LUCIANA COSTA FURTADO

**Potencial anticâncer de substâncias isoladas de
Streptomyces sp. recuperada da ascídia
Euherdmania sp.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientador(a): Profa. Dra. Leticia Veras Costa Lotufo

Versão original.

São Paulo
2019

RESUMO

FURTADO, L. C. **Potencial anticâncer de substâncias isoladas de *Streptomyces* sp. recuperada da ascídia *Euherdmania* sp.** 2019. 104 p. Mestrado em Farmacologia – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Os produtos naturais de origem marinha despontam como uma fonte de potencial farmacológico inestimável. Dentro dessa perspectiva, o fornecimento sustentável de metabólitos bioativos a partir do cultivo de micro-organismos marinhos figura como uma atrativa solução para a prospecção racional dessas substâncias. Um *screening* inicial com cinco extratos de bactérias marinhas (BRA-339, BRA-341, BRA-346, BRA-374 e BRA-386) mostrou que, além de alto potencial citotóxico, um deles (BRA-346) inibia a atividade catalítica da subunidade ChTL do proteassoma. A bactéria BRA-346 isolada da ascídia endêmica brasileira, *Euherdmania* sp., mostrou-se uma promissora fonte de substâncias citotóxicas. Essa cepa, pertencente ao gênero *Streptomyces*, produz extrato com atividade citotóxica significativa, apresentando CI_{50} de 30 ng/mL em células humanas de carcinoma de cólon, HCT-116. O teste alvo-direcionado em proteassoma purificado de *S. cerevisiae* inibiu a atividade catalítica da enzima a uma concentração média de 0,42 μ g/mL, para o extrato, e 0,045 μ g/mL, para sua fração enriquecida (BRA-346ADC). Os ensaios cristalográficos detectaram a presença de uma substância pertencente a classe das epóxi-cetonas ligado à subunidade catalítica ChTL. Análises em espectrometria de massas identificaram o íon TMC-86A e dihidroeponemicina na fração. Os inibidores de proteassoma são utilizados clinicamente no tratamento de mieloma múltiplo, mas vêm sendo testados com resultados promissores em outros tipos de cânceres, incluindo glioblastomas. Esse câncer ainda carece de terapia mais efetiva que permita uma maior sobrevida dos pacientes. Testes com a fração enriquecida BRA-346ADC revelaram alta citotoxicidade nas linhagens celulares HOG (oligodendroglioma) e T98G (glioblastoma), CI_{50} = 25,4 e 37,3 ng/mL, respectivamente. A análise da expressão proteica e de genes direcionados para via do proteassoma e estresse do retículo mostraram aumento de ubiquitinação e de genes relacionados a resposta ao estresse do retículo induzidos pelo tratamento com a fração BRA-346 ADC. Esses resultados demonstram a importância das substâncias produzidas pela bactéria *Streptomyces* sp. BRA-346 frente a modelos de Glioblastoma.

Palavras-chave: Micro-organismos marinhos. Substâncias citotóxicas. Proteassoma.

.

ABSTRACT

FURTADO, L. C. **Potencial anticâncer de substâncias isoladas de *Streptomyces* sp. recuperada da ascídia *Euherdmania* sp.** 2019. 104 p. Master thesis in Pharmacology – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Marine natural products emerge as a source of inestimable pharmacological potential. In this perspective, the sustainable supply of bioactive metabolites from the cultivation of marine microorganisms appears as an attractive solution for the rational exploration of these substances. An initial screening with five marine bacterial extracts (BRA-339, BRA-341, BRA-346, BRA-374 and BRA-386) showed that, besides of the high cytotoxic potential, one of them (BRA-346) inhibited the catalytic activity of the ChTL subunit of the proteasome. The bacterium BRA-346 isolated from the Brazilian endemic ascidian, *Euherdmania* sp., was shown to be a promising source of cytotoxic substances. This strain, belonging to the genus *Streptomyces*, produces extract with significant cytotoxic activity, presenting IC₅₀ of 30 ng/mL in human colon carcinoma cells, HCT-116. The enzymatic assay using purified *S. cerevisiae* proteasome showed an inhibition with an average concentration of 0.42 µg/mL for the extract and 0.045 µg/mL for its enriched fraction (BRA-346ADC). The crystallographic assays detected the presence of a compound belonging to the epoxy-ketone class bounded to the catalytic subunit ChTL. Mass spectrometric analysis identified the TMC-86A ion and dihydroeponemycin in the fraction. Proteasome inhibitors are used clinically in the treatment of multiple myeloma, but they have been tested with promising results in other types of cancers, including glioblastomas. This cancer still needs more effective therapy that allows a greater survival of the patients. Tests with the enriched fraction BRA-346 exhibited high cytotoxicity in the cell lines HOG (oligodendroglioma) and T98G (glioblastoma), IC₅₀= 25.4 and 37.3 ng/mL, respectively. Analysis of the protein and genes expression related to the proteasome pathway and reticulum stress showed an increase of the ubiquitination and reticulum stress response genes induced by the BRA-346ADC fraction in the treatments. Together these results reinforce the importance of the compounds present in the *Streptomyces* sp. BRA-346 in Glioblastoma models.

