

BIOPROSPECÇÃO MARINHA: DAS CIÊNCIAS DO MAR ÀS CIÊNCIAS DA SAÚDE EM BUSCA DE NOVOS COMPOSTOS BIOATIVOS COM POTENCIAL ANTINEOPLÁSICO

Marine Bio-prospection: from marine biology to health searching for new potential antineoplastic bio-active components

Giselle Pinto de Faria Lopes¹, Isabel Virgínia Gomes e Silva², Karina Lani Silva³, Raquel Ciuvalschi Maia⁴, Ricardo Coutinho⁵, Angelica Ribeiro Soares⁶, Maria Helena Campos Baeta Neves⁷

Resumo: A mortalidade por tipo de câncer entre os militares da Marinha difere da população geral de referência e se associa a certas ocupações, evidenciando-se o tumor cerebral em associação com as funções do grupo saúde. Por outro lado, o potencial biotecnológico dos metabólitos secundários de cianobactérias revelou o grande potencial dessas substâncias para uso, principalmente, como fármacos antineoplásicos. Logo, o presente estudo de Pesquisa & Desenvolvimento em Biotecnologia Marinha buscou utilizar de forma sustentável os recursos naturais marinhos, juntando esforços intra e extra-MB para contribuir com soluções de problemas crônicos como o câncer, o qual afeta a qualidade de vida do pessoal militar e civil bem como da sociedade, contemplando diversas subáreas e linhas de pesquisa da Estratégia de Ciência, Tecnologia & Inovação da Marinha do Brasil. Observamos que extratos brutos, principalmente das cianobactérias *Oscillatoria sp.* e *Phormidium sp.*, mostraram efeitos citotóxico e citostático significativos em tumores cerebrais com características moleculares diferentes testados *in vitro*. Também foi demonstrado que os extratos apresentam diferentes classes químicas em sua composição, mas sugerem a presença de alcaloides,

Abstract: Mortality by type of cancer among Navy military members differs from the general reference population and is associated with certain occupations. Out of these associations, we highlight that of brain tumors with the health team. On the other hand, the biotechnological potential of cyanobacterial secondary metabolites has been revealed, particularly as antineoplastic drugs. Therefore, the present Marine Biotechnology Research & Development (R&D) study sought to sustainably use marine natural resources, joining efforts inside and outside the Brazilian Navy to contribute to solving chronic problems such as cancer, which affects the quality of life of military and civilian personnel as well as that of society, contemplating several sub-areas and lines of research of the Brazilian Navy Strategy for Science, Technology & Innovation. We found that crude extracts, particularly from *Oscillatoria sp.* and *Phormidium sp.* cyanobacteria, showed significant cytotoxic and cytostatic effects on brain tumors, with different molecular characteristics when tested *in vitro*. The extracts also showed different chemical classes in their composition, but with the suggested presence of alkaloids, important bioactive compounds with reported

1. Pesquisadora da Divisão de Bioprodutos, Departamento de Biotecnologia Marinha, do Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira – Arraial do Cabo, RJ – Brasil. E-mail: giselle.lopes@marinha.mil.br

2. Biotecnologista doutoranda do Programa Associado de Pós-Graduação em Biotecnologia Marinha, Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira / Universidade Federal Fluminense, Arraial do Cabo, RJ – Brasil. E-mail: isabel.virginia.1995@gmail.com

3. Tecnologista da Plataforma de Citometria de Fluxo, Coordenação de Pesquisa, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Rio de Janeiro, RJ – Brasil. E-mail: karinalani@inca.gov.br

4. Chefe do Laboratório de Hemato-oncologia Celular e Molecular, Coordenação de Pesquisa, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Rio de Janeiro, RJ – Brasil. E-mail: raquel.maia@inca.gov.br

5. Chefe do Departamento de Biotecnologia Marinha, Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira, Arraial do Cabo, RJ – Brasil. E-mail: ricardo.coutinho@marinha.mil.br

6. Chefe do Grupo de Produtos Naturais de Organismos Aquáticos, Núcleo em Ecologia e Desenvolvimento Socioambiental de Macaé, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ – Brasil. E-mail: angelica.r.soares@gmail.com

7. Superintendente de Pós-Graduação, Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira, Arraial do Cabo, RJ – Brasil. E-mail: maria.helena@marinha.mil.br

compostos bioativos importantes com ação antineoplásica já descrita. Este estudo apresentou-se extremamente promissor para novas estratégias na área da saúde, principalmente em oncologia, constituindo no avanço de Pesquisa & Desenvolvimento (P&D) com todo o incremento biotecnológico necessário para o desenvolvimento de produtos e serviços interdisciplinares em um futuro próximo.

