

## ATIVIDADE ANTITUMORAL DE EXTRATOS BIOATIVOS PRODUZIDOS POR FUNGOS

Paulo Ricardo da Silva<sup>1</sup>; Bruno Severo Gomes<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Paulo Ricardo da Silva do Curso de Ciências Biológicas- CCB –UFPE; E-mail: Paulo\_odoxe@hotmail.com, <sup>2</sup> Bruno Severo Gomes Depto de Micologia – CCB – UFPE. E-mail: bseverogomes@gmail.com.

**Sumário:** Os fungos assim como outros micro-organismos apresentam uma grande variedade de metabolitos secundários que podem ser utilizados na área medica. Por isso tem se investido bastante em estudo sobre metabolitos secundários produzidos por micro-organismos. O câncer é uma doença que vem crescendo assustadoramente em nosso país e também no mundo. O câncer é caracterizado por um crescimento desordenado das células que invadem os tecidos e órgãos do paciente. O modelo de culturas de células neoplásicas apresenta vantagens que o torna essencial para o estudo da atividade anticâncer. Através deste meio de cultura é possível controlar ph, temperatura, pressão osmótica, tensão de CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub>. Além disso, podemos obter células idênticas após replicação. O objetivo deste estudo foi verificar a atividade antitumoral *in vitro* de extratos fúngicos produzidas por fungos preservados na Micoteca URM-UFPE. As culturas fúngicas *Trichosporon sporotrichoides* e *Aspergillus sulphureus* foram reativadas e submetidas a processos de autenticação taxonômica. Das culturas foi testada a capacidade de produção das enzimas: lipase e queratinase. *Trichosporon sporotrichoides* foi detectada a produção de lipase e de *Aspergillus sulphureus* a produção de queratinase. Dos dois extratos, apenas a queratinase apresentou condições de aplicação, devido à consistência viscosa da lipase após a liofilização. A queratinase foi testada em culturas de células tumorais de HEP-2 (Carcinoma de laringe), NCI H-292 (Câncer de pulmão- humano) e HL60 (Leucemia promielocítica aguda humana). Após as leituras, não foi detectada para a concentração utilizada atividade antitumoral da queratinase (1 a 20% de inibição). Conclui-se com este estudo que, a queratinase produzida pelos micro-organismos estudados apresentou um baixo nível de toxicidade com percentual de (1 a 20% de inibição) nas 3 linhagens de células utilizadas neste estudo. Estudos posteriores com concentrações maiores poderão apresentar resultados diferentes.

**Palavras-chave:** bioativos; extratos; fungos.

### INTRODUÇÃO

Os fungos são fontes promissoras de novas drogas. Diversos medicamentos utilizados nos centros de saúde são derivados de metabólitos de fungos (STROBEL; DAISY, 2003, FERRARA, 2006). Uma das características das células cancerígenas é o crescimento desordenado e a capacidade de invadir outros tecidos e órgãos (WHO, 2007, INCA, 2008). As culturas preparadas diretamente de tecidos de um organismo, com ou sem um passo inicial de fracionamento das células, são chamadas de culturas primárias. Na maioria dos casos, células em culturas primárias podem ser retiradas da placa de cultura e usadas para formar um número razoável de culturas secundárias, podendo ser repetidamente subcultivadas desta forma, por semanas ou meses. Tais células apresentam frequentemente muitas propriedades diferenciadas apropriadas a sua origem (ALBERTS et al., 1997). Portanto, estudos *in vitro* a respeito da indução e progressão da transformação celular induzida por carcinógenos químicos podem propiciar importantes esclarecimentos a

