

## FUNGO ENDOFÍTICO DE *Achyrocline satureioides*: IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E ANÁLISE DO EFEITO CITOTÓXICO SOBRE LINHAGEM DE MELANOMA HUMANO

NATHALIA STARK PEDRA<sup>1</sup>; NATÁLIA PONTES BONA<sup>2</sup>; ROBERTO RAMOS SOBRINHO<sup>3</sup>; ELIZANDRA BRAGANHOL<sup>4</sup>; ROSELIA MARIA SPANEVELLO<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – nathaliastark@hotmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – nataliapbona@gmail.com

<sup>3</sup>Universidade de Brasília – ramosrs@email.arizona.edu

<sup>4</sup>Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – ebraganhola@ufcspa.edu.br

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas – rspanevello@gmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

O câncer de pele é o tumor mais frequente na população brasileira e corresponde cerca de 30% das neoplasias malignas registradas no país (INCA, 2020). O melanoma consiste na forma mais agressiva de carcinoma de pele, o qual apresenta elevado potencial para formar metástases e resistência ao tratamento (LEONARDI et al., 2018). Uma vez que a incidência desta neoplasia tem aumentado de forma alarmante em todo o mundo nos últimos anos (CARR et al., 2020), a busca por novas estratégias terapêuticas são essenciais.

Evidências sugerem que plantas medicinais são colonizadas por fungos endofíticos, os quais são capazes de produzir uma variedade de metabólitos com atividade terapêutica representando assim, uma fonte promissora de compostos bioativos (STROBEL; LONG, 1998; JIA et al., 2016). Recentemente descrevemos o isolamento de um fungo endofítico a partir da planta medicinal *Achyrocline satureioides*, cujos compostos apresentaram interessante efeito citotóxico sobre linhagens de glioblastoma (PEDRA et al., 2018).

Diante do potencial citotóxico exibido pelo microrganismo isolado, o presente estudo visou elucidar a taxonomia do fungo endofítico de *A. satureioides* e avaliar o efeito dos metabólitos bioativos sobre a linhagem de melanoma humano (A375).

### 2. METODOLOGIA

#### 2.1 Isolamento e identificação do fungo endofítico de *A. satureioides*

O fungo endofítico foi isolado de caules sadios de *A. satureioides* conforme PEDRA et al (2018). Para a identificação molecular, a extração do DNA genômico do fungo foi realizada de acordo com DOYLE (1990) e a amplificação da região ITS (do inglês, 'Internal Transcribed Spacer') determinada via reação em cadeia da polimerase utilizando os primers ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC). Após, a análise das sequências amplificadas e sequenciadas foram realizadas através da ferramenta BLAST (NCBI).

#### 2.2 Preparação da fração F<sub>DCM</sub> do fungo endofítico de *A. satureioides*

Os micélios do fungo endofítico foram inoculados em meio de cultivo líquido batata-dextrose, mantidos em estufa a 25 °C e luminosidade controlada. Após 25 dias, os compostos produzidos pelo fungo e liberados no meio de cultivo foram extraídos com o solvente orgânico diclorometano e a fase orgânica rotaevaporada a pressão reduzida. Posteriormente, a extração de fase sólida foi realizada utilizando cartucho de fase reversa utilizando metanol 50% conforme descrito por PEDRA et al (2018), resultando na fração F<sub>DCM</sub>.

### 2.3 Cultura de linhagem de melanoma e análise da proliferação celular

A linhagem de melanoma humano (A375) foi cultivada em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). As células foram semeadas em uma densidade de  $5 \times 10^3$  células por poço, mantidas em estufa de CO<sub>2</sub>, a 37 °C e atmosfera umidificada. As culturas foram expostas à F<sub>DCM</sub> em concentrações crescentes de 1 a 20 µg/mL durante 24, 48 e 72 h. Posteriormente, a proliferação celular foi avaliada pela coloração de proteínas celulares através do reagente Sulforodamida B. Células não tratadas foram utilizadas como controle.

