *Homocysteine-responsive endoplasmic reticulum-resident ubiquitin-like domain member 1*

HOG – Linhagem celular de oligodendroglioma

HL-60 – Linhagem celular de leucemia humana

HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*

HPRT1 – gene da *Hipoxantina fosforribosiltransferase 1*

HRP - *Horseradish Peroxidase*

HSPA4 – gene *Heat Shock Protein Family A Member 4*

HSPA5 – gene *Heat Shock Protein 5*

Hsp70 – *Heat Shock Protein*

HUVECs - Células Endoteliais Da Veia Umbilical Humana

IC95% - Intervalo de Confiança de 95%

IDH – Isocitrato desidrogenase

IκBα – Inibidor de kappa B α

IKK - quinase do inibidor κB

INCA – Instituto Nacional de Câncer

IRE1 - *Inositol-requiring enzyme 1*

JNKs - *Jun N-terminal kinases*

LAMP3 - proteina 3 de membrana associada ao lisossomo

MAPK8 – gene *Mitogen-activated protein kinase 8*

MAPK9 – gene *Mitogen-activated protein kinase 9*

MM – Mieloma Múltiplo

MO59K - Linhagem celular de glioblastoma

MTT - 3-(4,5-dimetil-tiazol-2il)-2,5-difeniltetrazólio bromida

NCBI - *National Center for Biotechnology Information*

NF1 – gene da Neurofibromatose tipo I

NF-κB - Fator Nuclear Kappa B

OMS – Organização Mundial da Saúde

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

PERK - proteína quinase de RNA semelhante a quinase do retículo

PPP1R15A – gene *Protein Phosphatase 1 Regulatory Subunit 15A*

RFU – Unidade Relativas de Fluorescência

ROS – *Reative Oxygen Species*

SYVN1 – gene *Synoviolin 1*

SRB – Sulforodamina B

TCA – Ácido Tricloroacético

TL - *Tripsina-Like*

TNF - Fator De Necrose Tumoral

T98G – Linhagem celular de glioblastoma

UPLC - *Ultra Performance Liquid Chromatography*

UPR – *Unfolded Protein Response*

UPS – Unfolded Protein System

U87MG – Linhagem celular de glioblastoma

U251 – Linhagem celular de glioblastoma

XBP1 – gene *X-box binding protein 1*

WHO – *World Health Organization*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 21

1.1 Câncer e sua problemática 21

1.2 Proteassoma como alvo na terapia anticâncer 23

1.3 Produtos naturais marinhos 27

2 OBJETIVOS 32

2.1 Objetivo Geral 32

2.2 Objetivos Específicos 32

3 MATERIAL E MÉTODOS 33

3.1 Planejamento experimental 33

3.2 Bactérias marinhas 34

3.3 Obtenção do fermentado biológico e extrato bruto das bactérias 35

3.4 Prospecção alvo-direcionada 36

3.4.1 Inibição da atividade do proteassoma 36

3.4.2 Cristalografia de proteínas 37

3.5 Perfil metabólico (HPLC-MS) dos extratos testados e dos padrões 37

3.6 Fracionamento cromatográfico 38

3.6.1 Molecular networking 39

3.7 Avaliação da atividade biológica 40

3.7.1 Linhagens celulares 40

3.7.2. Ensaio do MTT 41

3.7.3 Ensaio da Sulforodamina B 42

3.8 Estudos sobre mecanismos de ação 43

3.8.1 Determinação de proteínas celulares por Western blotting 43

3.8.2 Avaliação da expressão gênica por qPCR 44

4 RESULTADOS 46

5 DISCUSSÃO 75

6 CONCLUSÃO 88

REFERÊNCIAS 89

APÊNDICE(S) 101

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer e sua problemática

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer é um dos maiores problemas de saúde pública. Aproximadamente 14 milhões de novos casos são registrados por ano globalmente, e esse número deve subir 70% até 2038 (OMS, 2018). No Brasil, cerca de 600 mil novos casos anuais de câncer foram estimados para o biênio 2018-2019, sendo a maior porcentagem de câncer de próstata para os homens, e de mama para as mulheres (INCA, 2018).

Câncer é definido como um grupo de centena de doenças que partilham a multiplicação desordenada de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se (formando metástases) para outras regiões do corpo (INCA, 2018).

As células tumorais param de obedecer os mecanismos normais de controle de divisão celular, diferenciação e interação intercelular e com a matriz extracelular e tendem a ser muito agressivas e formar tumores. Os tumores malignos apresentam algumas características em comum, como instabilidade genética, evasão da apoptose, produção contínua de sinais proliferativos, insensibilidade a fatores supressores do crescimento, potencial replicativo ilimitado, indução da angiogênese e metástase, desregulação do metabolismo energético, invisibilidade ao sistema imune e promoção de inflamação associada ao tumor. A instabilidade genética é um componente chave na origem do tumor uma vez que ela possibilita a geração de diversidade genética que, por sua vez, induz a aquisição das demais características carcinogênicas (HANAHAN; WEINBERG, 2000; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

A maioria dos fármacos antineoplásicos tem como principal característica a citotoxicidade, levando a morte das células tumorais por apoptose. Apesar do sucesso em diversos protocolos e até cura, ainda se carece de moléculas mais seletivas e menos tóxicas. A toxicidade da quimioterapia antitumoral baseada na citotoxicidade das moléculas utilizadas é, sem dúvida, o fator limitante mais importante para a aprovação para o uso na clínica bem como para o sucesso das terapias em pacientes que não raro já estão debilitados pela própria doença (WHO).

Mais além, alguns tumores podem desenvolver resistência aos quimioterápicos, por meio da superexpressão da glicoproteína-P, da enzima dihidropirimidina desidrogenase e da glutationa, como normalmente acontece nos

cânceres de mama, próstata, cólon, melanoma e gliomas (LEE; STEELMAN; MCCUBREY, 2004; ROCHA et al., 2016). Desse modo, a busca e o desenvolvimento de novas terapias anticâncer são de grande importância para contornar essas variantes que comprometem a eficiência dos tratamentos e diminuem a sobrevida dos pacientes.

Dentre os cânceres que apresentam resistência a quimioterapias convencionais, merece particular destaque o glioblastoma multiforme (GBM), subtipo mais comum de glioma. Este é o tumor cerebral maligno de quarto grau mais comumente encontrado em adultos com um mau prognóstico e opções de tratamento limitadas e, por isso, apresenta baixa sobrevida para os pacientes. Esse tipo de câncer atinge pacientes com uma faixa etária de 55 a 85 anos e constitui quase 50% de todos os tumores cerebrais malignos primários. A taxa de sobrevivência para portadores de GBM é de 2 anos para cerca de 27% dos pacientes tratados com a terapia padrão (FRIEDMAN; KERBY; CALVERT, 2000; LOUIS et al., 2016; STUPP et al., 2009).

Os gliomas respondem por quase 80% de todos os tumores cerebrais malignos e são responsáveis pela maioria das mortes por tumores cerebrais primários. Esse tipo de tumor surge a partir de células gliais, células que envolvem e suportam células nervosas. Os tumores de mais fácil cura são os de grau I, que apresentam delimitações. Já os glioma de graus II a III mostram infiltração difusa, e os de grau IV, além da infiltração, são bastante invasivos (DANG; JIN; SU, 2010).

O tratamento convencional inclui retirada do tumor seguida por radioterapia e quimioterapia (temozolomida). Suas altas taxas de recorrência, resistência geral à terapia e deterioração neurológica diminuem a eficiência da terapia e a sobrevida do paciente (KIM et al., 2015). Isso acontece em virtude do local de surgimento do tumor, que permite que as células malignas estejam protegidas pela barreira hematoencefálica, que por ser um órgão essencial e de difícil acesso, limita a terapia local. Esse tipo de tumor é bastante invasivo e coloniza áreas do cérebro que controlam importantes funções, como motoras, da fala e dos sentidos. Portanto, a cirurgia nessas áreas são de alto risco, além de que o seu difícil acesso impossibilita uma retirada eficiente de todas as células malignas, podendo levar a progressão do tumor ou recorrência da doença (DAVIS, 2016).

A temozolomida (Temodar®) é um agente alquilante de DNA usado na terapia de primeira linha para gliomas de alto grau e glioblastoma multiforme. Sua metabolização leva a produção do cátion metildiazônio que transfere um grupo metila

para o DNA que, consequentemente, leva a quebras na fita dupla do DNA e representa a citotoxicidade do fármaco por meio da promoção de morte celular por apoptose ou autofagia (ROOS et al., 2007; VILLANO; SEERY; BRESSLER, 2009).

Histologicamente, os gliomas são classificados em astrocitomas, oligodendrogliomas, oligoastrocitoma mistos ou ependimomas de acordo com semelhanças morfológicas. Para os astrocitomas (que se assemelham aos astrócitos) é frequente o desenvolvimento de glioblastomas de grau IV (GBM). É importante destacar que o glioblastoma multiforme se divide em primário e secundário e, para o primeiro tipo, não ocorre casos anteriores de câncer de cérebro, contudo, para o segundo, o seu desenvolvimento é recorrência e progressão de astrocitomas de graus II e III (KLEIHUES; OHGAKI, 1999; LOUIS et al., 2007).

Algumas mutações são caracteristicamente encontradas nos gliomas. Estudos dos genes desse tipo de câncer mostraram que os casos clássicos de gliomas exibem amplificação do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), diminuição dos níveis de neurofibromina (gene NF1), aumento da expressão de genes da família do fator de necrose tumoral (TNF) e aumento da via do NF-κB (GOODENBERGER; JENKINS, 2012; VERHAAK et al., 2010). Vale destacar também mutações nos genes da isocitrato desidrogenase (IDH1 e IDH2) que ajudam a promover a gliomagênese.

1.2 Proteassoma como alvo na terapia anticâncer

Considerando que o câncer está, de forma geral, relacionado a disfunções no ciclo celular e que o complexo proteolítico proteassoma é vital para esse controle, moléculas que interajam com o proteassoma podem estar associadas ao controle do câncer. As células tumorais também dependem do fator de transcrição NF-κB, que inibe a apoptose e promove a expressão de fatores de crescimento e citocinas importantes para a patogênese tumoral (HIDESHIMA et al., 2002). O tratamento com inibidores do proteassoma evita a degradação do IκB que se mantém preso ao NF-κB, evitando seu deslocamento para o núcleo celular. Essa inibiçao também leva ao acúmulo tóxico de proteínas mal-enoveladas, o que ativa as JNKs (*Jun N-terminal kinases*) e eventualmente a apoptose (GOLDBERG, 2012).

O proteassoma controla importantes processos biológicos, tais como: estresse proteico (degradação de proteínas mal enoveladas e homeostase proteica), mitose,

crescimento celular, quimiotaxia, apresentação de antígenos, angiogênese, apoptose e regulação da expressão gênica (FRANKLAND-SEARBY; BHAUMIK, 2012; GOLDBERG, 2003; GOLDBERG, 2007; GOLDBERG, 2012; SCHMIDT; FINLEY, 2014). Devido a isso, este complexo enzimático multicatalítico torna-se um alvo clínico atraente para o desenvolvimento de novas terapias, pois sua reciclagem constante de aminoácidos é decisiva para permanente síntese proteica das células tumorais.

A organização estrutural do proteassoma se divide em: região central 20S e tampa reguladora 19S (Figura 1). Essa região central consiste em uma estrutura cilíndrica com atividade de hidrólise peptídica, e a região reguladora, situada nas extremidades, realiza função de reconhecimento do substrato, remoção e desdobramento da cadeia de ubiquitina, por meio de um processo dependente do ATP.

Nos proteassomas presentes em células de mamíferos, a estrutra central do complexo proteolítico possui 2 anéis α externos idênticos e 2 anéis β internos idênticos. Cada anel β abriga 3 subunidades catalíticas (β1, β2 e β5) que exibem diferentes preferências de substrato, referidas como caspase-like (CL), tripsina-like (TL) e quimotripsina-like (ChTL) (DICK et al., 1998).

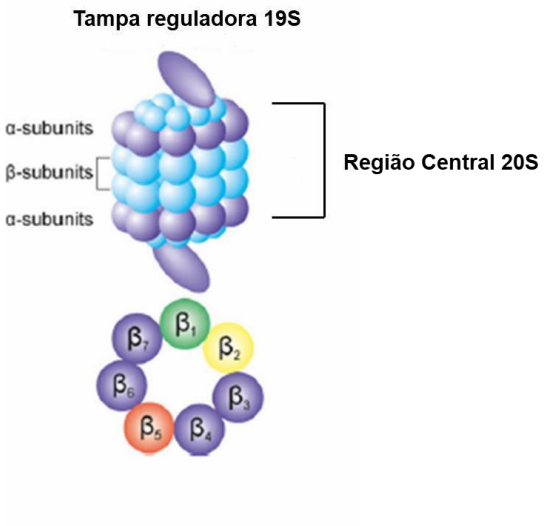


Figura 1 - Figura esquemática da estrutura do proteassoma 26S.
Complexo proteolítco composto pela região central 20S e tampa reguladora 19S, além de suas subunidades catalíticas, β1, β2 e β5. Adaptado de Kubiczkova et al. (2014).

Para selecionar as proteínas que devem ser direcionadas para a câmara interna do complexo e degradadas, estas são marcadas pela ligação covalente de

cadeias de poliubiquitina (ubiquitinação) que juntamente com a proteólise formam o sistema ubiquitina-proteassoma (UPS, do inglês *Ubiquitin Proteasome System*), bastante explorado como um alvo para descoberta de fármacos (HUANG; DIXIT, 2016; RABL et al., 2008).

A inibição do complexo proteassoma já é uma estratégia validada para o tratamento de mieloma múltiplo (MM), e também tem sido apontado como alvo para outras neoplasias, incluindo tumores sólidos (KISSELEV; VAN DER LINDEN; OVERKLEEFT, 2012; RAEDLER, 2015; RAJAN; KUMAR, 2016).

Esforços para a validação desse alvo como terapia nos últimos anos levou a aprovação do Bortezomibe como quimioterápico anticâncer em 2003 (MEINERS et al., 2008; ORLOWSKI; KUHN, 2008). Nos ensaios iniciais, o Bortezomibe apresentou citotoxicidade contra linhagens celulares de câncer, especialmente aquelas derivadas do mieloma múltiplo. Estas descobertas *in vitro* também se traduziram em eficácias *in vivo* promissoras em modelos de xenoenxerto de malignidades hematológicas e não hematológicas em camundongo (ADAMS et al., 1999; HUBER; GROLL, 2012; NAWROCKI et al., 2004; TEICHER et al., 1999).

O Bortezomibe é um ácido dipeptídeo borônico que forma uma ligação covalente com o resíduo catalítico da treonina presente nas subunidades β5 e β1 do proteassoma e inibe, preferencialmente, o sítio ChTL do proteassoma (CHEN et al., 2011; GROLL et al., 2006) . Seu mecanismo de ação impede a ocorrência de cascatas de sinalização intracelular, levando a célula à apoptose. A principal via responsável pela morte celular corresponde ao aumento do níveis de IκB que permanece ligado ao NF-κB, impedindo seu deslocamento para o núcleo e ativação, por transcrição, de genes envolvidos na sobrevida celular e de moléculas proliferativas e antiapoptóticas (BRUNTON, 2012).

Uma segunda geração de inibidores surge, e, entre eles, vale destacar o Carfilzomibe, que é um inibidor que se liga fortemente a subunidade ChTL e pertence ao grupo químico das epóxi-cetonas. Apresenta inibição irreversível do proteassoma e estrutura química diferente do Bortezomibe, o que levou a uma resposta mais sustentada em estudos pré-clínicos, resultando em efeitos antiproliferativos e proapoptóticos em linhagens celulares de cancer hematológico (DEMO et al., 2007). Em 2012, foi aprovado para o tratamento do mieloma múltiplo em pacientes que apresentaram progressão da doença mesmo após tratamento com o Bortezomibe.

O grupo epóxi reage fortemente com o resíduo N-terminal de treonina catalítica do proteassoma, e este mecanismo altamente seletivo elimina o potencial de atividade fora do alvo com outras proteases celulares, o que pode contribuir para uma melhor tolerabilidade *in vivo* (F. et al., 2009; GROLL et al., 2000; KUHN et al., 2007).

Há também um outro tipo de inibidor do proteassoma, este apresenta em sua estrutura um anel γ-lactama-β-lactona. Desse grupo, é importante destacar a salinosporamida A (Marizomibe), substância isolada a partir da bactéria marinha *Salinispora tropica*. É um potente inibidor que inibe a proliferação celular *in vitro* de carcinoma de cólon humano (HCT-116), carcinoma de pulmão (NCI-H226), glioblastoma (SF-539), melanoma (SK-MEL-28) e mama (MDA-MB-435) com concentrações inibitórias abaixo de 11 ng/mL. Apresenta inibição 35 vezes maior do que o composto omuralida, que foi utilizado como controle positivo em alguns estudos (FELING et al., 2003). Após três anos da sua descoberta, em 2003, a salinosporamida A ingressou na fase I de testes clínicos para o tratamento de pacientes com mieloma múltiplo, linfomas, leucemias e tumores sólidos, além de outras enfermidades como doenças neurodegenerativas e infecciosas (COOKSON, 2006; CRUNKHORN, 2016; CZESNY et al., 2009; GULDER; MOORE, 2010; KHARE et al., 2016).

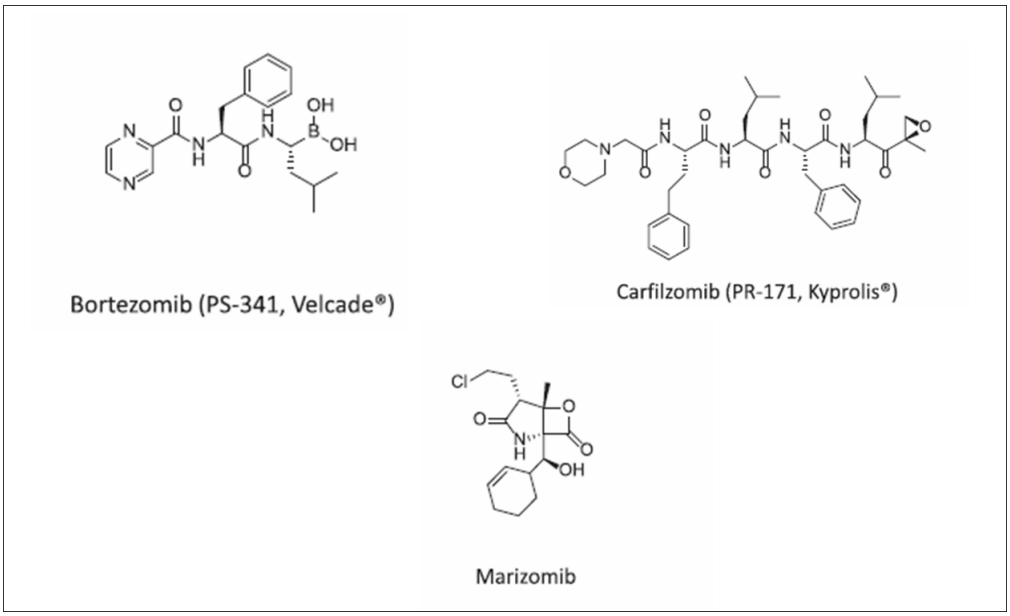


Figura 2 - Inibidores do proteassoma.
Aprovados para uso na clínica: Bortezomibe (2003) e Carfilzomibe (2012).
Fonte: (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov)

O proteassoma também tem sido considerado como um alvo para o tratamento de glioblastoma. Em estudos com animais, o Marizomibe (salinosporamida A)

distribuiu-se no cérebro a 30% dos níveis sanguíneos em ratos e inibiu significativamente a atividade do proteassoma no tecido cerebral de macacos. Acredita-se que esses resultados relacionam-se ao potencial de penetrar a barreira hematoencefálica que o Marizomibe apresenta (DI *et al*., 2015; DI et al., 2016).

Zhang (2018) avaliaram, *in vitro* e *in vivo*, a eficácia antiproliferativa de um nanodisco lipídico carregado com Carfilzomibe ligado ao D-peptídeo DA7R (DA7R-ND/CFZ) utilizando linhagem celular de glioblastoma, U87MG. Os resultados mostraram supressão tumoral e aumento da sobrevida dos ratos portadores do tumor intracranial. O Carfizomibe (Kyprolis®) é um derivado sintético da epoximicina, susbtância produzida pelo actinomiceto Q996-17, isolado de uma amostra de solo coletada na Índia (HANADA et al., 1992; KIM; CREWS, 2013).

Durante os últimos anos, o potencial dos inibidores do proteassoma vem sendo amplamente testado. Sua atividade perturba tanto a homeostase das proteínas como o ciclo celular, por meio da ativação dos programas de morte celular. Os trabalhos desenvolvidos com esses tipos de compostos revelaram que numerosos tipos de cânceres exibem uma função aberrante do sistema ubiquitina proteassoma (UPS) e, portanto, o tratamento com tais inibidores pode apresentar uma estratégia bem-sucedida (CHEN; MADURA, 2005; HOELLER; DIKIC, 2009).

Dentro das diversas estratégias para prospecção de compostos com atividade anticâncer, vem ganhando destaque os ensaios alvo-direcionados, que permitem encontrar substâncias mais seletivas, reduzindo os efeitos colaterais do tratamento. Essa abordagem parte de um alvo celular específico que é fundamental para a sobrevida celular, como é caso de algumas proteínas inibidoras de apoptose, enzimas e complexo proteolítico proteassoma. Nessa ideia, os produtos naturais apresentam moléculas com disposição estrutural que facilita a ligação a determinados alvos, além de fortes interações moleculares (CARLSON, 2010; LA CLAIR, 2010).

1.3 Produtos naturais marinhos

Os produtos naturais são de grande importância para a humanidade desde a antiguidade. Suas propriedades farmacológicas são utilizadas no tratamento de diversas doenças e sua gama de estruturas moleculares possibilita o desenho de novos fármacos e a descoberta de novos alvos para diversas quimioterapias. São amplamente explorados e o desenho de substâncias sintéticas que mimetizam seus

grupos farmacofóricos só vem aumentando. Por meio de programas computacionais, a descoberta de novas moléculas de origem natural está sendo aperfeiçoada. Avanços em bioinformática promovem a exploração de genes biossintéticos que produzem metabólitos secundários bioativos, o que ajuda a prever suas estruturas químicas e vias de biossíntese (KIM; MOORE; YOON, 2015; NEWMAN; CRAGG, 2016a ; RODRIGUES et al., 2016). Dentre os produtos naturais, vale destacar os de origem marinha que estão em ampla fase de descoberta e expansão e já apresentam oito substâncias aprovadas para uso clínico, sendo 5 destes com atividade anticâncer (GERWICK; MOORE, 2012).

Os mares e oceanos abrigam mais de 90% da biodiversidade do planeta entre macro e micro-organismos (HILL; FENICAL WILLIAM, 2010; JIMENO et al., 2008), e essa diversidade biológica está ligada a uma variedade de metabólitos, que são produzidos devido a intensas pressões ecológicas. Segundo Newman e Cragg (2016b), o ambiente marinho apresenta substâncias extremamente potentes, com atividades antitumorais, anti-inflamatórias, analgésicas e imunomoduladoras.

Os estudos com produtos naturais marinhos iniciaram na década de 50, com o isolamento dos arabinucleosídeos espongouridina e espongotimidina da esponja marinha *Cryptotethya crypta*, que serviram de inspiração para síntese do ARA-C, ARA-A e AZT, utilizados para tratamento de leucemia, *Herpes* vírus e AIDS, respectivamente (BERGMANN; BURKE, 1956; BERGMANN; FEENEY, 1951; BERGMANN; STEMPIEN, 1957; NEWMAN; CRAGG, 2012). Os produtos naturais apresentam mecanismos de ação incomuns, devido a sua estrutura química atípica, o que lhes permite serem testados e usados na clínica (GERWICK; MOORE, 2012).

Em 2003, um trabalho desenvolvido por Jimenez e colaboradores utilizou 10 espécies de ascídias abundantes no litoral cearense, entre elas *Euherdmania* sp. e *Eudistoma vannamei*, para verificação da atividade citotóxica de seus extratos. Seis espécies de ascídias apresentaram extratos com atividade biológica em pelo menos um dos testes empregados. O extrato de *E. vannamei* mostrou a mais alta citoxicidade em todas as células tumorais testadas, com CI_{50} variando de < 2 μg/mL para células leucêmicas CEM a 23,8 μg/mL para células de melanoma murinho B16 (JIMENEZ et al., 2003). Já o extrato da *Euherdmania* sp. também apresentou citotoxicidade nas quatro linhagens de células testadas com valores de CI_{50} variando de 24,3 μg/mL em

CEM a 53,0 μg/mL em HL-60, sendo, portanto, o primeiro relato de atividade citotóxica para esse gênero.

As ascídias pertencem ao Filo Chordata, Sub-filo Tunicata, Classe Ascidiacea. São animais que se alimentam filtrando água do mar e possuem notocorda em sua fase larval, além de serem dominantes em muitas comunidades marinhas, tendo uma ampla distribuição geográfica (LAMBERT, 2005; WATTERS, 2018). Um estudo de Palanisamy, Rajendran e Marino (2017) forneceu um relato de aproximadamente 580 compostos, isolados de ascídias no período de 1994 a 2014, com atividades antibacteriana, anti-inflamatória, anti-viral, hipoglicemiante, antiproliferativa e antiparasitária.

Existem numerosos relatos de substâncias bioativas oriundas de ascídias do gênero *Eudistoma* (PALANISAMY; RAJENDRAN; MARINO, 2017), que inclui 161 espécies descritas (http://www.marinespecies.org). *Eudistoma vannamei*, por sua vez, é uma ascídia colonial tropical endêmica no litoral nordestino do Brasil (Lotufo & Silva, 2006). Este organismo, juntamente com os micro-organismos associados, tem sido um estudado pelo nosso grupo de pesquisa nos últimos 15 anos como uma fonte inestimável de produtos naturais bioativos. Neste contexto, substâncias de diversas classes químicas já foram isoladas dessa ascídia, incluindo estaurosporinas, antraciclinonas, dicetopiperazinas, alcalóides de pirimidina e uma ditiolpirrolona (ABREU et al., 2014; JIMENEZ et al., 2012; SOUSA et al., 2012; TAKEARA et al., 2015).

O gênero *Euherdmania,* por outro lado, ainda é pouco estudado, apresentando até o momento 15 espécies descritas (www.marinespecies.org). Monniot ((MONNIOT, 1983)1983) descreveu a *Euherdmania fasciculata*, uma espécie nova coletada em Guuadalupe – Caribe, que possui semelhança morfológica com a espécie desse trabalho, mas ainda são necessários dados moleculares que possam confirmar se correspondem de fato a mesma espécie ou não. De todo o modo, esse trabalho é bastante pioneiro, uma vez que não existem estudos envolvendo a microbiota e nem o metabolismo secundário de ascídias desse gênero.

Dos produtos obtidos de ascídias é importante destacar, pela sua relevância clínica, a Trabectedina (ET-743, Yondelis®) obtida da *Ecteinascidia turbinata* e aprovada pela agência regulatória européia (EMEA) em 2007. Esse fármaco é um agente alquilante de DNA utilizado no tratamento de sarcomas de tecidos mole e câncer de ovário (J. MONK et al., 2012).

Os organismos marinhos possuem uma variedade de metabólitos secundários, provavelmente como aparato de defesa. Contudo, a maior parte desses metabólitos são produzidos por micro-organismos endossimbióticos. Estudos demonstraram que alguns compostos isolados inicialmente de invertebrados marinhos são, na verdade, sintetizados por bactérias (CHEN; FU; WANG, 2017; MOHAPATRA; BAPUJI; SREE, 2002), como é o caso da briostatina, produzida pela *Candidatus Endobugula sertula*, bactéria simbionte do briozoário *Bugula neritina* (DAVIDSON et al., 2001).

Em um estudo de Buedenbender et al (2017) espécies de actinomicetos associadas a três ascídias australianas foram investigadas. A análise metabolômica confirmou que a maioria dos metabólitos eram sintetizados pelos Actinomicetos, principalmente aqueles dos gêneros *Streptomyces* e *Micromonospora*.

O potencial dos micro-organismos marinhos na busca de novos fármacos também é fundamentado na importância histórica dos micro-organismos terrestres como fonte de fármacos e, de fato, esforços dedicados neste sentido já possibilitaram o isolamento de inúmeros metabólitos secundários a partir desses grupos. (WILLIAMS, 2008).

Embora sejam necessárias técnicas diferenciadas para o isolamento e cultivo de micro-organismos marinhos, muitos dos princípios desenvolvidos para a fermentação industrial podem ser aplicados para a obtenção dos metabólitos secundários em larga escala, o que resolve tanto a questão da disponibilidade de material como minimiza o impacto ecológico (JENSEN et al., 2000).

Os micro-organismos marinhos desenvolveram um aparato metabólico bastante peculiar que é, de certo modo, muito mais versátil que o de micro-organismos terrestres. Condições únicas de pH, temperatura, pressão, oxigênio, luz, nutrientes e salinidade permitem que ostentem atividades biológicas especiais. Essa característica lhes confere uma enorme capacidade adaptativa, o que garantiu a sua sobrevivência em ambientes às vezes extremos, e favoreceu a produção de metabólitos nunca antes observados para organismos terrestres (ZHANG et al., 2005).

