



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Curso de Graduação Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia

ARTHUR CARMELLO ALMEIDA

**PRODUÇÃO FERMENTATIVA DE NIGERICINA E AÇÃO
TERAPÊUTICA EM LINHAGENS TUMORAIS**

Araraquara, SP

2022

ARTHUR CARMELLO ALMEIDA

**PRODUÇÃO FERMENTATIVA DE NIGERICINA E AÇÃO
TERAPÊUTICA EM LINHAGENS TUMORAIS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Engenheiro(a) de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Álvaro Baptista Neto

Araraquara, SP

2022

A448p Almeida, Arthur Carmello.
Produção fermentativa de nigericina e ação terapêutica em
linhagens tumorais / Arthur Carmello Almeida. – Araraquara: [S.n.],
2022.
74 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação - Engenharia de
Bioprocessos e Biotecnologia) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de
Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Área de
Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientador: Álvaro de Baptista Neto.

1. Nigericina (Revisão). 2. Câncer. 3. Antibiótico. 4. Fermentação
(Produção). I. Baptista-Neto, Álvaro de, orient. II. Título.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente à minha família. À minha irmã Carol Carmello por ter me ajudado e apoiado nos momentos mais delicados durante estes três anos, à minha mãe Mara Carmello, por ter me dado todo apoio necessário durante estes três anos, ao meu avô José Luiz Carmello pelo imenso carinho, cuidado e por tudo que fez por mim, serei eternamente grato. À minha avó Leonor Prosdocini que sempre consegue ver o lado positivo nas coisas e desta forma me inspirou a continuar firme e forte nesta trajetória, ao meu pai Alaor por ter me instruído com a parte técnica, à minha psicóloga e amiga Eliete, por ter me incentivado e ajudado psicologicamente no término deste trabalho e por fim ao meu Dobermann Apollo que chegou em uma época muito complicada e fez toda diferença.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família por ter me dado suporte necessário para que este trabalho fosse feito da melhor forma possível, ao meu cachorro por estar fazendo parte da minha vida e por ter me feito um bem imensurável, agradeço meus avós Leonor e José Carmello por todo carinho que me deram, também agradeço amigos que foram importantes para que eu tivesse equilíbrio nessa jornada.

Agradeço ao meu orientador Álvaro por ser sempre acessível e me ajudar com as dúvidas e as dificuldades do projeto, à FMB (Faculdade de Medicina de Botucatu) que por meio das Professoras Luciane e Lilian me abriram as portas e me receberam tão bem, enquanto outras se fecharam, agradeço imensamente essas oportunidades e espero ter contribuído e continuar contribuindo com a FMB também.

E por último e não menos importante, gostaria de agradecer a Mim mesmo. E colocando um trecho do discurso do cantor Snoop Dog após ganhar uma estrela na calçada da fama, que me representa muito neste momento:

“Last but not least, I wanna thank me

I wanna thank me for believing in me

I wanna thank me for doing all this hard work

I wanna thank me for having no days off

I wanna thank me for never quitting

I wanna thank me for always being a giver and tryna give more than i receive

I wanna thank me for tryna do more right than wrong

I wanna thank me for just being me at all times “

RESUMO

O presente trabalho relata produção fermentativa de nigericina e faz uma revisão sobre ações terapêuticas desse antibiótico da classe dos ionóforos de potássio, que vem se mostrando uma molécula muito promissora na inibição do crescimento, migração, invasão e resistência das mais variadas linhagens de células tumorais. O objetivo é a identificação das melhores condições fermentativas visando uma maior produção da nigericina bem como analisar os diversos efeitos desta substância frente à variados tipos de células tumorais. Embora os mecanismos de atuação ainda não estejam plenamente elucidados. Há possibilidade de utilização desse agente com objetivo de promover a redução de efeitos adversos causados pelos métodos tradicionais de quimio e radioterapia, bem como efeito antiproliferativo metastático frente à correlação positiva dose dependente da eficácia na diminuição desses efeitos, portanto, diminuindo o sofrimento de milhares de pessoas que passam ou ainda vão desenvolver essa condição. A produção fermentativa de nigericina demonstrou ser viável em larga escala com boa relação custo/benefício, além disso os estudos mostram ações significativas potenciais para tratamento utilizando a nigericina isolada ou associadas com outras substancias na inibição e desenvolvimento de diversos tipos de canceres bem como redução incidência de metástase “in vitro” e “In vivo”, portanto os resultados sugerem que a nigericina é um molécula candidata promissora na utilização de certos tipos de tumores e provendo um melhor prognostico para os pacientes.

Palavras-chave: Revisão, Nigericina; Cancer; Antibiótico; Produção, Fermentação.

ABSTRACT

The present work reports fermentative production of nigericin and reviews the actions of this antibiotic, which is a potassium ionophore compound, which has shown to be a very promising molecule in inhibiting the growth, migration, invasion and resistance of the most varied lineages of tumor cells, although the mechanisms of action are not yet fully elucidated. There is the possibility of using this agent with the objective of promoting the reduction of adverse effects caused by traditional methods of chemo and radiotherapy, as well as a metastatic antiproliferative effect in the face of a positive dose-dependent correlation of efficacy in reducing these effects, therefore reducing the suffering of thousands of people who pass or will still develop this condition. The fermentative production of nigericin has been shown to be viable on a large scale with a good cost/benefit ratio, in addition, studies show significant potential actions for treatment using nigericin alone or associated with other substances in the inhibition and development of various types of cancers as well as reducing the incidence of metastasis "in vitro" and "in vivo", therefore a promising candidate molecule in the use of certain types of tumors and providing a better prognosis for patients.

Keywords: Review, Nigericin; Cancer; Antibiotic; Fermentation; Production

LISTA DE ILUSTRAÇÕES, FIGURAS

Figura 1. Figura ilustrativa da estrutura molecular relativa ao ionóforo nigericina.

Figura 2. Ilustra a citotoxicidade apresentada pela nigericina contra células do tronco do tipo carcinoma nasofaríngeo contra duas cepas a S18 e a S26 ambas in vitro. (A) Gráfico de dose-resposta de cepas NPS S18 e S26 e (B) gráfico da concentração inibitória 50 (IC₅₀) P = 0.035. (DENG et al, 2013)

Figura 3. Crescimento da linhagem SW620 de células de tumor colorretal sobre ausência e presença (1 µmol/L) de nigericina adaptado de (LIU et al, 2018).

Figura 4. Crescimento da linhagem KM12 de células de tumor colorretal sobre ausência e presença (4 µmol/L) de nigericina adaptado de (LIU et al, 2018).

Figura 5. Teste de Apoptose celular usando a linhagem SW620 na ausência e na presença (1 µmol/L) de nigericina adaptado de (LIU et al, 2018).

Figura 6. Teste de Apoptose celular usando a linhagem KM12 na ausência e na presença (4 µmol/L) de nigericina adaptado de (LIU et al, 2018).

Figura 7. Inibição causada pela nigericina contra células tumorais do tipo SW620 controle e SW620 com β-catenina injetadas de forma subcutânea, utilizando ensaio de bioluminescência após 4 semanas da inoculação, adaptado de (LIU et al, 2018)

Figura 8. Gráfico de peso das células tumorais na presença e ausência de dois elementos, a nigericina e a β-catenina, adaptado de (LIU et al, 2018).

Figura 9. Inibição causada pela nigericina contra células tumorais do tipo SW620 controle e SW620 com β-catenina injetadas na cavidade peritoneal, utilizando ensaio de bioluminescência após 35 dias da inoculação, adaptado de (LIU et al, 2018).

Figura 10. Ambos os gráficos de Viabilidade celular por concentração de nigericina utilizada evidenciam a diminuição da viabilidade células das células cancerígenas de pâncreas de duas linhagens diferentes (PANC-1 e SW1990), expondo as células a diferentes concentrações de nigericina (0 - 50µM) e à diferentes tempos de exposição (0 – 32 Horas), demonstrou que com o aumento da concentração utilizada houve uma nítida diminuição da viabilidade células em ambas as linhagens tumorais, portanto a nigericina possui atividade contra estas células adaptado de XU, ZHIHUA et al, 2019.

Figura 11. Gráficos de concentração inibitória média por tempo (8; 16 e 32 horas) de exposição à nigericina 5 µmol/L utilizando as duas linhagens celulares de câncer de pâncreas (PANC-1 e

SW1990), evidenciando a inibição causada pela nigericina na viabilidade células das cepas utilizadas ao longo do tempo. (*P < 0.05) (XU, ZHIHUA et al, 2019).

Figura 12. Gráfico de viabilidade das células de pulmão tumorais H460 (%) por concentração do antibiótico nigericina ministrado em concentrações crescentes (1-50 µM) e avaliada após 72 horas de exposição, a viabilidade celular foi feita por ensaio de MTT, retirado de Yakisich et al, 2017.

Figura 13. Imagem do ensaio de formação de colônias com as células H460 utilizando um controle negativo sem nigericina e mais dois poços contendo 0,1µM e 1µM de nigericina respectivamente durante 72 horas de exposição, o que evidenciou uma forte influência da nigericina na proliferação das células H460 neste período, retirado de Yakisich, 2017.

Figura 14. Fotos dos ensaios de Migração celular utilizando a linhagem de células tumorais H460, no grupo controle não havendo nigericina no meio e o segundo contendo nigericina na concentração de 1µM e ao lado um gráfico de migração de células (%) nos dois grupos tanto controle quanto contendo nigericina, retirado de Yakisich et al, 2017, *p<0.05.

Figura 15. Fotos do ensaio de Invasão celular utilizando a linhagem de células tumorais H460, em dois grupos, no grupo controle sem nigericina e no segundo grupo contendo nigericina na concentração de 1µM e ao lado um gráfico de invasão celular (%) analisado nos dois grupos, tanto no controle quanto no contendo nigericina, retirado de Yakisich et al, 2017, *p<0.05.

Figura 16. Gráfico em barras da viabilidade das células cancerígenas pulmonares H460 (%) usando múltiplas concentrações de Wnt-1 (0 – 100 ng/mL) nos determinados grupos, sendo o primeiro o grupo controle sem nigericina e os demais com 0,5µM e 1µM de nigericina, todos com 72 horas de exposição. A viabilidade das células foi determinada por ensaio de MTT, retirado do estudo de Yakisich, 2017.

Figura 17. Foto tirada do gel SDS-PAGE com immunoblotting contendo as moléculas analisadas nas células tumorais H460, nas amostras contendo o grupo controle (tratado apenas com DMSO 0.0005%) e dos grupos contendo concentrações crescentes de nigericina (0,5 µM ; 1 µM ; 2,5 µM), adaptado de Yakisich et al, 2017.

Figura 18. Ensaio de formação de colônias feito com células tumorais humanas H460 utilizando controle com DMSO apenas, MD, DIG e nigericina, amostras individuais e conjugadas de nigericina com DIG ou MD nas concentrações de 0,1 µM; 20 nM e 20nM respectivamente, retirado e adaptado de Yakisich et al, 2017.

Figura 19. Gráfico em barras de viabilidade celular de células cancerígenas de pulmão H460 por amostra contendo concentrações crescentes de nigericina (1-10 µM) utilizando o método contagem de células kit-8, adaptado de Yakisich et al, 2017, *p<0.05.

Figura 20. Gráfico em barras da viabilidade células de células tumorais de pulmão humano linhagem H460, por amostra contendo as drogas de forma independente e a associação de nigericina (NIG) e

MonoD (MD) ou Digitoxina (DIG) nas concentrações de 0,5 μ M e 20 nM respectivamente, a viabilidade das tumoresferas foi medida utilizando o ensaio de contagem de células K-8, retirado e adaptado de Yakisich et al, 2017, * $p < 0.05$.

Figura 21. Demonstra os ensaios de migração e invasão feitos por ensaio de câmara de Boyden usando NIG em células EOCs das linhagens A2780 e SKOV3 com o uso de amostras controle contendo DMSO e amostras contendo NIG em concentrações crescentes (5–20 μ mol/L), efeito inibitório observado qualitativamente nas imagens e quantitativamente nos respectivos gráficos à direita com teste estático demonstrando a diferença significativa entre os grupos, adaptado de Wang e Zhou et al, 2017 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Figura 22. Imagem ilustra gráficos de tamanho de células tumorais das linhagens A2780 e SKOV3 por complexidade e à direita dois gráficos de barras de apoptose por amostra utilizada, foram utilizadas concentrações crescentes de NIG (5-20 μ M) e DMOS para o controle durante 48 horas de exposição e fixadas com solução de PI/Annexin V-FITC e detectado em citometria de fluxo, células em estágio inicial de apoptose (baixo-direita) Annexin V+/PI–, células em estágio tardio de apoptose (cima-direita) Annexin V+/PI+, células sobreviventes (baixo-esquerda) Annexin V–/PI– e células consideradas em necrose (cima-esquerda) Annexin V–/PI+, adaptado de Wang et al, 2017. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Figura 23. Combinação de Gráfico em barras de nível de expressão por proteínas chave relacionadas com o processo apoptótico, analisadas por Western blot em ambas as linhagens de células tumorais (A2780 e SKOV3) com o uso de um controle contendo DMSO e três amostras contendo concentrações crescentes de NIG (5-20 μ M), e uma foto da técnica de Western blot contendo a indicação de cada molécula para análise qualitativa, adaptado de Wang et al, 2017. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Figura 24. Foto do ensaio de Imunofluorescência evidenciando a redução da via “*Wnt/ β -catenin signaling pathway*” em duas amostras, a primeira contendo DMSO e segunda contendo NIG. À direita um gráfico do ensaio de luciferase mostra a inibição causada por NIG na via “*Wnt/ β -catenin signaling pathway*”, ambos os ensaios feitos utilizando as linhagens tumorais A2780 e SKOV3, adaptado de Wang et al, 2017. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Figura 25. Gráfico de fração formadora de colônias (CFF) por pH utilizando quatro diferentes concentrações de nigericina em baixas concentrações (0,25-1,0 μ g/ml), evidencia o efeito da nigericina na formação de colônia de célula tumoral da linhagem M1R em função do pH externo à célula, adaptado de Jähde et al, 1989.

Figura 26. Gráfico de fração formadora de colônia por concentração de Mafosfamida em μ g/ml (MAFO), utilizando MAFO conjugado com nigericina nas concentrações 0,25 μ g/ml ou 1,0 μ g/ml em dois pHs diferentes (7,4 e 6,5), testando o potencial causado pela nigericina na diminuição da formação de colônias de células tumorais da linhagem M1R, adaptado de Jähde et al, 1989.

Figura 27. Gráfico de fração formadora de colônia por concentração de Mafosfamida em $\mu\text{g/ml}$ (MAFO), utilizando MAFO conjugado com nigericina nas concentrações 0,25 $\mu\text{g/ml}$ ou 1,0 $\mu\text{g/ml}$ em dois pHs diferentes (7,4 e 6,2), testando o potencial causado pela nigericina na diminuição da formação de colônias de células tumorais da linhagem M1R, adaptado de Jähde et al, 1989.

Figura 28. Gráfico em barras da concentração de Mafosfamida (MAFO, em $\mu\text{g/ml}$) por amostra em dois pHs 7,4 ou 6,2, com ou sem nigericina (0,25 $\mu\text{g/ml}$), as barras representam a concentração de MAFO necessária para reduzir CFF de células M1R para 0,01 do valor controle, adaptado de Jähde et al, 1989.

Figura 29. Gráficos da supressão dos promotor ativado de PSA andrógeno-dependente por nigericina em células 22Rv1. As quais foram transfectadas com promotores PSA-Luc e CMV-RLuc e tratados com concentrações crescentes (0,2-20 μM) de thapsigargin, 17-AAG ou nigericina em ausência (○) ou na presença (■) de 1 nM DHT durante 24 horas de exposição, retirado de Mashima et al, 2010.

Figura 30. Supressão da produção de PSA andrógeno-dependente durante um período de exposição (entre 0-24 horas) e contendo ou não doses de DHT (10 nM) e de Nigericina (100 nM) em células tumorais da linhagem LNCaP, adaptado de Mashima et al, 2010.

Figura 31. Supressão da produção de PSA andrógeno-dependente durante 24 horas, usando ou não DHT (10 nM) com controles positivos e negativos e três amostras contendo concentrações crescentes de nigericina (1-100 nM) em células tumorais da linhagem LNCaP, adaptado de Mashima et al, 2010.

Figura 32. Imagem de células LNCaP tratadas com DHT (10 nM) e três amostras com concentrações crescentes de nigericina (1-100 nM) durante 5 dias, adaptado de Mashima et al, 2010.

Figura 33. Gráfico de barras do crescimento celular de células da linhagem LNCaP na ausência ou na presença de andrógeno, foram tratadas com DHT (0 ou 10 nM) e na ausência ou na presença de nigericina na concentração de 10 nM durante 3 dias, assim como realizado teste estatístico (teste bicaudal, teste t) entre as amostras, adaptado de Mashima et al, 2010; ** $p < 0.01$.

Figura 34. Gráficos de barras da porcentagem de expressão de PSA e AR detectado em células LNCaP tratadas durante 24 horas na ausência ou na presença de DHT (10 nM) e na ausência ou na presença de nigericina (1-100 nM), adaptado de Mashima et al, 2010.

Figura 35. Gráfico de porcentagem de AR/GAPDH por tempo de exposição à actinomicina D (10 μM) na ausência ou na presença de nigericina (100nM) durante 4 ou 8 horas, utilizando células LNCaP em 5% de meio CCS com ou sem DHT (10 nM), contendo três amostras, o controle (○), DHT (●) e DHT com nigericina (▲), a análise feita por qRT-PCR, adaptado de Mashima et al, 2010; ** $p < 0.01$.

Figura 36. Efeito da nigericina no nível de AR (cadeia completa), tAR (truncado) e na expressão das moléculas marcadoras de apoptose em células 22Rv1, as quais foram tratadas com nigericina com uma dose crescente de nigericina (1-100 nM), adaptado de Mashima et al, 2010.

Figura 37. Gráfico de barras [receptor andrógeno de cadeia completa (□) e receptor andrógeno de cadeia truncada (■)] da porcentagem de proteína AR por concentrações crescentes de nigericina (1-100 nM), adaptado de Mashima et al, 2010.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AR – receptor andrógeno, do inglês androgen receptor.

CCK-8 – Ensaio de contagem de células kit-8, do inglês Cell Counting Kit-8.

CECS - células estaminais cancerosas.

CFF – fração formadora de colônia, do inglês colony-forming fraction.

circRNAs – ácido ribonucleico circular, do inglês circular ribonucleic acid.

CMV-RLuc - Renilla reniformis luciferase reporter vector with CMV promoter.

CSCs - células tronco cancerígenas, do inglês cancer stem cell.

CSLCs - células semelhantes à células tronco cancerígenas, do inglês Cancer-like stem cell.

DDP - agente cisplatina

DHT – di-hidrotestosterona, do inglês dihydrotestosterone.

DIG - digitoxina.

DMSO – dimetilsulfóxido

DR5 - receptor morto (Final) 5, do inglês Dead Receptor 5

EMT – Transição Epitélio-Mesenquimal, do inglês epithelial–mesenchymal transition.

EOC – Células epiteliais cancerígenas de ovário, do inglês Epithelial ovarian cancer.

HRPC – Câncer prostático resistente à hormônios, do inglês hormone-refractory prostate cancer.

IC50 - inibição do crescimento 50.

LF – Fermentação em estado líquido, do inglês Liquid fermentation.

M1R – carcinoma mamário de rato, do inglês rat mammary carcinoma

MAFO – mafosfamida.

MD - monoD.

NIG - nigericina.

NPS - células tronco de carcinoma nasofaríngeo, do inglês nasopharyngeal carcinoma stem cells.

PBS – Tampão fosfato-salino, do inglês phosphate buffered saline.

PI – Iodeto de Propídio.

PSA - antígeno prostático específico, do inglês prostate-specific antigen.

qRT-PCR - reação em cadeia da polimerase- em tempo real, do inglês Real Time Quantitative PCR

RNA - ácido ribonucleico, do inglês ribonucleic acid.