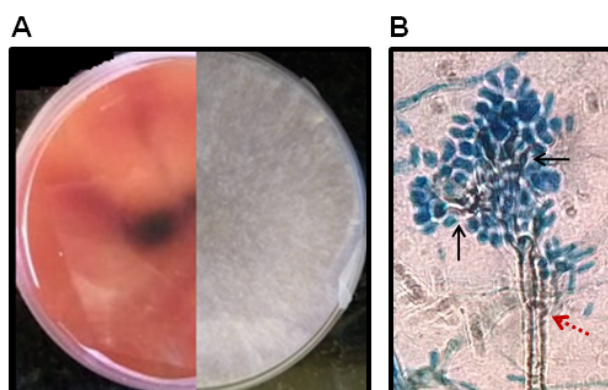
### 2.4 Análise estatística

Os dados foram expressos como média ± 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

O fungo endofítico isolado de *A. saturoioides* é caracterizado por colônias filamentosas de coloração branca com superfície algodoada e reverso marrom-avermelhado (Figura 1A), possuindo hifas hialinas e septadas que ramificam-se em fiálides cilíndricas com conídios unicelulares nas extremidades dos ramos, conforme descrito por PEDRA et al. (2018) (Figura 1B). Entretanto, devido a dificuldade de caracterização das estruturas reprodutivas, o microrganismo não pôde ser identificado com base em seus aspectos morfológicos.

Neste contexto, para identificar a taxonomia no fungo endofítico de *A. saturoioides*, a região ITS do DNA foi amplificada e sequenciada. Com base nos dados moleculares obtidos, o fungo endofítico de *A. saturoioides* foi identificado como *Biscogniauxia* sp., uma vez que a sequência de nucleotídeos exibiu 99% de similaridade com fungos pertencentes a este gênero (GenBank: KP306931; FJ884075).



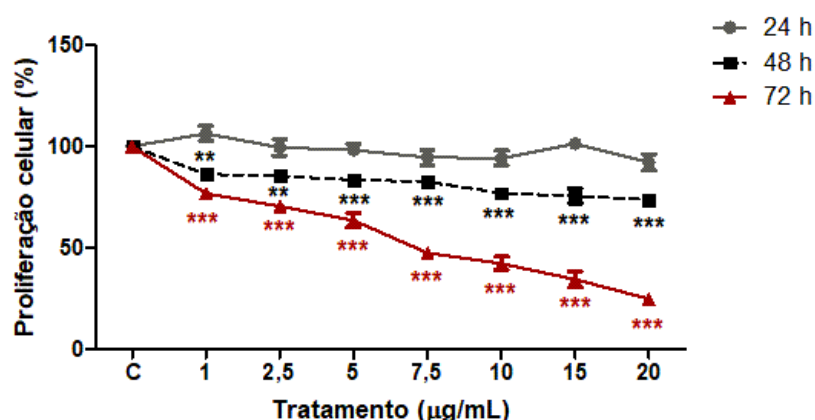
**Figura 1.** Fungo endofítico isolado de *A. saturoioides*. (A) Colônia de coloração branca algodoada e reverso marrom-avermelhado. (B) Estrutura microscópica (40x) demonstrando hifas hialinas septadas (seta pontilhada vermelha), fiálides cilíndricas (seta preta) e conídios unicelulares (corados em azul).

Membros do gênero *Biscogniauxia* sp. compreendem fungos ascomicetos da família Xylareaceae (LIU et al., 2019) e são encontrados naturalmente em espécies de *Cinnamomum* sp. (CHENG et al., 2012), *Equinacea* sp. (CARVALHO et al., 2016) e *Dendrobium* sp. (MA et al., 2020). No entanto, este consiste no

primeiro estudo descrevendo a ocorrência deste fungo endofítico em espécies de *A. satoreioides*.

No presente estudo verificamos ainda que os compostos provenientes do metabolismo secundário de *Biscogniauxia* sp. exibiram efeito citotóxico de maneira tempo e concentração dependente (Figura 2). A fração F<sub>DCM</sub> (concentração de 20 µg/mL) reduziu a proliferação das células de melanoma em cerca de 30% e 75% após 48 e 72 h de tratamento, respectivamente, quando comparado ao controle.

Os efeitos citotóxicos de compostos produzidos por espécies de *Biscogniauxia* tem sido documentados em diversas linhagens tumorais humana, como câncer de cólon (SW80), câncer cervical (HeLa), adenocarcinoma de pulmão (A549) e leucemia mielogênica (K562) (ZHAO et al., 2016; MA et al., 2020). Entre os metabólitos bioativos relacionados com tais efeitos destacam-se os compostos pertencentes à classe das azafilonas, meleínas, meroterpenoides e sesquiterpenos (CARVALHO et al., 2016; ZHAO et al., 2016; LIU et al., 2019). Diante do exposto, pode-se inferir que a *A. satoreioides* hospeda um fungo endofítico capaz de produzir compostos com propriedades antitumorais.



