

SCH-642305 PRODUZIDA POR FUNGO ENDOFÍTICO DE *Achyrocline satureioides* INIBE PROLIFERAÇÃO E MIGRAÇÃO CELULAR DE LINHAGEM CELULAR DE GLIOBLASTOMA MULTIFORME HUMANO

NATHALIA STARK PEDRA¹; NATÁLIA PONTES BONA²; JULIANA HOFSTATTER AZAMBUJA³; KIRLEY MARQUES CANUTO⁴; ELIZANDRA BRAGANHOL⁵; ROSELIA MARIA SPANEVELLO⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – nathaliastark@hotmail.com

² Universidade Federal de Pelotas – nataliapbona@gmail.com

³Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – julianahazambuja@hotmail.com

⁴Embrapa Agroindústria Tropical – kirley.canuto@embrapa.br

⁵Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – elizbraganhhol@yahoo.com.br

⁶Universidade Federal de Pelotas – rspanevello@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Os gliomas correspondem à grande maioria dos tumores intracerebrais (SILVA et al., 2016) sendo o glioblastoma multiforme (GBM), glioma de grau IV, a neoplasia mais agressiva do sistema nervoso central (LOUIS et al., 2016). A migração difusa de tais células tumorais no parênquima cerebral circundante consiste em uma das principais causas do baixo prognóstico dos pacientes acometidos pelo GBM, cuja expectativa de vida varia entre 12 a 15 meses (EISEMANN et al., 2018). Neste sentido, a busca por novas modalidades terapêuticas capazes de reduzir a malignidade do tumor e aumentar a sobrevida dos pacientes torna-se essencial. Os produtos naturais provenientes do metabolismo secundário de microrganismos, especialmente fungos endofíticos, consistem em uma ampla fonte de compostos bioativos (NISA et al., 2015). Tais microrganismos vivem no interior de plantas medicinais e exibem diversas propriedades farmacológicas, atuando como excelentes alternativas para a descoberta de fármacos antitumorais (CRAGG; PEZZUTO, 2016). Plantas pertencentes à espécie *Achyrocline satureioides*, popularmente conhecidas como “macela” exibem diversas atribuições terapêuticas, inclusive atividade citotóxica seletiva sobre linhagens de GBM humano (U251MG e U87MG) e de rato (C6) (SOUZA et al., 2018). Neste contexto, o presente estudo visou investigar o efeito de metabólitos produzidos por fungo endofítico de *A. satureioides* sobre viabilidade, proliferação e migração celular de linhagem de GBM humano U138.

2. METODOLOGIA

2.1 Isolamento de fungo endofítico de *A. satureioides* e identificação estrutural do composto 1

O fungo endofítico foi isolado de caules sadios de *A. satureioides* conforme MACHADO (2009). Os micélios foram inoculados em meio de cultivo líquido mantidos em estufa a 25 °C e luminosidade controlada por 25 dias. Os compostos produzidos pelo fungo endofítico e liberados no meio de cultivo foram extraídos com o solvente orgânico diclorometano. Posteriormente, o extrato obtido foi fracionado conforme descrito por GALVÃO et al. (2018) e a elucidação estrutural do composto 1 foi realizada mediante análises de cromatografia líquida de ultra-eficiência acopladas ao espectrômetro de massas (CLUE-MS).

2.2 Cultura de linhagem de GBM

A linhagem de GBM humano (U138) foi cultivada em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). As células foram semeadas em uma densidade de 5×10^3 ou 1×10^5 por poço, mantidas em estufa de CO_2 , a 37°C e atmosfera umidificada. As culturas foram expostas ao composto 1 em concentrações de 0,05; 0,5; 1; 2,5; 5 e/ou 10 $\mu\text{g/mL}$ durante 48 h. Células não tratadas foram utilizadas como controle.

2.3 Análise citotóxica

A viabilidade celular foi determinada pelo teste de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)2,5-difenil brometo de tetrazolina (MTT), cujo ensaio quantifica células metabolicamente ativas. Já a proliferação celular foi avaliada pela coloração de proteínas celulares através do reagente Sulforodamida B.

2.4. Ensaio de migração celular

O impacto do composto 1 sobre a migração celular foi realizada conforme descrito por KACZMAREK et al. (2005). O ensaio é baseado no monitoramento do fechamento de uma fenda realizada na monocamada de células confluentes nos intervalos de tempo de 0, 18, 24 e 48 h de tratamento.