respeito dos mecanismos envolvidos neste processo e serem de utilidade para o desenvolvimento de estratégias quimiopreventivas ou quimioterapêuticas para o uso humano. Além disso, a compreensão dos eventos celulares que acompanham a progressão de transformação até o fenótipo neoplásico resultante oferece a possibilidade de intervenção e prevenção seletivas durante os múltiplos estágios da transformação celular (ZHU; GOODERHAM, 2002). As vantagens da cultura de células residem no controle fisiológico do pH, temperatura, pressão osmótica, tensão de CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub>, além das condições fisiológicas que podem ser mantidas relativamente constantes. A cada replicação celular as amostras são idênticas e as características da linhagem irão se perpetuar por manter a homogeneidade das amostras. Outra vantagem importante a ser destacada é que para o *screening* de drogas onde se fazem muitas replicatas e se testam inúmeros compostos, a cultura de células é menos custosa economicamente que os testes *in vivo*, além de reduzir o uso de animais em experimentos, evitando questões éticas e morais desses ensaios (FRESHNEY, 2005). Existem poucos trabalhos disponíveis que correlacionem a aplicação de metabolitos produzidos por extratos fúngicos e culturas de células cancerígenas. Por isso, foi proposto esse estudo com objetivo de verificar a atividade antitumoral *in vitro* de extratos fúngicos produzidas por fungos preservados na Micoteca URM-UFPE.

### MATERIAIS E MÉTODOS

Foram selecionadas duas culturas de fungos (levedura e fungo filamentosos), preservadas sob óleo mineral (SHERF, 1943) preservados na Micoteca URM do Departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco. No processo de reativação, fragmentos das culturas foram transferidos para caldo glicosado e mantidos a 28°C ± 2°C. Após crescimento foram semeados em ágar Sabouraud para verificação da viabilidade, pureza e autenticação taxonômica. Para autenticação de fungos filamentosos foram observadas características macroscópicas das colônias (cor, aspecto, consistência, presença de pigmento, etc.) e características microscópicas (morfologia de estruturas somáticas e reprodutivas), utilizando metodologia e literatura específica (ELLIS, 1971, 1976; DOMSCH et al., 2007). Para autenticação taxonômica de leveduras foram observadas características macroscópicas, microscópicas e quando necessário características fisiológicas das colônias preconizados e adotados por LODDER (1970); KREGER VAN RIJ (1984) ; KURTZMAN; FELL (1998) e BARNETT et al. (2000). Foram detectadas a produção das enzimas: lipases e queratinases. Ambos extratos foram liofilizados. O protocolo de liofilização causou a perda do extrato de lipase. Restando somente a amostra de queratinase para ser aplicada nas culturas de células cancerígenas. As linhagens tumorais utilizadas, HEP-2 (Carcinoma de laringe), NCI H-292 (câncer de pulmão– humano) e HL60 (leucemia promielocítica aguda humana). As linhagens foram obtidas do Banco de células do Rio de Janeiro, cultivadas em meio RPMI 1640 ou DMEN, suplementados com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>. O método utilizado para a análise da citotoxicidade foi o método do MTT. Foi descrito primeiramente por Mosmann (1983), tendo a capacidade de analisar o estado metabólico da célula. É uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometode tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de substratos de enzimas microsossomais e mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. O estudo citotóxico pelo método do MTT permitiu definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação (BERRIDGE et al., 1996). As células foram plaqueadas em placas de 96 poços nas

seguintes concentrações (células/mL): HEP-2, NCI H-292 em  $1 \times 10^5$  cel/ mL e HL-60 em  $0,3 \times 10^6$  cel/ mL. Um teste inicial com uma única concentração do extrato (50  $\mu\text{g/mL}$ ) foi realizado. Uma escala de intensidade foi utilizada para avaliar o potencial citotóxico das amostras testadas. Amostras foram classificadas sem atividade (1 a 20% de inibição), com pouca atividade (inibição de crescimento celular variando de 20 a 50%), com atividade moderada (inibição de crescimento celular variando de 50 a 70%) e com muita atividade (inibição de crescimento variando de 70 a 100%). A concentração dos fármacos capaz de inibir 50% do crescimento celular (CI50) foi realizada para as amostras que apresentaram muita atividade no teste de concentração única. As substâncias previamente dissolvidas em DMSO foram diluídas em série no meio RPMI para obtenção das concentrações finais (0,3-25  $\mu\text{g/mL}$ ) e adicionadas em placa de 96 poços (100 $\mu\text{L}$ / poço) e incubadas por 72h. Três horas antes de completar o período de incubação, 25  $\mu\text{L}$  da solução estoque (5 mg/mL) de MTT foi adicionado em cada poço. Em seguida a placa foi centrifugada e o sobrenadante retirado. O precipitado resultante foi dissolvido em 100  $\mu\text{L}$  de DMSO e lido em espectrofotômetro de placa a 595nm.