RT-PCR - reação em cadeia da polimerase – transcriptase reversa, do inglês Reverse Transcription–Polymerase Chain Reaction

SDS-PAGE - eletroforese em gel de poliacrilamida, do inglês sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis.

SmF – Fermentação Submersa, do inglês Submerged Fermentation.

SSF – Fermentação em estado sólido, do inglês Solid-State Fermentation.

tRA – receptor andrógeno truncado.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	DESENVOLVIMENTO	19
	2.0 REVISÃO DA LITERATURA.....	19
	2.1 PRODUÇÃO FERMENTATIVA.....	19
	2.1.1 METODOLOGIA PRODUÇÃO FERMENTATIVA E VIABILIDADE CUSTO/BENEFÍCIO	21
	2.1.2 INTRODUÇÃO - IONÓFOROS.....	22
	2.1.3 MECANISMO DE ATUAÇÃO DA NIGERICINA.....	23
	2.2 ATIVIDADES ANTITUMORAIS DA NIGERICINA	24
	2.2.1 ATIVIDADE CONTRA CÉLULAS-TRONCO CANCEROSAS EM CARCINOMA NASOFARINGE	24
	2.2.2 ATIVIDADE CONTRA CÉLULAS CANCEROSAS COLORRETAIS HUMANAS E EXPERIMENTAL EM ANIMAIS DE LABORATÓRIO.	25
	2.2.3 CÉLULAS TUMORAIS DE PÂNCREAS.	29
	2.2.4 TUMORES PULMONARES.....	32
	2.2.5 CÂNCER DE OVÁRIO.....	40
	2.2.6 CARCINOMA DE MAMA	44
	2.2.7 CÂNCER DE PRÓSTATA	48
	2.3 PATENTES ENVOLVENDO NIGERICINA	55
	2.3.1 – PATENTE EUA – NIGERICINA PARA TRATAMENTO DE COCCIDIOSES (PROTOZOÁRIOS).....	55
	2.3.2 PATENTE EUROPEIA – NIGERICINA COMO AGENTE ANTIVIRAL.	56
3	CONCLUSÃO OU CONSIDERAÇÕES FINAIS	56
4	REFERÊNCIAS.....	57
5	APÊNDICE.....	61
	5.1 PATENTES	61
6	ANEXO.....	65

1 INTRODUÇÃO

A nigericina (NIG) possui o registro na *Chemical Abstracts Service* - CAS no. 28643-80-3, e na *European Chemical Agency* - ECHA no. 608-231-4, seus principais sinônimos: Antibiotico X464, Azalomicina M, Polieteterina A, Antibiotico K178, Helexina C, entre outros. Disponível em: (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Nigericin> acesso em 18/07/2022). (<https://echa.europa.eu/information-on-chemicals/pre-registered-substances/-/dislist/substance/100.131.597> acesso dia 19/07/2022).

Trata se de um composto polieter ionóforo carboxílico, metabólico secundário produzido por bactérias do gênero *Streptomyces* e apresenta uma grande importância biotecnológica para a produção de bioativos nos seguimentos farmacêutico ou veterinário como antibiótico (ex: bactérias gram – ou + e antiviral Vaccinia vírus e antifungico) e agrônômico (ex herbicida) (HEISEY; PUTNAM, 1990; MYSKIWB, et.al 2010; SAHU, et.al, 2020).

A família desses ionóforos representam mais de 120 produtos naturais estruturalmente relacionados com a capacidade de quelar seletivamente íons metálicos e transportá-los através das membranas celulares. A ação da nigericina, foi descrita pela primeira vez em 1951. Exerce diversos efeitos nas células através de sua capacidade de mediar troca H^+/K^+ , através das membranas biológicas. (HARVEY; MIRONENKO, et.al., 2007).

Outra aplicação importante do antibiótico NIG para controle microbiológico no setor agroindustrial com objetivo de aumentar a produção com redução de custos, em particular do setor sucroalcooleiro que foi responsável por aproximadamente 2% do PIB nacional e por 31% do PIB da agricultura no Brasil em 2012, tendo empregado cerca de 4,5 milhões de pessoas. O Brasil é o segundo maior produtor de etanol do mundo. Para a produção de etanol, o monitoramento e o controle de contaminantes da microbiota nas dornas de fermentação são fundamentais para a melhora na eficiência e no rendimento da produção de etanol. A contaminação bacteriana é certamente o principal fator que afeta a fermentação alcoólica. Portanto

a utilização NIG, em virtude de suas propriedades bactericidas ou bacteriostáticas, funcionam como agentes desinfetantes, reduzindo a contaminação microbiológica da fermentação dessa forma promovendo aumento de produtividade <https://bv.fapesp.br/pt/auxilios/93548/aplicacao-do-antibiotico-nigericina-para-controle-microbiologico-no-setor-agroindustrial/> acesso em 18/07/2022.

O trabalho de dissertação realizado por André Luiz Scridelli Silva avaliou o potencial de produção de nigericina pela actinobactéria EUCAL 26, isolada da rizosfera do eucalipto. Esta actinobactéria apresenta um grande potencial biotecnológico, em virtude de produzir apenas a nigericina como metabolito ativo, ou seja, o extrato bruto é composto única e exclusivamente por nigericina. Outro resultado bastante promissor, foi a produção de nigericina em aproximadamente 500,0 mg/L, empregando uma solução melaço de soja 1% como meio de cultivo, sendo o melaço de soja um resíduo agroindustrial de baixo custo e com grande potencial para aplicação em processos biotecnológicos.

O autor André Luiz Scridelli Silva também realizou testes de atividade biológica comparativos entre nigericina e monensina, frente a diferentes linhagens de bactérias, no qual a nigericina apresentou maior atividades em menores concentrações.

Visto a isso, prevê-se uma diminuição na adição de antibiótico, tornando o processo mais sustentável, desta forma, o principal objetivo deste projeto PIPE foi avaliar a possibilidade de introduzir no mercado um produto sustentável e de baixo custo para ser utilizado no controle de contaminantes do mosto de fermentação para a produção de etanol.

Deste modo, a empresa MC DESINFECÇÃO INDUSTRIAL propõe um projeto, que conta com uma colaboração inédita com o Laboratório de Espectrometria de Massas Aplicada a Produtos Naturais (USP – Ribeirão Preto) e com a Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara, visando avaliar o desenvolvimento do potencial de aplicação do antibiótico nigericina, produzido pela actinobactéria EUCAL 26, isolado e produzido em trabalhos realizados na USP de São Paulo. (AU) <<https://bv.fapesp.br/pt/auxilios/93548/aplicacao-do-antibiotico->

nigericina-para-controle-microbiologico-no-setor-agroindustrial/> acesso em: 18/07/2022, para o controle microbiológico do processo de fermentação do etanol.

Os agentes antitumorais são compostos que dentre as diversas atividades conseguem de algum modo impedir a continuação de linhagens celulares cancerosas. Podem ser classificados como alcaloides, cumarinas, curcuminoides, flavonoides, ligninas, taninos, terpenos (sesquiterpenos, diterpenos e triterpenos), estilbenos e polissacarídeos (CAI et al., 2004).

A molécula de NIG possui potenciais aplicações como agente anti-tumoral devido atividade inibitória em células estaminais cancerosas (CECs), das quais possuem alta capacidade de renovação, podendo dar origem a novas linhagens celulares cancerosas heterogêneas, que geram um aumento na probabilidade destas serem resistentes a diversos tipos de tratamentos tumorais, dentre eles quimioterapia e radioterapia, ao serem expostas à NIG, as células não se renovam levando à apoptose (DENG et al., 2013).

A NIG é agente químico que possui a capacidade de se ligar a cátions metálicos (agente quelante) formando complexos dinamicamente reversíveis de lipídeos, dos quais, por seu caráter lipídico facilita o transporte de íons através de membranas celulares. Com esta propriedade a molécula consegue romper o potencial de membrana e estimular as enzimas ATPases presentes nas mitocôndrias gerando a falta de potássio comprometendo a fosforilação oxidativa (SHAVIT et al., 1968; ROTTENBERG; SCARPA, 1974; EYTAN et al. 1990).

Quanto a possíveis efeitos adversos toxicológicos da NIG, foi realizado experimentalmente pesquisa possíveis ações teratogênica em camundongos foi administrada por via intraperitoneal em doses de 5,0 ou 7,0 mg/kg nos dias 7-12 de gestação para camundongos CD-1 prenhes. Camundongos adicionais foram injetados ip com 2,5 mg/kg apenas nos dias 11º ou 12º dias de gestação reduziram o crescimento fetal e aumentaram as mortes pré-natais. Sinais adicionais de toxicidade para o conceito incluíram costelas extras relacionadas ao tratamento e ossificação retardada. O tratamento também foi associado a malformações macroscópicas e esqueléticas, como fenda facial mediana, exencefalia, encefalocele, costelas fundidas e vértebras anômalas e exoccipitais. Com a de dose

de 5,0 mg/kg administrada no 8º dia de gestação, as doses de NIG foram associadas a malformações grosseiras ou esqueléticas também resultaram em toxicidade materna observável. (VEDEL-MACRANDER, et.al. 1986).

O presente estudo da NIG demonstra que embora possa em doses maiores (animais de experimentação) ter alguns agravos toxicológico assim como também acontece com outros agentes (risco/benefício), esses resultados justificam-se pela importância da sua múltipla utilização em diversas áreas em particular como antitumoral, bem como, no incremento da produção para as dornas na indústria sucroalcooleira, ou ainda na agricultura como herbicida e até para ração animal (ruminantes), bem como para redução dos efeitos adversos graves dos tratamentos clássicos para as neoplasias com radioterapia e quimioterapia, quando utilizado isolado ou como coadjuvante. O presente trabalho tem como objetivo identificar as melhores condições na produção fermentativa da NIG, bem como, a realização de revisão dos estudos atividade antitumoral, inclusive ao alterar alguns parâmetros, tais como, percentagem ou concentração, e avaliação se poderia apresentar uma atividade antitumoral eficaz, bem como a redução na ação metastática dos tumores. Fazendo da nigericina uma molécula muito promissora como adjuvante nos tratamentos convencionais dos mais variados tipos de cânceres.

2 DESENVOLVIMENTO

2.0 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 PRODUÇÃO FERMENTATIVA

A fermentação é processo pelo qual substratos complexos são metabolizados e transformados em moléculas complexas de interesse funcional.

Fungos e bactérias são exemplos de microrganismos que se utilizam deste meio, seja para produção de energia ou para produção de metabolitos importantes para manutenção do próprio microrganismo no meio, tais como metabolitos secundários, dos quais podemos destacar os antibióticos, moléculas de alto interesse industrial nas indústrias alimentícias (ROSSI, 2009; DAVEREY; PAKSHIRAJAN, 2009) e terapêutico nas indústrias farmacêuticas (DEMAIN, 1999).

O processo de fermentação pode ser conduzido de duas formas majoritárias, meio solido (SSF) e meio submerso (SmF) ou meio líquido (LF), o que as difere basicamente é qual a natureza do substrato que é utilizado para a fermentação (PANDEY et al., 1999).

A escolha do substrato utilizado na fermentação é de extrema importância, uma vez que depende da reação de cada microrganismo frente à determinados substratos, sendo estes cruciais para a produtividade do processo fermentativo (SUBRAMANIYAM; VIMALA, 2012).

Para a fermentação em estado solido (SSF) os substratos normalmente utilizados são bagaço, farelo de milho, fibra de coco, palha de arroz o próprio arroz dentre outros (PANDEY et al., 1999). A principal característica desta modalidade de fermentação é a eficiência no uso do substrato, uma vez que se trata de um processo lento e que permite uma longa fermentação liberando de forma gradual os nutrientes para o microrganismo fermentar. Porém, por possuir um baixo teor de água ativada, ela se torna ineficaz para microrganismos que necessitam de uma certa quantidade de água ativada para metabolizar os substratos, tais como bactérias (BABU; SATYANARAYANA, 1996).

Na fermentação em meio submerso (SmF) os substratos utilizados estão no estado líquido e com grande quantidade de água, tais como suco de frutas, caldos ou melaço, sendo que esse tipo de fermentação se caracteriza pelo alto valor nutricional disponível, o que gera um consumo rápido dos nutrientes, necessitando, geralmente, a reposição de nutrientes durante a fermentação. Mas em contrapartida, para microrganismos, tais como bactérias, que necessitam de uma alta quantidade de água livre, este tipo de fermentação é o mais indicado. Neste tipo de cultivo, os produtos são excretados para o meio, por conter um meio líquido, sendo que a purificação do composto se torna mais rápido e fácil quando comparado à fermentação de estado solido (SUBRAMANIYAM; VIMALA, 2012; MANTECA; ANGEL et al., 2008).

No cultivo submerso visando a produção de nigericina, diversos fatores influenciam a fermentação de maneira positiva e negativa, dentre eles podemos destacar a temperatura durante o processo fermentativo e o pH do meio. Para a

determinação das melhores condições de cultivo, há a necessidade de grande número de experimentos para encontrar as condições ótimas de processo, sendo a utilização das técnicas de planejamento experimental, uma técnica para diminuir o número de experimentos necessários para determinar as condições ótimas de processo. Visto a isso, a dissertação de André Luiz Scridelli Silva relata a realização de um planejamento fatorial a fim de reduzir a quantidade de fermentações necessárias e otimizar custo e tempo dos experimentos na produção de nigericina. Desta forma, o autor André realizou um planejamento fatorial 3^k e obteve uma superfície de resposta utilizando o programa STASTISCA 9.0. Neste planejamento, foi avaliado três condições para cada parâmetro, totalizando 9 experimentos com os seguintes pHs (5, 7 e 9) e temperaturas (15°C, 25°C e 30°C). A concentração de nigericina foi a variável resposta, sendo este produto detectado utilizando um espectrofotômetro de massas. Nesse trabalho, foi possível identificar o composto nigericina após a fermentação utilizando os meios de cultivo (BD, Czapek, ISP2, M29 e TSB) utilizando as actinobactérias EUCAL 26 e EUCAL 74. Neste trabalho, o autor, chegou à conclusão de que a fermentação que obteve a melhor produtividade do ionoforo NIG foi a conduzida a temperatura de 25°C e pH 7 (SILVA, 2014). Sendo assim, foi possível determinar as melhores condições para produção de NIG utilizando as cepas EUCAL 26 e EUCAL 74.

2.1.1 METODOLOGIA PRODUÇÃO FERMENTATIVA E VIABILIDADE CUSTO/BENEFICIO

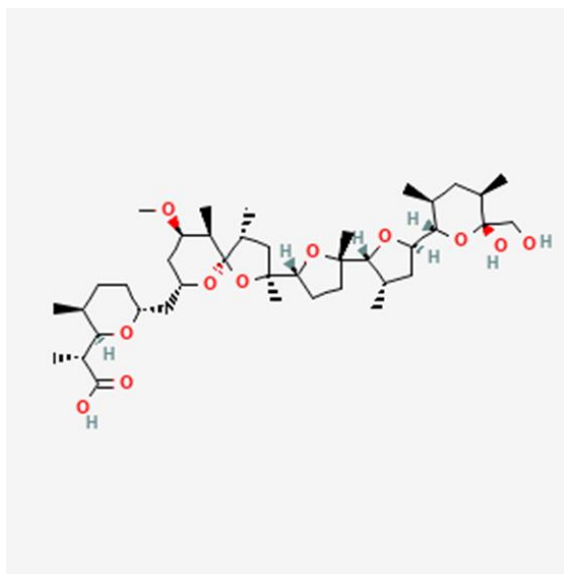
A contaminação bacteriana é certamente o principal fator que afeta a fermentação alcoólica. Quando a contaminação bacteriana atinge níveis entre 10^7 e 10^8 células/mL no mosto, ocorrem queda significativa no rendimento alcoólico. Sem dúvida alguma, o uso de biocidas é o procedimento mais comumente empregado, em virtude de suas propriedades bactericidas ou bacteriostáticas, funcionam como agentes desinfetantes, reduzindo a contaminação microbiológica da fermentação. Os antibióticos comerciais mais utilizados para o controle bacteriano durante a fermentação são o clorafenicol, a tetraciclina, a penicilina e a monensina sódica.

Dentre os quais se destaca o antibiótico importado, monensina sódica, que possui grande atividade sobre bactérias Gram-positivas, as principais causas de contaminação no processo de fermentação etanólica. Atualmente, o gasto com antibióticos para a produção de etanol está em torno de R\$ 0,02 por litro, sendo assim, a implantação de uma produção local de antibiótico a baixo custo pode ser uma alternativa (utilização de nigericina no controle biológico em dornas de Fermentação) para a diminuição do custo final na produção de etanol. Se a tecnologia atender toda a produção do Estado de São Paulo, e gerasse uma diminuição de R\$ 0,01 por litro de etanol produzido, a economia seria de R\$ 99 milhões considerando a safra de 2013/14. A nigericina pertence à classe de antibióticos poliéteres ionóforos, produzidos por actinobactérias do gênero *Streptomyces*, sendo que dentro dessa classe de compostos são conhecidas mais de 120 estruturas diferentes, (SILVA, et.al, 2017). <<https://bv.fapesp.br/pt/auxilios/93548/aplicacao-do-antibiotico-nigericina-para-controle-microbiologico-no-setor-agroindustrial/>> acesso em: 18/07/2022.

2.1.2 INTRODUÇÃO - IONÓFOROS

Os denominados ionóforos que são produzidos por certos tipos de bactérias, constituem um grupo heterogêneo de substâncias que possuem em comum a habilidade de elevar a permeabilidade de membranas celulares para pequenos íons. Essas moléculas são divididas em dois grupos, os formadores de canais e os transportadores móveis que conseguem se ligar a íons solúveis formando complexos lipídicos solúveis e, com isso, estas moléculas têm a capacidade de se mover por entre as membranas biológicas. Podem ser divididos em dois grupos, os ionóforos carboxílicos, que são carregados negativamente e geram complexos iônicos eletricamente neutros e, também, os ionóforos neutros, inicialmente neutro e que formam complexos carregados quando estão associados a determinados tipos íons (DOEBLER, 2000).

Figura 1. Figura ilustrativa da estrutura molecular relativa ao ionóforo nigericina.



Fonte : NIH- pubchen, 2005.

2.1.3 MECANISMO DE ATUAÇÃO DA NIGERICINA

A NIG é um antibiótico da classe dos ionóforos derivado do gênero *Streptomyces* e atua no mecanismo intracelular regulando o nível de pH da membrana, atuando como um antiportador (antiporter) H/K, competindo com o mecanismo de antiporter Na/H que exclui moléculas de H⁺ em troca de moléculas de Na⁺. Tem grande interesse uma vez que produz uma hiperpolarização da membrana e influência de forma significativa e a geração de um potencial de ação induzido eletricamente do que outros ionóforos (XU et al, 2019).

Ainda, a NIG induz a expressão do gene *Dead Receptor 5* (DR5) responsável pela produção de uma proteína reguladora de apoptose em células Caki, que contribui significativamente para a estabilização das proteínas DR5, DR5 é o nome de um gene e, também, a uma proteína que funciona como um receptor superficial celular responsável por mediar a apoptose das células. Além disso reduz a expressão de Cbl, que são ubiquitinas ligases, das quais se tratam de proteínas que regulam a sinalização de transdução da célula em resposta a diferentes estímulos do meio, indicando para a célula a mudança que ocorreu no meio. Uma vez reduzida

a expressão de Cbl, evita-se que o sinal de apoptose seja cessado (PARK; EUN JUNG et al., 2016).