Considerando os fortes indícios de que os micro-organismos associados sejam os verdadeiros responsáveis pelo elaborado arsenal de metabólitos secundários isolados de invertebrados marinhos, a produção desses compostos é viável e sustentável. Uma atrativa solução para a prospecção racional dos recursos do mar é fornecer a esses simbiontes meios de cultivo apropriados, para um suficiente

fornecimento desses metabólitos, por meio da fermentação biológica de micro-organismos marinhos.

Os actinomicetos são considerados o grupo mais promissor para produção de compostos antibacterianos e citotóxicos. A estreptomicina, um exemplo icônico de fármaco antimicrobiano, é obtida de actinomiceto do gênero *Streptomyces* (MIAO; DAVIES, 2010). Esse gênero é responsável por cerca de 7600 compostos com atividade biológica. Os actinomicetos terrestres desse gênero foram os primeiros a serem estudados e suas substâncias bioativas se tornaram medicamentos. Tal gênero foi primeiramente descrito em 1943 por Waksman e Henrici e seus representantes colonizam diversos ambientes, sejam eles terrestres ou marinhos (LI et al., 2011; SANTHANAM et al., 2012).

Mais de 85% dos antibióticos naturais descobertos são provenientes de bactérias do gênero *Streptomyces*. Fármacos em estudos clínicos para tratamento de tumores também têm sido obtidos a partir de micro-organismos deste grupo, como é o caso das antraciclinas. Compostos dessa classe, daunorubicina e doxorubicina, ambas produzidas por *Streptomyces peucetius*, possuem potente atividade citotóxica com mecanismo de ação que envolve espécies reativas de oxigênio e dano ao DNA (OLANO; CARMEN, 2009).

Apesar do considerável arsenal de drogas já existente para o tratamento dos diversos tipos de cânceres e do sucesso terapêutico em vários tratamentos, ainda não se chegou a um composto ideal. Assim, a busca por compostos mais seletivos, com menos efeitos colaterais, maior potência terapêutica e menor índice de resistência para a terapia do câncer é de extrema relevância. Portanto, torna-se imperativa a necessidade de encontrar, desenvolver, e introduzir no arsenal médico, novas opções terapêuticas mais eficientes (COSTA-LOTUFO et al., 2009).

Levando em consideração que a rica biodiversidade marinha do Brasil ainda é pouco explorada, o potencial farmacológico dos micro-organismos marinhos e a carência por substâncias antitumorais, é de grande relevância o estudo dos compostos obtidos a partir desses micro-organismos. Além disto, também é estratégica a busca por novos compostos com atividade farmacológica, ampliando o conhecimento e buscando ajudar na solução da problemática do câncer.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Avaliar o potencial anticâncer de substâncias inibidoras do proteassoma produzidas por bactérias marinhas associadas a ascídias em modelos celulares de glioma e glioblastoma.

2.2 Objetivos Específicos

- Realizar a prospecção alvo-direcionada em extratos de bactérias isoladas de ascídias, utilizando como alvo a subunidade catalítica do proteassoma a partir de ensaios enzimáticos, estudos de cristalografia e redes moleculares (GNPS);
- Identificar substâncias do extrato orgânico da bactéria BRA-346, *Streptomyces* sp., com atividade citotóxica em células tumorais através de fracionamento químico guiado pela atividade biológica;
- Estudar as interações da(s) substância(s) citotóxica(s) com o proteassoma, utilizando estudos de atividade enzimática e estudos de cristalografia;
- Validar a atividade biológica de uma fração enriquecida contendo inibidores do proteassoma utilizando modelos celulares de glioma e glioblastoma.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Planejamento experimental

O projeto de mestrado foi delineado a partir de resultados preliminares do Trabalho de Conclusão Curso da aluna realizado na Universidade Federal do Ceará, quando foram isoladas 36 cepas de bactérias a partir de 2 espécies de ascídias, *Euherdmania* sp. e *Eudistoma vannamei*. Dentre essas bactérias, 19 mostraram-se ativas em células de carcinoma de cólon. Para o projeto de mestrado, foram selecionados 5 extratos ativos produzidos a partir das bactérias BRA-339, BRA-341, BRA-346, BRA-374 e BRA-386. Esses extratos foram submetidos ao ensaio de inibição da atividade catalítica do proteassoma em parceria com o Laboratório Nacional de Biociências (LNBio-CNPEM).

O extrato mais ativo (BRA-346) foi, então, submetido a um ensaio de cristalografia com o proteassoma para identificação de potenciais ligantes. Em seguida, esse extrato foi submetido a um fracionamento químico inicial, e as frações obtidas foram testadas novamente para inibição enzimática. A partir desses resultados, as frações ativas foram submetidas a uma análise de desreplicação em um sistema de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas, seguida de análise no sistema *Global Natural Product Social Molecular Networking* (GNPS) (https://gnps.ucsd.edu/) para construção de redes moleculares. Esta análise permitiu em conjunto com os dados estruturais do cristal observado a proposição de íons candidatos ao ligante do proteassoma.

Posteriormente, a bactéria selecionada, BRA-346, foi recultivada em grande quantidade com o objetivo de realizar o fracionamento bioguiado dos ligantes. Os dois cultivos em larga escala não foram suficentes para o isolamento da molécula de interesse em quantidade suficiente para os testes biológicos. Diante desse obstáculo, utilizou-se uma fração enriquecida do extrato para a execução dos testes em linhagens celulares de glioma e gliobastoma, utilizando técnicas, como ensaios de citotoxicidade, expressão de genes e marcação de proteínas, para obter informações qualitativas e quantitativas sobre alterações na ultra-estrutura e fisiologia das células tumorais. O desenho experimental encontra-se ilustrado na Figura 3.

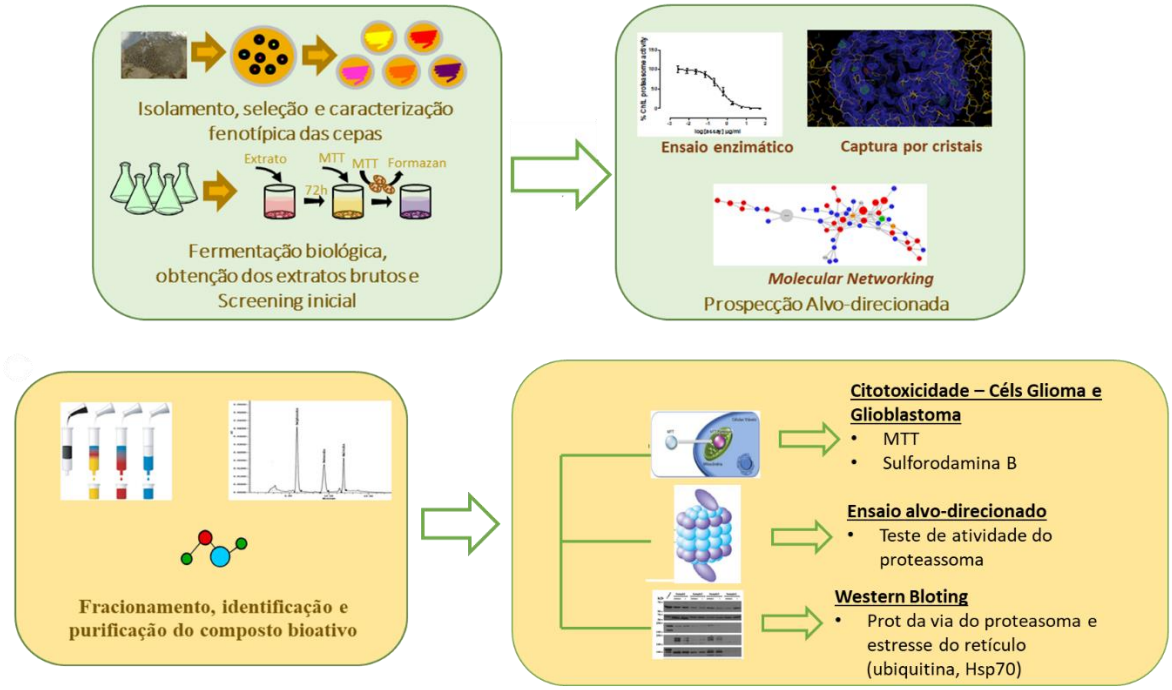


Figura 3 - Desenho ilustrativo do fluxograma de desenvolvimento do trabalho.

3.2 Bactérias marinhas

As cepas bacterianas BRA-339, BRA-341, BRA-346 e BRA-386 (Figura 4) foram previamente isoladas da ascídia *Euherdmania* sp., enquanto que a bactéria BRA-374 (Figura 4) foi isolada da ascídia *E. vannamei*, ambas coletadas na praia da Taíba, no munícipio de São Gonçalo do Amarante, Ceará (3º34,125'S; 38º54,469'W) conforme descrito por Furtado (2017). A seleção das cepas baseiou-se na elevada atividade citotóxica observada por Furtado (2017) frente a células de carcinoma de cólon (HCT-116) através do teste do MTT (Tabela 1). Essas bactérias são mantidas criopreservadas em glicerol 50% no banco de micro-organismos do Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia Marinha (LaBBMar) da Universidade Federal do Ceará, e foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Diego Veras Wilke para a realização deste trabalho.

A identificação molecular das bactérias foi feita a partir do isolamento do DNA genômico, amplificação do gene do 16S rRNA utilizando os primers universais 27F (5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1494R (5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3') (HEUER et al., 1997), e posterior sequenciamento. As sequencias obtidas foram comparadas com outras já cadastradas no banco de espécies tipo Ezbiocloud (www.ezbiocloud.org); e no banco de dados do *National Center for Biotechnology*

Information (NCBI), por meio da ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). Essa análise possibilitou a classificação das bactérias BRA-339, BRA-346, BRA, 374 e BRA-386 como pertencentes ao gênero *Stretomyces* sp. A bactéria BRA-341 não teve sua identificação realizada. Todo o procedimento utilizado encontra-se descrito em detalhes em Furtado (2017).

Figura 4 - Fotos de bactérias utilizadas no presente estudo. Bactérias oriundas banco de microrganismos do Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia Marinha (LaBBMar) da Universidade Federal do Ceará.
Fotos da autora.

Tabela 1. Atividade citotóxica dos extratos orgânicos obtidos em cultura de células HCT-116 avaliadas pelo ensaio do MTT após 72hs de incubação.
Os valores representam suas respectivas IC_{50} (µg/mL) e intervalo de confiança de 95% (IC95%).

Atividade citotóxica			
Extrato	CI_{50} (µg/mL)	IC_{50} (95%)	R^2
BRA 339	0,83	0,48 – 1,42	0,88
BRA 341	5,15	2,99 – 8,85	0,92
BRA 346	0,03	0,02 – 0,04	0,99
BRA 374	2,88	1,09 – 7,62	0,92
BRA 386	1,19	0,89 – 1,59	0,99

Dados do Trabalho de Conclusão de Curso da autora (Furtado, 2017)

3.3 Obtenção do fermentado biológico e extrato bruto das bactérias

Para a obtenção dos extratos, as cepas foram inoculadas em Erlenmeyers de 2L, contendo 1L de caldo A1 (amido, peptona e extrato de levedura) e mantido a 130 rpm de agitação à 28°C por sete dias. Após esse período, o caldo de cultura foi extraído duas vezes com acetato de etila (AcOEt), sendo que para cada extração, 800

mL do solvente foram adicionados aos frascos, que permaneceram sob agitação por, no mínimo, uma hora. Em seguida, o conteúdo de cada frasco foi filtrado em funil de separação, a biomassa resultante foi descartada e o extrato líquido foi rotaevaporado para remoção do solvente e obtenção do extrato bruto.

3.4 Prospecção alvo-direcionada

O primeiro ensaio alvo-direcionado foi realizado em colaboração com a Prof.ª Dr.ª Daniela Trivella no LNBio – CNPEM, assim como as etapas de purificação e caraterização dos compostos bioativos, contando com a participação do Dr. Rafael de Felício.

3.4.1 Inibição da atividade do proteassoma

Os ensaios de inibição do proteassoma, única enzima eleita como alvo de estudos nesta proposta, foram realizados a partir da verificação da inibição da atividade de sua unidade catalítica. O ensaio realizado no LNBio utilizou a partícula 20S do proteassoma purificada de células de *Saccharomyces cerevisiae*. Tal partícula foi incubada com os extratos selecionados em placas de 384 poços. A seguir, foi adicionado o substrato suc-LLVY-AMC, e a intensidade de fluorescência (IF a λmax excitação = 355 nm; λmax emissão = 460 nm) em cada poço guiou a identificação dos extratos ativos, ressaltados pela redução da IF. Um grupo controle (DMSO) e outro na presença de inibidor padrão do proteassoma (MG132) foram utilizados para a normalização dos efeitos observados e expressos como porcentagem de atividade remanescente da enzima. A amostra identificada como mais ativa foi submetida a experimento em diferentes concentrações, a fim de se extrair os seus valores de CI_{50}. Os ensaios foram analisados estatisticamente usando o programa GraphPad Prism 5.0.

Avaliou-se também a inibição da subunidade catalítica do proteassoma por meio do kit 20S Proteasome Activity Assay Cat. nº. APT280 (Merck Millipore). Esse ensaio foi realizado no Laboratório de Farmacologia Marinha (LaFarMar) e através desse kit testou-se os inibidores purificados – dihidroeponemicina, epoxomicina e salinosporamida A -, além de calcular a CI_{50} da fração BRA-346 ADC. Para o controle

negativo aplicou-se DMSO que ficou a uma concentração de 5% de um volume total de 100 µL. Todo o ensaio foi realizado conforme o protocolo do fabricante.

Os ensaios foram analisados estatisticamente usando o programa GraphPad Prism 7.0.

3.4.2 Cristalografia de proteínas

A cristalização do alvo biológico (proteassoma) foi realizada pelo método da gota suspensa (TRIVELLA et al., 2014) utilizando automação disponível no RoboLab (LNBio, CNPEM). Inicialmente os kits de cristalização do RoboLab foram testados (n= 600 condições). As gotas de cristalização foram monitoradas via sistema de fotodocumentação do RoboLab-LNBio. Para o refinamento das condições o procedimento foi manual. Os experimentos de difração de raios X foram realizados no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS-CNPEM, Campinas, SP). Conjuntos de dados foram coletados pelo método de rotação a 100 K. Os dados foram processados com o pacote XDS-XScale (KABSCH, 2010), sendo as fases recuperadas por substituição molecular ou faseamento experimental com o auxílio do pacote PHENIX (ADAMS et al., 2010). O refinamento das estruturas foi realizado com o programa Coot (EMSLEY; COWTAN, 2004) e pacote PHENIX. As estruturas foram validadas com o programa Procheck (LASKOWSKI et al., 1993) e depositadas no Protein Data Bank.

3.5 Perfil metabólico (HPLC-MS) dos extratos testados e dos padrões

Os cinco extratos estudados foram analisados por HPLC-MS/MS e LC-UV para caracterização do perfil metabólico e análise de similaridade. Essas análises foram realizadas em parceria com a Dr.ª Anelize Bauermeister no Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais e Sintéticos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP. Foi utilizado um Sistema de HPLC (Shimadzu) acoplado ao espectrometro de massas (ESI-QqTOF) micrOTOF QII (Bruker Daltonics), equipado com fonte de ionização eletrospray (operando em modo de ionização positivo), e analisador do tipo quadrupolo e tempo de voo. Separação cromatográfica foi realizada em coluna Supelco Ascentis Express C18 (5 µm, 150 x 3.0 mm), equipado com uma pré-coluna. A temperatura da coluna foi mantida à 40 °C. A eluição foi conduzida com gradiente linear de fase móvel, começado com 5% até 100% de acetonitrila durante

25 min com fluxo de 0,7 mL/min. Ambos os solventes continham 0.1% de ácido fórmico. O volume de injeção foi de 15 µL.

Os parâmetros empregados na fonte de ionização foram os seguintes: voltagem: 3.5 kV, cone: 4.5 kV, gás de secagem: 9.0 L/min, temperatura do gás: 220 °C, faixa de *m/z*: 50-1500. Foi empregado um método do tipo “untargeted” o qual seleciona para fragmentar, separadamente, todos os íons acima de 1.0E3 de intensidade, neste método foi empregado uma rampa de energia de colisão de 20 a 75 eV para fragmentação dos íons.

3.6 Fracionamento cromatográfico

O extrato bruto da BRA-346 foi submetido ao fracionamento químico guiado pela a atividade biológica. Os primeiros estudos com esse extrato foram feitos em parceria com a Prof.ª Dr.ª Otília Deusdênia Loiola Pessoa e o Dr. Francisco das Chagas Lima Pinto no Laboratório de Análise Fitoquímica de Plantas Medicinais (LAFIPLAM II) do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará.

Os ensaios preliminares para avaliar a natureza química dos componentes do extrato foram feitos em placas de cromatografia de camada delgada comparativa e revelada com diversos reveladores (UV, H_2SO_4, dragendorff, ninidrina, etc). Após essa etapa, realizou-se partições do extrato bruto em outros solventes orgânicos (hexano, acetato, metanol), e as partições obtidas foram processadas em cromatografia de coluna Sepahdex LH-20. As frações que apresentaram atividade biológica foram separadas por cromatografia de polaridade reversa, Chromabond HR-X, obtendo-se 10 frações (BRA346-ACA - ACE e BRA346-ADA - ADE).

Para a obtenção dos dados de LC-MS/MS do extrato fracionado no LNBio (CNPEM), foi utilizado o cromatógrafo líquido de ultra-eficiência UPLC Acquity HClass Waters acoplado a detector de ultra-alta resolução com fonte de electrospray e analisador híbrido quadrupolo/tempo-de-vôo Impact II da empresa Bruker (*UHR-ESI-QqTOF*). Foi utilizada coluna BEH C18 (poro 1,7 µm, 2,1 mm x 100 mm) acoplado à pré-coluna compatível. O sistema de solventes bem como gradiente de eluição das amostras estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Sistema de solventes e gradiente cromatográfico utilizado para análise LC-MS/MS. Deve ser considerada a linha **A** (H_2O); linha **B** (metanol) e linha **C** (Ácido fórmico 2% (v/v)).

Tempo (min)	Linha A (%)	Linha B (%)	Linha C (%)	Curva
0	90	5	5	6
1	90	5	5	6
7	60	35	5	6
11	0	95	5	6
13	0	95	5	1
15	90	5	5	1

A coluna foi mantida à temperatura de 40º C e as eluições feitas com fluxo de 0,5 mL/min. Os detectores utilizados foram PDA, na faixa de comprimento de onda de 190 a 600 nm, e espectrômetro de massas ESI-QqTOF. O modo de análises no espectrômetro de massas foi o positivo, a fonte electrospray, na faixa de 30 a 1800 Da, com velocidade de detecção de 8 Hz, que apresentava os seguintes parâmetros: *end plate offset* = 500 V, capilar = 4500 V, nebulizador à 4,0 bar, fluxo de gás de secagem (nitrogênio) = 10 L/min, com temperatura de secagem de 200 ºC. Para o MS/MS: célula de colisão = 5,0 eV, com energia de colisão na faixa de 20 a 70 V, *cut-off* de fragmentação de 1000.

Como regra de fragmentação, íons com *m/z* abaixo de 200 Da foram excluídos, e a função “exclusão ativa” estava habilitada (íons precursores com mais de 3 espectros tinham sua fragmentação bloqueada por 0,3 min ou até a razão “intensidade atual/intensidade prévia” ser maior ou igual a 1,8). A substância Formiato de sódio (10 mM) foi utilizada para calibração externa e interna (em cada eluição).

As amostras foram preparadas em DMSO 100% à concentração de 10 mg/mL e foram injetados 1 mL em cada eluição. Brancos cromatográficos e do preparo da amostra foram igualmente analisados (injeções com MeOH, DMSO e com o extrato do meio de cultivo).

3.6.1 Molecular networking

Os dados obtidos descritos nos itens 3.5 e 3.6 foram convertidos pelo software MSConvert para o formato .mzXLM, tipo de arquivo compatível com a plataforma GNPS (WANG et al., 2016) (Wang et al., 2016). A construção da rede molecular foi baseada nos tutoriais apresentados na plataforma GNPS (ALLARD et al., 2016;

KLEIGREWE et al., 2015; NOTHIAS et al., 2018; WANG et al., 2016; YANG et al., 2013). Sumariamente, os dados (.mzXML) foram transferidos ao servidor da plataforma GNPS (ucsd.edu), utilizando o software Fillezilla. Na plataforma, os espectros foram agrupados por similaridade espectral de fragmentação, e os parâmetros usados estão descritos na Tabela 3. Após construção da rede molecular, o arquivo foi visualizado e no software Cytoscape (v. 3.2). Esse procedimento foi realizado para a construção das redes moleculares dos dados analisados no LNBio e no Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais e Sintéticos (NPPNS) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP.

Tabela 3. Parâmetros utilizados na plataforma online GNPS para construção da rede molecular.

Parâmetro GNPS	Valor	
	LNBio	NPPNS
Pairs_min_Cosine	0,5 – 0,65	0,65
Tolerance.PM_tolerance –íon precursor	0,02	0,08
Tolerance.PM_tolerance – íon fragmento	0,02	0,1
MIN_MATCHED_PEAKS	4	4
TOPK	10	10
Cluster_MIN_SIZE	1	1
Maximum_component_size	1	1
Min_peak_int	0	0
Run_MSCluster	On	On
Filter_precursor_window	1	1
Filter_library	1	1
Window_Filter	1	1
Score_Threshold	0,5	0,5
Min_matched_peaks_search	4	4

3.7 Avaliação da atividade biológica

3.7.1 Linhagens celulares

A fração BRA-346ADC do extrato da BRA-346 foi avaliada em células de glioma e glioblastoma (Tabela 4), gentilmente cedidas pela Prof.ª Dr.ª Regina Pekelman

Markus do Instituto de Biociências da USP. A opção por estas linhagens baseia-se nos resultados da atividade de inibidores do proteassoma nesses modelos, e da necessidade proeminente de desenvolvimento de terapias eficazes para o tratamento desse tipo de câncer, considerado como uma doença órfã pela OMS.

Tabela 4. Células utilizadas no presente trabalho.

Linhagem Celular	Tipo Histológico
HOG	Oligodendroglioma
T98G	Glioblastoma
U87MG	Glioblastoma astrocitoma

3.7.2. Ensaio do MTT

Este ensaio consiste numa análise colorimétrica que quantifica indiretamente as células viáveis, baseada na redução do sal 3-(4,5-dimetil-tiazol-2il)-2,5-difeniltetrazólio bromida (MTT), um composto de cor amarela, à formazan, de coloração púrpura, pelos substratos celulares NADH, NADPH, sendo convertido pela enzima succinato-desidrogenase (BERRIDGE; TAN, 1993; MOSMANN, 1983). Dessa forma, a redução do MTT a formazan, é diretamente proporcional à atividade mitocondrial e a viabilidade celular. Este ensaio foi também utilizado para determinar o valor da concentração inibitória média (CI_{50}) a partir de uma curva concentração x efeito para as amostras selecionadas.

As células foram plaqueadas em placas de 96 poços na concentração de 3 x 10^4 células/mL 24h antes do teste. A fração BRA-346ADC foi diluída em DMSO e testada em concentrações seriadas que variaram de 0,0032 a 50 µg/mL, em duplicata, com tempo de incubação de 72h a 37 ºC e 5% de CO_2. Após o período de incubação, o sobrenadante foi descartado e 150 µL da solução de MTT (Sigma)/meio RPMI na concentração de 0,5 mg/mL foi adicionado a todos os poços da placa, e esta foi incubada novamente por 3h. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e o precipitado (formazan) foi ressuspendido em 150 µL de DMSO até sua completa dissolução. A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro de placas em comprimento de onda de 570nm. A análise deste ensaio foi feita usando o programa

GraphPad Prism 7.0, a partir do qual se obteve a concentração inibitória média (CI_{50}) e seus respectivos intervalos de confiança de 95% (IC 95%), por meio de uma regressão não-linear a partir dos dados normalizados.

3.7.3 Ensaio da Sulforodamina B

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

Para a realização deste ensaio, foram plaqueadas 3 x 10^4 células/mL em 4 placas, sendo uma placa tempo zero e 3 placas teste (24, 48 e 72h), 24h antes do início do teste das amostras. Antes da aplicação das amostras, as células da placa tempo zero foram fixadas com 100 µL por poço de uma solução de ácido tricloroacético (TCA, do inglês Trichloroacetic Acid) 10%. Após 24, 48 e 72hs de tratamento, as células das placas teste foram fixadas com a mesma solução de TCA. Após um período mínimo de fixação de 4 horas a 4 ºC, as placas foram lavadas com água deionizada para posterior aplicação da solução de sulforodamina B (SRB) 0,4% - 100 µL/poço – e incubadas por 30 minutos a 37 ºC. O SRB foi removido e as placas lavadas com uma solução de ácido acético 1% (200 µL/poço). Para solubilização das proteínas fixadas e coradas, adicionou-se em cada poço 200 µL do tampão Tris base a 10 mM. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro de placas em comprimento de onda de 570nm. Os valores obtidos foram normalizados em relação a média da placa de tempo-zero e a média do controle negativo (DMSO) de cada placa teste. Os gráficos foram obtidos por interpolação dos dados normalizados em uma curva semilog, usando o programa GraphPad Prism 7.0. Calculou-se para cada composto três concentrações: concentração inibitória média (CI_{50}), concentração inibitória total (CIT) e concentração letal média (CL_{50}).

3.8 Estudos sobre mecanismos de ação

Os estudos sobre mecanismos de ação foram realizados através do uso de técnicas que permitem analisar vias de sinalização e estruturas específicas das células tratadas com as substâncias bioativas.

3.8.1 Determinação de proteínas celulares por Western blotting

O W*estern blotting* (*immunoblotting*) é um método empregado para detectar uma determinada proteína numa amostra. Este método foi utilizado para verificar a expressão aumentada ou diminuída de proteínas-chave que podem estar associadas à inibição do proteassoma e ao estresse do retículo endoplasmático (ubiquitina, NF-κB e Hsp-70).

Para tanto, as células tratadas e o controle tiveram suas proteínas extraídas usando tampão de extração composto de Tris 1M, EDTA 200mM, ortovanadato de sódio, fluoreto de fenilmetano sulfonil diluído em etanol 100%, fluoreto de sódio e pirofosfato tetrassódico. As proteinas foram quantificadas pelo método de Bradford, utilizando como padrão uma curva de BSA (Bovine Serum Albumine, 1 mg/mL). Posteriormente, as proteínas foram submetidas a uma eletroforese em gel de acrilamida. Após a corrida, por eletrotransferência, as proteínas separadas no gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose para a detecção pelos anticorpos. Após a eletrotransferência, na membrana foi realizado o bloqueio para evitar ligações em sítios inespecíficos pelos anticorpos primários e secundários. Marcou-se proteínas ubiqutinadas (ubiquitin P4D1 – Cell Signaling), fator de trascrição (NF-κBp105/p50 – Cell Signaling), proteína de choque térmico 70kDa (Hsp70 – Biolegend) e α-tubulina (Cell Signaling). Para marcação dos anticorpos primários, usou-se anti-mouse IgG, HRP-linked e anti-rabbit, HRP-linked (ambos Cell Signaling). A detecção de todas as marcações foi feita por quimioluminescência, através da reação catalisada pela Horseradish Peroxidase (HRP). As bandas marcadas pelos anticorpos foram quantificadas pelo programa UN-SCAN-IT gel 6.1 que quantifica os pixels de cada banda. Cada valor associado as bandas foram normalizados em relação ao valor de quantificação da tubulina para o cálculo da expressão relativa.

Tais valores de expressão foram analisados no programa GraphPad Prism 7.0, aplicando o teste de Dunnet para análise de variância.

3.8.2 Avaliação da expressão gênica por qPCR

A *Polymerase Chain Reaction* (PCR) em tempo real permite avaliar o nível de expressão de genes pré-selecionados. Essa técnica amplifica fragmentos a partir de cDNa produzidos via reação de transcriptase reversa, o que possibilita identificar a quantidade de RNA mensageiro em sua reação de acordo com padrões estabelecidos.

Para a produção do cDNA foram extraídos RNAs de células tratadas e controle, utilizando o Trizol (CHOMCZYNSKI, 1987) e seguindo as etapas descritas em no protocolo desse reagente (TRIzol Reagent User Guide – Thermo Fisher Scientific). Após extração, o RNA foi quantificado para a posterior produção do cDNA. A construção do cDNA foi feita de acordo com o protocolo do *Kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Thermo Fisher Scientific) com adição do inibidor de ribonuclease RNaseOUT™ (Invitrogen) e primers randômicos, conforme as seguintes etapas: 10’ a 25 ºC; 2 ciclos de 60’ a 37 ºC e um ciclo de 5’ a 85 ºC.

Ao cDNA foi adicionado Sybr Green PCR Master Mix e uma solução a 300nM dos primers *foward* e *reverse* de cada gene previamente selecionado (Tabela 5). Utilizou-se como marcador endógeno os genes da hipoxantina fosforribosiltransferase 1 (HPRT1) e da beta-actina (ACTB). A reação de qPCR exigia 12uL de volume e suas etapas consistiam em: 2’ a 50 ºC e 10’ a 95 ºC para o estágio de manutenção, 40 ciclos de 15” a 95 ºC e 1’ a 60 ºC para o estágio da PCR; e 15” a 95 ºC, 1’ a 60 ºC e 15” a 95 ºC para o estágio da curva de *melting*. Para análise de expressão relativa, utilizou-se os valores obtidos da média do Cycle Threshold (CT) de cada gene. O valor de cada gene foi normalizado em relação a média da razão dos valores dos endógenos. O valor de expressão relativa dos controles foi adotado como 1 e dos tratamentos foram calculados em relação ao controle. A construção dos gráficos foi feita pelo programa GraphPad Prism 7.0. Para construção do *heatmap*, utilizou-se o programa MeV: MultiExperiment viewer.

