XXVIII Encontro Anual de Iniciação Científica
V Encontro Anual de Iniciação Científica Júnior
eaic 2019

ATIVIDADE BIOLÓGICA DE COMPOSTOS BIOATIVOS PRODUZIDOS POR BACTÉRIAS ISOLADAS DE CAVERNA SOBRE CÉLULAS TUMORAIS

Giovana Sequinel Correa (PIBIC/Araucária), Katia Sabrina Paludo (Orientador), katiapaludo@gmail.com
Universidade Estadual de Ponta Grossa/Debiogem

Morfologia, Citologia e Biologia Celular.

Palavras-chave: Citotoxicidade, melanoma, B16F10

Resumo
No presente trabalho foi avaliada a atividade biológica de extratos de bactérias isoladas da caverna Pedra da Cachoeira, Altamira, Pará. O objetivo do trabalho foi avaliar os efeitos citotóxicos de 11 extratos obtidos de culturas das cepas CV26a, CV26b e CV36 em células tumorais de melanoma murino (B16-F10), além de uma linhagem não tumoral representada pela 3T3, de fibroblasto murino. Dos 11 extratos apenas três se mostram seguros e um apresenta resultado que pode ser considerado interessante e viável para futuras análises e purificações.

Introdução
No meio científico encontram-se micro-organismos de diversos tipos, como as bactérias que vêm sendo utilizadas em pesquisas em busca de compostos secundários úteis no tratamento de patologias humanas (LIMA, 2013).
O câncer de pele é uma das doenças mais comuns em humanos e está dividido em duas categorias: câncer de pele melanoma e câncer de pele não-melanoma (GRAYSCHOPPER et al., 2007, BAGHERI e SAFAI, 2001). O melanoma murino (linhagem B16-F10) é um dos principais modelos usados em estudos laboratoriais desse tipo de tumor, pois sua genética é bem conhecida e as suas características histológicas possuem muita semelhança com o melanoma humano (SILVA et al., 2013).
Recentemente o prof. Dr. Ulisses Brigatto Albino, da Universidade Federal do Sul e Sudoeste do Pará - UNIFESSPA, isolou 49 cepas de bactérias do solo da caverna “Pedra da Cachoeira” localizada no oeste do Pará, e as testou quanto ao seu potencial de antibiose contra *Staphylococcus aureus, Escherichia coli e Candida albicans*. Três cepas, das que apresentaram os melhores resultados em relação aos experimentos de antibiose e citotoxicidade em relação a diferentes linhagens tumorais (BISCAIA, 2015) foram testadas nesse trabalho.
O objetivo do trabalho foi analisar o efeito citotóxico de extratos de bactérias isoladas de caverna sobre uma linhagem tumoral, na busca de moléculas com efeito antitumoral.

Material e Métodos

Foram coletadas amostras de material das paredes, solo e fezes de morcegos e tomadas 10 amostras de cada substrato. Após incubação, as colônias bacterianas foram contadas e as de características diferentes foram inoculadas em placas de Petri e separadas a fim de serem isoladas. Após a obtenção dos cultivos homogêneos, foi realizado, nas diferentes bactérias, o teste de Gram para se confirmar a pureza das culturas.

Para obtenção dos extratos, foram realizados estudos cinéticos a partir de curvas de crescimento e foram escolhidos dois momentos para extração do material: 30 h (fase estacionária) e 40 h (fase de declínio). Para a produção dos extratos, as bactérias foram cultivadas em meio líquido LB (Luria-Bertani) e levadas à incubadora à 30 ºC sob agitação (120 rpm) durante 30 e 40 h. Após esses períodos, as mesmas foram filtradas para separar as células (fase A) do meio de cultura (fase B). Logo após as extrações, o material foi concentrado em evaporador rotativo, onde foram obtidos dois tipos de extratos: o extrato do meio de cultura e o extrato intracelular.

Para testar a citotoxicidade dos extratos bacterianos, foram utilizadas linhagens de fibroblasto murino (3T3, banco de células do Rio de Janeiro, código 0017) e melanoma murino (B16-F10, banco de células Rio de Janeiro, código 0342), ambas foram cultivadas em meio RPMI, suplementado com soro fetal bovino 10% e mantidas em estufa com 5% de CO2 a 37ºC.

As diferentes concentrações dos extratos bacterianos foram incubadas sobre as células por 48 h. Depois disso, todos os poços foram analisados, em um microscópio invertido, para a visualização da morfologia das células, das linhagens e comparação com o resultado do MTT, que foi adicionado aos poços. As absorbâncias obtidas foram transformadas em % de viabilidade celular. Foram realizados os cálculos de CI50, concentração média de um extrato necessário para inviabilizar 50% do crescimento celular, levando-se em consideração pelo menos três repetições de um experimento, sendo recomendado como interessante para continuidade dos experimentos e purificação, extratos brutos com valores de CI50 inferiores a 30 µg/mL após uma exposição de 72 h. Também foi obtido o índice de seletividade (IS) para cada extrato, o qual é definido pela razão do CI50 para cada extrato entre as linhagens 3T3, não-tumoral e a B16-F10 linhagem tumoral.