Palavras-chave: Bioprospeção marinha. Cianobactéria. Tumor cerebral. Potencial antineoplásico.

antineoplastic action. This study is extremely promising for new health strategies, especially in oncology, representing an R&D advancement with all the biotechnological increment necessary to develop interdisciplinary products and services in the near future.

Keywords: Marine bioprospecting. Cyanobacteria. Brain tumor. Antineoplastic potential.

1. INTRODUÇÃO

A atual Política Naval (MARINHA DO BRASIL, 2019) apresenta um Mapa Estratégico da Marinha composto pelos Objetivos Navais, que estão distribuídos em perspectivas interligadas para o período de 2020 a 2039. Entre esses objetivos encontram-se a valorização do pessoal e o apoio à saúde, fatores que contribuem para ampliar ações que promovem a qualidade de vida do pessoal militar e civil. Estudos de Silva, Santana e Dana (2000) e Silva e Santana (2004) demonstraram que a mortalidade por tipo de câncer entre os militares da Marinha difere da população geral de referência e se associa a certas ocupações, evidenciando-se os tumores cerebral e hepático em associação com as funções do grupo saúde; cólon-retos, com funções dos oficiais da Armada e da administração; e câncer de laringe, com o grupo de manutenção e reparos.

O presente estudo de Pesquisa & Desenvolvimento (P&D) em Biotecnologia Marinha buscou utilizar de forma sustentável os recursos naturais marinhos, juntando esforços intra e extra-MB para contribuir com soluções de problemas crônicos como o câncer, o qual afeta a qualidade de vida do pessoal militar e civil bem como da sociedade. Com isso, o trabalho contemplou diversas subáreas e linhas de pesquisa da Estratégia de CT&I da MB, tais como: Banco de Tecidos Biológicos, Desempenho Humano e Saúde, Farmacologia Bioquímica e Molecular, Biomedicamentos e Produtos para a Saúde (MARINHA DO BRASIL, 2017).

No Brasil, o câncer é a segunda maior causa de morte. Segundo dado epidemiológico atual do Instituto Nacional de Câncer, estimou-se para o biênio 2018–2019 a ocorrência de cerca de 600 mil casos novos de câncer (INCA, 2018). De todos os tumores cerebrais, o glioblastoma é o subtipo com maior taxa de incidência e mortalidade, sendo o tumor cerebral maligno mais frequente, pois apresenta significativa

resistência à quimioterapia e à radioterapia (46,1%), com sobrevida de, no máximo, 1 ano (LOUIS et al., 2016).

Com o avanço da Biotecnologia e da Bioprospeção Marinha, notou-se que os organismos marinhos têm propriedades peculiares não encontradas no ambiente terrestre. Essas propriedades têm demonstrado diversas aplicações, valorizando potencialmente os 70% de ambiente marinho presentes na superfície do planeta (MALVE, 2016). Atualmente, o grande potencial da biodiversidade dos ambientes marinhos como fonte de substâncias de interesse biotecnológico é indiscutível. A diversidade química e o elevado potencial bioativo desses metabólitos, muitos dos quais revelam novos mecanismos de ação, têm incentivado os esforços de pesquisadores na academia para a busca e o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos, principalmente como antineoplásicos (JASPARS et al., 2016). A Bioprospeção de Fármacos Marinhos teve seu grande marco inicial com a descoberta e o isolamento de nucleosídeos com propriedades anticâncer derivados da esponja *Tethya crypta* (antiga *Cryptotethya crypta*), que se tornaram a base para análogos sintéticos do fármaco Ara-C (Citarabina), utilizado no tratamento de leucemia mieloide aguda (COSTA-LOTUFO et al., 2009). Dessa forma, as cianobactérias marinhas são, no mundo todo, uma importante fonte de metabólitos secundários com interesse altamente biotecnológico. Entretanto, apesar da rica flora marinha do estado do Rio de Janeiro, estudos com cianobactérias são raros no Brasil. Cianobactérias são organismos procariotos fotossintetizantes considerados uma das formas mais antigas de vida sob a Terra e, que ao longo da evolução, se adaptaram à maioria dos ambientes terrestres e a ambientes aquáticos marinhos e de água doce (PAERL; PAUL, 2012). O interesse biotecnológico pelos metabólitos secundários de cianobactérias tem revelado o grande potencial dessas substâncias para uso, principalmente, como fármacos antineoplásicos, dos quais alguns encontram-se atualmente em fase avançada de testes clínicos (DIXIT; SUSEELA, 2013).