Tabela 5 - Sequência de primers usados na qPCR.

Primers	Sequência
ACTB_FW	AGGCCAACCGCGAGAAG
ACTB_RV	ACAGCCTGGATAGCAACGTACA
*AMFR*_FW	GTCAGGGAAGAACATCAAGGAG
*AMFR*_RV	GGGGAAACATCTCTTGAATCTG
*ATF4*_FW	ATGTCCCCCTTCGACCAG
*ATF4*_RV	CCATTTTCTCCAACATCCAATC
*ATF6*_FW	TGAACTTCGAGGATGGGTTC
*ATF6*_RV	TCACTCCCTGAGTTCCTGCT
*BAX*_FW	GAGCTGCAGAGGATGATTGC
*BAX*_RV	CAGCTGCCACTCGGAAAA
*CANX*_FW	GCCTCCGCCTCTCTCTTTAC
*CANX*_RV	CCATGATCTCTAGCCTCCCG
*HSPA5*_FW	TCAAGTTCTTGCCGTTCAAGG
*HSPA5*_RV	AAATAAGCCTCAGCGGTTTCTT
*CALR*_FW	GAGCCTGCCGTCTACTTCA
*CALR*_RV	AACTGAGAACGAATTTGCCA
*CCT7*_FW	CATTCTCAACAAGCTGCGGG
*CCT7*_RV	TTGATCCGCACCATAGCTGG
*DDIT3*_FW	AGAACCAGGAAACGGAAACAGA
*DDIT3*_RV	TCTCCTTCATGCGCTGCTTT
*HERPUD1*_FW	GTTGGGTGGTTTCCATTTAG
*HERPUD1*_RV	CTTCCTGTAAGTTATTGTTGGG
*HPRT1*_FW	GAACGTCTTGCTCGAGATGTGA
*HPRT1*_RV	TCCAGCAGGTCAGCAAAGAAT
*HSPA4*_FW	GCAACAGCAGCAGACACCAG
*HSPA4*_RV	CCTTCTTGGCTTGGGGTGGT
*MAPK8*_FW	CCAGGACTGCAGGAACGAGT
*MAPK8*_RV	CCACGTTTTCCTTGTAGCCC
*MAPK9*_FW	CGGACAGCGTGCACTAACTT
*MAPK9*_RV	TTTCACCAGCTCTCCCATGA
*PPP1R15A*_FW	GATGGCATGTATGGTGAGCG
*PPP1R15A*_RV	GTGTGATGGTGGATAAGAGAAC
*SYVN1*_FW	GACAGTTCAAGAAAGCTGTG
*SYVN1*_RV	TATGGAAAATGTGGTTGCAG
*XBP1*_FW	AGAGTCTGATATCCTGTTGG
*XBP1*_RV	AGTTCATTAATGGCTTCCAG

4 RESULTADOS

Os extratos das bactérias BRA-339, BRA-341, BRA-346, BRA-374 e BRA-386, foram testados para verificação da inibição da atividade catalítica do proteassoma (Figura 5). A cepa BRA-346 que tinha mostrado extrato com potente atividade citotóxica em células HCT-116 (CI_{50} = 30ng/mL) foi a única cepa que apresentou inibição da atividade catalítica do proteassoma.

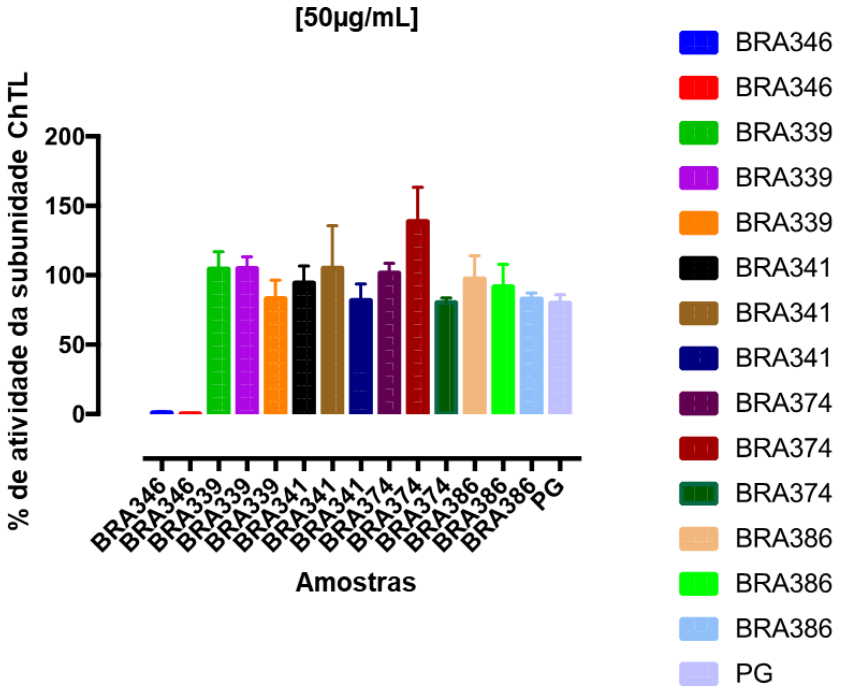


Figura 5 - Ensaio de inibição da atividade catalítica da subunidade ChtL (quimiotripsina-like) pelos extratos de bactérias isoladas da ascídia Euherdmania sp.
O ensaio enzimático foi realizado in vitro com o proteassoma cristalizado de Saccharomyces cerevisiae (1µg/mL) e os extratos (50 µg/mL), que estavam em triplicata, com exceção do extrato BRA-346. Ensaio com 3 experimentos independentes, com exceção da BRA-346.

A análise do perfil metabólico (HPLC-UV) (Figura 6) dos cinco extratos testados mostrou que a bactéria BRA-346 apresenta um perfil químico diferenciado das outras bactérias avaliadas. Essa diferença também pode ser observada na Figura 7, cromatogramas de espectrometria de massas (HPLC-MS), porém com um pouco mais de complexidade referente à quantidade de picos cromatográficos.

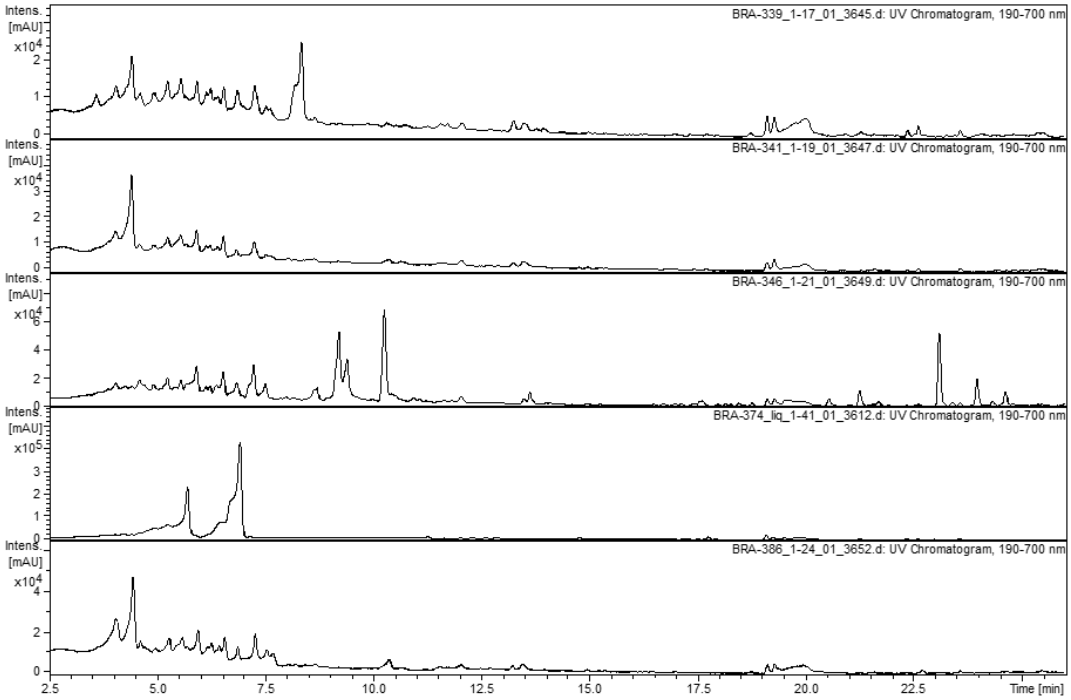


Figura 6 - Perfil cromatográfico (HPLC-UV, 190-700 nm) dos extratos das 5 bactérias estudadas neste trabalho.
Sequência de identificação de cada perfil cromatográfico: BRA-339, BRA-341, BRA-346, BRA-374 e BRA-386.

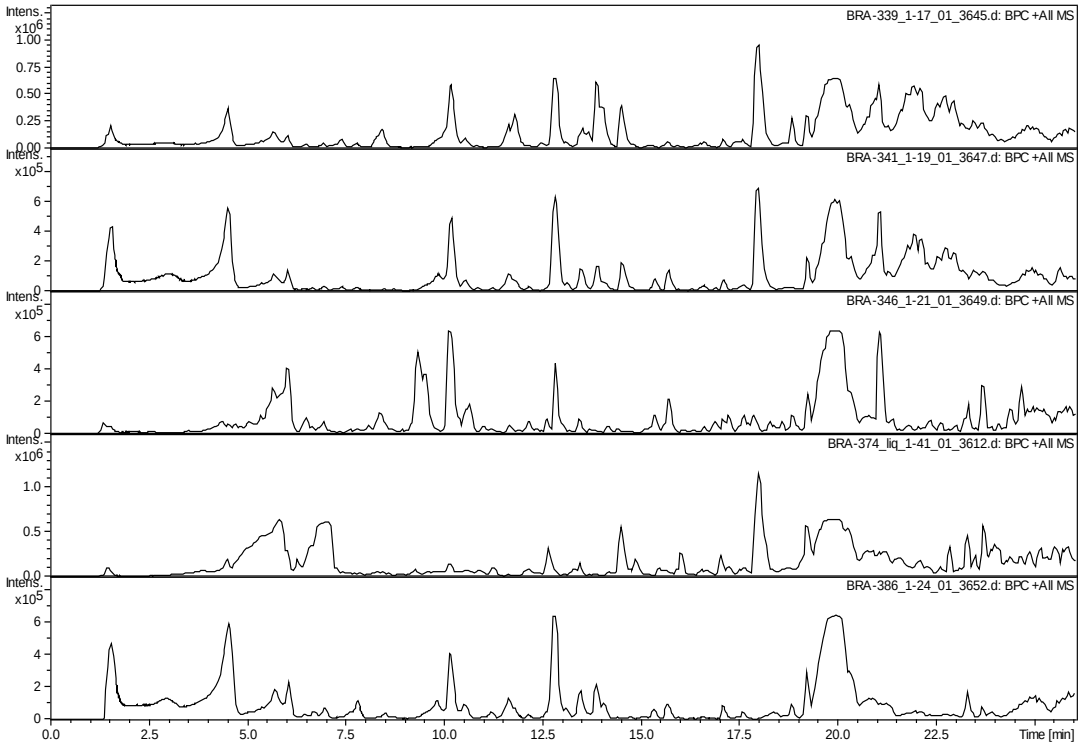


Figura 7 - Perfil cromatográfico (HPLC-MS, 50-1500 Da) do extrato das 5 bactérias estudadas neste trabalho.
Sequência de identificação de cada perfil cromatográfico: BRA-339, BRA-341, BRA-346, BRA-374 e BRA-386.

Com o intuito de observar melhor a similaridade química entre os extratos, e também na tentativa de identificação de substâncias conhecidas, as amostras foram submetidas a análise por *molecular networking*. Por meio dessa análise (Figura 8) é possível observar a presença de muitos íons e grupos moleculares presentes exclusivamente no extrato produzido pela bactéria BRA-374, e não identificados pelas bibliotecas presentes no GNPS. Portanto, essa bactéria é de interesse para estudos futuros como uma promissora fonte de novas estruturas. Além disso, também foram observados alguns grupos moleculares presentes principalmente no extrato produzido pela bactéria BRA-346. Há que se mencionar que o cluster 1 (Figura 8) não foi identificado na base de dados do GNPS, enquanto que o cluster 2 (Figura 8) foi identificado como lipídios contendo fosfocolina.

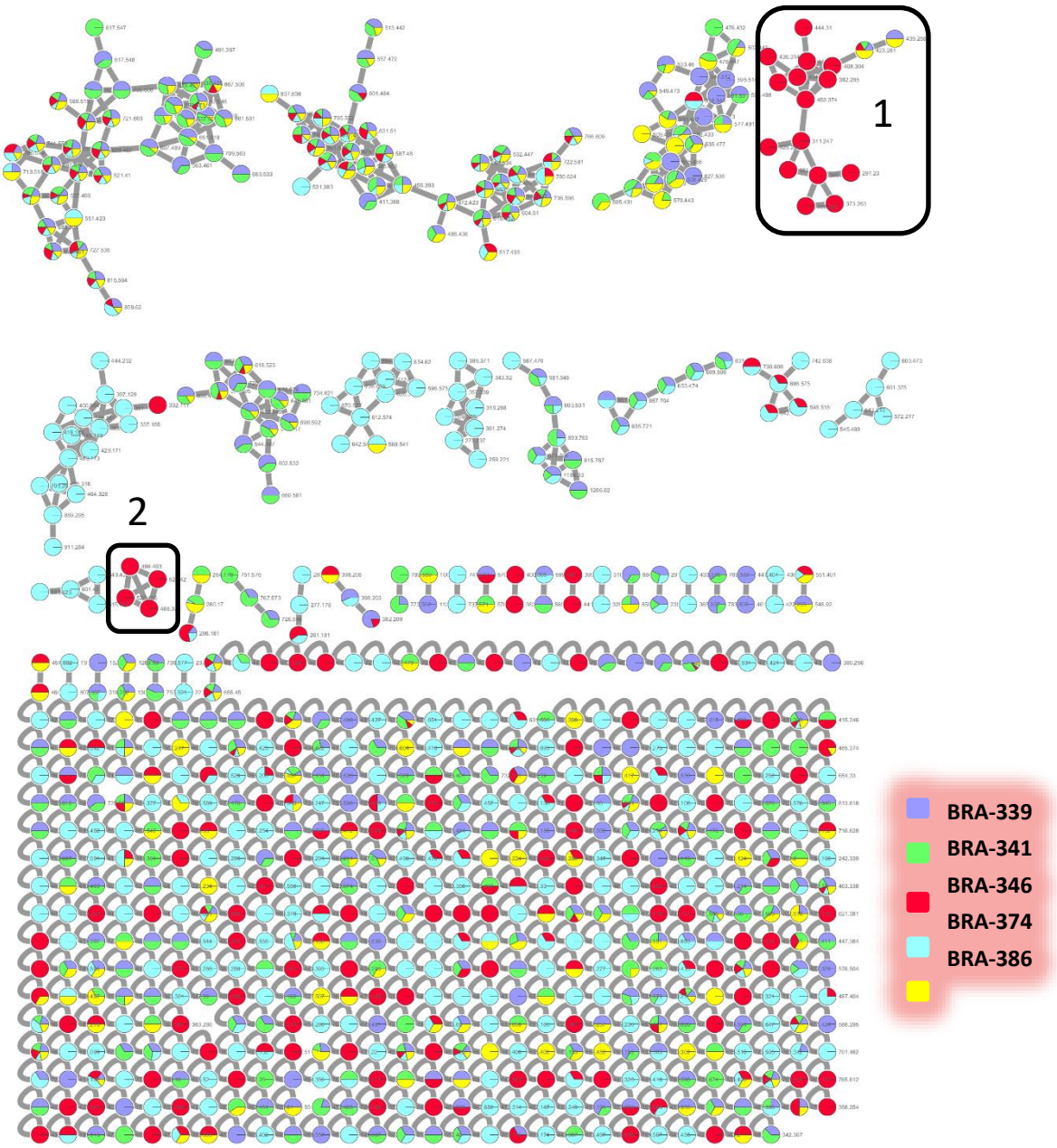


Figura 8 - Molecular networking com os extratos brutos das cinco bactérias investigadas neste trabalho.
Os dados foram obtidos utilizando dados de modo de ionização positiva (ESI +). As cores dos nós representam os extratos de acordo com a legenda e os nós destacados em caixas pretas representam os íons predominantemente presentes na bactéria BRA-346.

Desta maneira, o extrato da *Streptomyces* sp. BRA-346 foi selecionado para continuação deste trabalho. O ensaio de inibição da atividade catalítica do proteassoma foi repetido com concentrações crescentes do extrato da BRA-346 para determinação da concentração inibitória média em relação a atividade catalítica (Figura 9), obtendo-se um valor de CI_{50} de 0,42 µg/mL.

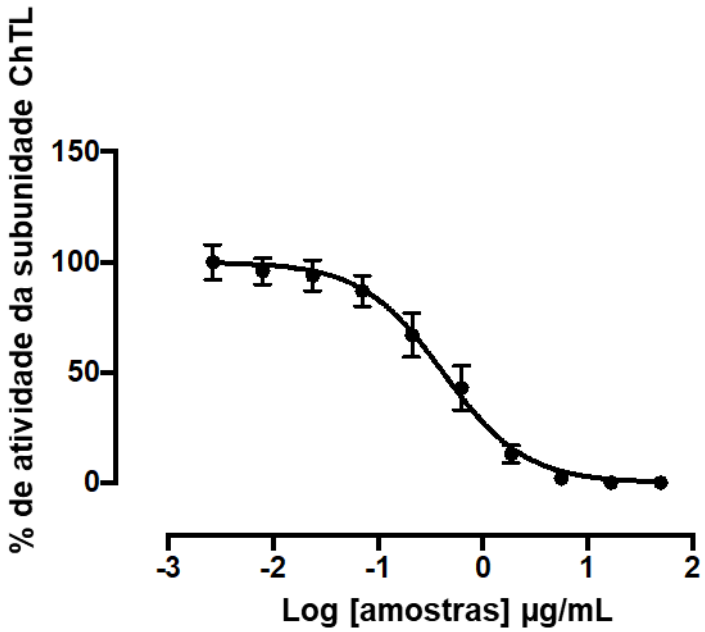


Figura 9 - Ensaio de inibição da atividade da subunidade catalítica ChTL pelo extrato da BRA-346.
Experimento para determinação da concentração inibitória média realizado, em triplicata, com proteassoma cristalizado de Saccharomyces cerevisiae (1 µg/mL), substrato suc-LLVY-AMC (200 µM) por 2 horas de incubação.

As 96 frações obtidas do extrato da BRA-346 foram testadas com relação a inibição da atividade catalítica do proteassoma. Duas frações mostraram-se fortemente ativas, 57 e 58 (Figura 10).

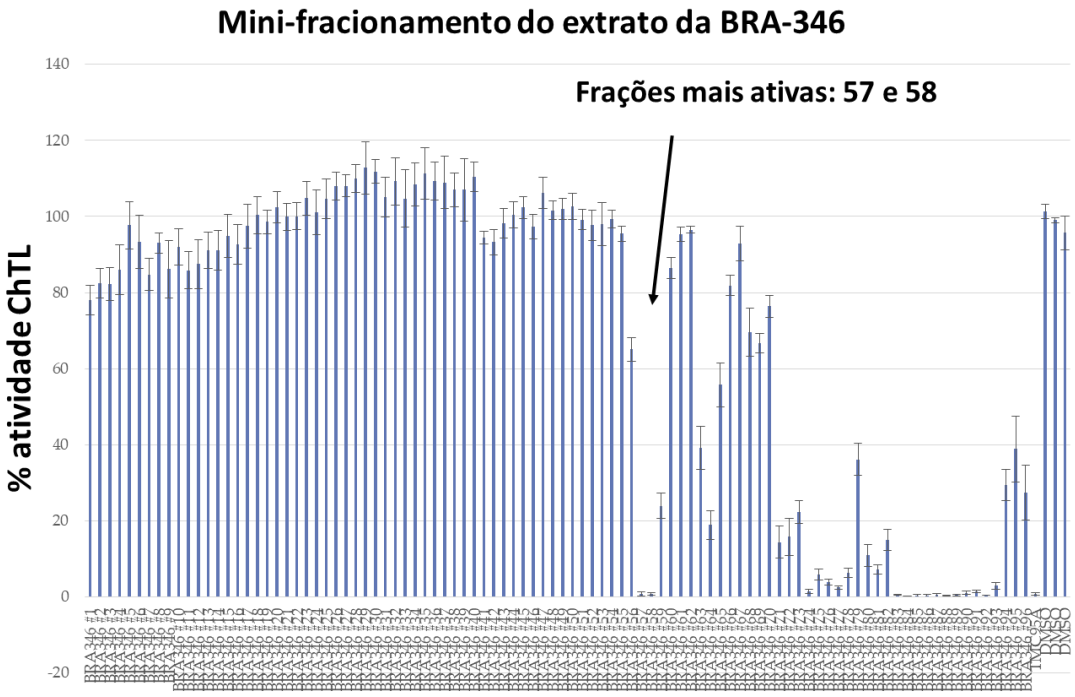


Figura 10 - Ensaio de avaliação de inibição do proteassoma pelas frações obtidas do extrato BRA-346.
Ensaio enzimático, in vitro, de avaliação da porcentagem de inibição da subunidade catalítica ChtL do proteassoma pelas frações (50 µg/mL) que foram obtidas do extrato da BRA-346 em proteassoma cristalizado de S. cerevisiae (1 µg/mL).

Dados de cristalografia mostraram a densidade eletrônica da substância presente nas duas frações mais ativas (57 e 58), ligada no sítio ativo ChTL do proteassoma próximo ao resíduo catalítico de treonina amino-terminal, possibilitando a análise da ligação em resolução atômica e 3 dimensões. A partir desta informação, foi possível confirmar o sítio de ligação do produto natural, seu modo de interação com os átomos da subunidade catalítica e inferir macrocomponentes da estrutura química do produto natural bioativo (Figura 11).

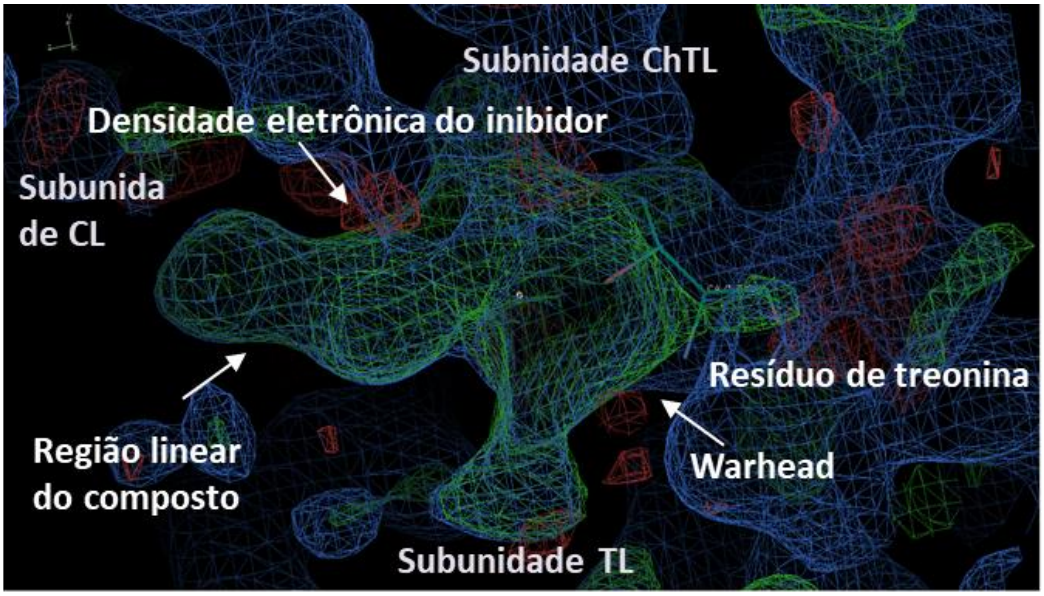


Figura 11 - Imagem cristalográfica da ligação do composto inibidor do proteassoma.
Ensaio de cristalografia mostrando a ligação do inibidor presente nas frações 57 e 58 na subunidade catalítica ChTL do proteassoma.

As frações 57 e 58 foram analisadas por cromatografia líquida de ultra-eficiência UPLC acoplada a espectromêtro de massas de alta resolução e os dados foram processados e submetidos a análise e comparação dos espectros utilizando os algoritmos disponibilizados na plataforma GNPS. As redes moleculares geradas foram analisadas com o software Cytoscape (Figura 12). O íon com relação *m/z* 343,186 (fórmula predita pelo SmartFormula, $C_{16}H_{27}N_2O_6$) foi o único presente em todas as frações ativas, e sua busca no Dicionário de Produtos Naturais revelou apenas a 1-N-deacil,1-N- butanoil-eponemicina como possível candidato.

A proposição do possível candidato como responsável pela atividade biológica apresentada pelo extrato da BRA-346 é corroborada pela densidade eletrônica dessa substância ser compatível com aquela observada nos ensaios de cristalografia mostrados, bem como seu perfil de fragmentação no espectrômetro de massas. Vale salientar que existem ainda outros íons nesse cluster de substâncias presentes nas frações ativas que correspondem a derivados clorados dessa substância.

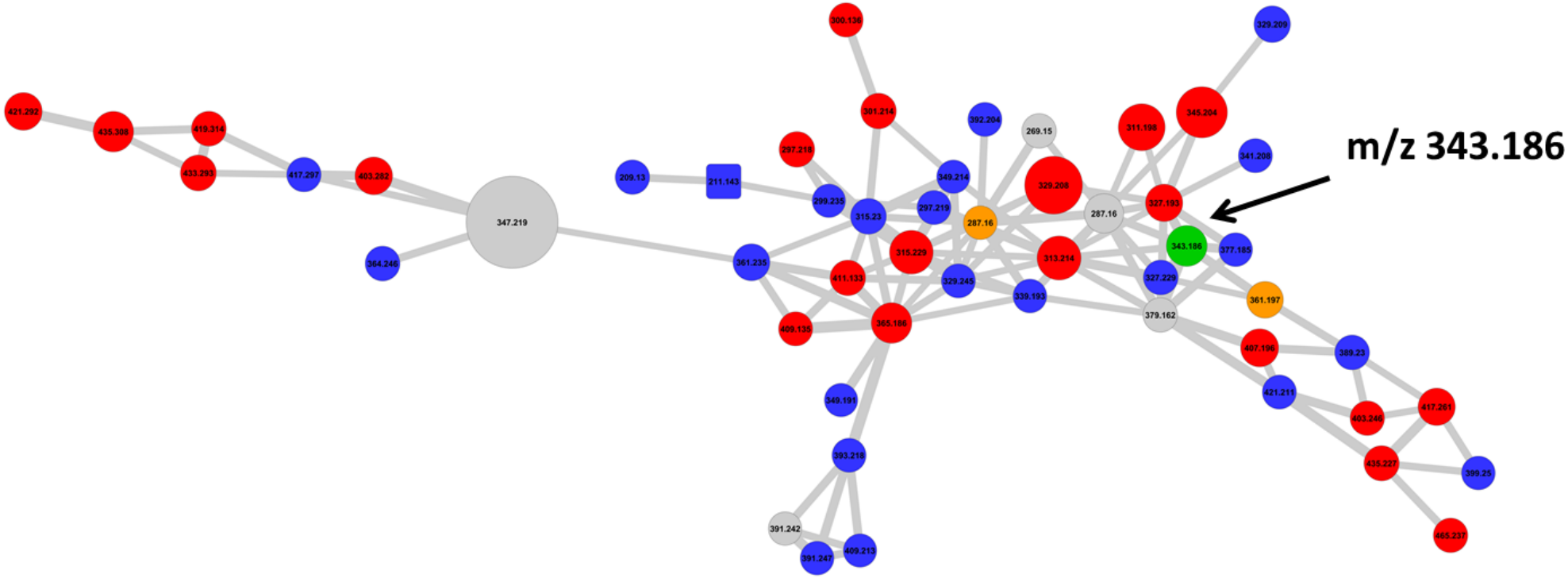


Figura 12 - Rede molecular com cluster dos deravados da eponemicina apresentando também vários análogos.
A substância com *m/z* 343,186 estava presente nas frações 57 e 58, e corresponde a 1-N-deacil, 1-N-butanoil-eponemicina.

A quantidade obtida das frações 57 e 58 não foi suficiente para prosseguir com a purificação do composto e nem para avaliação mais aprofundada da sua atividade biológica. Desta maneira, voltamos nossa atenção para as frações do extrato da BRA-346 obtidos através de procedimentos cromatográficos sequenciais guiados pela atividade citotóxica utilizando incialmente cromatografia de exclusão em coluna de Sephadex LH-20, seguida de cromatografia de afinidade reversa com a resina Chromabond HR-X. O fluxograma desse processo está mostrado na Figura 13.

Como pode ser visto nessa figura, obteve-se três novas frações a partir da partição do extrato - hexano, acetato de etila e hidroalcoólica, sendo estas últimas ativas (CI_{50} < 0,1 μg/mL) (Figura 14A). Diante do valor de CI_{50}, escolheu-se aprofundar os estudos com a fração acetato de etila (BRA-346A), realizando seu fracionamento cujo resultado foram 5 novas frações. A avaliação da atividade biológica dessas frações apresentou a fração BRA-346AD como a mais promissora, com CI_{50} de 0,007 μg/mL (Figura 14B). Essa fração foi, então, selecionada para um novo fracionamento, e a fração mais ativa foi a BRA-346-ADC (CI_{50} = 0,034 μg/mL) (Figura 14C).