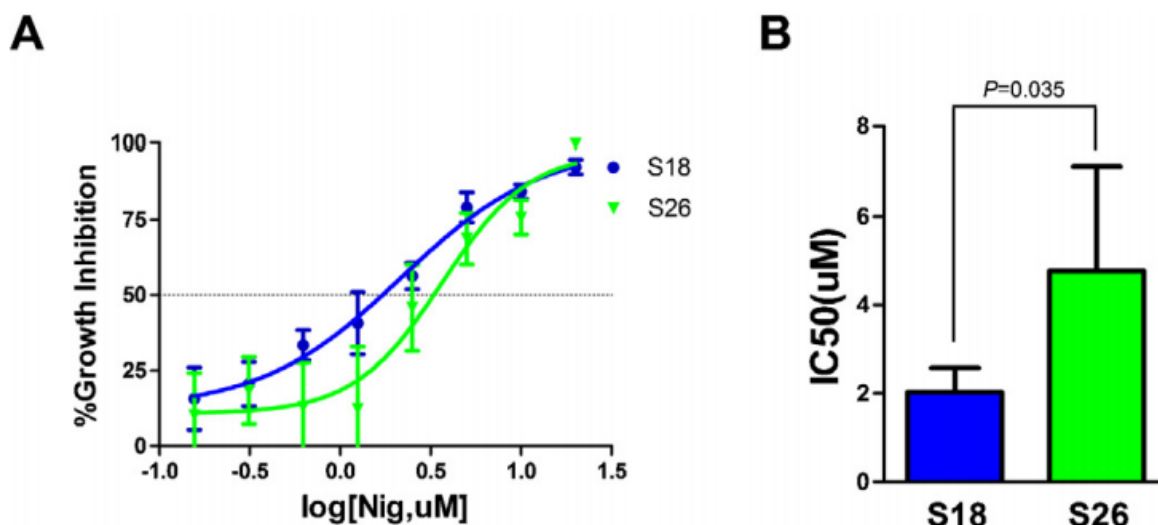
2.2 ATIVIDADES ANTITUMORAIS DA NIGERICINA

2.2.1 ATIVIDADE CONTRA CÉLULAS-TRONCO CANCEROSAS EM CARCINOMA NASOFARINGE

O estudo feito por Deng et al. (2013) relata a realização de experimentos in vivo em camundongos e revelou que a NIG, quando testada para as linhagens de células tronco de carcinoma nasofaringe (NPS), apresentou uma alta citotoxicidade para as cepas utilizadas.

O estudo em camundongos foi feito utilizando as duas linhagens de NPS, as CNE-2-S18 (S18) e CNE-2-S26 (S26), através de testes “in vitro” e “in vivo”, sendo que o teste in vitro demonstrou que a NIG exerceu uma influência maior na linhagem S18 quando comparado à S26 como pode-se notar na figura 1, no qual é mostrada a necessidade de menor concentração antibiótico para inibir o crescimento da linhagem S18 em relação a S26. Esse resultado é evidenciado pela diferença entre os fatores de inibição do crescimento 50 (IC50), o qual mede o potencial de inibição que uma substância causa inibindo uma função biológica específica ou um ser biológico específico (DENG et al, 2013).

Figura 2. Resultado da citotoxicidade apresentada pela nigericina contra células do tronco do tipo carcinoma nasofaríngeo contra duas cepas a S18 e a S26 ambas "in vitro". (A) Gráfico de dose-resposta de cepas NPS S18 e S26 e (B) gráfico da concentração inibitória 50 (IC50). $P = 0.035$.



Fonte: Adaptado de DENG et al, 2013.

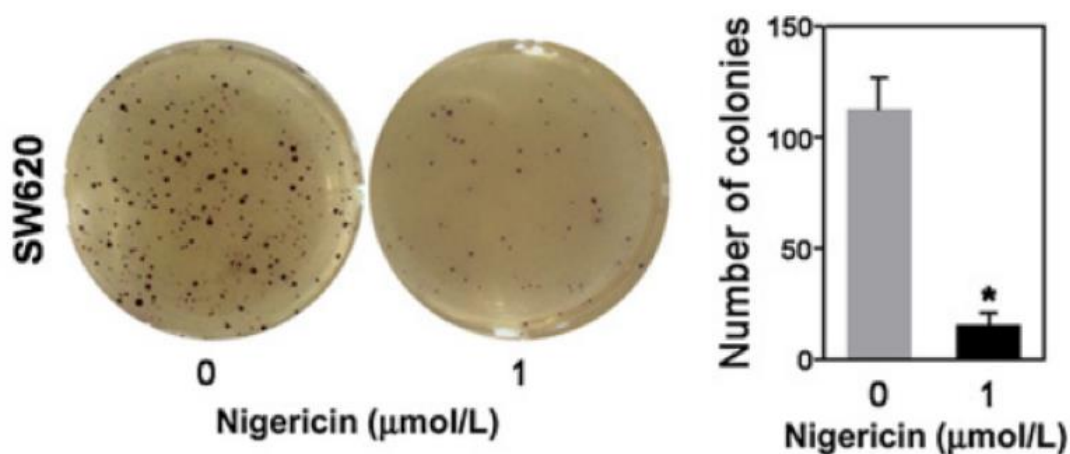
O crescimento das células tumorais foi avaliado por citometria de fluxo e a concentração inibitória 50, que indica a concentração mínima necessária de uma substância no meio para que induza 50% das células à lise ou morte celular, foi feito através de método utilizando do MTT, um teste colorimétrico comumente utilizado em cultura de células para avaliar a viabilidade celular. A citotoxicidade da NIG "in vivo" se mostrou importante contra células S18 de carcinoma nasofaringe inoculadas de forma subcutânea em camundongos, reduzindo significativamente o tumor, porém para células da linhagem S26 foi constatado uma ligeira melhora com o uso de NIG, o uso do agente cisplatina (DDP) foi mais significativo do que a NIG neste grupo, ambos em relação ao controle que continham células tumorais não tratadas (DENG et al, 2013).

2.2.2 ATIVIDADE CONTRA CÉLULAS CANCEROSAS COLORRETAIS HUMANAS E EXPERIMENTAL EM ANIMAIS DE LABORATÓRIO.

Os resultados experimentais em camundongos de estudos realizados por Liu, et.al (2018), avaliando a ação da NIG em linhagens de câncer colorretal SW620 e a KM12 são mostrados nas figuras 3 e figura 4. A diferença entre diferentes níveis de

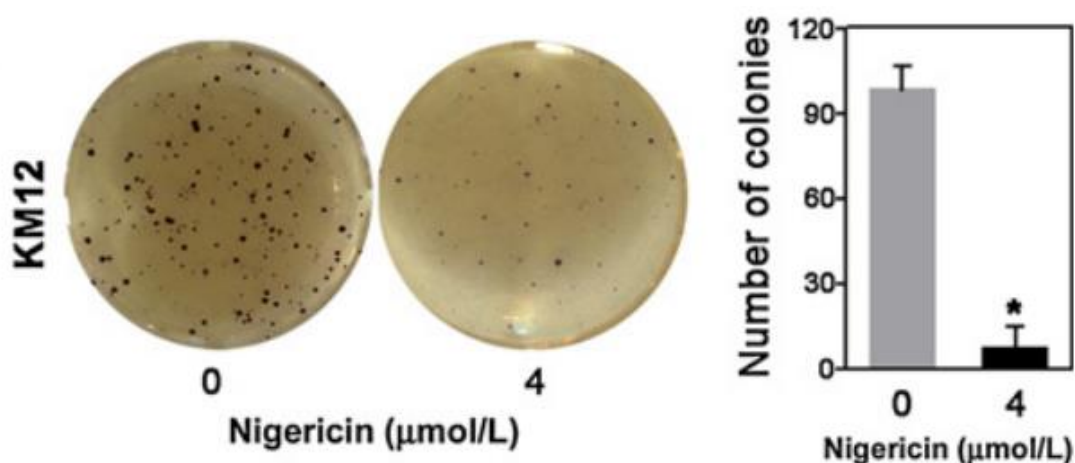
concentração de NIG de 1 $\mu\text{mol/L}$ e 4 $\mu\text{mol/L}$ respectivamente gerou em teste de formação de colônias (*in vitro*), um crescimento significativamente menor se comparado à linhagens que não foram expostas ao ionóforo em questão.

Figura 3. Crescimento da linhagem SW620 de células de tumor colorretal sobre ausência e presença (1 $\mu\text{mol/L}$) de nigericina.



Fonte: Adaptado de LIU, et.al (2018).

Figura 4. Crescimento da linhagem KM12 de células de tumor colorretal sobre ausência e presença (4 $\mu\text{mol/L}$) de nigericina

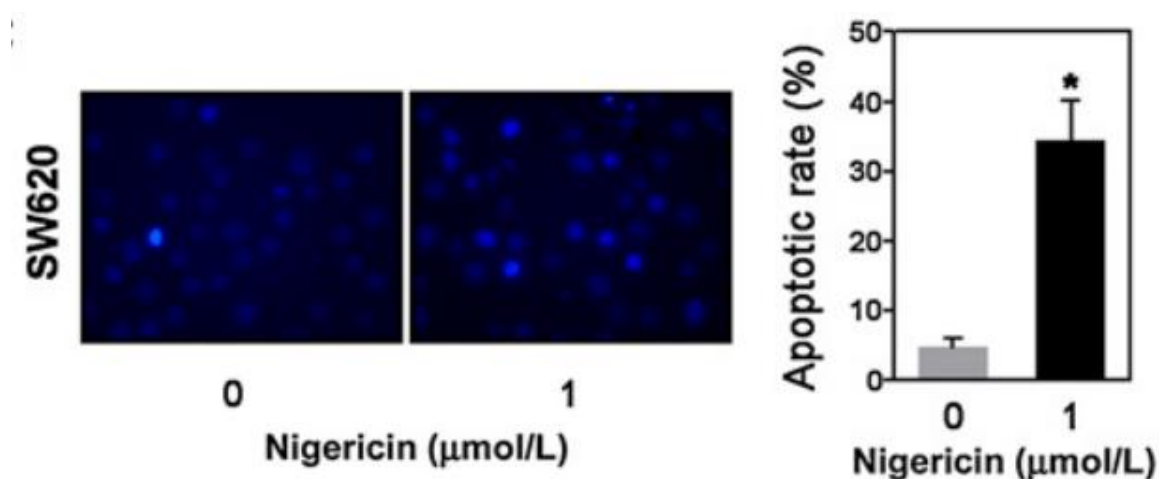


Fonte: Adaptado de LIU, et.al (2018).

Utilizando o corante Hoechst33342, também o estudo identificou que a NIG induziu uma importante atividade apoptótica de ambas as linhagens (SW620 e

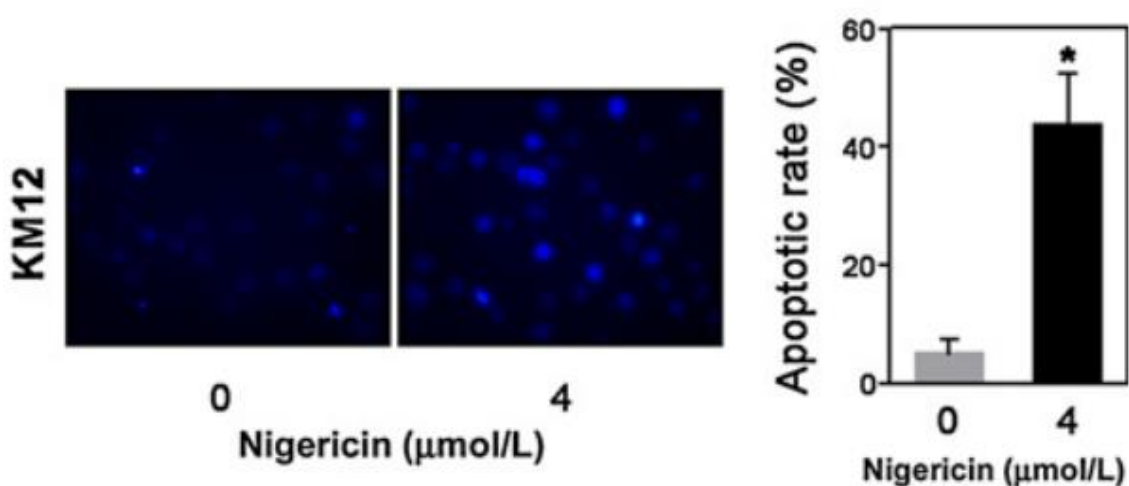
KM12) conforme ilustra as figuras 5 e 6, e se mostrou efetiva “*in vitro*” como agente antitumoral (LIU et al, 2018). Portanto, “*in vitro*”, o resultado se mostrou promissor quanto à ação inibitória de aumento numérico das células de tumores colorretais.

Figura 5. Teste de Apoptose celular usando a linhagem SW620 na ausência e na presença (1 $\mu\text{mol/L}$) de nigericina.



Fonte: LIU, et.al (2018).

Figura 6. Teste de Apoptose celular usando a linhagem KM12 na ausência e na presença (4 $\mu\text{mol/L}$) de nigericina.

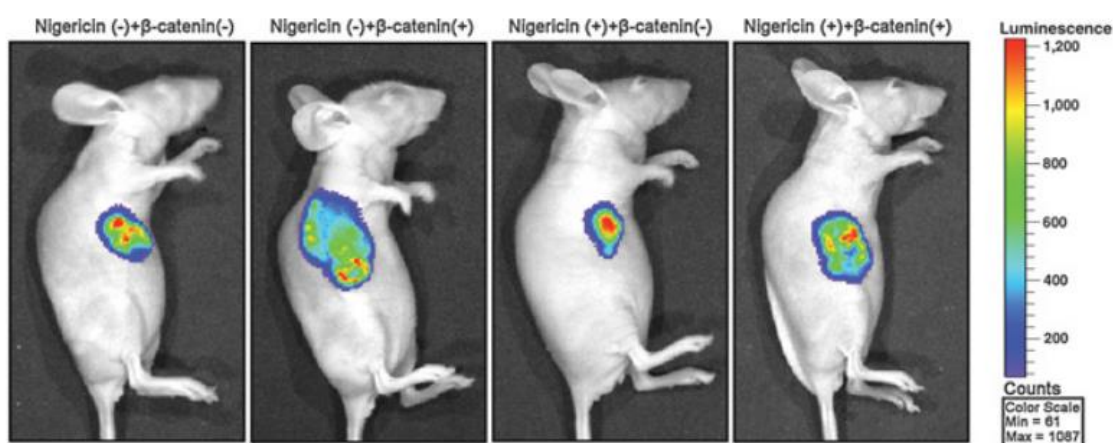


Fonte: LIU, et.al (2018).

O estudo “*in vivo*” injetando em um grupo de camundongos células SW620 controle e em outro grupo de camundongos células β -catenina-superexpressada de SW620 que gera tumores maiores quando comparados às células SW620 controle,

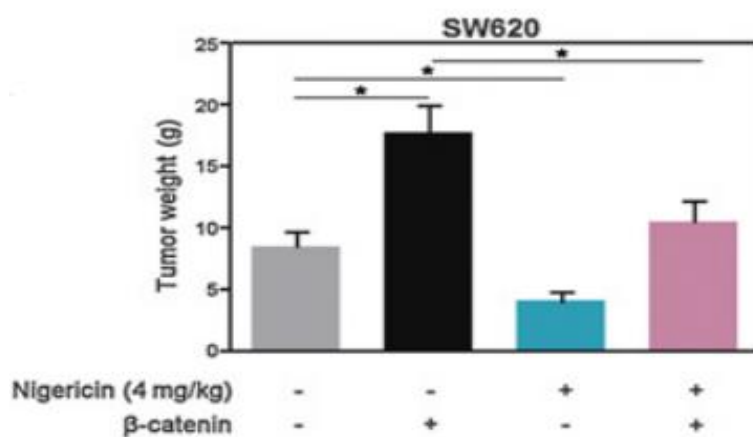
tal como mostrado pela figura 7. O estudo de Liu et al (2018) mostra a injeção de duas linhagens de células (SW620 controle e SW620 β catenina) com NIG nos camundongos de forma subcutânea, sendo que após 4 semanas foi constatado uma diminuição da massa tumoral segundo a figura 8

Figura 7. Inibição causada pela nigericina contra células tumorais do tipo SW620 controle e SW620 com β -catenina injetadas de forma subcutânea, utilizando ensaio de bioluminescência após 4 semanas da inoculação.



Fonte: LIU, et.al (2018).

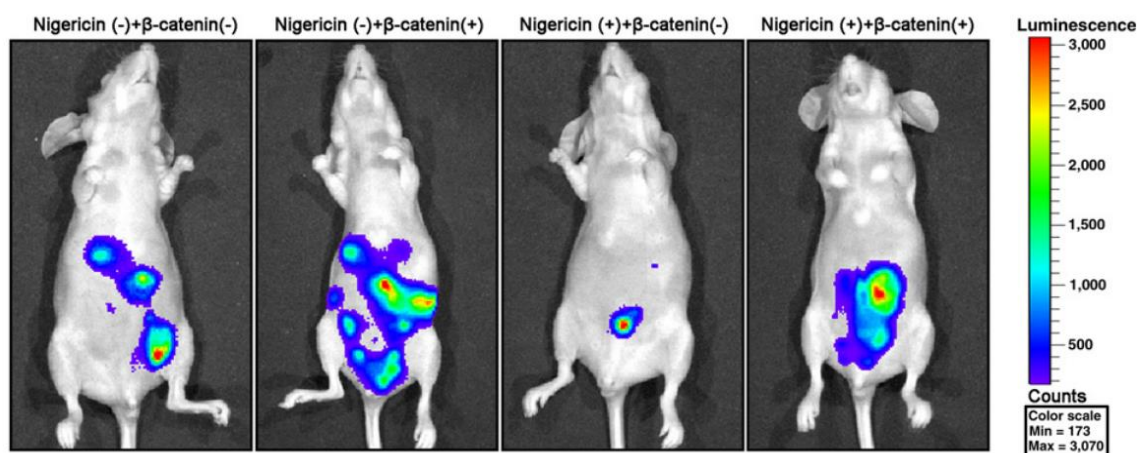
Figura 8. Gráfico de peso das células tumorais na presença e ausência de dois elementos, a nigericina e a β -catenina.



Fonte: LIU, et.al (2018).

Posteriormente foi injetado na cavidade peritoneal células tumorais tratadas e NIG em diferentes concentrações para alguns grupos, sendo que, após 35 dias, com ensaio de bioluminescência, observou-se regressão das células tumorais na cavidade peritoneal dos camundongos tratados com NIG como mostrado pela figura 9 (LIU et al, 2018).

Figura 9. Inibição causada pela nigericina contra células tumorais do tipo SW620 controle e SW620 com β -catenina injetadas na cavidade peritoneal, utilizando ensaio de bioluminescência após 35 dias da inoculação.



Fonte: LIU, et.al (2018).

Com base neste estudo, confirma-se a utilização da NIG como potencial alternativa para tratamento de tumores colorretais, uma vez que se mostrou eficiente não somente *“in vitro”* como *“in vivo”*, além de reduzir significativamente a atividade metastática do superexpressor β -catenina. 7 (LIU et al, 2018).

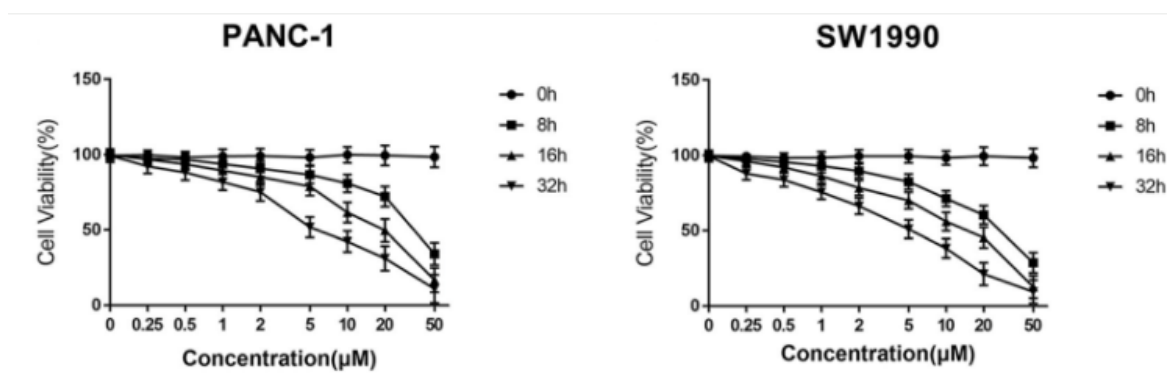
2.2.3 CÉLULAS TUMORAIS DE PÂNCREAS.