Diante disso, o presente estudo de âmbito multidisciplinar teve o objetivo de considerar o conhecimento na área de Biotecnologia Marinha e de novas drogas na descoberta de estratégias terapêuticas no combate ao câncer.

2. OBJETIVO

Avaliar o efeito antineoplásico dos extratos brutos de cianobactérias em células humanas de câncer cerebral, o glioblastoma, e investigar classes químicas responsáveis por esse efeito.

3. METODOLOGIA

3.1. COLETA, EXTRAÇÃO E ANÁLISE

As amostras de cianobactérias *Oscillatoria sp.* foram coletadas na Praia do Sol; as de *Phormidium sp.*, na Praia da Areia; as de *Lyngbya sp.*, na Praia Seca, RJ; e as de *Aphanothece sp.*, em Figueira, Arraial do Cabo, RJ. Para a obtenção de cultivos unialgais, foram utilizados azida sódica e fluoreto de sódio, favorecendo somente o crescimento fotoautotrófico (MELO et al., 2012) (Figura 1). As amostras biológicas



Figura 1. (A) As amostras de cianobactérias foram coletadas em Figueira, (B) em que foi feito um recorte do solo e (C) separada a camada superior, (D) contendo o homogenato de cianobactérias. Essas foram colocadas em cultivo unialgal, mostrando os tipos isolados macroscopicamente: *Phormidium sp.*, *Lyngbya sp.* e *Aphanothece sp.*, e (E) microscopicamente a cianobactéria *Oscillatoria sp.*

foram liofilizadas e extraídas com uma mistura de acetato de etila:metanol (1:1). Esses foram rotaevaporados e os perfis químicos dos extratos foram determinados por meio de cromatografia de coluna delgada (CCD). Os extratos brutos foram mantidos a -20°C até o momento dos testes antineoplásicos, em que foram reconstituídos com dimetil sulfóxido.

3.2. EFEITO CITOTÓXICO

As células humanas de tumores cerebrais do tipo glioblastoma, T98G e U251 (*American Type Culture Collection*), foram cultivadas com concentrações crescentes dos extratos brutos das 4 diferentes cianobactérias isoladas, sendo 62,5, 125, 250, 500 e 1.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Após 72 horas, foi realizada a técnica espectrofotométrica de viabilidade celular por meio da conversão do sal MTT (5 mg/mL) em cristal de formazan (MOSMANN, 1983). Após a dissolução desses cristais por dimetil sulfóxido, a densidade ótica foi registrada em 570 nm (Beckman Coulter). O percentual de viabilidade foi convertido, considerando-se a densidade ótica das células controle não tratadas com os extratos como 100%.

3.3. EFEITO CITOSTÁTICO

As células tumorais T98G e U251 foram cultivadas com suas respectivas IC50, e após 72 horas foram fotografadas em contraste de fase e, em seguida, foram fixadas com tampão citrato (10 mM). Após a incorporação do intercalante de DNA, iodeto de propídeo (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), e a adição de RNase (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 30 minutos, a fluorescência (FL-3) foi analisada por citometria de fluxo (Cyan ADP, Becton & Dickinson). O percentual de células em cada fase do ciclo celular (G0/G1, S e G2/M) foi observado, além de também quantificarmos células com DNA fragmentado (subG0/G1).