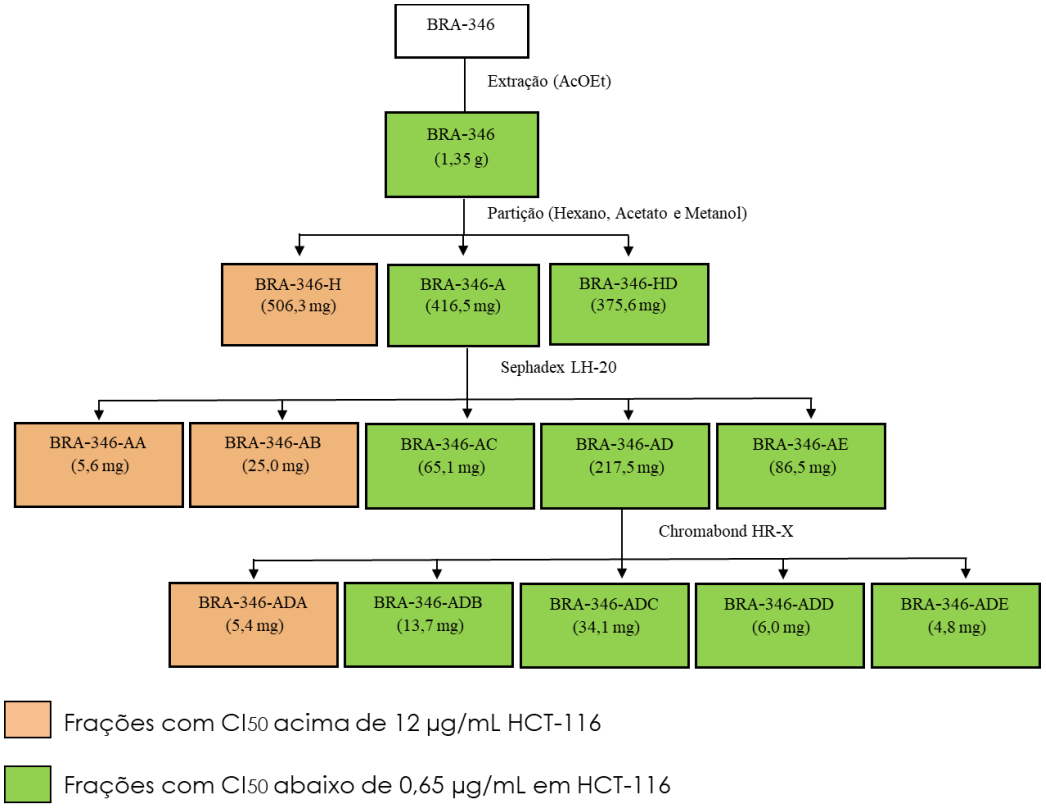


Figura 13 - Fluxograma do fracionamento do primeiro fermentado biológico em grande quantidade do extrato bruto da BRA-346 guiado pela atividade biológica.
Etapas em sequencia: extração com acetato de etila; partição em hexano, acetato de etila e metanol; separação cromatográfica de exclusão (Sephadex LH-20); e cromatografia de polaridade reversa (Chromabond HR-X).

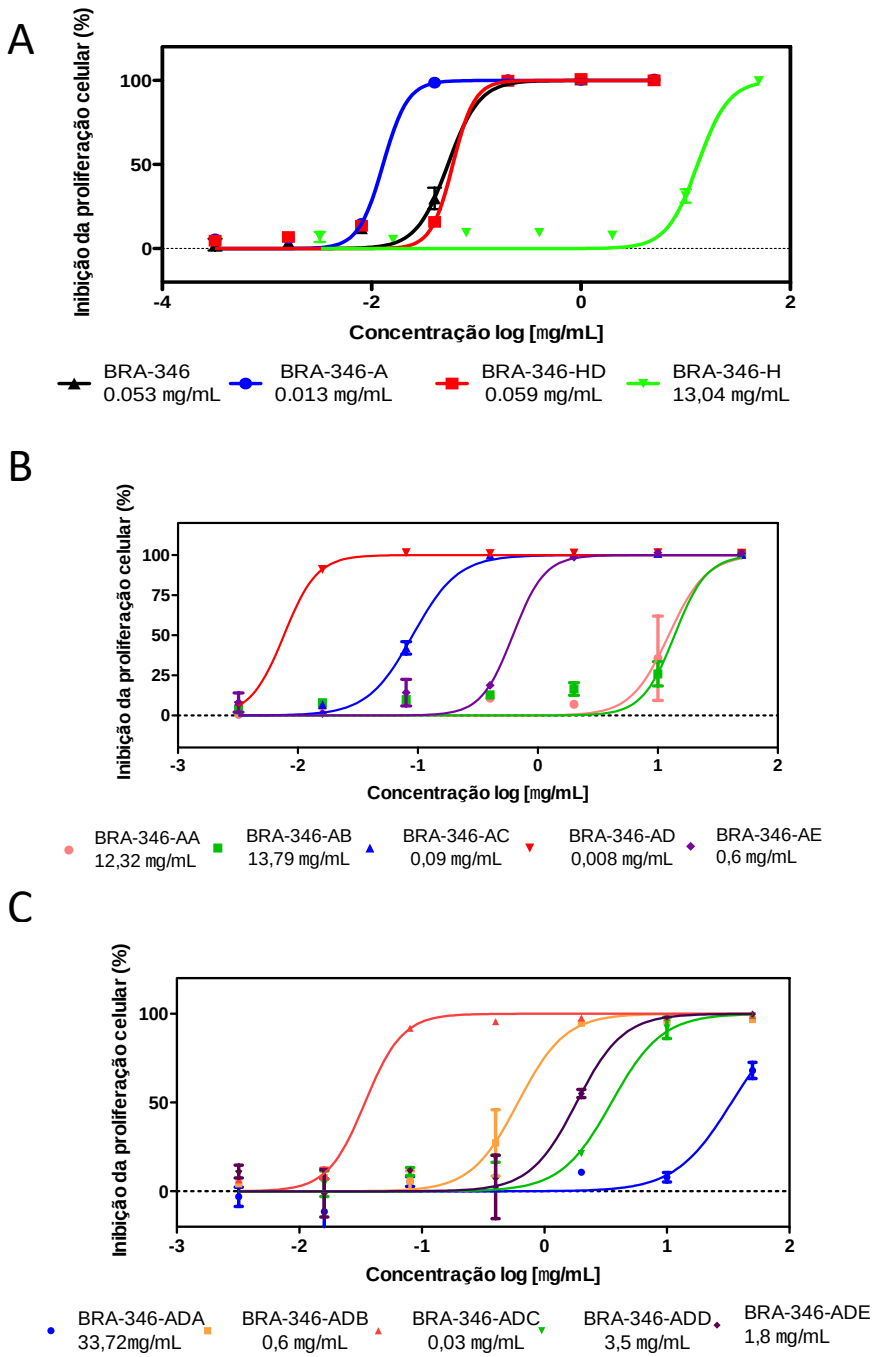


Figura 14 - Avaliação da citotoxicidade das frações obtidas do extrato da BRA-346 em células HCT-116.
Ensaio do MTT com incubação de 72h. Em A – Extrato bruto e amostras obtidas da partição. Em B – Amostras obtidas do fracionamento por cromatografia de exclusão em Sephadex LH-20. Em C – amostras obtidas do fracionamento por cromatografia de polaridade reversa (Chromabond HR-X).

A fim de verificar a presença do ion *m/z* 343,186 nas frações BRA-346-ADA a BRA-346-ADE, essas amostras foram submetidas à análises por LC-MS e LC-UV. Como pode ser observado na Figura 15, as amostras ainda apresentam uma mistura

de substâncias, e entre elas, foi possível confirmar a presença de um íon com *m/z* 343.851 bem próxima daquele encontrado (*m/z* 343,186), além de possíveis análogos.

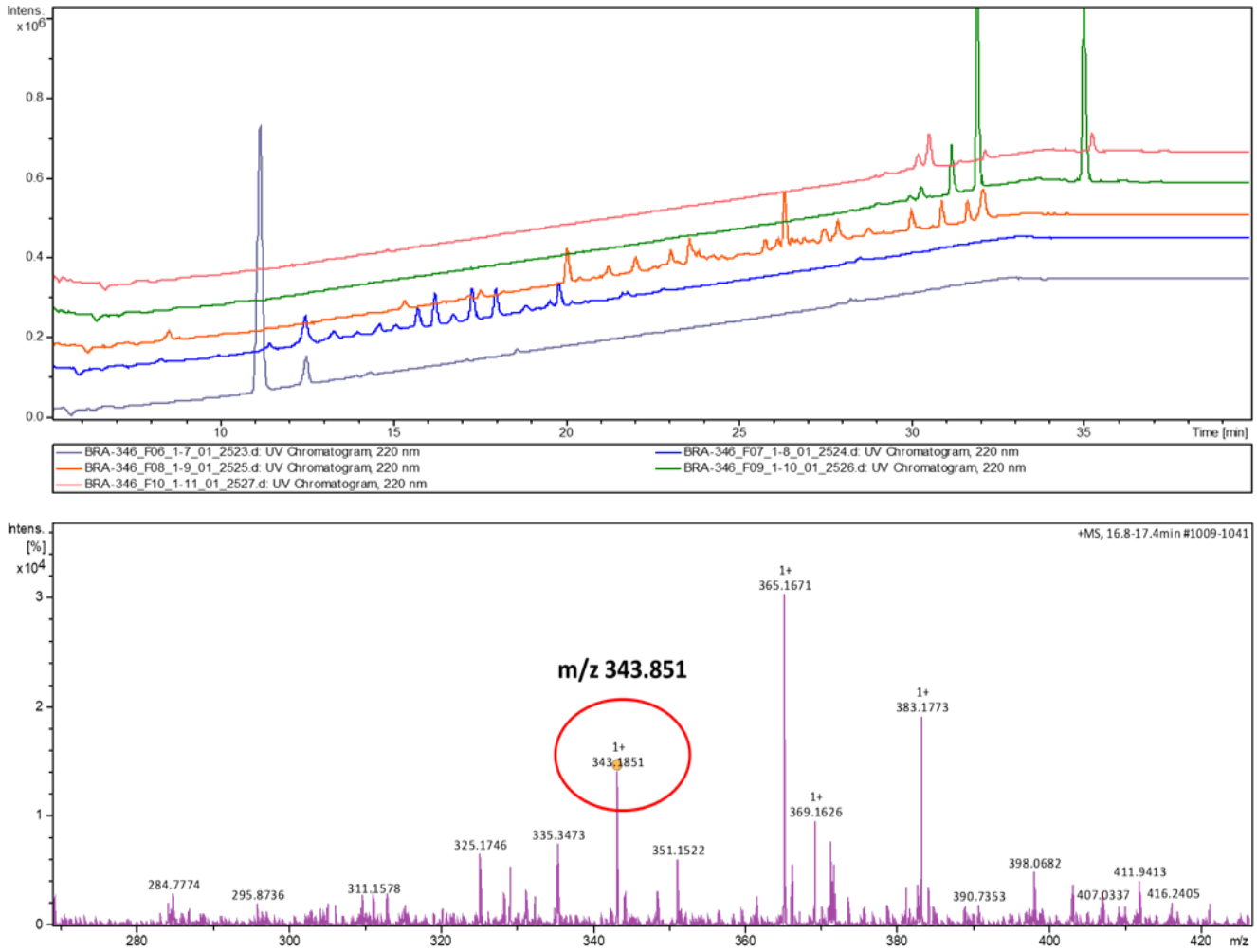


Figura 15 - Cromatogramas das frações BRA-346 ADA – ADE.
Frações analisadas no comprimento de onda de 220nm e espectro de massas da fração BRA-346ADC no tempo de retenção de 17.4 min, mostrando a presença do íon m/z 343.851, indicando ser o mesmo encontrado nas análises realizadas no LNBio.
Legenda da figura: BRA-346_F06: BRA-346 ADA; BRA-346_F07: BRA-346 ADB; BRA-346_F08: BRA-346 ADC; BRA-346_F09: BRA-346 ADD; BRA-346_F10: BRA-346 ADE.

Sabendo que 1-N-deacil,1-N-butanoil-eponemicina é um composto pertencente a classe das epóxi-cetonas, escolheu-se dois padrões membros dessa classe - inibidores do proteassoma já descritos na literatura -, epoxomicina e dihidroeponemicina, para avaliar sua pureza e aquisição de espectros de fragmentação dessas substâncias para usá-los como padrões no *molecular networking,* ajudando assim a identificar análogos presentes no extrato e/ou nas frações do extrato da bactéria BRA-346 (Figuras 16 e 17).

A Figura 16 mostra os cromatogramas dos padrões analisados por HPLC-MS/MS, onde é possível identificar diferenças no perfil cromatográfico entre as substâncias dihidroeponemicina e epoxomicina.

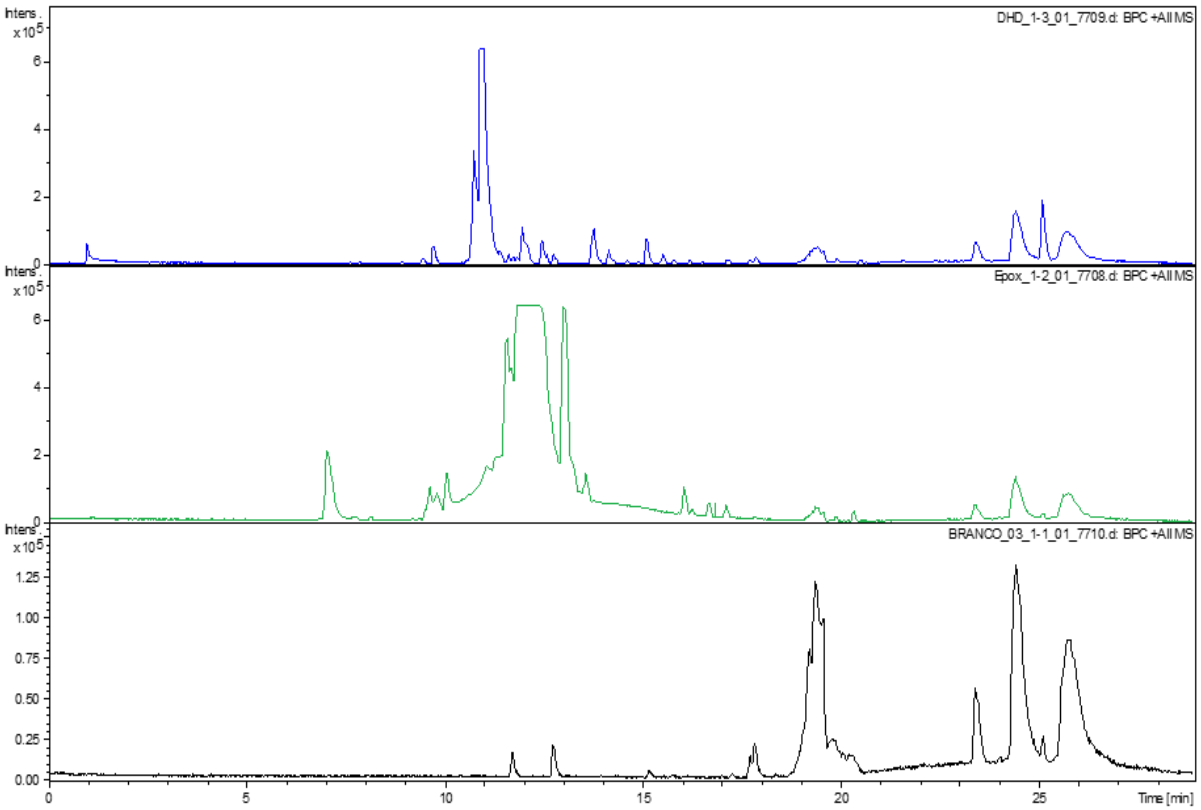


Figura 16 - Cromatogramas (LC-MS) dos padrões adquiridos para este trabalho.
Em azul, cromatograma da dihidroeponemicina, em verde, cromatograma da epoxomicina e em preto, metanol.
.

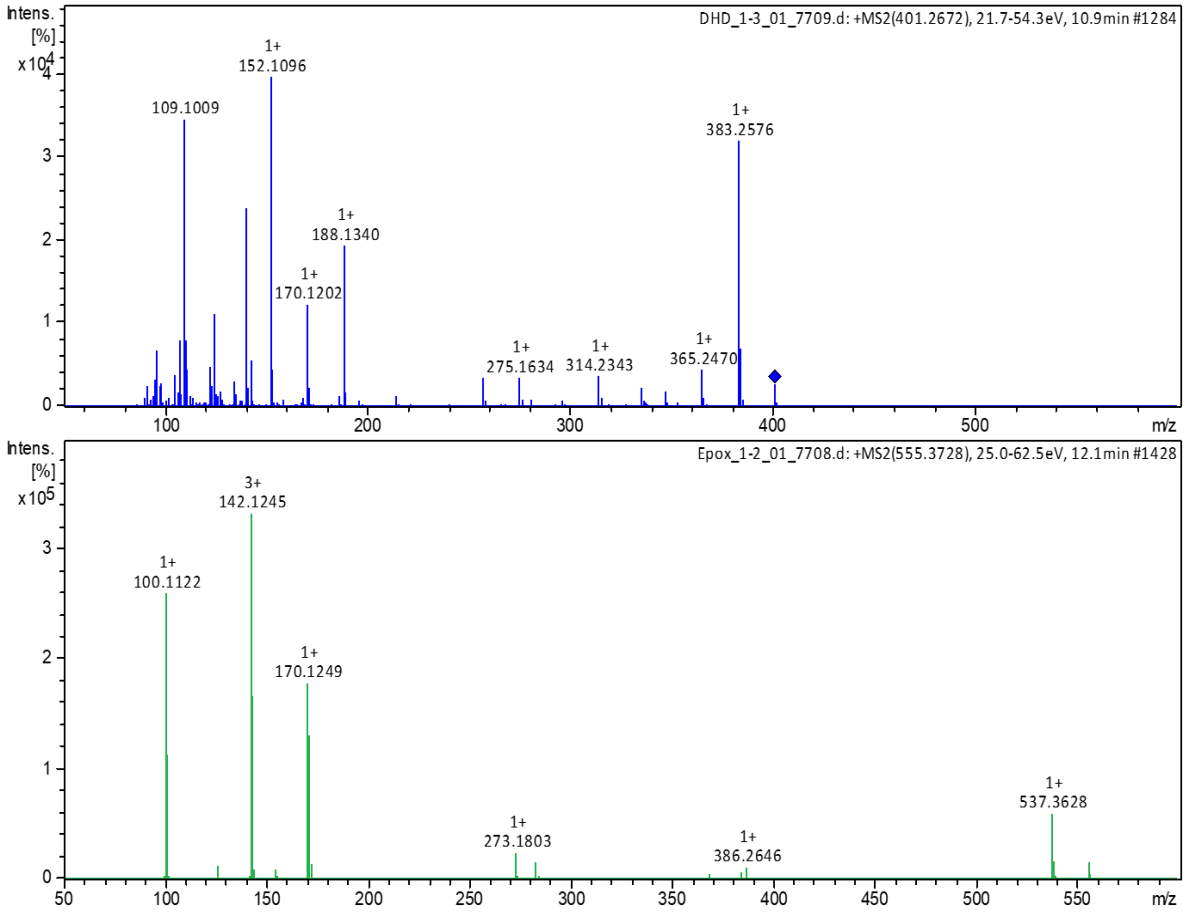


Figura 17 - Espectros de fragmentação dos padrões escolhidos para esse trabalho.
Espectro de fragmentação da dihidroeponemicina no tempo de retenção de 10.9 min (imagem superior). Espectro de fragmentação da epoxomicina no tempo de retenção de 12.1 min (imagem inferior)

De acordo com a Figura 17, é possível observar que as duas substâncias, apesar de serem derivadas de uma mesma classe química, apresentam perfil de fragmentação bem diferente uma da outra, por isso, elas não se agrupam em um mesmo cluster no *molecular networking*.

O *molecular networking* gerado a partir dos íons encontrados mostrou que as frações e o extrato bruto formam um maior número de nós. É possível identificar que a dihidroeponemicina agrupa com íons presentes nas frações, destaque para o íon de *m/z* 401.266. Foi também encontrado nas frações um análogo da dihidroeponemicina com *m/z* 415.2, indicando a presença de um CH_2 a mais em relação ao íon anterior (Figura 18).

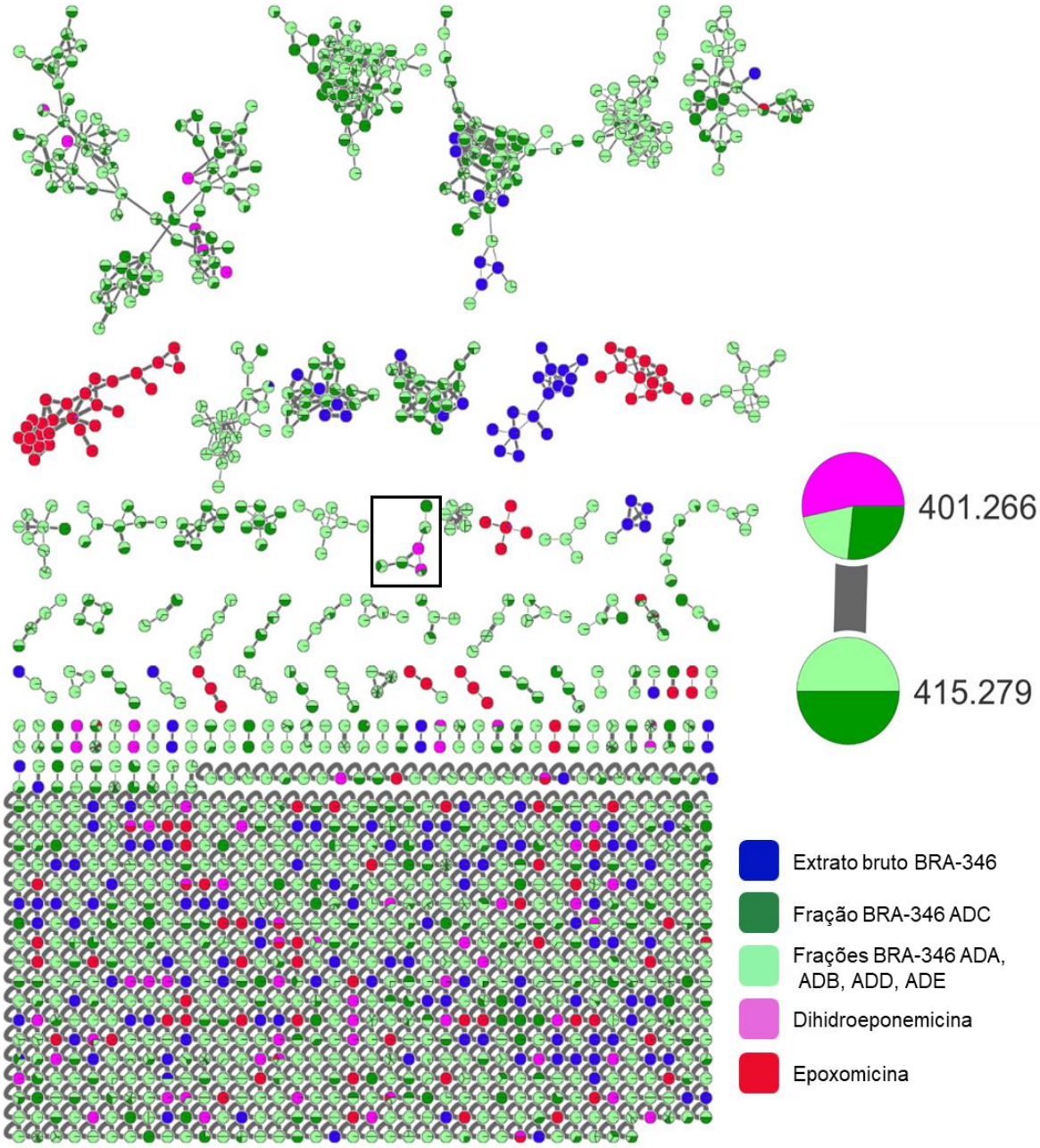


Figura 18 - Molecular networking com as frações e o extrato bruto da BRA-346 e os padrões dihidroeponemicina e epoxomicina.
Agrupamento montado a partir dos dados do perfil de fragmentaçao dos compostos obtidos pelo modo de ionização positiva (ESI +). Os nós representam os íons presentes nos compostos, que são representados por suas cores na legenda. Os nós destacados na caixa preta representam os íons presentes nas frações do extrato da BRA-346 e na dihidroeponemicina.

Sendo assim, selecionamos a fração BRA-346-ADC para prosseguirmos com os estudos, uma vez que tínhamos a maior atividade, além da maior quantidade, e a presença de íons referentes ao composto 1-N-deacil,1-N-butanoil-eponemicina, evidenciado como potencial inibidor do proteassoma nos estudos de cristalografia, e a dihidroeponemicina, inibidor já descrito na literatura.

Em seguida, avaliou-se a atividade citotóxica desta fração em linhagens celulares de câncer de cérebro humano: oligodendroglioma, HOG, e glioblastoma, T98G e U87MG, por meio do ensaio do MTT (Tabela 6). Como pode ser observado, a fração BRA-346-ADC apresente potente atividade citotóxica nas 3 linhagens com CI_{50} menor que 1 μg/mL.

Tabela 6 - Atividade citotóxica da fração BRA-346-ADC em linhagens celulares HOG, T98G e U87MG, por meio do ensaio do MTT.
Tempo de incubação de 72h. CI_{50} (µg/ml) determinada por regressão não-linear.

	Linhagem celular (CI_{50})		
Substância	HOG	T98G	U87MG
BRA-346-ADC	0,43 µg/mL	0,46 µg/mL	0,9 µg/mL
Doxorrubicina	1,421 µg/mL	37,68 µg/mL	5,625 µg/mL

Para dar prosseguimento ao estudo dos efeitos da fração BRA-346ADC nas linhagens tumorais, comparou-se seus efeitos moleculares e potência em relação à inibidores do proteassoma já descritos na literatura: dihidroeponemicina, epoxomicina e salinosporamida A (Marizomibe), sendo este último gentilmente cedido pelo Prof. Dr. William Fenical da Universidade da Califórnia em San Diego.

Por meio do ensaio de atividade do proteassoma realizado no LaFarMar, verificou-se a inibição da atividade da enzima pelos inibidores purificados e pela fração enriquecida. Os inibidores purificados inibiram mais de 95% da atividade do complexo catalítico em uma concentração teste de 30 µM. A fração apresentou um valor de CI_{50} de 0,045 μg/mL (Figuras 19 e 20).

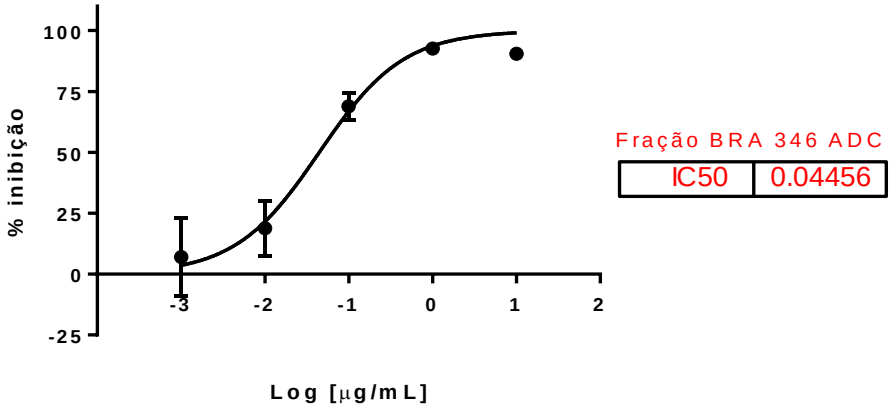


Figura 19 - Gráfico de avaliação da inibição da atividade do proteassoma.
Teste de inibição enzimática do proteassoma purificado (20S Proteasome Activity Assay Kit) pela fração enriquecida do extrato da BRA 346ADC. Valor da CI_{50} = 0,045 µg/mL.

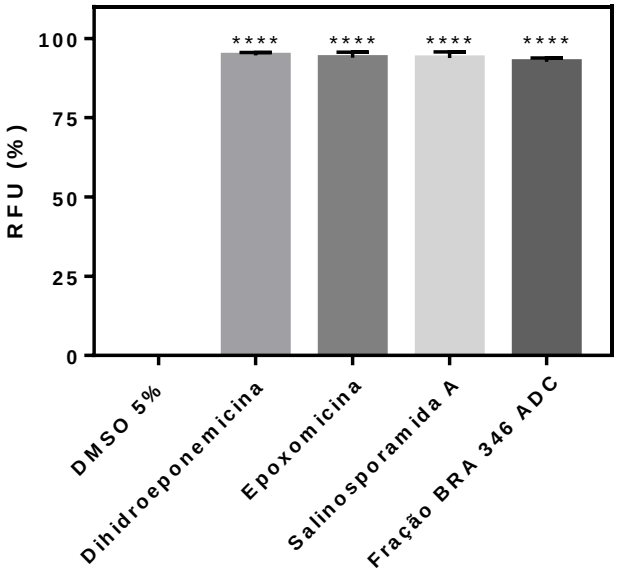


Figura 20. Gráfico comparativo da inibiçao da atividade do proteassoma pelos inibidores comerciais - dihidroeponemicina, epoxomicina, salinosporamida A (concentração única de 30 µM) – e pela fração enriquecida BRA 346 ADC (1 µg/mL).
Os valores foram estatisticamente analisados no programa por análise de múltipla comparação ANOVA, teste de Tukey.
**** significância entre os inibidores e o controle (DMSO 5%), valor de $p < 0.0001$, $R^2 = 0.9992$.
% de inibição medida em RFU (unidades relativa de fluorescência).