Segundo discutido por Xu et al. (2019), a NIG pode inibir o crescimento celular de células cancerígenas de pâncreas devido a uma notável diminuição da viabilidade das células tumorais e um aumento da expressão de determinados circRNAs. No referido estudo, foram utilizadas linhagens de células tumorais de pâncreas (PANC-1 e SW1990), sendo estas cultivadas em meio “Dulbecco’s Modified Eagle” suplementado com soro fetal bovino à 10% a 37°C em incubação

contendo 5% de CO₂, as células estavam em fase de crescimento logarítmico para os experimentos. As células foram colocadas em placa de 96 poços na densidade de 3×10^4 células por poço e encubadas a 37°C por 24 horas. Em diferentes tempos (0, 8, 16 e 32 horas) após a utilização de NIG em diferentes concentrações (0; 0,25; 0,5; 1; 2; 5; 10; 20; e 50 µmol/L), posteriormente as células foram incubadas com 20 µl de uma concentração 5 mg/ml MTT (Sigma, Shanghai, China) por 4 horas a 37 °C e, então, tratadas com 200 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) durante 20 min. Após esse tempo, foi feita a leitura da absorbância com um espectrofotômetro no comprimento de onda de 490nm. Os autores realizaram a análise de sequenciamento de RNA de alto rendimento com o objetivo de analisar a quantidade e a integridade das moléculas de RNA presentes na amostra, para tanto as células foram expostas à NIG (5 µmol/L) durante diferentes períodos (0; 8; 16 e 32 horas). Os equipamentos utilizados para as respectivas análises foram, NanoDrop™ ND-2000 (Thermo Fisher Scientific, Scotts Valley, CA, USA) e Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Os fragmentos de circRNAs foram quantificados e analisados por Shanghai OE Biotech (Shanghai, China), utilizando primers correspondentes à cada circRNA, realizando a análise por RT-PCR para verificar a confiabilidade do sequenciamento de RNA anterior.

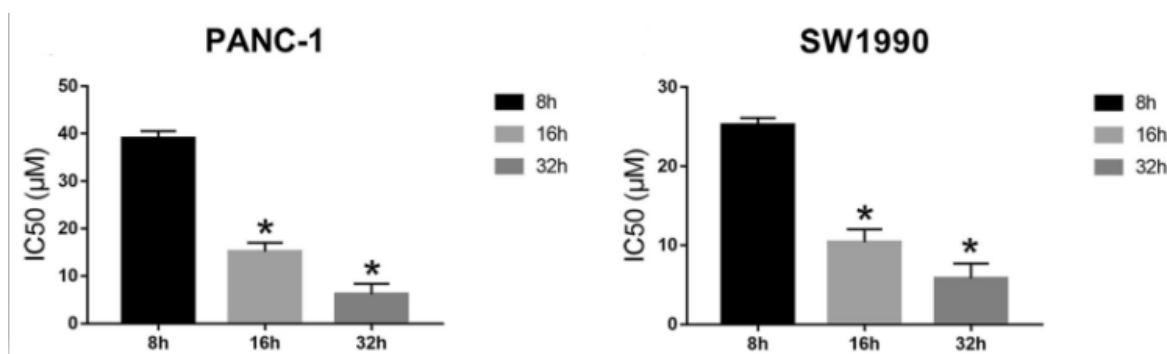
O método utilizado para verificar a proliferação células das células tumorais foi o ensaio de MTT para identificar células viáveis, o estudo identificou uma diminuição na viabilidade celular conforme o aumento do tempo de exposição e conforme a dose de NIG empregada em ambas as linhagens celulares (PANC-1 e SW1990). Segundo demonstrada pela figura 10, concomitantemente Xu et al (2019) fizeram a análise estatística e determinaram concentração inibitória média nos tempos de exposição analisados. Os resultados da análise estática podem ser vista na figura 11, sendo que foi constatado que os resultados são diferentes estatisticamente e, portanto, existe uma diferença notável entre os dados, reforçando a ideia de inibição gerada pela NIG em células tumorais pancreáticas.

Figura 10. Ambos os gráficos de viabilidade celular por concentração de nigericina utilizada evidenciam a diminuição da viabilidade células das células cancerígenas de pâncreas de duas linhagens diferentes (PANC-1 e SW1990), expondo as células a diferentes concentrações de nigericina (0 - 50 μ M) e à diferentes tempos de exposição (0 – 32 Horas), demonstrou que com o aumento da concentração utilizada, houve uma nítida diminuição da viabilidade células em ambas as linhagens tumorais, portanto a nigericina possui atividade contra estas células adaptado de XU, ZHIHUA et al, 2019.



Fonte: XU et al, (2019).

Figura 11. Gráficos de concentração inibitória média por tempo (8; 16 e 32 horas) de exposição à nigericina 5 μ mol/L utilizando as duas linhagens celulares de câncer de pâncreas (PANC-1 e SW1990), evidenciando a inibição causada pela nigericina na viabilidade células das cepas utilizadas ao longo do tempo. (* $P < 0.05$).



Fonte: XU et al, (2019).

Os autores também analisaram por qRT-PCR a expressão e a presença de 183 circRNAs (comuns aos três grupos do experimento), sendo que alguns foram escolhidos ao acaso para identificar se a NIG interfere na expressão dos mesmos, e foi verificado um aumento da expressão dos “*up-regulated*” e diminuição dos circRNAs “*down-regulated*”. Sendo assim, foi razoável afirmar que estes circRNAs

podem participar do mecanismo de dano causado pela NIG às células tumorais PANC-1 e SW1990. (XU; ZHIHUA et al, 2019).

O estudo publicado por Xu et al (2019) identificou um forte indício de que o composto NIG atua diminuindo a viabilidade celular de variantes celulares cancerígenas do tipo PANC-1 e SW1990. Além disso, houve uma relação direta entre a quantidade de amostras utilizadas, como demonstrado na figura 10, juntamente com a análise da influência nos circRNAs, os quais podem ter relação com o mecanismo de dano celular provocado pela NIG nas células tumorais estudadas.

O estudo ainda nos faz concluir que existe uma relação direta entre quantidade e tempo de exposição das células cancerígenas à NIG, observa-se, também, uma redução da viabilidade celular, fornecendo material para o início de novas pesquisas envolvendo a molécula de NIG e células tumorais de pâncreas.

2.2.4 TUMORES PULMONARES

As células tumorais pulmonares humanas são células que apresentam diversas formas distintas de proliferação e estabilização, tornando uma célula com uma resistência múltipla a tratamentos anticâncer, o que dificulta o tratamento. Estas células tumorais pulmonares são referenciadas como células tronco cancerígenas (CSCs) e células semelhantes a células tronco cancerígenas (CSLCs), que possuem uma resistência maior ao processo de quimioterapia convencional e são consideradas as mais preocupantes (YAKISICH,2017).

Recentemente, foi demonstrado que células não-CSCs podem se converter a CSCs ou CSLCs e, portanto, torna os tratamentos direcionados ineficaz, à estas subpopulações de células. Para aumentar a eficácia do tratamento é necessário identificar novas combinações de compostos ou novos medicamentos que tenham a capacidade de atingir um amplo espectro de células cancerígenas das mais variadas subpopulações e principalmente as mais estáveis aos tratamentos (YAKISICH, 2017).

O estudo conduzido por Yakisich et al, (2017) fez uma triagem in vitro com diferentes condições de cultura em células humanas H460 pulmonares

cancerígenas, das quais possuíam três populações que dispõem de diferentes graus de proliferação, resistência e sensibilidade química, de maneira a mimetizar a complexidade e a heterogeneidade do tumor in vivo.

As vias de sinalização *Wingless* que conta com as glicoproteínas Wnt que atuam como ligantes para simular vias de transdução de sinal mediadas por receptores, tanto em vertebrados quanto em invertebrados, como possível via para desenvolvimento de alguns tumores. A ativação destas glicoproteínas gera um efeito modulante no comportamento das células, na sobrevivência e na proliferação das mesmas (MOON, 2005). Portanto a Wnt é reconhecida como uma importante peça no processo de metástase e proliferação das células cancerígenas pulmonares, sendo que essa se mostrou como uma alternativa muito promissora como molécula alvo nos tratamentos preventivos de câncer (YAKISICH, 2017).

O estudo de Yakisich et al, (2017) identificou que a NIG em baixas concentrações molares, na grandeza de nanomolar, tem efeito em caminhos de sinalização importantes para as células cancerígenas. Com isso, a NIG consegue aumentar a fragilidade das células cancerígenas quando administradas conjuntamente com outras drogas tais como digitoxina (DIG) e monod (MD).

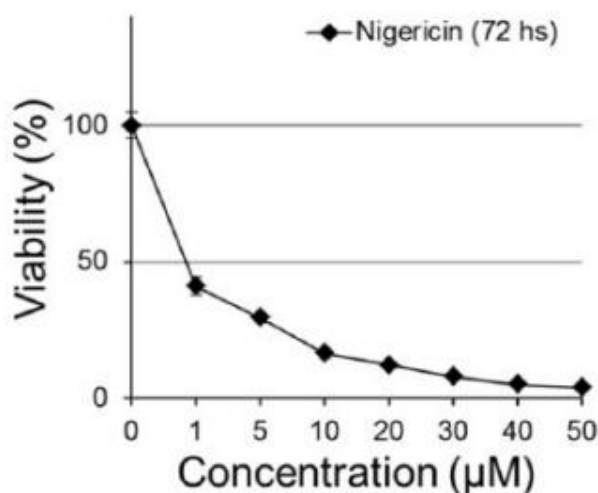
Para avaliar esta combinação entre NIG e GIG ou MD, o estudo de Yakisich et al. (2017) mostra a realização de experimentos in vitro com um grupo tratado somente com NIG à uma concentração de 25mM, e os demais tratados com uma combinação de NIG e DIG (10mM) ou MD (10mM), juntamente com a glicoproteína ativadora Wnt-1 HLY78 (10mM).

A metodologia utilizada para verificar a viabilidade celular foi o ensaio de MTT, o método de contagem de colônia foi feito por ensaio de formação de colônia, para detecção do ciclo celular da célula utilizou-se a citometria de fluxo para a identificação de tumoresferas ou alguma disfunção no ciclo celular, por intermédio de ensaio e análise de migração e de invasão.

A atividade antiproliferativa da NIG, que foi estudada por Yakisich et al (2017), foi confirmada após a verificação da viabilidade celular da linhagem H460. Os resultados são mostrados na figura 12 e reafirmado com o ensaio de unidades

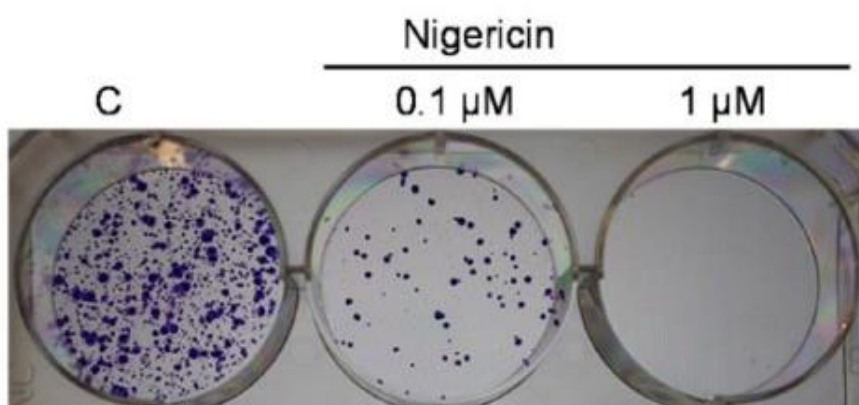
formadoras de colônia mostrado na figura 13. Ambos os experimentos foram feitos sob condições rotineiras de cultura.

Figura 12. Gráfico de viabilidade das células de pulmão tumorais H460 (%) por concentração do antibiótico nigericina ministrado em concentrações crescentes (1-50 μM) e avaliada após 72 horas de exposição, a viabilidade celular foi feita por ensaio de MTT.



Fonte: YAKISICH, JUAN SEBASTIAN et al (2017)

Figura 13. Imagem do ensaio de formação de colônias com as células H460 utilizando um controle negativo sem nigericina e mais dois poços contendo 0,1 μM e 1 μM de nigericina respectivamente durante 72 horas de exposição, o que evidenciou uma forte influência da nigericina na proliferação das células H460 neste período.

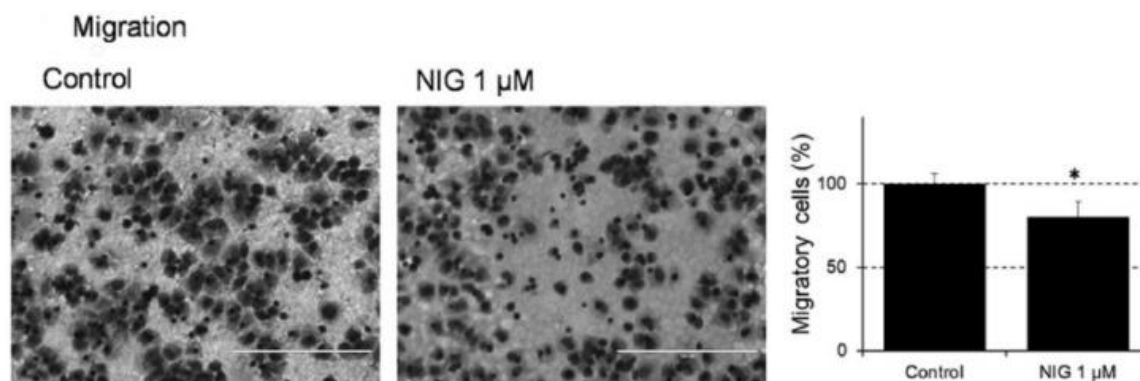


Fonte: YAKISICH, JUAN SEBASTIAN et al (2017)

Os testes de migração e invasão foram feitos sob as mesmas condições normais de cultura e foram avaliados com uma dose 1 μM de NIG, como demonstrado nas figuras 14 e 15 respectivamente, as quais deixaram nítido uma

ação significativa da NIG no impedimento da migração e da invasão respectivamente.

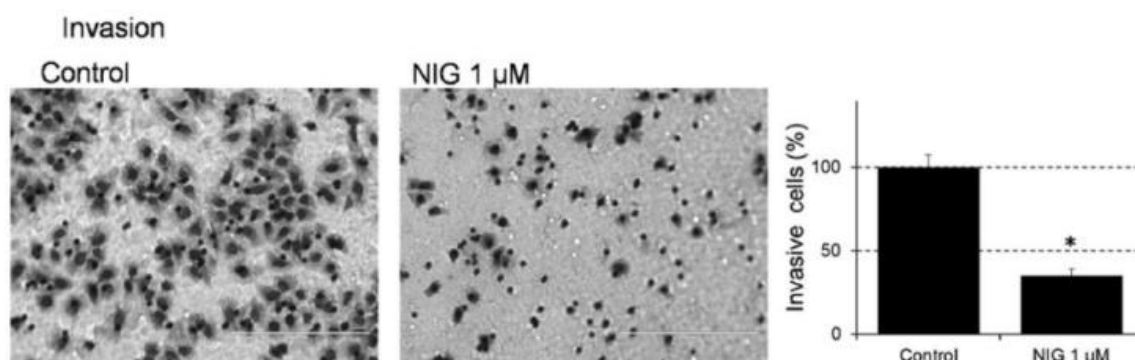
Figura 14. Fotos dos ensaios de Migração celular utilizando a linhagem de células tumorais H460, no grupo controle não havendo nigericina no meio e o segundo contendo nigericina na concentração de $1\mu\text{M}$ e ao lado um gráfico de migração de células (%) nos dois grupos tanto controle quanto contendo nigericina, $*p<0.05$.



Fonte: YAKISICH, JUAN SEBASTIAN et al (2017)

Na figura 14, com análise estatística por teste-t, Yakisich et al (2017) verificou uma diferença entre o grupo controle e o contendo NIG o que deixa claro a influência a sua ação no processo de migração das células tumorais H460.

Figura 15. Fotos do ensaio de Invasão celular utilizando a linhagem de células tumorais H460, em dois grupos, no grupo controle sem nigericina e no segundo grupo contendo nigericina na concentração de $1\mu\text{M}$ e ao lado um gráfico de invasão celular (%) analisado nos dois grupos, tanto no controle quanto no contendo nigericina, $*p<0.05$.

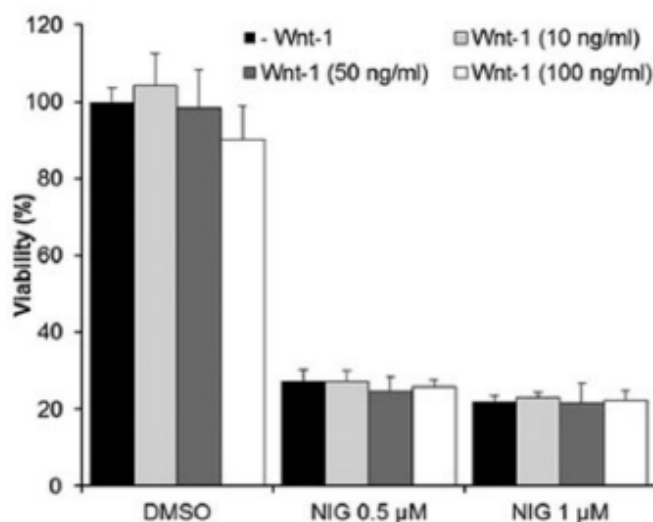


Fonte: YAKISICH, JUAN SEBASTIAN et al (2017)

Na figura 15, com análise estatística por teste-t, Yakisich et al (2017) verificaram uma diferença notável entre a invasão das células H460 no grupo controle e no grupo contendo NIG, evidenciando a sua atuação inibindo o processo de invasão.

Com os resultados obtidos, pôde-se concluir que a NIG potencializa o efeito do ativador Wnt HLY78 e consegue regular negativamente a via de sinalização Wnt que está intimamente relacionada à manutenção das células cancerígenas. Verificou-se, também, que a NIG promove a translocação da molécula de β -catenina para o núcleo e que o Wnt-1 (agonista de Wnt) mas, não afeta a viabilidade celular dos grupos contendo NIG. Nesse caso, não altera o seu efeito segundo demonstrado pela figura 16.

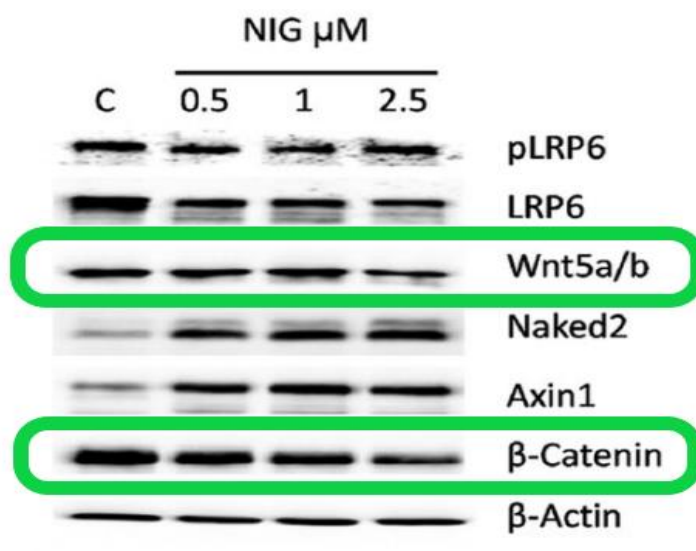
Figura 16. Gráfico em barras da viabilidade das células cancerígenas pulmonares H460 (%) usando múltiplas concentrações de Wnt-1 (0 – 100 ng/mL) nos determinados grupos, sendo o primeiro o grupo controle sem nigericina e os demais com 0,5 μ M e 1 μ M de nigericina, todos com 72 horas de exposição. A viabilidade das células foi determinada por ensaio de MTT.



