



Arquipélago de São Pedro e São Paulo

Foto: Ary Amarante

Biotecnologia Marinha

“Micro-organismos do ASPSP são utilizados em pesquisas que buscam novos fármacos anticâncer”

Os ecossistemas marinhos brasileiros, em especial aqueles de lugares como o Arquipélago de São Pedro e São Paulo - ASPSP, que permanecem praticamente inexplorados, têm uma importância estratégica para o país. Contudo, o aproveitamento destes recursos continua um desafio de difícil equacionamento, uma vez que as lacunas que temos no conhecimento básico não nos permitem ter uma real dimensão da diversidade biológica associada a esse ambiente e ponderar sobre sua fragilidade, tampouco avaliar as oportunidades de inovação.

Neste contexto, o projeto ProspecMar-Ilhas buscou um paradigma de bioprospecção pautado na sustentabilidade, com foco na realização de pesquisas na microbiota cultivável associada a diferentes matrizes, como sedimento, água, e organismos holobiontes como esponjas, cnidários e ascídias para a elaboração de um banco de cepas, um patrimônio de alto valor agregado, que garantirá a preservação, o armazenamento e o acesso às bactérias isoladas do ASPSP por tempo indeterminado.

Mais além, os resultados apresentados, até agora, ressaltam a riqueza biotecnológica

do ASPSP e o potencial farmacológico quanto à atividade anticâncer abrigado nessas bactérias.

Há que se ressaltar, na cadeia produtiva do desenvolvimento de medicamentos, que a busca por novos princípios ativos é o ponto fundamental para gerar inovação. Nessa vereda, as substâncias de origem marinha têm originado bioprodutos relevantes com a descoberta de moléculas com estruturas peculiares associadas à potentes propriedades farmacológicas, sobremaneira se considerado o contexto da terapia do câncer. O projeto ProspecMar-Ilhas levou ao isolamento de mais de 250 cepas de bactérias, das quais 31 continuam a ser estudadas. Assim, as perspectivas de geração de produtos inovadores a partir deste material são extremamente animadoras, ainda mais se ponderado com o emprego de diferentes estratégias de prospecção.

Prospecção fenotípica de actinobactérias recuperadas do sedimento do ASPSP

A bioprospecção farmacológica tradicional, também chamada de fenotípica, é pautada, inicialmente, na identificação de atividade biológica de interesse em extratos obtidos dos organismos, seguido pelo iso-

lamento e identificação do princípio ativo e, por fim, pelo estudo de seu modo de ação. Este estudo, cujo objetivo foi acessar o potencial anticâncer dos metabólitos produzidos por actinobactérias associadas ao sedimento do ASPSP que, por sua vez, não estavam prontamente acessíveis para investigação, contou ainda com uma etapa preliminar, compreendendo a recuperação de tais bactérias das amostras de sedimento.

As actinobactérias são produtoras de esporos, o que as torna mais resistentes a certas condições de estresse em relação as bactérias Gram negativas e outras Gram positivas como elas, porém que não esporulam. Visando otimizar a obtenção de actinobactérias, o sedimento coletado foi submetido a dois processamentos distintos.

MÉTODOS DAS PESQUISAS

O método 1 consistiu na secagem da amostra seguida de carimbo com esponja. O método 2 foi realizado através de aquecimento do sedimento diluído em água do mar (Figura 1). Estes processos levaram à obtenção de 268 cepas de bactérias recuperadas do sedimento do ASPSP entre actinobactérias e outros táxons (FERREIRA