Avaliou-se o potencial de inibição do crescimento celular da fração enriquecida ADC do extrato BRA 346 em comparação com inibidores do proteassoma purificados em linhagens celulares de glioma e glioblastoma (HOG e T98G), através do ensaio do SRB em diferentes tempos de incubação (24, 48 e 72h). Os estudos com a linhagem U87MG não foram continuados devido a problemas no crescimento dessa linhagem.

Na tabela 7 estão descritos os valores da concentração inibitória média (CI_{50}), concentração inibitória total (CIT) e concentração letal média (CL_{50}) de cada composto testado. Há que se ressaltar que, ao contrário do MTT que baseia-se numa medida indireta da densidade celular a partir do metabolismo do MTT, o ensaio do SRB baseia-se numa medida da concentração de proteína das amostras, e portanto, é uma media direta, que não pressupõe metabolização.

Tabela 7. Avaliação da inibição do crescimento celular das linhagens HOG e T98G tratadas com os inibidores do proteassoma purificados e a fração BRA-346ADC.
Na tabela são apresentados os valores de concentração inibitória média (CI_{50}), concentração inibitória total (CIT) e concentração letal média (CL_{50}) a partir de 2 experimentos independentes. Análise feita pelo teste do SRB em três tempos de incubação, 24, 48 e 72h. Para algumas amostras não foi possível calcular os valores de concentração inibitória total (CIT) e da concentração letal média (CL_{50}). Os valores para os inibidores encontram-se em nM e os da fração em ng/mL.

24h		**HOG**			**T98G**	
Substâncias	CI_{50}	CIT	CL_{50}	CI_{50}	CIT	CL_{50}
Dihidroeponemicina	20.7	277.3	3707.5	19	395	-
Epoxomicina	15.9	191.6	2307.4	10	196	3847.8
Salinosporamida A	375.3	-	-	103.8	-	-
Fração BRA 346 ADC	151.5	2595.2	44456.8	208.3	6778.4	-
48h		**HOG**			**T98G**	
Substâncias	CI_{50}	CIT	CL_{50}	CI_{50}	CIT	CL_{50}
Dihidroeponemicina	2.7	23.3	201.5	2.2	28.2	356.6
Epoxomicina	2.1	14.3	98.5	3.6	34.9	341.6
Salinosporamida A	130.8	-	-	36.5	1176.9	-
Fração BRA 346 ADC	25.4	209.8	1733.6	37.3	433.3	5038
72h		**HOG**			**T98G**	
Substâncias	CI_{50}	CIT	CL_{50}	CI_{50}	CIT	CL_{50}
Dihidroeponemicina	1.7	17.4	174.2	1.7	14.8	126.6
Epoxomicina	1.6	15.8	157.2	2.1	20.2	193.3
Salinosporamida A	72.8	-	-	27.5	378.9	-
Fração BRA 346 ADC	32	231.2	1669.9	8.6	109.3	1397

Diante dos valores encontrados, foi possível identificar que as substâncias apresentavam seletividade diferente para as linhagens. A fração ADC apresentou menores valores de CI_{50} para a linhagem HOG nos tempos de 24 e 48h, e a

salinosporamida A mostrou menores valores para a linhagem T98G nos três tempos de incubação. Já a dihidroeponemicina e epoxomicina apresentaram valores muito próximos para ambas as linhagens nos três períodos.

Para acompanhar alterações moleculares, foi selecionada a concentração inibitória média do tratamento de 48h com o objetivo de identificar eventos anteriores a morte celular. As duas linhagens foram tratadas com a fração BRA-346-ADC e os inibidores com a finalidade de verificar o nível de expressão de genes e proteínas relacionados com a via de estresse do retículo endoplasmático e o sistema ubiquitina proteassoma, respectivamente.

Avaliando a expressão de genes pós-tratamento (Figura 21) foi possível perceber que a dihidroeponemicina e a epoxomicina não promoveram maiores alterações na expressão de genes das linhagens testadas. Contudo, significativas alterações foram verificadas quando as células foram tratadas com a fração BRA-346ADC e com a salinosporamida A. Analisando os primeiros genes selecionados por meio da diferença de cores no *heatmap*, a fração aumentou a expressão da maioria dos genes avaliados, principalmente, na linhagem HOG. Já para ambas as linhagens, a salinosporamida A promoveu uma diminuição da expressão de grande parte dos genes.

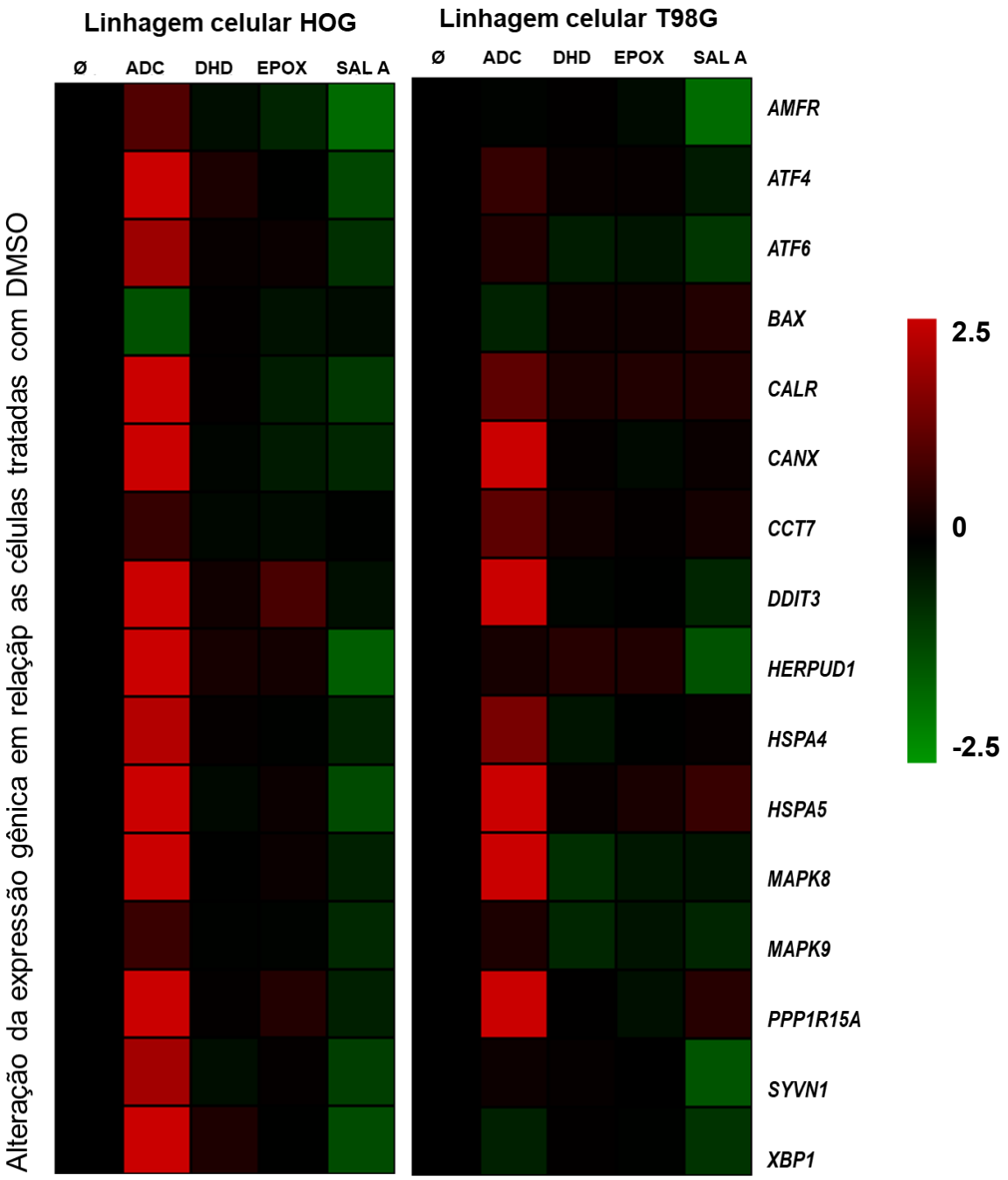


Figura 21 - Heatmap da avaliação de expressão gênica na linhagens de glioma e glioblastoma tratadas com inibidores do proteassoma purificados e a fração BRA-346ADC em relação ao controle DMSO.
Os genes que tiveram sua expressão aumentada estão em vermelho e os genes que tiveram sua expressão diminuída estão em cor verde.
Legenda: Ø: DMSO, ADC: fração BRA 346 ADC; DHD: dihidroeponemicina; EPOX: epoxomicina; SAL A: salinosporamida A

A partir dos resultados de expressão de genes obtidos no primeiro ensaio, foram selecionados 6 genes para avaliação após novos tratamentos nas linhagens.

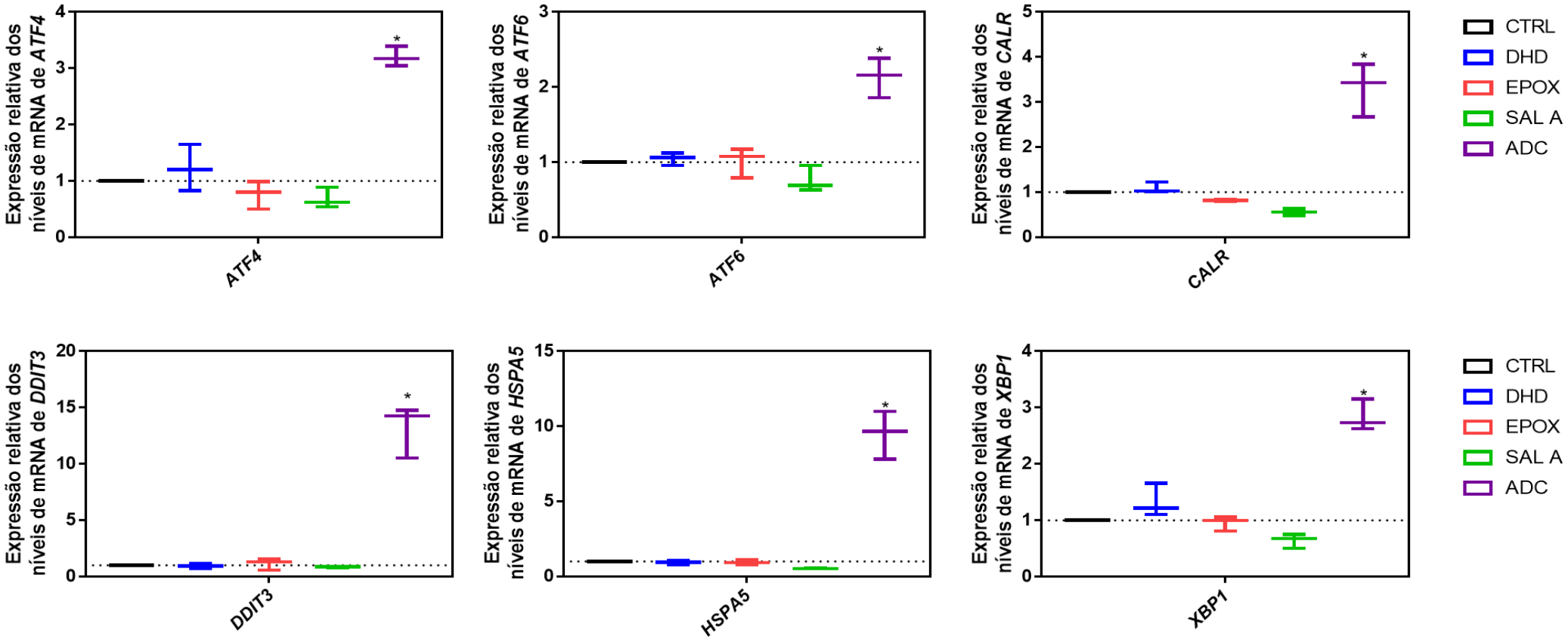


Figura 22 - Gráficos comparativos da expressão relativa dos níveis de mRNA dos genes *ATF4, ATF6, CALR, DDIT3, HSPA5* e *XBP1* em HOG tratada com os inibidores do proteassoma e a fração BRA-346ADC.

Análise de expressão realizada em relação ao controle DMSO 0,6% por um período de 36h. Inibidores e concentrações: dihidroeponemicina (DHD) 2,7 nM, epoxomicina (EPOX) 2,1 nM, salinosporamida A (SAL A) 130,8 nM e fração BRA-346ADC (ADC) 25,4 ng/mL. Os valores foram estatisticamente analisados por meio da análise de múltipla comparação ANOVA, usando o teste de Tukey.

* significância entre a fração ADC e o controle (DMSO 0,6%), valor de $p < 0.0001$.

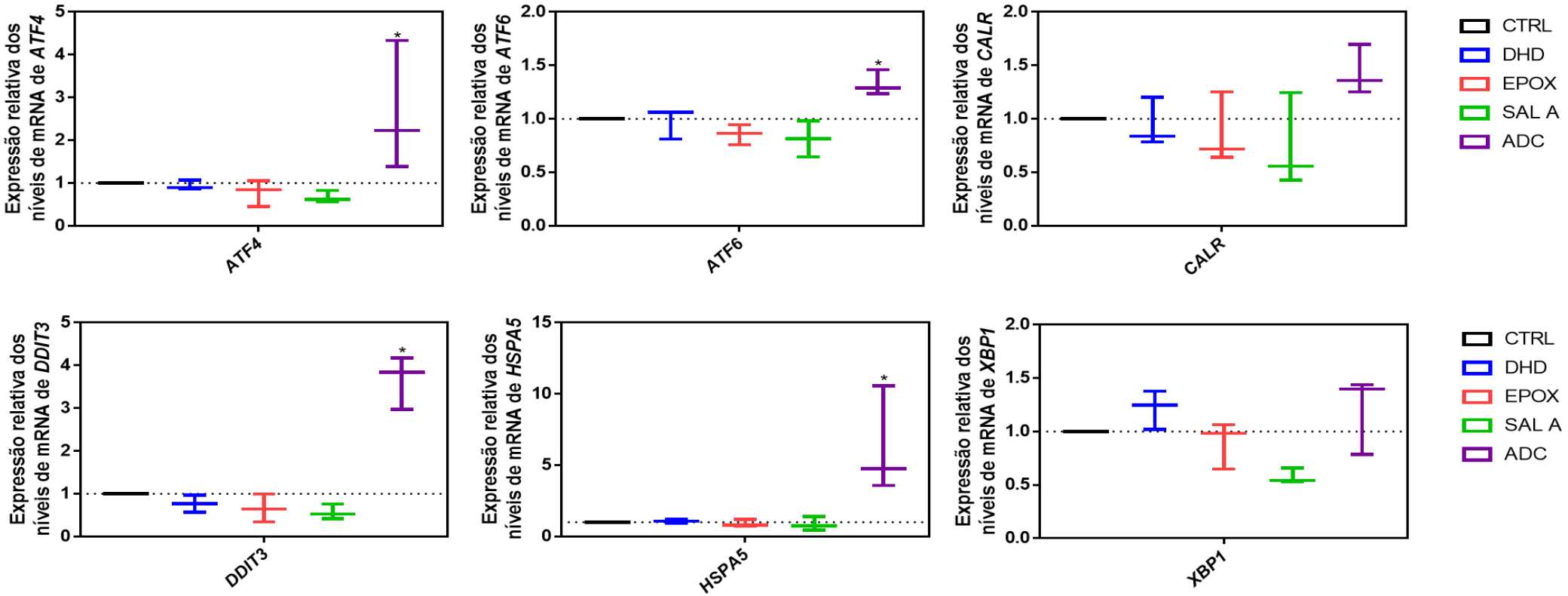


Figura 23 - Gráficos comparativos da expressão relativa dos níveis de mRNA dos genes *ATF4, ATF6, CALR, DDIT3, HSPA5* e *XBP1* em T98G tratada com os inibidores do proteassoma e a fração BRA-346ADC.

Análise de expressão realizada em relação ao controle DMSO 0,06% por um período de 36h. Inibidores e concentrações: dihidroeponemicina (DHD) 2,7 nM, epoxomicina (EPOX) 2,1 nM, salinosporamida A (SAL A) 130,8 nM e fração BRA-346ADC (ADC) 25,4 ng/mL. Os valores foram estatisticamente analisados por meio da análise de múltipla comparação ANOVA, teste de Tukey.

* significância entre a fração ADC e o controle (DMSO 0,6%), valor de $p < 0.1$

Os gráficos de expressão gênica dos novos ensaios mostraram que todos os 6 genes analisados foram significativamente superexpressos na linhagem HOG quando esta recebeu o tratamento com a fração ADC em comparação ao tratamento com DMSO (Figura 22). Vale salientar um maior aumento de expressão para o gene *HSPA5* (aproximadante 9 vezes), em relação ao controle. Esse gene codifica uma proteína da família das proteínas de choque térmico (Hsp70).

Em parte diferente do que se verificou na linhagem HOG, a expressão gênica no tratamentos com a fração ADC realizados na linhagem T98G apresentou superexpressão para 4 genes, contudo, para o gene de calreticulina e da proteína de ligação X-box 1 não houve diferença significativa (Figura 23).

Para avaliar a expressão de proteínas, foram feitos tratamentos com os inibidores do proteassoma e a fração ADC nas duas linhagens em uma relação tempo-dependente. As células ficaram em contato com os compostos por 24, 36 e 48h e realizou-se a marcação de proteínas relacionadas ao UPS (ubiquitina), a UPR - *Unfolded Protein Response* – (Hsp70) e o complexo NF-κB.

A quantificação da expressão das proteínas ubiquitinadas entre os tratamentos na linhagem HOG mostrou que a fração ADC aumenta a ubiquitinação no tempo aplicado de 36h. Para a salinosporamida A, é significativamente percebida uma diminuição da ubiquitinação de proteínas para um tempo de tratamento de 48h, não sendo significativo para 36h e 24h em comparação ao controle de 0h. Contudo, essa mesma diminuição é inferida para o controle de 48h, o que sugere que a diferença de expressão não seja pelo tratamento, mas tenha alguma relação com o tempo de replicação da célula. Já para a dihidroeponemicina e epoxomicina, não se constata diferença de expressão em relação ao controle de 0h em nenhum dos tempos de tratamento aplicados.

Para a linhagem T98G, não se identificou nenhuma diferença significativa entre os tempos de tratamento e seus controles para nenhum dos compostos aplicados. Contudo, é importante salientar que os desvios podem sugerir a necessidade de novos testes com essa linhagem (Figura 24).

Já para a marcação da Hsp70 (Figura 25), os resultados obtidos após a quantificação mostraram que não houve variação significativa na expressão dessa chaperona em nenhuma das linhagens tratadas com os compostos em relação aos seus controles, apesar do aumento expressivo de mRNA do seu gene de codificação *HSPA5* para o tratamento com a fração.

A marcação com NF-κB com os pesos 105 e 50kDa objetivou verificar se a proteína de maior peso estava sendo clivada em tamanhos menores. Era esperado que a inibição do proteassoma pelos inibidores e fração promovesse um aumento em quantidade do NF-κB 105kDa.

Pelos resultados obtidos não foi possível identificar alterações significativas nas quantidades de NF-κB 105kDa (Figura 26) nos tratamentos aplicados na linhagem HOG. Já para NF-κB 50kDa, foi percebida apenas uma diminuição da expressão no tratamento com a salinosporamida A (Figura 26).

Para os tratamentos realizados na linhagem T98G, nenhuma modificação foi significativa (Figura 27).

PROTEÍNAS UBIQUITINADAS

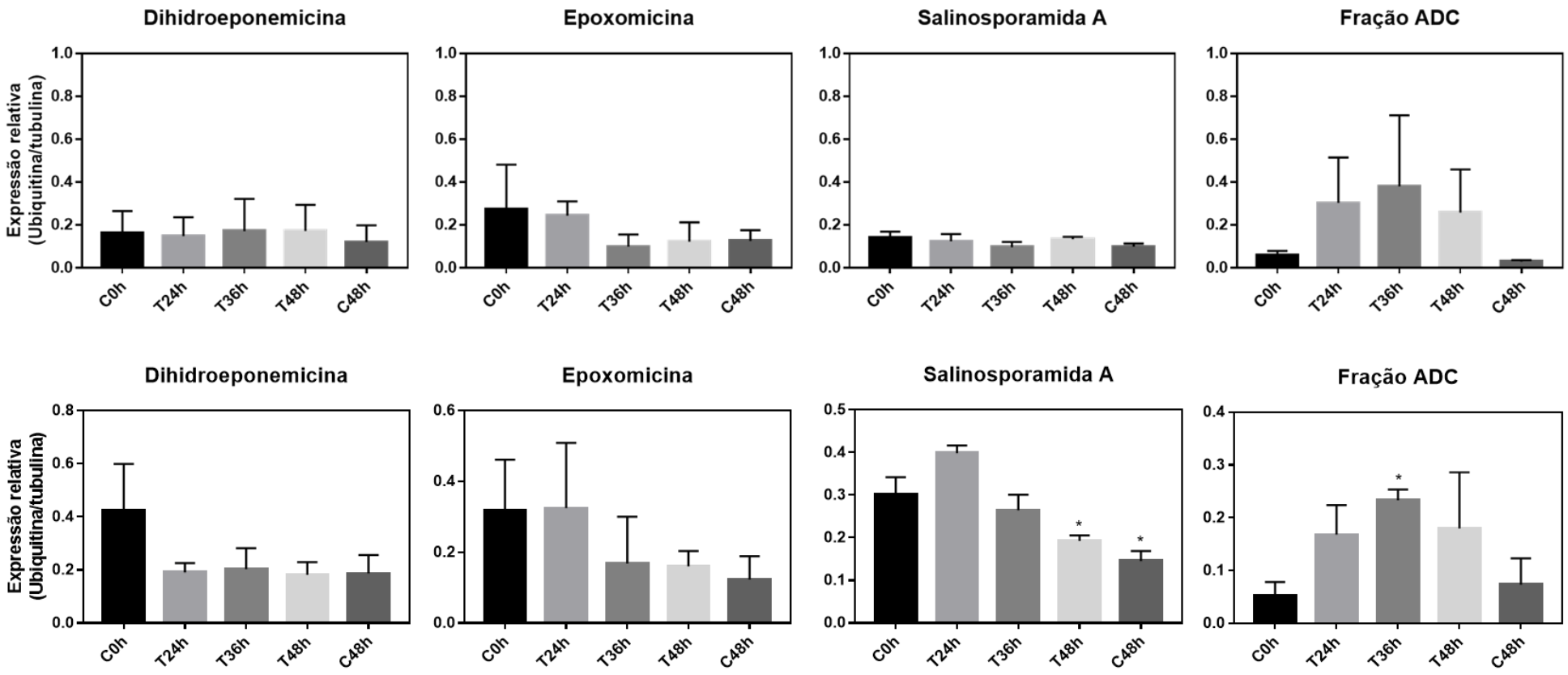


Figura 24 - Gráficos de expressão relativa de proteínas ubiquitinadas em relação nos tratamentos com inibidores purificados do proteassoma e a fração ADC.

Os gráficos superiores mostram o tratamento realizado com cada composto em tempos de 24, 36 e 48h para a linhagem HOG e os gráficos inferiores mostram os tratamentos realizados na linhagem T98G. Os valores de expressão relativa foram analisados por meio da quantificação de pixels das bandas visualisadas do western blotting pelo programa UN-SCAN-IT gel 6.1. Para análise dos valores quantificados aplicou-se o teste de Dunnet.

* significância em relação ao controle 0h (DMSO 0,6%), valor de $p < 0.03$

.

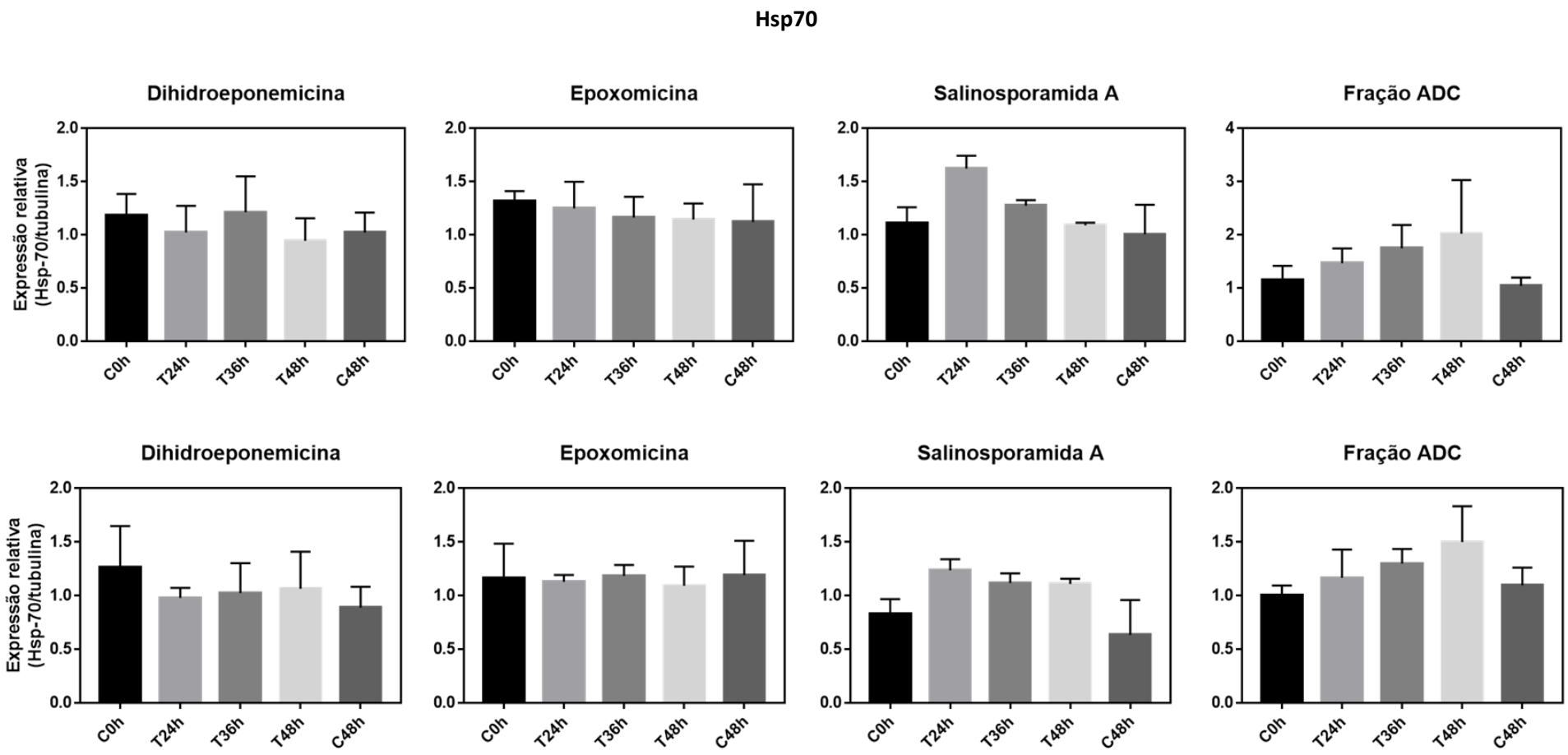


Figura 25 - Gráficos de expressão relativa de proteína Hsp70 em relação a tubulina para o tratamento com inibidores purificados do proteassoma e a fração ADC.
Os gráficos superiores mostram o tratamento realizado com cada composto em tempos de 24, 36 e 48h para a linhagem HOG e os gráficos inferiores mostram os tratamentos realizados na linhagem T98G. Os valores de expressão relativa foram analisados por meio da quantificação de pixels das bandas visualisadas do western blotting pelo programa UN-SCAN-IT gel 6.1. Para análise dos valores quantificados apilcou-se o teste de Dunnet.