Keywords: Marine microorganisms. Cytotoxic substances. Proteasome. Glioblastoma.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer e sua problemática

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer é um dos maiores problemas de saúde pública. Aproximadamente 14 milhões de novos casos são registrados por ano globalmente, e esse número deve subir 70% até 2038 (OMS, 2018). No Brasil, cerca de 600 mil novos casos anuais de câncer foram estimados para o biênio 2018-2019, sendo a maior porcentagem de câncer de próstata para os homens, e de mama para as mulheres (INCA, 2018).

Câncer é definido como um grupo de centena de doenças que partilham a multiplicação desordenada de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se (formando metástases) para outras regiões do corpo (INCA, 2018).

As células tumorais param de obedecer os mecanismos normais de controle de divisão celular, diferenciação e interação intercelular e com a matriz extracelular e tendem a ser muito agressivas e formar tumores. Os tumores malignos apresentam algumas características em comum, como instabilidade genética, evasão da apoptose, produção contínua de sinais proliferativos, insensibilidade a fatores supressores do crescimento, potencial replicativo ilimitado, indução da angiogênese e metástase, desregulação do metabolismo energético, invisibilidade ao sistema imune e promoção de inflamação associada ao tumor. A instabilidade genética é um componente chave na origem do tumor uma vez que ela possibilita a geração de diversidade genética que, por sua vez, induz a aquisição das demais características carcinogênicas (HANAHA; WEINBERG, 2000; HANAHA; WEINBERG, 2011).

A maioria dos fármacos antineoplásicos tem como principal característica a citotoxicidade, levando a morte das células tumorais por apoptose. Apesar do sucesso em diversos protocolos e até cura, ainda se carece de moléculas mais seletivas e menos tóxicas. A toxicidade da quimioterapia antitumoral baseada na citotoxicidade das moléculas utilizadas é, sem dúvida, o fator limitante mais importante para a aprovação para o uso na clínica bem como para o sucesso das terapias em pacientes que não raro já estão debilitados pela própria doença (WHO).

Mais além, alguns tumores podem desenvolver resistência aos quimioterápicos, por meio da superexpressão da glicoproteína-P, da enzima dihidropirimidina desidrogenase e da glutathione, como normalmente acontece nos

cânceres de mama, próstata, cólon, melanoma e gliomas (LEE; STEELMAN; MCCUBREY, 2004; ROCHA et al., 2016). Desse modo, a busca e o desenvolvimento de novas terapias anticâncer são de grande importância para contornar essas variantes que comprometem a eficiência dos tratamentos e diminuem a sobrevida dos pacientes.

Dentre os cânceres que apresentam resistência a quimioterapias convencionais, merece particular destaque o glioblastoma multiforme (GBM), subtipo mais comum de glioma. Este é o tumor cerebral maligno de quarto grau mais comumente encontrado em adultos com um mau prognóstico e opções de tratamento limitadas e, por isso, apresenta baixa sobrevida para os pacientes. Esse tipo de câncer atinge pacientes com uma faixa etária de 55 a 85 anos e constitui quase 50% de todos os tumores cerebrais malignos primários. A taxa de sobrevivência para portadores de GBM é de 2 anos para cerca de 27% dos pacientes tratados com a terapia padrão (FRIEDMAN; KERBY; CALVERT, 2000; LOUIS et al., 2016; STUPP et al., 2009).

Os gliomas respondem por quase 80% de todos os tumores cerebrais malignos e são responsáveis pela maioria das mortes por tumores cerebrais primários. Esse tipo de tumor surge a partir de células gliais, células que envolvem e suportam células nervosas. Os tumores de mais fácil cura são os de grau I, que apresentam delimitações. Já os glioma de graus II a III mostram infiltração difusa, e os de grau IV, além da infiltração, são bastante invasivos (DANG; JIN; SU, 2010).

