

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS (PPGCF)**

IZA MIRELA RODINI GARCIA PRINCIVAL

**ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO DO
POTENCIAL ANTINEOPLÁSICO DA NIGERICINA, PRODUZIDA POR
Streptomyces hygrosopicus ACTMS-9H**

**Recife
2020**

IZA MIRELA RODINI GARCIA PRINCIVAL

**ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO DO
POTENCIAL ANTINEOPLÁSICO DA NIGERICINA, PRODUZIDA POR
Streptomyces hygrosopicus ACTMS-9H**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Farmácia.

Área de concentração: Fármacos e Medicamentos

Orientador: Profa. Teresinha Gonçalves da Silva

**Recife
2020**

Catálogo na fonte:
Bibliotecário: Aécio Oberdam, CRB4: 1895

P957i Príncival, Iza Mirela Rodini Garcia.
Isolamento, Identificação estrutural e avaliação do potencial antineoplásico da nigericina, produzida por *Streptomyces hygroscopicus* ACTMS-9H / Iza Mirela Rodini Garcia Príncival – 2020.
120 p.

Orientadora: Teresinha Gonçalves da Silva
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2020.
Inclui referências e anexos.

1. Nigericina. 2. *Streptomyces*. 3. Câncer. Silva, Teresinha Gonçalves da (orientadora). II. Título.

615 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2023 - 278)

IZA MIRELA RODINI GARCIA PRINCIVAL

**ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO DO
POTENCIAL ANTINEOPLÁSICO DA NIGERICINA, PRODUZIDA POR
Streptomyces hygroscopicus ACTMS-9H**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Farmácia. Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos

**COMISSÃO
EXAMINADORA**

Aprovada em 18/12/2020

TITULARES

Profa. Dra. Teresinha Gonçalves da Silva
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Fernando Halwass
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. José Augusto Ferreira Perez Villar
Universidade Federal de São João del-Rei

Profa. Dra. Gardenia Carmen Gadelha Militão
Universidade Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Maria Bernadete de Souza
Universidade Universidade Federal de Pernambuco

**Recife
2020**

*Para meu marido, Jefferson
Que sem exitar se dedicou e me apoiou
nesses 9 anos de pós-graduação.*

*Para meu filho, Theo
Que foi gerado, nasceu e cresceu junto
com este trabalho.*

*Para mim, Iza Mirela
Que saiu de uma faculdade privada,
percorreu o mundo corporativo e depois
chegou ao maior título concedido de uma
pós-graduação aos 40 anos.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço minha Orientadora/Professora Dra. Teresinha Gonçalves pela oportunidade concedida para desenvolver projetos de pesquisa em seu laboratório, mesmo quando não era sua aluna. Este trabalho só foi concluído graças a sua compreensão pelo meu tempo dividido entre maternar e trabalhar. Todo este período foi, sem dúvidas, bastante enriquecedor em diversos aspectos da minha vida. Muito obrigado!

Gostaria de agradecer a minha coorientadora Dra. Maria do Desterro Rodrigues, que além de me ensinar técnicas no laboratório se tornou uma grande amiga, sempre houve muita troca tanto cientificamente quanto nos aspectos da vida. Sentirei muita falta dos nossos cafés.

Gostaria de Agradecer a todos os integrantes do Laboratório Biofarmatox, que não só dividimos o dia a dia como também de alguma forma todos colaboraram em este trabalho.

Gostaria de agradecer a Universidade Federal de Pernambuco pelos 9 anos de casa e a ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pelo seu esforço em formar profissionais preparados.

Gostaria de Agradecer aos secretários do PPGCF, Nerilin e Rilvan. Por sempre estarem ao lado dos alunos, prestando todo o apoio e providências necessárias.

Gostaria de Agradecer aos Colaboradores deste trabalho, que sem esta união de conhecimentos não seria possível concluir este trabalho:

Ao Professor Pascal Marchand, grupo de pesquisa IICimed – Um, Nantes França.

Ao Professor Alberto Wisniewski Jr., e aluno Jhonattas Carvalho Carregosa do grupo de pesquisa Petróleo e Energia de Biomassas – PEB (UFS).

Ao Professor Fernando Halwass e aluno Jose Adonias Alves Franca do grupo de pesquisa Laboratório Nmrdev (UFPE).

A Professora Patricia Maria Guedes Paiva do do grupo de pesquisa Laboratório Bioprot (UFPE).

A Professora Christina Alves Peixoto e aluna Karina Lidianne Alcântara Saraiva do grupo de pesquisa Laboratório de Ultraestrutura (Fiocruz - PE).

Ao Professor Jefferson Luiz Princival e aluno Emmanuel Dias da Silva do grupo de pesquisa Laboratorio de Catalise Organica (UFPE).

Ao professor Marcelo Zaldini Hernandez e aluno Luiz Felipe Gomes Rebelo Ferreira do grupo de pesquisa Laboratório LQTN (UFPE).

Gostaria de agradecer aos alunos que me apoiaram e aos que colaboraram com este trabalho em especial Caio César Oliveira Lucena, Dayane Correia Gomes, Sandrine Maria de Arruda Lima e Dartagnan de Sá Pires.

Gostaria de agradecer ao órgão de fomento FACEPE pelo apoio financeiro e à bolsa de estudos concedida.

E por fim, gratidão aos meus pais por me darem o melhor presente da vida que é a educação. Aos meus irmãos que são exemplos de profissionais capacitados e sucedidos. A minha amiga Juliana Souza, que sempre me incentivou e que admiro profissionalmente. Ao meu marido, Jefferson que me mostrou este universo científico, que foi minha inspiração, admiração e o maior apoio que já recebi em toda minha vida, sem ele eu não teria chegado até aqui.

Muito obrigada!

Iza Mirela

RESUMO

O Câncer é um grande problema de saúde pública mundial. Neste sentido, este trabalho apresenta o isolamento, caracterização, avaliação da atividade anticâncer e possíveis modos de ação da nigericina produzida por *Streptomyces hygroscopicus* ACTMS-9H. A nigericina foi obtida em uma proporção de 30% (m/m), a partir de um extrato pré-purificado denominado EB1 e teve sua atividade neoplásica avaliada empregando diferentes linhagens de células tumorais. Os resultados destes ensaios, obtidos pelo método do MTT, mostraram excelentes resultados para células de adenocarcinoma mamário MCF 7 ($CI_{50} = 0,11 \mu\text{M}$), carcinoma mucoepidermóide pulmonar NCIH 292 ($CI_{50} = 0,04 \mu\text{M}$), fibroblastos murino L929 ($CI_{50} = 0,3 \mu\text{M}$), leucemia promielocítica aguda HL 60 ($CI_{50} = 0,001 \mu\text{M}$) mastocitoma de camundongo P 815 ($CI_{50} = 0,01 \mu\text{M}$), células do carcinoma de cólon HCT 116 ($CI_{50} = 0,01 \mu\text{M}$), além de $CI_{50} = 0.041 \mu\text{M}$, em células mononucleares do sangue periférico humano PBMC. Por se tratar de um modelo humano, apresentar resultados de relevância e existir poucos dados na literatura, células HCT 116 foram escolhidas para realizar ensaios de morte celular e mecanismo de ação. Analisando dados de microscopia óptica, onde diversas alterações morfológicas foram constatadas, os resultados corroboram com os ensaios bioquímicos, que indica que o ácido livre de Nigericina induz morte celular por apoptose e autofagia. Por fim, ensaios envolvendo quinases mostraram bons resultados de CI_{50} para: CDK9 ($36,12\mu\text{M}$); JAK3 ($8,82\mu\text{M}$); CK1 ϵ ($23,03\mu\text{M}$); GSK3 β ($5,38\mu\text{M}$); ABL1 ($14.73\mu\text{M}$). Por apresentar boa atividade frente às quinases JAK3 e GSK3, simulações computacionais foram realizadas, mostrando importantes interações da nigericina no sítio ativo destas enzimas. Para o alvo JAK3, por exemplo, a nigericina foi capaz de realizar três ligações de hidrogênio, com distâncias de 2,8Å (GLN827); 2,9Å (IYS830) e 2,7Å (ARG953). Já para o modelo GSK3, outras três ligações de hidrogênio, com distâncias de 3,3Å (VAL61); e 3,2Å e 3,4Å, com o mesmo resíduo de aminoácido (ambos com ASP200), foram observadas. Apesar de ser um estudo preliminar, essas interações em JAK-3 e GSK3- β sugerem morte por autofagia.

Palavras-chave: nigericina; *streptomyces*; câncer.

ABSTRACT

Cancer is a major public health problem worldwide. In this sense, this work presents the isolation, characterization, evaluation of anticancer activity and possible modes of action of nigericin produced by *Streptomyces hygroscopicus* ACTMS-9H. Nigericin was obtained in a proportion of 30% (w / w), from a pre-purified extract called EB1 and had its neoplastic activity evaluated using different tumor cell lines. The results from these tests, obtained by the MTT method, showed excellent results for MCF 7 mammary adenocarcinoma cells ($IC_{50} = 0.11 \mu\text{M}$), pulmonary mucoepidermoid carcinoma NCIH 292 ($IC_{50} = 0.04 \mu\text{M}$), murine L929 fibroblasts ($IC_{50} = 0.3 \mu\text{M}$), acute promyelocytic leukemia HL 60 ($IC_{50} = 0.001 \mu\text{M}$) mouse mastocytoma P 815 ($IC_{50} = 0.01 \mu\text{M}$), colon carcinoma cells HCT 116 ($IC_{50} = 0.01 \mu\text{M}$), in addition to $IC_{50} = 0.041 \mu\text{M}$, for human peripheral blood mononuclear cells PBMC. For being a human model, show relevant results and possess few data in the literature, HCT 116 cells were chosen to perform tests of cell death and mechanism of action. Analyzing optical microscopy data, where several morphological changes were found, the results corroborate with the biochemical tests, which indicates the free acid of Nigericin induces cell death by apoptosis and autophagy. Finally, kinases assays showed good IC_{50} results for: CDK9 ($36.12\mu\text{M}$); JAK3 ($8.82\mu\text{M}$); CK1 ϵ ($23.03\mu\text{M}$); GSK3 β ($5.38\mu\text{M}$); GLA1 ($14.73\mu\text{M}$). For presenting good activity against the JAK3 and GSK3 kinases, computer simulations were performed, where was possible observe important interactions of nigericin in the active site of these enzymes. For the target JAK3, for example, nigericin was able to make three hydrogen bonds, with distances of 2.8\AA (GLN827); 2.9\AA (IYS830) and 2.7\AA (ARG953). For the GSK3 model, three other hydrogen bonds, with distances of 3.3\AA (VAL61); and 3.2\AA and 3.4\AA , with the same amino acid residue (both with ASP200), were observed. Despite being a preliminary study, these interactions in JAK-3 and GSK3- β suggest death by autophagy.

Keywords: nigericin; *streptomyces*; cancer.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Bleomicina e análogos.....	25
Figura 2 - Epotilona e análogos	26
Figura 3 - Despeptideos com atividade antineoplásica	28
Figura 4 - Ciclo de vida de <i>Streptomyces</i>	30
Figura 5 - Evolução das drogas anticâncer produzidas por <i>Streptomyces</i>	32
Figura 6 - Actinomicina D, também conhecida como Dactinomicina.....	33
Figura 7 - Mitomicinas produzidas por <i>Streptomyces lavendulae</i>	34
Figura 8 - Exemplos de macrolactamas com ação citotóxica.....	35
Figura 9 - Antraciclinas produzidas por <i>Streptomyces peucetius</i>	37
Figura 10 - Tetraciclinas bioativas	38
Figura 11- Ionóforos bioativos.....	40
Figura 12 - Transporte por ionóforos.	41
Figura 13 - Incidência e mortalidade do câncer.	43
Figura 14 - (a) Ciclo de vida celular (b) ciclo das células cancerosas adormecidas.	47
Figura 15 - Tipos de morte celular.	50
Figura 16 - Morte celular por apoptose.	51
Figura 17 - Morte celular por autofagia	53
Figura 18 - Morte celular por Necrose.....	54
Figura 19 - Fluxograma da obtenção de <i>Streptomyces sp.</i> UFPEDA 3370.	64
Figura 20 - Da esquerda para a direita elaiofilina (padrão) e a fração EB1.	72
Figura 21 - Padrão de massa obtido da fórmula molecular $C_{40}H_{68}O_{11}Na$	73
Figura 22 - Estiramentos do padrão espectral da Nigericina por I.V.....	74
Figura 23 - Conversão do MTT em formazan.	77
Figura 24 - Efeito da nigericina sobre as células de cólon humano após 48 h.	83

Figura 25 - MEV das células HCT 116 tratadas com nigericina.....	85
Figura 26 - Interação da nigericina com GLN827, LYS830 e ARG953.....	88
Figura 27 - Interação da nigericina com VAL61, e dois ASP200.	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Medicamentos anticâncer derivados de produtos naturais	20
Tabela 2 - Incidência estimada conforme a localização primária do tumor.....	56
Tabela 3 - Linhagens de células de câncer utilizadas.....	63
Tabela 4 - Comparação de sinais por RMN da Nigericina com dados da literatura.	75
Tabela 5 - Ensaio de citotoxicidade da nigericina (25 µg/mL) por MTT após 72 h ..	78
Tabela 6 - Ensaios de CI50 e valores calculados de Índice de Seletividade.	79
Tabela 7 - Atividade da nigericina frente a proteínas quinases.....	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

OMS	Organização Mundial da Saúde
USDA	Departamento de Agricultura dos Estados Unidos
HTS	<i>-High-Throughput Screening</i>
ABTS	2,2- azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
TGI	Concentração inibitória total
DE ₅₀	Dose responsável pela metade da resposta de eficácia
CI ₅₀	Concentração que inibe 50% do crescimento celular
CMI	Concentração Mínima Inibitória
DL ₅₀	Dose letal mediana responsável por 50% de morte celular
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
IAPs	Inibidores de apoptose
IC 95%	Intervalo de confiança de 95%
INCA/ NCI	Instituto Nacional do Câncer / <i>National Cancer Institute</i>
µg/mL	concentração em microgramas por mililitro
nM	concentração em nanomol por litro
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i> / Células mononucleares de sangue periférico
PBS	<i>Phosphate Buffer Solution</i> / Solução tampão fosfato
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> / Reação em cadeia da polimerase
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H tetrazólio
Formazan	1-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-3,5-difenilformazan

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1	PRODUTOS NATURAIS COMO AGENTES ANTICÂNCER.....	18
2.1.1	Produtos naturais anticâncer de organismos do solo.....	21
2.1.1.1	Principais metabólitos secundários de origem microbiana.....	21
2.1.1.2	Bactérias.....	23
2.1.1.3	Streptomyces.....	29
2.1.1.3.1	<i>Metabólitos secundários de streptomyces.....</i>	<i>31</i>
2.2	NIGERICINA.....	39
2.3	CARACTERÍSTICAS DO CÂNCER.....	42
2.4	VIAS DE MORTE CELULAR.....	48
2.4.1	Tipos de morte celular.....	50
2.4.2	Tratamento do cancer.....	56
3	OBJETIVOS.....	60
3.1	OBJETIVO GERAL.....	60
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	60
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	61
4.1	MATERIAIS E SOFTWARES UTILIZADOS.....	61
4.1.1	Equipamentos.....	61
4.1.2	Reagentes e solvents.....	61
4.1.3	Análise estatística.....	62
4.2	CÉLULAS.....	63
4.3	METODOLOGIA.....	64
4.3.1	Extrato eb1 de streptomyces sp. ufpeda 3370.....	64
4.3.2	Obtenção da nigericina por purificação da fração eb1.....	65
4.3.2	Purificação da elaiofilina da fração EB1.....	65
4.3.3	Atividade antiproliferative.....	66
4.3.3.1	Células tumorais.....	66
4.3.3.1.1	<i>Avaliação da ativiade citotóxica da nigericina (concentração única).....</i>	<i>66</i>
4.3.3.1.2	<i>Determinação da ci50 frente a células hct 116.....</i>	<i>66</i>

4.3.3.2	Isolamento de células pbmcs.....	67
4.3.3.2.1	<i>Avaliação da nigericina contra células pbmc em concentração única.....</i>	68
4.3.3.2.2	<i>Avaliação da nigericina contra viabilidade celular de pbmc.....</i>	68
4.3.3.2.3	<i>Ensaio de morte celular por anexina /iodeto de propídio.....</i>	69
4.3.4.3	Microscopia eletrônica de transmissão.....	69
4.3.4.4	Ensaio de inibição de quinase.....	69
4.3.5	Estudo <i>in silico</i>.....	70
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	72
5.1	PURIFICAÇÃO DA NIGERICINA A PARTIR DO EXTRATO EB1.....	72
5.2	ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DA NIGERICINA COMO ÁCIDO LIVRE...73	73
5.3	ENSAIO DE CITOTOXICIDADE.....	76
5.4	DETECÇÃO DE APOPTOSE POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	82
5.5	ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL.....	84
5.6	ENSAIOS DE INIBIÇÃO DE QUINASE.....	86
5.7	MODELAGEM MOLECULAR.....	87
6	CONCLUSÃO.....	90
	REFERÊNCIAS.....	91
	ANEXO A - AMPLIAÇÃO ESI(+)-FTMS ENTRE 720 E 730 M/Z.....	113
	ANEXO B - AMPLIAÇÃO ESI(+)-FTMS ENTRE 740 E 750 M/Z.....	114
	ANEXO C - RMN 1H COM AMPLIAÇÃO DA FAIXA 0,5 E 7,5 PPM.....	115
	ANEXO D - RMN 13C COM AMPLIAÇÃO DA FAIXA 5 E 190 PPM.....	116
	ANEXO E - RMN COSY HH.....	117
	ANEXO F - RMN NOESY.....	118
	ANEXO G - RMN HSQC CH (FOLDADO).....	119
	ANEXO H - RMN HMBC.....	120

1 INTRODUÇÃO

A cada ano, milhões de vidas são perdidas por motivo de doenças. Dentre as principais, destacam-se as morbidades cardíacas coronárias, doenças cerebrovasculares, infecções respiratórias (atualmente o mundo está sob a pandemia do vírus SARS-CoV-2)¹, doença pulmonar obstrutiva crônica, doenças diarreicas, AIDS, tuberculose e câncer.

O câncer é uma doença complexa de característica genética, que altera a expressão de proteínas regulatórias importantes. As mutações envolvendo oncogênese podem ocorrer por vários tipos de mecanismos, onde as alterações moleculares envolvidas na carcinogênese humana e os mecanismos pelos quais as funções celulares podem ser alteradas são muito diversas.² Essa enfermidade constitui um grupo de mais de 100 doenças, onde os estágios do desenvolvimento do tumor maligno ocorre pela divisão descontrolada das células de um determinado tecido. Assim, o tumor começa a se desenvolver quando uma célula sofre mutações que as tornam mais susceptível de se dividir do que normalmente faria.³ Com essas mutações, as células podem escapar do seu local de origem e estabelecer novos tumores em diferentes locais do corpo (metástase) ao longo do tempo.

Dentre as alternativas de combate ao câncer, o uso de medicamentos derivados de produtos naturais tem sido uma opção muito empregada, visto que substâncias naturais são uma fonte inesgotável de agentes medicinais com múltiplas estruturas químicas e grande potencial terapêutico. Essas substâncias naturais, com variadas atividades biológicas, vêm sendo eficientemente empregadas como antimicrobianos, imunossuppressores, agentes anti-inflamatórios e anticâncer. Por isso, muitos exemplos de metabólitos secundários produzidos por organismos vivos como bactérias, fungos e plantas vêm sendo alvo de interesse da indústria farmacêutica.

Atualmente, a descoberta de drogas a partir de organismos vivos, se baseia, principalmente, em métodos de triagem de bioatividade e isolamento de moléculas bioativas⁴. Destas triagens, compostos que apresentem potencial propriedade bioquímica costumam servir como alvos moleculares, e sua estrutura química usada como ponto de partida para modificações químicas. Esse método tem permitido descobrir moléculas mais seletivas, menos tóxicas e de grande potencial terapêutico. Além disso, as porções farmacologicamente ativas podem possuir semelhanças

estruturais com moléculas já descritas, o que pode facilitar a previsão no desenvolvimento de drogas com grande potencial clínico.

Além da triagem de alto rendimento (*High-Throughput Screening-HTS*), outras formas desenvolvidas de *screening*, como programas químicos que podem ajudar a identificar a interação entre as moléculas e o alvo da droga, podem ser executados para aprimorar e melhorar a potência, a seletividade e as propriedades físico-químicas das moléculas estudadas. Essa série de atividades, voltadas ao desenvolvimento de um novo medicamento desde a ideia original até a fase clínica e posterior comercialização, é um processo complexo que pode levar de 12 a 15 anos e custar mais de 1 bilhão de dólares⁵.

Com isso, várias classes de metabólitos secundários, têm sido estudadas como agentes importantes para o tratamento de uma variedade de doenças cancerígenas. Como exemplo de substâncias empregadas com sucesso, pode-se citar a vinblastina, vincristina, camptotecina, podofilotoxina, paclitaxel, doxorubicina e alguns de seus derivados.

Embora vários produtos naturais tenham sido identificados para esse fim, a obtenção de quantidades substanciais destas substâncias isoladas de extratos brutos que apresenta atividade citotóxica ainda é um fator determinante. Com isso, o uso de modelos de triagem de citotoxicidade continua fornecendo dados preliminares de grande relevância na busca de extratos bioativos com potencial aplicação antineoplásica⁶.

Pesquisas voltadas ao estudo de organismos vivos representam um recurso de grande potencial para a descoberta de substâncias de interesse em saúde, pois esses são capazes de produzir variadas classes de compostos e bioatividades.⁷ Dentre os principais organismos de origem em solo estudados, e que são responsáveis pela maior parte da produção de produtos naturais de interesse acadêmico e industrial, pode-se citar as bactérias.

Dentre as bactérias que constituem o domínio dos micro-organismos ou micróbios procariontes, *Streptomyces* é o maior gênero da família *Streptomycetaceae*.⁸ Esses Actinomicetos são um grupo especial de bactérias filamentosas, que incluem cerca de 800 espécies catalogadas (<https://lpsn.dsmz.de/genus/streptomyces>). Essas bactérias filamentosas produzem uma grande variedade de metabólitos de interesse em saúde, incluindo antivirais, antibióticos, antifúngicos, anticâncer, antioxidantes e compostos neuroprotetores.⁹ É

importante salientar, que cerca de 70% dos antibióticos utilizados na medicina são originalmente derivados de actinobactérias,¹⁰ dos quais mais de 10.000 desses medicamentos são derivados do gênero *Streptomyces*¹¹. Por esse motivo, esforços vêm sendo feitos para se explorar, de forma eficiente, o grande potencial de *Streptomyces*, mais especificamente na descoberta de novos medicamentos que se apresentem com alta eficácia e menores efeitos colaterais.

Uma fonte importante de metabólitos secundários bioativos é a bactéria filamentosa *Streptomyces hygroscopicus*. Essas espécies pertencem a um dos gêneros mais intensamente estudados de *Streptomyces* e são conhecidas fontes de substâncias de grande interesse industrial¹². Exemplos são as substâncias rapamicina¹³ e ascomicina¹⁴. Este último também é usado para tratar doenças autoimunes e pode impedir a rejeição após um transplante de órgão. Atualmente, este composto está sendo produzido biotecnologicamente a partir de *Streptomyces hygroscopicus*¹⁵.

Considerando que *Streptomyces sp.* são uma fonte valiosa de metabólitos bioativos, fornecendo inclusive substâncias empregadas no combate a diversos tipos de câncer, a exploração e o estudo da sua capacidade em fornecer substâncias envolvidas em importantes processos bioquímicos se justifica.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PRODUTOS NATURAIS COMO AGENTES ANTICÂNCER

O papel dos produtos naturais como fonte de remédios formou a base dos sistemas de medicina tradicional e são usados há séculos por diferentes culturas¹⁶. Com isso, um grande número de compostos isolados de fontes naturais com efeitos terapêuticos benéficos, como propriedades anticancerígenas, imunomodulatórias e anti-inflamatórias foram identificados¹⁷.

A natureza é uma fonte inesgotável de substâncias para fins terapêuticos, onde os organismos vivos presentes no solo merecem destaque. Os medicamentos derivados destes organismos constituem a maior parte dos agentes quimioterapêuticos usados no combate à vários tipos de câncer¹⁸. Além disso, cerca de 80% dos medicamentos quimioterápicos aprovados¹⁹, e mais da metade de todos os medicamentos são baseados em produtos naturais²⁰.

Ao passo que centenas de substâncias podem ser produzidas por um único organismo, uma enorme diversidade química pode ser encontrada devido a existência de milhões de espécies. Por isso, a natureza continua sendo a principal fonte de moléculas devido à diversidade de plantas, animais, e espécies de micro-organismos. Assim, pesquisas na tentativa de se explorar a natureza em busca de novas substâncias com potencial atividade anticâncer ou que melhorem sua ação, são alvo de estudos de cientistas de diversas áreas do conhecimento.

Um número significativo de metabólitos secundários produzidos por diferentes tipos de organismos vivos pode ser encontrado como potentes agentes antitumorais tanto no crescimento de células tumorais (*in vitro*) quanto em ensaios clínicos de câncer¹⁹. O avanço biotecnológico voltado às pesquisas em produtos naturais tem aumentado a descoberta destes agentes, além de estar diretamente ligado ao reconhecimento de moléculas protótipos que possibilitam o planejamento de novas drogas sintéticas. Com o câncer sendo uma das doenças mais mortais do mundo, com perspectivas crescentes para as próximas décadas (devido ao envelhecimento da população), um aumento no interesse científico e comercial para a descoberta de novos agentes anticâncer de fontes naturais deve acontecer.

Historicamente, os programas de descoberta de drogas com atividade contra o câncer começaram a partir da Segunda Guerra Mundial, e os efeitos

das drogas descobertas deram o impulso para estabelecer, em 1955, o Centro Nacional de Serviços de Quimioterapia contra o Câncer. Com isso, a capacidade da quimioterapia para curar a leucemia aguda na infância, e a doença de Hodgkin na década de 1960 e no início da década de 1970, superaram a desconfiança sobre a capacidade dos medicamentos naturais em tratar esse tipo de doença²¹.

O potencial do uso de produtos naturais como agentes antineoplásicos foi reconhecido na década de 1950, e desde então, vários estudos forneceram informações valiosas sobre a descoberta de novos agentes antineoplásicos que ocorrem naturalmente. Além disso, com o desenvolvimento de novas tecnologias de triagem, a pesquisa por novos agentes anticâncer em plantas e outros organismos, levaram a obtenção de medicamentos originários de produtos naturais, ou baseados nele, aprovados para comercialização a partir de 1950²². Pelo levantamento realizado entre janeiro de 1981 e dezembro de 2014 (34 anos), 174 novas substâncias para o tratamento do câncer foram aprovadas para comercialização. Destas, 56 (32%) eram produtos naturais não modificados ou derivados diretos e 37 (21%) inspirados em estruturas químicas de produtos naturais. Assim, um total de 93 (53%) são produtos naturais ou derivados diretamente ou com base neles²³.

A maioria das descobertas de drogas a partir de fontes naturais deriva de plantas, e se baseia, principalmente, em métodos de triagem de bioatividade e isolamento de molécula bioativa²⁴. As principais classes de metabólitos secundários são os alcaloides, terpenoides, esteroides, flavonoides e saponinas, que são classe de substâncias importantes empregadas no tratamento de uma variedade de tipos de câncer²⁵. Por exemplo, fitoquímicos como vinblastina, vincristina, camptotecina, podofilotoxina, paclitaxel, homoharringtonina e alguns de seus derivados, são alguns dos medicamentos anticâncerígenos aprovados e usados clinicamente de forma isolada ou em combinação com outros agentes quimioterápicos²⁶. A Tabela 1 a seguir mostra alguns exemplos de agentes derivados de fontes naturais, que se apresentam como potentes agentes antitumorais tanto no crescimento de células tumorais *in vitro* quanto em ensaios clínicos²⁷.

Tabela 1. Medicamentos anticâncer derivados de produtos naturais *

Micro-organismos	ORIGEM	
	Plantas	Organismos Marinhos
Composto (Tipo de Câncer)	Composto (Tipo de Câncer)	Composto (Tipo de Câncer)
Actinomicina (Sarcoma)	Vincristina (Leucemia, Linfoma, Mama, Pulmão)	Citarabina (Leucemia, linfoma)
Bleomicina (Colo do útero, cabeça e pescoço)	Vinblastina (Mama, Linfoma, Rim)	Bryostatina (Experimental)
Daunomicina (Leucemia)	Paclitaxel (Ovário, Mama, Pulmão, Bexiga, Cabeça e pescoço)	Dolastatina (Experimental)
Doxorrubicina (Linfoma, Mama, ovário, pulmão, sarcoma)	Topotecano (Ovário, Pulmão)	Ecteinascidin (Experimental)
Epirubicina (Mama)	Irinotecano (Colorretal, Pulmão)	Aplidine (Experimental)
Idarubicina (Mama, leukemia)	Flavopiridol (Pulmão)	Halicondrina B (Experimental)
Mitomomicina C (Gástrico, colorretal, pulmão)	Acronicilina (Experimental)	Discodermolide (Experimental)
Streptozocina (Gástrico, endócrino)	Bruceantin (Leucemia, Linfoma, Mieloma ²⁸)	Criptoficina (Experimental)
Wortmanina (Experimental)	Thalicarpin (Experimental)	
Rapamicina (Experimental)	Omacetaxina (Leucemia mielóide)	
Geldanamicina (Experimental)		

Fonte: Adaptado de *Natural products in anticancer therapy*²⁷

Embora muitas substâncias tenham sido testadas em ensaios clínicos contra o câncer, um pequeno percentual destes compostos testados foi aprovado para uso em humanos. Atualmente, a 21ª Edição da lista de

medicamentos essenciais da OMS (2019) está disponível. Nela, informações dos medicamentos essenciais em saúde, como antineoplásicos, estão listados (<https://www.who.int/>)²⁹. Além disso, o desenvolvimento de novos agentes de fontes naturais apresenta alguns obstáculos, como por exemplo, a dificuldade em acessar a fonte das amostras, obter quantidades apropriadas do composto para ensaios bioquímicos e procedimentos adequados para isolar o composto ativo na amostra em quantidades necessárias para testes pré-clínicos ou para produção em escala industrial, em alguns casos. Esses problemas tornaram-se evidentes quando o paclitaxel, um agente que interage com a tubulina, e que é usado em uma diversidade de tipos de tumores foi introduzido em uso clínico.

Para tentar contornar este tipo de situação e conseguir obter quantidades suficientes de um produto natural com atividade promissora de forma sustentável, a produção destas substâncias pode ser realizada através de tecnologias do DNA recombinante. Nela, um hospedeiro geneticamente modificado pode ser usado para aumentar a produtividade de produtos naturais de forma heteróloga³⁰. Como pré-requisito, os sistemas genéticos devem estar disponíveis e a base molecular da biossíntese do composto precisa ser entendida.

2.1.1 Produtos naturais anticâncer de organismos do solo

2.1.1.1 Principais metabólitos secundários de origem microbiana

Um esquecimento de material de estudo, em uma mesa de laboratório, em 1928, contendo a bactéria *Staphylococcus aureus* foi responsável pela revolução na história de produtos naturais de origem microbiana. Tratava-se da descoberta, acidental, da penicilina, um metabolito secundário produzido pelo fungo filamentosso *Penicillium notatum*, que contaminou as amostras, e que tem ação antibiótica. A penicilina é reconhecida por sua eficiência contra bactérias Gram-positivas responsáveis por doenças como escarlatina, pneumonia, gonorreia, meningite e difteria. Também por isso, a descoberta feita por Alexander Fleming, salvou milhões de vidas e rendeu a ele, Howard Florey e

Ernst Chain o prêmio Nobel de fisiologia e medicina, em 1945. À época Fleming³¹ disse:

“I did not invent penicillin. Nature did that. I only discovered it by accident.”
(*“Eu não inventei a penicilina. A natureza fez isso. Eu só descobri isso por acidente.”*)

Depois disso, vieram os primeiros anos de pesquisa com antibióticos, denominada *Golden Age*, que levou a descoberta da estreptomicina a partir de *Streptomyces griseus*³²; cloranfenicol de *Streptomyces venezuelae*³³; clortetraciclina de *Streptomyces aureofaciens*³⁴; cefalosporina C de *Cephalosporium acremonium*³⁵; eritromicina de *Saccharopolyspora erythraea*³⁶; e vancomicina de *Amycolatopsis orientalis*³⁷.

Devido a isso, os micro-organismos se tornaram uma importante fonte de variados tipos de metabólitos bioativos e de grande importância na indústria farmacêutica³⁸. Os metabolitos secundários de origem microbiana são usados atualmente, para outras aplicações além de suas conhecidas atividades como antibacterianas, antifúngicas e antivirais. Uma das mais importantes é sua aplicação como agentes anticâncer.

Dentre as principais substâncias produzidas por micróbios encontrados no solo, e que são conhecidos agentes anticâncer, destacam-se a actinomicina produzida por *Streptomyces* spp.; bleomicina por *Streptomyces verticillus*; daunomicina por *Streptomyces coeruleorubidus*; doxorubicina, epirubicina e idarubicina por *Streptomyces pneuceticus*; mitomicina C por *Streptomyces caespitosus*; geldanamicina e rapamicina por *Streptomyces hygrosopicus*; e Wortmannina por *Talaromyces wortmanni*³⁹.

Como pode-se observar, vários metabólitos importantes são produzidos por espécies de *Streptomyces*. Devido a isso, e a importância destes produtos naturais, esse assunto será mais detalhadamente discutido na seção.

Das vantagens do uso de micróbios como fonte de agentes anticâncer, pode-se destacar o fato de que para produzir um determinado metabólito, a fonte microbiana reativada e armazenada indefinidamente, o que garante sua disponibilidade por tempo indeterminado⁴⁰. Além disso, os micro-organismos podem ser cultivados em condições diferenciadas e em fermentadores de

grande volume, garantindo a produção de quantidades sustentáveis de um determinado metabólito de interesse.

Um exemplo de sucesso de como as melhores condições de cultura de cepas produtoras podem aumentar a produção de um produto natural de interesse é o caso da penicilina. Em 1972, a cepa inicial da *P. notatum* produziu penicilina em 7 dias em uma concentração de 12 g/L. Em 1990, a cepa melhorada produziu 42 g/L em 7 dias. Já em 1993, a concentração da penicilina na indústria chegava a 60 g/L. Estima-se que cepas industriais recentes produzam 100.000 vezes mais penicilina do que a cepa original de *P. notatum* descoberta por Fleming⁴¹. Sendo assim, um aumento na concentração de compostos bioativos de interesse pode ser realizado pela alteração nas condições de cultura. Além disso, o melhoramento genético de micro-organismos pode ser usado para regular a produção de um composto específico, ou gerar análogos de interesse. Dentre os principais micro-organismos estudados, em particular de origem terrestre, podemos destacar os fungos e as bactérias.

2.1.1.2 Bactérias

Os produtos naturais derivados de bactérias desempenham papel fundamental na descoberta de novas substâncias para uso em medicina, além disso, as bactérias desempenham liderança na descoberta de potenciais candidatos à medicamentos contra o câncer. As bactérias, inclusive, apresentam um grande número de agentes aprovados, se comparado aos relatos de substâncias produzidas por outros micro-organismos. Além disso, o uso de bactérias no combate a certos tipos de câncer é reconhecido desde 1893, quando, pela primeira vez, os estudos realizados pelo médico cirurgião William B. Coley, descreveram a regressão de tumores sólidos de carcinoma e sarcoma, por tratamento com o caldo de cultura da bactéria *Streptococcus pyogenes*⁴². Mais tarde, em 1935, Connell usou filtrados estéreis da bactéria *Clostridium histolyticum* para tratar câncer avançado, e relatou que a regressão dos tumores era resultado da produção de “enzimas” das bactérias⁴³.

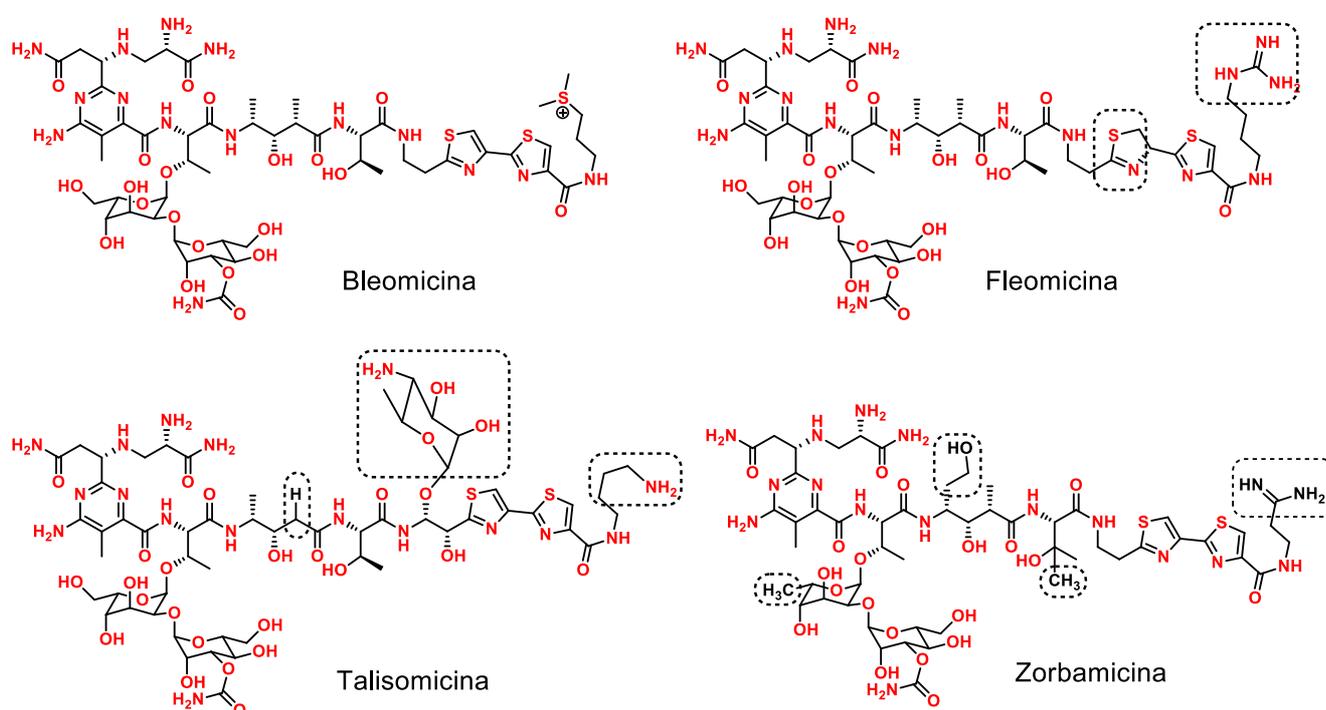
Desde então, metabólitos secundários extraídos de micro-organismos têm sido estudados, levando a obtenção de uma série de drogas quimioterápicas onde a maioria dos compostos usados em medicina, são antibióticos produzidos microbialmente ou seus derivados⁴⁴.