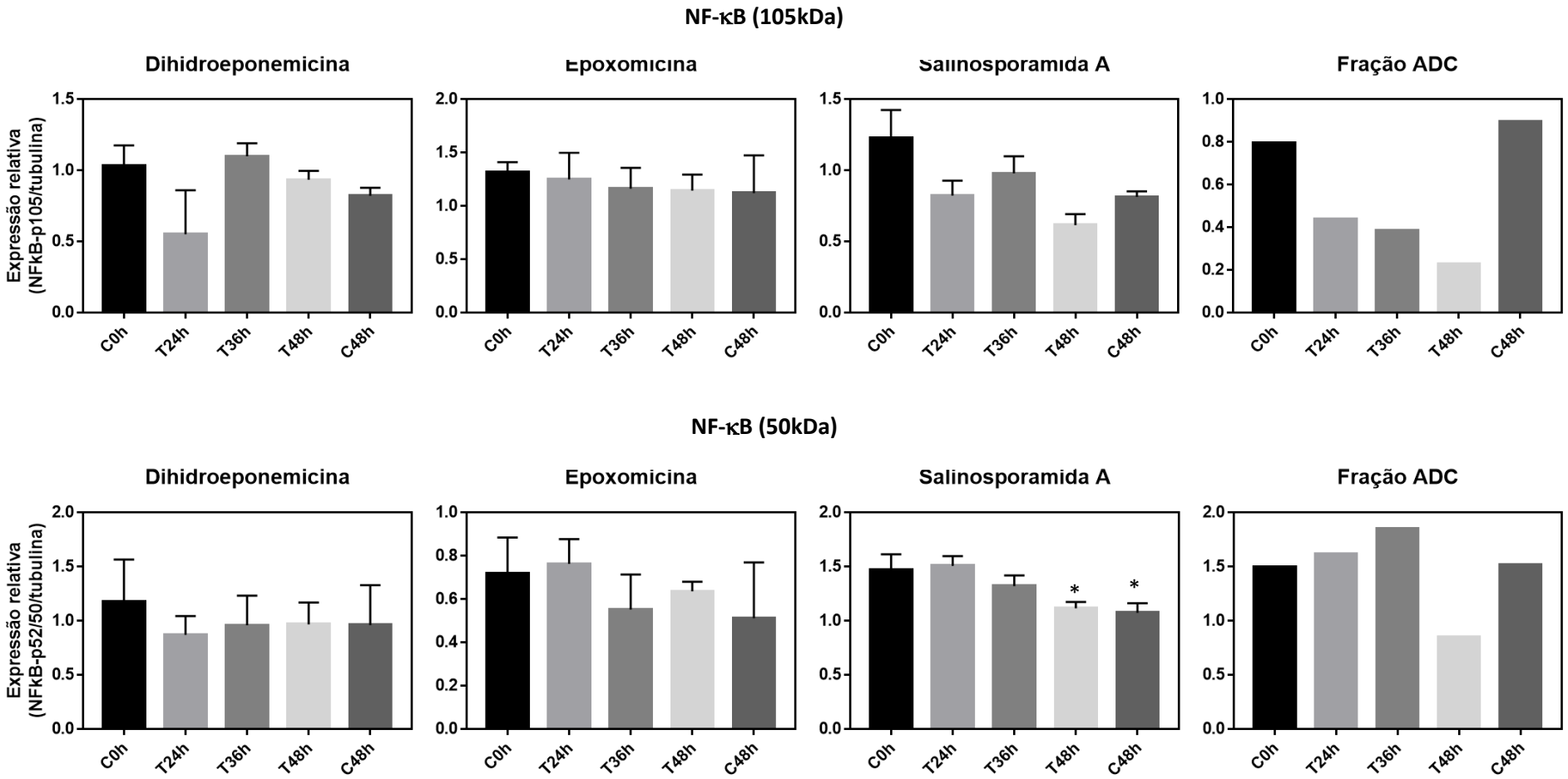


Figura 26 - Figura 26. Gráficos de expressão relativa das proteínas NF-κB (105kDa) e NF-κB (50kDa) em relação a tubulina paras os tratamentos com os inibidores purificados do proteassoma e a fração ADC.

Os gráficos mostram o tratamento realizado com cada composto em tempos de 24, 36 e 48h para a linhagem HOG. Foi aplicada análise de variância por meio do teste de Dunnet.

* significância em relação ao controle 0h (DMSO 0,6%), valor de $p < 0.04$, $R^2 = 0.86$

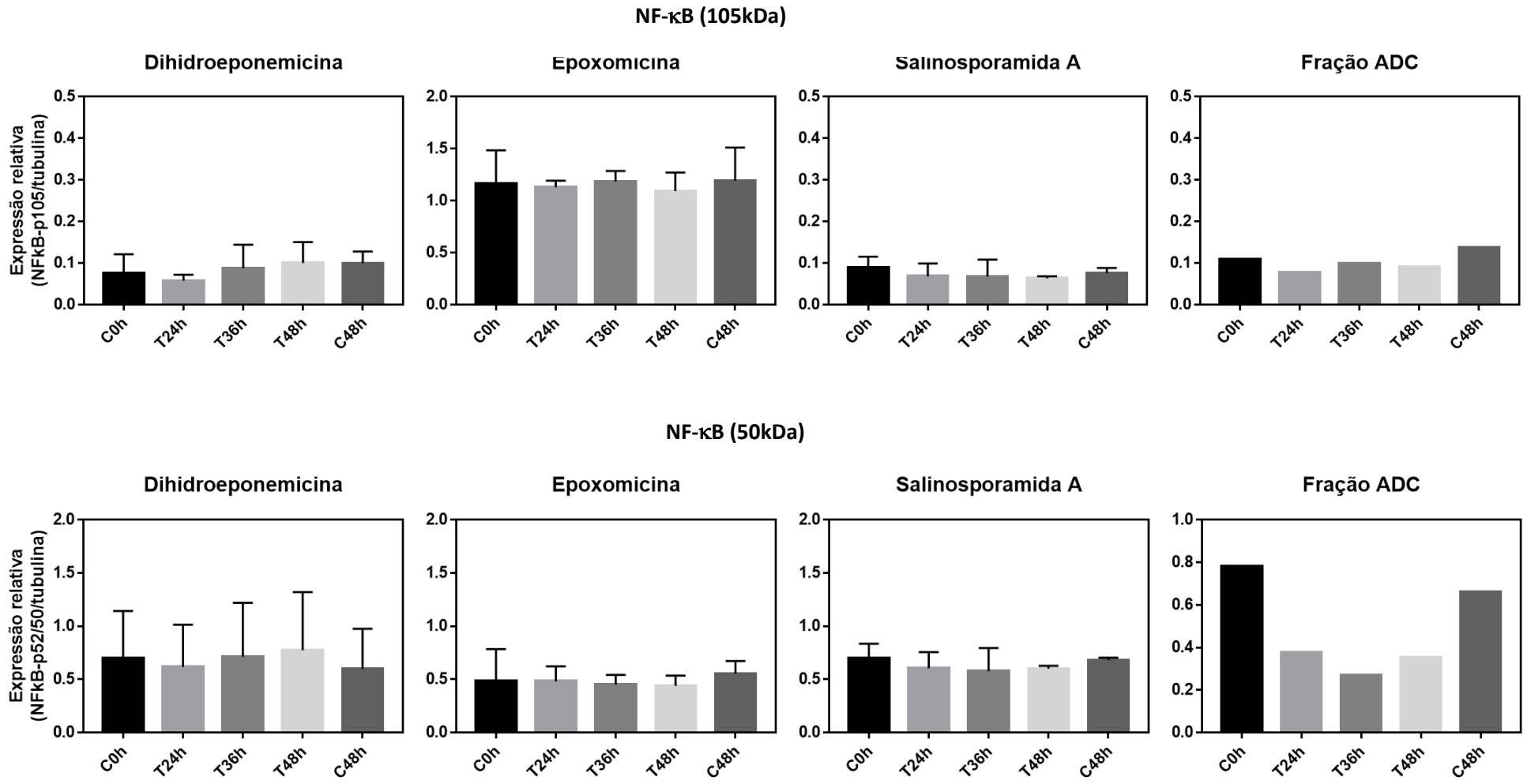


Figura 27 - Gráficos de expressão relativa das proteínas NF-κB (105kDa) e NF-κB (50kDa) em relação a tubulina paras os tratamentos com os inibidores purificados do proteassoma e a fração ADC.
Os gráficos mostram o tratamento realizado com cada composto em tempos de 24, 36 e 48h para a linhagem T98G. Aplicou-se análise de variância por meio do teste de Dunnet. DMSO (0,6%).

Uma outra marcação foi realizada para comparar a expressão de proteínas na resposta ao tratamento de 36h com os compostos. A verificação no nível de expressão foi feita entre os tratados e as proteínas marcadas foram as ubiquitinadas, Hsp70, NF-kB e alfa-tubulina (Figura 28).

Qualitativamente, é possível sugerir que o tratamento com a fração ADC promoveu maior expressão de proteínas ubiquitinadas, tanto para linhagem HOG como para T98G. É perceptível também maior marcação da proteína Hsp70 no tratamento com a fração em ambas as linhagens, salientando que na T98G foi mais expressivo quando comparado com os outros inibidores.

Para NF-κB 105kDa, sua marcação foi mais intensa na HOG do que na T98G, contudo, mais expressiva para os inibidores purifcados. Já o NF-κB 50kDa demonstra-se mais marcado no tratamento com a salinosporamida A.

Na linhagem T98G, percebe-se uma menor expressão do NF-κB clivado para o tratamento com a fração e com a salinosporamida A se comparado com a dihidroeponemicina e epoxomicina. Contudo, não se pode afirmar uma diminuição da clivagem do NF-κB 105kDa, pois este não aparece fortemente marcado nos tratamentos com a fração e salinosporamida A.

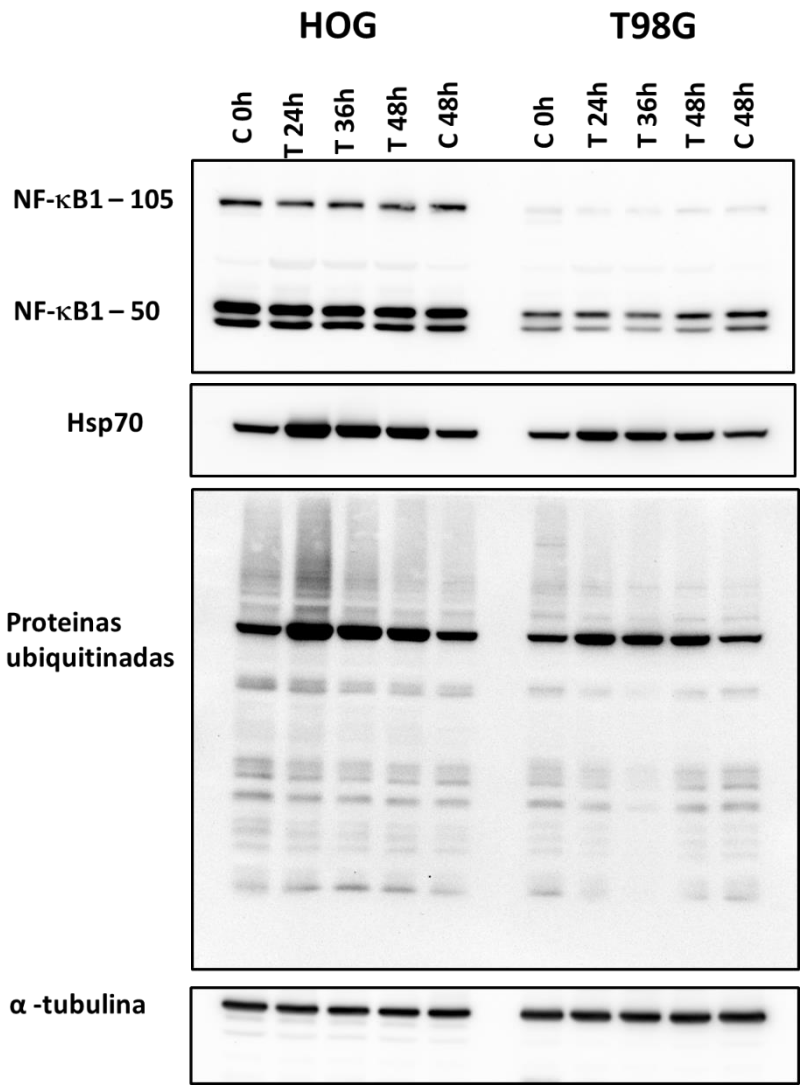


Figura 28 - *Immunoblotting* de proteinas ubiquitinadas, Hsp-70, NF-□B (105 e 50kDa) e □-tubulina.
O tempo de incubação dos tratamentos foi de 36h com os inibidores, a fração BRA-346ADC e DMSO 0,6%, como controle.
Legenda: C- controle (DMSO); DHD: dihidroeponemicina; EPOX: epoxomicina; SAL A: salinosporamida A; ADC: fração BRA-346ADC (n=1).

5 DISCUSSÃO

Os micro-organismos marinhos despontam como uma fonte interessante de substâncias bioativas, pois, além de fazer parte de um grupo ainda pouco explorado no contexto farmacológico, podem apresentar soluções importantes para a indústria farmacêutica. Sua diversidade de substâncias bioativas que variam de peptídeos, como lantibióticos, nanoantibióticos e peptidomiméticos, e enzimas a metabólitos secundários mais complexos que podem se ligar a novos alvos moleculares, como também propor novos mecanismos de ação (REEN et al., 2015). Adicionado a isso, técnicas específicas de isolamento e cultivo e de abordagens como mineração molecular, mostram-se como uma alternativa promissora para atender às demandas desafiadoras da indústria de fármacos (ROMANO et al., 2017).

Dos 1184 novas substâncias aprovadas entre os anos de 1981 a 2006 para o tratamento de doenças humanas, 70% eram produtos naturais. Esse avanço também advém de melhores técnicas de exploração do ambiente marinho o que vem permitindo a descoberta de centenas de novas substâncias a cada ano (BLUNT et al., 2015; JASPARS et al., 2016).

O presente trabalho aborda a prospecção de moléculas de origem marinha para a terapia anticâncer, utilizando como alvo o proteassoma. Dos cinco extratos avaliados como possível inibidores do proteassoma, apenas o extrato da bactéria *Streptomyces* sp. BRA-346 apresentou-se ativo, mostrando certa peculiaridade nos metabólitos secundários produzidos por essa cepa bacteriana, o que foi corroborado pelo estudo do seu perfil metabolólico. A partir do fracionamento do extrato da BRA-346, foram obtidas duas frações ativas que foram então avaliadas através de cristalografia e caracterização química a partir da análise de seus constituintes por espectrometria de massas, comparação com dados disponíveis na base GNPS e construção de redes moleculares. Esse desenho experimental parte da premissa da ligação de uma substância a um alvo pré-estabelecido, o que permite maior rapidez na identificação de moléculas com interesse biológico, além de menor custo e maiores chances de sucesso da elucidação da estrutura molecular. Essa especificidade de ligação permite compreender importantes características químicas da molécula, principalmente, no que se refere ao desenho da sua estrutura espacial (Aguda *et al*., 2016). O trabalho também avaliou a atividade biológica de uma fração do extrato em linhagens tumorais de glioma e glioblastoma por meio da análise de expressão de

proteínas e genes relacionados com o sistema ubiquitina proteassoma (UPS, do inglês *Ubiquitin Proteasome System*) e a resposta ao estresse do retículo (UPR, do inglês *Unfolded Protein Response*), através de *immunoblotting* e qPCR, para compreender melhor os mecanismos disparados pelo inibidor do proteassoma presente no extrato.

Através do ensaio cristalográfico com o proteassoma de *S. cerevisiae*, foi possível observar a formação de cristais do proteassoma com uma substância presente nas frações da BRA-346, mostrando interação da substância ativa com o resíduo amino-terminal da treonina presente na subunidade testada do complexo protéico. As subunidades β do proteassoma contêm resíduos catalíticos de treonina na região N-terminal que realizam um ataque nucleofílico aos substratos. Esse ataque ocorre na região C-terminal dos resíduos de aminoácidos presentes nos compostos ligantes (BOCHTLER et al., 1999). A inibição da atividade catalítica β5 se confirmou pela ausência de degradação do substrato suc-LLVY-AMC, exclusivo para essa subunidade.

Os resultados da caracterização química através da construção de redes moleculares levaram a sugestão da substância 1-N-deacil,1-N-butanoil-eponemicina (*m/z* 343,186), também sabida como TMC-86A, como sendo a potencial substância inibidora. De fato, tal substância foi previamente descrita como inibidora do proteassoma ao ligar-se ao sítio ChTL do complexo protéico multicatalítico (KOGUCHI et al., 2000).

A 1-N-deacil,1-N-butanoil-eponemicina foi isolada primeiramente por Koguchi e colaboradores em 1999 a partir de uma cepa bacteriana pertencente ao gênero *Streptomyces*. O isolamento desse composto permitiu a determinação de sua estrutura e propriedades físico-químicas, o que mostrou a presença de uma porção epóxi-β-aminocetona, encontrada, similarmente, na eponemicina (KOGUCHI et al., 2000). A fómula molecular proposta por Koguchi, $C_{16}H_{26}N_2O_6$, foi a mesma proposta no presente estudo, através do SmartFormula 3D (Bruker) que combina a massa exata, padrão isotópico, espectros MS/MS e um algoritmo, para identificação da estrutura (KIND; FIEHN, 2006; KOGUCHI et al., 2000).

Por sua vez, a eponemicina foi primeiramente descrita por Sugawara e colaboradores em 1989. Tal composto foi isolado do extrato da bactéria *Streptomyces hygroscopicus*, recuperada de uma amostra de solo das Filipinas (SUGAWARA et al., 1990). Após isolada, o grupo avaliou o potencial citotóxico da eponemicina e seus derivados, dihidroeponemicina e tetrahidroeponemicina, em células de melanoma

murino (B16-F10) e carcinoma de cólon humano (HCT-116). A eponemicina apresentou menor CI_{50} tanto em B16-F10 como em HCT-116; 1,7 e 9,7 ng/mL, respectivamente. Um detalhe importante é que o derivado dihidroeponemicina manteve a atividade citotóxica frente ao tetrahidroeponemicina, visto que esse último teve sua função epóxi subtraída, mostrando que a função biológica está relacionada com esse grupamento químico.

Os estudos iniciais com a eponemicina relataram seu forte poder anti-angiogênico e a capacidade de diminuir o desenvolvimento tumoral, além de inibir a proliferação e a migração de células endoteliais (OIKAWA et al., 1991). Na tentativa de compreender o mecanismo de ação que envolvia a eponemicina e sua atividade antitumoral, Meng *et al*. (1999) verificaram a ligação da dihidroeponemicina nas subunidades catalíticas β do imunoproteassoma, LMP2 e LMP7.

A eponemicina e a epoxomicina, assim como o Carfilzomibe, pertencem a mesma classe de produtos naturais inibidores do proteassoma. São peptídeos modificados que contêm um grupo α',β'-epoxicetona no carbono terminal ligado a um aminoácido de cadeia aberta (ZWICKL; BAUMEISTER, 2002). Trabalhos anteriores mostraram, inicialmente, que a epoxomicina inibe o proteassoma de maneira potente e seletiva ligando-se covalentemente ao sítio ChTL. As subunidades TL e CL também são inibidas, entretanto, de maneira bem mais lenta (MENG et al., 1999; SIN et al., 1999).

Em 2000, foi apresentada a estrutura cristalográfica de ligação da epoxomicina com a subunidade ChTL do proteassoma 20S de *S. cerevisiae*. Por meio dessa estrutura, foi possível identificar a formação de um anel morfolino entre a treonina amino-terminal da subunidade catalítica e o grupo farmacofórico da epoxomicina, o mesmo presente na eponemicina (GROLL et al., 2000).

É interessante ressaltar que a análise da composição química das frações ativas obtidas do fracionamento bioguiado pela atividade inibitória da função catalítica do proteassoma revelou também a presença de outras substâncias com similaridade estrutural a TMC-86A, incluive de análogos clorados, que ainda não são conhecidos na literatura. Os esforços para purificação dessas substâncias nos levaram a uma fração enriquecida contendo substâncias dessa classe como revelado pela presença de íons comuns a dihidroeponecina nas frações BRA346 ADA, ADB, ADC, ADD e ADE. A fração ADC foi então selecionada para continuação desse estudo, uma vez

que alia a presença das substâncias de interesse com potente citotoxicidade em linhagem de cólon HCT-116 e atividade inibitória do proteassoma.

A avaliação da inibição da proliferação celular das linhagens de glioma e glioblastoma pela fração BRA-346ADC do extrato mostrou alto potencial citotóxico dessa fração, com CI_{50} para as linhagens HOG e T98G, 25,4 e 37,3 ng/mL, respectivamente, de acordo com o ensaio do SRB após 48 horas de incubação. Esse valores de CI_{50} são bem próximos dos encontrados para o tratamento com salinosporamida A, 41 ng/mL para HOG, e 11,5 ng/mL para T98G, que é um inibidor purificado. Por outro lado, a epoximicina e a dihidroeponemicina apresentaram baixos valores de CI_{50} em todos os tempos testados, com valores muito próximos entre si.

O diálogo entre inibidores do proteassoma e o câncer de sistema nervoso foi recentemente iniciado na literatura. Os inibidores são fortemente reconhecidos por seu papel na terapia do mieloma múltiplo e leucemias, mas também vêm sendo amplamente investigados em tumores sólidos, inclusive em gliomas (DI et al., 2016; VEGGIANI et al., 2019; ZHANG et al., 2018).

Em um trabalho de 2000, Wagenknecht testou três inibidores do proteassoma: lactacistina, inibidor calpaína I e MG132 em células de glioma e concluiu que esses inibidores induzem morte celular por apoptose independente de p53/p21 (WAGENKNECHT et al., 2008). Um estudo de 2004 testou o Bortezomibe em um modelo de gliossarcoma intracraniano em rato, no qual correlacionou-se sobrevida e toxicidade dose-dependente e concluíram aumento da sobrevida em doses até 0,2 mg/kg (OLSON; BOWERS; ZHANG, 2004).

Outros relatos com o inibidor do proteassoma MG132 e linhagens de glioblastoma afirmaram forte inibição do crescimento das células tumorais por meio da parada em G2/M do ciclo celular, despolarização mitocondrial, diminuição de Bcl-xL, ativação de JNK e p38 e inibição das vias de sobrevivência NF-κB e PI3K/Akt (ZANOTTO-FILHO et al., 2012). Manton et al (2016) por meio de uma avaliação, *in vivo,* do Marizomibe mostrou que o inibidor atinge tumores cerebrais ortotópicos onde inibe a função do proteassoma e aumenta a morte em combinação com o Vorinostat, um inibidor de histona desacetilase.

Após a confirmação da atividade da fração BRA-346-ADC nas células de câncer de cérebro, prosseguiu-se com o estudo do mecanismo de ação desta fração nessas células, investigando a participação de proteínas relacionadas com a via UPS e genes envolvidos na UPR.

O sistema ubiqiuitina-proteassoma desempenha forte papel nos processos celulares, principalmente por promover a reciclagem de proteínas dentro da célula, otimizando a progressão do ciclo celular, replicação do DNA, proliferação e morte celular. Já se vem discutindo que uma expansão do UPS pode corroborar para a progressão do câncer (CHEN et al., 2017). Algumas alterações nesse sistema já foram identificadas em células tumorais, e estas poderiam amplificar a progressão e invasão do tumor. Tais alterações estariam relacionadas com a interação de oncogenes e supressores tumorais à componentes do sistema (DING et al., 2014).

Os tratamentos com a fração BRA-346ADC e com a salinosporamida A na linhagem HOG apresentaram um aumento de proteínas ubiquitinadas, contudo, em tempos diferentes. Para a fração ocorre maior marcação na incubação de 36h, e para salinosporamida A no tempo de 48h. Esse dado, além de ser um indicativo da inibição da atividade proteassomal, pode acarretar o estresse celular. O aumento de proteínas ubiquitinadas é possivel que esteja relacionado com a não degradação das mesmas através do UPS. O proteassoma com sua subunidade catalítica ocupada pelos inibidores não permite a entrada de novas proteínas ubiquitinadas em seu complexo proteolítico, promovendo um acúmulo no citoplasma. Em um trabalho de Gutierrez e colaboradores (2019) o tratamento de linhagens tumorais com derivados de piridazinona, compostos com diversas atividade biológicas (anti-inflamatória, antiviral, analgésica, anti-câncer, entre outras), promoveu a inibição da atividade do proteassoma e um forte processo de ubiquitinação, o que levou produção de ROS e, consequentemente, apoptose.

Meng et al. (1999) já tinham demonstrado um aumento de proteínas ubiquitinadas em células endoteliais da veia umbilical de humanos (HUVECs) quando tratadas com epoxomicina, um potente inibidor do proteassoma. Esse aumento pode elevar os níveis de sequestosome 1 (p62/SQSTM1), uma proteína que se liga a ubiquitina, podendo contribuir para autofagia, apoptose ou tumorigênese (MYEKU; FIGUEIREDO-PEREIRA, 2011).

A salinosporamida A (Marizomibe) não foge desse padrão, seu anel β-lactona-γ-lactâmico inibe os três sítios catalíticos do proteassoma de maneira irreversível e também promove acúmulo de proteínas ubiquitinadas. Seus estudos clínicos vêm avançando rapidamente e confirmando sua atividade contra tumores sólidos e neoplasias hematológicas (SALA et al., 2018), principalmente, naquelas com resistencia a outros inibidores, como o Bortezomibe e o Carfilzomibe. A combinação

do Marizomibe com um inibidor de histona desacetilase (Vorinostat) proporcionou um efeito antitumoral sinérgico nas linhagens de células tumorais de pacientes com melanoma, pâncreas e câncer de pulmão (MILLWARD et al., 2012).

É de grande valia mencionar que para tumores sólidos refratários ao Bortezomibe e ao Carfilzomibe, a salinosporamida A consegue superar a resistência promovida pela manutenção da atividade residual da subunidade β2 do proteassoma (LEVIN et al., 2016). Até o momento, os ensaios clínicos com o Marizomibe incluem testes para mieloma múltiplo (e refratário), melanomas, linfomas, glioblastoma, câncer de pâncreas, de pulmão de células não pequenas, linfomas e ependimomas (clinicaltrials.gov, 2019).

Para análise dos níveis de expressão proteica, esse trabalhou buscou avaliar, em paralelo, alterações na expressão de proteínas de choque térmico da família Hsp70.

As proteínas Hsp70 (70kDa) são chaperonas que fazem parte da família de proteínas de choque térmico. Essas chaperonas são de crucial importância para o bom funcionamento e manutenção da célula, pois auxiliam no dobramento e montagem de novas proteínas, além de promover a passagem, pela membrana, de proteínas que fazem parte de organelas ou serão secretadas. As Hsp70 interagem com segmentos peptídicos hidrofóbicos das proteínas que estão sendo enoveladas com a necessidade de ATP e sua alta expressão em células tumorais pode indicar resistência aos quimioterápicos (MAYER; BUKAU, 2005).

Um trabalho avaliou a inibição de Hsp70 e do proteassoma como uma alternativa para o tratamento do mieloma múltiplo. Usando linhagens celulares bioluminescentes de mieloma foi possivel verificar apoptose tardia e redução do crescimento tumoral de xenoenxerto subcutâneo em camundongos imunodeficientes após o tratamento combinado do Bortezomibe com o VER-155008 (EUGÊNIO et al., 2017). Isso mostra a dependência das linhagens tumorais em relação as proteinas de choque térmico.

Bush, Goldberg e Nigam (1997) já tinham demonstrado que o tratamento de células renais caninas com MG132, MG115, N-acetil-leucil-leucil-norleucinal e lactacistina (inibidores do proteassoma) aumentara acentuadamente os níveis de mRNAs de proteinas citosólicas de choque térmico (Hsp70, polubiquitina) e chaperonas do retículo endoplasmático (GRP78, GRP94, ERp72).

Diferentemente do que vem sendo mostrado na literatura, os resultados encontrados nesse trabalho mostraram que não houve diferença significativa para expressão de proteínas da família Hsp70 em nenhum dos tratamentos aplicados, seja para HOG ou T98G. Uma possibilidade seria que estas proteínas não estariam sendo formadas, devido a uma diminuição de aminoácidos e dipeptídeos que não estariam sendo reciclados por causa da inibição do proteassoma.

Outro ponto explorado nesse trabalho foi a expressão do NF-κB. Os fatores de transcrição nuclear κB pertencem uma família de 5 subtipos de fatores transcricionais que se ligam em regiões específicas do DNA, promovendo a transcrição de genes específicos. São eles: NF-κB1, NF-κB2, RelA, RelB e c-Rel. Sua ativação pode advir do TNF-α, EGF, espécies reativas de oxigênio e citocinas. Regulado pelo IKK, o NF-κB só consegue transpor do citoplasma para o núcleo após ser desacoplado do seu inibidor IκB. O complexo IKK, quinase do inibidor κB (IκB), funciona fosforilando o IκB para que este seja direcionado para degradação via proteassoma e libere o NF-κB para o núcleo (LIU et al., 2012).

Estudos anteriores relataram a inibição da via do NF-κB usando inibidores do proteassoma em linhagens de câncer cervical, de cólon e mieloma. Esses três estudos demonstraram que o tratamento com inibidores do proteassoma ocasionava uma estabilização do inibidor IκB, permitindo uma estabilidade do acoplamento ligado ao NF-κB, dessa forma, impedindo a ativação da sua via (ADAMS, 2001; CUSACK et al., 2001; TRAENCKNER; WILK; BAEUERLE, 1994).

Uma análise do efeito dos inibidores do proteassoma MG-115, MG-132 e lactacistina no NF-κB em células de câncer epitelial intestinal (HT-29) reportou um aumento da ativição do NF-κB e sua atividade transcricional. Os autores verificaram uma amplificação da degradação do IκB, através de sua quinase (IKK), levando desta forma a liberação do NF-κB (NEMETH, 2004). É importante comentar que esse estudo traz um contra-ponto visto que se esperava a desativação do sistema NF-κB. Não obstante, os autores sugerem haver uma regulaçao atípica do NF-κB em células tratadas com inibidores do proteassoma.

Os resultados desse trabalho não conseguiram mostrar alterações significativas na expressão dos dois tamanhos de NF-κB marcados, cujo objetivo era verificar a ocorrência de degradação desse fator. Contudo, em uma avaliação qualitativa do *immunoblotting* que compara os inibidores, percebe-se que a marcação

dos dois tamanhos do NF-κB é reduzida no tratamento com a fração em relação a todos os outros inibidores e ao controle. No tratamento com epoxomicina realizado na linhagem T98G, os resultados qualitativos sugerem uma maior marcação de NF-κB 105kDa e menor de 50kDa. Essas duas análises podem indicar um processo de inibição proteassomal ou outra regulação desse fator como mencionado por Németh (2004), visto que os outros indício (genes e proteínas marcadas) não foram alterados.