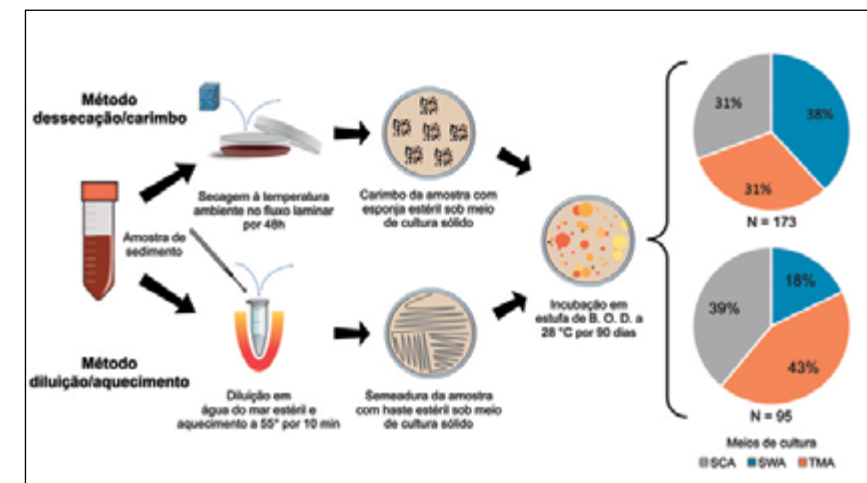


Figura 1. Métodos utilizados para processamento dos sedimentos coletados no ASPSP, e proporções do número de cepas de bactérias recuperadas nos diferentes métodos e meios utilizados.

et al., 2016). Destas, 65% foram obtidas pelo método 1 e os 35% restantes pelo método 2.

Dentre as cepas isoladas, 75 foram cultivadas em meio de cultura líquido visando a fermentação e extração química em três solventes diferentes – acetato de etila (AcO-Et), n-butanol (BuOH) e metanol (MeOH) gerando, portanto, três extratos para cada cepa (Figura 2A). O efeito antiproliferativo em células tumorais de cada extrato obtido foi avaliado *in vitro* contra uma linhagem de carcinoma colorretal humano (HCT 116), através do ensaio de MTT. Este ensaio (Figura 2A) baseia-se na conversão de um sal de tetrazólio de coloração amarela, a formazan, de coloração roxa, resultante da atividade de enzimas mitocondriais (MOSMANN, 1983). Os extratos que causaram inibição >75% na concentração de 50µg/mL foram considerados ativos. Dos 224 extratos testados, 50 (22%) foram citotóxicos às células HCT-116, sendo que metade destes foi obtida em AcOEt. Assim, estes resultados evidenciam que o sedimento do ASPSP hospeda microrganismos produtores de substâncias com potencial anticâncer.

Investigação química de extratos produzidos por cepas de actinobactérias recuperadas do sedimento do ASPSP

Três cepas produtoras de extratos citotóxicos, identificadas como *Salinispora arenicola* (BRA-132), *Actinomadura* sp. (BRA-177) e *Streptomyces* sp. (BRA-199), foram selecionadas para prosseguir em estudos, visando a identificação ou o isolamento de substâncias ativas.

Prospecção alvo-direcionada de extratos de actinobactérias do sedimento do ASPSP

Outra técnica denominada “cromatografia funcional” consiste numa cromatografia por bioafinidade, cuja fase estacionária é uma resina incorporada da proteína-alvo e a fase móvel é o extrato natural a ser testado.

Os extratos obtidos a partir de microrganismos recuperados do sedimento do ASPSP foram testados, por esta abordagem, em uma classe específica de proteínas inibidoras de caspases, as chamadas proteínas inibidoras da apoptose (IAPs), a saber survivina, livina, XIAP e cIAP-2. Algumas IAPs encontram-se superexpressas em células tumorais, sendo que a evasão aos sinais pró-apoptóticos, promovida em parte por proteínas desse grupo, está associada à progressão tumoral e à resistência a quimioterápicos (DYNEK e VUCIC, 2013).

Prospecção genômica

Um grupo de pesquisadores vem implementando a prospecção genômica de actinomicetos marinhos isolados do ASPSP e detentores de atividades citotóxicas.