### **RESULTADOS**

Após as leituras, as amostras de queratinase aplicadas nas linhagens celulares HEP-2 (Carcinoma de laringe), NCI H-292 (câncer de pulmão– humano) e HL60 (leucemia promielocítica aguda humana) apresentaram valor de (1 a 20% de inibição), sendo classificadas como sem atividade. O extrato fungico não atingiu o resultado esperado, que era o de inibir ou até mesmo destruir as células tumorais.

### **DISCUSSÃO**

Segundo Gomes et al 2012, quando uma molécula absorve excesso de energia, as estruturas terciárias da enzima se rompe, desnaturando a mesma, que perde a sua atividade catalítica. O protocolo de liofilização utilizado ocasionou a perda do extrato de lipase. Sabe-se que as variações de pH, temperatura e concentração da enzima são fatores que influenciam no processo de isolamento da enzima. Pretendemos testar outros protocolos com diferentes variações de pH, temperatura e concentração da enzima para futuros estudos. Os estudos de Gallo et al. (2007) utilizou 200 extratos fungicos e obteve os seguintes resultados: 17 apresentaram alta toxicidade inibindo mais de 75% da proliferação celular e 20 apresentaram atividade moderadas com inibição proliferativa entre 50- 75% sobre pelo menos umas das linhagens utilizadas. Diferentemente dos estudos anteriores, utilizamos apenas um extrato fungico. Entretanto, não podemos afirmar se o extrato não interferiu de forma direta ou indireta no metabolismo das células tumorais. Sendo necessário a análise em outros aspectos, como estudos funcionais. Pretende-se testar outros protocolos com diferentes variações de pH, temperatura e concentração da enzima para futuros estudos

### **CONCLUSÕES**

Conclui-se com este estudo que, o protocolo de liofilização não é adequado para o extrato de lipase. Podemos observar também que, o extrato fungico de queratinase apresentou um baixo nível de toxicidade nas três linhagens de células utilizadas neste estudo. Pretendemos em estudos futuros modificar o protocolo de liofilização, além de aumentar o numero de extratos que serão utilizados frente as culturas celulares.

### **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Universidade Federal de Pernambuco, a PROPESQ, a CAPES, ao departamento de micologia, Prof. Dr. Bruno Severo Gomes, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Gardenia Carmen Gadelha Militao, a Minelli, a Odacy, a Marilia, Jobson Ferraz, a Anthony Alves, a José Ewerton, a Diego e a Thiago.