A ativação de vias relacionadas ao estresse do retículo origina cascatas de sinalização que respondem a esse estresse. As vias da UPR podem ser percebidas pela proteína quinase de RNA semelhante a quinase do retículo (PERK), pela *Inositol-requiring enzyme 1* (IRE1) e por meio da ativação do fator de transcrição 6 (ATF6), todos localizados nas membranas do retículo. Estudos reforçam que o estresse do retículo (ER) pode estar relacionado com a citotoxicidade verificada em muitas substâncias naturais (LIMONTA et al., 2019).

O sistema UPR pode também trazer uma resposta de sobrevivência para as células que se encontram em privação de nutrientes, condições particularmente observadas no processo de tumorigênese. Situações de hipóxia, baixa glicose, baixo pH e estresse oxidativo ativam as cascatas relacionadas à UPR, que busca manter o bom funcionamento da célula. Apesar desse esforço, a ativação constante da resposta ao estresse do retículo pode levar a ativação de vias de morte celular em prol do benefício do organismo como um todo. Portanto, essa sobrecarga da UPR pode ser vista como um alvo terapeutico contra o câncer.

Fatores intrínsecos ou extrínsecos às celulas podem ativar a resposta ao estresse do retículo. Quando identificado, esse estresse promove o desacoplamento da GRP78 das proteínas PERK, IRE1 e ATF6, que ficarão livres para ativar os fatores de transcrição ATF4, XBP1 e ATF6, respectivamente, e buscarão a homeostase celular. Um resumo de ativação da via UPR encontra-se representado na figura 29.

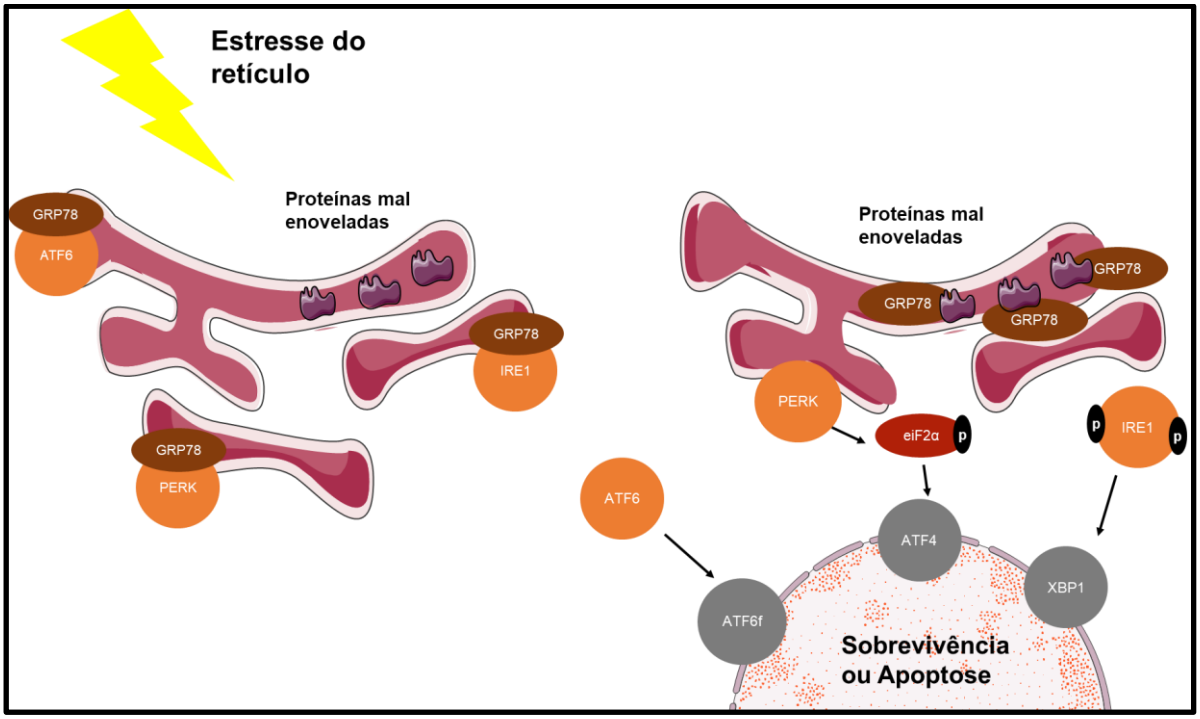


Figura 29 - Esquema da ativação da via UPR após estresse do retículo endoplasmático (RE). A proteína GRP78 fica acoplada às proteínas ATF6, IRE1 e PERK, situadas na membrana do retículo. O surgimento de proteínas mal enoveladas faz com que o GRP78 de desconecte dos componentes do RE para ligação a essas proteínas. Após isso, fatores transcricionais são ativados: a PERK promove fosforilação de eiF2α que ativa ATF4 (sobrevivência), a IRE1 é fosforilada e ativa XBP1 (sobrevivência) e ATF6 ativa ATF6f (apoptose).

De acordo com os resultados obtidos da expressão gênica, foi possível observar que a fração BRA-346ADC promoveu a superexpressão dos genes *ATF4, ATF6, DDIT3, HSPA5* para ambas as linhagens testadas, e *CALR* e *XBP1* somente para a HOG. Poucas alterações, no entanto, foram observadas nas células tratadas com epoximicina, dihidroeponemicina e salinosporamida A.

O ATF4 é um fator de transcrição que tem sua expressão ativada após a fosforilação de eIF2α pela PERK (HETZ, 2012). Esse fator transcricional pode regular genes que controlam a autofagia (ATG7, ATG5, LC3B), apoptose e processos antioxidantes. A cascata apoptótica tem ligação com aumento de CHOP, que regula IP3R e altera a homeostase do cálcio, e, assim, a degradação da XIAP promove a inibição de Bcl-2 (CHAO et al., 2012; HE; KAINA, 2019; HIRAMATSU et al., 2014).

A associação do ATF6 com a UPR relaciona-se quando este como fator de transcrição promove a transcrição dos genes da ERAD e de XBP1 (HETZ, 2012). É também importante ressaltar que ativação de ATF6 pode contribuir para a resistência a quimio e radioterapia em glioblastoma. Dadey e colaboradores (2016) demonstraram que a radiação induzida promove estresse no retículo endoplasmático

e ativação de vias relacionadas. Foi também percebida a influência do ATF6 quando se conseguiu melhorar a morte por radiação em linhagens knockdown para o ATF6, um regulador da resposta ao estresse. A resistência estaria relacionada com a regulação positiva da proteína regulada pela glicose 78 (GRP78).

O *DDIT3* é o gene que codifica a proteína homóloga C/EBP (CHOP), que é pró-apoptótica. O aumento da sua expressão pode colaborar para o tratamento do glioblastoma. Um estudo com um composto natural (isochaihu lactona) extraído da erva chinesa Nan-Chai-Hu induziu a expressão de *DDIT3* e promoveu parada na fase G2/M do ciclo celular, além de apoptose, em células de glioblastoma multiforme. Ensaios *in vivo* foram realizados e mostraram, juntamente com a superexpressão de DDIT3 e Caspase 3, uma supressão do crescimento tumoral. Os autores puderam depreender que a homeostase promovida pela UPR havia sido interrompida (TSAI et al., 2017).

Wang e colaboradores (2018) mostraram que o produto natural flavokavain B diminuiu o crescimento de linhagens tumorais de glioma, T98G, U87MG e U251, por meio da indução do estresse do retículo e a autofagia, percebendo uma maior expressão das proteínas ATF4, transcrição por dano em DNA 3 (DDIT3) e Hsp70.

Na tentativa de identificar o aumento da expressão de uma das proteínas de choque térmico, avaliamos a expressão do mRNA do gene *HSPA5*. Este apareceu superexpresso nas duas linhagens, mas apenas para o tratamento realizado com a fração. O *HSPA5* codifica a produção da proteína GRP78, que fica localizada no lúmen do retículo endoplasmático. Seu envolvimento ocorre no dobramento e montagem de proteínas, na ligação do Ca^{2+} ao RE, atua evitando a apoptose, além de diminuir a inflamação. Seu papel anti-apoptótico traz um entrave para o tratamento do câncer, pois aumenta a proliferação celular, sobrevivência e angiogênese de células cancerígenas. Portanto, pode ser considerado um alvo terapêutico (BOOTH et al., 2012).

A superexpressão de *HSPA5* devido a presença de inibidores do proteassoma já tinha sido reportada em 2015 quando pesquisadores tentavam investigar o papel da proteina de membrana associada ao lisossomo 3 (LAMP3) no proteassoma e na autofagia e identificaram que o uso do MG132 promovia não só a produção de LAMP3 como a superexpressão de genes da UPR (*ATF3, ATF4, DDIT3 e HSPA5*) (DOMINGUEZ-BAUTISTA et al., 2015).

A modulação da resposta ao estresse do retículo com drogas que atuam especificamente na GRP78, como é o caso da epigalocatequina galato, promoveu a sensibilização de células de glioma que não respondiam mais a temozolomida(AVRIL; VAULÉON; CHEVET, 2017). Esse dado traz a possibilidade da GRP78 ser um alvo interessante para abordagem terapêutica de gliomas. Contudo, é preciso verificar o nível de toxicidade em tecidos com alta dependência dessa proteína.

CALR é o gene da calreticulina, essa proteína é uma chaperona localizada dentro do RE que ajuda na manutenção dos íons Ca^{2+}. Quando é translocada do retículo para o citoplasma sofre um processo de argilinação pela enzima arginil-transferase. A sua expressão aumentada em glioblastoma multiforme pode apresentar benefícios para a sobrevida do paciente, principalmente daqueles refratários (MUTH et al., 2016).

Comba e colaboradores (2019) mostraram que linhagens celulares de glioma (HOG e MO59K) tratadas com o Bortezomibe aumentam os níveis de calreticulina arginilada e uma maior mobilização de Ca^{2+} promovendo uma ativação sustentada da apoptose. A calreticulina também estaria associada a radiosensibilidade em linhagens U251 que foram transfectadas para superexpressão da proteína. Essa superexpressão modula a apoptose induzida por radiação, diminuindo fortemente a sinalização de Akt (OKUNAGA et al., 2006). Esses estudos indicam que alterações nos níveis de cálcio intracelular desempenham um papel na modulação da apoptose.

XBP1, que é um gene cuja expressão está relacionada a resposta ao estresse do retículo, é moldado pela IRE1 - proteína com atividade de quinase e endoribonuclease – para a produção de uma isoforma de XBP1, fator de transcrição homeostático (CALFON et al., 2002). Esse fator de transcrição regula genes participantes da via de degradação de proteínas associadas ao retículo endoplasmático (ERAD) e de dobramento de proteínas. Sua superexpressão no tratamento deste trabalho pode decorrer da tentativa de célula em recuperar a homeostasia.

O *XBP1* parece ter um papel importante na proteção contra o estresse oxidativo em gliomas, potencialmente através de regulação positiva de moléculas antioxidantes. Seu silenciamento levou a morte celular de linhagens de gliblastoma U251, a diminuição da viabilidade celular, além da diminuição da capacidade de formação de tumores (LIU et al., 2011; LIU et al., 2016).

A avaliação da expressão de proteínas e genes mostrou que ainda é preciso aprofundar os estudos sobre as alterações ocasionadas pelos tratamentos, visto que os dados apresentados contrapoem alguns pontos encontrados na literatura.

A tabela 8 traz um resumo qualitativo das alterações moleculares identificadas por *western blotting* (proteínas) e qPCR (genes). É visto que a fração BRA-346ADC promove alterações importantes nas linhagens HOG e T98G. Acredita-se que o fato de algumas dessas alterações terem se apresentado de forma diferente do que hoje é encontrado na literatura decorra da complexidade química ainda presente na fração, ou ainda que mecanismos diversos estejam sendo deflagrados pelas substâncias ativas presentes na fração.

Tabela 8 - Resumo da análise qualitativa das alterações moleculares identificadas nas linhagens após os tratamentos.
Dados da expressão de proteínas e genes avaliados nas linhagens HOG e T98G tratadas com a fração BRA-346ADC e os inibidores purificados do proteassoma.

	Imunoblotting	qPCR
	HOG	
Fração BRA-346ADC	Aumento da ubiquitinação e Hsp70 Manteve a degradação do NF-kB 105 em NF-kB 50	Aumentou todos 6 genes reavaliados
Dihidroeponemicina	Diminuição do NF-kB 105 e 50 kDa	Aumento de expressão apenas do *XBP1*
Epoxomicina	Diminuição da ubiquitinação e do NF-kB 50 kDa	Diminuição de expressão do genes *ATF4, ATF6 e CALR*
Salinosporamida A	Aumento de Hsp70 e diminuição de NF-kB 105 e 50 kDa	Diminuição de todos os genes, com exceção do *DDIT3*
	T98G	
Fração BRA-346ADC	Aumento da ubiquitinação, Hsp70 Diminuição do NF-kB 50 kDa	Aumentou todos 6 genes reavaliados
Dihidroeponemicina	Diminuição da ubiquitinação, Hsp70	Diminuição CALR, DDIT3 Aumento do XBP1
Epoxomicina	Diminuição da ubiquitinação	Diminuição de todos os genes com exceção do *HSPA5* e *XBP1*
Salinosporamida A	Aumento da ubiquitinação (24h) e Hsp70 Diminuição da ubiquitinação (48h)	Diminuição de todos os genes com exceção do *HSPA5*

6 CONCLUSÃO

Diante dos dados expostos, o presente trabalho apresenta a identificação de substâncias inibidoras do proteassoma (TMC-86A, dihidroeponemicina e derivados) no extrato da uma bactéria marinha do gênero Streptomyces isolada da ascídia Euherdmania sp. Os resultados químicos sugerem a presença de novos compostos clorados também com função de inibição enzimática. Apesar da confirmação de inibidores do proteassoma na composição da fração, não foi possível observar semelhante expressão genética e proteica para as células tratadas com inibidores purificados. Os dados propoem até o momento que os tratamentos das linhgens tumorais de glioma e glioblastoma com a fração obtida do extrato da bactéria BRA-346 dispara a resposta ao estresse do retículo e interferem no sistema ubiquitina-proteassoma. Em virtude da ativação de mais de uma via no mecanismo que envolve a ação dessa fração, a continuidade dos seus estudos se faz necessária para elucidação de outras substâncias que possam estar envolvidas com a citotoxicidade mostrada nas linhagens de câncer de cérebro, pois tal citotoxicidade traz a possibilidade de investigação de nova terapia para esse tipo de câncer. Vale comentar que o perfil de resposta diferente apresentado pela fração nos modelos utilizados em relação ao inibidores usados com controles-positivos sugere a possibilidade de um mecanismo de ação peculiar. Esses resultados ressaltam a importância dos micro-organismos marinhos como fonte de moléculas citotóxicas, mostrando uma peculiar biodiversidade química desses micro-organismos, além da necessidade de melhor investigar o potencial antitumoral de suas moléculas.

REFERÊNCIAS

ABREU, P. A. et al. Identification of Pyrroloformamide as a Cytokinesis Modulator. **ChemBioChem**, v. 15, n. 4, p. 501–506, 3 mar. 2014.

ADAMS, J. et al. Proteasome Inhibitors : A Novel Class of Potent and Effective Antitumor Agents Proteasome Inhibitors : A Novel Class of Potent and Effective Antitumor Agents. **Direct**, p. 2615–2622, 1999.

ADAMS, J. Proteasome Inhibition in Cancer: **Cancer Research**, v. 28, n. 6, p. 613–619, 2001.

ADAMS, P. D. et al. research papers PHENIX : a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution research papers. p. 213–221, 2010.

ALLARD, P. et al. Integration of Molecular Networking and In-Silico MS/MS Fragmentation for Natural Products Dereplication. **Analytical Chemistry**, v. 88, n. 6, p. 3317–3323, 15 mar. 2016.

AVRIL, T.; VAULÉON, E.; CHEVET, E. Endoplasmic reticulum stress signaling and chemotherapy resistance in solid cancers. **Oncogenesis**, v. 6, n. 8, p. e373, 28 ago. 2017.

BERGMANN, W.; BURKE, D. C. Contributions to the Study of Marine Products. XL. The Nucleosides of Sponges. IV. Spongosine. **Journal of Organic Chemistry**, v. 21, n. 2, p. 226–228, 1956.

BERGMANN, W.; FEENEY, R. J. Contributions to the study of marine products. XXXII. The nucleosides of sponges. **Journal of Organic Chemistry**, v. 16, n. 6, p. 981–987, 1951.

BERGMANN, W.; STEMPIEN, M. F. Contributions to the Study of Marine Products. XLIII. The Nucleosides of Sponges. V. The Synthesis of Spongosine. **Journal of Organic Chemistry**, v. 22, n. 12, p. 1575–1577, 1957.

BERRIDGE, M. V.; TAN, A. S. Characterization of the Cellular Reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular Localization, Substrate Dependence, and Involvement of Mitochondrial Electron Transport in MTT Reduction. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 303, n. 2, p. 474–482, jun. 1993.

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

BOCHTLER, M. et al. The proteasome. **Annu Rev Biophys Biomol Struct**, v. 28, p.

295–317, 1999.

BOOTH, L. et al. OSU-03012 suppresses GRP78/BiP expression that causes PERK-dependent increases in tumor cell killing. **Cancer Biology & Therapy**, v. 13, n. 4, p. 224–236, 15 fev. 2012.

BRUNTON, L.L. Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 12ª ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2012.

BUEDENBENDER, L. et al. Taxonomic and metabolite diversity of actinomycetes associated with three Australian ascidians. **Diversity**, v. 9, n. 4, 2017.

BUSH K T; GOLDBERG A L; NIGAM S K. Proteasome inhibition leads to a heat-shock response, induction of endoplasmic reticulum chaperones, and thermotolerance. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 14, p. 9086–9092, 1997.

CALFON, M. et al. IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. **Nature**, v. 415, n. 6867, p. 92–96, jan. 2002.

CARLSON, E. E. Natural Products as Chemical Probes. **ACS Chemical Biology**, v. 5, n. 7, p. 639–653, 16 jul. 2010.

CHAO, C.-C. et al. Ca2+ store depletion and endoplasmic reticulum stress are involved in P2X7 receptor-mediated neurotoxicity in differentiated NG108-15 cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 113, n. 4, p. 1377–1385, abr. 2012.

CHEN, D. et al. Bortezomib as the First Proteasome Inhibitor Anticancer Drug: Current Status and Future Perspectives. **Current Cancer Drug Targets**, v. 11, n. 3, p. 239–253, 1 mar. 2011.

CHEN, L.; FU, C.; WANG, G. Microbial diversity associated with ascidians: a review of research methods and application. **Symbiosis**, v. 71, n. 1, p. 19–26, 2017.

CHEN, L.; MADURA, K. Increased proteasome activity, ubiquitin-conjugating enzymes, and eEF1A translation factor detected in breast cancer tissue. **Cancer Research**, v. 65, n. 13, p. 5599–5606, 2005.

CHEN, L et al. Enhanced Degradation of Misfolded ProteinsPromotes Tumorigenesis. **Cell Reports,** v. 18, p. 3143-3154, 2017.

CHOMCZYNSKI, P. Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Extraction. v. 159, p. 156–159, 1987.

COMBA, A. et al. Arginylated Calreticulin Increases Apoptotic Response Induced by Bortezomib in Glioma Cells. **Molecular Neurobiology**, v. 56, n. 3, p. 1653–1664, 18 mar. 2019.

COOKSON, M. R. Hero versus antihero: The multiple roles of α-synuclein in

neurodegeneration. **Experimental Neurology**, v. 199, n. 2, p. 238–242, jun. 2006.

COSTA-LOTUFO, L. V. et al. Organismos marinhos como fonte de novos fármacos: histórico & perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 703–716, 2009.

CRUNKHORN, S. Antimalarials: Novel proteasome inhibitor combats malaria. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 15, n. 4, p. 232, 2016.

CUSACK, J. C. et al. Advances in Brief Enhanced Chemosensitivity to CPT-11 with Proteasome Inhibitor PS-341 : Implications for Systemic Nuclear Factor- κB Inhibition 1. **Genetics and Molecular Biology**, p. 3535–3540, 2001.

CZESNY, B. et al. The proteasome inhibitor epoxomicin has potent Plasmodium falciparum gametocytocidal activity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 10, p. 4080–4085, 2009.

DADEY, D. Y. A. et al. The ATF6 pathway of the ER stress response contributes to enhanced viability in glioblastoma. **Oncotarget**, v. 7, n. 2, 12 jan. 2016.

DANG, L.; JIN, S.; SU, S. M. IDH mutations in glioma and acute myeloid leukemia. **Trends in Molecular Medicine**, v. 16, n. 9, p. 387–397, 2010.

DAVIDSON, S. K. et al. Evidence for the Biosynthesis of Bryostatins by the Bacterial Symbiont “ Candidatus Endobugula sertula ” of the Bryozoan Bugula neritina. v. 67, n. 10, p. 4531–4537, 2001.

DAVIS, M. E. GBM treatment overview. **Clin J Oncol Nurs**, v. 20, n. 5, p. 1–14, 2016.

DEMO, S. D. et al. Antitumor Activity of PR-171, a Novel Irreversible Inhibitor of the Proteasome. Cancer Research, [s.l.], v. 67, n. 13, p.6383-6391, 1 jul. 2007. American Association for Cancer Research (AACR).

DI, K. et al. Marizomib activity as a single agent in malignant gliomas: Ability to cross the blood-brain barrier. **Neuro-Oncology**, v. 18, n. 6, p. 840–848, 2016.

DICK, T. P. et al. Contribution of Proteasomal β-Subunits to the Cleavage of Peptide Substrates Analyzed with Yeast Mutants. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 40, p. 25637–25646, 2 out. 1998.

DING, F. et al. The role of the ubiquitin-proteasome pathway in cancer development and treatment. **Front Biosci (Landmark Ed.)**, v. 19, p. 886-895, 2014.

DOMINGUEZ-BAUTISTA, J. A. et al. Loss of lysosome-associated membrane protein 3 (LAMP3) enhances cellular vulnerability against proteasomal inhibition. **European Journal of Cell Biology**, v. 94, n. 3–4, p. 148–161, mar. 2015.

EMSLEY, P.; COWTAN, K. research papers Coot : model-building tools for molecular graphics research papers. p. 2126–2132, 2004.

EUGÊNIO, A. I. P. et al. Proteasome and heat shock protein 70 (HSP70) inhibitors as therapeutic alternative in multiple myeloma. **Oncotarget**, v. 8, n. 70, p. 114698–114709, 2017.

F., P. et al. Carfilzomib can induce tumor cell death through selective inhibition of the chymotrypsin-like activity of the proteasome. **Blood**, v. 114, n. 16, p. 3439–3447, 2009.

FELING, R. H. et al. Salinosporamide A: A highly cytotoxic proteasome inhibitor from a novel microbial source, a marine bacterium of the new genus Salinospora. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 42, n. 3, p. 355–357, 2003.

FRANKLAND-SEARBY, S.; BHAUMIK, S. R. The 26S proteasome complex: An attractive target for cancer therapy. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, v. 1825, n. 1, p. 64–76, 2012.

FRIEDMAN, H. S.; KERBY, T.; CALVERT, H. Temozolomide and treatment of malignant glioma. **Clinical Cancer Research**, v. 6, n. 7, p. 2585–2597, 2000.

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

GOLDBERG, A. L. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. **Nature**, v. 426, n. 18/25 December, p. 895–899, 2003.

GOLDBERG, A. L. Functions of the proteasome: from protein degradation and immune surveillance to cancer therapy. **Biochemical Society Transactions**, v. 35, n. 1, p. 12–17, 2007.

GOLDBERG, A. L. Development of proteasome inhibitors as research tools and cancer drugs. **Journal of Cell Biology**, v. 199, n. 4, p. 583–588, 2012.

GOODENBERGER, M. L.; JENKINS, R. B. Genetics of adult glioma. **Cancer Genetics**, v. 205, n. 12, p. 613–621, 2012.

GROLL, M. et al. A gated channel into the proteasome core particle. **Nature Structural Biology**, v. 7, n. 11, p. 1062–1067, 2000.

GROLL, M. et al. Crystal structure of the boronic acid-based proteasome inhibitor bortezomib in complex with the yeast 20S proteasome. **Structure**, v. 14, n. 3, p. 451–456, 2006.

GULDER, T. A. M.; MOORE, B. S. Salinosporamide Natural Products: Potent 20 S Proteasome Inhibitors as Promising Cancer Chemotherapeutics. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 49, n. 49, p. 9346–9367, 3 dez. 2010.

GUTIERREZ, D. A. et al. A new pyridazinone exhibits potent cytotoxicity on human

cancer cells via apoptosis and poly-ubiquitinated protein accumulation. 2019.

HANADA, M. et al. Epoxomicin, a new antitumor agent of microbial origin. **The Journal of antibiotics**, v. 45, n. 11, p. 1746–52, 1992.

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

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–74, 2011.

HE, Y.; KAINA, B. Are There Thresholds in Glioblastoma Cell Death Responses Triggered by Temozolomide? **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 7, p. 1562, 28 mar. 2019.

HETZ, C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, n. 2, p. 89–102, 18 fev. 2012.

HEUER, H. et al. Analysis of Actinomycete Communities by Specific Amplification of Genes Encoding 16S rRNA and Gel-Electrophoretic Separation in Denaturing Gradients. v. 63, n. 8, p. 3233–3241, 1997.

HIDESHIMA, T. et al. NF-κB as a therapeutic target in multiple myeloma. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 19, p. 16639–16647, 2002.

HILL, R. T.; FENICAL WILLIAM, W. Pharmaceuticals from marine natural products: Surge or ebb? **Current Opinion in Biotechnology**, v. 21, n. 6, p. 777–779, 2010.

HIRAMATSU, N. et al. Translational and posttranslational regulation of XIAP by eIF2α and ATF4 promotes ER stress–induced cell death during the unfolded protein response. **Molecular Biology of the Cell**, v. 25, n. 9, p. 1411–1420, maio 2014.

HOELLER, D.; DIKIC, I. Targeting the ubiquitin system in cancer therapy. **Nature**, v. 458, n. 7237, p. 438–444, 2009.

HOUGHTON, P. et al. The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. v. 42, p. 377–387, 2007.

HUANG, X.; DIXIT, V. M. Drugging the undruggables: Exploring the ubiquitin system for drug development. **Cell Research**, v. 26, n. 4, p. 484–498, 2016.

HUBER, E. M.; GROLL, M. Inhibitors for the Immuno- and Constitutive Proteasome: Current and Future Trends in Drug Development. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 51, n. 35, p. 8708–8720, 27 ago. 2012.

Instituto Nacional de Câncer INCA. Estimativa 2018 <

http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/index.asp?ID=2>, acessado em dezembro de 2018.

J. MONK, B. et al. Trabectedin as a New Chemotherapy Option in the Treatment of Relapsed Platinum Sensitive Ovarian Cancer. **Current Pharmaceutical Design**, v. 18, n. 25, p. 3754–3769, 2012.

JASPARS, M. et al. The marine biodiscovery pipeline and ocean medicines of tomorrow. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 96, n. 01, p. 151–158, 19 fev. 2016.

JENSEN, P. R. et al. Marine Microorganisms and Drug Discovery : Current Status and Future Marine Microorganisms and Drug Discovery : Current Status and. n. August 2015, 2000.

JIMENEZ, P. C. et al. Biological activity in extracts of ascidians (Tunicata, Ascidiacea) from the northeastern Brazilian coast. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 287, n. 1, p. 93–101, 2003.

JIMENEZ, P. C. et al. Structure elucidation and anticancer activity of 7-oxostaurosporine derivatives from the Brazilian endemic tunicate Eudistoma vannamei. **Marine Drugs**, v. 10, n. 5, p. 1092–1102, 2012.

JIMENO, J. et al. New Marine Derived Anticancer Therapeutics ─ A Journey from the Sea to Clinical Trials. **Marine Drugs**, v. 2, n. 1, p. 14–29, 2008.

KABSCH, W. XDS. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, v. 66, n. 2, p. 125–132, 1 fev. 2010.

KHARE, S. et al. Proteasome inhibition for treatment of leishmaniasis, Chagas disease and sleeping sickness. **Nature**, v. 537, n. 7619, p. 229–233, 8 set. 2016.

KIM, E.; MOORE, B. S.; YOON, Y. J. Reinvigorating natural product combinatorial biosynthesis with synthetic biology. **Nature Chemical Biology**, v. 11, n. 9, p. 649–659, 2015.

KIM, K. B.; CREWS, C. M. From epoxomicin to carfilzomib: Chemistry, biology, and medical outcomes. **Natural Product Reports**, v. 30, n. 5, p. 600–604, 2013.

KIM, S. S. et al. Effective treatment of glioblastoma requires crossing the blood-brain barrier and targeting tumors including cancer stem cells: The promise of nanomedicine. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 468, n. 3, p. 485–489, 2015.

KIND, T.; FIEHN, O. Metabolomic database annotations via query of elemental compositions : Mass accuracy is insufficient even at less than 1 ppm. v. 10, p. 1–10,

2006.

KISSELEV, A. F.; VAN DER LINDEN, W. A.; OVERKLEEFT, H. S. Proteasome Inhibitors: An Expanding Army Attacking a Unique Target. **Chemistry & Biology**, v. 19, n. 1, p. 99–115, jan. 2012.

KLEIGREWE, K. et al. Combining Mass Spectrometric Metabolic Pro fi ling with Genomic Analysis: A Powerful Approach for Discovering Natural Products from Cyanobacteria. 2015.