Fonte: YAKISICH, JUAN SEBASTIAN et al (2017)

Para analisar a influência da NIG na molécula de β -catenina e na inibição da Wnt, foi realizado uma análise de eletroforese SDS-PAGE e a detecção das moléculas com anticorpos específicos por *immunoblotting* e o resultado mostrado na figura 17.

Figura 17. Foto tirada do gel SDS-PAGE com *immunoblotting* contendo as moléculas analisadas nas células tumorais H460, nas amostras contendo o grupo controle (tratado apenas com DMSO 0.0005%) e dos grupos contendo concentrações crescentes de nigericina (0,5 μ M ; 1 μ M ; 2,5 μ M).

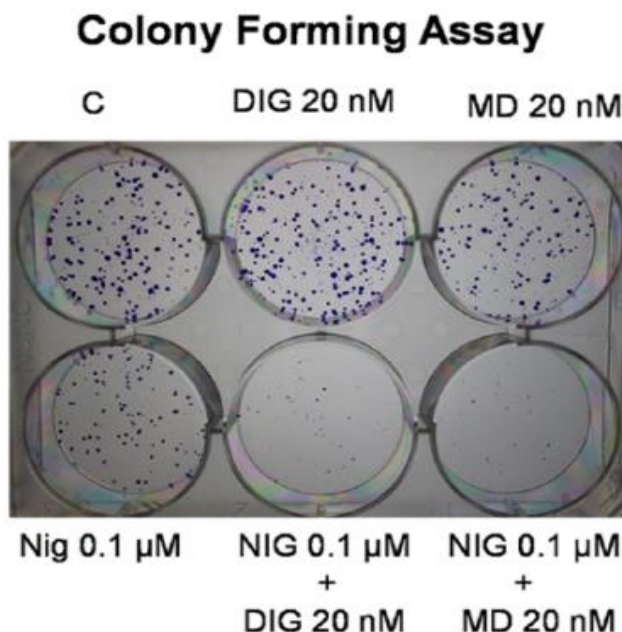


Fonte: YAKISICH, JUAN SEBASTIAN et al (2017)

O estudo conseguiu inferir qualitativamente que, conforme a concentração de NIG utilizada é aumentada, a faixa da molécula de β -catenina fica mais estreita, então é possível inferir que a molécula de NIG faz a translocação da molécula para o núcleo e que houve uma regulação negativa na glicoproteína Wnt. Tal resultado é demonstrado na figura 15.

Yakisich et al. (2017) puderam identificar que em presença concomitante de MD e DIG com NIG intensificou de forma significativa a propriedade antiproliferante. Tal resultado foi constatado através de ensaios de formação de colônias, sendo demonstrado na figura 18.

Figura 18. Ensaio de formação de colônias feito com células tumorais humanas H460 utilizando controle com DMSO apenas, MD, DIG e nigericina, amostras individuais e conjugadas de nigericina com DIG ou MD nas concentrações de 0,1 μ M; 20 nM e 20nM respectivamente.



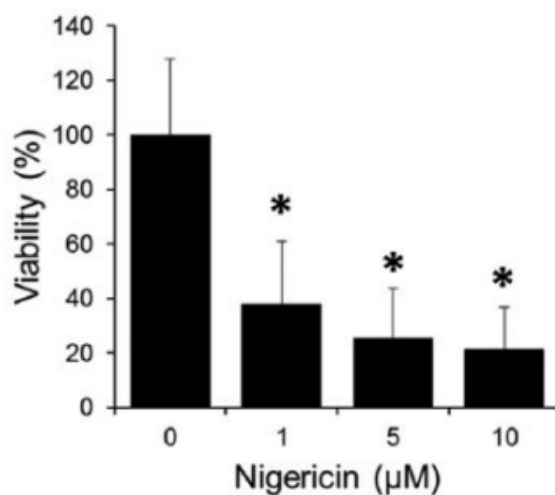
Fonte: YAKISICH, JUAN SEBASTIAN et al (2017)

Como demonstrado por Yakisich et al, (2017) qualitativamente, houve uma diminuição significativa e bem expressiva na formação de colônias das células tumorais, quando utilizado em conjunto com uma das drogas supracitadas. Com isso, a NIG, quando usada em associação à outras drogas, tem um poder antiproliferativo aumentado.

Em paralelo, confirmou-se que a atividade da NIG contra o aparecimento de tumoresferas de células pulmonares cancerígenas, como demonstrado na figura 19 feito por Yakisich et al, (2017). Nessa figura é possível identificar a diferença na viabilidade das células tumorais em formato de tumoresferas segundo as concentrações de NIG empregada em cada uma das amostras, sendo o grupo controle negativo e os demais com concentrações de 1; 5 e 10 μ M de NIG e se mostraram serem estatisticamente diferentes. O método analítico utilizado é o contador de células kit-8, para verificar a associação com outras drogas sendo validado a NIG na concentração de 0,5 μ M com MD ou DIG em 20 nM, sendo os resultados demonstrados na figura 20 retirado de Yakisich et al, 2017. Com isso, é possível verificar que houve uma diminuição estatisticamente significativa na

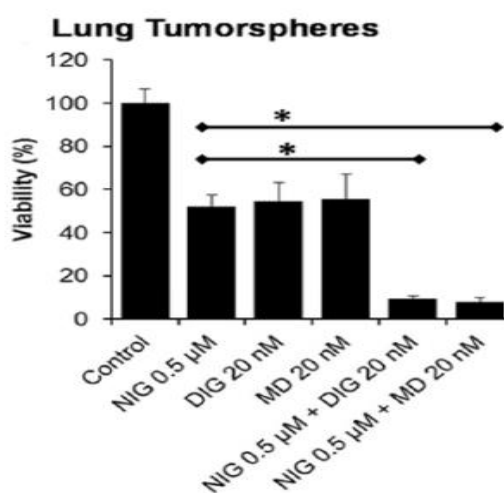
formação de tumoresferas, o que torna esta associação muito promissora em um futuro desenvolvimento de anticancerígenos

Figura 19. Gráfico em barras de viabilidade celular de células cancerígenas de pulmão H460 por amostra contendo concentrações crescentes de nigericina (1-10 μM) utilizando o método contagem de células kit-8, * $p < 0.05$.



Fonte: YAKISICH, JUAN SEBASTIAN et al (2017)

Figura 20. Gráfico em barras da viabilidade células de células tumorais de pulmão humano linhagem H460, por amostra contendo as drogas de forma independente e a associação de nigericina (NIG) e MonoD (MD) ou Digitoxina (DIG) nas concentrações de 0,5 μM e 20 nM respectivamente, a viabilidade das tumoresferas foi medida utilizando o ensaio de contagem de células K-8, retirado * $p < 0.05$.



Fonte: YAKISICH, JUAN SEBASTIAN et al (2017)

Por fim, nesse estudo se pôde concluir que a NIG diminui a viabilidade de células cancerígenas, inibe a expansão das mesmas e reduz a resistência que estas células têm a tratamentos com outras drogas testadas (MD e DIG). Também foi identificado uma influência negativa na expressão de glicoproteínas (Wnt), as quais estão intimamente relacionadas aos processos de resistência; de tumorigênese e metástase (invasão ou migração). O estudo sugere que o efeito principal da nigericina como inibidora tumoral é devido à translocação da Wnt para o núcleo, evitando que a célula tumoral tenha um estímulo químico para se propagar e se desenvolver (Yakisich et al 2017).

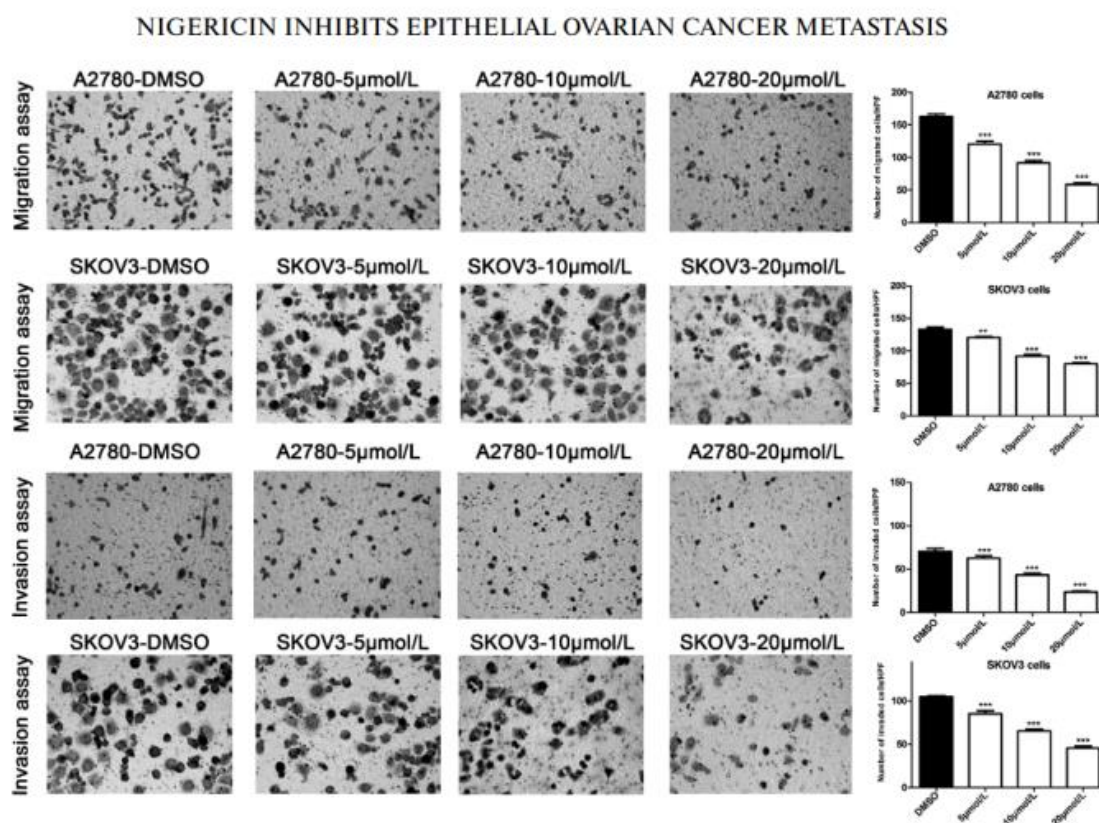
2.2.5 CÂNCER DE OVÁRIO

O objetivo do estudo conduzido por Wang e Zhao et al, (2017) foi identificar se a molécula de NIG consegue inibir células epiteliais cancerígenas de ovário de se proliferar; invadir e migrar. Além disso, elucidar uma possível rota do efeito inibitório. Os experimentos contemplaram os ensaios de proliferação celular por meio contagem de células kit-8 (CCK-8). Para a análise de ciclo celular das linhagens de células tumorais A2780 e SKOV3, foi feita a tripsinização, depois foi realizada três lavagens com PBS, fixada com etanol 70% e deixada durante a noite. O ciclo celular foi analisado usando RNase e Iodeto de propídio (PI), para coloração.

A avaliação de apoptose foi realizada por citometria de fluxo e medida pelo kit de detecção de apoptose Annexin V-FITC/PI (APOAF-20TST; Sigma, USA). O ensaio de migração e invasão foram feitos, sendo o primeiro em câmaras de Boyden com poro de 8 µm filtros (Corning, EUA) e segundo (ensaio de invasão celular) feito na parte superior da câmara, pré-revestida com Matrigel (BD, EUA). Testes de análise Westblot de população (SP), ensaios de imunofluorescência e luciferase para completar os métodos utilizados. Dessa forma esse estudo conduzido com NIG diminui a viabilidade celular das células cancerígenas das linhagens de células tumorais A2780 e SKOV3, inibindo a proliferação e induzindo a interrupção do ciclo celular nas células EOC. A NIG se mostrou efetiva na inibição do crescimento das EOCs, houve uma visível diferença entre as amostras e uma relação quanto à dose da NIG utilizada nas amostras, sendo esta diretamente proporcional ao efeito

inibitório do crescimento e inversamente proporcional à viabilidade celular. Tal resultado demonstra que a NIG possui uma forte ação tóxica para as células tumorais estudadas, tal como demonstrado na figura 21.

Figura 21. Ensaios de migração e invasão feitos por ensaio de câmara de Boyden usando NIG em células EOCs das linhagens A2780 e SKOV3 com o uso de amostras controle contendo DMSO e amostras contendo NIG em concentrações crescentes (5–20µmol/L), efeito inibitório observado qualitativamente nas imagens e quantitativamente nos respectivos gráficos à direita com teste estático demonstrando a diferença significativa entre os grupos, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

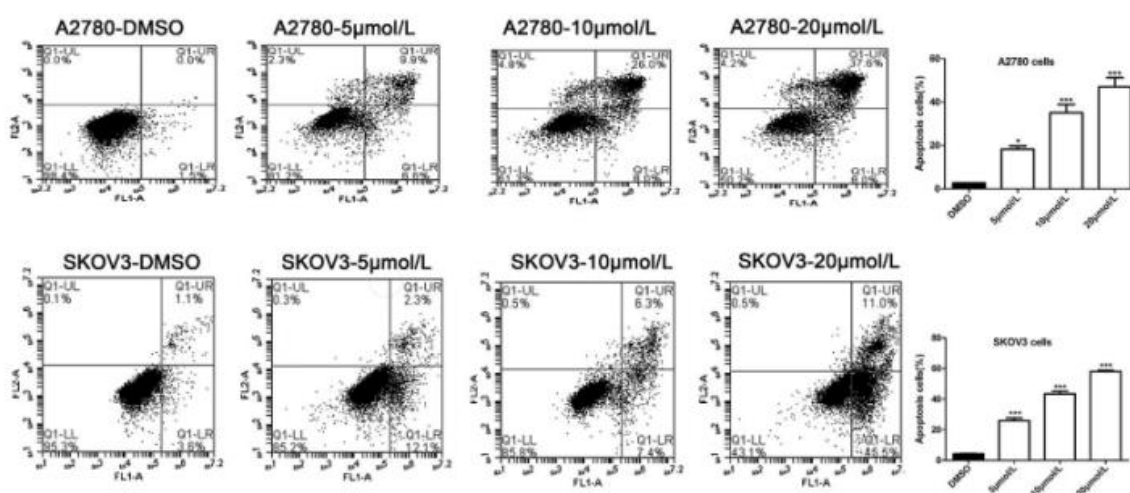


Fonte: WANG; ZHAO et al, (2017)

Na segunda parte do trabalho foi estudada a indução de apoptose das células EOCs devido a ação da nigericina. Os testes que foram feitos com annexin V mostrou que, conforme o aumento da concentração de NIG, houve um aumento da porcentagem de células positivas para annexin V. Este resultado indica que houve uma indução de apoptose promovida pela NIG, tal como visualizado na figura 22. Em concordância, Wang et al realizaram um Western blot para detectar as proteínas relacionadas com o quadro de apoptose, tais como Bax, Bcl-2, caspase-3 e PRAP.

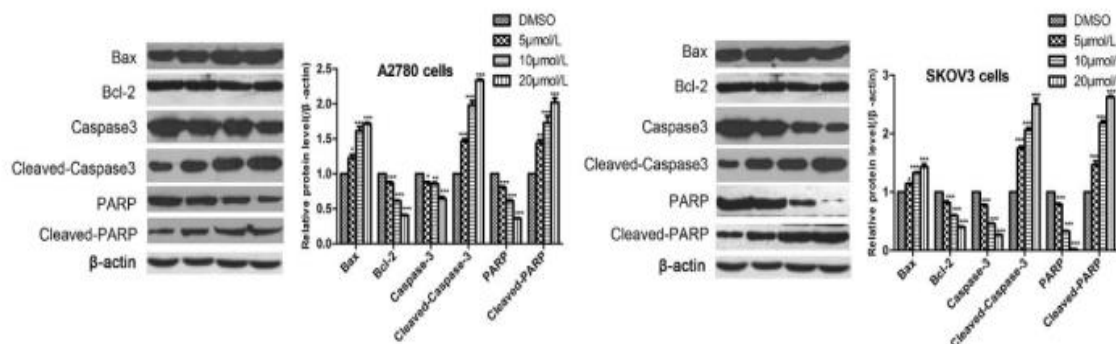
Os resultados são mostrados na figura 23, sendo detectado que as proteínas caspase-3, Bcl-2 e PRAP tiveram a expressão suprimida, Bax e as moléculas clivadas de PRAP e caspase se apresentaram em maior concentração nos ensaios, tanto com células A2780 quanto em células SKOV3. Portanto, juntando ambas as informações Wang et.al. (2017) concluíram que houve apoptose de ambas as linhagens celulares tumorais de ovário.

Figura 22. Gráficos de tamanho de células tumorais das linhagens A2780 e SKOV3 por complexidade e à direita dois gráficos de barras de apoptose por amostra utilizada, foram utilizadas concentrações crescentes de NIG (5-20 μ M) e DMOS para o controle durante 48 horas de exposição e fixadas com solução de PI/Annexin V-FITC e detectado em citometria de fluxo, células em estágio inicial de apoptose (baixo-direita) Annexin V+/PI–, células em estágio tardio de apoptose (cima-direita) Annexin V+/PI+, células sobreviventes (baixo-esquerda) Annexin V–/PI– e células consideradas em necrose (cima-esquerda) Annexin V–/PI+.



Fonte: WANG; ZHAO et al, (2017)

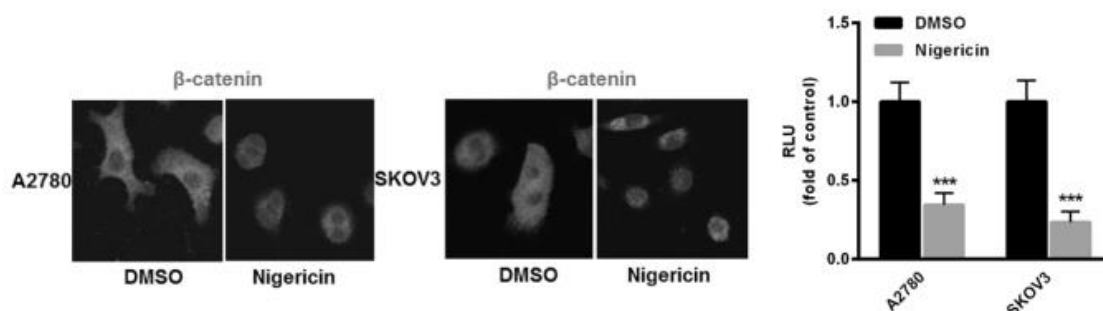
Figura 23. Combinação de Gráfico em barras de nível de expressão por proteínas chave relacionadas com o processo apoptótico, analisadas por Western blot em ambas as linhagens de células tumorais (A2780 e SKOV3) com o uso de um controle contendo DMSO e três amostras contendo concentrações crescentes de NIG (5-20 μ M), e uma foto da técnica de Western blot contendo a indicação de cada molécula para análise qualitativa, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.



Fonte: WANG; ZHAO et al, (2017)

O estudo de Wang et al, (2017) demonstrou que a molécula de NIG afetou a transição epitélio-mesenquimal (EMT), que é de suma importância para que a metástase ocorra em células EOC. Através de análise da expressão identificou proteínas chaves como o marcador de células epiteliais E-caderina, as expressões do marcador celular vimentina e dos fatores de transcrição *Slug*, *Snail*, e *Twist*, identificados por western blot e por ensaio de Imunofluorescência. Os resultados, constata um aumento da expressão da E-caderina, uma diminuição tanto do marcador vimentina, *slug*, *snail* e *twist*, o que segundo o artigo sugere que NIG inibe o processo de EMT e, portanto, possui uma ação significativa no controle da metástase de células EOC. Outra via tumorigenica explorada por esse estudo foi a da “*Wnt/β-catenin signaling pathway*”, sendo que os fatores de transcrição supracitados como *slug* e *snail* são estimulados por esta via de β-catenina para induzir a EMT e, portanto, favorecer o processo de metástase. No estudo a β-catenina foi marcada e analisada por Imunofluorescência, demonstrando que, ao ser utilizado NIG, houve uma diminuição da via “*Wnt/β-catenin signaling pathway*”. Essa constatação significa que a molécula citada pode inibir essa via suprimindo a EMT em células EOC, tal como demonstra a figura 24.