Um destes, com destaque na história dos metabólitos secundários produzidos por bactérias é a bleomicina. A bleomicina é um glicopeptídeo descoberto em 1962. Na época, o cientista japonês Hamao Umezawa observou que filtrados da cultura de *Streptomyces verticillus* apresentavam atividade anticâncer. Seus estudos foram divulgados em 1966⁴⁵, e três anos mais tarde a bleomicina foi lançada como medicamento pela Nippon Kayaku. Em 1973, a bleomicina obteve a aprovação do FDA e atualmente, faz parte da 21ª Edição da lista de medicamentos essenciais da OMS. Devido à ausência de atividade mielossupressora significativa, a bleomicina se tornou uma substância empregada em vários regimes quimioterápicos combinados.

Atualmente, a bleomicina é produzida pelo Actinomiceto *Streptoalloteichus hindustanus* e vem sendo usada no tratamento de carcinomas de células escamosas, melanomas, sarcomas, câncer testicular e ovário, linfomas de Hodgkin e não-Hodgkin e tumores de testículo como agente anticâncer⁴⁶. Uma curiosidade, é que o gênero *Streptoalloteichus* com o epíteto específico *hindustanus* foi descrito originalmente em 1978 como gênero e espécie da família Actinoplunaceae⁴⁷, por isso esse micro-organismo não aparece nas listas aprovadas de nomes bacterianos. Na época, um derivado da família das bleomicinas, a pingyangmicina, já era utilizada na terapia do câncer na China⁴⁸.

O desenvolvimento precoce da resistência aos medicamentos e a toxicidade pulmonar dose-dependente cumulativa são as principais limitações das bleomicinas em quimioterapia. O desenvolvimento desse sério efeito limita a quantidade de medicamento que pode ser administrada aos pacientes, um aspecto que também pode limitar a eficácia do tratamento em pacientes com doença pulmonar preexistente e carcinomas espinocelulares de pulmão ou esôfago.⁴⁹ Por isso, nas últimas décadas, o desenvolvimento de análogos ativos e particularmente menos tóxicos tem sido estudado por fermentação microbiana⁵⁰. Algumas substâncias pertencentes à família das bleomicinas, e que são produzidas por fermentação incluem a talisomicina⁵¹, a fleomicina⁵² e a zorbamicina⁵³. Alguns exemplos de estruturas de bleomicinas e suas principais diferenças estruturais estão representados na Figura 1.

Figura 1. Bleomicina e análogos



Fonte: o autor, 2020

Outros exemplos de bactérias que predominantemente vivem no solo, e que são produtoras de promissores agentes anticâncer são as mixobactérias ("bactérias do lodo"). As mixobactérias (ordem Myxococcales) são bactérias Gram-negativas pertencentes ao subgrupo Delta das Proteobactérias⁵⁴. Elas formam células em forma de bastão, sendo capazes de se mover, e são encontradas em abundância na maioria dos ambientes, em particular no solo⁵⁵.

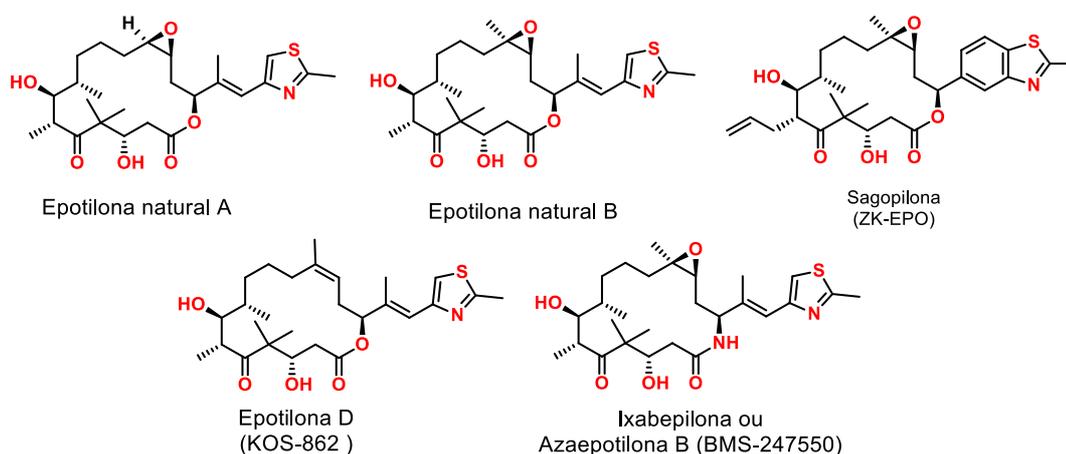
As mixobactérias são conhecidas por produzirem uma grande variedade de metabólitos secundários de interesse biotecnológico⁵⁶. Além disso, essas bactérias são capazes de produzir metabólitos de várias classes químicas, muitas com características únicas, exibindo um amplo espectro de bioatividades⁵⁷. Alguns Metabólitos secundários produzidos por mixobactérias em destaque são as Epotilonas⁵⁸ e as Tubulisinas⁵⁹. Estas substâncias apresentam atividade potente contra vários tipos de células cancerígenas, e efetiva mesmo contra células resistentes ao paclitaxel, por exemplo.

As Epotilonas são macrolídeos de 16 membros, isolados pela primeira vez por Höfle na década de 1990 a partir da mixobactéria gram-negativa *Sorangium*

*cellulosum*⁶⁰. As Epotilonas têm um modo de ação semelhante ao paclitaxel (estabilização de microtúbulos durante a divisão celular), e foram a primeira classe de compostos, após a descoberta dos taxanos, que tinham o efeito de estabilizar os microtúbulos⁶¹. Além disso, as Epotilonas se comparadas aos taxanos, apresentarem as vantagens de serem mais solúveis em água, serem produzidas em maiores quantidades por tecnologia de fermentação bacteriana⁶² e manter atividade contra linhagens de células de tumores resistentes a múltiplas drogas (MDR)⁶³.

Desde sua descoberta, centenas de análogos foram testados em ensaios bioquímicos, e destes destacam-se, incluindo as epotilona naturais A e B (Novartis), a epotilona D⁶⁴ (KOS-862 da Kosan Biosciences) e a sagopilona⁶⁵ (ZK-EPO). É importante ressaltar que desde que a doxorrubicina foi aprovada em 1974, apenas o medicamento natural paclitaxel (1994) e os semissintéticos docetaxel (1996) e ixabepilona (2007) haviam sido aprovados como pelo FDA, como derivados diretos de produtos naturais para monoterapia para MBC até 2007⁶⁶. Na Figura 2 estão representados alguns exemplos de epotilonas.

Figura 2. Epotilona e análogos



Fonte: o autor, 2020

Outra família de moléculas isoladas, e extrema relevância, são os alcaloides da vinca⁶⁷ (criptoficinas). As criptoficinas são citotoxinas pertencentes à família dos macrolídeos depsipeptídeos. Os depsipeptídeos são peptídeos, onde um ou mais de seus grupos amida são substituídos por um grupo éster correspondente.

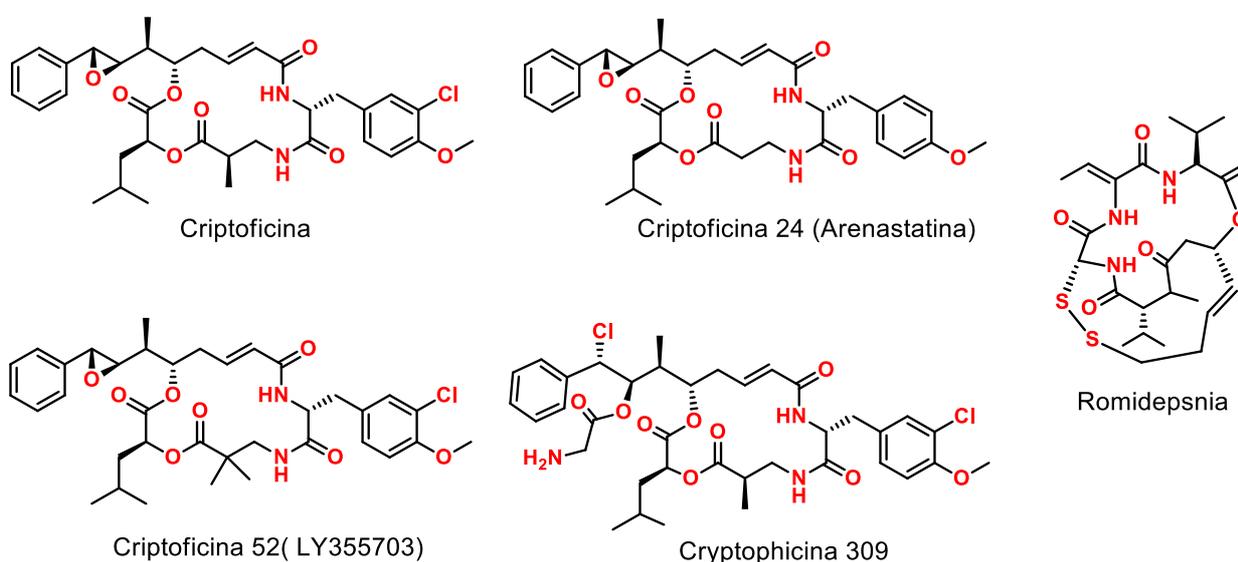
As criptoficinas foram originalmente descobertas em 1990, através da exploração de cianobactérias do gênero *Nostoc*⁶⁸, e descobertas como substâncias capazes de induzir apoptose⁶⁹ por outros mecanismos além daqueles mediados pela inibição de microtúbulos⁷⁰. Inicialmente, as criptoficinas foram patenteadas como agentes antifúngicos e quatro anos mais tarde identificadas como inibidores de microtúbulos⁷¹. Curiosamente, moléculas análogas as criptoficinas foram isoladas a partir da esponja marinha *Dysidea arenaria*⁷². Como as cianobactérias são simbiontes comuns de esponjas, sugere-se que as bactérias podem ser a verdadeira origem destas substâncias⁷³. Originalmente, esses compostos foram isolados por pesquisadores da Merck como um potente fungicida. No entanto, a empresa abandonou o projeto, devido aos compostos serem altamente tóxicos para serem desenvolvidos como antifúngicos⁷⁴. Vários anos depois, o interesse pelas criptoficinas foi renovado após uma extrato lipofílico de *Nostoc* sp. apresentar potente atividade citotóxica⁷⁵. Após isolamento, atividades antimetabólica e citotoxicidade frente a células tumorais humanas foram atribuídas a criptoficina⁷⁶. Com mais de 25 análogos naturais⁷⁷, a criptoficina é um dos agentes desestabilizadores de tubulina mais potentes já descobertos, onde a cascata apoptótica é resultado da parada celular por hiperfosforilação de Bcl-2 na fase G2/M⁷⁸. Além disso, as criptoficinas também são potenciais quimioterápicos, exibindo atividade frente a linhas de células tumorais resistentes a múltiplas drogas⁷⁹.

Os derivados da criptoficina mais conhecidos são a criptoficina 24 (arenastatina) e a criptoficina 52. A criptoficina 52, também conhecida como agente LY355703⁸⁰, é o análogo que exibe maior potência em ensaios de inibição da polimerização dos microtúbulos. O agente LY355703 é preparado através de modificações do produto natural⁸¹, e possui potente atividade antiproliferativa e citotóxica contra um amplo espectro de linhagens celulares de tumor humano, incluindo várias linhas multirresistentes, demonstrando ser de 40 a 400 vezes mais potente que o paclitaxel e os alcaloides da vinca⁸². No entanto, apesar de demonstrar excelentes resultados e finalmente chegar aos ensaios clínicos de fase 2, a Eli Lilly & Co., empresa responsável pela sua produção, decidiu interromper seu desenvolvimento devido aos altos custos de produção associados à grande toxicidade⁸³. No entanto, em 2005, um ensaio clínico de

fase 2 envolvendo pacientes com câncer de ovário avançado resistente à platina concluiu que a taxa de estabilização da doença, com ausência de efeitos adversos, justificava sua reinvestigação⁸⁴.

A partir de então, uma segunda geração de análogos da criptoficina, com melhores propriedades de solubilidade e estudos pré-clínicos, indicam um aumento acentuado da eficácia contra uma variedade de tumores⁸⁵. Alguns desses exemplos são a criptoficina 309 e a romidepsina. Esta última é produzida pela bactéria *Chromobacterium violaceum* e foi aprovada pelo FDA como um potente agente antitumoral. Este composto foi isolado destas bactérias encontradas em amostras de solo japonês, e aprovada em novembro de 2009 para o tratamento do linfoma cutâneo de células T⁸⁶. Sua aprovação pelo FDA é baseada em dois grandes estudos de fase II: um estudo multi-institucional baseado no NCI nos Estados Unidos (71 pacientes) e um estudo internacional (96 pacientes), onde não houve toxicidades com risco de vida, observados na maioria dos pacientes. Alguns exemplos de despéptidos com atividade antineoplásica estão representados na Figura 3.

Figura 3. Despéptidos com atividade antineoplásica



Fonte: o autor, 2020

2.1.1.3 *Streptomyces*

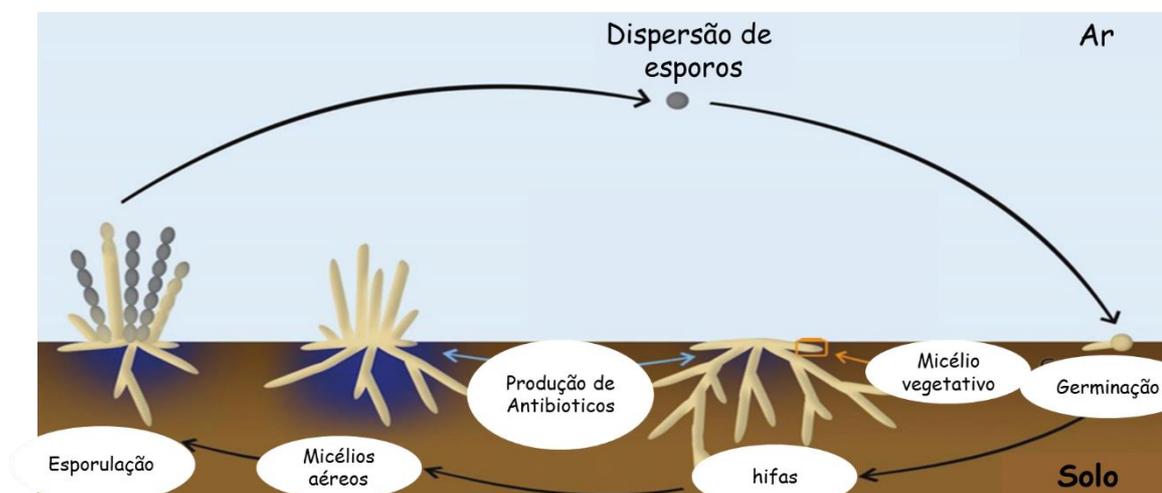
Streptomyces são bactérias filamentosas aeróbias Gram-positivas que surgiram há cerca de 2,3 bilhões de anos, na época da primeira oxigenação da atmosfera terrestre⁸⁷. Esse gênero de bactérias pertence à família *Streptomycetaceae* sob a ordem *Actinomycetales*, da classe *Schizomycetes*. Esses Actinomycetes, de morfologia semelhante aos fungos, são conhecidos por serem uma fonte valiosa de compostos biologicamente ativos⁸⁸. Estudos mostram que cerca de 74% dos antibióticos são derivados do gênero *Streptomyces*¹¹, onde a produção destes metabólitos se dá na fase germinativa⁸⁹.

Com relação à sua abundância, estima-se que um grama de solo contém 10^9 UFC (unidades formadoras de colônia) e, dessas, 10^7 são Actinobacterias⁹⁰. Apesar de serem bactérias onipresentes do solo, também podem ser encontradas em ambiente marinho⁹¹, incluído esponjas, e também encontradas como simbiontes de insetos, como a formiga *Acromyrmex octospinosus*, que auxiliam na proteção de fungos cultivados por formigas fitopatogênicas⁹².

Os *Streptomyces* são eubactérias extremamente resistentes e com uma incrível capacidade reprodutora. Em condições ideais, algumas espécies podem se duplicar a cada 20 minutos. Além disso, eles têm como características crescer na forma de filamentos ou como micélio e não apresentam as formas bacterianas ou cocóides usuais. O ciclo de desenvolvimento das *Streptomyces* se inicia com um esporo, que após germinação leva a formação de hifas vegetativas muito pouco septadas. Essas hifas se estruturam em rede, tendo o micélio vegetativo o papel de filtrar os nutrientes do ambiente. Os *Streptomyces* possuem uma estrutura de colônia complexa baseada em micélios multinucleados e ramificados, com diferenciação da colônia em estruturas vegetativas e reprodutivas. Essa morfologia multicelular complexa levou microbiologistas anteriores a acreditar que os actinomicetos eram fungos ou elos intermediários entre fungos e bactérias. Elas também formam conídios, que são produzidos em cadeias de hifas aéreas portadoras de esporos, que são a forma de resistência e disseminação desta bactéria⁹³. Assim, os *Streptomyces* se desenvolvem como organismos totalmente miceliais e se reproduzem pela formação de esporos imóveis nas pontas das hifas aéreas (Figura 4), que também podem ser

dispersos por agentes físicos ou pelas atividades de animais móveis que habitam o mesmo nicho.

Figura 4. Ciclo de vida de *Streptomyces*



Fonte: Adaptado de Urem et al.⁹⁴

A maioria dos membros de *Streptomyces* são saprófitas, ou seja, organismos que se alimentam absorvendo substâncias normalmente provenientes de matéria orgânica em decomposição. Apesar de várias cepas poderem infectar e causar doenças em humanos, incluindo contaminação de feridas e formação de abscessos, poucos exemplos de *Streptomyces* foram isolados de material patológico. No entanto, seu papel como agente de doenças infecciosas não pode ser descartado. Alguns exemplos de *Streptomyces* causadores de doenças são: *Streptomyces somaliensis*, conhecido por causar actinomicetomas em humanos; *Streptomyces listeri*, *Streptomyces galtieri* e *Streptomyces hortonensis*, que são isolados de corpos e tecidos de animais, e que apresentam ação proteolítica em gelatina e leite e como alérgenos respiratórios em humanos. Há um relatório que indica pneumonia mediada por *Streptomyces lanatus* em humanos⁹⁵.

Os *Streptomyces spp.* possuem como característica possuir um único cromossomo linear, sendo que essa topologia linear é incomum mesmo entre actinomicetos. Um 'núcleo' central, compreendendo aproximadamente metade do tamanho total do cromossomo, contém quase todos os genes essenciais para o crescimento. Estes incluem genes para divisão celular, replicação de DNA,

transcrição, tradução e biossíntese de aminoácidos⁹⁶. Além disso, com relação à estrutura gênica dos actinomicetos em geral, e os *Streptomyces* em particular, esses possuem um DNA com um conteúdo alto, e não usual, de G + C. Para estreptomicetos, com 73% G + C, isso está próximo do limite teórico para codificação de proteínas convencionais. Uma consequência é que certos códons ricos em AT são muito raros, o que pode ter implicações para a expressão gênica. Em particular, há uma relevância biológica para a expressão de genes envolvidos na diferenciação: os genes necessários para o crescimento vegetativo não possuem o códon de leucina TTA⁹⁷. Adicionalmente, uma nova modificação de base contendo enxofre, possivelmente de guanina, foi descoberta em alguns membros do gênero, incluindo *Streptomyces lividans* e *S. avermitilis*. Após sua descoberta nessas espécies, também foi encontrada no DNA de várias outras bactérias de diversos habitats e parece ser especificada como parte de uma ilha genética que se espalhou entre essas espécies⁹⁸.

Os *Streptomyces* têm sido fundamentais na descoberta de importantes metabólitos secundários, incluindo antibióticos, drogas imunossupressoras, drogas anticâncer e outros compostos biologicamente ativos^{11,99}. Além disso, eles respondem por 39% de todos os metabólitos microbianos, e da sua classe, este gênero é responsável por produzir quase 80% de moléculas bioativas¹¹. Atualmente, para o gênero *Streptomyces*, existem mais de 800 espécies catalogadas (<https://lpsn.dsmz.de/genus/streptomyces>) e alvos de publicações¹⁰⁰.

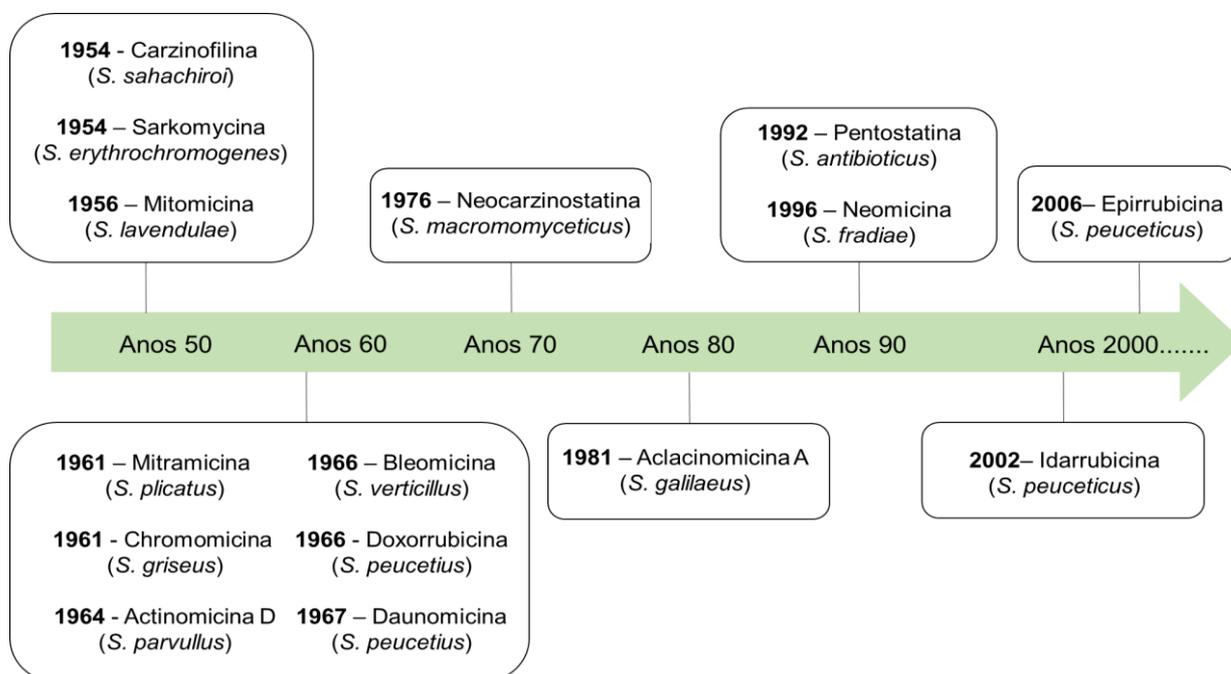
2.1.1.3.1 Metabólitos secundários de streptomyces

O gênero *Streptomyces* foi proposto inicialmente por Waksman e Henrici entre 1941¹⁰¹ e 1943¹⁰², com base em sua morfologia e quimiotipo da parede celular. No entanto, um pouco antes, em 1940, Waksman e Woodruff já tinham isolado a Actinomicina, o primeiro antibiótico de *Actinomyces antibioticus*, agora conhecido como *Streptomyces antibioticus*.¹⁰³

Os *Streptomyces*, são conhecidos por produzir um grande número de substâncias bioativas de grande impacto na saúde humana. Uma das razões é que os *Streptomyces* dedicam uma proporção considerável de seus genomas (até 10%) com genes que codificam a biossíntese de produtos naturais¹⁰⁴.

Devido à sua capacidade de produzir produtos naturais de grande importância, ao longo dos mais de 77 anos de estudo, vários antibióticos, agentes anticâncer e imunossuppressores foram desenvolvidos¹⁰⁵. Além disso, a triagem de *Streptomyces* têm levado a descoberta de um arsenal químico de grande aplicação no desenvolvimento de medicamentos¹⁰⁶, e o uso de múltiplas abordagens, como a engenharia de ribossomos¹⁰⁷ e engenharia genética¹⁰⁸, têm sido usadas para encontrar novos metabólitos secundários em cepas antigas de *Streptomyces*. Exemplos são as *S. coelicolor*, *S. lividans*, *S. albus* e *S. venezuelae*, que são espécies que favoreceram a produção heteróloga de metabólitos devido à sua relativa facilidade em ser manipulada geneticamente, à disponibilidade de suas sequências genômicas e ao suprimento abundante de seus substratos naturais¹⁰⁹. A linha do tempo, representada pela figura 5, mostra a evolução das drogas comerciais anticâncer produzidas por *Streptomyces* ao longo dos anos.

Figura 5. Evolução das drogas anticâncer produzidas por *Streptomyces* (Adaptado de *Marine Biomedicine* 2016¹¹⁰ e acrescido de Idarubicina e Epirubicina).

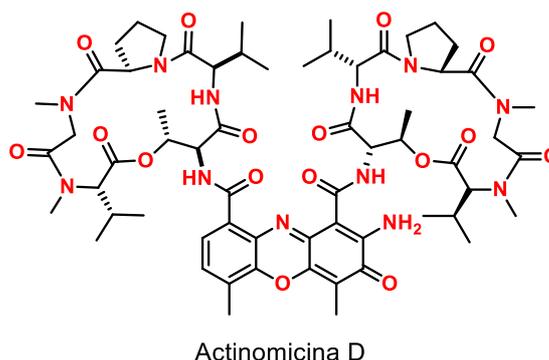


Fonte: o autor, 2020

A Actinomicina D (Figura 6), também conhecida como Dactinomicina, foi um dos primeiros antibióticos a demonstrar atividade anticâncer, desde sua descoberta por volta de 1940, a partir de *Streptomyces parvullus*¹¹¹. A

Dactinomicina pertence à família das actinomicinas, que são lactonas cromopeptídicas bicíclicas que compartilham uma unidade cromófora. O fragmento responsável pela cor do composto é um heterocíclo derivado da fenoxazina, contendo uma porção de quinonimina, onde em sua estrutura, são ligadas por duas lactonas pentapeptídicas de origem não-ribossômica.¹¹²

Figura 6. Actinomicina D, também conhecida como Dactinomicina



Fonte: o autor, 2020

A Actinomicina D, no entanto, teve sua eficácia reconhecida após o medicamento ter sido aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos em 1964, sob o nome comercial Cosmegen¹¹³. No entanto, embora não seja mais útil como antibiótico, essa substância continua sendo um agente quimioterápico comumente usado para o tratamento de vários tipos de câncer, e atualmente, está na Lista de Medicamentos Essenciais da OMS, como agente terapêutico contra neoplasia trofoblástica gestacional, rabdomiossarcoma e também tumor de Wilms. Atualmente, são conhecidas cerca de 41 actinomicinas, principalmente com variações na porção peptídica.

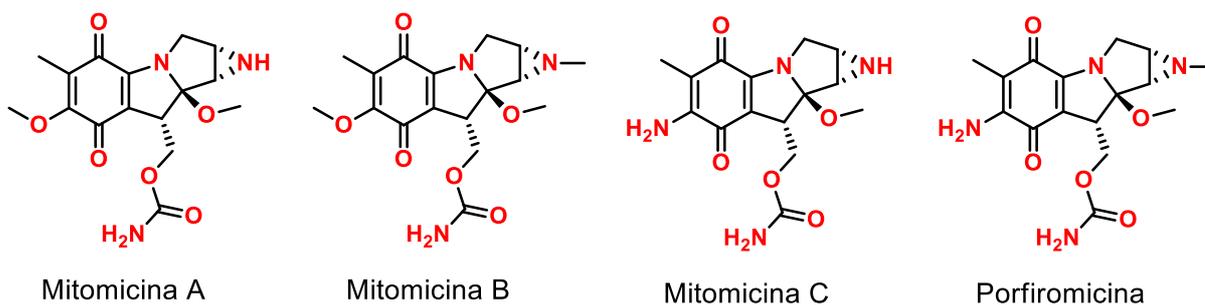
Além disso, à medida que os genomas de diferentes espécies de *Streptomyces* são sequenciados, é possível identificar dezenas de genes responsáveis pela produção de metabólitos secundários, no entanto, a maioria dos compostos codificados por esses clusters de genes ainda não foram identificados¹¹⁴.

Já as bleomicina, inicialmente extraída da cultura de *Streptomyces verticillus*¹¹⁵, e por isso aparece na linha de tempo, é empregada no tratamento de carcinomas, melanomas, sarcomas, câncer testicular e ovário, linfomas de Hodgkin e não-Hodgkin.

As mitomicinas, que são isoladas a partir de *Streptomyces caespitosus* ou *Streptomyces lavendulae*¹¹⁶, incluem as mitomicina A, B e C (Figura 7)¹¹⁷. Essas substâncias são antibióticos altamente citotóxicos, tendo seus primeiros exemplos isolados a partir de 1956¹¹⁸, época em que, 2 anos mais tarde, a mitomicina C (MMC) foi isolada¹¹⁹. O modo de ação da MMC foi reportado no início da década de 1960 por Iyer e Szybalski, que relataram que os efeitos da MMC se baseavam na capacidade do fármaco em formar ligações cruzadas no DNA¹²⁰. Outros análogos como a mitomicina A e a porfiromicina, ainda que tenham estrutura parecida, não apresentam resultados satisfatórios.

Desde que foi aprovada pelo FDA em 1974, a MMC continua sendo empregada na quimioterapia de câncer de cabeça e pescoço, cervical, gástrico, pancreático e cólon¹²¹. Além disso, é o único membro da família das mitomicinas usada clinicamente e considerada como agente único na terapia contra o câncer de bexiga¹²².

Figura 7. Mitomicinas produzidas por *Streptomyces lavendulae*.



Fonte: o autor, 2020

A rapamicina, um produto natural derivado de *Streptomyces rapamycinicus*, e que possui atividade anticâncer¹²³, age em células tumorais, impedindo sua proliferação, por apoptose¹²⁴.

A rapamicina (sirolimus) foi originalmente descoberta na Wyeth-Ayerst Pharmaceuticals em uma triagem de agentes antifúngicos e, posteriormente, descobriu-se ter uma atividade imunossupressora potente. Além disso, verificou-se que a rapamicina e a geldanamicina têm ações antiproliferativas e, portanto, podem ser utilizadas como novos agentes quimioterapêuticos¹²⁵. A rapamicina e seus análogos são produtos de *Streptomyces hygroscopicus* e inibem as vias de sinalização necessárias para a ativação e proliferação de células T. A rapamicina

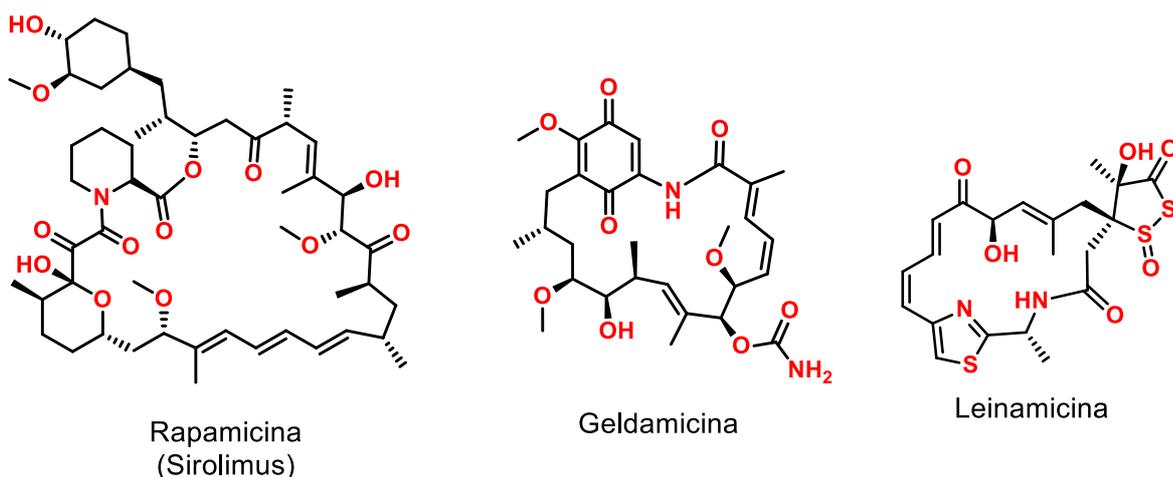
bloqueia a progressão do ciclo celular na fase G1 do meio até o final das células T e células B, e linhas celulares de osteossarcoma e rabdomyossarcoma, entre outras¹²⁶.

A geldanamicina é um composto antitumoral de benzoquinona ansamicina derivado de *Streptomyces hygroscopicus var. geldanus*¹²⁷. A geldanamicina impede a atividade da ATPase ao se ligar à proteína de choque térmico e dificulta a estabilidade e a função das proteínas quinases oncogênicas envolvidas na cascata de amplificação de sinal que controla a proliferação e apoptose. A geldanamicina e seus análogos desempenham um papel fundamental como agente anticâncer no câncer de mieloma múltiplo, mama e próstata¹²⁸.

A geldanamicina é um produto de fermentação natural da benzoquinona ansamicina que originalmente se pensava ser um inibidor direto da proteína tirosina quinase. No entanto, estudos subsequentes revelaram que a geldanamicina se liga e inibe a proteína HSD 90 de 90 kDa heatshock¹²⁹.

Outro exemplo de macrolactama com promissora ação contra o câncer é a Leinamicina (LNM), uma macrolactama de 18 membros produzida por várias espécies de *Streptomyces atrolivaceus*, e que foi isolada pela primeira em 1989¹³⁰. As estruturas de algumas Macrolactamas estão representadas na figura (Figura 8), a seguir.

Figura 8. Exemplos de macrolactamas com ação citotóxica



Fonte: o autor, 2020

A LNM exibe potente atividade antitumoral, inclusive sendo ativa contra tumores resistentes a medicamentos clinicamente importantes, e pode ser encontrada em várias espécies de *Streptomyces atrolivaceus*.

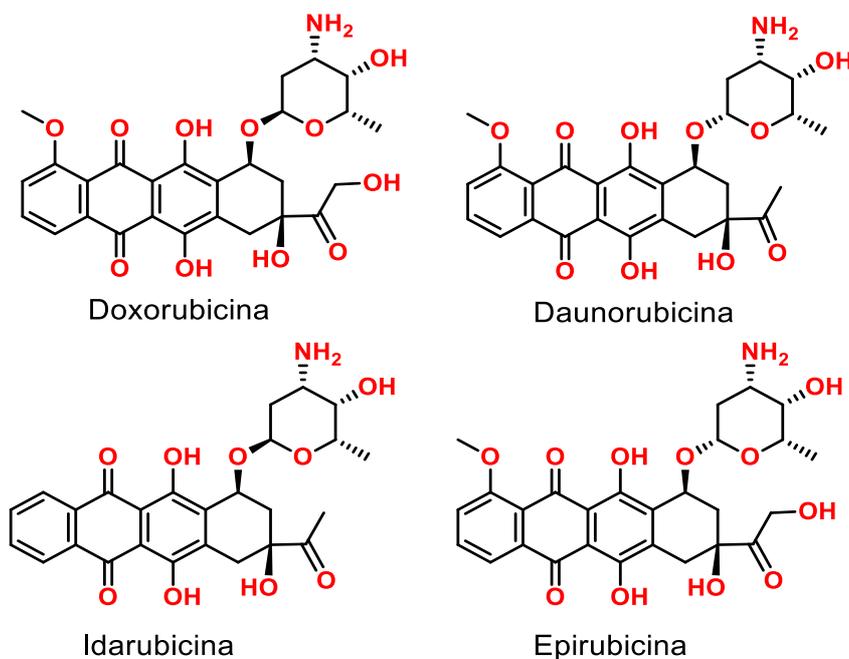
A LNM exerce atividade antitumoral por alquilação do DNA, mediada por íons episulfônio. Esse modo de ação é sem precedentes entre todos os produtos naturais que danificam o DNA¹³¹. Apesar de ter sido descoberta há quase 30 anos, essa substância, que apresenta promissora ação contra o câncer¹³², continua sendo alvo de estudo. Curiosamente, a leinamicina é, até os dias de hoje, o único membro conhecido dessa família de produtos naturais, não tendo sido isolado nenhum outro análogo nas últimas três décadas desde sua descoberta. Em vista disso, recentemente, a leinamicina tem sido alvo de estudos envolvendo sua relação estrutura atividade, onde estudos explorando o repertório combinatórios têm indicado promissores medicamento contra o câncer¹³³.