**Figura 2.** Análise do efeito antiproliferativo de fração F<sub>DCM</sub> de *Biscogniauxia* sp. sobre linhagem de melanoma humano A375 após 24, 48 e 72 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 ( $P < 0,001$  e  $P < 0,0001$ , respectivamente).

#### 4. CONCLUSÕES

O presente estudo consiste no primeiro relato descrevendo *Biscogniauxia* sp. como um fungo endofítico de *A. satoreioides*. Além disso, verificamos que os metabólitos produzidos pelo *Biscogniauxia* sp. foi capaz de reduzir significativamente a proliferação celular da linhagem de melanoma humano, sugerindo um elevado potencial dos microrganismos endofíticos na produção de compostos bioativos de interesse farmacológico na terapia anticâncer.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CARR, S.; SMITH, C.; WERNBERG, J. Epidemiology and risk factors of melanoma. **Surgical Clinics**, v. 100, n. 1, p. 1-12, 2020.

CARVALHO, C.; WEDGE, D.; CANTRELL, C.; SILVA-HUGHES, A.; PAN, Z.; MORAES, R.; MADDOXX, V.; ROSA, L. Molecular phylogeny, diversity, and bioprospecting of endophytic fungi associated with wild ethnomedicinal North American plant *Echinacea purpurea* (Asteraceae). **Chemistry & Biodiversity**, v. 13, n. 7, p. 918-930, 2016.

CHENG, M.; WU, M.; YANAI, H.; SU, Y.; CHEN, I.; YUAN, G.; HSIEH, S.; CHEN, J. Secondary metabolites from the endophytic fungus *Biscogniauxia formosana* and their antimycobacterial activity. **Phytochemistry Letters**, v. 5, n. 3, p. 467-472, 2012.

DOYLE, J. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, n. 1, p. 13-15, 1990.

INCA. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil, Rio de Janeiro, p. 51, 2021. Acessado em 06 de ago. 2021. Online. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>

JIA, M.; CHEN, L.; XIN, H.; ZHENG, C.; RAHMAN, K.; HAN, T.; QIN, L. P. Friendly relationship between endophytic fungi and medicinal plants: a systematic review. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 1, p. 1-14, 2016.

LEONARDI, G.; FALZONE, L.; SALEMI, R.; ZHANGÍ, A.; SPANDIDOS, D.; MCCUBREY, J.; LIBRA, M. Cutaneous melanoma: From pathogenesis to therapy. **International Journal of Oncology**, v. 52, n. 4, p. 1071-1080, 2018.

LIU, Y.; ZHAP, H.; XIE, J.; ZOU, J.; HU, D.; GUO, L.; CHEN, G.; YAO, X.; GAO, H. New phthalide derivatives from the *Biscogniauxia* sp. and their activities. **Fitoterapia**, v. 137, n. 1, p. 104184, 2019.

MA, X.; NONTACHAYYAPOOM, S.; HYDE, K.; JEEWON, R.; DOILOM, M.; CHOMNUNTI, P.; KANG, J. *Biscogniauxia dendrobii* sp. nov. and *B. petrensis* from *Dendrobium orchids* and the first report of cytotoxicity (towards A549 and K562) of *B. petrensis* (MFLUCC 14-0151) in vitro. **South African Journal of Botany**, v. 134, n. 1, p. 382-393, 2020.

PEDRA, N.; GALDINO, K.; DA SILVA, D.; RAMOS, P.; BONA, N.; SOARES, M.; AZAMBUJA, J.; CANUTO, K.; DE BRITO, E.; RIBEIRO, P.; SOUZA, A.; CUNICO, W.; STEFANELLO, F.; SPANEVELLO, R.; BRAGANHOL, E. Endophytic fungus isolated from *Achyrocline satureioides* exhibits selective antiglioma activity - The role of Sch-642305. **Frontiers in Oncology**, v. 8, n. 1, p. 476, 2018.

STROBEL, G.; LONG, D. Endophytic microbes embody pharmaceutical potential. **ASM News**, v. 64, n. 5, p. 263-268, 1998.

ZHAO, H.; CHEN, G.; ZOU, J.; HE, R.; QIN, S.; HU, D.; LI, G.; YAO, X.; GAO, H. Dimericbiscognienyne A: a meroterpenoid dimer from *Biscogniauxia* sp. with new skeleton and its activity. **Organic Letters**, v. 19, n. 1, p. 38-41, 2017.