2.5 Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão e analisados por ANOVA de uma via seguido de post-hoc de Tukey. Os resultados foram considerados significativos quando $P < 0.05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Até o momento, foi possível o isolamento de um fungo endofítico o qual está em processo de identificação molecular, sendo o presente estudo, o primeiro relato a cerca do isolamento de um fungo endofítico a partir de *A. saturoioides*. Durante o fracionamento dos compostos produzidos pelo metabolismo secundário deste fungo endofítico, foi possível detectar um composto cujas análises do espectro de CLUE-MS o identificaram estruturalmente como uma lactona macrocíclica de fórmula molecular $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{O}_4$ sendo caracterizada como Sch-642305 (Figura 1). Segundo CHU et al. (2003), esta lactona foi primeiramente isolada a partir de *Penicillium verrucosum*. Além disso, Sch-642305 é descrita como o principal composto produzido pelo fungo endofítico *Phomopsis* sp., exibindo interessantes efeitos citotóxicos sobre linhagens tumorais de carcinoma colorretal humano (HCT-116), adenocarcinoma de mama humano (MDA-MB-231) e leucemia mielogênica humana (K562) (ADELIN et al., 2011).

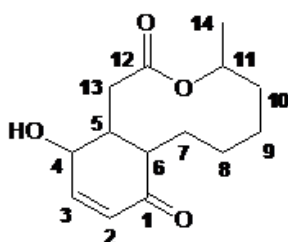


Figura 1. Estrutura de Sch-642305 produzida por fungo endofítico isolado de *A. saturoioides*.

É bem estabelecido que a U138 é uma linhagem celular que exibe uma mutação da p53, cuja perda de funcionalidade está associada a uma sensibilidade diminuída aos agentes quimioterápicos que por sua vez, consiste em uma das

principais características relacionadas à baixa sobrevida dos pacientes diagnosticados com GBM (SILVA et al., 2016). Conforme demonstrado na Figura 2A-B, a Sch-642305 reduziu significativamente a viabilidade e proliferação da linhagem de GBM humano U138 de maneira concentração dependente, exibindo valores de IC₅₀ de 15,20 µg/mL e 7,59 µg/mL, respectivamente, sugerindo um elevado potencial antiglioma. De acordo com EISEMANN et al. (2018), um dos fatores que contribui significativamente com o desenvolvimento de quimioresistência dos pacientes acometidos pelo GBM, é a capacidade de infiltração difusa das células tumorais no tecido cerebral adjacente. Desta forma, identificar compostos que sejam capazes de inibir a migração celular torna-se interessante. Como evidenciado na Figura 2C, a Sch-642305 inibiu em 36% a migração celular da linhagem de GBM humano U138 após 48 horas de tratamento na concentração de 0,5 µg/mL. Com base nos dados apresentados pode-se inferir que esta lactona é capaz de interagir com componentes da matriz extracelular responsáveis pela motilidade das células neoplásicas, reduzindo assim, sua capacidade migratória.

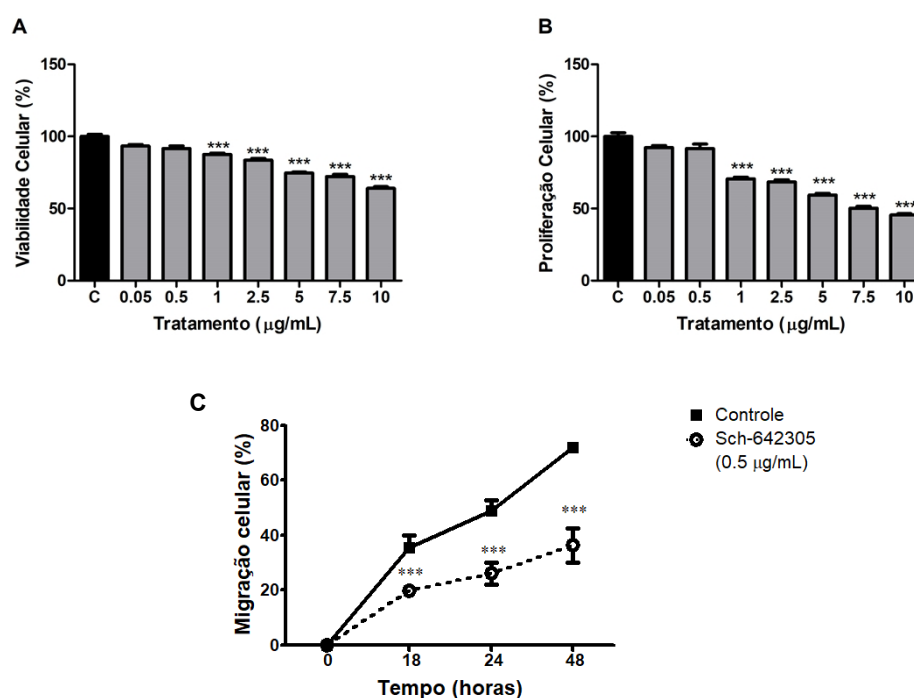


Figura 2. Sch-642305 reduz viabilidade (A), proliferação (B) e migração celular (C) de linhagem de GBM humano U138 após 48 h de tratamento. Células não tratadas foram utilizadas como controle ('C'). Os dados foram expressos como média±erro padrão, analisados por ANOVA seguido de post-hoc de Tukey e considerados significativos quando $P < 0.05$. *** Significativamente diferente do controle ($P < 0,0001$).