Figura 24. Foto do ensaio de Imunofluorescência evidenciando a redução da via “*Wnt/β-catenin signaling pathway*” em duas amostras, a primeira contendo DMSO e segunda contendo NIG. À direita um gráfico do ensaio de luciferase mostra a inibição causada por NIG na via “*Wnt/β-catenin signaling pathway*”, ambos os ensaios feitos utilizando as linhagens tumorais A2780 e SKOV3, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.



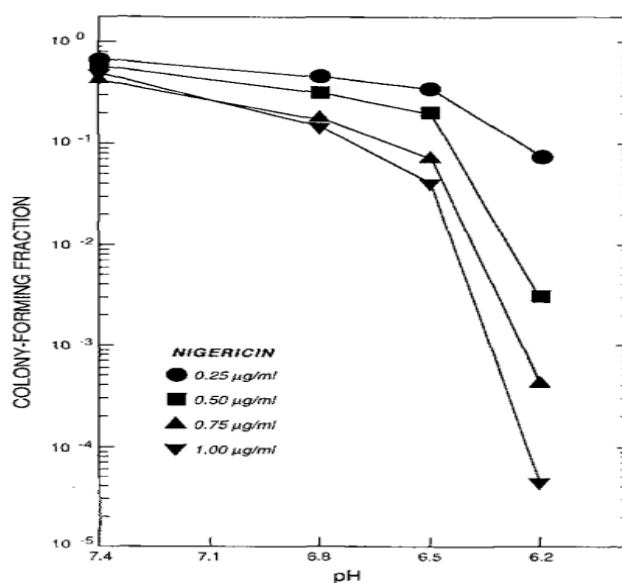
Fonte: WANG; ZHAO et al, (2017)

Portanto, no referido artigo pôde inferir que a molécula de NIG pode inibir o processo de EMT, durante o processo de metástase, a invasão celular das linhagens, por meio da indução de apoptose, e a interrupção do ciclo celular. Também propõe que a molécula de NIG possa se tornar uma importante ferramenta estratégica na terapia de pacientes que possam vir a desenvolver o quadro de metástase de células EOC. (WANG et al 2017).

2.2.6 CARCINOMA DE MAMA

O estudo experimental com ratos, realizado por Jähde et al (1989), teve como objetivo avaliar se a NIG pode ser usada para potencializar o efeito citotóxico de mafosfamida (MAFO; um precursor da ciclofosfamida "ativada") em carcinoma mamário de rato (MIR), analisando em diferentes condições de pH (7,4; 6,8; 6,5; 6,3). O estudo identificou que a NIG, que é um importante mediador de íons H^+ para o interior da célula, pode atuar acentuando o efeito citotóxico em meios em que o pH externo à célula é menor que 7, sendo menos efetivo quando o meio externo está com o pH mais próximo à 7. Inicialmente, fez a verificação do potencial inibitório da NIG através do ensaio de formação de colônias de células tumorais de rato linhagem M1R como mostra na figura 25.

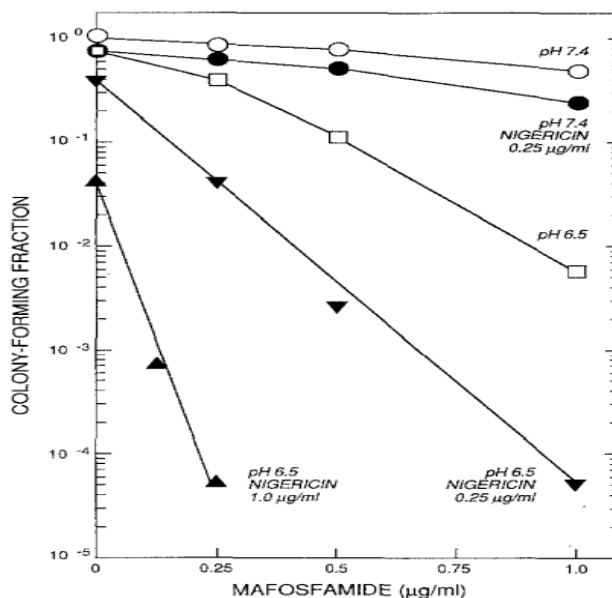
Figura 25. Gráfico de fração formadora de colônias (CFF) por pH utilizando quatro diferentes concentrações de nigericina em baixas concentrações (0,25-1,0 µg/ml), evidencia o efeito da nigericina na formação de colônia de célula tumoral da linhagem M1R em função do pH externo à célula.



Fonte: JÄHDE et al, (1989)

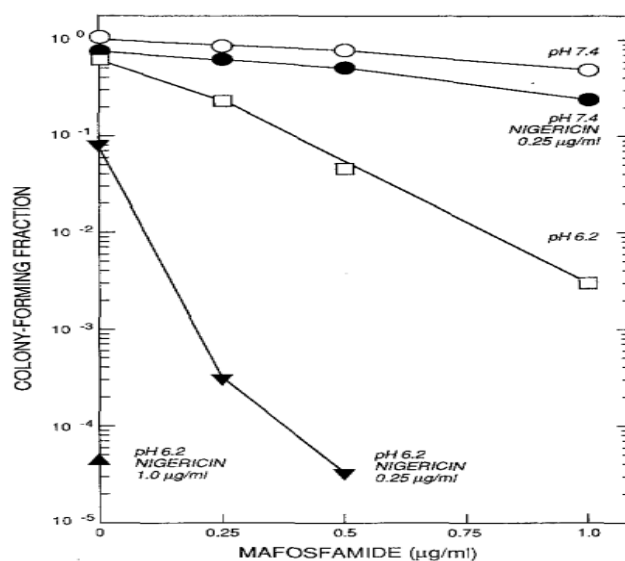
Foi demonstrado que, em meios de pH próximo à 7,4, a NIG não possui maiores efeitos na proliferação celular, já nos demais valores de pH houve uma diferença significativa na diminuição de unidades formadora de colônias, indicando que a molécula consegue reduzir a formação de colônias de células tumorais da linhagem M1R. Então o estudo conduzido por Jähde et al, (1989) mostra o experimento utilizando o NIG para verificar se o efeito modulador e pode aumentar a citotoxicidade do agente alquilante utilizado (MAFO). O agente utilizado MAFO, em soluções aquosas sofre hidrólise liberando 4-hidroxíciclofosfamida (uma substância sabidamente citotóxica) que, quando usado junto à NIG, mostrou um maior potencial citotóxico nas células M1R. Esses resultados são mostrados nas figuras 26 e 27, ambas por contraste analisando os pH's externos (do meio) de 6,5 e 6,2 respectivamente com o de 7,4, a fim de esclarecer a diferença significativa que o pH externo faz na ação da citotoxicidade das moléculas quando usadas juntas.

Figura 26: Gráfico de fração formadora de colônia por concentração de Mafosfamida em $\mu\text{g/ml}$ (MAFO), utilizando MAFO conjugado com nigericina nas concentrações 0,25 $\mu\text{g/ml}$ ou 1,0 $\mu\text{g/ml}$ em dois pHs diferentes (7,4 e 6,5), testando o potencial causado pela nigericina na diminuição da formação de colônias de células tumorais da linhagem M1R.



Fonte: JÄHDE et al, (1989)

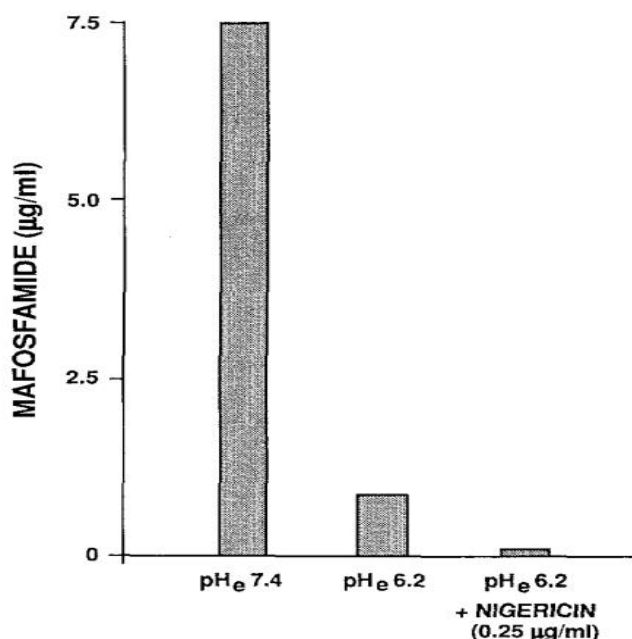
Figura 27: Gráfico de fração formadora de colônia por concentração de Mafosfamida em $\mu\text{g/ml}$ (MAFO), utilizando MAFO conjugado com nigericina nas concentrações 0,25 $\mu\text{g/ml}$ ou 1,0 $\mu\text{g/ml}$ em dois pHs diferentes (7,4 e 6,2), testando o potencial causado pela nigericina na diminuição da formação de colônias de células tumorais da linhagem M1R.



Fonte: JÄHDE et al, (1989)

O estudo demonstrou então uma diminuição da dose de MAFO necessária para se ter o mesmo efeito citotóxico, quando for utilizado conjuntamente com NIG. Em um experimento para obter uma citotoxicidade de aproximadamente 99% (IC₉₉) utilizando somente MAFO, foi necessária uma concentração de 7,5 µg/ml. Em um outro teste em que o MAFO foi utilizado juntamente com NIG à 0,25 µg/ml, houve uma redução na dose necessária para obter o mesmo efeito, necessitando de apenas 0,8 µg/ml em pH externo de 6,2. O que representou um aumento de 8 vezes do potencial citotóxico do MAFO, como demonstrado pela figura 28.

Figura 28: Gráfico em barras da concentração de Mafosfamida (MAFO, em µg/ml) por amostra em dois pHs 7,4 ou 6,2, com ou sem nigericina (0,25 µg/ml), as barras representam a concentração de MAFO necessária para reduzir CFF de células M1R para 0,01 do valor controle



Fonte: JÄHDE et al, (1989)

Para obter sucesso na supressão das células M1R, o estudo identificou a necessidade de diminuir o pH do meio e utilizar a NIG devido sua propriedade moduladora de íons H⁺/K⁺ que irá neutralizar o mecanismo de transporte dos íons H⁺ pela membrana da célula tumoral causando uma diminuição da fração formadora de colônia, reduzindo a expansão das células tumorais M1R e potencializando o efeito citotóxico do MAFO, reduzindo assim a quantidade de MAFO utilizado para se

chegar a um mesmo efeito. Embora em pH's de caráter ácido a NIG sozinha tem se mostrado um forte agente citotóxico, a combinação de MAFO e NIG demonstrou que, mesmo em baixas concentrações e nos mesmos pH's o efeito citotóxico, possui efeito nas células cancerígenas estudadas. Portanto, a NIG como um ionóforo pode ser usado para modular o pH interno da célula tumoral, aumentando assim a citotoxicidade de drogas alquilantes, tais como MAFO, em células de tumorais, mais precisamente, neste estudo, a linhagem M1R. (JÄHDE et al, 1989).

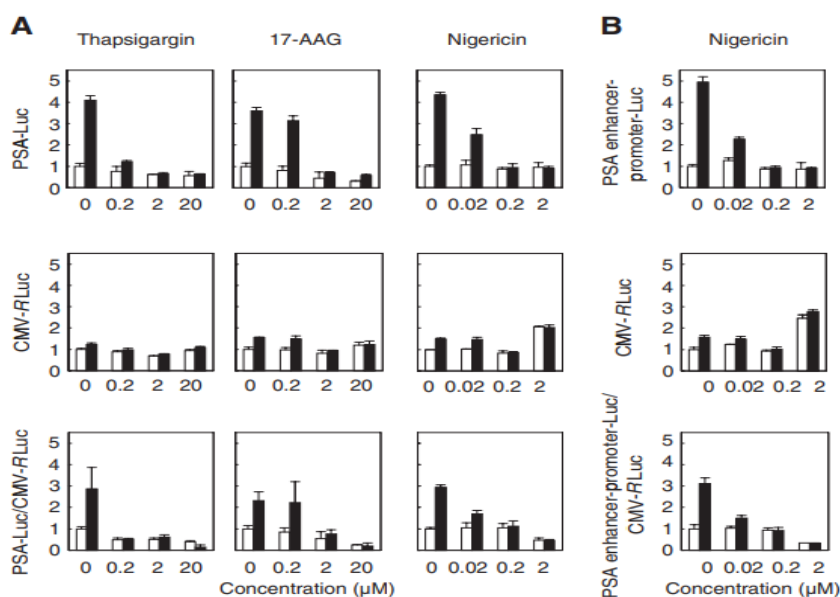
2.2.7 CÂNCER DE PRÓSTATA

O objetivo do estudo experimental in vitro de Mashima et al (2010) foi analisar se a molécula de NIG mimetiza o “*knockdown*” de isoformas do receptor andrógeno (RA) e, portanto, consegue evitar mutações do RA em células de câncer prostático resistentes à hormônios (HRPC), reduzindo inclusive a expressão das moléculas de RA truncadas e inteiras, suprimindo o crescimento do tumor prostático HRPC. A molécula de RA é uma importante peça na expansão do HRPC e, por isso, moléculas cujo alvo de bloqueio ou corte, podem gerar grandes benefícios para o tratamento deste tipo de câncer. As células HRPC frequentemente desenvolvem novas mutações do receptor andrógeno, o que pode tornar a célula capaz de crescer sem a dependência do RA ou com mecanismos de resistência à moléculas que possuem como alvo o RA. Salienta-se que existem estratégias farmacológicas para evitar esse tipo de mutação.

Na revisão bibliográfica feita por Mashima et al (2010), foi relatada a NIG como molécula capaz de inibir a ativação do promotor do antígeno prostático específico (PSA), por meio da mediação exercida por RA e, conseqüentemente, a inibição da produção do PSA em células tumorais prostáticas. Com isso, o presente estudo examinou o efeito causado pela molécula de NIG ao crescimento de células prostáticas cancerígenas, tanto RA dependentes quanto independente. Linhas celulares utilizadas foram LNCaP [AR(T877A)-positivo, andrógeno dependente]; 22Rv1 [AR(H874Y, exon 3 duplicado) e tAR-positivo, andrógeno-independente]; PC-3, e DU145 (AR-negativo, andrógeno-independente). A análise de ciclo celular feita por citometria de fluxo após cada tratamento células viáveis foram contadas por Sysmex. O RNA total foi transformado por transcriptase reversa em cDNA e usado

em reação PCR para ampliar fragmentos de DNA para AR e PSA. Nos resultados da utilização de NIG em células 22Rv1, nas concentrações superiores à 20nM, observou-se que houve repressão à indução dependente de andrógeno causada pelo PSA, porém não houve efeito na atividade do promotor CMV conforme mostra a figura 29. Em seguida, examinado o efeito causado pela NIG na expressão da molécula de andrógeno-dependente do PSA endógeno em células de câncer de próstata da linhagem LNCaP, a qual expressa o RA completo, foi usada a linhagem LNCaP ao invés da 22Rv1, devido à baixa e tardia expressão da proteína endógena de PSA.

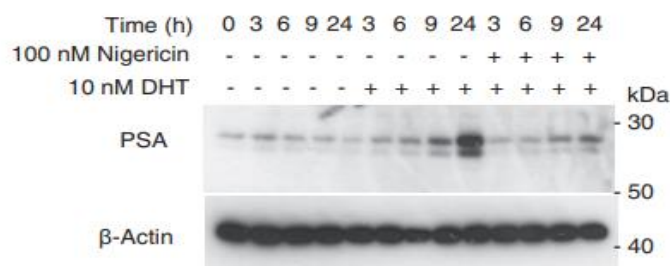
Figura 29. Gráficos da supressão dos promotor ativado de PSA andrógeno-dependente por nigericina em células 22Rv1. As quais foram transfectadas com promotores PSA-Luc e CMV-RLuc e tratados com concentrações crescentes (0,2-20 μ M) de thapsigargin, 17-AAG ou nigericina em ausência (□) ou na presença (■) de 1 nM DHT durante 24 horas de exposição.



Fonte: retirado de Mashima et al, (2010).

Como mostrado na figura 30, a NIG foi efetiva na atenuação da produção de PSA dependente de DHT ao longo do tempo e no aumento de dose da mesma.

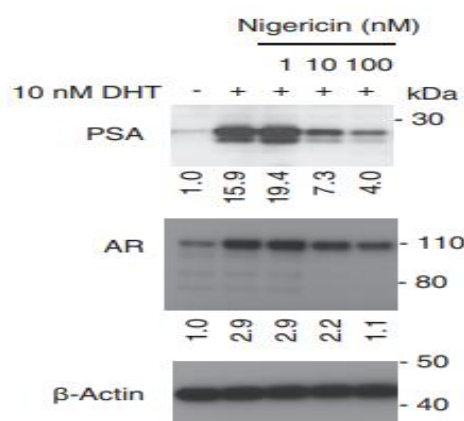
Figura 30. Supressão da produção de PSA androgênio-dependente durante um período de exposição (entre 0-24 horas) e contendo ou não doses de DHT (10 nM) e de Nigericina (100 nM) em células tumorais da linhagem LNCaP.



Fonte: retirado de Mashima et al, (2010).

Células LNCaP tem uma mutação específica no RA, nomeada T877A, mutação esta que confere à linhagem LNCaP resistência à flutamina. Portanto a NIG se mostrou efetiva contra variantes celulares das quais o RA possui resistência à flutamina. Em concordância, diminuiu os níveis da proteína RA, mesmo sob presença do promotor DHT conforme demonstrado na figura 31. Tal resultado indica que o fator inibitório causado pela NIG pode não ser causado pela incorporação do RA em células LNCaP.

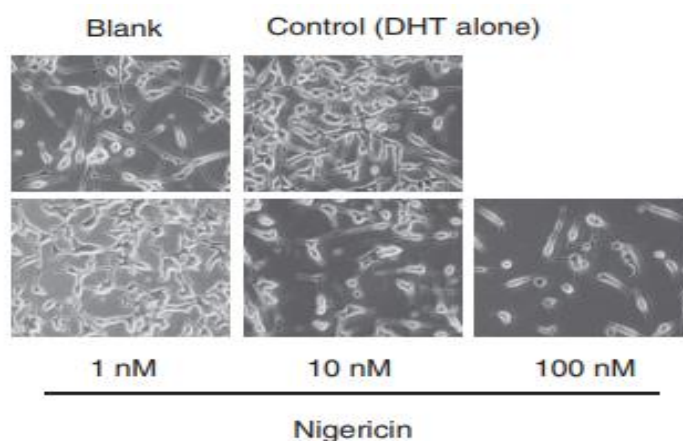
Figura 31. Supressão da produção de PSA andrógeno-dependente durante 24 horas, usando ou não DHT (10 nM) com controles positivos e negativos e três amostras contendo concentrações crescentes de nigericina (1-100 nM) em células tumorais da linhagem LNCaP.



Fonte: retirado de Mashima et al, (2010).

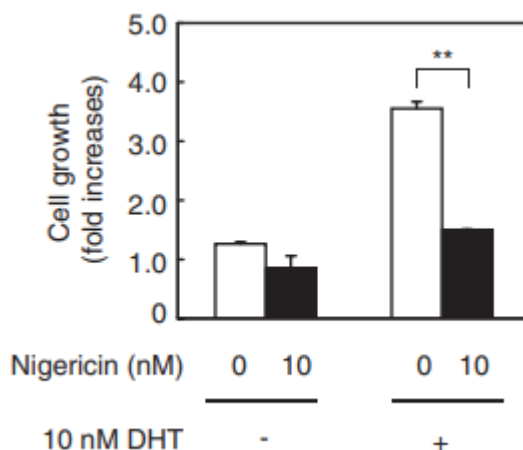
O estudo de experimental in vitro Mashima et al (2010) detectou uma inibição eficiente do crescimento das células LNCaP DHT-dependentes nas amostras com NIG nas concentrações de 10 e 100 nM como demonstra a figura 32. Os resultados mostram que esse mesmo fator inibitório não foi significante diferente em células LNCaP sem DHT, tal como pode ser visto na figura 33. Esse resultado indica que a molécula de NIG diminui a transcrição de RA - dependente e inibiu o crescimento de células de tumor prostático andrógeno-dependentes.