3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software *GraphPadPrism 6.0* (Windows). Os dados foram avaliados quanto a sua normalidade e, em seguida, foi utilizado o teste paramétrico *two-way* ANOVA com pós-teste de Dunnett. Os resultados foram representados pela média e pelo desvio padrão, sendo considerados significativos quando $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

Considerando-se as diferentes características moleculares dos dois tumores cerebrais testados, pode-se observar melhor perfil de resposta das células U251, sendo mais sensíveis aos tratamentos e apresentando IC₅₀ em 3/4 dos extratos de cianobactérias testados, quando comparada às células T98G, que demonstraram maior resistência, apresentando IC₅₀ apenas em 2/4 desses mesmos extratos (Tabela 1).

Dentre os quatro extratos brutos de cianobactérias, apenas a *Aphanothece sp.* não apresentou citotoxicidade para obtermos a IC₅₀ em nenhuma das linhagens testadas. Isso foi visto para *Lyngbya sp.* nas células T98G. Nas Figuras 2A e 2B observamos

os gráficos de dose-reposta do efeito citotóxico dos quatro extratos de ambas as linhagens, acompanhada da morfologia das células por contraste de fase. Demonstramos que o tratamento com a IC₅₀ resulta no descolamento das células, seguido de morte celular, principalmente na U251 (Figuras 2C–2J).

Tabela 1. Concentração inibitória (IC₅₀).

Linhagem	T98G	U251
Extrato	IC ₅₀ (µg/mL)	
<i>Oscillatoria sp.</i>	124,9	51,91
<i>Phormidium sp.</i>	261,8	197,5
<i>Lyngbya sp.</i>	-	299,2