Outros exemplos de metabólitos secundários produzidos por bactérias tiveram um papel importante na história do desenvolvimento de terapias de combate ao câncer. Exemplos são as antraciclínonas daunomicina e doxorubicina (adriamicina), que foram introduzidas em estudos clínicos antes mesmo que seus modos de ação tivessem sido determinados.

As antraciclínonas são antibióticos antitumorais, amplamente empregados como medicamentos voltados ao tratamento da quimioterapia contra diversos tipos de câncer¹³⁴. Esses agentes antineoplásicos representam uma família de produtos naturais isolados de micro-organismos com uma vasta atividade antitumoral. Além disso, os antibióticos da antraciclina são os agentes antineoplásicos mais empregados contra vários tipos de cânceres¹³⁵. Esses agentes inibem a topoisomerase II, mas também se intercalam no DNA e formam metabólitos que interagem com muitas moléculas intracelulares. Além disso, há evidências que as antraciclínonas podem formar ligações com os grupos fosfolipídios (carregados negativamente) da membrana celular, alterando sua fluidez, assim como o transporte de íons¹³⁶.

Alguns exemplos de antraciclínonas, de extrema importância no tratamento de vários tipos de câncer, e que são produzidas por *Streptomyces peucetius* são: doxorubicina¹³⁷ e daunorubicina¹³⁸, aprovadas pelo FDA na década de 1960, e as idarubicina¹³⁹ e a epirubicina¹⁴⁰, aprovadas pelo FDA 35 anos depois, em 2002¹⁴¹ e 2006¹⁴², respectivamente (Figura 9).

Figura 9. Antraciclinas produzidas por *Streptomyces peucetius*.



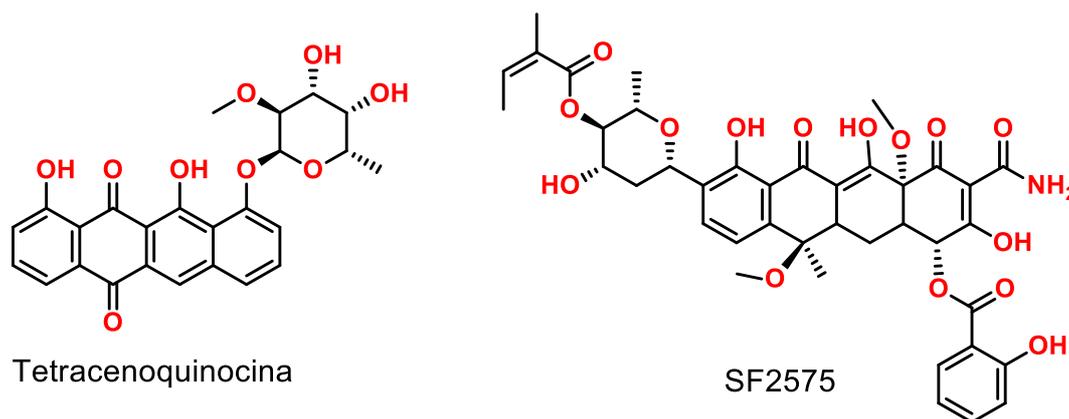
Fonte: o autor, 2020

Enquanto a daunorubicina é usada no tratamento de linfoma linfoblástico ou mieloblástico agudo, a doxorubicina é usada no tratamento de câncer de mama, tumores sólidos em crianças, sarcomas de tecidos moles e linfomas agressivos¹⁴³. Já a idarubicina, também conhecida como (4-DMDR), é um análogo da daunorubicina (ausência do grupamento metoxila), aprovado para o tratamento de leucemias¹⁴⁴. A epirubicina (um epímero da doxorubicina), por sua vez, é empregada no tratamento de câncer de mama. Uma curiosidade observada para um medicamento inicialmente empregado como antibiótico, é o caso da tetraciclina de quarta geração, conhecida como SF 2575, produzida por *Streptomyces* sp. Esta substância, que possui baixa atividade antibiótica, é responsável por um alto nível de atividade contra células de leucemia P388 e outros tipos de células cancerígenas¹⁴⁵, onde atua, assim como as camptotecinas e doxorubicina, contra as topoisomerasas I e II do DNA.

Recentemente, a tetracenoquinocina, uma nova tetraciclina produzida por *Streptomyces* sp. NEAU-L3, foi analisada como possível agente quimioterápico, através de testes de inibição do crescimento *in vitro* de três linhagens celulares de

tumor humano, carcinoma hepático (HepG2), pulmão (A549) e carcinoma de cólon (HCT 116). De acordo com os resultados, no entanto, o bioensaio mostrou que a tetracenoquinocina A apresenta menor citotoxicidade frente as células testadas quando comparada com a doxorrubicina¹⁴⁶. As estruturas da tetracenoquinocina e SF 2575 estão representadas na Figura 10 a seguir.

Figura 10. Tetraciclinas bioativas



Fonte: o autor, 2020

Em suma, desde o isolamento da actinomicina, e a descoberta de sua ação como agente anticâncer, muitos compostos anticâncer foram isolados das espécies de *Streptomyces*, incluindo as bleomicinas e, principalmente as antraciclinas. Baseado nisso, percebe-se a importância do processo de fermentação de diferentes espécies de *Streptomyces* como um dos métodos de grande importância utilizados na descoberta de medicamentos importantes para uso medicinal¹⁴⁷.

Uma fonte importante de metabólitos bioativos oriundos de *Streptomyces*, é o *Streptomyces hygroscopicus*. Essa espécie pertence a um dos gêneros de *Streptomyces* mais intensamente estudados e são produtores bem conhecidos de muitos metabólitos secundários de importância industrial¹⁴⁸. Exemplos são os medicamentos imunossuppressores rapamicina e ascomicina. A ascomicina, por exemplo, também é usada para tratar doenças autoimunes e pode prevenir a rejeição após um transplante de órgão. Devido a sua importância, esta substância vem sendo biotecnologicamente produzida por fábricas de células de *Streptomyces hygroscopicus*¹⁴⁹. Outro produto natural, de grande importância produzido a partir de *Streptomyces hygroscopicus* é a nigericina. Esta substância, também conhecida como polieterina A, azalomicina M, helixina C, antibiótico K178 e antibiótico X-464, é um

ionóforo de grande relevância industrial. Como um dos objetivos desta tese foi o isolamento e a identificação desta substância, a partir de *Streptomyces hygrosopicus* ACTMS-9H, um tópico sobre esta substância, descrevendo sua característica como ionóforo está representado a seguir.

2.2 NIGERICINA

Uma das substâncias produzidas por *Streptomyces*, e que possui grande potencial como substância bioativa é a nigericina, um poliéter natural que tem como característica ser um ionóforo. Os ionóforos são antibióticos naturais, e apresentam como característica intrínseca serem substâncias lipossolúveis que servem como agentes de transporte de íons através da membrana celular.

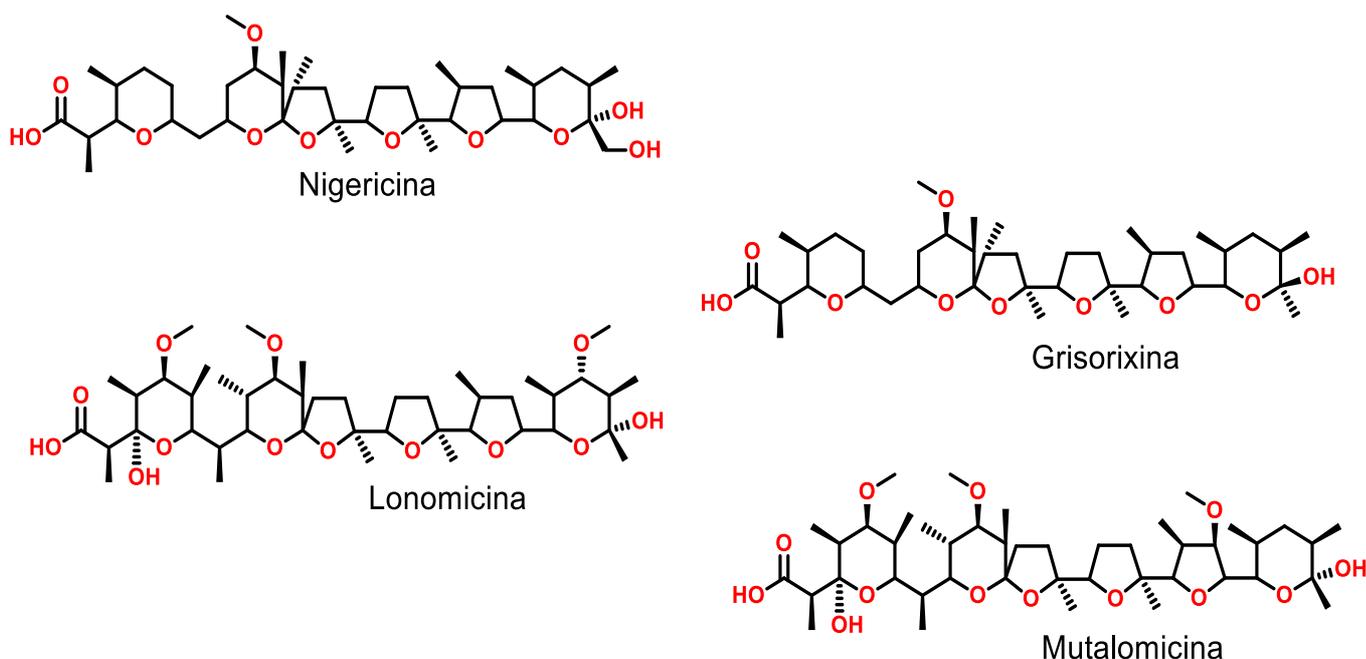
A história dos poliéteres ionóforos começou em 1951, quando a nigericina foi isolada a partir de *Streptomyces spp.* Desde então, mais de 50 micro-organismos foram descobertos como fontes produtoras destas substâncias¹⁵⁰. O termo ionóforo foi usado pela primeira vez em 1967 em referência à capacidade das moléculas orgânicas de se ligar a cátions metálicos e formar complexos lipossolúveis que facilitam seu transporte através das membranas celulares. Além disso, os ionóforos podem se difundir do meio extracelular para o intracelular e de volta ao espaço extracelular ou podem permanecer na membrana plasmática enquanto transporta íons metálicos entre os espaços intracelular e extracelular¹⁵¹. Essas substâncias se apresentam com um amplo espectro de atividade biológica que varia desde a atividade antibacteriana, especialmente contra bactérias Gram-positivas, incluindo também *S. aureus* e *S. epidermidis* resistentes a antibióticos até atividades como antifúngica, antiparasitária, antimalárica, antiviral, anti-inflamatória e citotóxica de células tumorais¹⁵².

Estruturalmente, essas substâncias são ácidos mono-carboxílicos contendo poliéteres, que conformacionalmente formam um interior hidrofílico rico em oxigênio capaz de transportar íons monovalentes de forma eficiente através da membrana (K^+ , Rb^+ , Na^+ , Cs^+ , Li^+ , H^+). Atualmente, são conhecidos mais de 120 ionóforos de ocorrência natural¹⁵³, dando a esses produtos naturais, produzidos por *Streptomyces sp.*, grande importância econômica, cerca de US\$ 150 milhões em vendas anuais¹⁵⁴.

Como os ionóforos têm a capacidade de acidificar o meio intracelular do citoplasma¹⁵⁵, e como se sabe que as células cancerosas têm um pH interno invertido,

em comparação com as células normais (pH interno levemente alcalino favorece a proliferação de células cancerosas), esta característica, em diminuir o pH interno das células tem sido usado, onde estas substâncias são usadas como sensibilizadores de células tumorais, que em combinação com outras drogas vêm aumentando o potencial citotóxico em células tumorais. Um exemplo, é a potencialização do paclitaxel, fármaco anticâncer clinicamente utilizado quando em associado ao ionóforo inostamicina¹⁵⁶. Nesse caso, após as células cancerosas terem seu pH interno diminuído, a replicação do DNA torna-se inadequada. Esta abordagem tem sido usada para melhorar a citotoxicidade seletiva de drogas contra células cancerosas. Atualmente, vários ionóforos poliéteres são comercializados¹⁵⁷. Alguns deles estão representados na Figura 11.

Figura 11. Ionóforos bioativos

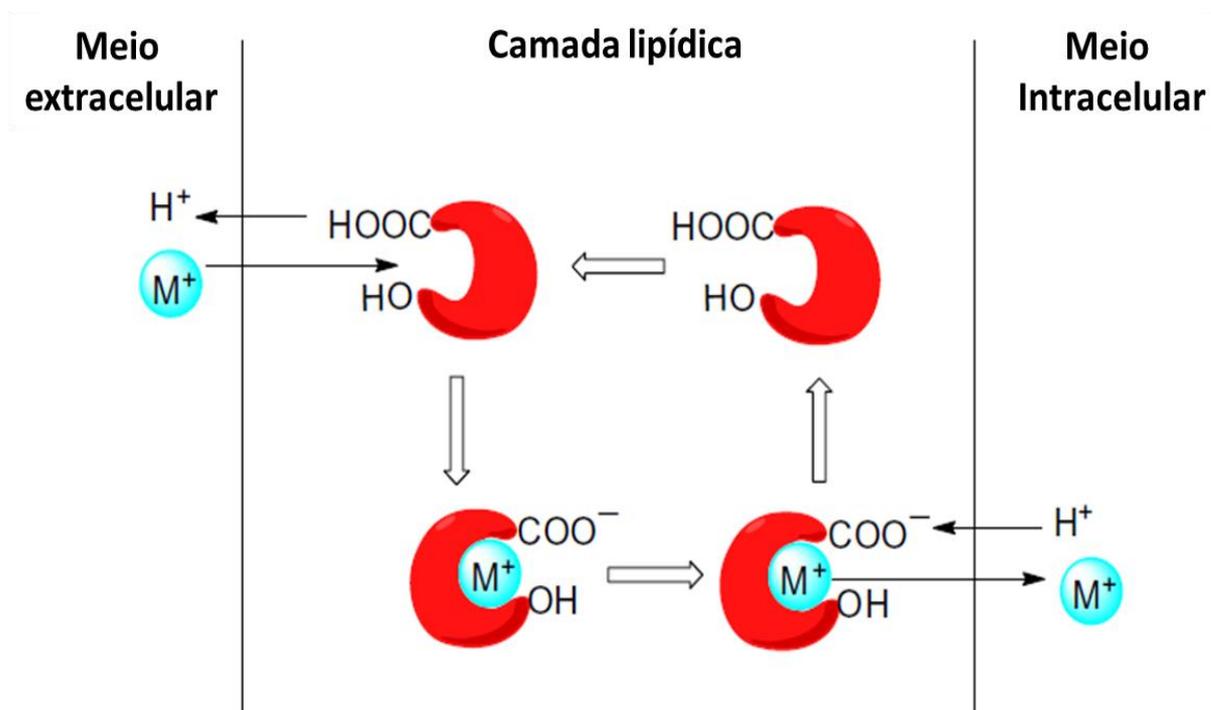


Fonte: o autor, 2020

O estudo do transporte dos íons por ionóforos, através da membrana celular é essencial para compreender o mecanismo de ação e sua atividade anticâncer. O conhecimento desses mecanismos é muito significativo devido à atividade biológica dos ionóforos com capacidade de transportar cátions através das membranas celulares, perturbando o gradiente natural de concentração de Na^+/K^+ . O mecanismo de transporte de um cátion por ionóforos de poliéteres é atribuído à sua capacidade de trocar prótons e cátions¹⁵⁸. Esse mecanismo é possível no ambiente neutro ou

levemente alcalino da célula porque está ligado à desprotonação do grupo carboxila (COOH) levando a um grupo carboxilato (COO) (Figura 12).

Figura 12. Transporte por ionóforos.



Fonte: Adaptado de Bioorg. Med. Chem. Lett. 2012, 22, 7002

A nigericina é um antibiótico derivado de *Streptomyces hygroscopicus* que atua como um transportador de íons K^+/H^+ ¹⁵⁹. Os efeitos da nigericina e de outros ionóforos no pH intracelular de células tumorais vêm sendo estudados desde 1972¹⁶⁰. Desde então, estudos mostram que a nigericina é capaz de causar acidificação do citoplasma, e com isso inibir a síntese de DNA de células cancerosas¹⁶¹. Desde então, a nigericina vem sendo reportada em vários estudos de tipos de câncer¹⁶². Desde então, vários dados evidenciam que a nigericina é capaz de possuir uma promissora atividade anticancerígena em uma variedade de cânceres, incluindo câncer de próstata¹⁶³, câncer de bexiga¹⁶⁴, células de leucemia linfocítica crônica¹⁶⁵ e câncer de pulmão¹⁶⁶. Um exemplo é o estudo realizado por Deng e colaboradores, é relatado que a nigericina pode ter como alvo seletivo as células-tronco cancerosas (CTC) de carcinoma da nasofaringe, e que ao ser utilizada em conjunto com o medicamento clínico cisplatina, excelentes resultados tanto *in vitro* quanto *in vivo* são alcançados¹⁶⁷.

Em 2004, Vaupel e colaboradores relataram que a nigericina pode inibir as células-tronco do câncer de mama pelo menos 100 vezes mais efetivamente do que o paclitaxel em camundongos¹⁶⁸. Além disso, Zhou e colaboradores demonstraram que a nigericina pode suprimir a metástase do câncer colorretal por meio da inibição da transição epitelial-mesenquimal (TEM)¹⁶⁹.

Mais recentemente, os efeitos anticâncer da nigericina foram relatados para células de câncer de pulmão, onde ela é capaz de inibir de forma eficiente a viabilidade das células que crescem em condições de cultura de rotina, períodos prolongados de privação de soro e tumores pulmonares¹⁷⁰.

Apear do grande número de estudos envolvendo células de câncer e a nigericina, terem sido reportados, até o presente momento, apenas o sal sódico da nigericina tem sido envolvido nestes ensaios. Com isso, e em vista do grande potencial da nigericina com agente anticâncer, nesta tese o emprego da nigericina na forma de seu ácido livre será estudada para determinar as atividades específicas em linhas de células PC humanas e investigar seu possível mecanismo molecular.

2.3 CARACTERÍSTICAS DO CÂNCER

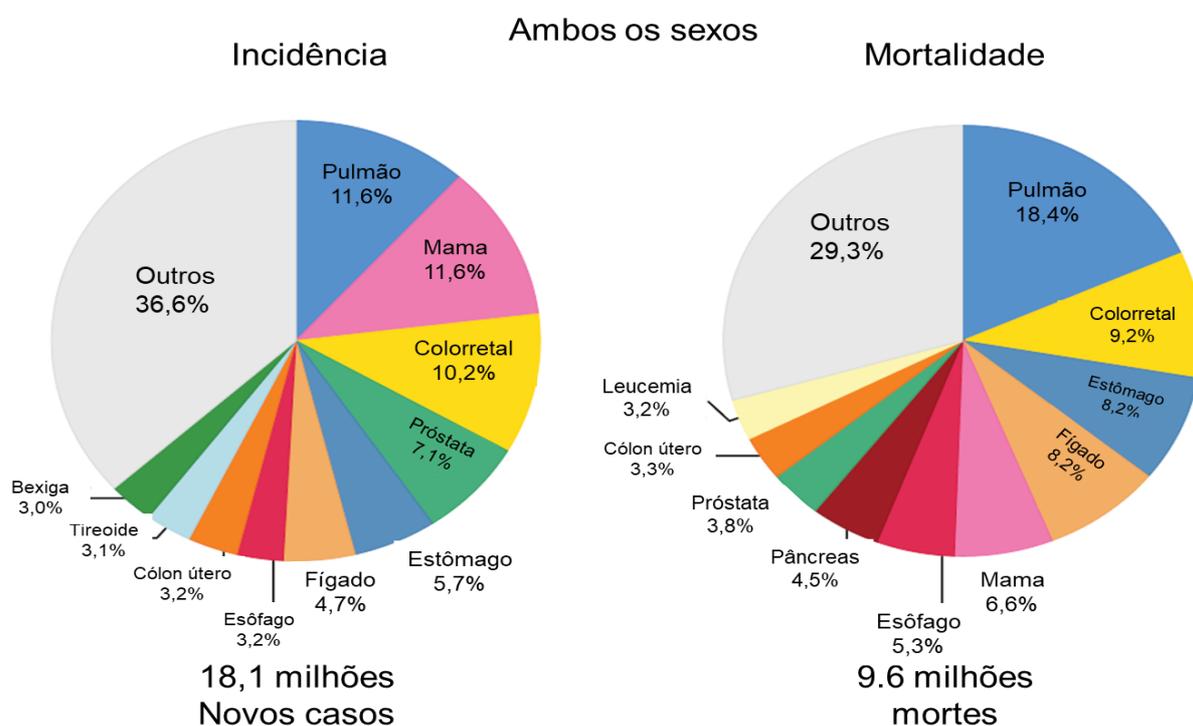
O termo “câncer”, de origem no latim que significa “caranguejo” foi criado pelo médico Hipócrates (360-470 a.c). Esse termo se deve ao modo infiltrante da doença, suas projeções e os vasos sanguíneos em volta do tumor, que lembra as patas de um caranguejo¹⁷¹. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) o câncer é um termo usado para designar uma doença complexa e de característica genética, que pode afetar qualquer parte do corpo, onde a principal característica é a rápida multiplicação de células anormais, que podem migrar para tecidos e órgãos distintos (metástase celular)¹⁷².

Essencialmente, o câncer é uma doença da mitose. Como tal, ocorre quando as células normais são transformadas em células cancerosas, que então se proliferam de forma incontrolável. As células cancerosas, oriundas de células saudáveis cujos genes foram alterados/mutados, não respondem aos sinais que controlam o desenvolvimento e a morte das células normais. Sendo assim, as células cancerosas continuam a crescer e proliferar e até invadir outras partes do corpo. No processo, algumas das células cancerosas acabam formando tumores não apenas na primeira

região a ser afetada (tumor primário), mas também resultam em crescimentos malignos secundários longe do local primário conhecido como metástase.

O câncer é o principal problema de saúde pública no mundo e já está entre as quatro principais causas de morte prematura, antes dos 70 anos, e uma das doenças com maior risco de vida no mundo. A incidência e a mortalidade vêm aumentando, em parte pelo envelhecimento da população, pelo crescimento populacional, afeta principalmente países de baixa renda e em desenvolvimento, seguida de hábitos de sedentarismo, alimentação inadequada, entre outros¹⁷³. Em 2018, a mais recente estimativa mundial, aproximadamente 18,1 milhões de novos casos de câncer (17,0 milhões excluindo câncer de pele não melanoma) e 9,6 milhões de mortes por câncer (9,5 milhões excluindo câncer de pele não melanoma) foram relatados globalmente, resultando em aproximadamente 10 milhões de mortes. O câncer de pulmão é o mais incidente no mundo, em ambos os sexos (11,6% do total de casos) e a principal causa de morte por câncer (18,4% total de mortes por câncer), seguido pelo câncer de mama feminino (11,6%) e câncer de próstata (7,1%), câncer colorretal (6,1%), câncer de estômago (8,2%) e câncer de fígado (8,2%)¹⁷⁴ (Figura 13).

Figura 13. Incidência e mortalidade do câncer



Fonte: Bioorg. Med. Chem. Lett. 2012, 22, 7002

As células cancerosas têm várias propriedades que produzem características únicas. Elas possuem membrana e conteúdo mineral diferente do das células normais, onde essas diferenciações influenciam diretamente as propriedades das células cancerosas. Essas propriedades físico-químicas são de extrema importância nos estudos de neoplasias resistente à radioterapia e quimioterapia, por exemplo¹⁷⁵.

A sinalização mitogênica em células cancerosas também se diferencia, por ser melhor compreendida¹⁷⁶. As células cancerosas podem adquirir a capacidade de sustentar a sinalização proliferativa de várias maneiras alternativas: Elas podem produzir ligantes do fator de crescimento, aos quais podem responder por meio da expressão de receptores cognatos, resultando em estimulação proliferativa autócrina¹⁷⁷. Atualmente, sabe-se que células cancerosas podem enviar sinais para que estimulam as células normais dentro do estroma associado ao tumor, para que essas forneçam às células cancerosas vários fatores de crescimento¹⁷⁸.

Com relação à biologia, a mutação no DNA cromossômico de uma célula normal, resulta em um câncer, que pode ser ocasionado devido a fatores externos, quanto internos. Entre os fatores internos está a idade, gênero, hormônios, condições imunes e mutações hereditárias. Enquanto os fatores externos, estão adoção de hábitos de vida sedentária, obesidade, fumo, álcool, contato com produtos químicos, radiação¹⁷⁹. Histologicamente, as principais diferenças entre as células saudáveis e cancerosas incluem a forma anormal com que a célula cancerosa possui, inclusive sendo incapaz de autorreparação.

A combinação de características histológicas, genéticas e epigenéticas, vêm levando a uma abordagem diagnóstica integrada e multidisciplinar, na tentativa de se estudar as interações entre a sinalização oncogênica e o metabolismo do câncer¹⁸⁰.

As principais características que diferem uma célula cancerosa de uma célula normal, compreendem seis capacidades biológicas intrínsecas, que são:

- Autossuficiência em sinais estimuladores de crescimento.
- Insensibilidade para fatores que inibem o crescimento.
- Invasão de outros tecidos e capacidade de fazer metástases.
- Potencial ilimitado de multiplicação.

- Estímulo ao desenvolvimento de novos vasos sanguíneos.
- Bloqueio dos mecanismos naturais de morte celular.

Estas características, adquiridas durante o desenvolvimento da doença em várias etapas dos tumores, são marcas registradas e constituem um princípio organizador para racionalizar as complexidades das doenças neoplásicas¹⁸¹.

Além destas características principais, é importante salientar a instabilidade do genoma, que pode gerar uma diversidade de mutantes, e a inflamação, que promove variadas funções nos tecidos. Outras características como, reprogramação do metabolismo energético e fuga da destruição imunológica, também são de extrema importância. Além das células cancerosas, os tumores podem exibir outra dimensão de complexidade: eles contêm um repertório de células recrutadas, aparentemente normais, que contribuem para a aquisição de características marcantes, criando um microambiente tumoral.

Somado à estas características, pode-se incluir também a autossuficiência na proliferação, que dependem de estimulação de fatores de crescimento, que inclusive podem ser oriundos da utilização de sinais para células normais¹⁸². Com isso, a relação da evolução progressiva de células em seu estado normal para seu estado neoplásico, está diretamente ligada à alguma destas características marcantes. Outro atributo importante é que, por terem tecidos complexos compostos de vários tipos de células distintas, os tumores participam de interações celulares heterotípicas.

Além disso, nem todos os pacientes respondem aos tratamentos, devido à resistência às drogas empregadas, ou a incidência de células cancerosas dormentes. As células cancerosas dormentes, são elusivas e podem se esconder em órgãos distantes antes de serem reativadas para causar recidiva da doença, após o tratamento bem-sucedido do tumor primário. Isso tem levado à tipos de cânceres aparentemente incuráveis.

No cenário clínico, o termo “células cancerosas em dormência” é usado para se referir ao longo tempo decorrido entre o tratamento do tumor primário e a recidiva metastática em locais secundários. Este conceito foi desenvolvido por Geoffrey Hadfield em 1954, quando ele propôs que a recorrência surgisse porque as células cancerosas dormentes entram em um estado de parada mitótica temporária¹⁸³. Este

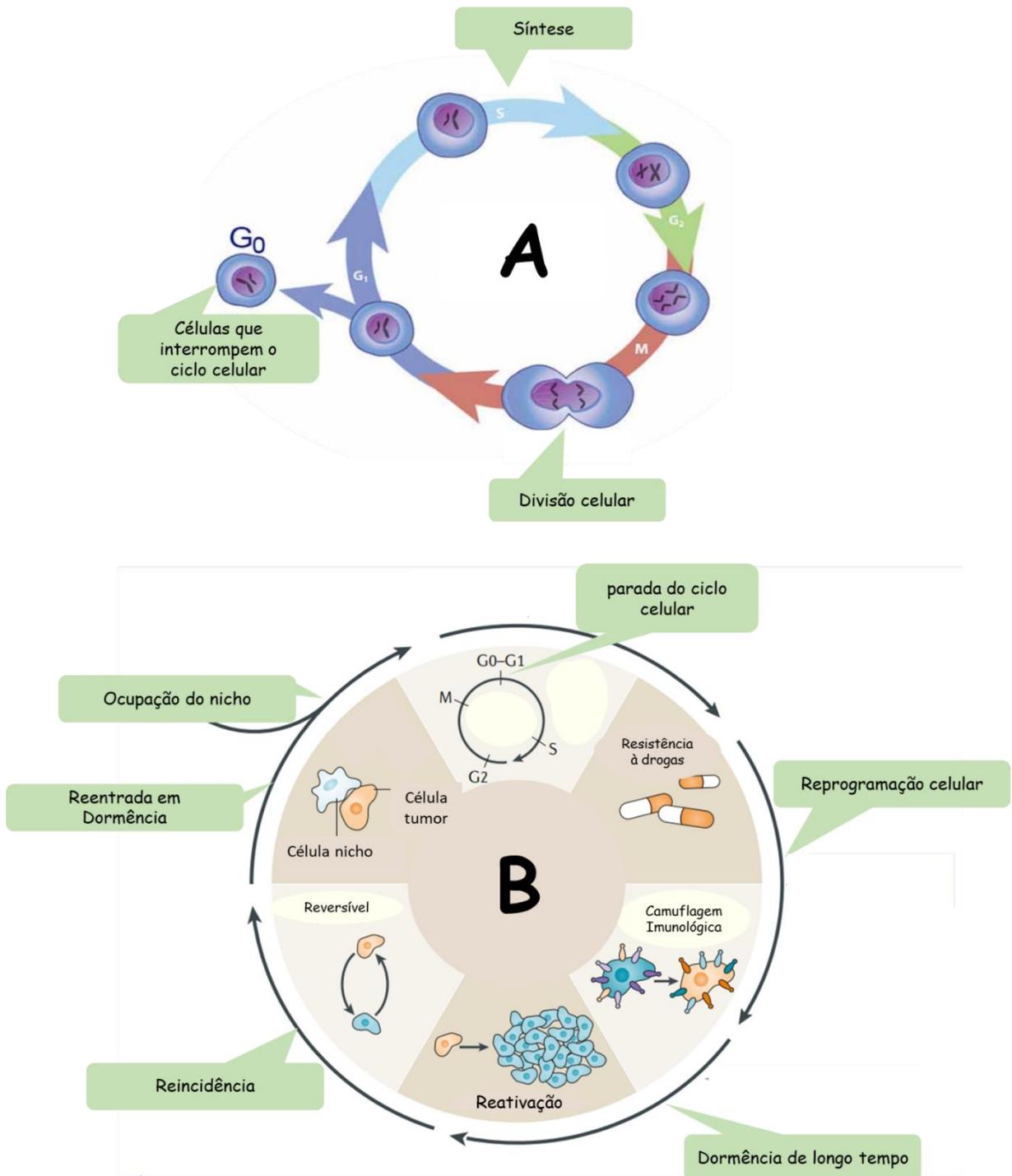
conceito de dormência do câncer vem sendo descrito para os cânceres sólidos mais comuns, incluindo câncer de mama, próstata, pulmão, cólon e rim, bem como melanoma, e também para cânceres hematológicos, como mieloma múltiplo e leucemia¹⁸⁴. Normalmente, a proliferação deste tipo de células ocorre de duas formas: de uma célula solitária que existe em um estado dormente de longo prazo; ou de pequenos agrupamentos de células ou micrometástases que existem em equilíbrio entre a proliferação e a morte celular¹⁸⁵. Por exemplo, no caso do câncer de mama positivo para receptor de estrogênio (RE), o risco de recidiva continua a aumentar continuamente por 15 anos após completar anos de terapia endócrina adjuvante¹⁸⁶. Estas células têm como características, serem raras, resistentes aos medicamentos e responsáveis pela recidiva da doença. Outra característica, é que essas células cancerosas ativadas ou dormentes estão no mesmo estágio de diferenciação celular e alternam para frente e para trás¹⁸⁷. Nesta perspectiva, as células cancerosas dormentes são células não proliferantes que sofreram parada do ciclo celular G0-G1. É importante salientar, que estas células são distintas das "células de ciclo lento", como as células-tronco cancerosas¹⁸⁸.

O estudo deste tipo de célula é de fundamental importância, uma vez que a doença metastática é responsável pela esmagadora maioria das mortes relacionadas ao câncer¹⁸⁹. Isso se deve ao fato de que, em muitos casos, os pacientes apresentam metástases muito depois do tratamento e da remoção do tumor primário.

O ciclo celular normalmente se inicia na fase G1, onde a célula aumenta de tamanho e se prepara para a replicação do DNA, que ocorre na fase de S síntese. Já na fase G2 a célula se prepara para a mitose, dando origem a novas células-filhas. Como em células cancerígenas a autopreparação não é eficiente, isso causa alteração no ciclo celular¹⁹⁰. Já no ciclo de vida da célula cancerosa dormente, as células cancerosas ocupam primeiro o nicho. Após o envolvimento das células com os receptores no nicho, as células cancerosas dormentes sofrem parada do ciclo celular G0-G1 e reprogramação celular para se adaptar ao nicho e sobreviver. Como parte dessa adaptação, as células cancerosas dormentes ativam os mecanismos de evasão imunológica, para se esconder do sistema imunológico e permitir a dormência de longo prazo. Posteriormente, essas células cancerosas dormentes são reativadas por mudanças no nicho, proliferam e se manifestam como recidiva metastática. Esses estágios são acompanhados por marcas que definem a dormência das células

cancerosas: dependência de nicho; parada do ciclo celular; resistência a droga; camuflagem imunológica; reativação; e reversibilidade. Na Figura 14 a seguir, estão representadas as etapas do ciclo celular normal (A), incluindo o ciclo das células cancerosas adormecidas (B).

Figura 14. (a) Ciclo de vida celular (b) ciclo das células cancerosas adormecidas.



Fonte: Adaptado de Phan et. Al.¹⁹¹

2.4 VIAS DE MORTE CELULAR

A característica mais marcante das células cancerosas envolve sua capacidade de proliferação crônica. Assim, tecidos normais servem para controlar a produção e liberação de sinais de promoção de crescimento, garantindo a homeostase do número de células e, portanto, a manutenção da arquitetura e função normal do tecido. As células cancerosas, ao desregulamentar esses sinais, apropriam-se destes mecanismos, que em grande parte são fatores de crescimento que se ligam aos receptores da superfície celular, tipicamente contendo domínios intracelulares de tirosina quinase. As quinases passam então a emitir sinais por meio de vias de sinalização intracelular ramificadas que regulam a progressão através do ciclo celular. Além, disso, elas controlam, também, o crescimento celular (aumento no tamanho da célula) e com isso a sobrevivência celular e o metabolismo energético.

O sequenciamento do DNA de células cancerosas revela que certos tumores humanos sofrem mutações somáticas, e que essas predizem a ativação de circuitos de sinalização, geralmente desencadeados por receptores do fator de crescimento. Destas análises, pôde-se saber, por exemplo que 40% dos melanomas humanos contêm mutações ativadoras que afetam a estrutura da proteína B-Raf, resultando na sinalização constitutiva através do Raf para a via da proteína mitogenativada (MAP)-quinase¹⁹². Da mesma forma, as mutações na subunidade catalítica das isoformas de fosfoinosítideo 3-quinase (PI3-quinase) estão sendo detectadas em uma série de tipos de tumor, que servem para hiperativar o circuito de sinalização da PI3-quinase, incluindo seu transdutor de sinal chave Akt / PKB¹⁹³. No entanto, as vantagens para as células tumorais com relação a ativação da sinalização a montante (receptor) versus a jusante (transdutor), ainda continuam sendo alvo de estudos, uma vez que esses mecanismos ainda permanecem não desvendados.