Figura 32. Imagem de células LNCaP tratadas com DHT (10 nM) e três amostras com concentrações crescentes de nigericina (1-100 nM) durante 5 dias.



Fonte: retirado de Mashima et al, (2010).

Figura 33. Gráfico de barras do crescimento celular de células da linhagem LNCaP na ausência ou na presença de andrógeno, foram tratadas com DHT (0 ou 10 nM) e na ausência ou na presença de nigericina na concentração de 10 nM durante 3 dias , assim como realizado teste estatístico (teste bicaudal, teste t) entre as amostras, adaptado de Mashima et al, 2010; ** $p < 0.01$.

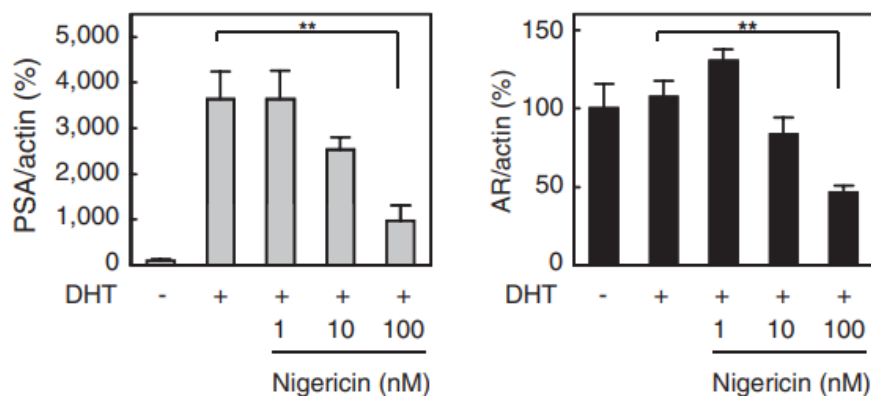


Fonte: retirado de Mashima et al, (2010).

Ainda, segundo o estudo de Mashima et al (2010), a NIG atua suprimindo a via de sinalização RA ainda na fase de transcrição e, também, na fase pós-transcricional do RNA mensageiro (mRNA). Para chegar à conclusão e determinar com clareza o mecanismo de mediação usado pela NIG na inibição de RA, foi analisado o nível de expressão do mRNA do RA em células LNCaP durante o tratamento com NIG.

Utilizando a técnica de qRT-PCR foi confirmado a supressão causada pela NIG, alterando para um decréscimo dos níveis de PSA nas células LNCaP, segundo mostra a figura 34. Também, foi verificado um decréscimo dos níveis de expressão do RNA mensageiro da RA, tal como demonstrado na figura 34, fato que confere com a inibição verificada na figura 31 supracitada, da qual os níveis de expressão das moléculas de RA foram reduzidos com o uso da NIG. Este resultado indica que a NIG pode reduzir a expressão das moléculas RA a nível transcricional, atuando possivelmente em promotores de RA ou afetando a estabilidade do mRNA da RA.

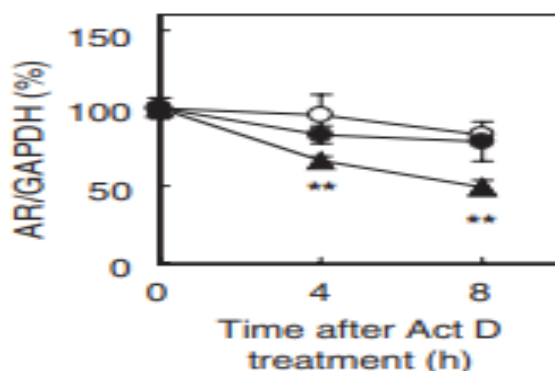
Figura 34. Gráficos de barras da porcentagem de expressão de PSA e AR detectado em células LNCaP tratadas durante 24 horas na ausência ou na presença de DHT (10 nM) e na ausência ou na presença de nigericina (1-100 nM).



Fonte: retirado de Mashima et al, (2010).

Desta forma, no estudo foi realizada uma análise para saber se a NIG atuava na atividade do promotor RA mRNA e se interferia nos níveis de mRNA, sendo os resultados demonstrado na figura 35 Com isso, pode-se concluir que a NIG diminui a estabilidade do RA mRNA e que não afeta a atividade do promotor mRNA, portanto a NIG não atua no promotor e sim na redução da estabilidade do mRNA correspondente.

Figura 35. Gráfico de porcentagem de AR/GAPDH por tempo de exposição à actinomicina D (10 μ M) na ausência ou na presença de nigericina (100nM) durante 4 ou 8 horas, utilizando células LNCaP em 5% de meio CCS com ou sem DHT (10 nM), contendo três amostras, o controle ($\circ$), DHT ($\bullet$) e DHT com nigericina ($\blacktriangle$), a análise feita por qRT-PCR, adaptado de Mashima et al, 2010; ** p < 0.01.

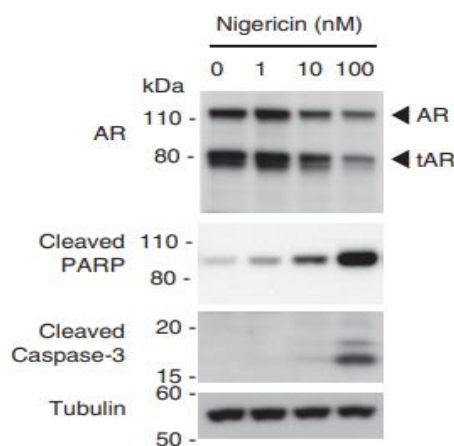


Fonte: retirado de Mashima et al, (2010).

A NIG também consegue suprimir constitutivamente a expressão de andrógenos truncados (tRA) ativo e o crescimento de células HRPC, tal como demonstram estudos de Dehm et al., 2008 e Gro et al., 2009. Os dois trabalhos reportaram que os tRAs, que não possuem o domínio de ligante, contribuem para o crescimento celular de variantes independentes de andrógenos, das quais a linhagem 22Rv1 expressa tRA de aproximadamente 80kDa assim como RA de cadeia completa. Em concordância com a observação feita acima, o DHT transloca os RAs de cadeia completa do citoplasma para o núcleo em ambas as linhagens celulares (LNCaP e 11Rv1) (Mashima et al., 2010).

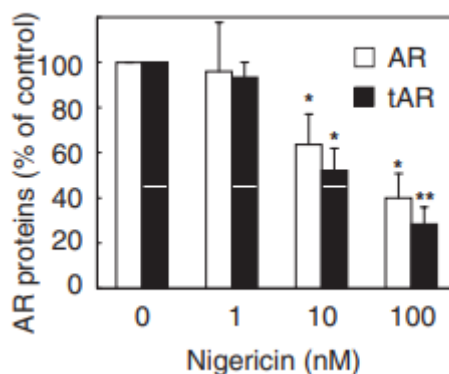
Posteriormente, Mashima et al. 2010 estudaram a influência da NIG diante de tRA e no crescimento de células 22Rv1. Nesse trabalho foi constatado que a molécula de NIG inibe a expressão de tRA e, também, a expressão do RA de cadeia completa, conforme ilustrado nas figuras 36 e 37 (efeito diretamente proporcional à dose de NIG). Com isso, pode-se supor que a NIG inibe o crescimento de células 22Rv1 andrógeno independentes também diretamente proporcional à dose administrada.

Figura 36. Efeito da concentração de nigericina no nível de RA (cadeia completa), tRA (truncado) e na expressão das moléculas marcadoras de apoptose em células 22Rv1, as quais foram tratadas com nigericina com uma dose crescente de nigericina (1-100 nM).



Fonte: retirado de Mashima et al, (2010).

Figura 37. Gráfico de barras [receptor andrógeno de cadeia completa (□) e receptor andrógeno de cadeia truncada (■)] da porcentagem de proteína RA por concentrações crescentes de nigericina (1-100 nM).



Fonte: retirado de Mashima et al, (2010).

Como conclusão, Mashima et al (2010) identificaram a NIG como uma molécula promissora na inibição da sinalização RA, reduzindo os níveis de mRNA de RA, o que reduz a expressão tanto de RA truncado quanto de cadeia completa. Além disso, reduz uma boa gama de variantes de RA em HRPC que pode ser susceptível à esta inibição funcional causada pela NIG.

2.3 PATENTES ENVOLVENDO NIGERICINA

2.3.1 – PATENTE EUA – NIGERICINA PARA TRATAMENTO DE COCCIDIOSES (PROTOZOÁRIOS).

Esta invenção refere-se geralmente à prevenção e tratamento da coccidiose e mais particularmente o uso da nigericina como coccidiostático e, para novas composições, ações contendo a referida nigericina ou seu metal alcalino, alcalino terra, amônio e sais de amônio substituídos, em incluindo metilamina, dimetilamina, trietilamina, etil amina e similares. A coccidiose é uma doença comum e disseminada das aves causada por uma ou mais de várias espécies de protozoários parasitas do gênero *Eimeria*, como *E. tenella*, *E. necatrix*, *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. brunetti*, *E. mivati*, *E. adenoides* e *E. meleagridis*. *E. tenella* é o causador agente de uma

infecção grave e muitas vezes fatal do ceco de frangos, que se manifesta por graves e extensas hemorragia. (United States Patent O " 13,555,150. 1971).

2.3.2 PATENTE EUROPEIA – NIGERECINA COMO AGENTE ANTIVIRAL.

O agente pode ser usado para o tratamento de doenças virais causadas por vírus contendo DNA, como herpes vírus, denovírus e poxvírus, contém como ingrediente ativo o antibiótico ionóforo nigericina reduzido por *Streptomyces Hygroscopicus*

Este agente não induz resistência e efeitos colaterais, mas tem uma toxicidade relativamente baixa. É usado na medicina humana. contendo vírus tais como vírus do herpes, adenovírus e vírus da varíola. É conhecido, para o tratamento de doenças causadas por herpes, adenovírus e outros vírus contendo DNA. (Escritório Europeu de Patentes - número de registro: 88101018.51988, 1987).

3 CONCLUSÃO OU CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os estudos mostram ações potenciais significativas para tratamento utilizando a nigericina isolada na diminuição da viabilidade de células cancerígenas multirresistentes ou associadas com outras substâncias. Também possui potencial na inibição do desenvolvimento de diversos tipos de cânceres bem como redução incidência de metástase “in vitro” e “In vivo”, portanto, uma molécula candidata promissora na utilização de certos tipos de tumores e provendo um melhor prognóstico para os pacientes. Quanto à produção fermentativa da nigericina, os estudos demonstram um bom panorama do grau de desenvolvimento dos processos fermentativos com informações importantes quanto ao meio utilizado e nutrientes adequados para cada processo fermentativo, além disto o estudo dá base para que os pesquisadores e indústrias consigam escolher com base em seus processos qual o melhor método e uma condição ótima de cultivo, além disto o estudo também evidenciou uma ótima relação custo/benefício desse meio de produção do ionóforo e

confirmou uma excelente viabilidade comercial, identificando meios de incrementar a produção e mostrando na indústria como este antibiótico é importante na produção de indústrias sucroalcooleiras e até mesmo alimentícia utilizando como fator de promotor de crescimento.

4 REFERÊNCIAS

ALLINEN, Minna, et al. Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer. **Cancer cell**, v. 6, n. 1, p. 17-32, 2004.

BABU, K. R.; SATYANARAYANA, T. Production of bacterial enzymes by solid state fermentation. **Journal of scientific & industrial research**, v. 55, n. 5-6, p. 464-467, 1996.

CAI, YIZHONG, et al. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. **Life sciences**, v. 74, n. 17, p. 2157-2184, 2004.

DAVEREY, ACHLESH; PAKSHIRAJAN, KANNAN. Production of sophorolipids by the yeast *Candida bombicola* using simple and low cost fermentative media. **Food Research International**, v. 42, n. 4, p. 499-504, 2009.

DEMAIN, ARNOLD L. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 52, n. 4, p. 455-463, 1999.

DENG, CHENG-CHENG, et al. Nigericin selectively targets cancer stem cells in nasopharyngeal carcinoma. **International journal of biochemistry & cell biology**, v. 45, n. 9, p. 1997-2006, 2013.

DOEBLER, JA. Effects of neutral ionophores on membrane electrical characteristics of NG108-15 cells. **Toxicology letters**, v. 114, n. 1-3, p. 27-38, 2000. doi: 10.1016/s0378-4274(99)00193-9.

DOEBLER, JA. Comparative effects of carboxylic ionophores on membrane potential and resistance of NG108-15 cells. **Toxicology in vitro**, 2000. Imagem molécula

nigericina. National Institutes of Health National Library (NIH– Pubchem) of Medicine - National Center for Biotechnology Information, (1985). Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Nigericin>> acesso em 18/07/2022.

EUROPEAN PATENT OFFICE. Patente CE. Escritório Europeu de Patentes europeen des brevets © Número da publicação: 0 294 538 A2 © © Data de registro: 25/01/88 Dundarov, Stefan Georgiev Dunav-Str. 58-2 @ Data de publicação do pedido: BG-1202 Sofia(BG) 14/12/88 Boletim de Patentes 88/50, 1987. <https://patents.google.com/patent/EP0294538A2/en> acesso em 15/08/2022.

EUROPIAN CHEMICAL AGENCY. ECHA (31/05/2018) - Disponível em: <<https://echa.europa.eu/information-on-chemicals/pre-registered-substances/-/dislist/substance/100.131.597>> Acesso em: 19/07/22.

EYTAN, G. D.; CARLENOR, E.; RYDSTRÖM, J. Energy-linked transhydrogenase. Effects of valinomycin and nigericin on the ATP-driven transhydrogenase reaction catalyzed by reconstituted transhydrogenase-ATPase vesicles. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 22, p. 12949-12954, 1990.

GORMAN, M.; HAMILL, ROBERT. **Nigericin for treating coccidiosis**. Indianapolis, Ind., assignors to Eli Lilly and Company, Indianapolis, Ind., a corporation of Indiana No Drawing. Patente USA - No. 721,922 . Int. Cl. A611: 21/00. 1971. <<https://patents.google.com/patent/US3555150A/en>> Acesso em: 15/08/2022.

HARVEY, BARBARA M., et al. Insights into polyether biosynthesis from analysis of the nigericin biosynthetic gene cluster in *Streptomyces* sp. DSM4137. **Chemistry & biology**, v.14, n. 6, p. 703-714, 2007.

HEISEY, R.M; PUTNAM. A.R. Herbicidal activity of the antibiotics geldanamycin and nigericin. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 9, Article number: 19, 1990. doi:10.1007/BF02041937

JÄHDE, ECKHARD et al. Hydrogen ion-mediated enhancement of cytotoxicity of bis-chloroethylating drugs in rat mammary carcinoma cells in vitro. **Cancer research**, v. 49, n. 11, p. 2965-2972, 1989.

JÄHDE, ECKHARD; GLÜSENKAMP, KARL-HEINZ; RAJEWSKY, MANFRED F. Nigericin enhances mafosfamide cytotoxicity at low extracellular pH. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 27, n. 6, p. 440-444, 1991.

LIU, FEI, et al. Nigericin Exerts Anticancer Effects on Human Colorectal Cancer Cells by Inhibiting Wnt/ β -catenin Signaling PathwayNigericin Inhibits Wnt/ β -catenin Pathway in CRC. **Molecular cancer therapeutics**, v. 17, n. 5, p. 952-965, 2018.

MANTECA, ANGEL et al. Mycelium differentiation and antibiotic production in submerged cultures of *Streptomyces coelicolor*. **Applied and environmental microbiology**, v. 74, n. 12, p. 3877-3886, 2008.

MASHIMA, TETSUO; OKABE, SACHIKO; SEIMIYA, HIROYUKI. Pharmacological targeting of constitutively active truncated androgen receptor by nigericin and suppression of hormone-refractory prostate cancer cell growth. **Molecular pharmacology**, v. 78, n. 5, p. 846-854, 2010.

MOON, Randall T. Wnt/ β -catenin pathway. **Science's STKE**, v. 2005, n. 271, p. cm1-cm1, 2005.

MYSKIW, C; Piper, P; Huzarewich, R; Booth, TF; Cao, J. Nigericin is a potent inhibitor of the early stage of vaccinia virus replication. **Antiviral research**, v. 88, n. 3, p. 304-10, 2010. doi: 10.1016/j.antiviral.2010.10.001.

PANDEY, Ashok et al. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. **Current science**, v. 77, n. 1, p. 149-162, July, 1999. JSTOR, <http://www.jstor.org/stable/24102923>.

PARK, EUN JUNG, et al. Chloroquine enhances TRAIL-mediated apoptosis through up-regulation of DR5 by stabilization of mRNA and protein in cancer cells. **Scientific reports**, v. 6, 22921, 2016. doi: 10.1038/srep22921.

ROSSI, S. C. et al. Improving fruity aroma production by fungi in SSF using citric pulp. **Food Research International**, v. 42, n. 4, p. 484-486, 2009.

ROTTENBERG, H; SCARPA, A. Calcium uptake and membrane potential in mitochondria. **Biochemistry**, v. 13, n. 23, p. 4811–4817, 1974.

SAHU, AMIT KUMAR, et al. Approach to nigericin derivatives and their therapeutic potential. **RSC Advances**, v. 10, n. 70, p. 43085-43091, 2020. doi: 10.1039/d0ra05137c.

SHAVIT, N.; DILLEY, R. A.; SAN PIETRO, A. Ion translocation in isolated chloroplasts. Uncoupling of photophosphorylation and translocation of K and H ions induced by nigericin. **Biochemistry**, v. 7, n. 6, p. 2356-2363, 1968.

SILVA, ANDRE LUIZ SCRIDELLI. **Otimização de processo fermentativo para produção antibiótico Nigericina por streptomyces**. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/59/59138/tde-050820140438/>.

SOUZA E SILVA, M.C. **Aplicação do antibiótico nigericina para controle microbiológico no setor agroindustrial**. 2017. Projeto de Pesquisa. Disponível em: <<https://bv.fapesp.br/pt/auxilios/93548/aplicacao-do-antibiotico-nigericina-para-controle-microbiologico-no-setor-agroindustrial/>> acesso em 18/07/2022.

SUBRAMANIYAM, R., VIMALA, R. Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: a comparative study. **Int J Sci Nat**, v. 3, n. 3, p. 480-486, 2012.

USPTO. United States Patent and Trademark Office. Patentes nos USA. <https://www.uspto.gov/>.

VEDEL-MACRANDER, G. C.; HOOD, R. D. Teratogenic effects of nigericin, a carboxylic ionophore. **Teratology**, v. 33, n. 1, p. 47-51, 1986. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/tera.1420330108>

WANG, MAONAN, et al. Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. **Journal of Cancer**, v. 8, n. 5, p. 761-773, 2017. doi: 10.7150/jca.17648.

WANG, WEN, et al. Nigericin inhibits epithelial ovarian cancer metastasis by suppressing the cell cycle and epithelial–mesenchymal transition. **Biochemistry (Moscow)**, v. 82, n. 8, p. 933-941, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1134/S0006297917080089>.

XU, ZHIHUA; High-throughput sequencing of circRNAs reveals novel insights into mechanisms of nigericin in pancreatic cancer. **BMC genomics**, v. 20, n. 1, p. 1-11, 2019.

YAKISICH, JUAN SEBASTIAN et al. Nigericin decreases the viability of multidrug-resistant cancer cells and lung tumorspheres and potentiates the effects of cardiac glycosides. **Tumor Biology**, v. 39, n. 3, p. 1010428317694310, 2017.

5 APÊNDICE

5.1 PATENTES

HAMMANN, P. et al. Derivados de nígericina, substituídos no anel F, processam sua preparação, agentes que os contêm, e seu uso como compostos com atividade antiviral e antibacteriana (1989 Patente - EP0336248A1.) disponível: <<https://patents.google.com/patent/EP0336248A1/en>> acesso em: 25/08/2022.