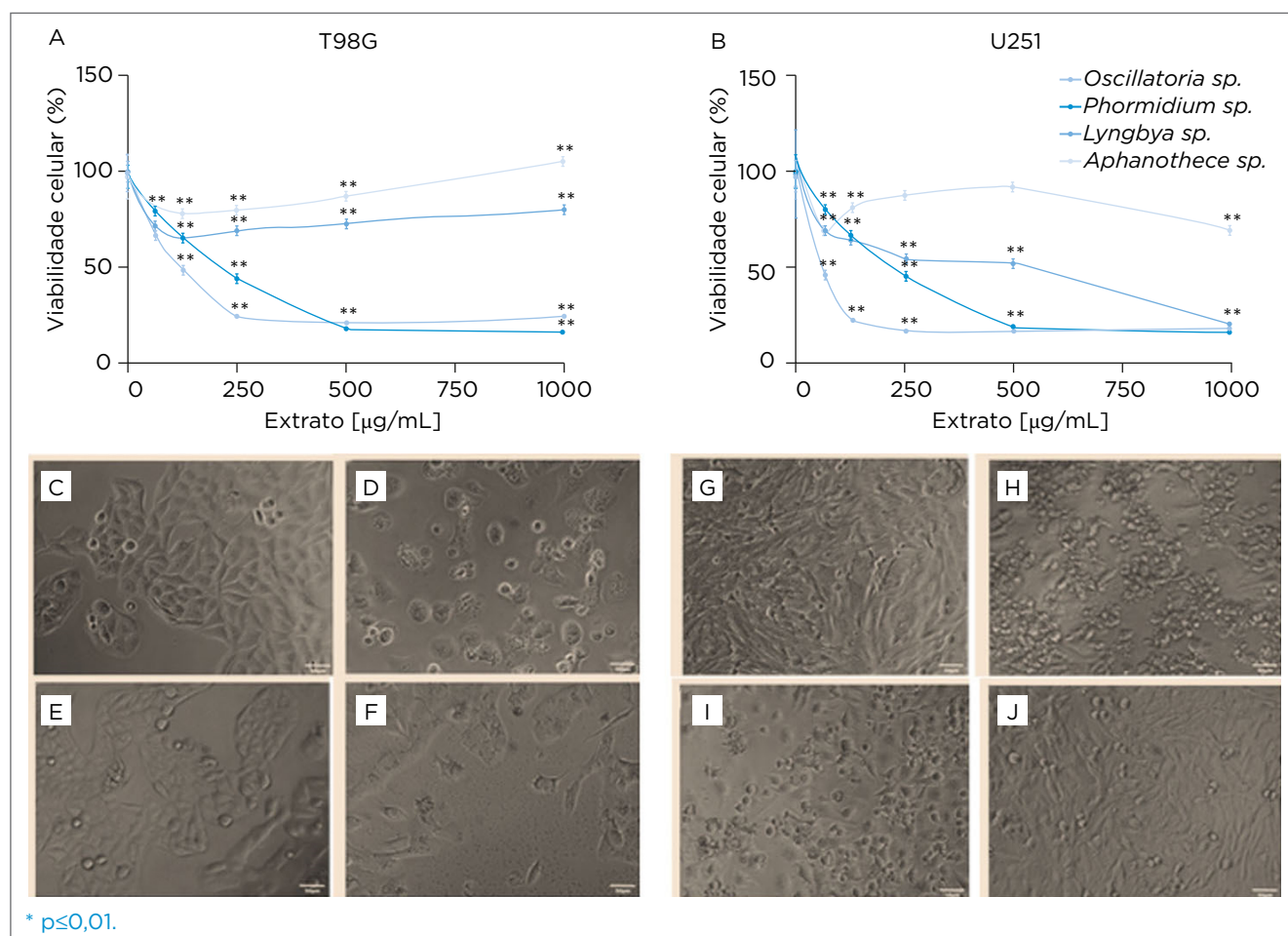


Figura 2. Viabilidade de células de glioblastoma humano (A) T98G e (B) U251 cultivadas com extratos brutos de cianobactérias após 72 horas, através do método MTT. Morfologia em contraste de fase das células (C) T98G controle, cultivadas com (D) *Oscillatoria sp.* 125 µg/mL, (E) *Phormidium sp.* 250 µg/mL, (F) *Lyngbya sp.* 1.000 µg/mL. Morfologia das células (G) U251 controle, (H) *Oscillatoria sp.* 62,5 µg/mL, (I) *Phormidium sp.* 250 µg/mL e (J) *Lyngbya sp.* 250 µg/mL. Resultado representativo de 2 experimentos independentes feitos em oito réplicas, sendo média ± desvio padrão. *Two-way* ANOVA com pós-teste de Dunnett em relação ao controle. Barra de escala = 50 µm.

Os resultados de fragmentação do DNA corroboraram a citotoxicidade observada no ensaio anterior de viabilidade, evidenciando fenômeno significativo de morte celular. As células tumorais T98G apenas tratadas com os extratos de *Oscillatoria sp.* e *Phormidium sp.* demonstraram significativo percentual de fragmentação do DNA, quando cultivadas com as IC50 correspondentes (Figura 3A). As células U251 novamente demonstraram ser mais sensíveis, mostrando maior percentual significativo de células mortas em relação aos mesmos extratos; entretanto, em relação ao tratamento com o extrato de *Lyngbya sp.* não foi significativo (Figura 3B).

Na avaliação do ciclo celular dos glioblastomas humanos tratados com os diferentes extratos de cianobactérias, verificamos efeito citostático semelhante, independentemente do tipo de cianobactérias. Os extratos de *Oscillatoria sp.*, *Phormidium sp.* e *Lyngbya sp.* resultaram na parada do ciclo das células tumorais nas fases S e G2/M, verificada pelo aumento significativo do percentual, quando comparado ao controle em ambas as linhagens (Figuras 4A e 4B).

Após verificar os efeitos citotóxico e citostático dos extratos, observamos que cada extrato bruto é constituído de moléculas bioativas de diferentes classes químicas por meio da cromatografia de camada delgada (Tabela 2). O extrato