A sinalização mitogênica em células de mamíferos é realizada principalmente por fatores de crescimento via receptores localizados na membrana plasmática. Como nela, a maioria dos receptores tem um domínio de atividade da tirosina quinase, estes domínios são importantes para a interação dos fatores de crescimento além de ativar vias de sinalização que alteram os padrões de expressão gênica e induzem a mitogênese, que se desregulados estão relacionados ao câncer. Dentre esses receptores cita-se: ERBB, VEGF, PDGF e IGF. Os receptores ERBB estão frequentemente envolvidos na produção de muitos tipos de câncer. Tanto a

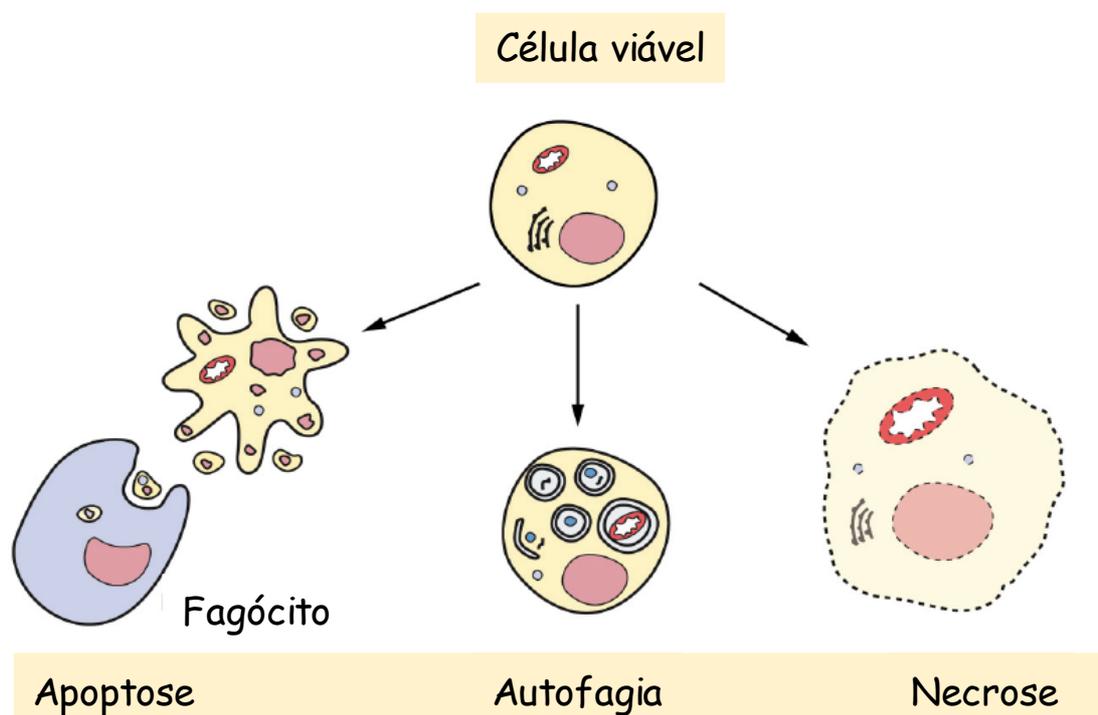
superexpressão do fator de crescimento quanto do receptor, além de mutações no domínio citoplasmático da tirosina quinase, contribuem para a sinalização constitutiva no câncer humano¹⁹⁴. O VEGF tem um papel central na manutenção do crescimento do tumor, facilitando o crescimento de novos vasos sanguíneos. Portanto, a inibição do crescimento na vasculatura tumor, interferindo na atividade do VEGFr, é agora uma alternativa real em terapias combinatórias. PDGF é um fator de crescimento envolvido no crescimento do tecido conjuntivo e na cicatrização de feridas. Mutações ativadoras de PDGFr foram encontradas em tumores gastrointestinais e a sinalização autócrina mantida por este receptor foi descrito em muitos tumores, onde o inibidor da atividade da tirosina quinase de Bcr-Abl também tem como alvo a quinase do PDGFr. Finalmente, o IGF-I e o II têm um importante papel antiapoptótico e pró-mitogênico na maioria dos tumores. Diferentes inibidores estão agora em estudos clínicos para uso em combinação de drogas quimioterápicas no tratamento de diferentes tumores. O estudo de quinases é um dos objetivos mais intensamente estudados em farmacologia, atualmente, especialmente para o câncer, devido ao seu papel crítico nas vias de sinalização¹⁹⁵. Uma vez que as proteínas quinases regulam uma variedade de vias de sinalização, elas são consideradas os principais condutores da progressão da doença em várias patologias, incluindo o câncer¹⁹⁶. Como exemplo, a desregulação da quinase JAK-3 leva ao aumento da invasão e ao crescimento progressivo no carcinoma colorretal¹⁹⁷, onde para este tratamento, o primeiro inibidor de JAK a chegar ao mercado dos EUA, foi a ruxolitiniba, aprovada em 2012¹⁹⁸. Outra proteína quinase envolvida no câncer é a GSK-3, uma serina/treonina quinase existente como duas isoformas denominadas GSK-3 α (51 KDa) e GSK-3 β (47 KDa), expressa na maioria dos tecidos e codificada por dois genes diferentes¹⁹⁹. O mecanismo pelo qual a GSK-3 afeta a transformação neoplásica e a tumorigênese permanece indefinido, no entanto, o papel da GSK-3 no câncer é amplamente investigado e, em alguns casos, sua atividade foi associada à progressão do tumor, enquanto em outros casos a supressão da atividade da GSK-3 por diferentes quinases foi associada à progressão do câncer, por meio da estabilização de componentes de o complexo β -catenina. Além disso, a GSK-3 pode ser superexpressada em vários cânceres, como tumores de cólon, fígado e pâncreas, onde a regulação negativa de GSK-3 β inibe o crescimento do câncer pancreático, angiogênese e expressão do fator de crescimento endotelial vascular²⁰⁰. Portanto, a investigação, cada vez maior, da

regulação negativa, inibição ou modulação da atividade de GSK-3 vêm sendo de fundamental importância para futuras modalidades de tratamento²⁰¹.

2.4.1 Tipos de morte celular

Com relação à morte celular, os três tipos, Apoptose, Autofagia e Necrose estão representados na Figura 15, e serão apresentados separadamente a seguir.

Figura 15. Tipos de morte celular

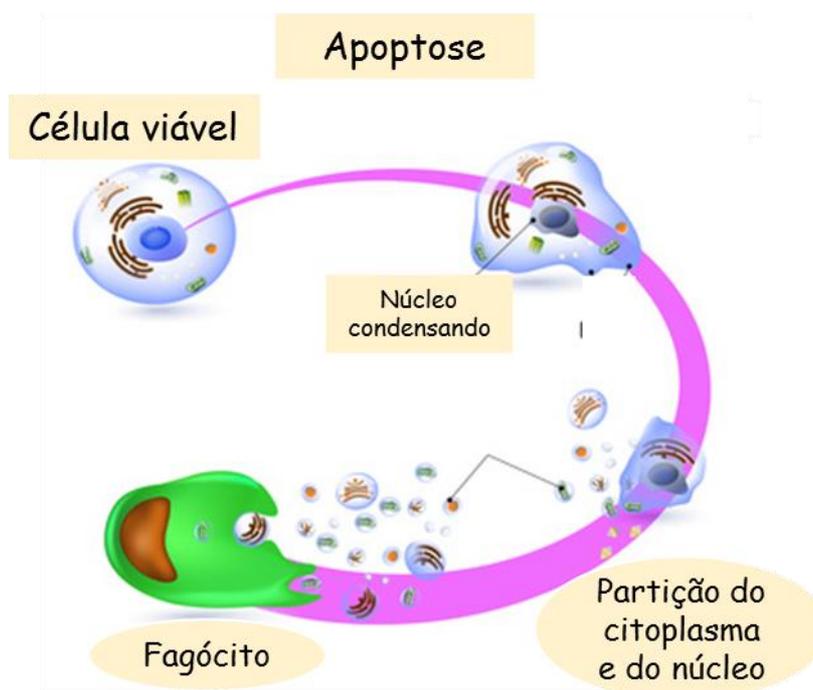


Fonte: o autor, 2020

APOPTOSE

A apoptose é um processo no qual a célula é compactada, e tem sua membrana fragmentada em corpos apoptóticos. Assim, as células tornam-se menores e podem ser fagocitadas pelas células do sistema imunológico (Figura 16). O conceito de que a morte celular programada por apoptose é uma barreira natural para evitar o desenvolvimento do câncer foi estabelecido há décadas²⁰².

Figura 16. Morte celular por apoptose



Fonte: o autor, 2020

Neste moedo, a apoptose é desencadeada em resposta a vários estresses fisiológicos que as células cancerosas experimentam durante o curso da tumorigênese ou como resultado da terapia anticâncer. Dentre as formas indutoras de apoptose, cita-se os desequilíbrios de sinalização resultantes de níveis elevados de sinalização de oncogene, e os danos ao DNA associados à hiperproliferação. Além disso, a apoptose é atenuada nos tumores que conseguem progredir para estados de malignidade de alto grau e resistência à terapia²⁰³.

No processo apoptótico, os reguladores, são divididos em dois circuitos principais, um recebendo e processando sinais de indução de morte extracelular (o programa apoptótico extrínseco, envolvendo, por exemplo, o ligante Fas / receptor Fas), e o outro detectando e integrando uma variedade de sinais de origem intracelular (o programa intrínseco). Cada um culmina na ativação de uma protease normalmente latente (caspases 8 e 9, respectivamente), que passa a iniciar uma cascata de proteólise envolvendo caspases efetoras responsáveis pela fase de execução da apoptose, na qual a célula é progressivamente desmontada e depois consumida, tanto por seus vizinhos quanto por células fagocíticas dedicadas. Atualmente, o programa

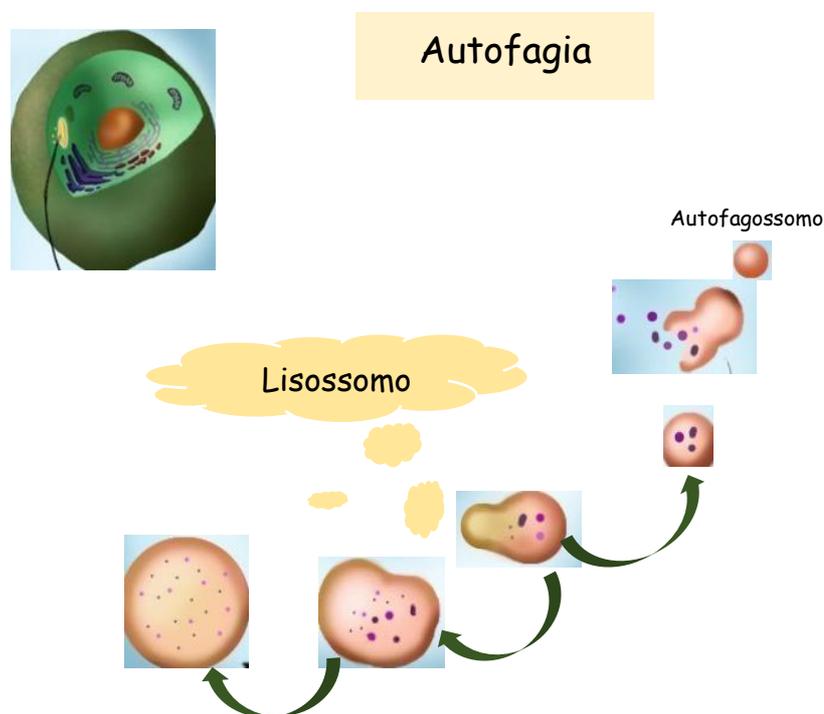
apoptótico intrínseco está mais amplamente implicado como uma barreira para a patogênese do câncer. O “gatilho apoptótico” é controlado pelos pró e antiapoptóticos da família Bcl-2 de proteínas regulatórias²⁰⁴. O arquétipo Bcl-2, junto com seus semelhantes (Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, A1) são inibidores da apoptose, agindo em grande na supressão de duas proteínas ativadoras pró-apoptóticas (Bax e Bak); os últimos estão embutidos na membrana mitocondrial externa. Quando ajudados da inibição por seus parentes antiapoptóticos, Bax e Bak rompem a integridade da membrana mitocondrial externa, causando a liberação de proteínas sinalizadoras pró-apoptóticas, das quais a mais importante é o citocromo C. O citocromo C liberado ativa, por sua vez, uma cascata de caspases que atuam por meio de suas atividades proteolíticas para induzir as múltiplas alterações celulares associadas ao programa apoptótico. Bax e Bak compartilham domínios de interação proteína-proteína, denominados motivos BH3, com as proteínas antiapoptóticas semelhantes a Bcl-2 que medeiam suas

Embora nem todas as condições celulares que desencadeiam a apoptose tenham sido completamente elucidadas, vários sensores de anormalidade que desempenham papéis importantes no desenvolvimento do tumor foram identificados. O mais notável é um sensor de danificação do DNA, que funciona por meio do supressor de tumor TP53²⁰⁵, que induz a apoptose pela regulação positiva da expressão das proteínas Noxa e Puma BH3.

AUTOFAGIA

A autofagia é uma importante resposta fisiológica celular que, como a apoptose, opera em níveis basais baixos nas células, mas pode ser fortemente induzida em certos estados de estresse celular, como, por exemplo a deficiência de nutrientes²⁰⁶. O programa autofágico permite que as células quebrem organelas celulares, como ribossomos e mitocôndrias, permitindo que os catabólitos resultantes sejam reciclados e, portanto, usados para biossíntese e metabolismo de energia. Como parte deste programa, as vesículas intracelulares denominadas autofagossomos envolvem organelas intracelulares e, em seguida, se fundem com os lisossomos onde ocorre a degradação (Figura 17). Desse modo, metabólitos de baixo peso molecular são gerados para sustentar a sobrevivência em ambientes estressados e limitados por nutrientes vividos por muitas células cancerosas.

Figura 17. Morte celular por autofagia



Fonte: o autor, 2020

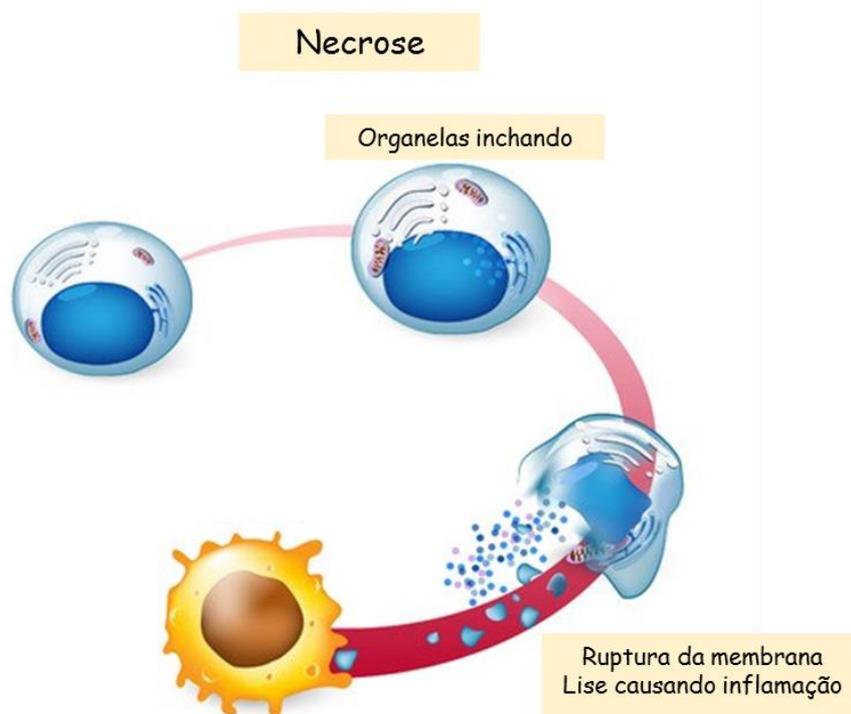
Além disso, a autofagia é capaz de atuar na homeostasia celular, que pode estar diretamente ligado ao desenvolvimento de diversas condições patológicas, incluindo o câncer²⁰⁷. Assim como a apoptose, a maquinaria de autofagia possui componentes reguladores e efetores. Estudos revelam que existem interseções entre os circuitos reguladores que regem a autofagia, apoptose e homeostase celular de proteínas que medeiam a formação de autofagossomos e entrega aos lisossomas. Por exemplo, a via de sinalização envolvendo as quinases PI3-quinase, AKT e *mTOR*, que é estimulada por sinais de sobrevivência para bloquear a apoptose, da mesma forma inibe a autofagia; quando os sinais de sobrevivência são insuficientes, a via de sinalização PI3K é regulada para baixo, com a consequência de que a autofagia e/ou apoptose pode ser induzida²⁰⁸. Outra interconexão reside na proteína Beclin-1. Beclin-1 é um membro da subfamília de proteínas reguladoras apoptóticas BH3, e seu domínio BH3 permite que ela se ligue às proteínas Bcl-2 / Bcl-xL. Proteínas BH3 acopladas a sensor de estresse podem deslocar Beclin-1 de sua associação com Bcl-2 / Bcl-xL, permitindo que Beclin-1 desencadeie autofagia da mesma forma que podem liberar Bax e Bak pró-apoptóticos para desencadear apoptose, dependendo do estado fisiológico da célula. Um fato curioso, e paradoxo, é que a restrição de

nutrientes, a radioterapia e certas drogas citotóxicas podem induzir níveis elevados de autofagia, que são aparentemente citoprotetores de células cancerosas. Isso pode, por exemplo prejudicar em vez de acentuar as ações de morte celular²⁰⁹. Isso também pode levar, por meio da autofagia, a um estado de dormência reversível²¹⁰. Esta resposta de sobrevivência pode permitir a persistência e eventual recrescimento de alguns tumores mais recentes após o tratamento com potentes agentes anticâncer. Assim, em analogia à sinalização de TGF- β , que pode ser supressora de tumor em estágios iniciais da tumorigênese e promoção de tumor posteriormente, a autofagia parece ter efeitos conflitantes nas células tumorais e, portanto, na progressão tumoral.

NECROSE

Em contraste com a apoptose, na qual uma célula que está morrendo se contrai até se tornar um corpo muito pequeno, e que logo é consumido, as células necróticas ficam inchadas (oncoses), e explodem, liberando seu conteúdo no microambiente local do tecido (Figura 18).

Figura 18. Morte celular por Necrose



Fonte: o autor, 2020

Embora a necrose seja historicamente vista muito como uma forma de morte por exaustão e colapso de todo o sistema, o cenário conceitual está mudando: a morte celular por necrose está claramente sob controle genético, e em algumas circunstâncias, pode ser um processo aleatório e não direcionado²¹¹. Além disso, e talvez mais importante, a morte celular necrótica libera sinais pró-inflamatórios no microambiente, em contraste com a apoptose e a autofagia, que são ausentes desta operação. Como consequência, as células necróticas podem recrutar células inflamatórias do sistema imunológico²¹², cuja função é agir no dano tecidual e remover os associados detritos necróticos. No contexto da neoplasia, no entanto, várias linhas de evidência indicam que as células imunes inflamatórias podem ser ativamente promotoras de tumor, uma vez que tais células são capazes de promover a angiogênese, a proliferação de células cancerígenas e a capacidade de invasão. Além disso, as células necróticas podem liberar fatores reguladores bioativos, como a IL-1a, que pode estimular diretamente a proliferação de células viáveis vizinhas, com potencial, mais uma vez, de facilitar a progressão neoplásica²¹³. Consequentemente, a morte celular necrótica, embora aparentemente benéfica para contrabalançar a hiperproliferação associada ao câncer, pode, em última análise, causar mais danos do que benefícios. Consequentemente, neoplasias incipientes e tumores potencialmente invasivos e metastáticos podem ganhar uma vantagem ao tolerar algum grau de morte celular necrótica, fazendo isso para recrutar células inflamatórias promotoras de tumor que trazem fatores estimuladores de crescimento para as células sobreviventes dentro desses crescimentos.

A necroptose, por exemplo, é um processo altamente regulado e bem compreendido a nível molecular, sendo um mecanismo de *back-up* para as células que são destinadas a morte quando a via apoptótica encontra-se comprometida (BERGHE et al., 2014; ALMAGRO; VUCIC, 2015). A ativação de receptores de morte, como rTNF, pode provocar esse subtipo de morte celular por necrose independente de caspase, mas dependente da atividade de um domínio de morte contendo quinase, o receptor 1 (RIP1, também conhecido como RIPK1) que forma o complexo RIP1-RIP3 (necrosomo) (Figura 11) (PAPATRIANTAFYLLOU, 2012).

2.4.2 Tratamento do câncer

A mortalidade por câncer é responsável por cerca de 15% das mortes causadas por neoplasia em todo o mundo²¹⁴. Por ser considerado um problema de saúde pública emergente, e por ser uma doença de tratamento dispendioso, e por poder apresentar resistência à quimioterapia em pacientes, atualmente os dados do setor de saúde voltado para essa doença tumoral se mostram cada vez mais preocupantes. Estimativas atuais mostram que no Brasil, para cada triênio 2020-2022 aponta cerca de 685 mil pessoas sejam acometidas por novos casos desta doença (Tabela 2).

Tabela 2. Incidência estimada conforme a localização primária do tumor

Homens			Mulheres		
Câncer Primário	Casos (%)		Câncer Primário	Casos (%)	
Próstata	65.840	29,2	Mama	66.280	29,7
Traqueia/Pulmão	20.520	9,1	Cólon e Reto	20.470	9,2
Cólon e Reto	17.760	7,9	Cólon do útero	16.590	7,4
Estômago	13.360	5,9	Traqueia/Pulmão	12.440	5,6
Cavidade Oral	11.180	5,0	Glândula Tiroide	11.950	5,4
Esôfago	8.690	3,9	Estômago	7.870	3,5
Bexiga	7.590	3,4	Ovário	6.650	3,0
Laringe	6.470	2,9	Corpo do útero	6.540	2,9
Leucemias	5.920	2,6	Linfoma não-Hodgkin	5.450	2,4
Sistema Nervoso Central	5.870	2,6	Sistema Nervoso Central	5.220	2,3
Total	225.460		222.980		

Fonte: Adaptado de INCAQ 2020 - <https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>.

O câncer representa uma doença de difícil tratamento, por ser uma doença invasiva, de caráter genético e/ou epigenético e seu crescimento desordenado de células mutadas. Apesar do avanço científico para o combate ao câncer e qualidade no tratamento a incidência de câncer vem crescendo nas últimas décadas²¹⁵

Dos principais métodos atuais para o tratamento de câncer, pode-se citar a cirurgia, quimioterapia, radiação- γ (radioterapia) e imunoterapia ou terapia genética, onde a quimioterapia é o método mais eficaz para o tratamento de tumores metastáticos²¹⁶.

Os primeiros tratamentos de pessoas acometidas com câncer, em meados de 1950, eram feitos através da remoção do tumor por cirurgia. No entanto, essa é, atualmente, apenas uma das alternativas para o tratamento de neoplasia²¹⁷, e de acordo com o tipo e o estágio em que a doença se encontra, a quimioterapia é uma das alternativas mais empregadas, ainda que esta seja combinada com outras técnicas de forma concomitante.

A terapia por radiação- γ é uma alternativa bastante eficaz para o tratamento de tumores locais. Nela, a radiação é incidida nos tumores malignos, onde a destruição do tumor ocorre pela absorção de energia da radiação. Neste procedimento, o objetivo é causar dano e coibir o crescimento de células cancerosas²¹⁸.

Na radioterapia, os efeitos da radiação são previamente quantificados de acordo com a dose, que leva em consideração a energia aplicada por unidade de massa, tendo o gray (1Gy = 1J/kg) como unidade no S.I., onde um gray é a absorção de 1 J de radiação por 1 kg de matéria²¹⁹. Normalmente, as células tumorais são mais susceptíveis a este tipo de radiação do que as células saudáveis, devido ao se dividirem com mais frequência. No entanto, como elevadas doses de radiação são necessárias para erradicar o tumor (da ordem de 50 a 100 Gy), normalmente, tecidos saudáveis também são comprometidos. O desenvolvimento de técnicas de imagem extremamente sensíveis, em conjunto com o avanço da radio-biologia tem impulsionado este tipo de tratamento. A saber, da maioria dos pacientes submetidos a essa terapia, 40% apresentam resultado de cura²²⁰.

A combinação da radioterapia com a cirurgia, por exemplo, pode ser realizada, no intuito de reduzir o tamanho do tumor, e diminuir a área de incisão cirúrgica (terapia neoadjuvante), quando realizada antes do processo cirúrgico. Já quando a radiação é aplicada depois da cirurgia (terapia adjuvante), a intenção é destruir células cancerosas residuais²²¹. Apesar de eficaz, essa combinação de técnicas não é indicada para tratamento de câncer em fase metastática. Para esse tipo de situação, o mais aconselhável é o uso da quimioterapia²²².

A quimioterapia, diferente da cirurgia e da radioterapia, é uma técnica empregada para tratar a doença de forma sistêmica. Esse tratamento consiste na administração de drogas que impedem, seletivamente, o crescimento e a multiplicação de células malignas, em todo o corpo. No entanto, devido a muitos fármacos empregados nessa terapia se apresentarem com alta toxicidade, afetando também tecidos saudáveis, esses possuem uma faixa estreita entre a dose mínima necessária para um tratamento eficiente da doença, e a dosagem tóxica permitida²²³.

Deve-se notar, também, que a quimioterapia, eficaz contra alguns tipos de câncer, pode envolver a utilização de um único tipo de fármaco, ou a combinação de dois ou mais agentes, a chamada quimioterapia combinada. Esses regimes de combinação vêm apresentando resultados mais eficazes diminuindo o fator de resistência às drogas e atingindo células em diferentes fases do seu ciclo. Esse tipo de tratamento pode compreender agentes derivados de fontes naturais e sintéticas. Um exemplo é a combinação terapêutica do produto microbiano Bleomicina, o produto de origem vegetal etoposídeo e o agente sintético cisplatina, que desempenhou um papel significativo no aumento da taxa de cura de câncer testicular disseminado de 5% em 1974 para 90% em 2011²²⁴.

A terapia combinada apresenta vantagens importantes sobre a monoterapia no tratamento do câncer²²⁵. Uma delas, é que o uso de diferentes modalidades terapêuticas pode atuar de forma aditiva ou sinérgica. Com isso, além de aumentar a eficiência da terapia, o risco de formação de resistência pode ser reduzido. Outra vantagem é a diminuição de efeitos colaterais, devido às doses reduzidas de quimioterápicos tóxicos²²⁶.

No entanto, as características de resistência a múltiplas drogas das células cancerígenas e os efeitos colaterais dos medicamentos ainda são grandes obstáculos ao sucesso do tratamento durante o processo de quimioterapia²²⁷.

A imunoterapia ou terapia biológica é o tratamento do câncer por meio de uma indução do sistema imunológico. Ela ocorre pela ativação do sistema imunológico do paciente, que induz uma resposta eficiente de destruição das células cancerosas. As imunoterapias são classificadas como imunoterapias de ativação, enquanto as imunoterapias que reduzem ou suprimem são classificadas como imunoterapias de supressão²²⁸. Estas terapias vêm, recentemente, se tornando uma alternativa viável e de grande potencial biotecnológico para pesquisadores, médicos e empresas farmacêuticas, para o tratamento de vários tipos de câncer²²⁹.

Esta abordagem explora o fato de que, frequentemente, as células cancerígenas possuem moléculas em sua superfície (antígenos tumorais) que podem ser detectadas pelo sistema imunológico. Uma grande quantidade de cânceres humanos tem antígenos incluindo linfoma de Burkitt, neuroblastoma, melanoma maligno, osteossarcoma, carcinoma de células renais, cancro de mama, câncer de próstata, cânceres pulmonares e câncer de cólon²³⁰.

A resposta a imunoterapia envolve os linfócitos e anticorpos dentre outros elementos. Os linfócitos T auxiliares, células T citotóxicas, células T reguladoras, células B, células naturais killer e células apresentadoras de antígenos (APC, antigens presenting cell) são múltiplos componentes de respostas celular que se comunicam entre si via interação célula-célula mediada por diversas moléculas de adesão e receptores existentes na superfície celular e proteínas, denominadas citocinas.

Os antígenos são capazes de gerar uma resposta imunológica eficiente no combate as células tumorais (produtos de oncogênese ou supressores de tumores). No processo de transformação celular, as células passam a expressar, de maneira desregulada, proteínas envolvidas no ciclo celular, como por exemplo Ras, BCR-ABL e p53. Os linfócitos T CD+ são capazes de reconhecer estes antígenos nas superfícies das células tumorais e desenvolver uma resposta citotóxica²³¹.

3 OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

- Purificar e investigar a atividade anticâncer do principal componente da fração EB1 (fração mais ativa) obtida de um extrato metanólico e produzida por *Streptomyces hygroscopicus* ACTMS-9H, e estudo de possíveis mecanismos de ação citotóxica *in vitro* e *in silico*.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Fracionar a fração EB1 e isolar o composto responsável pela atividade;
- Identificar a substância química presente na fração EB1, empregando técnicas espectroscópicas (RMN e IV) e espectrométricas (Massas de alta resolução);
- Avaliar a atividade citotóxica da substância isolada frente a células tumorais e células mononucleares de sangue periférico humano;
- Analisar a via de morte celular por citometria de fluxo e microscopia eletrônica;
- Testar a substância isolada frente a proteínas quinases;
- Realizar estudo de docking da substância isolada nos alvos moleculares (quinases) mais ativos nos testes *in vitro*;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS E SOFTWARES UTILIZADOS

4.1.1 Equipamentos

- Balança analítica
- Citômetro de fluxo
- Coluna cromatográfica (250 mm x 4,6 mm) e (100 mm x 3,5mm) de vidro
- Contador manual
- Espectrofotômetro de placas
- Espectrômetro de massas de alta resolução
- Capela de fluxo laminar
- Incubadora de células com CO₂
- Microscópio óptico
- Pipetas automáticas
- Sistema HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência ou CLAE)
- Agitador magnético com aquecimento
- Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear RMN
- Aparelho de Infravermelho
- Polarímetro
- Equipamento de ponto de fusão

4.1.2 Reagentes e solventes

- Acetato de Etila
- *n*-hexano
- Sílica gel 70-230 mesh
- Acetonitrila grau analítico
- Diclorometano
- Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), Sigma

- Sulfato de Magnésio anidro
- Dimetilsulfóxido (DMSO)
- Etanol
- Meio de cultura para células RPMI e DMEM
- Rodamina 123
- Soro fetal bovino (SFB)
- Doxorubicina
- Elaiofilina
- Nigericina

4.1.3 Análise estatística

Os valores de citotoxicidade em concentração única e os ensaios de avaliação antiproliferativa, realizados em triplicatas, foram calculados usando o programa Graphpad Prism versão 5.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA). Os resultados das reações em triplicata estão expressos pela média \pm desvio padrão. Os valores da CI_{50} , com seus intervalos de confiança de 95% foram calculados a partir da regressão não linear, utilizando o software GraphPad Prism 5.0. A citometria de fluxo foi realizada em um sistema de citômetro de fluxo C6 com precisão BD e os resultados foram analisados usando o software C6 BD preciso. A adição de átomos de hidrogênio ausentes e a geração da conformação 3D para a Nigericina foram feitas usando o software Marvin Sketch 20.10.0., e os cálculos de docking molecular foram realizados usando o software AutoDock 4.2. Para analisar as interações intermoleculares presentes nas soluções de docking o software BINANA foi utilizado. O software PyMol foi usado para gerar as imagens de interações moleculares, onde as distâncias estão em Angstrons (Å).

4.2 CÉLULAS

As linhagens de células utilizadas nos testes *in vitro* estão listadas na Tabela 3.

Tabela 3. Linhagens de células de câncer utilizadas

Código*	Tipo Histológico	Fonte	Origem
HCT 116	Carcinoma de colon	Banco de células do Rio de Janeiro.	Humano
MCF 7	Carcinoma de mama	Banco de células do Rio de Janeiro.	Humano
NCI H292	Carcinoma de pulmão	Banco de células do Rio de Janeiro.	Humano
HL 60	Leucemia promielocítica aguda	Banco de células do Rio de Janeiro.	Humano
P 815	Mastocitoma murino	Banco de células do Rio de Janeiro.	Murina - Camundongos
L 929	Fibroblasto de camundongo	Banco de células do Rio de Janeiro.	Humano
PBMC	Linfócitos e monócitos	Cultura primária	Humano

*Código universal de linhagens de células.

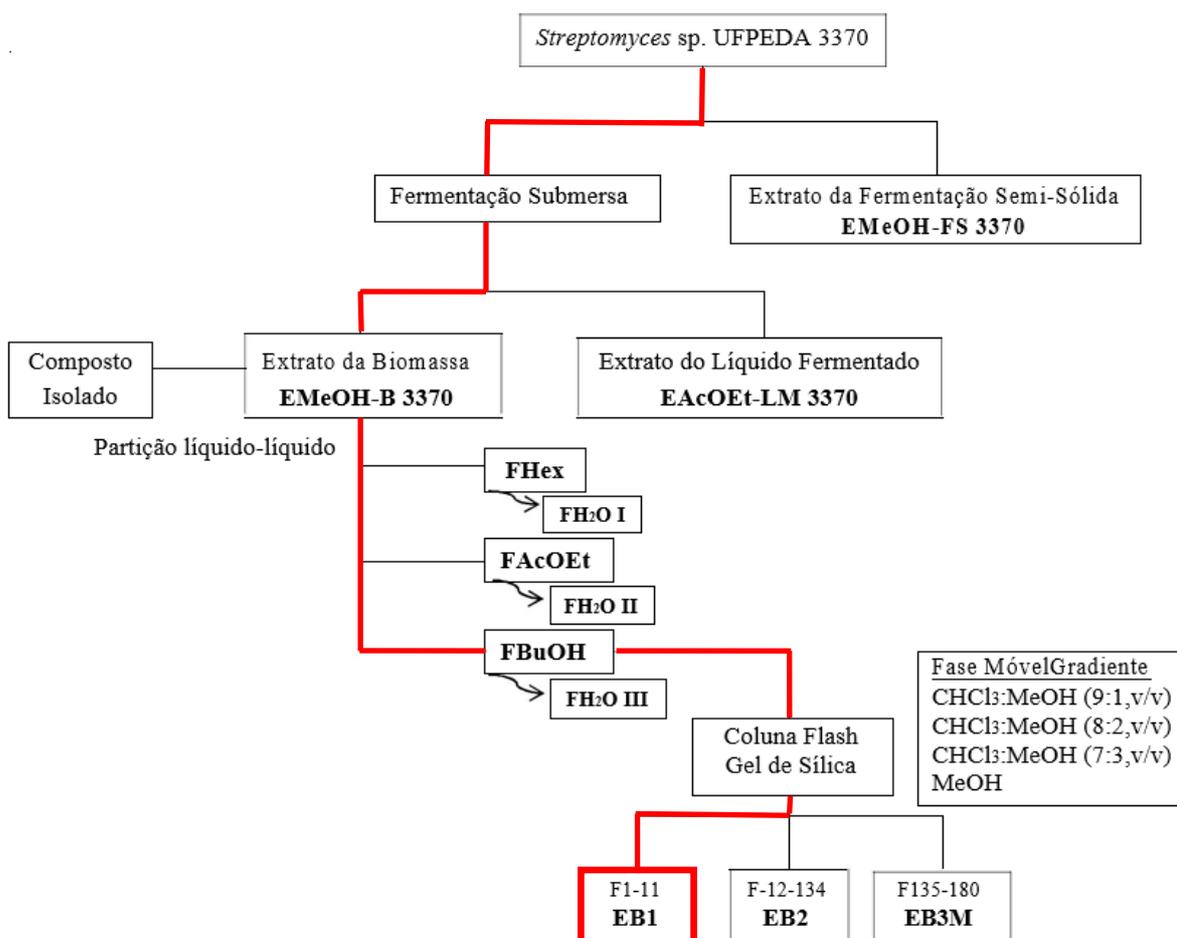
Fonte: o autor, 2020

4.3 METODOLOGIA

4.3.1 Extrato eb1 de *streptomyces sp. ufpeda 3370*

O extrato EB1, que corresponde à fração extraída com Metanol da biomassa obtida da fermentação de *Streptomyces hygroscopicus* ACTMS-9H, estava armazenada na coleção de extratos brutos da coleção de metabólitos do Laboratório BIOFARMATOX da Universidade Federal de Pernambuco. Esse extrato estava acondicionado em um freezer, em temperatura de -20 °C. A obtenção do extrato EB1 foi realizado previamente pelo grupo. Após processo de fermentação, e posterior fracionamento dos metabólitos Bioativos, estes extratos brutos foram alvo de estudo da tese da aluna Sandrine Maria de Arruda Lima sob a orientação da Professora Teresinha Gonçalves da Silva. A figura 19 ilustra o processo de obtenção do extrato EB1.

Figura 19. Fluxograma da obtenção de *Streptomyces sp. UFPEDA 3370*.



Fonte: adaptado de *Appl Microbiol Biotechnol.* **2017**, 101, 711.²³²

4.3.2 Obtenção da nigericina por purificação da fração eb1

Para purificar a substância principal presente na fração EB1, fração obtida previamente pelo grupo através da fermentação da linhagem bacteriana *Streptomyces hygrosopicus* ACTMS-9H, uma purificação em coluna de sílica foi realizada. Para isso, uma massa sólida contendo a fração EB1 (1,0 g) foi transferido para um balão de fundo redondo com capacidade para 10 mL, e a ele foram adicionados, sequencialmente, metanol (3 mL) e sílica (1,0 g). Após agitação magnética por cerca de 10 minutos, o metanol foi removido em um evaporador rotativo, sob vácuo, e o material suportado em sílica foi cuidadosamente colocado sob uma coluna de vidro (25 cm x 2,5 cm), previamente preenchida com sílica (10,0 g). Uma substância foi então purificada empregando uma mistura de *n*-hexano/acetato de etila (1:1, 50%) como eluente, onde as frações que apresentaram F.R. = 0,75 foram combinadas. Essas frações foram então concentradas em um evaporador rotativo, sob vácuo, e tiveram a remoção total do solvente após operação em uma bomba de alto-vácuo. Destas operações, um sólido cristalino amarelo muito claro (0,3 g) foi obtido. Posteriormente esta substância foi identificada como nigericina.

Dados analíticos da nigericina: Sólido amarelo claro; Rendimento = 30% m/m (0,3 g); ponto de fusão = 183-185 °C; $[\alpha]_D = +4.2^\circ$ (c 0.4, MeOH) $[\alpha]_D$ da literatura = $+36.2^\circ$ (c 1.0, CHCl₃); Infravermelho (cm⁻¹): 3378, 2969, 2877, 1722, 1460, 1378, 1117, 1044, 957; Massa (m/z) encontrada para C₄₀H₆₈O₁₁Na = 747,4655, obtida por espectrometria de massas de alta resolução (HRMS, ionização por electrospray). Em acordo com o valor calculado de 747,4659.

4.3.2 Purificação da elaiofilina da fração EB1

Da mesma etapa de purificação da fração EB1, como mencionado anteriormente, pôde-se obter 0,02 g de outra substância (elaiofilina) como um sólido cristalino branco. Para esta etapa, um aumento na polaridade do solvente empregado foi feito para *n*-hexano/acetato de etila (1: 2), onde então as frações com F.R. = 0,2 foram separadas. Dados analíticos da elaiofilina: Sólido branco; Rendimento = 2% m/m (0,02 g); ponto de fusão = 179-183 °C; $[\alpha]_D = -102$ (c 0.1, MeOH).

4.3.3 Atividade antiproliferativa

4.3.3.1 Células tumorais

As linhagens de células HCT 116, HL 60 e MCF 7 foram cultivadas em meio RPMI-1640 e as linhas de células cancerosas NCIH 292, P 815 e L 929 foram cultivadas em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM). Ambos os meios foram suplementados com soro fetal bovino (FBS), em concentração final de 10%, e suplementados com penicilina, estreptomicina como antibióticos (1%) e glutamina (1%). Em seguida, os meios foram incubados na presença de atmosfera de CO₂ (5%) por 24 horas, tendo sua temperatura monitorada e mantida a 37° C.