KLEIHUES, P.; OHGAKI, H. Primary and secondary glioblastomas: From concept to clinical diagnosis. **Neuro-Oncology**, v. 1, n. 1, p. 44–51, 1 jan. 1999.

KOGUCHI, Y. et al. TMC-86A, B and TMC-96, New Proteasome Inhibitors from Streptomyces sp. TC 1084 and Saccharothrix sp. TC 1094. II. Physico-chemical Properties and Structure Determination. **The Journal of Antibiotics**, v. 53, n. 1, p. 63–65, 2000.

KUBICZKOVA, L. et al. Proteasome inhibitors - molecular basis and current perspectives in multiple myeloma. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 18, n. 6, p. 947–961, jun. 2014.

KUHN, D. J. et al. Potent activity of carfilzomib, a novel, irreversible inhibitor of the ubiquitin-proteasome pathway, against preclinical models of multiple myeloma. **Blood**, v. 110, n. 9, p. 3281–3290, 1 nov. 2007.

LA CLAIR, J. J. Natural product mode of action (MOA) studies: A link between natural and synthetic worlds. **Natural Product Reports**, v. 27, n. 7, p. 969–995, 2010.

LAMBERT, G. REVIEW / SYNTHÈSE Ecology and natural history of the protochordates 1. n. Herdman 1882, p. 34–50, 2005.

LASKOWSKI, R. A. et al. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**, v. 26, n. 2, p. 283–291, 1 abr. 1993.

LEE, J. T.; STEELMAN, L. S.; MCCUBREY, J. A. Phosphatidylinositol 3′-Kinase Activation Leads to Multidrug Resistance Protein-1 Expression and Subsequent Chemoresistance in Advanced Prostate Cancer Cells. **Cancer Research**, v. 64, n. 22, p. 8397–8404, 15 nov. 2004.

LEVIN, N. et al. Marizomib irreversibly inhibits proteasome to overcome compensatory hyperactivation in multiple myeloma and solid tumour patients. **British Journal of Haematology**, v. 174, n. 5, p. 711–720, 2016.

LI, J. et al. Streptomyces fildesensis sp . nov ., a novel streptomycete isolated from

Antarctic soil. p. 537–543, 2011.

LIMONTA, P. et al. Role of Endoplasmic Reticulum Stress in the Anticancer Activity of Natural Compounds. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 4, p. 961, 22 fev. 2019.

LIU, F. et al. IKK biology. **Immunological Reviews**, v. 246, n. 1, p. 239–253, 2012.

LIU, Y. et al. Targeting X box-binding protein-1 (XBP1) enhances sensitivity of glioma cells to oxidative stress. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v. 37, n. 4, p. 395–405, jun. 2011.

LIU, Y. et al. XBP1 silencing decreases glioma cell viability and glycolysis possibly by inhibiting HK2 expression. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 126, n. 3, p. 455–462, 17 fev. 2016.

LOUIS, D. N. et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. **Acta Neuropathologica**, v. 114, n. 2, p. 97–109, 2007.

LOUIS, D. N. et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. **Acta neuropathologica**, v. 131, n. 6, p. 803–20, 2016.

LOTUFO, T. M. C.; SILVA, A. M. B. Ascidiacea. In: H. Matthews-Cascon ; T. M. C. Lotufo (Ed.).Biota marinha da Costa Oeste do Ceará. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2006. p.221-247

MANTON, C. A. et al. Induction of cell death by the novel proteasome inhibitor marizomib in glioblastoma in vitro and in vivo. **Scientific Reports**, v. 6, n. January, p. 1–13, 2016.

MAYER, M. P.; BUKAU, B. Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 62, n. 6, p. 670–684, 2005.

MEINERS, S. et al. Proteasome inhibitors: Poisons and remedies. **Medicinal Research Reviews**, v. 28, n. 2, p. 309–327, mar. 2008.

MENG, L. et al. Eponemycin exerts its antitumor effect through the inhibition of proteasome function. **Cancer Research**, v. 59, n. 12, p. 2798–2801, 1999.

MIAO, V.; DAVIES, J. Actinobacteria : the good , the bad , and the ugly. p. 143–150, 2010.

MILLWARD, M. et al. Phase 1 clinical trial of the novel proteasome inhibitor marizomib with the histone deacetylase inhibitor vorinostat in patients with melanoma, pancreatic and lung cancer based on in vitro assessments of the combination. **Investigational New Drugs**, v. 30, n. 6, p. 2303–2317, 2012.

MOHAPATRA, B. R.; BAPUJI, M.; SREE, A. Antifungal Efficacy of Bacteria Isolated from Marine Sedentary Organisms. v. 47, n. 1, p. 51–55, 2002.

MONNIOT, F. Ascidies littorales de Guadeloupe. **Bull.Mus.natn.Hist.nat.**, n. 2, p. 413–422, 1983.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival : Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. v. 65, p. 55–63, 1983.

MUTH, C. et al. Primary glioblastoma multiforme tumors and recurrence. **Strahlentherapie und Onkologie**, v. 192, n. 3, p. 146–155, 8 mar. 2016.

MYEKU, N.; FIGUEIREDO-PEREIRA, M. E. Dynamics of the degradation of ubiquitinated proteins by proteasomes and autophagy: Association with sequestosome 1/p62. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 25, p. 22426–22440, 2011.

NAWROCKI, S. T. et al. The proteasome inhibitor bortezomib enhances the activity of docetaxel in orthotopic human pancreatic tumor xenografts. **Molecular cancer therapeutics**, v. 3, n. 1, p. 59–70, 2004.

NEMETH, Z. H. Proteasome Inhibitors Induce Inhibitory B (I B) Kinase Activation, I B Degradation, and Nuclear Factor B Activation in HT-29 Cells. **Molecular Pharmacology**, v. 65, n. 2, p. 342–349, 1 fev. 2004.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 3, p. 311–335, 2012.

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

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Drugs and Drug Candidates from Marine Sources: An Assessment of the Current “state of Play”. **Planta Medica**, v. 82, n. 9–10, p. 775–789, 2016b.

NOTHIAS, L. et al. Bioactivity-Based Molecular Networking for the Discovery of Drug Leads in Natural Product Bioassay-Guided Fractionation. 2018.

OIKAWA, T. et al. Eponemycin, a novel antibiotic, is a highly powerful angiogenesis inhibitor. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 181, n. 3, p. 1070–1076, dez. 1991.

OKUNAGA, T. et al. Calreticulin, a Molecular Chaperone in the Endoplasmic Reticulum, Modulates Radiosensitivity of Human Glioblastoma U251MG Cells. **Cancer Research**, v. 66, n. 17, p. 8662–8671, 1 set. 2006.

OLANO, C.; CARMEN, M. Antitumor compounds from actinomycetes : From gene

clusters to new derivatives by combinatorial biosynthesis Antitumor compounds from actinomycetes : from gene clusters to new derivatives by combinatorial biosynthesis. n. May 2014, 2009.

ORLOWSKI, R. Z.; KUHN, D. J. Proteasome inhibitors in cancer therapy: Lessons from the first decade. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 6, p. 1649–1657, 2008.

PALANISAMY, S. K.; RAJENDRAN, N. M.; MARINO, A. Natural Products Diversity of Marine Ascidians (Tunicates; Ascidiacea) and Successful Drugs in Clinical Development. **Natural Products and Bioprospecting**, v. 7, n. 1, p. 1–111, 2017.

RABL, J. et al. Mechanism of Gate Opening in the 20S Proteasome by the Proteasomal ATPases. **Molecular Cell**, v. 30, n. 3, p. 360–368, 2008.

RAEDLER, L. Velcade (Bortezomib) Receives 2 New FDA Indications: For Retreatment of Patients with Multiple Myeloma and for First-Line Treatment of Patients with Mantle-Cell Lymphoma. **American health & drug benefits**, v. 8, n. Spec Feature, p. 135–40, 2015.

RAJAN, A. M.; KUMAR, S. New investigational drugs with single-agent activity in multiple myeloma. **Blood cancer journal**, v. 6, n. 7, p. e451, 2016.

REEN, F. J. et al. **Emerging concepts promising new horizons for marine biodiscovery and synthetic biology**. [s.l: s.n.]. v. 13

ROCHA, C. R. R. et al. NRF2 and glutathione are key resistance mediators to temozolomide in glioma and melanoma cells. **Oncotarget**, v. 7, n. 30, 2016.

RODRIGUES, T. et al. Counting on natural products for drug design. **Nature Chemistry**, v. 8, n. 6, p. 531–541, 2016.

ROMANO, G. et al. Marine microorganisms as a promising and sustainable source of bioactive molecules. **Marine Environmental Research**, v. 128, p. 58–69, 2017.

ROOS, W. P. et al. Apoptosis in malignant glioma cells triggered by the temozolomide-induced DNA lesion O6-methylguanine. **Oncogene**, v. 26, n. 2, p. 186–197, 3 jan. 2007.

S.D., D. et al. Antitumor activity of PR-171, a novel irreversible inhibitor of the proteasome. **Cancer Research**, v. 67, n. 13, p. 6383–6391, 2007.

SALA, G. DELLA et al. Clogging the ubiquitin-proteasome machinery with marine natural products: Last decade update. **Marine Drugs**, v. 16, n. 12, 2018.

SANTHANAM, R. et al. Streptomyces deserti sp . nov ., isolated from hyper-arid Atacama Desert soil. p. 575–581, 2012.

SCHMIDT, M.; FINLEY, D. Regulation of proteasome activity in health and disease.

Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research, v. 1843, n. 1, p. 13–25, 2014.

SIN, N. et al. Total synthesis of the potent proteasome inhibitor epoxomicin: A useful tool for understanding proteasome biology. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 9, n. 15, p. 2283–2288, 1999.

SKEHAN, P. et al. New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening. **JNCI Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, n. 13, p. 1107–1112, 4 jul. 1990.

SOUSA, T. S. et al. Anthracyclinones from Micromonospora sp. n. Table 1, p. 1–5, 2012.

STUPP, R. et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. **The Lancet Oncology**, v. 10, n. 5, p. 459–466, 15 maio 2009.

SUGAWARA, K. et al. Eponemycin, a new antibiotic active against B16 melanoma. I. Production, isolation, structure and biological activity. **The Journal of antibiotics**, v. 43, n. 1, p. 8–18, 1990.

TAKEARA, R. et al. Pyrimidine alkaloids from eudistoma vannamei. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 25, n. 6, p. 698–700, 2015.

TEICHER, B. A. et al. The proteasome inhibitor PS-341 in cancer therapy. **Clinical Cancer Research**, v. 5, n. 9, p. 2638–2645, 1999.

TRAENCKNER, E. B.; WILK, S.; BAEUERLE, P. A. A proteasome inhibitor prevents activation of NF-kappa B and stabilizes a newly phosphorylated form of I kappa B-alpha that is still bound to NF-kappa B. **The EMBO Journal**, v. 13, n. 22, p. 5433–5441, nov. 1994.

TRIVELLA, D. B. B. et al. Enzyme inhibition by hydroamination: Design and mechanism of a hybrid carmaphycin-syringolin enone proteasome inhibitor. **Chemistry and Biology**, v. 21, n. 6, p. 782–791, 2014.

TSAI, S.-F. et al. Isochaihulactone-induced DDIT3 causes ER stress-PERK independent apoptosis in glioblastoma multiforme cells. **Oncotarget**, v. 8, n. 3, p. 4051–4061, 17 jan. 2017.

VEGGIANI, G. et al. Emerging drug development technologies targeting Ubiquitination for Cancer therapeutics. **Pharmacology & Therapeutics**, 6 mar. 2019.

VERHAAK, R. G. W. et al. Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant

Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. **Cancer Cell**, v. 17, n. 1, p. 98–110, 2010.

VILLANO, J. L.; SEERY, T. E.; BRESSLER, L. R. Temozolomide in malignant gliomas: Current use and future targets. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 64, n. 4, p. 647–655, 2009.

WAGENKNECHT, B. et al. Proteasome Inhibitor-Induced Apoptosis of Glioma Cells Involves the Processing of Multiple Caspases and Cytochrome c Release. **Journal of Neurochemistry**, v. 75, n. 6, p. 2288–2297, 29 jul. 2008.

WANG, J. et al. Inhibition of glioma growth by flavokawain B is mediated through endoplasmic reticulum stress induced autophagy. **Autophagy**, v. 14, n. 11, p. 2007–2022, 2 nov. 2018.

WANG, M. et al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. **Nature Biotechnology**, v. 34, n. 8, p. 828–837, 1 ago. 2016.

WATTERS, D. J. Ascidian toxins with potential for drug development. **Marine Drugs**, v. 16, n. 5, 2018.

WILLIAMS, P. G. Panning for chemical gold : marine bacteria as a source of new therapeutics. n. November, p. 45–52, 2008.

World Health Organization WHO programmers and projects: cancer. Disponível em: <http://www.who.int/cancer/en>. Acesso em: 12 fev. 2018.

YANG, J. Y. et al. Molecular Networking as a Dereplication Strategy. 2013.

ZANOTTO-FILHO, A. et al. Proteasome inhibitor MG132 induces selective apoptosis in glioblastoma cells through inhibition of PI3K/Akt and NFkappaB pathways, mitochondrial dysfunction, and activation of p38-JNK1/2 signaling. **Investigational New Drugs**, v. 30, n. 6, p. 2252–2262, 2012.

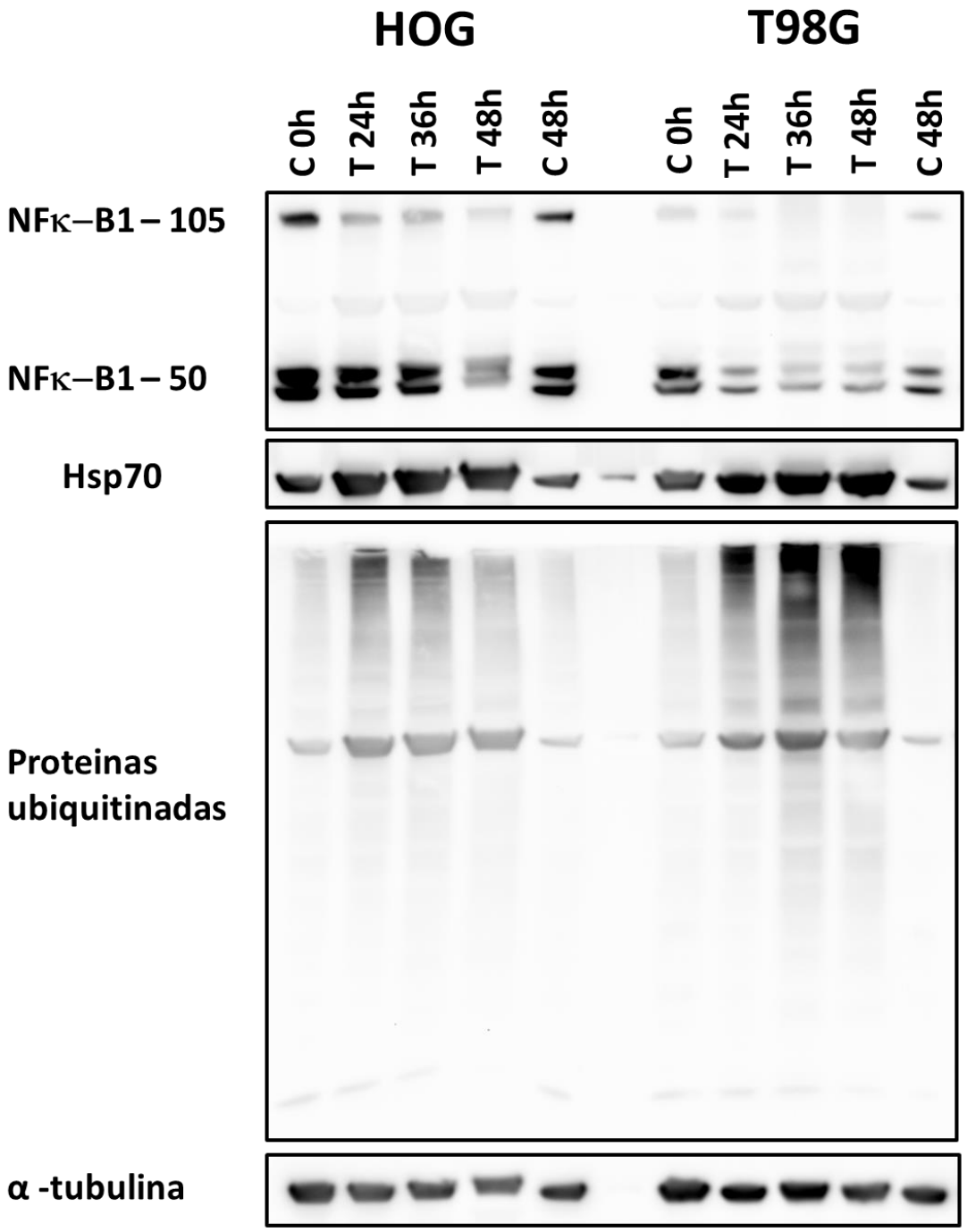
ZHANG, L. et al. Waites. p. 276–281, 2005.

ZHANG, M. et al. Veggiani. **Molecular Pharmaceutics**, v. 15, n. 6, p. 2437–2447, 2018.

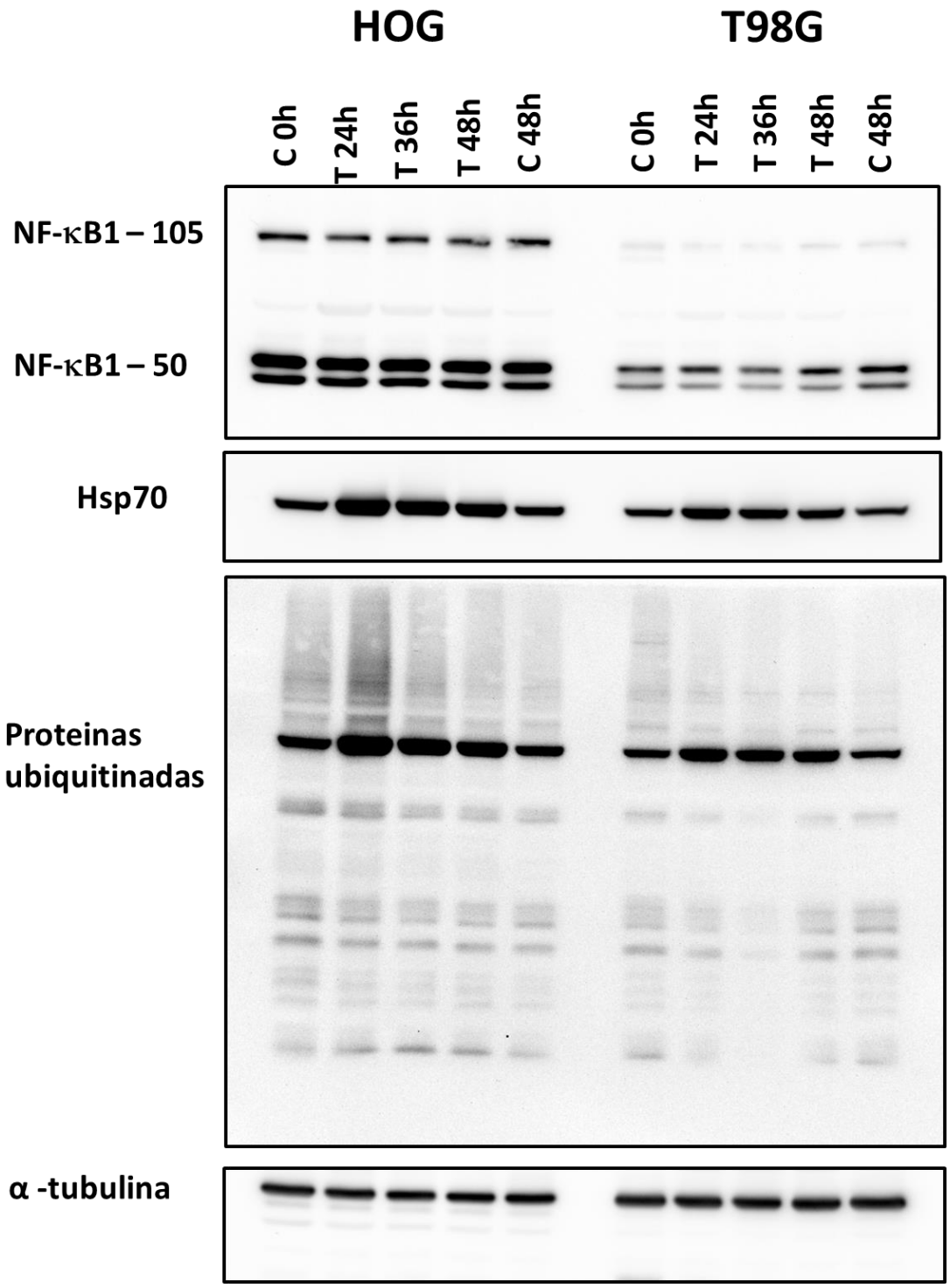
ZWICKL, Peter, BAUMEISTER, Wolfgang. **The Proteasome — Ubiquitin Protein Degradation Pathway.** Springer. 2002

APÊNDICE(S)

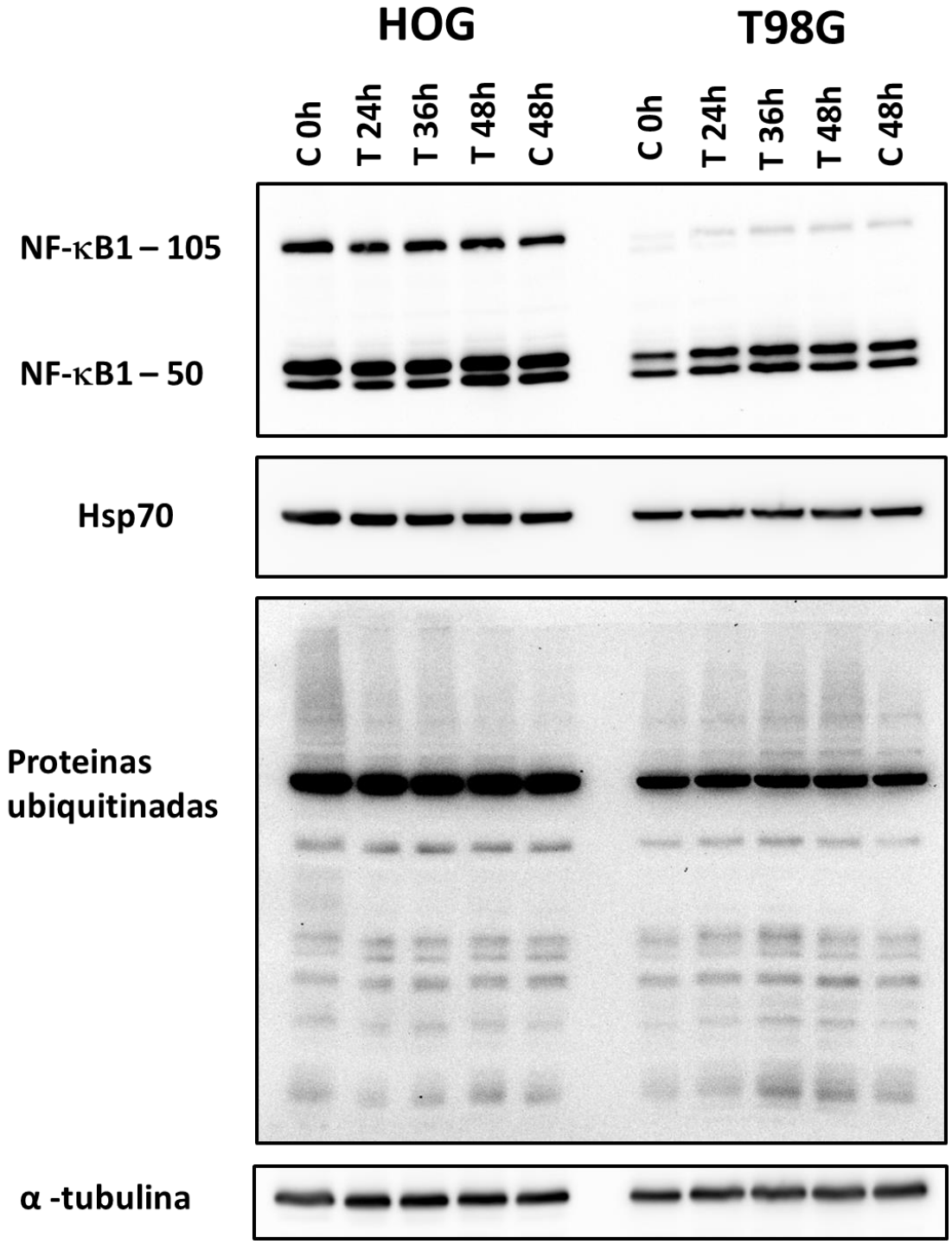
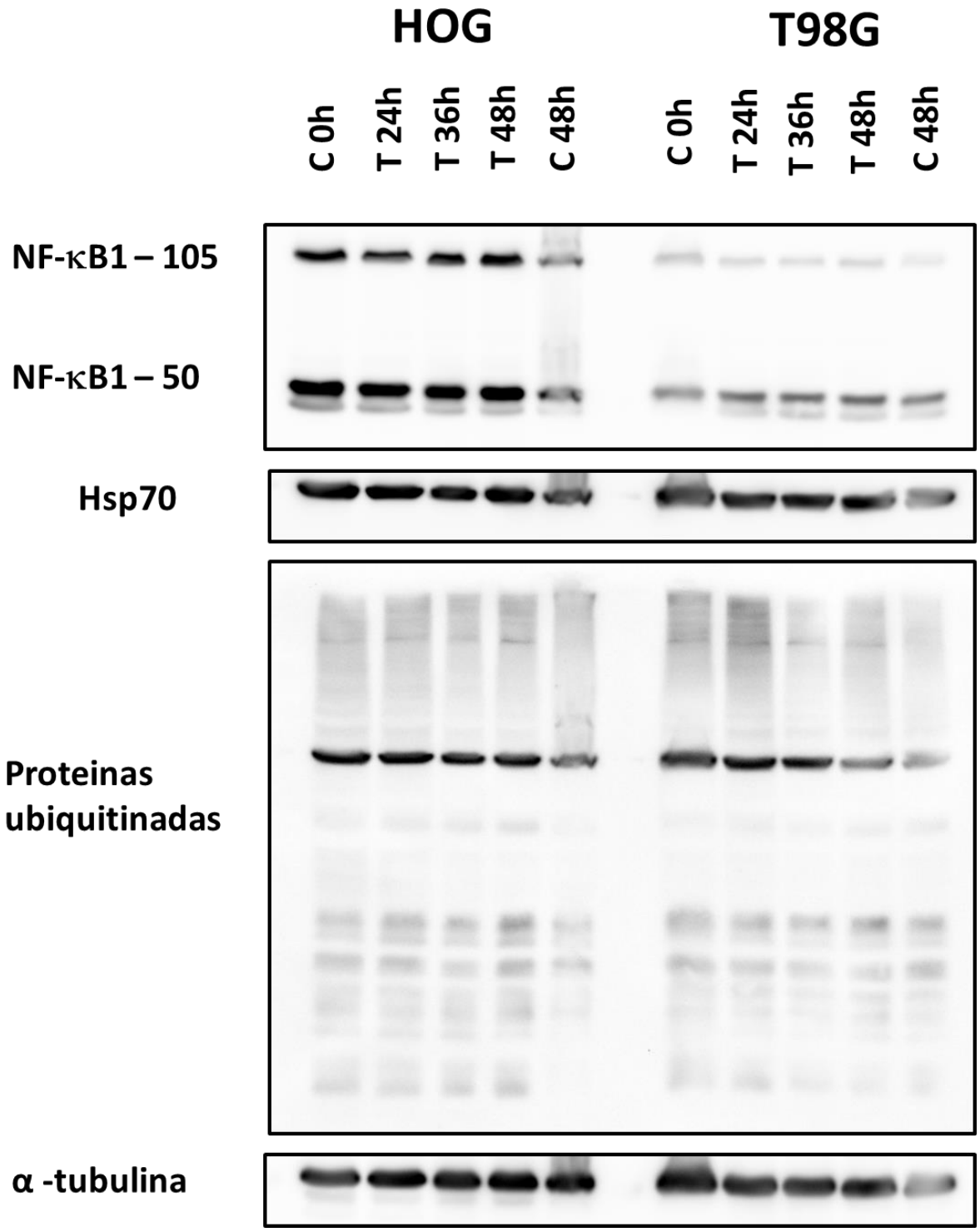
APÊNDICE A – Immunoblotting de NF-κB1, Hsp70, proteínas ubiquitinadas e α-tubulina de HOG e T98G após 24, 36 e 48h de incubação com DMSO 0,06% e fração BRA-346ADC na concentração de 25.4 ng/mL (n=3).



APÊNDICE B – Immunoblotting de NF-κB1, Hsp70, proteínas ubiquitinadas e α-tubulina de HOG e T98G após 24, 36 e 48h de incubação com DMSO 0,06% e salinosporamida A na concentração de 130,8 nM (n=2).



APÊNDICE C – Immunoblotting de NF-κB1, Hsp70, proteínas ubiquitinadas e α-tubulina de HOG e T98G após 24, 36 e 48h de incubação com DMSO 0,06% e dihidroeponemicina na concentração de 2,7 nM (n=2).



APÊNDICE D – Immunoblotting de NF-κB1, Hsp70, proteínas ubiquitinadas e α-tubulina de HOG e T98G após 24, 36 e 48h de incubação com DMSO 0,06% e epoxomicina na concentração de 2,1 nM (n=1).