Duas das linhagens descritas anteriormente, *Actinomadura* sp. (BRA-177) e *Streptomyces* sp. (BRA-199), tiveram seus genomas sequenciados na plataforma Illumina MiSeq da Central de Genômica e Bioinformática (CeGenBio), localizada na Universidade Federal do Ceará. Em ambos os casos, os dados brutos de sequência foram sub-

metidos a montagem utilizando o programa SPAdes, gerando-se rascunhos (draft) dos genomas de alta qualidade (> 100 vezes de cobertura), e com tamanho estimado compatível com o esperado para esses gêneros de actinomicetos: *Actinomadura* sp. BRA-177 de ~8,4Mb e *Streptomyces* sp. BRA-199 de ~ 6,2Mb (dados não publicados).

Os genomas foram anotados no servidor RAST(AZIZ et al., 2008) e prospectados para produção de produtos naturais.

Ao total, foram recuperados 22 e 34 grupos genéticos envolvidos na biossíntese de metabólitos secundários nos genomas das linhagens BRA-177 e BRA-199, incluindo vias de PKS e NRPS multifuncionais e multimodulares para produção de policetídeos e peptídeos complexos, além de genes para síntese de terpenos, lantipeptídeos, sideróforos, dentre outros.

PERSPECTIVAS

Embora os estudos estejam em expansão, no cenário da bioprospecção – definida como a busca por produtos e processos funcionais a partir da biodiversidade – a costa brasileira e, sobremaneira, as áreas insulares, possuem, ainda, imensas regiões a serem exploradas. Vale destacar, que habitats pouco estudados e regiões abastadas de endemismos ou de uma diversidade biológica peculiar, como ilhas oceânicas, podem oferecer bioprodutos inéditos ou singulares, em especial o ASPSP.

Artigo: Paula C. Jimenez, Elthon G. Ferreira, Larissa A. Guimarães, Amaro E. Trindade-Silva, F. Andréa S. Oliveira, Diego V. Wilke, Alison B. Silva, M. Conceição M. Torres, Otilia D. L. Pessoa, Letícia V. Costa-Lotufo.

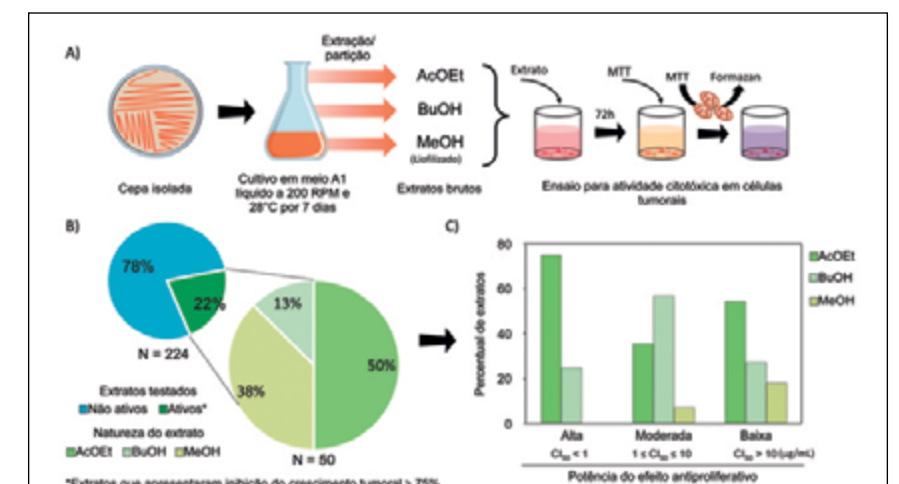


Figura 2. A) Estratégia de obtenção dos extratos das actinobactérias através do cultivo em meio líquido e extração com diferentes solventes, seguida de evaporação, e avaliação da atividade citotóxica em células tumorais usando o teste do MTT (MOSMANN, 1983). B) Percentual de extratos considerados ativos, e sua distribuição entre os diferentes solventes utilizados para extração. C) Quantidade de extratos por categoria de atividade: alta ($IC_{50} < 1 \mu\text{g/mL}$), moderada ($1 \leq IC_{50} \leq 10 \mu\text{g/mL}$) e baixa ($IC_{50} > 10 \mu\text{g/mL}$).