4.3.3.1.1 Avaliação da atividade citotóxica da nigericina (concentração única)

Inicialmente foi feita uma triagem da atividade citotóxica da nigericina utilizando uma concentração única (25 µg/mL). Neste ensaio, após contagem das células em Neubauer, as mesmas foram plaqueadas em microplacas de 96 poços na concentração de 3x10⁶ e mantidas sob incubação na presença de atmosfera de CO₂ (5%) a 37 °C por 24 horas. Após período de incubação, uma solução de nigericina purificada, previamente preparada em DMSO a 1% foi adicionada (concentração final de 25 µg/mL). As microplacas foram então incubadas por um período de 72 horas a 37 °C. Após permanecer incubada por 72 h, ao meio foram adicionados 25 µL de MTT (de uma solução 5 mg/mL) em cada poço, e a placa permaneceu em incubação por um período adicional de 3 horas. Em seguida, o excesso de MTT foi aspirado, seguido da adição de 100 µL de DMSO para solubilizar os cristais de formazan. As microplacas lidas em espectrofotômetro, e a detecção foi medida a 560 nm. Os ensaios foram realizados em quadruplicatas, usando doxorrubicina (5 µg/mL) como controle positivo, e a inibição calculada usando *Graphpad Prism* versão 5.0 para Windows (*GraphPad* Software, San Diego, Califórnia, EUA).

4.3.3.1.2 Determinação da *ci50* frente a células hct 116

A atividade citotóxica da Nigericina foi realizada, empregando diferentes concentrações da substância pelo ensaio MTT. As células HCT 116 foram empegadas em concentração de 3 ×10⁵ células/mL, e foram plaqueadas e incubadas por 24 h a 37 °C. Após período de incubação, uma solução de nigericina em DMSO (concentração de 1%) foi pipetada para as microplacas de 96 poços, onde as

concentrações variaram de 0,0007 μ g/mL até 25 μ g/mL. Nesta etapa, o meio empregado para as linhagens de células HCT 116, HL 60 e MCF 7 foi o RPMI-1640, já para as células NCIH 292, P 815 e L 929, o meio empregado foi o DMEM. O procedimento seguiu a metodologia descrita no item 4.3.3.1.1. Após as placas terem sido incubadas a 37 °C por um período adicional de 72 horas, MTT foi adicionado (25 μ L, de uma solução de 5mg/mL). O meio reacional foi então deixado reagir sob incubação durante 4 horas, centrifugado por 10 minutos a 1500 rpm, e aspirado para retirada do excesso de MTT no sobrenadante. Para calcular a viabilidade celular, 100 μ L de DMSO foram adicionados para dissolver os cristais de formazan formados, onde em seguida foi realizada a leitura do soluto em um espectrofotômetro de placa usando um comprimento de onda de 560 nm.

Os ensaios foram realizados em triplicata, empregando a doxorrubicina como controle positivo, onde a concentração correspondente à 50% de inibição da viabilidade (CI₅₀) foi calculada por análise de regressão usando *Graphpad Prism* versão 5.0 para Windows (*GraphPad Software*, San Diego, Califórnia, EUA).

4.3.3.2 Isolamento de células pbmcs

As células de PBMC (*peripheral blood mononuclear cells*) que incluem linfócitos e monócitos, foram obtidas a partir de coleta de sangue periférico humano, de voluntários saudáveis de meia-idade. A coleta do sangue foi realizada em frascos heparinizados, por profissionais capacitados da UFPE (Unidade do hospital da Universidade Federal de Pernambuco), utilizando seringas esterilizadas e descartáveis com volume de 5 mL, de acordo com as normas aprovadas pelo Comitê de ética em pesquisa com seres humanos da Universidade Federal de Pernambuco (processo nº 61757616.0.0000.508).

Neste ensaio, a amostra de sangue periférico foi transferida assepticamente para tubos com capacidade para 50 mL, seguido de lavagem com solução salina (NaCl 0,85% + CaCl₂ 10 mM), e centrifugação (3000 rpm, 5 min). Em seguida, 3 mL de Ficoll foram adicionados, onde o meio foi centrifugado por 30 minutos a 1500 rpm, empregando gradientes Ficoll-Hypaque® (Sigma-Aldrich, Reino Unido). Após centrifugação, as células foram colhidas, lavadas com tampão fosfato (PBS) até o volume de 11 mL e centrifugado por 20 min a 1000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de linfócitos ressuspendido em 2 mL de meio RPMI 1640,

suplementado com 20% de soro fetal bovino, 100 U/mL penicilina, 100 µg/mL estreptomicina. Utilizando câmara de Neubauer, as células foram contadas e plaqueadas em placa de 96 poços na concentração de 1×10^6 e mantidas sob incubação na presença de atmosfera de CO₂ (5%) a 37 °C por 24 horas.

4.3.3.2.1 Avaliação da nigericina contra células pbmc em concentração única

Às células mononucleares do sangue periférico, mantidas a 37 °C, por 24 horas em meio RPMI-1640, foi adicionada Nigericina, previamente dissolvida em DMSO e pipetada para os poços, para uma concentração final de 25 µg/mL. Em seguida, as placas de poços foram incubadas nos mesmos 37 °C por um período adicional de mais 72 horas, onde então foi adicionado MTT (25µL, de uma solução de 5mg/mL). O meio reacional foi deixado reagir durante 4 horas, centrifugado por 10 minutos a 1500 rpm, e então aspirado para retirada do excesso de MTT no sobrenadante. Para calcular a viabilidade celular, 100 µL de DMSO foram adicionados para dissolver os cristais de formazan formados, onde em seguida foi realizada a leitura do soluto em um espectrofotômetro de placa usando *Graphpad Prism* versão 5.0 para Windows (*GraphPad Software*, San Diego, Califórnia, EUA) usando um comprimento de onda de 560 nm. Para comparação, os ensaios foram realizados em triplicata usando doxorubicina (5 µg/ml) como controle positivo.

4.3.3.2.2 Avaliação da nigericina contra viabilidade celular de pbmc

Para determinar a viabilidade celular, às células mononucleares do sangue periférico, mantidas à 37 °C por 24 horas, foi adicionado uma solução de Nigericina, previamente dissolvida em DMSO. A solução foi pipetada para microplacas de 96 poços, onde a concentração final da Nigericina variou de 0,0007µg/mL até 25µg/mL (concentração final), em meio RPMI-1640. Em seguida, as placas de poços foram incubadas nos mesmos 37 °C por um período adicional de mais 72 horas, onde então foi adicionado MTT (25µL, de uma solução de 5mg/mL). O meio reacional foi deixado reagir durante 4 horas, centrifugado por 10 minutos a 1500 rpm, e então aspirado para retirada do excesso de MTT no sobrenadante. Para calcular a viabilidade celular, 100 µL de DMSO foram adicionados para dissolver os cristais de formazan formados, onde em seguida foi realizada a leitura do soluto em um espectrofotômetro de placa usando um comprimento de onda de 560 nm. Os ensaios foram realizados em triplicata, empregando a doxorubicina como controle positivo, onde as análises de regressão

foram realizadas usando *Graphpad Prism versão 5.0* para Windows (*GraphPad Software*, San Diego, Califórnia, EUA).

4.3.3.2.3 Ensaio de morte celular por anexina V/iodeto de propídio

Para realizar o ensaio de morte celular empregando anexina V/iodeto de propídio (IP), uma suspensão de células de carcinoma de cólon humano (HCT 116), mantidas à 37 °C por 24 horas e contendo $0,3 \times 10^6$ células/mL foi plaqueada em uma microplaca de 24 poços, e submetidas à reação de coloração usando um kit anexina V-FITC (AnnV-FITC) (Calbiochem), de acordo com às recomendações do fabricante. Após transferir o reagente AnnV-FITC ao meio celular, o mesmo foi incubado a uma temperatura de 37 °C, por 48 h, na presença de 5% de CO₂, e exposto a diferentes concentrações de nigericina (concentração da CI₅₀, metade da CI₅₀ e duas vezes a CI₅₀).

4.3.4.3 Microscopia eletrônica de transmissão

Para realizar os ensaios de microscopia eletrônica de transmissão, uma suspensão de células HCT 116 ($0,3 \times 10^6$ células/mL) foi empregada. Assim, tanto células controle quanto células tratadas por 48 h com a concentração de 0,0138 µM de Nigericina foram empregadas. Após o período de incubação, as células foram fixadas por 2 h com uma solução contendo glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 4%, em solução tampão cacodilato 0,1M. Após fixação, as amostras foram lavadas duas vezes no mesmo tampão e pós-fixadas em uma solução contendo tetróxido de ósmio 1%, cloreto de cálcio 2 mM e ferricianeto de potássio 0,8%, em pH 7,2. O meio reacional foi então desidratado em acetona e incorporado usando um kit Fluka Epoxy Embedding (Fluka Chemie AG, Buchs, Suíça). A polimerização foi realizada a 60 °C durante 24 h, onde cortes ultrafinos (70 nm) foram colocados em grades de níquel de 300 mesh e, em seguida, contrastados com acetato de uranila a 5% e citrato de chumbo. A amostra foi então analisada por microscopia eletrônica de transmissão (Tecnai Spirit Biotwin, FEI Company, Hillsboro, OR, EUA).

4.3.4.4 Ensaio de inibição de quinase

A atividade da quinase foi realizada, empregando a proteína como substrato na presença de ATP (10 µM), em um volume final de 6 µL, usando o kit de ensaio ADP-GloTM e o tampão MgCl₂ 10 mM, EGTA 1 mM, DTT 1 mM, Tris-HCl 25 mM pH 7,5,

heparina 50 $\mu\text{g/mL}$. No ensaio, os controles foram realizados com diluições apropriadas de DMSO, onde os substratos peptídicos foram obtidos da Proteogenix (Schiltigheim, França). Um painel de cinco proteínas quinases recombinantes foi usado durante este estudo: HsCDK9/CyclinT; HsGSK3- β ; HsCK1 ϵ ; HsJAK3 e HsABL1. Todas as proteínas, de origem humana, foram expressas via DNA Recombinante em baculovírus empregando células de inseto Sf9.

4.3.5 Estudo in silico

As estruturas de JAK3 e GSK3- β foram obtidas através do repositório *Protein Data Bank* (rcsb.org), sob os códigos 6AAK e 1Q41, respectivamente. A estrutura da nigericina foi obtida no banco de dados *DrugBank* (drugbank.ca, código: DB14056). Para fins de comparação em abordagens *in silico*, as moléculas peficitinibe (que é a referência como ligante cocrystalizado na estrutura 6AAK) e indirubina (um derivado monoximal, que é a referência como ligante cocrystalizado na estrutura 1Q41) também foram usadas. A adição de átomos de hidrogênio ausentes e a geração da conformação 3D para a nigericina foram feitas usando o software *Marvin Sketch* 20.10.0. Os cálculos de docking molecular foram realizados usando o software *AutoDock* 4.2, usando valores aumentados para dois parâmetros importantes da busca do algoritmo genético: i) ga_run: aumentado de 10 para 50; e ii) ga_num_evals: aumentou de 2.500.000 para 25.000.000. As coordenadas centrais da caixa da grade do espaço de busca foram definidas nos respectivos ligantes cocrystalizados para cada alvo, e o valor padrão (0,375 Å) para o espaçamento entre os pontos da grade foi usado. Para JAK3: coordenadas centrais determinadas pelo ligante peficitinibe (Center X: 39.439, Center Y: 6.199 e Center Z: 36.168) e o tamanho do espaço de busca foi definido como um cubo de 40 pontos em cada dimensão (40 x 40 x 40). Para GSK3- β : coordenadas centrais determinadas pelo ligante indirubin-3'-monoxime (Center X: 11.811 Center Y: -38.319 e Center Z: 49.192) e o tamanho do espaço de busca foi definido como um retângulo (40 x 54 x 62). A adição de hidrogênios polares, cargas gasteiger e ramos de torção, para todos os ligantes, foram obtidos usando o software *AutoDock Tools* [57]. A fim de levar em consideração alguns graus de liberdade importantes do receptor e, assim, simular melhor o fenômeno de ajuste induzido na farmacodinâmica, os seguintes resíduos de aminoácidos foram tratados como flexíveis durante os cálculos: i) para JAK3, os resíduos LEU828, VAL884, TYR904, ARG953, ASN954, LEU956 e ASP967; e ii) para GSK3- β , os resíduos

LYS85, LEU132, THR138, ARG141, LEU188, CYS199 e ASP200. Em seguida, o software BINANA foi utilizado para analisar as interações intermoleculares presentes nas soluções de docking. Finalmente, o software PyMol foi usado para gerar as imagens de interações moleculares. Todas as ligações de hidrogênio são apresentadas em distâncias doador-aceitador e estão medidas em Angstroms (Å).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PURIFICAÇÃO DA NIGERICINA A PARTIR DO EXTRATO EB1

Para isolar as substâncias contidas na fração EB1, fração mais ativa presente na fermentação da linhagem bacteriana *Streptomyces* sp. UFPEDA 3370,²³² uma análise qualitativa prévia em CCD foi realizada. Nela, foi possível observar a presença de duas substâncias (Figura 20). Esta operação foi necessária não apenas para verificar a existência das substâncias, mas também para dimensionar a melhor polaridade da mistura de solventes a ser empregada na purificação dos compostos em coluna de sílica.

Figura 20. Da esquerda para a direita elaiofilina (padrão) e a fração EB1. Eluente *n*-hexano/acetato de etila (1:1)



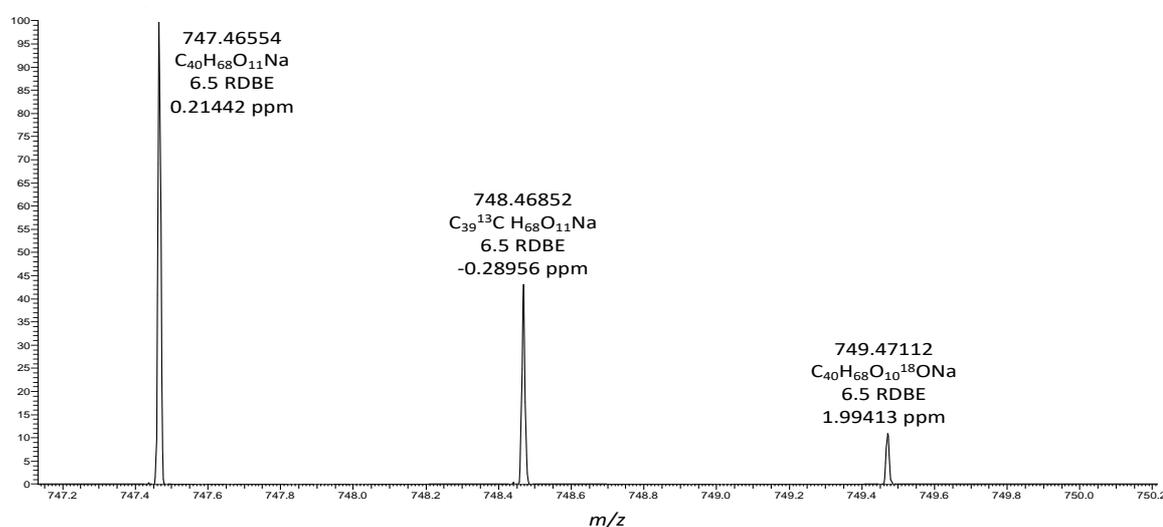
Fonte: o autor, 2020

Primeiramente, os componentes foram purificados usando uma mistura de *n*-hexano/acetato de etila (1:1) como eluente. Por termos o padrão da Nigericina no laboratório (F.R = 0,2), as frações com F.R. = 0,75 foram combinadas onde se obteve um sólido cristalino amarelo muito claro. De forma surpreendente, a purificação dos compostos em coluna de sílica levou a obtenção da Nigericina em grande proporção em relação à massa do extrato EB1 bruto (30% m/m). Ou seja, em 100% do extrato bruto, foi possível purificar 30% em massa de Nigericina. Esse fato foi determinante para darmos continuidade ao trabalho, uma vez que vários experimentos seriam necessários para determinar se esta substância teria potencial frente às células de câncer em ensaios bioquímicos.

5.2 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DA NIGERICINA COMO ÁCIDO LIVRE

Após a obtenção de 300 mg do composto puro (300 mg), iniciou-se a caracterização completa da estrutura da substância, com análise por espectrometria de massa de alta resolução, utilizando fonte de ionização por electrospray. A análise dos dados do composto mostrou uma boa resposta de ionização no modo positivo (ESI+), com um pico com $m/z = 747,46554$. Essa massa levou a fórmula molecular $C_{40}H_{68}O_{11}Na$, confirmada pelo padrão isotópico $748,46852 m/z$ e $749,47112 m/z$, para os isótopos ^{13}C e ^{18}O , respectivamente (Figura 21).

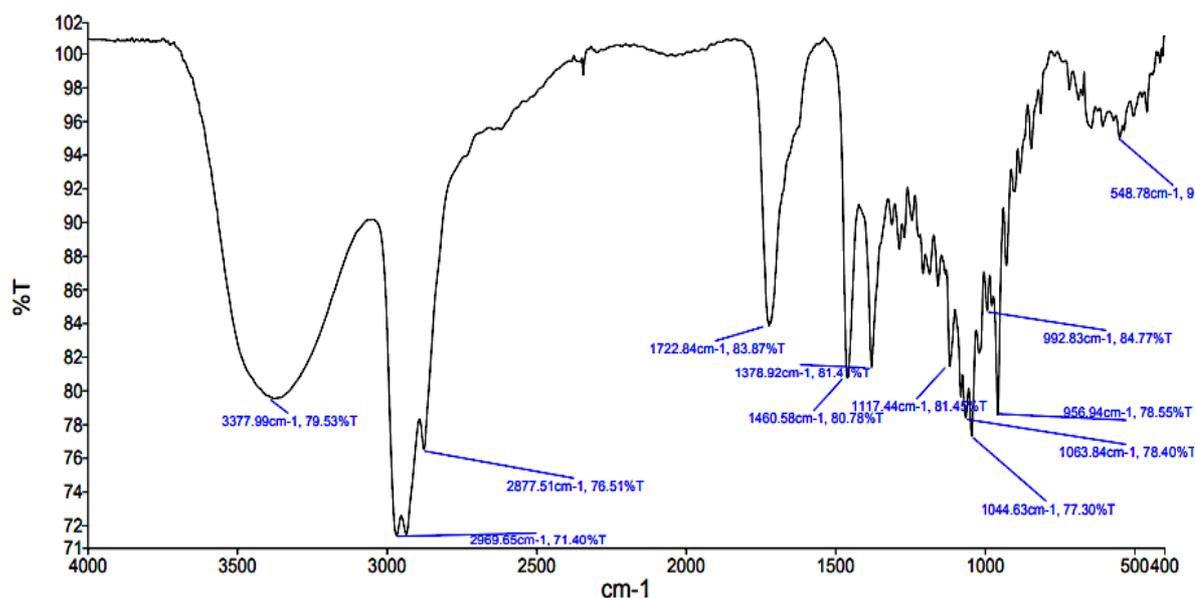
Figura 21. Padrão de massa obtido da fórmula molecular $C_{40}H_{68}O_{11}Na$



Fonte: o autor, 2020

Com a massa e a fórmula molecular do composto obtidas, iniciou-se uma pesquisa na literatura, baseada em metabólitos produzidos por *Streptomyces hygroscopicus*²³³. Essa revisão nos levou a sugerir a nigericina como possível metabólito isolado de *Streptomyces hygroscopicus* ACTMS-9H. Com a semelhança dos dados, após comparação dos dados analíticos, continuou-se a identificação, realizando uma análise por Espectroscopia de Infravermelho (FT-IR), para análise dos grupos funcionais presentes na molécula (Figura 22). Dentre os valores de vibração resultantes, e que ajudaram a elucidar os grupos funcionais da molécula, podemos destacar uma forte banda de absorção em 3378 cm^{-1} que indica a presença de grupos hidroxila, bem como uma absorção em 1722 cm^{-1} que é característica de ligação $C=O$ de ácido carboxílico. Outros estiramentos importantes aparecem em 1117 cm^{-1} ; 1063 cm^{-1} e 1044 cm^{-1} que são característicos para a vibração $C-O$, e que indicam a presença de grupos éter na molécula.

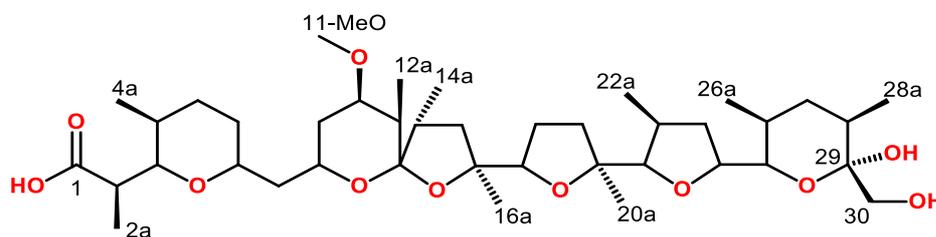
Figura 22. Estiramentos do padrão espectral da Nigericina por I.V.



Fonte: o autor, 2020

Na sequência, tanto a análise por ponto de fusão (183-185 °C), quanto a análise polarimétrica $[\alpha]^{20D} = +4.2^\circ$, (c 0.4, MeOH), foram idênticos aos relatados na literatura²³³. A confirmação estrutural da nigericina como substância isolada de *Streptomyces hygroscopicus* ACTMS-9H foi realizada após análise por RMN, onde análises uni e dimensionais foram realizadas. Na Tabela 4 estão representados os valores e linhas espectrais de ¹H e ¹³C da nigericina, em comparação com dado da literatura. Os dados analíticos permitiram concluir a identificação, inclusive a estereoquímica e confirmar a estrutura da nigericina como uma das substâncias isoladas da fração EB1.

Tabela 4. Comparação de sinais por RMN da Nigericina com dados da literatura.



Nigericina

Carbono	^1H 500 MHz / ^{13}C 125 MHz NMR(CDCl ₃) Lit. ²³⁴	δH	Exp. ^1H 800 MHz / ^{13}C 200 MHz NMR (DMSO-d ₆)	δH
	δC		δC	
1	177.5 s	-	176.55 s	-
2	44.2 d	2.22 (m)	42.6 d	2.20 (m)
2a	13.06 q	1.24 (m)	12.95 q	0.93 (s)
3	73.0 d	3.63 (m)	73.14 d	3.65 (m)
4	27.5 d	1.49 (m)	26.98 d	1.71 (m)
4a	10.8 q	1.05 (m)	10.88 q	0.84 (d)
5	25.7 t	1.42 (m)	25.12 t	1.86 (m)
		1.49 (m)		1.39 (m)
6	23.1 t	1.74 (m)	21.2 t	1.73 (m)
		-		1.25 (m)
7	69.0 d	3.84 (m)	68.34 d	3.98 (m)
8	35.2 t	2.50 (m)	36.20 t	1.92 (m)
		1.13 (m)		1.40 (m)
9	60.3 d	4.03 (m)	60.26 d	3.75 (m)
10	31.7 t	1.90 (m)	33.95 t	1.86 (m)
		-		1.16 (m)
11	78.0 d	3.27 (m)	77.8 d	3.24 (m)
MeO-11	57.4 q	3.34 (s)	57.16 q	3.19 (s)
12	37.1 d	1.49 (m)	36.90 d	1.65 (m)
12a	13.13 q	1.12 (m)	12.63 q	0.87 (d)
13	108.2 s	-	107.06 s	-
14	39.0 d	1.74 (m)	39.39 d	2.25 (m)
14a	13.3 q	0.88 (m)	13.25 q	0.82 (d)
15	43.2 t	1.49 (m)	39.09 t	2.01 (m)
		1.42 (m)		1.23 (m)
16	81.5 s	-	83.06 s	-
16a	28.0 q	2.18 (s)	24.94 q	1.03 (m)
17	82.4 d	3.36 (m)	81.65 d	3.65 (m)
18	26.1 t	1.49 (m)	27.76 t	1.73 (m)
		1.42 (m)		1.49 (m)
19	31.0 t	1.75 (m)	34.59 t	1.97 (m)

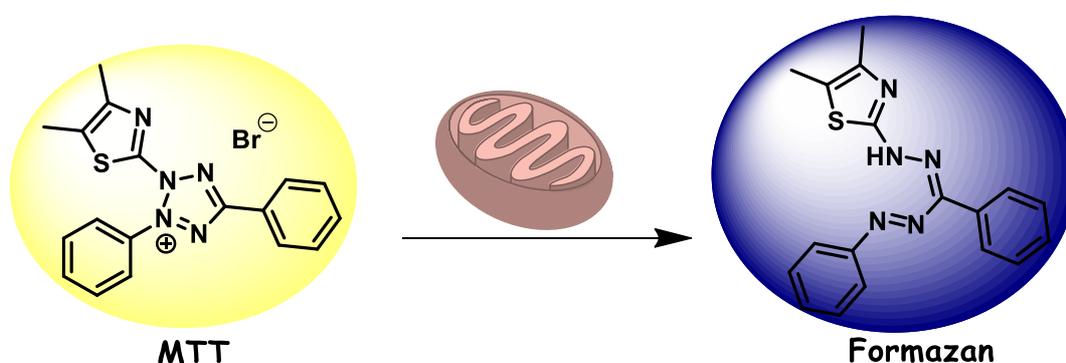
		1.35 (m)		1.44(m)
20	83.5 s	-	83.78 s	-
20a	22.7 q	2.11 (s)	23.18 q	1.08 (s)
21	85.8 q	3.76 (m)	85.68 d	3.68 (m)
22	35.1 d	1.80 (m)	34.62 d	2.18 (m)
22a	15.6 q	0.87 (m)	15.60 q	0.91 (d)
23	32.3 t	1.80 (m)	36.50 t	2.05 (m)
		1.35 (m)		1.56 (m)
24	76.7 d	4.20 (m)	79.22 d	4.00 (m)
25	74.4 d	3.74 (m)	76.37 d	3.30 (m)
26	32.5 d	1.35 (m)	34.86 d	1.32 (m)
26a	17.3 q	0.86 (m)	18.05 q	0.88 (d)
27	37.2 t	1.35 (m)	37.05 t	1.33 (m)
		-		1.21 (m)
28	35.7 d	1.42 (m)	33.06 d	1.76 (m)
28a	16.3 q	0.92 (m)	16.27 q	0.77 (d)
29	97.0 s	-	96.97 s	-
30	68.3 t	4.25 (m)	65.65 t	3.28 (m)
		-		3.20 (m)
OH-29	-	-	-	4.97 (s)
OH-30	-	-	-	4.26 (s)

5.3 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

Assim como todos os ensaios antiproliferativos, o ensaio de concentração única foi realizado pelo método MTT. Este ensaio tem como princípio, quantificar as células viáveis, ou seja, as células capazes de transformar o substrato brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT) no composto E,Z- 1-(4,5-dimethylthiazol-2-il)-1,3-difenilformazan. Esta redução biológica, promovida pelas enzimas

oxidorreductase (dependentes de NAD (P) H), presentes nas mitocôndrias, de leva a formação de uma solução de coloração azul escura, que é mensurada com o auxílio de um espectrofotômetro usando fonte de luz com comprimento de onda de 490 nm. Sendo assim, quanto mais células viáveis estiverem presentes após incubação do meio com MTT, mais azul fica o meio. A Figura 23 ilustra a transformação do MTT (amarelo claro) em formazan (azul escuro).

Figura 23 - Conversão do MTT em formazan.



Fonte: o autor, 2020

A vantagem do método MTT, é a transformação de um sal hidrossolúvel e a relativa simplicidade com que as operações são feitas, o que permite sua replicação de forma confiável em rotina de laboratório.

Sendo assim, após adicionar o sal MTT aos micropoços contendo a nigericina purificada e as células cancerígenas, que reagiram por 72h, em uma dose de concentração fixada em 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, foi possível observar alta porcentagem de inibição frente a todas as células testadas (Tabela 5). Os resultados iniciais apresentados na Tabela 5 mostram que a nigericina apresentou citotoxicidade acima de 95% para todas as células testadas, com destaque para as linhagens HCT 116, HL 60 e L 929. Esse fator foi de extrema importância, uma vez que substâncias que apresentaram uma inibição do crescimento celular acima de 75%, na dose de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ são consideradas ativas²³⁵.

Tabela 5 - Ensaio de citotoxicidade da nigericina (25 µg/mL) por MTT após 72 h.

Entrada	Linhagem celular	% inibição (nigericina)	% inibição (doxorubicina)
1	HCT 116	100 ± 2.41	92.7 ± 1.4
2	MCF 7	97.6 ± 2.5	74.8 ± 2.1
3	NCIH 292	98 ± 0.2	94.2 ± 1.9
4	HL 60	100 ± 0.21	98.2 ± 0.7
5	P 815	95.1 ± 0.7	91.8 ± 0.9
6	L 929	100 ± 0.56	93.8 ± 1.2

É importante salientar, que apesar da nigericina apresentar um amplo espectro de atividade biológica e estar envolvida em estudos relacionados à atividade anticâncer, até o presente momento, a aplicação desta substância está limitada ao uso do sal de sódio comercial, associada à outras substâncias.

Como os ionóforos em geral têm a capacidade de acidificar o meio intracelular do citoplasma, e com isso ser usado para sensibilizar células cancerígenas, os resultados apresentados nesta sessão representam dados importantes, se comparado com o uso do sal, como encontrado na literatura. Isso se deve ao fato de não encontrarmos dados na literatura que reportassem a nigericina pura como substância capaz de ser citotóxica contra células cancerosas.

Além disso, por saber de sua característica em se difundir do meio extracelular, dados adicionais sobre o tipo de morte celular causada seriam de grande relevância, uma vez que esta substância é bastante difundida em ensaios bioquímicos.

Por se tratar de um modelo humano e apresentar porcentagem quantitativa de inibição frente a nigericina no ensaio de concentração única (Tabela 5, entrada 1) além de apresentar poucos dados na literatura se comparados com células HL 60, por exemplo, as células HCT 116 foram escolhidas para dar continuidade nos ensaios de morte celular e mecanismo de ação, onde os ensaios bioquímicos indicaram que o ácido livre de Nigericina induz morte celular por apoptose e autofagia.

Como todas as células testadas nos ensaios de inibição por concentração única foram sensíveis à nigericina, inclusive apresentando alta atividade citotóxica com valores de inibição do crescimento celular entre 95 a 100%, os ensaios de CI_{50} foram

realizados com todas as células de câncer. Nestes ensaios, onde a doxorubicina foi empregada como controle positivo, os valores de CI_{50} também foram usados para se determinar os índices de seletividade frente as células PBMC (Tabela 6).

Tabela 6. Ensaio de CI_{50} e valores calculados de Índice de Seletividade

Célula	<u>CI_{50} (μM)*</u>		<u>CI_{50} (nM)**</u>		<u>IS**</u>	
	Nigericina	DOX	Nigericina	DOX	Nigericina	DOX
HCT 116	0.01 (0.007-0.015)	0.23 (0.12-0.43)	13.8	423.1	3.33	5.9
MCF 7	0.08 (0.003-0.023)	0.45 (0.32-0.62)	110.4	827.7	0.06	3.0
NCIH 292	0.03 (0.02-0.05)	0.13 (0.07-0.24)	41.4	239.1	0.6	3.3
HL 60	0.001 (0.001-0.002)	0.37 (0.25-0.54)	1.4	680.6	7.5	3.6
P 815	0.009 (0.006-0.01)	0.08 (0.04-0.17)	12.4	147.1	1.5	16.9
L 929	0.22 (0.18-0.28)	0.71 (0.54-0.99)	303.6	1306.0	0.13	1.9
PBMC	0.03 (0.01-0.09)	1.36 (0.06-0.09)	41.4	2501.7	-	-

Fonte: o autor, 2020

*Valores de CI_{50} (μM) em linhagens de células tumorais ou células PBMC calculado usando regressão não linear no GraphPad Prism 5.0 após 72 h; ** $SI = CI_{50} (\text{PBMC}) / CI_{50} (\text{célula cancerosa})$

A citotoxicidade da nigericina também foi avaliada em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), a fim de determinar se há efeito pronunciado em comparação com linhas de células tumorais. Um procedimento usual de seletividade é a comparação dos testes de proliferação de células de câncer com células normais, que inclui linfócitos e monócitos. Portanto, a partir do resultado do ensaio realizado, o índice de seletividade pode ser calculado a fim de demonstrar a razão de CI_{50} entre células, e assim estimar a segurança presuntiva do composto (Tabela 6). O objetivo deste teste é avaliar a seletividade do composto, o que é um fator importante na descoberta de novos fármacos, uma vez que a intenção é observar alta seletividade das substâncias contra células de câncer, e diminuir ao máximo possíveis efeitos adversos em células saudáveis²³⁶.

Como é possível observar na Tabela 6, o valor da concentração da Nigericina que inibe 50% do crescimento celular para as células PBMC apresentou $CI_{50} = 0,03 \mu\text{g/mL}$. Ao se dividir este valor pelo valor de CI_{50} encontrado para as células HCT 116, ($0,009 \mu\text{g/mL}$) um valor de seletividade de 3 é encontrado. É importante salientar que valores de Seletividade acima de 2 são desejáveis²³⁷. As linhagens que apresentaram índice de seletividade maior que 2 foram HCT 116, HL 60 e P 815. Dos dados obtidos dos ensaios, e que estão representados na Tabela 6, também é possível observar que de todas as linhagens de células testadas na presença de nigericina, as células humanas de leucemia promielocítica aguda (HL 60) foram as que apresentaram maior sensibilidade $0.0014 \mu\text{M}$.

Também é possível observar, que a nigericina apresentou potente citotoxicidade frente a outras linhagens celulares, como HCT 116 e P 815, com CI_{50} de $0,0138 \mu\text{M}$, e $0.0124 \mu\text{M}$, respectivamente. A linhagem NCIH-292 também se mostrou muito sensíveis à presença da nigericina, com um CI_{50} de $0,0414 \mu\text{M}$.

Apesar da nigericina ter sido mais ativa frente às células citadas acima, esta também apresentou toxicidade significativa frente à linhagem MCF 7, com CI_{50} de $0,1104 \mu\text{M}$. Um efeito menos pronunciado para as células L 929 ($0.3036 \mu\text{M}$) também foi observado. Os valores de CI_{50} obtidos no presente trabalho, estão muito abaixo

dos valores repostados na literatura, onde valores micromolares bem maiores são reportados quando o sal de sódio é empregado foi empregado para o tratamento de células de câncer^{238 e 239}.

Este comportamento, se deve, provavelmente à diferente permeação causada pela função do ácido livre através da membrana mitocondrial interna, se comparado ao sal de sódio ou ao comportamento intrínseco do ácido livre contra as linhagens de células testadas neste trabalho, o fato é que a proporção da quantidade diminuiu mil vezes em dose usando ácido livre em vez do sal de sódio correspondente, se comparado com dados da literatura. De forma interessante, se compararmos os efeitos celulares por essa diferenciação, podemos racionalizar que, provavelmente ela é direcionada devido à estrutura molecular da nigericina, onde o ácido livre da nigericina atua como um ácido carboxílico molecular não dissociado, e com isso pode atravessar a membrana com mais facilidade. Essa característica, provavelmente é responsável por conduzir de forma mais eficiente o próton para o interior da célula como um trocador de H^+ , levando acidificação do meio interno e conseqüentemente levando à morte celular em um ambiente de pH ácido. Além disso, bioquimicamente, após diminuir o pH intracelular pela liberação do próton, pode ocorrer uma depleção de potássio devido à capacidade da nigericina agir como um ionóforo, em aumentar o efluxo de K^+ , perturbando a homeostase do íon intracelular²⁴⁰.

Esses resultados nos fornecem dados sobre a nigericina que até então não foram relatados na literatura. Além disso, apesar de a nigericina ter sido relatada na literatura e descrita como sendo potencialmente usada em ensaios citotóxicos, até hoje, seu uso é restrito apenas para o sal de sódio comercialmente vendido pela cia Sigma-Aldrich.

Outro fator importante, são os valores de seletividade obtidos quando linhagens de células tumorais são comparadas com células mononucleares do sangue periférico (PBMCs). Para os valores de (SI), quanto maior for o valor desse índice (usualmente acima de 1), maior será a seletividade do composto em relação à célula tumoral. No entanto, valores acima de 2 são desejáveis, de modo que o composto pode ser aplicado no dobro de sua concentração sem apresentar toxicidade na célula saudável. Da tabela 7, pode-se destacar a comparação da avaliação da citotoxicidade de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) com todas as linhagens de células de câncer testadas. Destes ensaios, foi possível identificar que a atividade

antiproliferativa da nigericina frente às células HCT 116 apresentou CI_{50} de $0.0138 \mu\text{M}$ e $IS = 3,0$, também foi possível observar que a onde os ensaios mostraram que a Nigericina é cerca de 30 vezes mais potente do que a doxorubicina. Por se tratar de um modelo humano, apresentar resultados de relevância, como boa seletividade, e apresentar poucos dados na literatura se comparados com células HL 60, por exemplo, as células HCT 116 foram escolhidas para dar continuidade nos ensaios de morte celular e mecanismo de ação envolvendo a nigericina como substância bioativa. Além disso, outro fator de extrema importância, e que corroborou diretamente para esta escolha desta linhagem de célula para dar continuidade aos estudos bioquímicos, foi o fato de que o câncer de cólon é um dos mais incidentes em humanos.