Nigericin derivatives, substituted at the F-ring, process for their preparation, agents containing them, and their use as compounds having antiviral and antibacterial activity. Antiviral effectiveness. Antiviral activity in cell culture

The test substances were dissolved in cell culture medium (Dulbecco's MEM) and placed in a geometric dilution series, factor 3, in standard microtiter plates in 100 µl cell culture medium. This was followed by the addition of 100 µl of a suspension of HeLa or Vero cells in medium with 5% fetal calf serum in a cell density of 2×10^5 cells / ml. The batches were infected with 50 µl of a suspension of the respective test virus, which was adjusted so that the cells showed a cytopathogenic effect (Cpe9) within 72 h. The evaluation was carried out by microscopic examination of the cell lawn and photometric measurement of the neutral red uptake (color test according to Finther The concentration of the preparation (µg / ml) was assumed as MIC, at which about 50% of the cells survived the infection (MIC, minimal inhibitory concentration).

Table 3 shows the effect (MIC in µg / ml) of various compounds according to the invention against the following viruses: Adeno 5, Vaccina, Herpes I, Herpes II, Influenza A, Paramyxo. III, Rhinovirus II

Antibacterial effectiveness

The antibacterial activity of the compounds according to the invention was determined in the Lorian agar dilution test (Antibiotics in Laboratory Medicine, Williams & Wilkins, Baltimore / London, 1980). The preparations were diluted in a geometric dilution series with factor 2 in Müller Hinton agar. One Petri dish contained only Müller Hinton agar and was used to control bacterial growth. The Petri dishes were then inoculated with the corresponding test bacteria using a Denley multipoint inoculator, which transferred 0.6 µl of a 1: 100 diluted 18-hour culture of the test bacteria. After 16 to 18 hours of incubation at 37 ° C, the petri dishes were examined macroscopically for bacterial growth.

The lowest concentration of the compounds according to the invention, which still completely prevented bacterial growth, was assumed to be MIC (Minimum Inhibitory Concentration).

Table 4 shows the activity (specification of the MIC in µg / ml) of various compounds according to the invention against the following bacteria: Staph. aureus (SG 511), Staph. aureus (285), Staph. aureus (503), strept. pyogenes (308 A), Strept. pyogenes (77 A), strept. faecium (D).

PATENTES –

HAMMANN, P. et al. Derivados de nigericina, método para a sua preparação, composições que contêm e utilização destas composições – Patente EP0324390 (1989). Disponível em :

<https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docid=ep11928654&_cid=p22-k8vjg0-98086-1 > acesso em 03/08/2022.

Bibliografia Nacional. Dados Descrição Reivindicações Família de Patentes Documentos

PermaLink Maquina de tradução Escritório Europeu de

Patentes Número do aplicativo 89100220

Data de aplicação 07.01.1989

Número da publicação 0324390

Data de publicação 19.07.1989

Tipo de Publicação A3 IPC

C07D 493/10 A61K 31/35 A61P 31/04 A61P 31/12 C07H 19/01

CPC A61P 31/04 A61P 31/12 C07H 19/01 C07D 493/10

Candidatos HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT

Inventores

HAMMANN, PETER, DR.

GRABLEY, SUSANNE, DR.

VOELSKOW, HARTMUT, DR.

WINKLER, IRVIN, DR.

SEIBERT, GERHARD, PROF. DR.

ZEECK, AXEL, PROF. DR.

STEINHOFF, ILSEMARIE, DR.

Dados de prioridade

3800598 12.01.1988 DE

3829780 02.09.1988 DE

Título

(DE) Nigericinderivate, Verfahren zu deren Herstellung, diese enthaltende Mittel und Verwendung derselben sowie die Verwendung von Nigericin als antiviral wirksame Substanz.

(EN) DERIVADOS DE NIGERICINA, MÉTODO PARA SUA PREPARAÇÃO, COMPOSIÇÕES QUE OS CONTÊM E UTILIZAÇÃO DESTAS COMPOSIÇÕES

(FR) Dérivés de la nigéricine, leur méthode de préparation, les compositions les contenant et l'utilisation de ceux-ci.

Abstrato

(DE) Die Erfindung betrifft Nigericinderivate der Formel I in der Z, R¹ und R² die angegebenen Bedeutungen haben. Die Verbindungen der Formel I zeigen sowohl antibakterielle als auch antivirale Wirksamkeit.

(EN) Derivados de nigericina de fórmula I em que Z, R^{<1>} e R^{<2>} têm os significados dados. Os compostos de fórmula I apresentam actividade antibacteriana e antiviral.

Documentos de patente relacionados

DE000003829780 ZA1989/00189 PT89426 DK11489 AU1989028362
JP1989213283 KR1019890011888

Processo:	15/15804-3
Linha de fomento:	Auxílio à Pesquisa - Pesquisa Inovativa em Pequenas Empresas - PIPE
Vigência:	01 de julho de 2016 - 31 de março de 2017
Área do conhecimento:	Ciências Biológicas - Bioquímica - Bioquímica de Microorganismos
Pesquisador responsável:	Mário César Souza e Silva
Beneficiário:	Mário César Souza e Silva
Empresa:	M C Tech Biotecnologia Ltda
Município:	Ribeirão Preto
Pesquisadores principais:	André Luiz Scridelli Silva
Pesq. associados:	Álvaro de Baptista Neto ; Luiz Alberto Beraldo de Moraes
Bolsa(s) vinculada(s):	16/15452-2 - Aplicação do antibiótico nigericina

6 ANEXO

Aplicação do antibiótico nigericina para controle microbiológico no setor agroindustrial

O setor sucroalcooleiro foi responsável por aproximadamente 2% do PIB nacional e por 31% do PIB da agricultura no Brasil em 2012, tendo empregado cerca de 4,5 milhões de pessoas. O Brasil é o segundo maior produtor de etanol do mundo. No entanto, o monitoramento e o controle de contaminantes da microbiota nas dornas de fermentação são fundamentais para a melhora na eficiência e no rendimento da produção de etanol. A contaminação bacteriana é certamente o principal fator que afeta a fermentação alcoólica. Quando a contaminação bacteriana atinge níveis entre 10^7 e 10^8 células/mL de mosto, ocorrem queda significativa no rendimento alcoólico. Sem dúvida alguma, o uso de biocidas os quais, em virtude de suas propriedades bactericidas ou bacteriostáticas, funcionam como agentes desinfetantes, reduzindo a contaminação microbiológica da fermentação é o procedimento mais comumente empregado. Os antibióticos comerciais mais utilizados para o controle bacteriano durante a fermentação são o clorafenicol, a tetraciclina, a penicilina e a monensina sódica. Dentre os quais se destaca o antibiótico importado, monensina sódica, que possui grande atividade sobre bactérias Gram-positivas, as principais causas de contaminação no processo de fermentação etanólica. Atualmente, o gasto com antibióticos para a produção de etanol está em torno de R\$ 0,02 por litro, sendo assim, a implantação de uma produção local de antibiótico a baixo custo pode ser uma alternativa para a diminuição do custo final na produção de etanol. Se a tecnologia atender toda a produção do Estado de São Paulo, e gerasse uma diminuição de R\$ 0,01 por litro de etanol produzido, a economia seria de R\$ 99 milhões considerando a safra de 2013/14. A monensina é comercializada por várias empresas do setor, com vendas anuais de 180 toneladas ao preço médio de R\$ 220,00/Kg, perfazendo anualmente o valor de R\$ 39.600.000,00. A monensina sódica pertence à classe de antibióticos poliéteres ionóforos, produzidos por actinobactérias do gênero *Streptomyces* *cinnamomensis*, dentro desta classe de compostos são conhecidas mais de 120

estruturas diferentes, dentre elas a nigericina. Em um trabalho recente, referente à dissertação de mestrado do aluno André Luiz Scridelli Silva, foi avaliado o potencial de produção de nigericina pela actinobactéria EUCAL 26, isolada da rizosfera do eucalipto. Esta actinobactéria apresenta um grande potencial biotecnológico, em virtude de produzir apenas a nigericina como metabolito ativo, ou seja, o extrato bruto é composto única e exclusivamente por nigericina. Outro resultado bastante promissor, foi a produção de nigericina em aproximadamente 500,0 mg/L, empregando uma solução melaço de soja 1% como meio de cultivo. O melaço de soja é um resíduo agroindustrial de baixo custo e com grande potencial para aplicação em processos biotecnológicos. Também foi realizado testes de atividade biológica comparativos entre nigericina e monensina, frente a diferentes linhagens de bactérias, onde a nigericina apresentou maior atividades em menores concentrações. Visto a isso, prevê-se uma diminuição na adição de antibiótico, tornando o processo mais sustentável. Desta forma, o principal objetivo deste projeto PIPE é avaliar a possibilidade de introduzir no mercado um produto sustentável e de baixo custo para ser utilizado no controle de contaminantes do mosto de fermentação para a produção de etanol. Deste modo, a empresa MC DESINFECÇÃO INDUSTRIAL propõe um projeto, que conta com uma colaboração inédita com o Laboratório de Espectrometria de Massas Aplicada a Produtos Naturais (USP - Ribeirão Preto) e com a Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara, visando avaliar o desenvolvimento do potencial de aplicação do antibiótico nigericina para o controle microbiológico do processo de fermentação do etanol produzido pela actinobactéria EUCAL 26, isolado e produzido em trabalhos realizados na USP de São Paulo. (AU)

<https://bv.fapesp.br/pt/auxilios/93548/aplicacao-do-antibiotico-nigericina-para-controle-microbiologico-no-setor-agroindustrial/>

Teratology

Citations: [11](#)

[PDF](#)

[TOOLS](#)

SHARE

Abstract

Nigericin (Na^+ salt) was given intraperitoneally at doses of 5.0 or 7.0 mg/kg on one of gestation days 7–12 to pregnant CD-1 mice. Additional mice were injected ip with 2.5 mg/kg on day 11 or 12 only. Injections on single gestation days reduced fetal growth and increased prenatal deaths. Additional signs of toxicity to the conceptus included treatment-related extra ribs and delayed ossification. Treatment was also associated with gross and skeletal malformations, such as median facial cleft, exencephaly, encephalocele, fused ribs, and anomalous vertebrae and exoccipitals. With the possible exception of the 5.0 mg/kg dose given on gestation day 8, nigericin doses associated with gross or skeletal malformations also resulted in observable maternal toxicity.

Nigericina (sal de Na^+) foi administrada por via intraperitoneal em doses de 5,0 ou 7,0 mg/kg em um dos dias de gestação 7-12 para camundongos CD-1 prenhes. Camundongos adicionais foram injetados ip com 2,5 mg/kg apenas no dia 11 ou 12. Injeções em dias de gestação única reduziram o crescimento fetal e aumentaram as mortes pré-natais. Sinais adicionais de toxicidade para o conceito incluíram costelas extras relacionadas ao tratamento e ossificação retardada. O tratamento também foi associado a malformações macroscópicas e esqueléticas, como fenda facial mediana, exencefalia, encefalocele, costelas fundidas e vértebras anômalas e exoccipitais. Com a possível exceção da dose de 5,0 mg/kg administrada no 8º dia de gestação, as doses de nigericina associadas a malformações grosseiras ou esqueléticas também resultaram em toxicidade materna observável.

Visualizações

1

Citações CrossRef até o momento

1

Altmétrico

Artigo de Pesquisa

Aproveitamento de resíduos de glicerol para produção de agentes de biocontrole nigericina e nifimicina por *Streptomyces hygroscopicus* : desenvolvimento de bioprocessos

Ivana Mitrovic¹ , Jovana Grahovac² , Jovana Hrustic³ , Aleksandar Jokić⁴ , Jelena Dodic⁵ , Milica Mihajlovic⁶ & [mostre tudo](#)

Recebido em 14 de outubro de 2020, aceito em 02 de março de 2021, Versão do autor aceita publicada online: 06 de abril de 2021, Publicado online: 18 de abril de 2021

Baixar citação <https://doi.org/10.1080/09593330.2021.1913241> Logotipo de marca cruzada  Marca Cruzada

Experimente nossos periódicos de Meio Ambiente e Sustentabilidade, faça login aqui para iniciar seu acesso, os dois últimos volumes completos GRATUITOS para você por 14 dias

ABSTRATO

A busca por métodos mais ecológicos para o controle de doenças de plantas que contribuam para a meta de sustentabilidade na agricultura está em foco. No presente estudo, foi examinado o potencial de *Streptomyces hygroscopicus* isolado de amostra de solo na produção de agentes de biocontrole, nigericina e nifimicina, eficazes contra o patógeno de armazenamento de maçãs *Alternaria alternata*. Além disso, foi realizada a modelagem e otimização da composição do meio para biossíntese do agente de biocontrole. Os resultados mostraram que a quantidade ótima de $C_3H_8O_3$, $(NH_4)_2SO_4$ e K_2HPO_4 no meio para a biossíntese de *Streptomyces hygroscopicus* é de 20, 0,25 e 1,46 g/L, respectivamente. O scale-up e

validação dos resultados obtidos realizados no biorreator de escala laboratorial de 3 L mostraram que no meio otimizado a uma taxa de aeração de 0,7 vvm e uma velocidade de agitação de 200 rpm, produziu nigericina e nifimicina, apresentou alta atividade. Nas mesmas condições, o cultivo de *S. hygroscopicus* foi realizado em biorreator laboratorial de 7 L em meio com glicerol residual ao invés de glicerol puro. Os resultados mostraram que o extrato metanólico do líquido de cultivo de *S. hygroscopicus*, contendo nigericina e nifimicina, foi altamente eficaz contra dois isolados de *Alternaria*. Isso foi confirmado in vitro obtendo grandes diâmetros de zona de inibição em isolados de *A. alternata* KA10 (47 mm) e T1Jg 3 (44,33 mm). Após análise in vitro bem sucedida, o teste in planta foi realizado. Verificou-se que os diâmetros de necrose medidos em frutos de macieira inoculados artificialmente com *A. alternata* em comparação com o diâmetro de necrose medido em frutos de controle não tratados foram 4,47 e 3,56 vezes menores.

Resumo gráfico

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Nigericin> acesso dia 18/07/2022.

ights sobre a biossíntese de poliéter

da Análise do Biossintético de Nigericina

Agrupamento de genes em *Streptomyces* sp. DSM4137

Barbara M. Harvey,¹ Tatiana Mironenko,¹ Yuhui Sun,^{1,2} Hui Hong,¹ Zixin Deng,² Peter F. Leadlay,¹

Kira J. Weissman,¹ e Stephen F. Haydock^{1,*}

¹Departamento de Bioquímica, Universidade de Cambridge, Cambridge CB2 1GA, Reino Unido

² Bio-X Life Science Research Center, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200030, China

*Correspondência: stephen.haydock@addenbrookes.nhs.uk

DOI 10.1016/j.chembiol.2007.05.011

RESUMO

A nigericina foi um dos primeiros ionóforos de poliéter a ser descoberto, mas sua biossíntese permanece obscuro. O cluster de genes biossintéticos pois a nigericina foi clonada por acaso de *Streptomyces* sp. DSM4137 e exclusão deste cluster de genes aboliu a produção de tanto a nigericina quanto o metabólito intimamente relacionado abierixina. Comparação detalhada da nigericina genes biossintéticos com suas contrapartes nos clusters biossintéticos para outros policetídeos levou a uma revisão significativa a via comum proposta para o poliéter biossíntese. Em particular, apresentamos evidências que na nigericina, nanchangmicina e monensina, uma proteína incomum semelhante à cetossintase, KSX, transfere o policetídeo linear inicialmente formado cadeia para uma proteína transportadora de acil discreta, ACPX, para ciclização oxidativa. Consistente com isso, a exclusão de monACPX ou monKSX do cluster de genes da monensina de forma eficaz aboliu a biossíntese da monensina A.

INTRODUÇÃO

Ionóforos de poliéter, como nigericina (1), abierixina (2), monensina A (3) e nanchangmicina (4) (Figura 1), constituem uma família de mais de 120 produtos naturais estruturalmente relacionados com a capacidade de quelar seletivamente íons metálicos e transportá-los através das membranas celulares [1]. Por exemplo, A nigericina, descrita pela primeira vez em 1951 [2], exerce diversas efeitos nas células através de sua capacidade de mediar H^+/K^+ neutro troca através das membranas biológicas. Os poliéteres têm aplicação generalizada em medicina veterinária e animal pecuária e, mais recentemente, foram identificados como agentes com atividade contra cepas de malária resistentes a medicamentos [3, 4]. Dois clusters de genes biossintéticos de poliéter até agora foram caracterizados, ou seja, aqueles que codificam a biossíntese de monensina A (3) [5, 6] e nanchangmicina (4) [7] (dianemicina), respectivamente. As informações obtidas a partir de um exame detalhado desses biossintéticos clusters começou a lançar luz sobre o mecanismo de biossíntese de poliéter e, em particular, a oxidação de a cadeia policetílica e sua subsequente ciclização [6, 8, 9] para formar os anéis de éter característicos.

Foi demonstrado que os esqueletos de policetídeos de monensina (3) e nanchangmicina (4) são gerados como para outros policetídeos complexos, pela ação de grandes

sintases de policetidos (PKS). Cada multifuncional módulo é capaz de executar um ciclo de extensão da cadeia adicionando a unidade extensora apropriada e carregando o nível apropriado de redução estereoespecífica. Variação da unidade extensora e do grau e estereoespecificidade das etapas redutivas em cada módulo permite uma enorme diversidade de produtos naturais complexos a serem produzidos por um mecanismo comum. No caso da monensina A (3), o PKS produz um C26 funcionalizado e ramificado cadeia contendo três ligações duplas. Essas ligações duplas são epoxidados por uma epoxidase dependente de flavina, MonCI, para dar um triepóxido putativo [6, 9]. Uma epoxidase homóloga, NanO, é codificado no cluster de genes para nanchangmicina (4) [7]. As novas proteínas, MonBI e MonBII (e sua contraparte proposta no cluster de nanchangmicina, NanI), foram implicados em garantir que a ciclização do intermediário multiepóxido passa a dar o poliéter da estereoquímica correta [10]. Para nanchangmicina (4), foi proposto que a oxidação e as etapas de ciclização ocorrem enquanto o policetídeo é ancorado a uma proteína transportadora de acil discreta (ACP), NanA10 [7], que também participa de uma rodada de cadeia policetí dica extensão. Surpreendentemente, nem o poliéter PKS contém

o domínio esperado de tioesterase intrínseca (TE) localizado no terminal C do módulo de extensão final. Liberação da cadeia de nanchangmicina (4) foi originalmente proposto como sendo catalisada por uma nova "liberação em cadeia" dependente de metal domínio", localizado no final do módulo final do a nanchangmicina PKS [7].

Nosso objetivo era lançar mais luz sobre os mecanismos detalhados da biossíntese de poliéter, caracterizando agrupamentos desta classe. A identificação inicial de um cluster de genes de DSM4137 com homologia muito significativa ao dos aglomerados de poliéter publicados [11] forneceu a oportunidade ideal para fazer isso. Também oferece recursos adicionais material genético para futura engenharia biossintética para fazer novos poliéteres. A cepa DSM4137 não foi anteriormente conhecido por produzir um poliéter, mas esperava-se que a análise do cluster revelaria a provável identidade

Insights into polyether biosynthesis from analysis of the nigericin biosynthetic gene cluster in *Streptomyces* sp. DSM4137

BM Harvey, T Mironenko, Y Sun, [H Hong](#), Z Deng... - *Chemistry & biology*, 2007 - Elsevier

Nigericin was among the first polyether ionophores to be discovered, but its biosynthesis remains obscure. The biosynthetic gene cluster for nigericin has been serendipitously cloned from *Streptomyces* sp. DSM4137, and deletion of this gene cluster abolished

the

production of both nigericin and the closely related metabolite abierixin. Detailed comparison of the nigericin biosynthetic genes with their counterparts in the biosynthetic