4. CONCLUSÕES

O presente estudo consiste no primeiro relato de um fungo endofítico isolado a partir de *A. satoreioides*. Além disso, foi identificado um produto do metabolismo secundário do fungo endofítico isolado, a lactona Sch-642305, a qual foi capaz de reduzir significativamente a proliferação e migração celular de linhagem de GBM humano, sugerindo um elevado potencial dos microrganismos endofíticos na produção de compostos bioativos de interesse farmacológico na terapia anticâncer.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADELIN, E.; SERVY, C.; CORTIAL, S.; LÉVAIQUE, H.; MARTIN, M.; RETAILLEAU, P.; OUAZZANI, J. Isolation, structure elucidation and biological activity of metabolites from Sch-642305-producing endophytic fungus *Phomopsis* sp. CMU-LMA. **Phytochemistry**, v. 72, n. 18, p. 2406-2412, 2011.

CHU, M.; MIERZWA, R.; XU, L.; HE, L.; TERRACCIANO, J.; PATEL, M.; MCPHAIL, A. T. Isolation and Structure Elucidation of Sch 642305, a Novel Bacterial DNA Primase Inhibitor Produced by *Penicillium verrucosum*. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 12, p. 1527-1530, 2003.

CRAGG, G.; PEZZUTO, J. Natural products as a vital source for the discovery of cancer chemotherapeutic and chemopreventive agents. **Medical Principles and Practice**, v. 25, n. Suppl. 2, p. 41-59, 2016.

EISEMANN, T.; COSTA, B.; STRELAU, J.; MITTELBRONN, M.; ANGEL, P.; PETERZIEL, H. An advanced glioma cell invasion assay based on organotypic brain slice cultures. **BMC Cancer**, v. 18, n. 1, p. 103, 2018.

GALVÃO, W.; BRAZ, R.; CANUTO, K.; RIBEIRO, P.; CAMPOS, A.; MOREIRA, A.; GONÇALVES, N. Gastroprotective and anti-inflammatory activities integrated to chemical composition of *Myracrodruon urundeuva* conservationist proposal for the species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 222, p. 177-189, 2018.

KACZMAREK, E.; ERB, L.; KOZIAK, K.; JARZYNA, R.; WINK, M.; GUCKELBERGER, O.; ROBSON, S. Modulation of endothelial cell migration by extracellular nucleotides. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 93, n. 04, p. 735-742, 2005.

LOUIS, D.; PERRY, A.; REIFENBERGER, G.; DEIMLING, A.; BRANGER, D.; CAVENEE, W.; OHGAKI, H.; WIESTLER, O.; KLEIHUES, P.; ELLISON, D. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. **Acta Neuropathologica**, v. 131, n. 6, p. 803-820, 2016.

MACHADO, M. A. B. L. **Isolamento, caracterização e avaliação da atividade antimicrobiana de fungos endofíticos de *Caesalpinia echinata* Lam. (Leguminosae-Caesalpinioideae)**. 2009. 144 f. Tese (Doutorado em Química e Biotecnologia) – Curso de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas.

NISA, H.; KAMILI, A. N.; NAWCHOO, I. A.; SHAFI, S.; SHAMEEM, N.; BANDH, S. A. Fungal endophytes as prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products: A review. **Microbial Pathogenesis**, v. 82, p. 50-59, 2015.

SILVA, A. The regrowth kinetic of the surviving population is independent of acute and chronic responses to temozolomide in glioblastoma cell lines. **Experimental Cell Research**, v. 348, n. 2, p. 177-183, 2016.

SOUZA, P.; BIANCHI, S.; FIGUEIRÓ, F.; HEIMFARTHA, L.; MORESCO, K.; GOLÇALVES, R.; HOPPE, J.; KLEIN, C.; SALBEGO, C.; GELAIN, D.; BASSANI, V.; ZANOTTO, A.; MOREIRA, C. Anticancer activity of flavonoids isolated from *Achyrocline satureioides* in gliomas cell lines. **Toxicology in Vitro**, v. 51, p. 23-33, 2018.