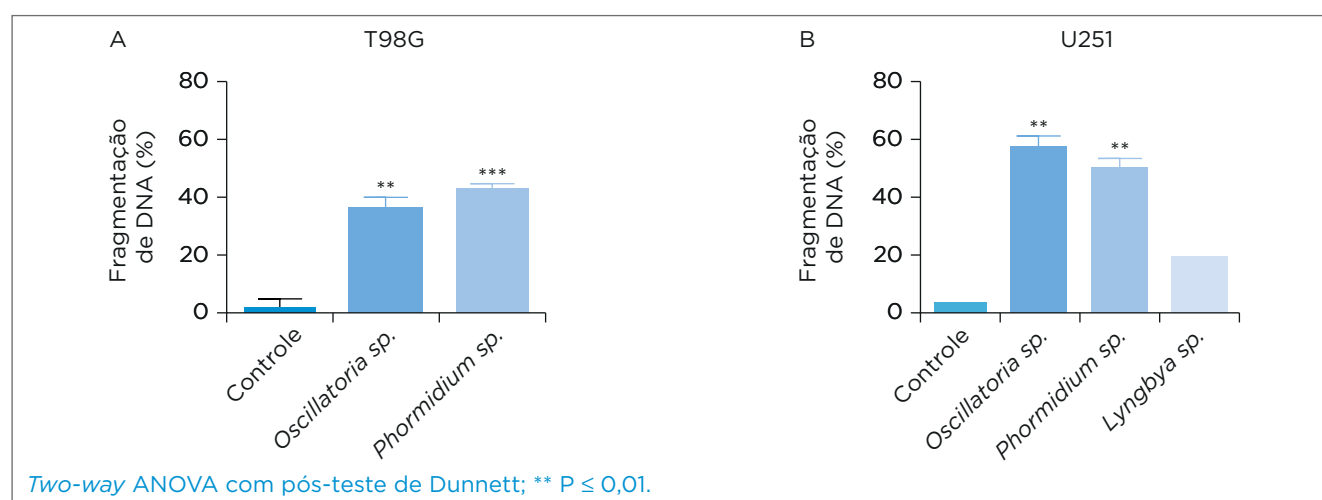


Figura 3. Fragmentação de DNA em células de glioblastoma humano (A) T98G e (B) U251 cultivadas com extratos brutos das cianobactérias após 72 horas com suas IC50. Resultado representativo de experimento de citometria fluxo considerando entre 10.000 e 30.000 células, sendo média \pm desvio padrão.

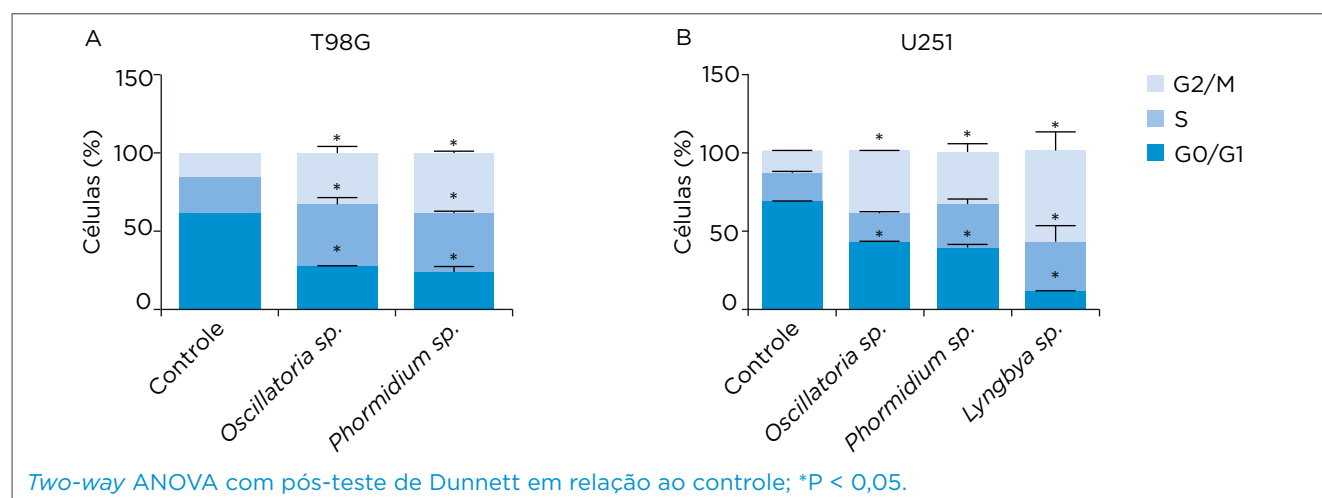


Figura 4. Ciclo celular de glioblastoma humano (A) T98G e (B) U251 cultivadas com extratos brutos de cianobactérias por 72 horas com suas IC50. Resultado representativo de experimento de citometria de fluxo considerando entre 10.000 e 30.000 células, sendo média \pm desvio padrão.

Tabela 2. Identificação de classes químicas através de cromatografia de camada delgada.