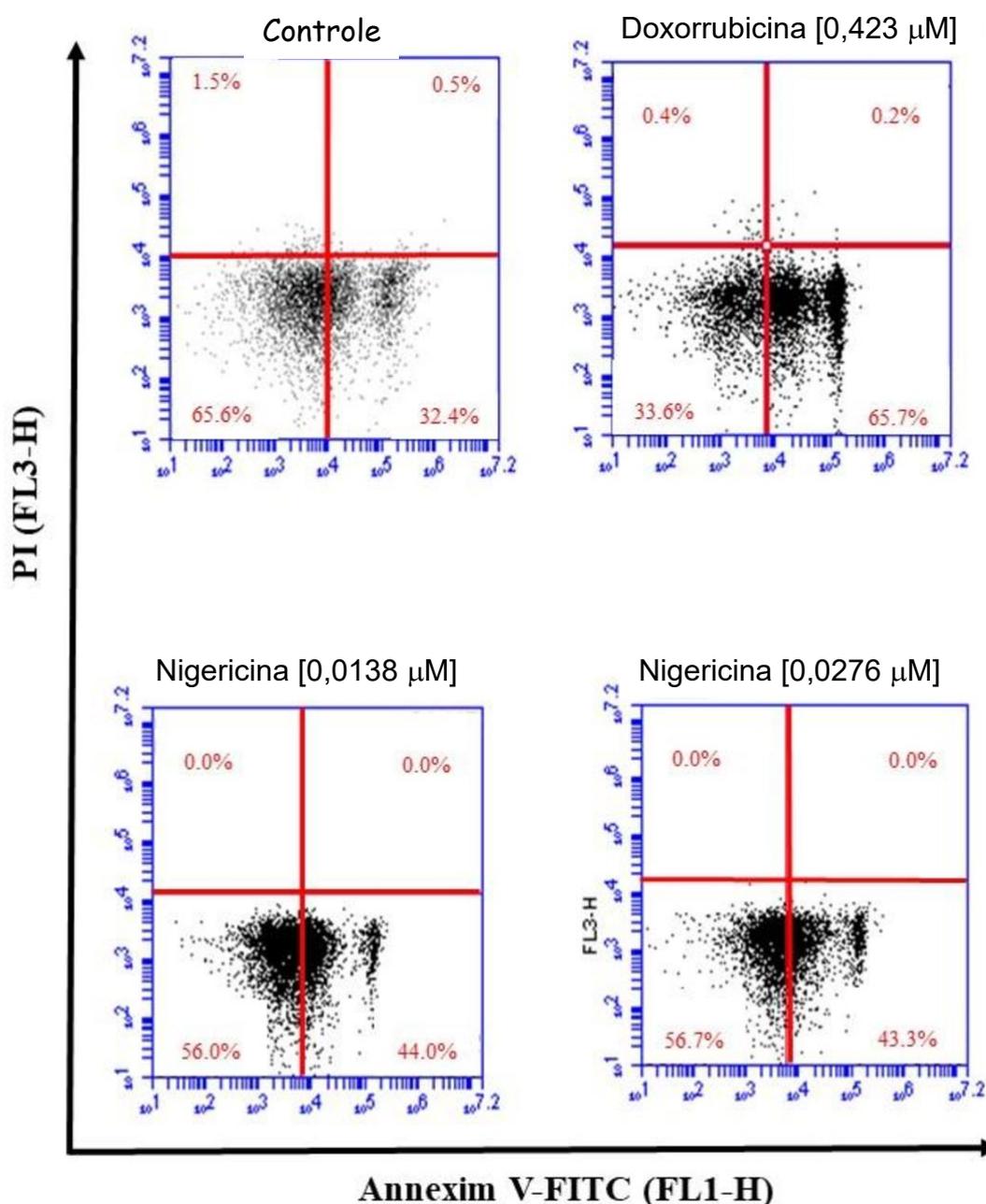
5.4 DETECÇÃO DE APOPTOSE POR CITOMETRIA DE FLUXO

Uma ferramenta de grande importância para estudar o tipo de morte célula é a análise da integridade da membrana plasmática. Com isso, para dar início aos estudos do processo de morte celular induzido em células HCT 116, estas foram tratadas com Nigericina, e após 48 h de incubação, foram duplamente coradas com anexina V e PI, seguidas da realização de uma análise em um aparelho de citômetro de fluxo. Este teste se baseia na capacidade do iodeto de propídeo se ligar ao DNA das células HCT 116, e emitir fluorescência após incidir laser de argônio (488 nm)²⁴¹. Outro fator determinante é que apenas as células em processo de necrose apresentam alteração precoce da membrana.

Sendo assim, após tratamento das células HCT 116 com Nigericina, o método permitiu avaliar a viabilidade através da avaliação da integridade da membrana plasmática, pois a ligação do agente de coração só ocorre, se as membranas das células estejam rompidas. Além disso, a diferença de emissão é característica, uma vez que as células que estejam com a membrana íntegra, emitem baixa fluorescência. Os valores de Annexin V e PI foram definidos como os eixos horizontal e vertical, respectivamente, para a construção do gráfico representativo. Nele, as células danificadas mecanicamente ou necróticas, células apoptóticas tardias, células viáveis e células apoptóticas precoces foram localizadas nos quadrantes superior esquerdo, superior direito, inferior esquerdo e inferior direito do gráfico de pontos de citometria de fluxo, respectivamente (Figura 24).

Como pode-se observar na Figura 13, a nigericina nas doses de 0,0138 e 0,0276 μM induziu apoptose em 44,0 e 43,3% das células HCT 116, respectivamente, enquanto a doxorubicina na dose de 0,3 $\mu\text{g/mL}$ induziu apoptose em 65,7% das células. Tanto a autofagia e a apoptose são processos biológicos bem regulados, e que têm papéis importantes no desenvolvimento e progressão dos tumores. No entanto, as vias de transdução entre autofagia e apoptose não é claro²⁴².

Figura 24. Efeito da nigericina sobre as células de cólon humano após 48 h. A doxorubicina (0,3 $\mu\text{g/mL}$) foi usada como controle positivo.



Fonte: o autor, 2020

Além disso, vários estudos demonstram que a autofagia tem um papel anti-apoptótico em vários tipos de câncer²⁴³, enquanto outros estudos relataram seu papel pró-apoptótico essencial em certos tipos de câncer, que incluem, por exemplo células de câncer colorretal²⁴⁴. Além disso, foi relatado que o tratamento empregando ionóforos que sinalizam inibidores das quinases GSK-3 têm induzido autofagia, no entanto o mecanismo de ação ainda é pouco conhecido²⁴⁵. Dos ensaios de detecção de apoptose por citometria de fluxo, além do ensaio mostrar comprometimento na integridade da membrana mitocondrial, pode-se inferir que a nigericina causou apoptose e autofagia.

5.5 ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL

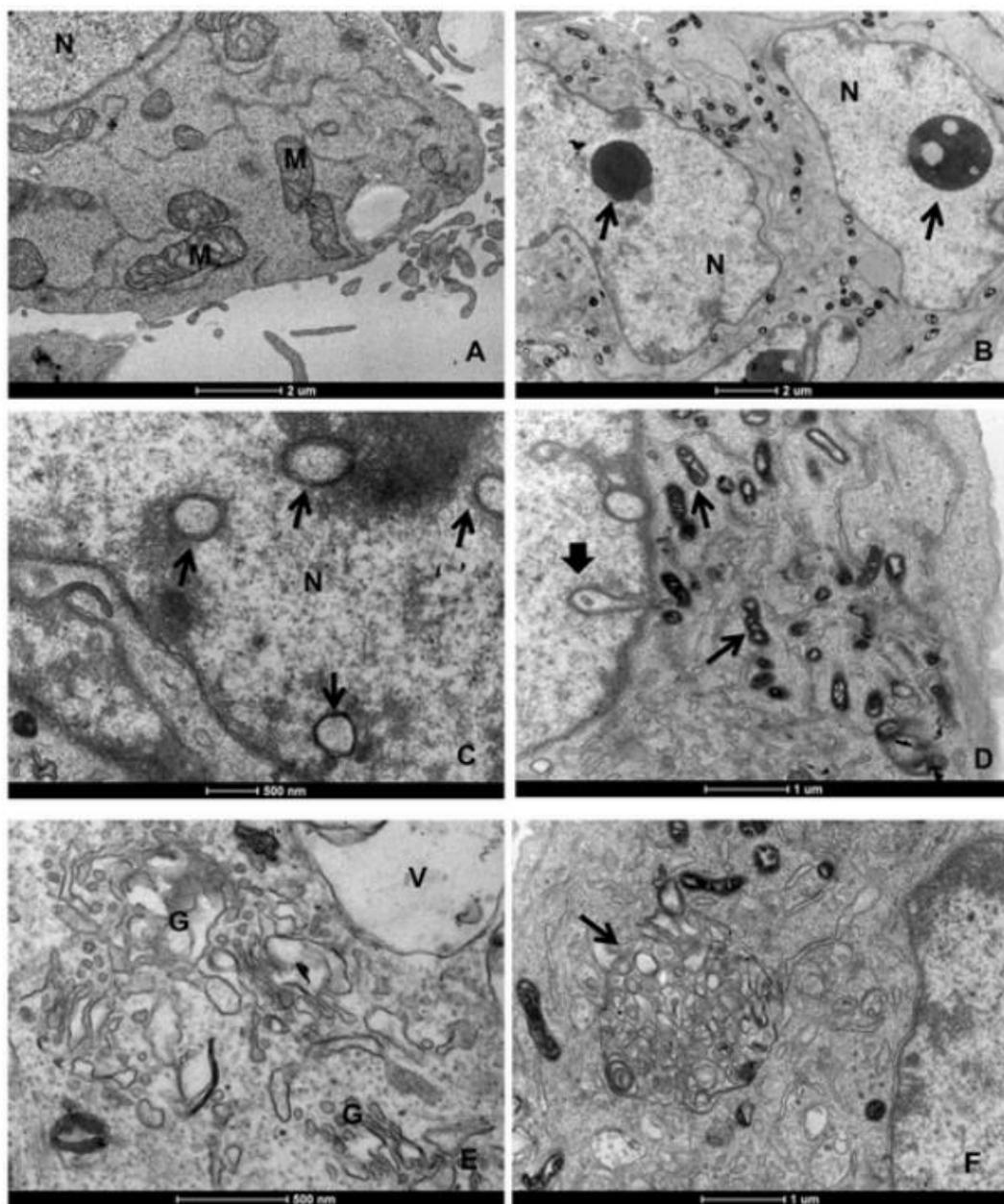
Como o percentual de células em apoptose foi abaixo de 50% quando tratadas com a nigericina, levantamos a hipótese de que outro tipo de morte celular poderia estar envolvido na ação da nigericina. Diante disto, foi realizada uma análise ultraestrutural. Esta análise, é uma importante operação de comparação morfológica, onde as células são analisadas em ensaios de microscopia eletrônica de transmissão.

As células de HCT 116 utilizadas como controle, sem adição da nigericina, apresentaram morfologia característica, como núcleo redondo, numerosas mitocôndrias, sáculos do retículo endoplasmático e Complexo de Golgi. Em contraste, as células HCT 116 que foram tratadas com nigericina, nas concentrações de 0,0138 μM ou 0,0276 μM (que correspondem ao valor de CI_{50} e 2 vezes o valor de CI_{50} , respectivamente), exibiram várias alterações morfológicas. As observações do resultado da análise ultraestrutural estão representadas na Figura 25.

A análise por microscopia óptica revelou diversas alterações morfológicas induzidas, onde é possível observar as mitocôndrias com inclusões semelhantes a depósitos osmiofílicos e perda de cristas, núcleo contendo inclusão osmiofílica redonda e vesículas de membrana dupla, bem como invaginações tubulares nucleares. É interessante perceber que houve, além disso, inclusão de conteúdo osmiofílico dentro do retículo endoplasmático liso (SER), fragmentação de SER e Complexo de Golgi e presença de estruturas semelhantes a autofagossomos circundadas por sáculos de membrana semelhante a ER, nessas células. As células, também continham organelas osmiofílicas citoplasmáticas juntamente com parte do citoplasma. Essa análise também revelou que o tratamento ocasionou aumento do

volume celular e da quantidade e tamanho de vesículas no citoplasma das células, indicando a provável ocorrência de autofagia.

Figura 25. MEV das células HCT 116 tratadas com nigericina. Visualização com aumento em 10.000 x. N= núcleo, G= Complexo de Golgi, M= mitocôndria, V= vacúolo. Figura A: Controle Células HCT 116 [0,0138 μ M] Figura B: Inclusão Nuclear Osmiofílica. Figura C: Vesículas nucleares de membrana dupla. Figura D: Invaginações tubulares da membrana nuclear (seta grande) e mitocôndrias osmiofílicas (setas finas). Figura E: Complexo de Golgi inchado e fragmentado. Figura F: Estrutura semelhante a autofagossomo.



5.6 ENSAIOS DE INIBIÇÃO DE QUINASE

Dentre os diversos reguladores da autofagia, destacam-se a proteína-quinase *mTOR* (do inglês, *mammalian target of rapamycin*: proteína alvo da rapamicina em mamíferos) e a proteína-quinase AMPK (proteína cinase ativada por AMP), as quais atuam sobre as taxas de formação de vesículas autofágicas²⁴⁶.

Sendo assim, neste trabalho, a nigericina foi testada frente a cinco proteínas quinases diferentes e que estão envolvidas em vários distúrbios humanos, incluindo câncer e doenças inflamatórias²⁴⁷. O estudo com a nigericina apresentou resultados significativos de atividade inibitória nas quinases HsJAK3 e HsGSK3 β com valores de CI_{50} de 8,82 μ M e 5,38 μ M, respectivamente. Além disso, a nigericina mostrou-se menos ativa frente a HsCDK9, HsCK1 ϵ e HsABL1. Os resultados são apresentados na Tabela 7. A nigericina também foi testada contra as quinases HsCDK5/p25, Haspin e HsPIM1, no entanto, não apresentou atividade inibitória significativa (dados não apresentados). Além disso, até onde se sabe, este é o primeiro estudo que mostra a ação da nigericina, em sua forma como ácido livre, em ensaios frente a proteínas quinases.

Tabela 7. Atividade da nigericina frente a proteínas quinases.

Quinase	HsCDK9/CyclinT	HsJAK3	HsCK1 ϵ	HsGSK3 β	HsABL1
CI_{50} (μM)	36.12	8.82	23.03	5.38	14.73

Valores de CI_{50} expressos de ensaios em triplicata

Fonte: o autor, 2020

Sabe-se que a quinase GSK-3 é capaz de inibir a autofagia através do alvo mamífero (*mTOR*) complexo 1 (*mTORC1*) pela rapamicina. Na verdade, a superexpressão de GSK-3 α ou GSK-3 β ativa *mTORC1* e suprime a autofagia em células de câncer de mama MCF-7. De maneira oposta, o tratamento de células com inibidores de GSK-3 inibe a atividade de *mTORC1* e aumenta o fluxo autofágico²⁴⁸. Esses estudos corroboram, pelo menos em parte, com nossos resultados *in vitro* no alvo GSK-3 β . Como houve aumento da autofagia causada pela presença da nigericina na forma do ácido livre, é mais provável que ela atue via *mTOR*. Além disso, o direcionamento da sinalização PI3K/AKT/*mTOR* pode não apenas induzir a apoptose

para inibir a proliferação de células tumorais, mas também induzir a autofagia, no entanto, as vias de transdução entre essas duas vias ainda não é claro²⁴⁹.

5.7 MODELAGEM MOLECULAR

A nigericina, por apresentar atividade inibitória da quinase em JAK-3 ($CI_{50} = 8,82 \mu/M$), nos levou a estudar estes resultados em uma simulação computacional, em um método *in silico*, que foi realizado pelo Prof. Marcelo Zaldini Hernandez, do Laboratório de Química Teórica da UFPE ²⁵⁰. A família Janus quinase (JAK) de proteínas tirosina-quinases não receptoras consiste em JAK1, JAK2, JAK3 e TYK2 (tirosina quinase-2), todos os quais desempenham um papel em diferentes citocinas e vias de sinalização mediadas por receptor de fator de crescimento²⁵¹ Janus quinase 3 (JAK3) pertence a uma família de tirosina quinases citoplasmáticas não receptoras. Além disso, as mutações de ativação de JAK3 que resultam na ativação persistente da sinalização JAK-STAT foram descritas em várias leucemias e linfomas. A desregulação de JAK-STAT resulta em doenças autoimunes, como artrite reumatoide, colite ulcerosa e doença de Crohn. A desregulação JAK-STAT também desempenha um papel na patogênese da mielofibrose, policitemia vera e outras doenças mieloproliferativas²⁵². A ativação de JAK também inicia a ativação da AMPK, PI3K e AKT / alvo de rapamicina de mamífero (*mTOR*)²⁵³, sugerindo JAK3 como um alvo potencial para terapia contra o câncer.

Os resultados destacados nas quinases JAK3 e GSK3 β *in vitro* nos levaram a estudar as posições de ligação da nigericina. Para o alvo JAK3, pode-se imaginar que nigericina realiza três ligações de hidrogênio, com distâncias de 2,8Å (GLN827), 2,9Å (LYS830) e 2,7Å (ARG953), e contatos hidrofóbicos com os resíduos LEU828, GLY829, VAL836, ALA853, GLY908, CYS909, ASN954, ILE955, LEU956, ALA966 e ASP967 (Figura 26). Assim, é possível concluir que, além da nigericina realizar três ligações de hidrogênio, ela também realiza contatos hidrofóbicos com outros onze resíduos. Esse “encaixe”, por exemplo, leva à uma maior afinidade da nigericina pela enzima, e conseqüentemente uma forte inibição competitiva pelo sítio ativo.

Continuando a análise das interações intermoleculares com o sítio de ligação de JAK3, é possível perceber que a nigericina formou duas pontes de hidrogênio com o resíduo LEU905 e uma com o resíduo ASP967. Já para o alvo GSK3- β , a nigericina formou três ligações de hidrogênio, com distâncias de 3,3Å (VAL61), 3,2Å e 3,4Å

(ambos com ASP200), uma ponte salina (ARG141) e contatos hidrofóbicos com resíduos ILE62, GLYS63, ASN64, VAL70, LYS85, TYR134, GLU137, THR138, GLN185, LEU188 e CYS199 (Figura 27).

Fonte: o autor, 2020

Figura 26. Interação da nigericina com GLN827, LYS830 e ARG953.

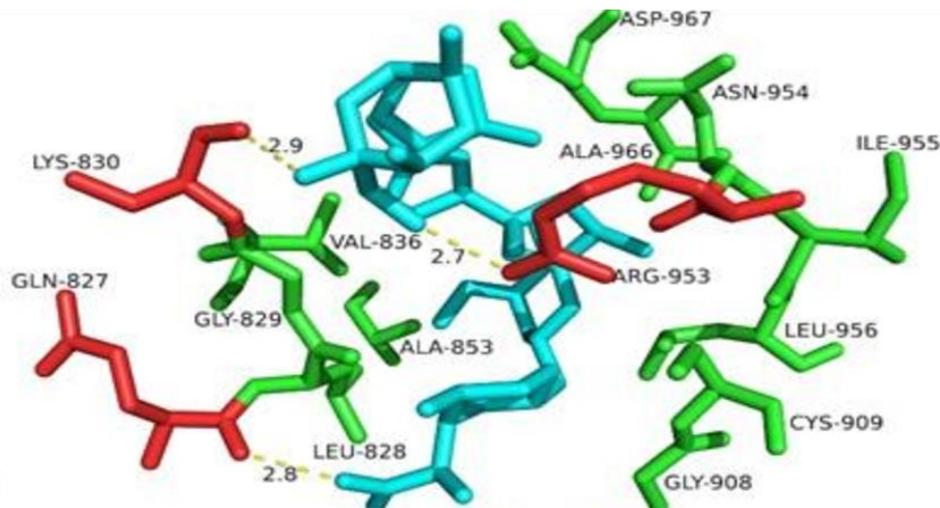
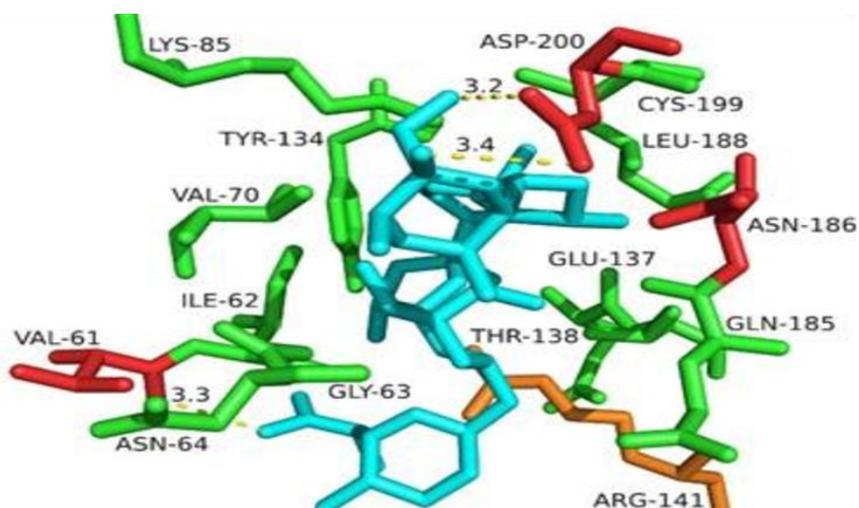


Figura 27. Interação da nigericina com VAL61, e dois ASP200



Fonte: o autor, 2020

As interações intermoleculares parecem explicar novamente as afinidades previstas dessas moléculas com este alvo. Desta forma, parece que um bom candidato a fármaco direcionado para GSK3- β poderia se beneficiar realizando interações intermoleculares com esses dois resíduos. Apesar de ser um estudo preliminar, as evidências apontam para um mecanismo de autofagia envolvendo a via

do o, onde a interação da nigericina com JAK-3 e GSK3- β pode convergir para a inibição de *mTOR*, entretanto, outros experimentos precisam ser realizados para confirmar esta hipótese.

6 CONCLUSÃO

Uma nova fonte, com produção de uma quantidade apreciável, de nigericina foi identificada em uma cepa de *Streptomyces hygroscopicus* UFPEDA 3370, isolada da rizosfera da *Paullinia cupana* (Amazônia, Brasil). Através de fracionamentos e purificação por cromatografia em sílica gel, foi possível isolar a nigericina, um composto bioativo promissor, a partir do extrato EB1, que é a fração metanólica de *Streptomyces hygroscopicus* UFPEDA 3370. A nigericina isolada, foi caracterizada em sua forma de ácido livre, e através dos testes *in vitro*, foi possível confirmar que seu amplo espectro antiproliferativo contra uma série de linhagens celulares. Além disso, a Nigericina apresentou particular eficiência e seletividade na inibição de células HCT 116 (carcinoma de cólon humano) e HL 60 (humano leucemia promielocítica aguda). Bioquimicamente, a nigericina foi responsável por causar morte celular por apoptose e autofagia, onde definiu-se também, sua atividade nas quinases JAK3 e GSK3- β . Através de estudos tanto *in vitro* quanto *in silico*, essas descobertas FORNECERAM uma base de dados para futuras investigações, onde uma possível aplicação da nigericina no combate ao câncer colorretal é uma opção com grande potencial.

REFERÊNCIAS

-
- ¹ Gorbalenya A.E., Makedon S.C., Baric R.S., de Groot, R.J., Drosten C., Gulyaeva A.A., Haagmans B. L., Lauber C., Leontovich A. M., Neuman B. W., Penzar D., Perlman S., Poon L.L.M., Samborskiy D.V., Sidorov I.A., Sola I., Ziebuhr J. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2, *Nature Microbiology*, **2020**, 5, 536-544.
- ² (a) Morjaria S. Driver mutations in oncogenesis, *IJMIO* , 2020, ARTICLE IN PRESS doi:10.25259/IJMIO_26_2020 (b) Haber D. A, Settleman J. Cancer: Drivers and passengers. *Nature* **2007**, 446, 145-6.
- ³ Cell: A Molecular Approach, 2nd ed. Geoffrey M. Cooper ISBN-13: **1997**, 978-0-19-850111-4
- ⁴ Brusotti G., Cesari I., Dentamaro A., Caccialanza G., Massolini G., Isolation and characterization of bioactive compounds from plant resources: the role of analysis in the ethnopharmacological approach, *J Pharm Biomed Anal.* **2014**, 87, 218-228.
- ⁵ Hughes J.P., Rees S., Kalindjian S.B., Philpott K.L., Principles of early drug discovery, *British Journal of Pharmacology* **2011**, 162, 1239-1249.
- ⁶ Cardellina J.H., Fuller R.W., Gamble W.R., Westergaard C., Boswell J., Munro M.H.G, Currens M., Boyd M.R., Evolving strategies for the selection, dereplication and prioritization of antitumor and HIV-inhibitory natural products extracts. In: Bioassay Methods in Natural Product Research and Development. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht **1999**, 25–36.
- ⁷ (a) Demain, A.L. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotech.* **1999**, 52, 455-463. (b) Newman, D.J., Cragg, G.M., Snader, K.M. The influence of natural products upon drug discovery. *Nat. Prod. Rep.* **2000**, 17, 215-234. (c) Demain, A.L., Sanchez, S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. *J. Antibiot.* **2009**, 62, 5-16.
- ⁸ Kämpfer, P. The Family Streptomycetaceae, Part I: Taxonomy. In Dworkin, Martin; Falkow, Stanley; Rosenberg, Eugene; Schleifer, Karl-Heinz; Stackebrandt, Erko (eds.). *The Prokaryotes* **2006**, 538-604.
- ⁹ (a) Ara, I., Bukhari, N.A., Aref, N.M., Shinwari, M.M.A., Bakir, M.A. Antiviral activities of streptomycetes against tobacco mosaic virus (TMV) in *Datura* plant: evaluation of different organic compounds in their metabolites. *Afr. J. Biotech.* **2012**, 11, 2130-2138. (b) Lee, L.H., Zainal, N., Azman, A.S., Eng, S.K., Ab Mutalib, N.S.,

Yin, W.F., Chan, K.G. *Streptomyces pluripotens* sp. nov., a bacteriocin-producing streptomycete that inhibits methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2014**, 64, 3297-3306. (c) Manivasagan, P., Venkatesan, J., Sivakumar, K., Kim, S.K. Pharmaceutically active secondary metabolites of marine actinobacteria. *Microbiol. Res.* **2014**, 169, 262-278. (d) Azman, A.S., Othman, I., Velu, S.S., Chan, K.G., Lee, L.H. Mangrove rare Actinobacteria: taxonomy, natural compound, and discovery of bioactivity. *Front. Microbiol.* **2015**, 6:856. (e) Law, J.W., Ser, H.L., Khan, T.M., Chuah, L.H., Pusparajah, P., Chan, K.G., Goh, B.H., Lee, L.H. The potential of *Streptomyces* as biocontrol agents against the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae* (*Pyricularia oryzae*). *Front. Microbiol.* **2017**, 8:3.

¹⁰ Subramani, R., Aalbersberg, W. Marine actinomycetes: an ongoing source of novel bioactive metabolites. *Microbiol. Res.* **2012**, 167, 571-580.

¹¹ Bérdy, J. Bioactive microbial metabolites. *J. Antibiot.* **2005**, 58, 1-26. (b) de Lima P.R.E., da Silva, I.R., Martins, M.K., de Azevedo, J.L., de Araújo, J.M. Antibiotics produced by *Streptomyces*. *Braz. J. Infect. Dis.* **2012**, 16, 466-471.

¹² X.Rong, Y.Huang, Taxonomic evaluation of the *Streptomyces hygrosopicus* clade using multilocus sequence analysis and DNA–DNA hybridization, validating the MLSA scheme for systematics of the whole genus, *Syst. Appl. Microbiol.* **2012**, 35, 7-18.

¹³ Sehgal S.N., Chang J.Y., Rapamycin: a new immunosuppressive macrolide. *Trans. Immunol. Lett.* **1990**, 7, 12-14.

¹⁴ Zuberbier T, Chong SU, Grunow K, Guhl S, Welker P, Grassberger M, Henz BM. The ascomycin macrolactam pimecrolimus (Elidel, SDZ ASM 981) is a potent inhibitor of mediator release from human dermal mast cells and peripheral blood basophils. *J Allergy Clin Immunol.* **2001**, 108, 275-280.

¹⁵ Wang C., Wang J., Yuan J., Jiang L., Jiang X., Yang B., Zhao G., Liu B., Huang D. Generation of *Streptomyces hygrosopicus* cell factories with enhanced ascomycin production by combined elicitation and pathway-engineering strategies, *Biotechnol. Bioeng.* **2019**, 116, 1-14.

¹⁶ Grag G.M., Newman D. J., Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA): General Subjects.* **2013**, 1830, 3670-3695.

¹⁷ (a) Tilaoui M., Mouse H. A., Jaafari A., Zyad A., Comparative phytochemical analysis of essential oils from different biological parts of *Artemisia herba alba* and their cytotoxic effect on cancer cells. Natural Products as Cytotoxic Agents in

Chemotherapy against Cancer *PLoS One*. **2015**, 10, e0131799 (b) Oliveira A. H., de Oliveira G. G., Carnevale Neto F., Portuondo D. F., Batista-Duharte A., Carlos I. Z. Anti-inflammatory activity of *Vismia guianensis* (Aubl.) Pers. extracts and antifungal activity against *Sporothrix schenckii*. *Journal of Ethnopharmacology* **2017**, 195, 266-274.

¹⁸ Newman D. J., Cragg G. M. Snader K. M., *J. Nat. Prod.* **2003**, 66, 1022

¹⁹ Newman, D.J.; Cragg, G.M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.* **2012**, 75, 311-335.

²⁰ Newman, D.J.; Cragg, G.M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.* **2016**, 79, 629-661.

²¹ Devita V. T., Chu E., A history of cancer chemotherapy. *Cancer Res.* **2008**, 68, 8643-53.

²² Anticancer Agents from Natural Products In: M. G. Cragg, D. G. I. Kingston, D.J. Newman, Editors. Taylor & Francis Group's LLC Second Ed. **2012**, 1.

²³ Newman D. J., Cragg G. M., Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014, *J Nat Prod.* 79, **2016**, 629-661.

²⁴ Brusotti G., Cesari I., Dentamaro A., Caccialanza G., Massolini G., Isolation and characterization of bioactive compounds from plant resources: the role of analysis in the ethno-pharmacological approach. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2014**, 87, 218-228.

²⁵ Gopalakrishnan A., Panicker P., Gopinath D., Vijayasaraswathy S.G., Kasa J., Ethnomedicine in cancer therapy: A review. *World J. Pharm. Res* **2014**,3, 305-319.

²⁶ Sisodiya P. S., Plant derived anticancer agents: A review. *Int. J. Res. Develop. Pharm. Life Sci.* **2013**, 2, 293-308.

²⁷ Da Rocha A., Natural products in anticancer therapy. *Current Opinion in Pharmacology*, **2001**, 1, 364-369.

²⁸ Cuendet M., J. M. Pezzuto Antitumor activity of bruceantin: an old drug with new promise. *J Nat Prod.* **2004**, 67,269-72.

²⁹ World Health Organization Model List of Essential Medicines 21st List **2019**
<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/325771/WHO-MVP-EMP-IAU-2019.06-eng.pdf?ua=1&ua=1>

³⁰ Donadio, S., Monciardini, P., Alduina, R., Mazza, P., Chiocchini, C., Cavaletti, L., Sosio, M., and Puglia, A.M. Microbial technologies for the discovery of novel bioactive metabolites. *J. Biotechnol.* **2002**, 99,187–198.

³¹ Tan S.Y., Tatsumura Y., Alexander Fleming (1881–1955): discoverer of penicillin. *Singapore Med. J.* **2015**, 56, 366-367.

³² Waksman S.A., Reilly H.C., Johnstone D.B., Isolation of streptomycin-producing strains of *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* **1946**, 52, 393-397.

³³ Duggar B.M., Aureomycin; a product of the continuing search for new antibiotics. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1948**, 51, 177-181.

³⁴ Ehrlich J., Bartz Q.R., Smith R.M., Joslyn D.A., Burkholder P.R. Chloromycetin, a new antibiotic from a soil actinomycete. *Science* **1947**, 106, 417.

³⁵ Newton G.G., Abraham E.P. Cephalosporin C, a new antibiotic containing sulphur and D-alpha-amino adipic acid. *Nature* **1955**, 175, 548.

³⁶ Kibwage I.O., Hoogmartens J., Roets E., Vanderhaeghe H., Verbist L., Dubost M., Antibacterial activities of erythromycins A, B, C, and D and some of their derivatives, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* **1985**, 28,630-633.

³⁷ Levine D., Vancomycin: A History. *Clin Infect Dis.* **2006**, 42, S5-S12.

³⁸ Gupta C, Prakash D, Garg A.P. Nutraceuticals from Microbes. In: Prakash D, Sharma G, editors. Phytochemicals of nutraceutical importance. UK: CABI International Publishers; **2014**. p. 79-102.

³⁹ Gupta C., Prakash D., Gupta S. Natural useful therapeutic products from microbes, *J Microbiol Exp.* **2014**, 1, 30–37.

⁴⁰ Okami Y. *Microb. Ecol.*, **1986**, 12, 65–78.

-
- ⁴¹ Ozcengiz, G., Demain, A.L. Recent advances in the biosynthesis of penicillins, cephalosporins and clavams and its regulation. *Biotechnology Advances*, **2013**, 31, 287-311
- ⁴² Chakrabarty A.M. Microorganisms and Cancer: Quest for a therapy. *J Bacteriol* **2003**, 185, 2683-6.
- ⁴³ Wei M.Q., Mengesha A., Good D., Anné J. Bacterial targeted tumour therapy-dawn of a new era. *Cancer Letters* **2008**, 259, 16-27.
- ⁴⁴ Sanchez S., Trampe S.G., Ávalos M., Ruiz B., Sanoja R.R., Estrada M.J., Microbial natural products, in *Natural Products in Chemical Biology*, ed. N. Civjan (Hoboken, NJ: Wiley), **2012** pp. 65-108. (b) Kinghorn A.D., Chin Y.W., Swanson S.M. Discovery of natural product anticancer agents from biodiverse organisms. *Curr Opin Drug Discov Devel.* **2009**, 12, 189-196
- ⁴⁵ Umenzawa, H. *J. Antibiot. (Tokyo) Ser. A* **1966**, 19, 200.
- ⁴⁶ Demain A. L., Vaishnav P. Natural products for cancer chemotherapy, *Microb. Biotechnol.* **2011**, 4, 687-699
- ⁴⁷ Tomita, K., Uenoyama Y., Numata K., Sasahira T., Hoshino Y., Fujisawa K., Tsukiura H., Kawaguchi H. *Streptoalloteichus*, a new genus of the family Actinoplanaceae. *J. Antibiot.* **1978**, 31, 497-510.
- ⁴⁸ Zhen, Y.S., Li, D.D. Antitumor antibiotic pingyangmycin: research and clinical use for 40 years. *Chin J Antibiot* **2009**, 34, 577-580.
- ⁴⁹ Raisfeld, I.H. Pulmonary toxicity of bleomycin analogs. *Toxicology and Applied Pharmacology* **1980**, 56, 326-336.
- ⁵⁰ Chen, J., Stubbe, J. Bleomycins: towards better therapeutics. *Nat. Rev. Cancer* **2005**, 5, 102-112
- ⁵¹ Miyaki T, Numata K, Nishiyama Y, Tenmyo O, Hatori M, Imanishi H, Konishi M, Kawaguchi H. Tallysomyacin a new antitumor antibiotic complex related to bleomycin. V. Production, characterization and antitumor activity of tallysomyacin S10b, a new biosynthetic tallysomyacin derivative. *J Antibiot (Tokyo)* **1981**, 34, 665-74.
- ⁵² Bradner, W.T.; Pindell M.H. Antitumor properties of phleomycin. *Nature* **1962**, 196, 682683

-
- ⁵³ Wang L, Yun B.S., George N.P., Wendt-Pienkowski E, Galm U, Oh T.J, Coughlin J.M., Zhang G, Tao M, Shen B. Glycopeptide antitumor antibiotic zorbamycin from *Streptomyces flavoviridis* ATCC 21892: strain improvement and structure elucidation. *J. Nat. Prod.* **2007**, 70, 402–406.
- ⁵⁴ Shimkets, L., Woese, C.R. A phylogenetic analysis of the myxobacteria: Basis for their classification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, 89, 9459–9463.
- ⁵⁵ Dawid, W. Biology and global distribution of myxobacteria in soils. *FEMS Microbiol.Rev.* **2000**, 24, 403–427
- ⁵⁶ (a) Bode H. B., Müller R. J. *Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, 33, 577–588. (b) Gerth K., Pradella S., Perlova O., Beyer S., Müller R., *J. Biotechnol.* **2003**, 106, 233–53.
- ⁵⁷ (a) Reichenbach, H. Myxobacteria, producers of novel bioactive substances. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2001**, 27, 149–156. (b) Weissman, K. J., and Müller, R.. Myxobacterial secondary metabolites: Bioactivities and modes-of-action. *Nat. Prod. Rep.* **2010**, 27, 1276–1295.
- ⁵⁸ Bollag D.M., McQueney P.A., Zhu J. Epothilones, a new class of microtubule-stabilizing agents with a taxol-like mechanism of action. *Cancer Res* **1995**, 55, 2325–33.
- ⁵⁹ Sasse F., Steinmetz H., Heil J., Hofle G., Reichenbach H. Tubulysins, new cytostatic peptides from myxobacteria acting on microtubuli. Production, isolation, physico-chemical and biological properties. *J Antibiot (Tokyo)* **2000**, 53, 879–885.
- ⁶⁰ Hofle, G. Structure elucidation of epothilones. *Angew. Chemie* **1996**, 35, 1567–1569
- ⁶¹ Chou, T.C., Zhang, X.G., Harris, C.R., Kuduk, S.D., Balog, A., Savin, K.A., Bertino, J.R., Daneshefsky, S.J. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1998**, 95, 15798.
- ⁶² Bollag, D.M., McQueney, P.A., Zhu, J., Hensens, O., Koupal, L., Liesch, J., Goetz, M., Lazarides, E., Woods, C.M. *Cancer Res.* **1995**, 55, 2325–2333
- ⁶³ Chou, T.C., Zhang, X.G., Balog, A., Su, D.S., Meng, D., Savin, K., Bertino, J., Danishefsky, S. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1998**, 95, 9642.
- ⁶⁴ Chou T.C.; O'Connor O.A.; Tong, W.P.; Guan, Y.; Zhang, X.G.; Stahel, S.J.; Lee, C.; Danishefsky, S.J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2001**, 47, 8113.