## REFERÊNCIAS

- ALENCAR, R. B., BIONDI, M. M., PAIVA, P. M. G., VIEIRA, V. L. A., CARVALHO, L. B., JR., ; BEZERRA, R. S. Alkaline proteases from digestive tract of four tropical fishes. *Brazilian Journal of Food Technology*, 6(2), 279–284.2003.
- ANBU, P.; GOPINATH, S.C.B.; HILDA, A.; LAKSHMIPRIYA, T.; ANNADURAI, G. Optimization of extracellular keratinase production by poultry farm isolate *Scopulariopsis brevicaulis*. *Bioresource Technology*, v.98, p.1298-1303, 2007.
- DOMSCH, K. H.; GAMS, W.; ANDERSON, T.H. 1993. *Compendium of soil fungi*. San Francisco: Editora IHW - Verlag V. I, 859p.
- ELLIS, M.B. *Dematiaceous hyphomycetes*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, England.1971.
- ELLIS, M.B. *More dematiaceous hyphomycetes*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, England.1976.
- FRESHNEY, I.R. *Culture of animal cells. A manual of Basic Technique*. 5 ed. New York: Wiley- Liss; 2005.
- BERRIDGE, C.W; BOLEN, S.J; MANLEY, M.S; FOOTE, S. Modulation of forebrain electroencephalographic (EEG) activity in halothaneanesthetized rat via actions of noradrenergic receptors within the medial septal region. *J Neurosci* 0:000 – 000.1996.
- INCA, *Estimativa/2008 Incidência de Câncer no Brasil*.
- TATTINI JUNIOR, Virgilio; PARRA, Duclerc Fernandes; PITOMBO, Ronaldo Nogueira de Moraes. Influência da taxa de congelamento no comportamento físico-químico e estrutural durante a liofilização da albumina bovina. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, São Paulo, v. 42, n. 1, p.127-136, mar. 2006.
- SALES, M.R.; CAMPOS, R.A.L.; SOUSA, M.A.; SOUZAMOTTA, C.; CAVALCANTI, M.T.H.; LIMA FILHO, J.L.; PORTO, A.L.F. Seleção de *Aspergillus* spp. para degradação in vitro de penas de galinha. In: *SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS*, 16., 2007, Curitiba. Anais. Curitiba: Senai; Cietep, 2007. 1 CD-ROM.
- SALES, Marília Ribeiro et al. Utilização de penas de galinha para produção de queratinase por *Aspergillus carbonarius*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 43, n. 2, p.285-288, Não é um mês valido! 2008.
- GALLO, Margareth B. C. et al. Atividade Citotóxica de Extratos de Fungos Endofíticos Isolados de *Smallanthus sonchifolius*. *Revista Brasileira de Biociências*, Porto Alegre., v. 5, n, p.402-404, jul. 2007.
- SEBRÃO, Damianni et al. *IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES EM FILME DE CASEINATO DE SÓDIO/GLICEROL: APLICAÇÃO NA SÍNTESE DE ÉSTERES*. *Química Nova*, Florianópolis, v. 30, n. 5, p.1182-1187, jul. 2007.
- CRUZ, Mariana ; ENES M.; PEREIRA M.; DOURADO M.; RIBEIRO A. B. S. . Modelos experimentais em oncologia: O contributo da cultura de células para o conhecimento da biologia do cancro. *Rev Port Pneumol*, Lisboa, v. 15, n. 4, ago. 2009 .
- DEMAIN, A. L. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology* 52: 455-463.1999.
- FERRARA, M. A. Fungos Endofíticos. Potencial para a Produção de Substâncias Bioativas. In: *Revista Fitos*. Rio de Janeiro 73-79.2006.
- GULATI, R., R.K. SAXENA AND R. GUPTA. A rapid plate assay for screening L-asparaginase producing micro-organisms. *Lett. Applied Microbiol.*, 24: 23-26.1997.
- HAMBURGER, M; HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry*. 1991; 30:3864-3874.
- HANKIN, L. ;ANAGNOSTAKIS, S. L.- The Use of Solid Media for Detection of Enzymes Production by Fungi. *Mycologia*, 67, 597- 607. 1979.
- IMADA, A., S. IGARASI, K. NAKAHAMA AND M. ISONO. Aspariginase and glutaminase activities of microorganisms. *J. Gen. Microb.*, 76: 85-99. 1973.
- LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N. T. *Tratado de Micologia Médica*. 9 ed. Savier, São Paulo, 2002. 1104p.
- LEAL, M.C.M.R. Utilização de enzimas hidrolíticas no tratamento de resíduos da indústria de laticínios. *Dissertação de mestrado*, COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.2000.



MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. *J. Immunol. Methods*, v.65,p.55-63, 1983.