Amostras	Reagentes				
	EtOH 5% H ₂ SO ₄	FeCl ₃	KMnO ₄	Ninidrina	Dragendorff
<i>Oscillatoria sp.</i>	+	+	+	+	+
<i>Phormidium sp.</i>	+	+	+	-	+
<i>Lyngbya sp.</i>	+	+	+	-	-
<i>Aphanothece sp.</i>	+	+	+	-	-

de *Oscillatoria sp.* mostrou presença de aminoácidos, revelados pela Ninidrina, o que difere de todos os outros extratos e pode estar conferindo maior efeito *in vitro*, em menores concentrações. Podemos sugerir ainda que os extratos brutos, principalmente de *Oscillatoria sp.* e *Phormidium sp.*, que tiveram efeitos relevantes em ambos os tumores testados, apresentam compostos importantes, como a família dos alcaloides, revelado pelo reagente Dragendorff, já descritos na literatura com efeito antineoplásico para esse e outros tipos de tumor (SILVA et al., 2018).

CONCLUSÕES

Considerando-se todas essas estratégias nos modelos pré-clínicos utilizadas e as diversas características químicas da biodiversidade marinha das cianobactérias, este estudo apresentou-se extremamente promissor para novas estratégias na área da saúde, principalmente em oncologia, constituindo no avanço de P&D com todo o incremento biotecnológico necessário para o desenvolvimento de produtos e serviços interdisciplinares em um futuro próximo.

REFERÊNCIAS

- COSTA-LOTUFO, L.V. et al. Organismos marinhos como fonte de novos fármacos: histórico & perspectivas. *Química Nova*, v. 32, n. 3, p. 703-716, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000300014>
- DIXIT, R.B.; SUSEELA, M.R. Cyanobacteria: potential candidates for drug discovery. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 103, n. 5, p. 947-961, 2013. <https://doi.org/10.1007/s10482-013-9898-0>
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ DE ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). *Números de Câncer*. Incidência de casos entre 2018/2019. Rio de Janeiro: INCA, 2018.
- JASPARS, M. et al. The marine biodiscovery pipeline and ocean medicines of tomorrow. *Journal of Marine Biological Association of the United Kingdom*, v. 96, n. 1, p. 151-158, 2016. <https://doi.org/10.1017/S0025315415002106>
- LOUIS, D.N. et al. The 2016 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathologica*, v. 131, n. 6, p. 803-820, 2016. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>
- MALVE, H. Exploring the ocean for new drug developments: Marine pharmacology. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, v. 8, n. 2, p. 83-91, 2016. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.171700>
- MARINHA DO BRASIL. *Estratégia de Ciência, Tecnologia e Inovação da Marinha do Brasil Estado-Maior da Armada*. Marinha do Brasil, 2017. 108 p.
- MARINHA DO BRASIL. *Política Naval*. Centro de Comunicação Social da Marinha, 2019. 47 p.
- MELO, L. F. de A. et al. Toxicity against *Artemia salina* of the zoanthid *Palythoa caribaeorum* (Cnidaria: Anthozoa) used in folk medicine on the coast of Pernambuco, Brazil. *Biotemas*, v. 25, n. 3, p. 145-151, 2012. <https://doi.org/10.5007/2175-7925.2012v25n3p145>
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- PAERL, H.W.; PAUL, V.J. Climate change: Links to global expansion of harmful cyanobacteria. *Water Research*, v. 46, n. 5, p. 1349-1363, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.08.020>
- SILVA, M.; SANTANA, V. Fatores de risco ocupacionais para câncer de cólon e reto entre militares da Marinha do Brasil. *Revista Brasileira de Medicina do Trabalho*, v. 2, n. 1, p. 22-29, 2004.
- SILVA, M.; SANTANA, V. S.; DANA, L. Mortalidade por câncer em militares da Marinha do Brasil. *Revista de Saúde Pública*, v. 34, n. 4, p. 373-379, 2000. <https://doi.org/10.1590/S0034-89102000000400010>
- SILVA, T.C.C. et al. Specific Cytostatic and Cytotoxic Effect of Dihydrochelerythrine in Glioblastoma Cells: Role of NF- κ B/ β -catenin and STAT3/IL-6 Pathways. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, v. 18, n. 10, p. 1386-1393, 2018. <https://doi.org/10.2174/1871520618666180412122101>