⁶⁵ DeConti R.C., Algazi A.P., Andrews S., Urbas P., Born O., Stoeckigt D., Floren L., Hwang J., Weber J., Sondak V.K., Daud A.I. Phase II trial of sagopilone, a novel epothilone analog in metastatic melanoma *B. J. Cancer* **2010**, 103, 1548–1553

⁶⁶ Cortazar P., Justice R., Johnson J., Sridhara R., Keegan P., Pazdur R., US Food and Drug Administration Approval Overview in Metastatic Breast Cancer, *J Clin Oncol.* **2012**, 10, 1705–1711.

⁶⁷ (a) Panda D, DeLuca K, Williams D, Jordan M.A., Wilson L. "Antiproliferative mechanism of action of cryptophycin-52: kinetic stabilization of microtubule dynamics by high-affinity binding to microtubule ends". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* **1998**, 95, 9313–9318. (b) Panda D., Himes R.H., Moore R.E., Wilson L., Jordan M.A. "Mechanism of action of the unusually potent microtubule inhibitor cryptophycin 1". *Biochemistry.* **1997**, 36, 12948–12953

⁶⁸ Schwartz R.E., Hirsch C.F., Sesin D.F., Flor J.E., Chartrain M., Fromtling R.E., Harris G.H., Salvatore M.J., Liesch J.M., Yudin K. "Pharmaceuticals from cultured algae". *Journal of Industrial Microbiology.* **1990**, 5, 113–123.

⁶⁹ Mooberry S.L, Busquets L., Tien G. "Induction of apoptosis by cryptophycin 1, a new antimicrotubule agent". *International Journal of Cancer* **1997**, 73, 440–8

⁷⁰ Drew L., Fine R.L., Do T.N., Douglas G.P., Petrylak D.P. "The novel antimicrotubule agent cryptophycin 52 (LY355703) induces apoptosis via multiple pathways in human prostate cancer cells". *Clinical Cancer Research* **2002**, 8, 3922–32.

⁷¹ Smith C.D., Zhang X., Mooberry S.L., Patterson G.M., Moore R.E. "Cryptophycin: a new antimicrotubule agent active against drug-resistant cells". *Cancer Research.* **1994**, 54, 3779–84.

⁷² Kobayashi M., Kurosu M., Ohyabu N., Wang W., Fujii S., Kitagawa I. "The Absolute Stereostructure of Arenastatin A, a Potent Cytotoxic Depsipeptide from the Okinawan Marine Sponge *Dysidea arenaria*". *Chemical & Pharmaceutical Bulletin.* **1994**, 42, 2196–2198

⁷³ Piel J. "Metabolites from symbiotic bacteria This review is dedicated to Professor Axel Zeeck on the occasion of his 65th birthday". *Natural Product Reports.* **2004**, 21, 519–38.

⁷⁴ Schwartz R. E., Hirsch C. F., Sesin D. F., Flor J. E., Chartrain M., Fromtling R.E., Harris G.H., Salvatore M.J. Liesch J.M., Yudin K. *J. Ind. Microbiol.* **1990**, 5, 113-124.

⁷⁵ Trimurtulu G., Ohtani I., Patterson G., Moore R.E., Corbett T.H., Valeriote F.A., Demchik L. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 4729–4737.

⁷⁶ (a) Corbett T.H., Valeriote F.A., Demchik L., Polin L., Panchapor C., Pugh S., White K., Knight J., Jones J., Jones L., LoRusso P., Foster B., Wiegand R.A., Lisow L., Golakoti T., Heltzel C.E., Ogino J., Patterson G.M., Moore R.E. *J. Exp. Ther. Oncol.* **1996**, 1, 95–108. (b) Panda D., Himes R. H., Moore R. E., Wilson L., Jordan M.A., *Biochemistry* **1997**, 36, 12948–12953. (c) Smith C.D., Zhang X., Mooberry S.L. Patterson G.M., Moore R.E. *Cancer Res.* **1994**, 54, 3779–3784.

⁷⁷ (a) Subbaraju G.V., Golakoti T., Patterson G.M., Moore R.E. *J. Nat. Prod.* **1997**, 60, 302–305. (b) Chaganty S., Golakoti T., Heltzel C., Moore R.E., Yoshida W.Y. *J. Nat. Prod.* **2004**, 67, 1403–1406.

⁷⁸ Lu K., Dempsey J., Schultz R.M., Shih C., Teicher B.A. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2001**, 47, 170-178.

⁷⁹ Smith C.D., Zhang X., Mooberry S.L., Patterson G.M., Moore R.E., *Cancer Res.* **1994**, 54 (14), 3779–3784.

⁸⁰ (a) Panda D., Williams D.C., Wagner M.M., Paul, D.C., Habeck L.L., Mendelsohn L.G., Shih C., Moore, R.E., Wilson, L. Inhibition of microtubule polymerization and dynamics by two novel cryptophycins, cryptophycins 52 and 55. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res* **1997**, 38, 225,.

⁸¹ Kobayashi M., Aoki S., Ohyabu N., Kurosu M., Wang W., Kitagawa I., *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 7969-7972.

⁸² (a) Corbett T., Valeriote F., Simpson C., Moore R., Tius M., Barrow R., Hemscheidt T., Liang J., Paik S., Polin L., Pugh S., Kushner J., Harrison S., Shih C., Martinelli M. Preclinical antitumor activity of cryptophycin-52/55 (C-52;C-55) against mouse tumors. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, **1997**, 38, 225, (b) Schultz, R.M., Shih C., Harrison S., Martinelli M.J., Toth J.E., Andis S.L. In vitro antiproliferative activity of the epoxide cryptophycin analogue, LY355703. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, **1997**, 38, 225–226, (c) Williams D.C., Wagner M.M., Law, K.L., Shepard R.L., Paul D.C., Starling J.J., Dantzig A.H., Moore R.W., Shih, C. In vitro pharmacology of cryptophycin 52 (LY355703) and cryptophycin 55 (LY355702) in human tumor cell lines. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* **1997**, 38: 226.

-
- ⁸³ Edelman M.J., Gandara D.R., Hausner P., Israel V., Thornton D., DeSanto J., Doyle L.A. *Lung Cancer* **2003**, 39, 197–199.
- ⁸⁴ D'Agostino G., del Campo J., Mellado B., Izquierdo M.A., Minarik T., Cirri L., Marini L., Perez-Gracia J.L., Scambia G. *Int. J. Gynecol. Cancer* **2006**, 16, 71–76.
- ⁸⁵ Liang J., Moore R.E., Moher E. D., Munroe J.E., Al-awar R.S., Hay D.A., Varie D.L., Zhang T.Y., Aikins J.A., Martinelli M.J., Shih C., Ray J.E., Gibson L.L., Vasudevan V., Polin L., White K., Kushner J., Simpson C., Pugh C., Corbett T.H. *Invest. New Drugs* **2005**, 23, 213–224.
- ⁸⁶ Dhar M., Ewing W., Lonberg N. *Annual Reports in Medicinal Chemistry* **2011**, 46, 433-502.
- ⁸⁷ Chater, K.F. Streptomyces. *Brenner's Encyclopedia of Genetics*, **2013**, 565–567.
- ⁸⁸ Dilip C.V., Mulaje S., Mohalkar R. A review on actinomycetes and their biotechnological application, *Int. J. Pharm. Sci. Res.* **2013**, 4, 1730-1742.
- ⁸⁹ Hwang, K.S., Kin, H.U., Charusanti, P., Palsson B., Lee, S.Y. Systems biology and biotechnology of Streptomyces species for the production of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, **2014**, 32, 255-268.
- ⁹⁰ Baltz R. Antimicrobials from actinomycetes: Back to the future. *Microbe – American Society for Microbiology*. **2007**;2, 125-131
- ⁹¹ Selvakumar J.N., Chandrasekaran S.D., Vaithilingam M. Bio prospecting of marine-derived Streptomyces spectabilis VITJS10 and exploring its cytotoxicity against human liver cancer cell lines. *Pharmacognosy Magazine*. **2015**, 11, 469.
- ⁹² Seipke R.F., Barke J., Brearley C., Hill L., Yu D.W., Goss R.J.M., A single Streptomyces symbiont makes multiple antifungals to support the fungus farming ant Acromyrmex octospinosus. *PLoS One*. **2011**, 6, e22028.
- ⁹³ Claessen D., de Jong W., Dijkhuizen L., Wösten H.A.B. Regulation of Streptomyces development: Reach for the sky! *Trends in Microbiology*. **2006**, 14, 313-319.
- ⁹⁴ Urem M., van Rossum T., Bucca G., Moolenaar G.F., Laing E., Swia tek-Połatyn M.A., Willemse J., Tenconi E., Rigali S., Goosen N., Smith C.P., van Wezel G.P.

2016. OsdR of *Streptomyces coelicolor* and the dormancy regulator DevR of *Mycobacterium tuberculosis* control overlapping regulons. *mSystems* **2016**, 1, 1-21.

⁹⁵ Sharma A., Gautam S., Saxena S. *Streptomyces Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)*, **2014**, 560-566

⁹⁶ Claessen D., de Jong W., Dijkhuizen L., Wosten H.A. Regulation of *Streptomyces* development: Reach for the sky. *Trends in Microbiology* **2006**, 14: 313–319.

⁹⁷ Growth F.K. Polarity and cell division in *Streptomyces*. *Current Opinion in Microbiology* **2003**, 6, 564-571.

⁹⁸ Dyson P., *Streptomyces Encyclopedia of Microbiology (Third Edition)* **2009**, 318-332

⁹⁹ Mann, J. Natural products as immunosuppressive agents, *Nat. Prod. Rep.* **2001**, 18, 417-430.

¹⁰⁰ Li L.Y., Yang Z.W., Asem M.D. "Streptomyces desertarenae sp. nov., a novel actinobacterium isolated from a desert sample," *Antonie van Leeuwenhoek*, **2019**, 112, 367-374.

¹⁰¹ Waksman S.A., Woodruff H.B. *Actinomyces antibioticus*, a new soil organism antagonistic to pathogenic and non-pathogenic bacteria. *J. Bacteriol.* **1941**, 42, 231-249.

¹⁰² Waksman S.A., Henrici A.T. The nomenclature and classification of Actinomycetes. *J. Bacteriol.* **1943**, 46, 337–341

¹⁰³ Waksman S.A., Woodruff H.B. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **1940**, 45, 609–614.

¹⁰⁴ Udvary D.W., Zeigler L., Asolkar R.N., Singan V., Lapidus A., Fenical W., Jensen P.R., Moore B.S. Genome sequencing reveals complex secondary metabolome in the marine actinomycete *Salinispora tropica*, *PNAS* **2007**, 19, 10376-10381

¹⁰⁵ Yoo Y.J., Hwang J.Y., Shin H.L., Cui H., Lee J., Yoon Y.J. Characterization of negative regulatory genes for the biosynthesis of rapamycin in *Streptomyces rapamycinicus* and its application for improved production. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, 42, 125–135.

-
- ¹⁰⁶ Antoraz S., Santamaria R.I., Diaz M., Sanz D.R.H. Toward a new focus in antibiotic and drug discovery from the *Streptomyces* arsenal. *Front. Microbiol.* **2015**, 6, 461.
- ¹⁰⁷ Tanaka Y. Activation and products of the cryptic secondary metabolite biosynthetic gene clusters by rifampin resistance (*rpoB*) mutations in actinomycetes. *J. Bacteriol.* **2013**, 195, 2959–2970.
- ¹⁰⁸ Luo Y. Activation and characterization of a cryptic polycyclic tetramate macrolactam biosynthetic gene cluster. *Nat. Commun.* **2013**, 4, 2894.
- ¹⁰⁹ Park S.R., Han A.R., Ban Y.H., Yoo Y.J., Kim E.J., Yoon Y.J. Genetic engineering of macrolide biosynthesis: past advances, current state, Microbial Production of Bioactive Molecules and future prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, 85, 1227–1239.
- ¹¹⁰ Marine Biomedicine: From Beach to Bedside, Ed. Bill J. Baker, CRC Press, Taylor & Francis Group, **2016**, 124-125 ISBN 9781466582132
- ¹¹¹ J.W. Foster, E. Katz, Control of actinomycin D biosynthesis in *Streptomyces parvulus*: regulation of tryptophan oxygenase activity. *J. Bacteriol.* **1981**, 148, 670-677.
- ¹¹² Hollstein U. *Chem. Rev.* **1974**, 74, 625-652.
- ¹¹³ Demain A. L., Sanchez S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. *Journal of Antibiotics*, **2009**, 62, 5-16,
- ¹¹⁴ (a) Baranasic D., Gacesa R., Starcevic A., Zucko J., Blazic M., Horvat M., Gjuracic K., Fujs S., Hranueli D., Kosec G., Cullum J., Petkovic H., Draft Genome Sequence of *Streptomyces rapamycinicus* Strain NRRL 5491, the Producer of the Immunosuppressant Rapamycin. *Genome Announc.* 1. **2013** doi: 10.1128/genomeA.00581-13. (b) Ohnishi, Y., Ishikawa J., Hara H., Suzuki H., Ikenoya M., Ikeda H., Yamashita A., Hattori M., Horinouchi S., Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. *J. Bacteriol.* **2008**, 190, 4050-4060. (c) Bentley S.D., Chater K.F., Cerdeno-Tarraga, A.M., Challis G.L., Thomson N.R., James K.D., Harris D.E., Quail M.A., Kieser H., Harper D., Bateman A., Brown S., Chandra G., Chen C.W., Collins M., Cronin A., Fraser A., Goble A., Hidalgo J., Hornsby T., Howarth S., Huang C.H., Kieser T., Larke L., Murphy L., Oliver K., O'Neil S., Rabbinowitsch E., Rajandream M.A., Rutherford K., Rutter S., Seeger K., Saunders D., Sharp S., Squares R., Squares S., Taylor K., Warren T., Wietzorrek A., Woodward J., Barrell B.G., Parkhill J., Hopwood

D.A., Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*. **2002**, 417, 141-147.

¹¹⁵ Chen H., Jiaqi C., Pan W., Xin W., Jianping W., Enhancement of bleomycin production in *Streptomyces verticillus* through global metabolic regulation of N-acetylglucosamine and assisted metabolic profiling analysis *Microb Cell Fact* **2020**, 19, 1-17.

¹¹⁶ Danshiitsoodol N., de Pinho C.A., Matoba Y., Kumagai T., Sugiyama M. "The mitomycin C (MMC)-binding protein from MMC-producing microorganisms protects from the lethal effect of bleomycin: crystallographic analysis to elucidate the binding mode of the antibiotic to the protein". *J Mol Biol*. **2006**, 360, 398–408

¹¹⁷ (a) Srivastava C., Hornemann U., High-pressure liquid chromatography of the antibiotics mitomycin A, B and C and of polar mitomycin C conversion products *Journal of Chromatography A* **1978**, 161, 393-395. (b) Gustafson D.L., Page R.L., Cancer Chemotherapy. Withrow and MacEwen's *Small Animal Clinical Oncology*, **2013**, 157–179.

¹¹⁸ Hata T., Sano Y., Sugawara R., Matsumae A., Kanomori K., Shima T., Hoshi T., Mitomycin, a new antibiotic from *Streptomyces*, *J. Antibiot.* **1956**, 9, 141–146.

¹¹⁹ Wakaki S., Marumo H., Tomioka K., Shimizu G., Kato E., Kamada H., Kudo S., Fujimoto Y. Isolation of new fractions of antitumor mitomycins, *Antibiot. Chemother.* **1958**, 8, 228–240.

¹²⁰ (a) Iyer V.N., Szybalski W.A. A molecular mechanism of mitomycin action: Linking of complementary DNA strands, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1963**, 50, 355–362. (b) Iyer V.N., Szybalski W.A. Mitomycins and porfiromycin: Chemical mechanism of activation and cross-linking of DNA, *Science* **1964**, 145, 55–58.

¹²¹ Bradner W.T. Mitomycin C: A clinical update, *Cancer Treat. Rev.* **2001**, 27, 35-50.

¹²² Bolenz C., Cao Y., Arancibia M.F., Trojan L., Alken P., Michel M.S. Intravesical mitomycin C for superficial transitional cell carcinoma, *Expert Rev. Anticancer Ther.* **2006**, 6, 1273–1282

¹²³ Kim Y.H., Park B.S., Bhatia, S.K., Seo H.M., Jeon J.M., Kim H.J. Production of rapamycin in *Streptomyces hygroscopicus* from glycerolbased media optimized by systemic methodology. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, 24, 1319–1326.

¹²⁴ Law B.K. Rapamycin: an anti-cancer immunosuppressant? *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2005**, 56, 47–60.

¹²⁵ Patrick Y. Major microbial diversity initiative recommended. *Am Soc Microbiol News* **1997**, 63:417-421.

¹²⁶ Alberts M.W., Williams R.T., Brown E.J., Tanaka A., Hall F.L., Schreiber S.L. FKBP-Rapamycin inhibits a cyclin-dependent kinase activity and a cyclin D1-Cdk association in early G1 of an osteosarcoma cell line. *J Biol Chem* **1993**, 268, 22825-29.

¹²⁷ Singh S.B., Genilloud O., Peláez F. Terrestrial Microorganisms – Filamentous Bacteria,” in *Comprehensive Natural Products II*, eds H.-W. Liu and L. Mander (Oxford: Elsevier), **2010**, 109–140.

¹²⁸ Gorska M., Popowska U., Sielicka A., Kuban-Jankowska A., Sawczuk W., Knap, N., Geldanamycin and its derivatives as Hsp90 inhibitors. *Front. Biosci. (Landmark Ed)* **2012**, 17, 2269–2277.

¹²⁹ Schulte T.W., Neckers L.M. The benzoquinone ansamycin 17-allylamino-17demethoxygeldanamycin binds to HSP90 and shares important biologic activities with geldanamycin. *Cancer Chemother Pharmacol* **1998**, 42, 273-279.

¹³⁰ (a) Hara M., DC 107, a novel antitumor antibiotic produced by a *Streptomyces* sp. *J Antibiot (Tokyo)* **1989**, 42, 333–335. (b) Hara M. Leinamycin, a new antitumor antibiotic from *Streptomyces*: Producing organism, fermentation and isolation. *J Antibiot (Tokyo)* **1989**, 42, 1768-1774.

¹³¹ Viswesh V., Gates K., Sun D. Characterization of DNA damage induced by a natural product antitumor antibiotic leinamycin in human cancer cells. *Chem Res Toxicol* **2010**, 23, 99–107.

¹³² Huang Y. Characterization of the *InmKLM* genes unveiling key intermediates for β -alkylation in leinamycin biosynthesis. *Org Lett* **2011**, 13, 498–501.

¹³³ Pan G., Xu Z., Guo Z., Hindra Ma, M., Yang D., Discovery of the leinamycin family of natural products by mining actinobacterial genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2017**, 114, E11131–E11140.

¹³⁴ (a) Duchnowska R. The role of anthracyclines and dose dense therapy in an adjuvant setting in HER-2 positive early breast cancer, in clinical practice. *Oncol.*

Clin. Pract. **2016**, 12, 8–11 (b) Rabbani A., Finn R.M., Ausio J. The anthracycline antibiotics: antitumor drugs that alter chromatin structure. *Bioessays* **2005**, 27, 50-56

¹³⁵ Demain A. L., Sanchez S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. *Journal of Antibiotics* **2009**, 62, 5-16.

¹³⁶ Cummings J., Cohen A.S., Hulse R., Post D.E., Redi M.H., Perkins J. *Eur. J. Cancer* **1991**, 27, 532.

¹³⁷ (a) Lomovskaya N., Otten S.L., Doi-Katayama Y., Fonstein L., Liu X.C., Takatsu T., Inventi-Solari A., Filippini S., Torti F., Colombo A.L., Hutchinson C.R., Doxorubicin overproduction in *Streptomyces peucetius*: cloning and characterization of the *dnrU* ketoreductase and *dnrV* genes and the *doxA* cytochrome P-450 hydroxylase gene, *J. Bacteriol.* **1999**, 181, 305-318. (b) Metsä-Ketelä M., Niemi J., Mäntsälä, P., Schneider G. "Anthracycline biosynthesis: genes, enzymes and mechanisms," in *Anthracycline Chemistry and Biology I: Biological Occurrence and Biosynthesis, Synthesis and Chemistry*, ed. K. Krohn (Berlin: Springer), **2008**, 101–140.

¹³⁷ Giddings L.A., Newman D.J. Microbial natural products: molecular blueprints for antitumor drugs. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, 40, 1181–1210.

¹³⁸ Di Marco A., Cassinelli G., Arcamone F. The discovery of daunorubicin. *Cancer Treat. Rep.* **1981**, 65, 3-8.

¹³⁹ Avendaño C., Menéndez J. C. Other Anticancer Drugs Targeting DNA and DNA-Associated Enzymes. *Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs* **2015**, 273-323.

¹⁴⁰ Cersosimo R.J., Hong W.K. Epirubicin: a review of the pharmacology, clinical activity, and adverse effects of an adriamycin analogue. *Journal of Clinical Oncology* **1986**, 4, 425-439

¹⁴¹ https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/appletter/2002/65036ltr.pdf

¹⁴² Application number: 50-807. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2006/050807s000_Approv.pdf

¹⁴³ Giddings L.A., Newman D.J. Microbial natural products: molecular blueprints for antitumor drugs. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, 40, 1181-1210.

¹⁴⁴ NIH National Cancer Institut: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/idarubicinhydrochloride>

-
- ¹⁴⁵ Pickens L.B., Kim W., Wang P., Zhou H., Watanabe K., Gomi S., Tay Y. Biochemical analysis of the biosynthetic pathway of an anticancer tetracycline SF2575. *J Am Chem Soc* **2009**, 131, 17677-17689
- ¹⁴⁶ Lu C., Zhao Y., Jia W.-Q., Zhang H., Qi H., Xiang W.S., Wang X.J. A new anthracycline-type metabolite from *Streptomyces* sp. NEAU-L3. *J. Antibiotics* **2017**, 70, 1026-1028.
- ¹⁴⁷ (a) Thiry M., Cingolani D. Optimizing scale-up fermentation processes. *Trends Biotechnol.* **2002**, 20, 103-105. (b) Hewitt, C. J., and Nienow, A. W. The scale-up of microbial batch and fed-batch fermentation processes. *Adv. Appl. Microbiol.* **2007**, 62, 105–135.
- ¹⁴⁸ Sehgal S.N., Chang J.Y. Rapamycin: a new immunosuppressive macrolide. *Trans. Immunol. Lett.* **1990**, 7, 12-14.
- ¹⁴⁹ Wang C., Wang J., Yuan J., Jiang L., Jiang X., Yang B., Zhao G., Liu B., Huang D. Generation of *Streptomyces hygroscopicus* cell factories with enhanced ascomycin production by combined elicitation and pathway-engineering strategies. *Biotechnol. Bioeng.* **2019**, 116, 1-14.
- ¹⁵⁰ (a) Dutton C.J.; Banks B.J.; Cooper C.B. *Nat. Prod. Rep.* **1995**, 12, 165; (b) Westley J.W. In *Polyether Antibiotics. Naturally Occurring Acid Ionophores*; Marcel Dekker: New York, **1982**, 1, 1-20.
- ¹⁵¹ (a) Mollenhauer H.H., Morré D.J., Rowe L.D. *Biochim. Biophys. Acta* 1990, 1031, 225; (b) Pressman, B. C. *Ann. Rev. Biochem.* **1976**, 45, 501; (c) Riddell F.G. *Chirality* **2002**, 14, 121.
- ¹⁵² (a) Kevin D.A., Meujo D.A.F., Hamann M.T. *Expert Opin. Drug Disc.* 2009, 4, 109; (b) Pressman B.C., DeGuzman N.T. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1975, 264, 373; (c) Chapman H.D., Jeffers T.K., Williams R.B. *Poult. Sci.* **2010**, 89, 1788; (d) Novilla, M. N. Ionophores. In *Veterinary Toxicology*; Gupta, R. C., Ed.; Academic Press, **2012**, 1281–1299.
- ¹⁵³ Antoszczak M., Steverding D., Huczynski A. Anti-parasitic activity of polyether ionophores. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, 166, 32-47.
- ¹⁵⁴ Callaway T.R., Edrington T.S., Rychlik J.L., Genovese K.J., Poole T.L., Jung Y.S., Bischoff K.M., Anderson R.C., Nisbet D.J. Ionophores: their use as ruminant growth promotants and impact on food safety. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* **2003**, 443-51.

¹⁵⁵ Baibakov B.A., Frank G.A., Margolis L.B., Skulachev V.P. Anti-tumor effect of K⁺/H⁺-antiporter nigericin on human lung carcinoma grown in in vivo-like histocultures. *Int. J. Oncol.* **1993**, 31127-1129.

¹⁵⁶ Simizu S., Tanabe K., Tashiro E., Takada M., Umezawa K., Imoto M. Potentiation of paclitaxel cytotoxicity by inostamycin in human small cell lung carcinoma, Ms-1 cells. *Jpn. J. Canc. Res.* **1998**, 89970-976.

¹⁵⁷ (a) Kevin D.A., Meujo D.A. F., Hamann M.T. *Expert Opin. Drug Disc.* **2009**, 4, 109; (b) Pressman B.C., DeGuzman N.T. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1975**, 264, 373; (c) Novilla M.N. Ionophores. In *Veterinary Toxicology*; Gupta, R. C., Ed.; Academic Press, **2012**, 1281–1299.

¹⁵⁸(a) Mollenhauer H.H., Morr  D.J., Rowe L.D. *Biochim. Biophys. Acta* **1990**, 1031, 225; (b) Pressman B.C. *Antibiotics and their complexes*; Marcel Dekker: New York, **1985**, 1–18; (c) Dobler M. Natural Cation-binding Agents in *Comprehensive Supramolecular Chemistry Molecular Recognition Receptors for Cationic Guests*; Gokel, G. W., Ed.; Pergamon: New York, NY, USA, **2004**, 1, 267–313.

¹⁵⁹ Steinrauf L.K., Pinkerton M., Chamberlin J.W. The structure of nigericin. *Biochem Biophys Res Commun* **1968**, 33, 29-31.

¹⁶⁰ Poole D.T., Butler T.C., Williams M.E. The effects of nigericin, valinomycin, and 2,4-dinitrophenol on intracellular pH, glycolysis, and K⁺ concentration of Ehrlich ascites tumor cells. *Biochim BiophysActa* **1972**, 266, 463–70.

¹⁶¹ (a) Rotin D., Wan P., Grinstein S., Tannock I. Cytotoxicity of compounds that interfere with the regulation of intracellular pH: a potential new class of anticancer drugs. *Cancer Res* **1987**, 47, 1497–504. (b) Margolis L.B., Rozovskaja I.A., Skulachev V.P. Acidification of the interior of Ehrlich ascites tumor cells by nigericin inhibits DNA synthesis. *FEBS Lett* **1987**, 220, 288–90.

¹⁶² (a) Schindler M., Grabski S., Hoff E., Simon S.M. Defective pH regulation of acidic compartments in human breast cancer cells (MCF-7) is normalized in adriamycin-resistant cells (MCF-7adr). *Biochemistry* **1996**, 35, 2811–7. (b) Kuin A., Aalders M., Lamfers M., van Zuidam D.J., Essers M., Beijnen J.H. Potentiation of anti-cancer drug activity at low intratumoral pH induced by the mitochondrial inhibitor m-iodobenzylguanidine (MIBG) and its analogue benzylguanidine (BG). *Br J Cancer* **1999**, 79, 793–801. (c) Andersson B., Behnam-Motlagh P., Henriksson R., Grankvist K. Pharmacological modulation of lung cancer cells for potassium ion depletion. *Anticancer Res* **2005**, 25, 2609–16. (d) Boesch M., Zeimet A.G., Rumpold H., Gastl G., Sopper S., Wolf D. Drug transporter-mediated protection of cancer stem cells from ionophore antibiotics. *Stem Cells Transl Med* **2015**, 4, 1028–32.

-
- ¹⁶³ Mashima T., Okabe S., Seimiya H. Pharmacological targeting of constitutively active truncated androgen receptor by nigericin and suppression of hormonerefractory prostate cancer cell growth. *Mol Pharmacol.* **2010**, 78, 846-854.
- ¹⁶⁴ Zanke B.W., Lee C., Arab S., Tannock I.F. Death of tumor cells after intracellular acidification is dependent on stress-activated protein kinases (SAPK/JNK) pathway activation and cannot be inhibited by Bcl-2 expression or interleukin 1b-converting enzyme inhibition. *Cancer Res.* **1998**, 58, 2801–8.
- ¹⁶⁵ Lu D., Choi M.Y., Yu J., Castro J.E., Kipps T.J., Carson D.A. Salinomycin inhibits Wnt signaling and selectively induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* **2011**, 108, 13253-7.
- ¹⁶⁶ Varnes M.E., Bayne M.T., Menegay H.J., Tuttle S.W. Effect of the K⁺/H⁺ ionophore nigericin on response of A549 cells to photodynamic therapy and tert-butylhydroperoxide. *Free Radic Biol Med.* **1993**, 15, 395–405.
- ¹⁶⁷ Deng C.C., Liang Y., Wu M.S., Feng F.T., Hu W.R., Chen L.Z. Nigericin selectively targets cancer stem cells in nasopharyngeal carcinoma. *Int J Biochem Cell Biol* **2013**, 45, 1997–2006.
- ¹⁶⁸ Vaupel P. Tumor microenvironmental physiology and its implications for radiation oncology. *Semin Radiat Oncol.* **2004**, 14, 198–206.
- ¹⁶⁹ Zhou H.M., Dong T.T., Wang L.L., Feng B., Zhao H.C., Fan X.K. Suppression of colorectal cancer metastasis by nigericin through inhibition of epithelial-mesenchymal transition. *World J Gastroenterol* **2012**, 18, 2640-8.
- ¹⁷⁰ Yakisich J.S., Azad N., Kaushik V., O'Doherty G.A., Iyer A.K. Nigericin decreases the viability of multidrug-resistant cancer cells and lung tumorspheres and potentiates the effects of cardiac glycosides. *Tumour Biol* **2017**, 39, 1010428317694310.
- ¹⁷¹ Feinberg A.P., Ohlsson R., Henikoff S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nature Reviews Genetics*, **2006**, 7, 21-33.
- ¹⁷² IARC International Agency for Research on Cancer Latest global cancer data: Cancer burden rises to 18.1 million new cases and 9.6 million cancer deaths in **2018**. Press release **2018**, n° 263, 1-3.
- ¹⁷³ Bray F. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians, Hoboken*, **2018**, 68, 394-424.

¹⁷⁴ BRAY F. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians, Hoboken*, **2018**, 68, 394-424.

¹⁷⁵ Haltiwanger S. Why electroporation is a useful technique for cancer treatments *Electroporation-Based Therapies for Cancer from Basics to Clinical Applications* 1st Edition **2014**, 103-125

¹⁷⁶ (a) Lemmon M.A., Schlessinger, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **2010**, 141, 1117–1134. (b) Witsch E., Sela, M., Yarden, Y. Roles for growth factors in cancer progression. *Physiology (Bethesda)* **2010**, 25, 85–101.

¹⁷⁷ (a) Hynes N.E., MacDonald G. ErbB receptors and signaling pathways in cancer. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2009**, 21, 177–184. (b) Perona R. Cell signalling: growth factors and tyrosine kinase receptors. *Clin. Transl. Oncol.* **2006**, 8, 77–82.

¹⁷⁸ (a) Cheng N., Chytil A., Shyr Y., Joly A., Moses H.L. Transforming growth factor-beta signaling deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. *Mol. Cancer Res.* **2008**, 6, 1521–1533. (b) Bhowmick N.A., Neilson E.G., Moses H.L. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* **2004**, 432, 332–337.

¹⁷⁹ Zonga A., Caob H., Wang F. Anticancer polysaccharides from natural resources: A review of recent research. *Carbohydrate Polymers*, **2012**, 90, 1395-1410.

¹⁸⁰ Masui K., Cavenee W.K., Mischel P.S. Cancer metabolism as a central driving force of glioma pathogenesis. *Brain Tumor Pathol.* **2016**, 33, 161-168.

¹⁸¹ Hanahan D., Weinberg R.A. *The hallmarks of cancer.* *Cell* **2000**, 100, 57–70

¹⁸² Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation *Cell* **2011**, 144, 646-674

¹⁸³ Hadfield G. The dormant cancer cell. *Br. Med. J.* **1954**, 2, 607–610.

¹⁸⁴ Friberg S. Nystrom A. Cancer metastases: early dissemination and late recurrences. *Cancer Growth Metastasis* **2015**, 8, 43–49.

¹⁸⁵ Townson J.L., Chambers A.F. Dormancy of solitary metastatic cells. *Cell Cycle* **2006**, 5, 1744–1750.

¹⁸⁶ Pan H. 20-Year risks of breast-cancer recurrence after stopping endocrine therapy at 5 years. *N. Engl. J. Med.* **2017**, 377, 1836–1846.

¹⁸⁷ Lawson M.A. Osteoclasts control reactivation of dormant myeloma cells by remodelling the endosteal niche. *Nat. Commun.* **2015**, 6, 8983.

¹⁸⁸ Yu Z., Pestell T.G., Lisanti M.P., Pestell R.G. Cancer stem cells. *Int J Biochem Cell Biol.* **2012**, 44, 2144-2151.

¹⁸⁹ (a) Lambert A. W., Pattabiraman D. R., Weinberg R. A. Emerging biological principles of metastasis. *Cell* **2017**, 168, 670–691. (b) Dillekas H., Rogers M. S., Straume O. Are 90% of deaths from cancer caused by metastases? *Cancer Med.* **2019**, 8, 5574–5576

¹⁹⁰ Boehm J.S. Integrative genomic approaches identify IKBKE as a breast cancer oncogene. *Cell*, **2007**, 129, 1065-1079.

¹⁹¹ Phan T.G., Croucher P.I. The dormant cancer cell life cycle. *Nat Rev Cancer* **2020**, 20, 398-411

¹⁹² Davies M.A., Samuels Y. Analysis of the genome to personalize therapy for melanoma. *Oncogene*, **2010**, 29, 5545–5555.

¹⁹³ (a) Jiang B.H., Liu L.Z. PI3K/PTEN signaling in angiogenesis and tumorigenesis. *Adv. Cancer Res.* 2009, 102, 19–65. (b) Yuan T.L., Cantley L.C. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene* **2008**, 27, 5497–5510.

¹⁹⁴ Perona R. Cell signalling: growth factors and tyrosine kinase receptors. *Clinical and Translational Oncology* **2006**, 8, 77–82.

¹⁹⁵ Wu P., Nielsen T.E., Clausen M.H., FDA-approved small-molecule kinase Inhibitors. *Trends Pharmacol. Sci.* **2015**, 36, 422-39

¹⁹⁶(a) O'Reilly K.E., Rojo F., She Q.B., Solit D., Mills G.B., Smith D., Lane H., Hofmann F., Hicklin D.J., Ludwig D.L. mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. *Cancer Res.* **2006**, 66, 1500-1508. (b) Shawver L.K., Slamon D., Ullrich A. Smart drugs: Tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *Cancer Cell.* **2002**, 1, 117–123.

-
- ¹⁹⁷ Kontzias A., Kotlyar A., Laurence P., Changelian J.J. O'Shea, Jakinibs: A new class of kinase inhibitors in cancer and autoimmune disease. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2012**, 12, 464–470.
- ¹⁹⁸ Liu J., Han G., Liu H., Qin C., Suppression of cholangiocarcinoma cell growth by human umbilical cord mesenchymal stem cells: a possible role of Wnt and Akt signaling. *PLoS One.* **2013**, 8, e62844
- ¹⁹⁹ Mancinelli R., Carpino G., Petrunaro S., Mammola C.L., Tomaipitınca L., Filippini A., Facchiano A., Ziparo E., Giampietri C. Multifaceted Roles of GSK-3 in Cancer and autophagy-related diseases. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017** 4629495.
- ²⁰⁰ Ougolkov A.V., Fernandez-Zapico M.E., Savoy D.N., Urrutia R.A., Billadeau D.D. Glycogen synthase kinase-3 β participates in nuclear factor κ B-mediated gene transcription and cell survival in pancreatic cancer cells. *Cancer Res.* **2005**, 65, 2076–2081.
- ²⁰¹ Vidri R.J., Timothy L.F., GSK-3: An important kinase in colon and pancreatic cancers. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **2020**, 1867, 118626.
- ²⁰² Lowe S.W., Cepero E., Evan G. Intrinsic tumour suppression. *Nature* **2004**, 432, 307–315
- ²⁰³ Adams J.M., Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* **2007**, 26, 1324–1337.
- ²⁰⁴ Adams, J.M., Cory, S. (The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* **2007**, 26, 1324–1337.
- ²⁰⁵ Junttila M.R., Evan G.I. p53—a Jack of all trades but master of none. *Nat. Rev. Cancer* **2009**, 9, 821-829.
- ²⁰⁶ Levine B., Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* **2008**, 132, 27–42.
- ²⁰⁷ Nagelkerke A., Sweep F.C.G.J., Geurts-moespo T.A., Bussink J., Span P.N. Therapeutic targeting of autophagy in cancer. Part I: Molecular pathways control ling autophagy. *Seminars in Cancer Biology* **2015**, v. 31, p. 89-98.
- ²⁰⁸ Mathew R., Karantza-Wadsworth V., White E. Role of autophagy in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2007**, 7, 961–967.