Os dados foram submetidos ao teste de distribuição normal de Shapiro-Wilk e Bartlett e posteriormente analisados por Anova de uma via e pós teste de Tukey. Foi considerado significativo $p<0,05$.

Resultados e Discussão

Foram analisados, no total, nove extratos oriundos do meio intracelular e extracelular das 3 cepas:

- Extratos CV26AI30H, CV26AI40H, CV26AM30H e CV26AM40H: cepa CV26A, material intracelular (I) ou do meio de cultivo (M), após 30 ou 40 h de cultivo (identificadas como 30H ou 40H no nome do extrato);

ISSN 1676-0093

- Extratos CV26BI30H, CV26BI40H, CV26BM30H e CV26BM40H: cepa CV26B, material intracelular (I) ou do meio de cultivo (M), após 30 ou 40 h de cultivo (identificadas como 30H ou 40H no nome do extrato);
- CV36I30H: cepa CV36I30H: cepa CV36, meio intracelular (I), após 30 h de cultivo.

Tabela 1. Valores de CI50 obtidos para as linhagens celulares encubadas com os extratos oriundos de bactérias da Caverna Pedra das Cachoeira no Pará e os Índices de Seletividade (IS) da linhagem tumoral (B16-F10) em relação a linhagem não tumoral (3T3).

EXTRATO	LINHAGEM	CI50(µg/ml)	IS
CV26AI30H	3T3	>400	>4,7
	B16F10	83,99 ± 6,87	
CV26AI40H	3T3	>400	1
	B16F10	>400	
CV26AM30H	3T3	277,3 ± 18,14	0,97
	B16F10	287,3 ± 35,57	
CV26AM40H	3T3	229,1 ± 29,87	1,88
	B16F10	121,9 ± 21,45	
CV26BI30H	3T3	>400	1
	B16F10	>400	
CV26BI40H	3T3	>400	1
	B16F10	>400	
CV26BM30H	3T3	256,4 ± 45,89	1,51
	B16F10	169 ± 22,89	
CV26BM40H	3T3	239,8 ± 32,56	0,84
	B16F10	283,8 ± 76,78	
CV36I30H	3T3	>400	1
	B16F10	>400	

Como pode ser observado na Tabela 1, nenhum dos extratos analisados, apresentou CI50 em concentrações consideradas interessantes para os autores citados. Como verificado anteriormente, quanto maior o IS, mais efetiva é a citotoxicidade do composto/extrato de uma linhagem em relação a outra. Ayesh, Abed e Faris (2014), sugerem que para um composto ser considerado de baixa toxicidade e com boas chances de ser uma nova droga anticâncer, deve apresentar um IS > 2, assim como, Fernandes (2015), sugere que para um composto ser considerado seguro seu IS deve ser > 1, mas, para ser considerado significativo como composto antitumoral o IS deve ser > 2. Dessa forma, levando-se em consideração o IS dos extratos avaliados, os extratos CV26A40H e CV26B30H são seguros para futuros estudos, mas apenas o composto CV26AI30H poderia ser considerado promissor para a continuação dos estudos e purificação para obtenção de subfrações.

ISSN 1676-0093

Conclusão

Considerando todos os extratos analisados, o CV26AI30H, o CV26A40H e o CV26B30H podem ser considerados seguros, mas apenas o CV26AI30H é interessante e viável para futuras análises e purificações pois, apesar do CI50 obtido ser superior ao limite recomendado pelo Instituto Nacional Americano do Câncer, apresentou valor de IS > 2.

Agradecimentos

A UEPG pelos professores e espaços para estudo; ao PIBIC pela bolsa para meus estudos e a Professora Dra. Kátia S. Paludo por proporcionar a oportunidade dessa pesquisa e seu auxílio em enriquecer meus estudos.

Referências

AYESH, B. M.; ABED, A. A.; FARIS, D. M. In vitro inhibition of human leukemia HP-1 cells by Origanum syriacum L. and Thymus vulgaris L. extracts. **BMC Res Notes**, 7 (2014), p. 612.

BAGHERI, M. e SAFAI, B. Cutaneous malignancies of keraticocytic origin. **Clinical Dermatology,** 19, 244-252, 2001.

BISCAIA, F. A. B. **Avaliação in vitro da atividade citotóxica de bactérias isoladas da caverna "pedra da cachoeira", Pará, sobre células tumorais**. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Ponta Grossa-PR, 2015.

FERNANDES, T. B. **Planejamento, síntese e avaliação do potencial antitumoral de compostos arilsulfonil-hidrazônicos.** 2015. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

GRAY-SHOPFER, V.; Wellbrock, C. et al. Melanoma biology and new targeted therapy. **Nature,** 445, 851-857, 2007.

LIMA, S. M. A. **Avaliação das atividades antimicrobiana e citotóxica de Metabólitos secundários produzidos pela actinobactéria Actms-9h isolada da rizosfera de *Paullinia cupana* kunth**. 2013, 93f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, 2013.

SILVA, C. F. N.; MELO, G. P.; BERNARDES, S. S.; CECCHINI, A. A. Experimental models of in vivo murine melanoma. **Biosaúde**, Londrina, v.15, n.2, p.73-80, 2013.

ISSN 1676-0093