²⁰⁹ (a) White E., Di Paola R.S. The double-edged sword of autophagy modulation in cancer. *Clin. Cancer Res.* **2009**, 15, 5308–5316. (b) Apel A., Zentgraf H., Büchler M.W., Herr I. Autophagy-A doubleedged sword in oncology. *Int. J. Cancer* **2009**, 125, 991–995. (c) Amaravadi R.K., Thompson C.B. The roles of therapy-induced autophagy and necrosis in cancer treatment. *Clin. Cancer Res.* **2007**, 13, 7271–7279.

²¹⁰ White E., Di Paola R.S. The double-edged sword of autophagy modulation in cancer. *Clin. Cancer Res.* **2009**, 15, 5308–5316. (b) Lu Z., Luo R.Z., Lu Y., Zhang X., Yu Q., Khare S., Kondo S., Kondo Y., Yu Y., Mills G.B. The tumor suppressor gene ARHI regulates autophagy and tumor dormancy in human ovarian cancer cells. *J. Clin. Invest.* **2008**, 118, 3917-3929.

²¹¹ Galluzzi, L., and Kroemer, G. Necroptosis: a specialized pathway of programmed necrosis. *Cell* **2008**, 135, 1161-1163.

²¹² Grivennikov, S.I., Greten, F.R., and Karin, M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* **2010**, 140, 883-899.

²¹³ Grivennikov, S.I., Greten, F.R., and Karin, M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* **2010**, 140, 883-899.

²¹⁴ Lozano R., Naghavi M., Foreman K., Lim S., Shibuya L., Aboyans V., Abraham J., Adair T., Aggarwal R., Ahn S.Y., Almazroa M.A., Alvarado M., Anderson H.R., Anderson L.M., Andrews K.G., Atkinson C., Baddour L.M., Collo S.B, Bartels D.H., Bell M.L., Benjamin E.J., Bennett D., Bhalla K., Bikbov N., Abdulhak A.B., Birbeck G., Blyth F., Bolliger I., Boufous S., Bucello C., M. Burch, P. Burney, J. Carapetis, H. Chen, D. Chou, S.S. Chugh, L.E. Coffeng, S.D. Colan, S. Colquhoun, K.E. Colson, J. Condon, M.D. Connor, L.T. Cooper, M. Corriere, M. Cortinovis, K.C. Vaccaro, W. Couser, B.C. Cowie, M.H. Criqui, M. Cross, K.C. Dabhadkar, N. Dahodwala, D. Leo, L. Degenhardt, A. Delossantos, J. Denenberg, D.C. Jarlais, S.D. Dharmaratne, E.R. Dorsey, T. Driscoll, H. Duber, B. Ebel, P.J. Erwin, P. Espindola, M. Ezzati, V. Feigin, A.D. Flaxman, M.H. Forouzanfar, F.G.R. Fowkes, R. Franklin, M. Fransen, M.K. Freeman, S.E. Gabriel, E. Gakidou, F. Gaspari, R.F. Gillum, D.G. Medina, Y.A. Halasa, D. Haring, J.E. Harrison, R. Havmoeller, R.J.R. J. Hay, B. Hoen, P.J. Hotez, D. Hoy, K.H. Jacobsen, S.L. James, R. Jasrasaria, S. Jayaraman, N. Johns, G. Karthikeyan, N. Kassebaum, A. Keren, J.P. Khoo, L.M. Knowlton, O. Kobusingye, A. Koranteng, R. Krishnamurthi, M. Lipnick, S.E. Lipshultz, S.L. Ohno, J. Mabweijano, M.F. MacIntyre, L. Mallinger, L. March, G.B.Marks, R. Marks, A. Matsumori, R. Matzopoulos, B.M. Mayosi, J.H. McAnulty, M.M. McDermott, J. McGrath, Z.A. Memish, G.A.Mensah, T.R. Merriman, C. Michaud, M. Miller, T.R. Miller, C. Mock, A.O. Mocumbi, A.A. Mokdad, A. Moran, K. Mulholland, M.N. Nair, L. Naldi, K.M.V. Narayan, K. Nasser, P. Norman, M. O'Donnell, S.B. Omer, K. Ortblad, R. Osborne, D. Ozgediz, B. Pahari, J.D. Pandian, A.P. Rivero, R.P.Padilla, F.P. Ruiz, N. Perico, D. Phillips, K. Pierce, C.A. Pope, E. Porrini, F. Pourmalek, M. Raju, D. Ranganathan, J.T. Rehm, D.B. Rein, G. Remuzzi, F.P. Rivara, T. Roberts, F.R. De León, L.C.

Rosenfeld, L. Rushton, R.L. Sacco, J.A. Salomon, U. Sampson, E. Sanman, D.C. Schwebel, M.S. Gomez, D.S. Shepard, D. Singh, J. Singleton, K. Sliwa, E. Smith, A. Steer, J.A. Taylor, B. Thomas, I.M. Tleyjeh, J.A. Towbin, T. Truelsen, E.A. Undurraga, N. Venketasubramanian, L. Vijayakumar, T. Vos, G.R. Wagner, M. Wang, W. Wang, K. Watt, M.A. Weinstock, R. Weintraub, J.D. Wilkinson, A.D. Woolf, S. Wulf, P.H. Yeh, P. Yip, A. Zabetian, Z.J. Zheng, A.D. Lopez, C.J. Murray, M.A. AlMazroa, Z.A. Memish, Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010, *Lancet* **2012**, 3802095-2128.

²¹⁵ Bray F. Transitions in human development and the global cancer burden. *In*: WILD, C.P.; STEWART, B. eds. World cancer report 2014. Lyon: *International Agency for Research on Cancer*, **2014**.

²¹⁶ Ghobrial I.M., Witzig T.E., Adjei A.A. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy, *Curr. Cancer Drug Targets* **2004**, 4, 569-576.

²¹⁷ Wyld L., Audisio R.A., Poston G.J. The evolution of cancer surgery and future perspectives. *Nature Reviews Clinical Oncology*, **2015**, 12,115–124.

²¹⁸ Baskar R., Lee K. A., Yeo R., Yeoh K.W. Cancer and radiation therapy: currentadvances and future directions. *International Journal of Medical Sciences*, **2012**, 9,193-199.

²¹⁹ Eickhoff H., Linz U. Medical Applications of Accelerators. *Reviews of Accelerator Science and Technology* **2008**, 1, 143-161

²²⁰ Begg A.C., Stewart F.A., Vens C. Strategies to improve radiotherapy with targeted drugs. *Nature Reviews Cancer* **2011**, 11, 239-253,

²²¹ Baskar R., Lee K.A., Yeo R., Yeoh K.W. Cancer and radiation therapy: currentadvances and future directions. *International Journal of Medical Sciences* **2012**, 9, 93-199.

²²² Peters C., Brown S. Antibody–drug conjugates as novel anti-cancer chemotherapeutics. *Bioscience Reports*, **2015**, 35, 1-20.

²²³ Utku N. New approaches to treat cancer - What they can and cannot do. *Biotechnology Healthcare* **2011**, 8, 25, **2011**.

²²⁴ (a) Demain A. L., Vaishnav P. Natural products for cancer chemotherapy. *Microb. Biotechnol.* **2011**, 4, 687-699. (b) Einhorn L. H., Donohue J., Cis-

diamminedichloroplatinum, vinblastine, and bleomycin combination chemotherapy in disseminated testicular cancer. *J. Urol.* **2002**, 168, 2368-2372.

²²⁵ (a) Bayat M.R., Homayouni T.S., Baluch N., Morgatskaya E., Kumar S., Das B., Yeger H. Combination therapy in combating cancer. *Oncotarget* **2017**, 8, 38022-38043. (b) Woodcock J., Griffin J.P., Behrman R.E. Development of novel combination therapies. *N Engl. J. Med.* **2011**, 364, 985–987.

²²⁶ (a) Mayer L.D., Janoff A.S. Optimizing combination chemotherapy by controlling drug ratios. *Mol. Interv.* **7**, **2007**, 216–223. (b) Zoli W., Ricotti L., Tesei A., Barzanti F., Amadori D. In vitro preclinical models for a rational design of chemotherapy combinations in human tumors. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **37**, **2001**, 69–82.

²²⁷ (a) Coates A., Abraham S., Kaye S.B., Sowerbutts T., Frewin C., Fox R.M., Tattersall M.H. On the receiving end: patient perception of the side-effects of cancer chemotherapy, *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* **1983**, 19, 203-208. (b) Bates S.E. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters, *Nat. Rev. Canc.* **2002**, 2, 48-58.

²²⁸ Conforti L. The ion channel network in T lymphocytes, a target for immunotherapy. *Clinical Immunology.* **2012**, 142, 105–6.

²²⁹ Syn N.L., Teng M.W., Mok T.S., Soo R.A. De-novo and acquired resistance to immune checkpoint targeting. *The Lancet. Oncology.* **2017**, 18, 731-741.

²³⁰ Conforti L. The ion channel network in T lymphocytes, a target for immunotherapy. *Clinical Immunology.* **2012**, 142, 105–6.

²³¹ Baker K.F., Isaacs J.D. Prospects for Therapeutic Tolerance in Humans. *Current Opinion in Rheumatology.* **2014**, 26, 219–227.

²³² Lima S.M., Melo J.G., Militão G.C., Lima G.M., do Carmo A.L.M, Aguiar J.S., Araújo R.M., Braz-Filho R., Marchand P., Araújo J.M., Silva T.G. Characterization of the biochemical, physiological, and medicinal properties of *Streptomyces hygroscopicus* ACTMS-9H isolated from the Amazon (Brazil). *Appl Microbiol Biotechnol.* **2017**, 101, 711-723.

²³³ Wu Z., Bai L., Wang M., Shen Y. Structure–antibacterial relationship of nigericin derivatives, *Chem. Nat. Comp.* **2009**, 45, 333-337

²³⁴ Z Wu Z., Bai L., Wang M., Shen Y. Structure–antibacterial relationship of nigericin derivatives, *Chem. Nat. Comp.* **2009**, 45, 333-337

²³⁵ Fouche G., Cragg G.M., Pillay P., Kolesnikova N., Maharaj V.J. Senabe J. In vitro anticancer screening of South African plants. *Journal of Ethnopharmacology*, **2008**, 119, 455-461,

²³⁶ Vasievich E. A., Huang L. The suppressive tumor microenvironment: a challenge in cancer immunotherapy. *Molecular Pharmaceutics* **2011**, 8, 635-641.

²³⁷ Suffness M., Pezzuto J.M. Assays related to cancer drug discovery. In: Hostettmann K (ed). *Methods in Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity*, Academic Press: London. **1990**, 6, 71-133.

²³⁸ Liu F., Li W., Hua S., Han Y., Xu Z., Wan D., Wang Y., Chen W., Kuang Y., Shi J., Zhi Q. Nigericin exerts anticancer effects on human colorectal cancer cells by inhibiting Wnt/b-catenin signaling pathway. *Mol. Cancer Ther.* **2018**, 17, 952-965.

²³⁹ Deng C.C., Liang Y., Wu M.S., Feng F.T., Hu W.R., Chen L.Z., Feng Q. S., Bei J.X., Zeng Y.X. Nigericin selectively targets cancer stem cells in nasopharyngeal carcinoma. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2013**, 45, 1997-2006.

²⁴⁰ Maidorn R.P., Cragoe E.J., Tannock I.F. Therapeutic potential of analogues of amiloride: inhibition of the regulation of intracellular pH as a possible mechanism of tumour selective therapy. *Br. J. Cancer.* **1993**, 67, 297-303.

²⁴¹ Macklis J.D., Madison R.D. Progressive incorporation of propidium iodide in cultured mouse neurons correlates with declining electrophysiological status: a fluorescence scale of membrane integrity. *Journal of Neuroscience Methods*, **1990**, 31, 43-46.

²⁴² (a) Gordy C., He Y.W. The crosstalk between autophagy and apoptosis: where does this lead? *Protein Cell.* **2012**, 3, 17-27. (b) Liu J., Long S., Wang H., Liu N., Zhang C., Zhang L., Zhang Y. Blocking AMPK/ULK1-dependent autophagy promoted apoptosis and suppressed colon cancer growth. *Cancer Cell Int.* **2019**, 13, 336.

²⁴³ (a) Jung H.J., Kang J.H., Choi S., Son Y.K., Lee K.R., Seong J.K., Kim S.Y., Oh S.H. Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) induces apoptosis and autophagy in lung cancer cells and autophagy inhibition enhances PMA induced apoptosis. *J. Ethnopharmacol.* **2017**, 208, 253-263. (b) Cave D.D., Desiderio V., Mosca L., Ilisso C.P., Mele L., Caraglia M., Cacciapuoti G., Porcelli M. S-Adenosylmethionine-mediated apoptosis is potentiated by autophagy inhibition induced by chloroquine in human breast cancer cells. *J. Cell. Physiol.* **2017**, 233, 1370-1383.

²⁴⁴ (a) Ranjan A., Srivastava S.K. Penfluridol suppresses pancreatic tumor growth by autophagy mediated apoptosis. *Sci. Rep.* **2016**, 6, 26165. (b) Wang Y., Luo Q., He X., Wei H., Wang T., Shao J., Jiang X., Emodin induces apoptosis of colon cancer cells via induction of autophagy in a ROS-dependent manner. *Oncol. Res.***2018**, 26, 889-899.

²⁴⁵ Azoulay A.R.E., Avrahami L., Katz A., Eldar F.H. Combined regulation of mTORC1 and lysosomal acidification by GSK-3 suppresses autophagy and contributes to cancer cell growth. *Oncogene.* **2015**, 34, 4613–4623.

²⁴⁶ Ozpolat B., Benbrook D.M. Targeting autophagy in cancer management – strategies and developments. *Cancer Manag Res* **2015**, 7, 291-299

²⁴⁷ (a) Roskoski R.Jr. Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors: A 2020 update. *Pharmacol Res.* **2020**, 152, 104609. (b) Schrecengost R.S., Green C.L., Zhuang Y., Keller S.N., Smith R.A., Maines L.W., Smith C.D. *In Vitro* and *In Vivo* Antitumor and Anti-Inflammatory Capabilities of the Novel GSK3 and CDK9 Inhibitor ABC1183. *J Pharmacol Exp Ther.* **2018**, 365, 107-116.

²⁴⁸ Azoulay A.R., Elya L.A., Katz A., Eldar F.H. Combined regulation of mTORC1 and lysosomal acidification by GSK-3 suppresses autophagy and contributes to cancer cell growth. *Oncogene.* **2015**, 34, 4613–4623.

²⁴⁹ (a) Thomas H.E., Mercer C.A., Carnevalli L.S., mTOR inhibitors synergize on regression, reversal of gene expression, and autophagy in hepatocellular carcinoma. *Sci. Transl. Med.* **2012**, 4, 139ra184. (b) Maiuri M.C., Zalckvar E., Kimchi A., Kroemer G. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2007**, 8, 741–52.

²⁵⁰ O Prof. Marcelo Zaldini Hernandez é coordenador do Laboratório de Química Teórica Medicinal (LQTM), do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFPE

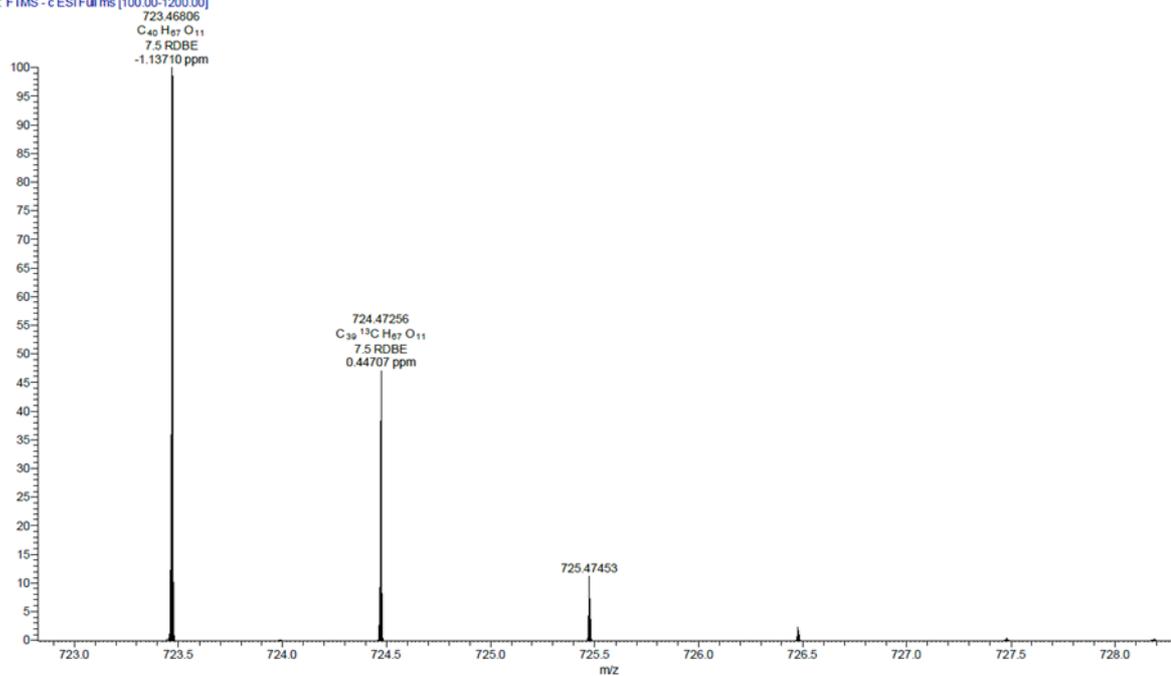
²⁵¹ M-Nairismägi M.E., Gerritsen Z.M. Oncogenic activation of JAK3-STAT signaling confers clinical sensitivity to PRN371, a novel selective and potent JAK3 inhibitor, in natural killer/T-cell lymphoma. *Leukemia.* **2018**, 32, 1147-1156.

²⁵² Roskoski R.Jr. Janus Kinase (JAK) Inhibitors in the Treatment of Inflammatory and Neoplastic Diseases. *Pharmacol Res.* **2016**, 111, 784-803.

²⁵³ Vainchenker W., Leroy E., Gilles L., Marty C., Plo I., Constantinescu S.N. JAK inhibitors for the treatment of myeloproliferative neoplasms and other disorders. *F1000Res.* **2018**, 7, 82.

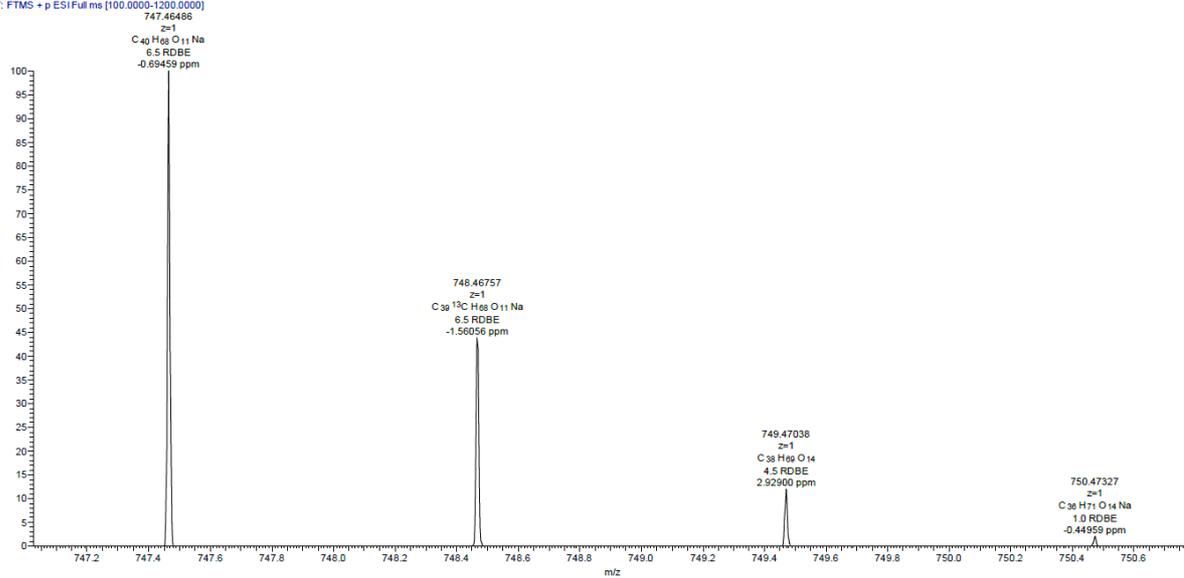
ANEXO A - AMPLIAÇÃO ESI(+)-FTMS ENTRE 720 E 730 M/Z

BG ELAIOFILINA TESTE 18.02.2019 - NEG_190218163751 #1 RT: 0.09 AV: 1 NL: 1.47E7
T: FTMS - c ESI Full ms [100.00-1200.00]

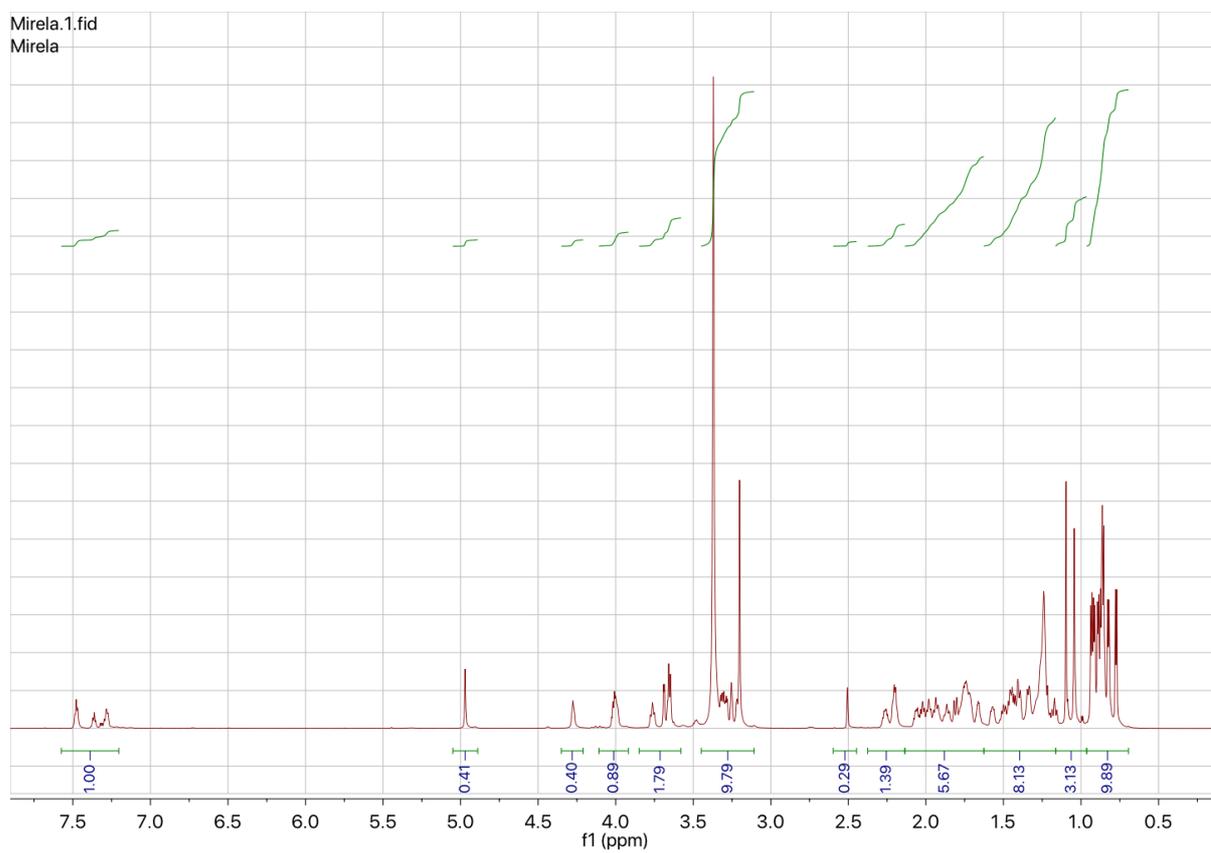


ANEXO B - AMPLIAÇÃO ESI(+)-FTMS ENTRE 740 E 750 M/Z

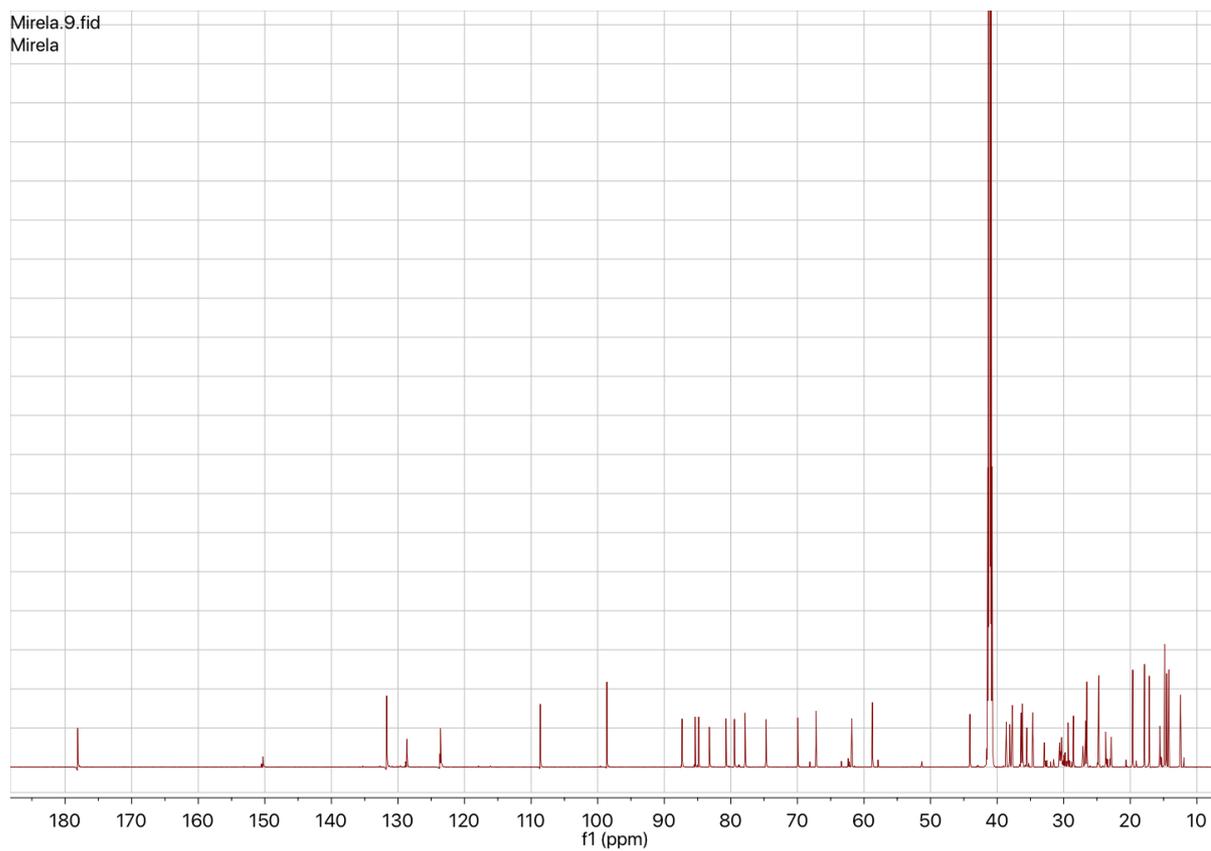
ELIÃOFLINA TESTE 18.02.2019 - POS #2.4 RT: 0.17-0.35 AV: 3 NL: 1.60E8
T: FTMS + p ESI Full ms [100.0000-1200.0000]



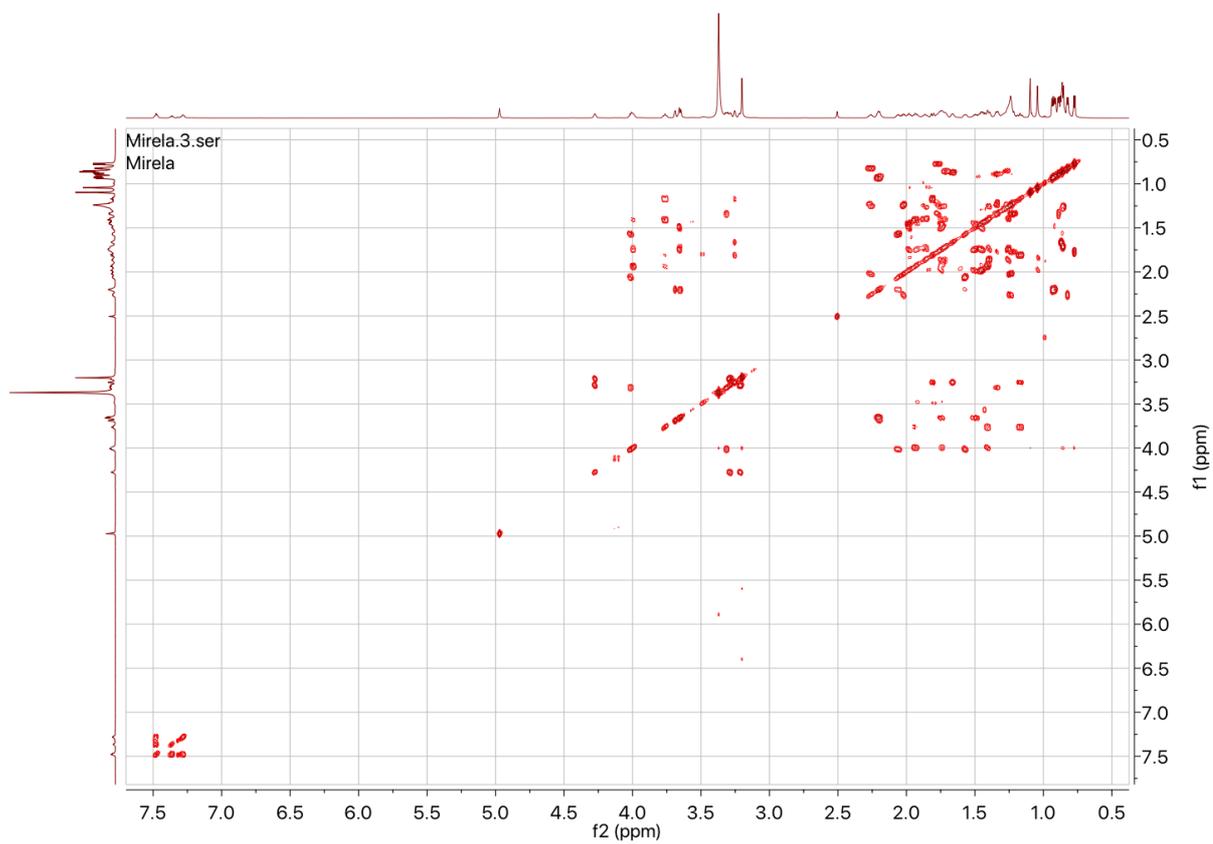
ANEXO C - RMN 1H COM AMPLIAÇÃO DA FAIXA 0,5 E 7,5 PPM



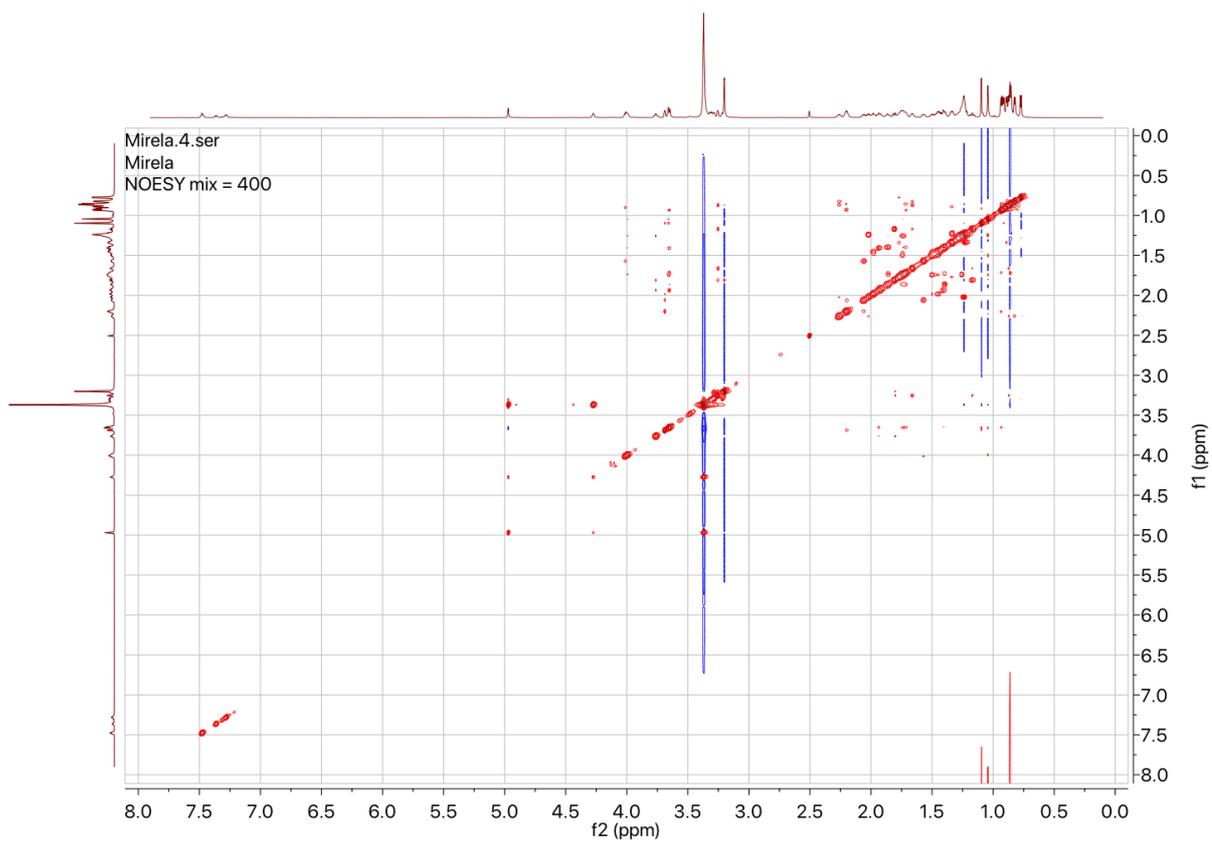
ANEXO D - RMN 13C COM AMPLIAÇÃO DA FAIXA 5 E 190 PPM



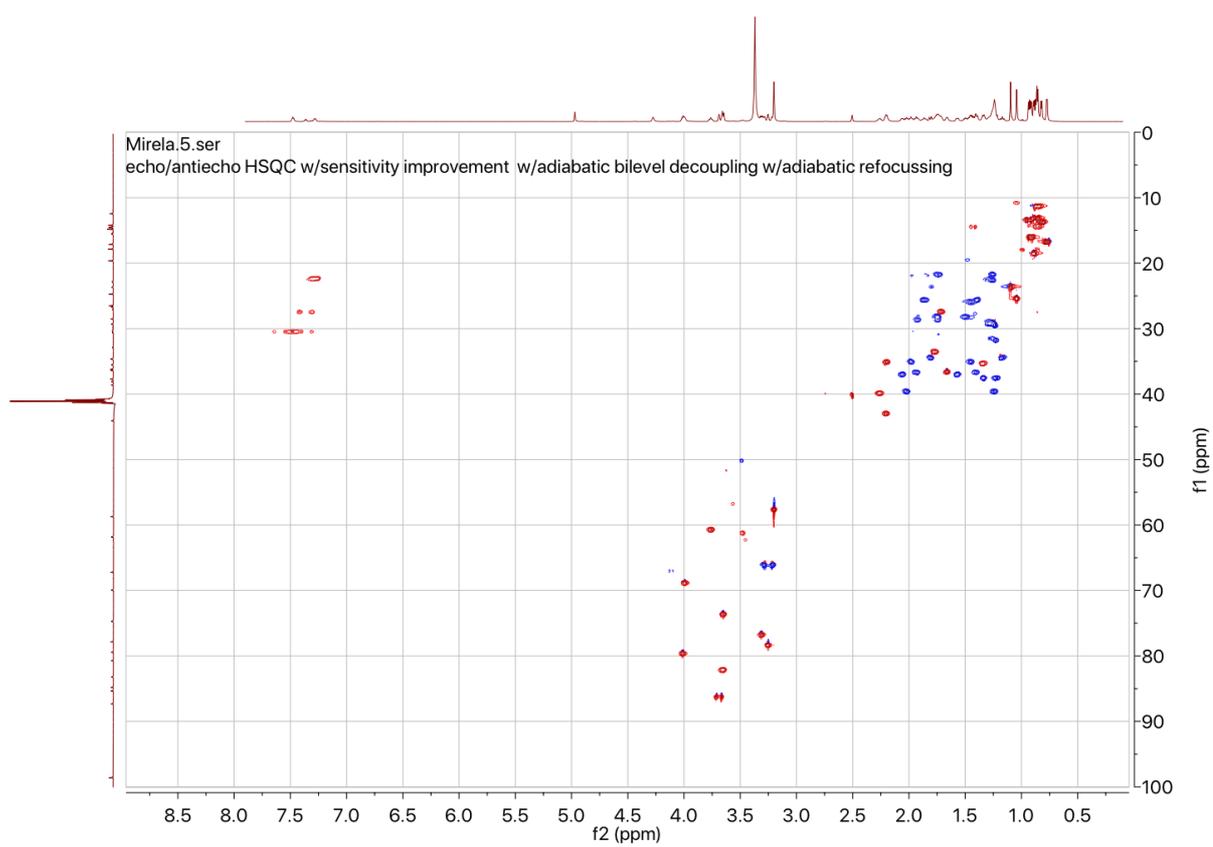
ANEXO E - RMN COSY HH



ANEXO F - RMN NOESY



ANEXO G - RMN HSQC CH (FOLDADO)



ANEXO H - RMN HMBC