O tratamento convencional inclui retirada do tumor seguida por radioterapia e quimioterapia (temozolomida). Suas altas taxas de recorrência, resistência geral à terapia e deterioração neurológica diminuem a eficiência da terapia e a sobrevida do paciente (KIM et al., 2015). Isso acontece em virtude do local de surgimento do tumor, que permite que as células malignas estejam protegidas pela barreira hematoencefálica, que por ser um órgão essencial e de difícil acesso, limita a terapia local. Esse tipo de tumor é bastante invasivo e coloniza áreas do cérebro que controlam importantes funções, como motoras, da fala e dos sentidos. Portanto, a cirurgia nessas áreas são de alto risco, além de que o seu difícil acesso impossibilita uma retirada eficiente de todas as células malignas, podendo levar a progressão do tumor ou recorrência da doença (DAVIS, 2016).

A temozolomida (Temodar®) é um agente alquilante de DNA usado na terapia de primeira linha para gliomas de alto grau e glioblastoma multiforme. Sua metabolização leva a produção do cátion metildiazônio que transfere um grupo metila

para o DNA que, conseqüentemente, leva a quebras na fita dupla do DNA e representa a citotoxicidade do fármaco por meio da promoção de morte celular por apoptose ou autofagia (ROOS et al., 2007; VILLANO; SEERY; BRESSLER, 2009).

Histologicamente, os gliomas são classificados em astrocitomas, oligodendrogliomas, oligoastrocitoma mistos ou ependimomas de acordo com semelhanças morfológicas. Para os astrocitomas (que se assemelham aos astrócitos) é frequente o desenvolvimento de glioblastomas de grau IV (GBM). É importante destacar que o glioblastoma multiforme se divide em primário e secundário e, para o primeiro tipo, não ocorre casos anteriores de câncer de cérebro, contudo, para o segundo, o seu desenvolvimento é recorrência e progressão de astrocitomas de graus II e III (KLEIHUES; OHGAKI, 1999; LOUIS et al., 2007).

Algumas mutações são caracteristicamente encontradas nos gliomas. Estudos dos genes desse tipo de câncer mostraram que os casos clássicos de gliomas exibem amplificação do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), diminuição dos níveis de neurofibromina (gene NF1), aumento da expressão de genes da família do fator de necrose tumoral (TNF) e aumento da via do NF- κ B (GOODENBERGER; JENKINS, 2012; VERHAAK et al., 2010). Vale destacar também mutações nos genes da isocitrato desidrogenase (IDH1 e IDH2) que ajudam a promover a gliomagenese.

1.2 Proteassoma como alvo na terapia anticâncer

Considerando que o câncer está, de forma geral, relacionado a disfunções no ciclo celular e que o complexo proteolítico proteassoma é vital para esse controle, moléculas que interajam com o proteassoma podem estar associadas ao controle do câncer. As células tumorais também dependem do fator de transcrição NF- κ B, que inibe a apoptose e promove a expressão de fatores de crescimento e citocinas importantes para a patogênese tumoral (HIDESHIMA et al., 2002). O tratamento com inibidores do proteassoma evita a degradação do I κ B que se mantém preso ao NF- κ B, evitando seu deslocamento para o núcleo celular. Essa inibição também leva ao acúmulo tóxico de proteínas mal-enoveladas, o que ativa as JNKs (*Jun N-terminal kinases*) e eventualmente a apoptose (GOLDBERG, 2012).

O proteassoma controla importantes processos biológicos, tais como: estresse proteico (degradação de proteínas mal enoveladas e homeostase proteica), mitose,

crescimento celular, quimiotaxia, apresentação de antígenos, angiogênese, apoptose e regulação da expressão gênica (FRANKLAND-SEARBY; BHAUMIK, 2012; GOLDBERG, 2003; GOLDBERG, 2007; GOLDBERG, 2012; SCHMIDT; FINLEY, 2014). Devido a isso, este complexo enzimático multicatalítico torna-se um alvo clínico atraente para o desenvolvimento de novas terapias, pois sua reciclagem constante de aminoácidos é decisiva para permanente síntese proteica das células tumorais.

A organização estrutural do proteassoma se divide em: região central 20S e tampa reguladora 19S (Figura 1). Essa região central consiste em uma estrutura cilíndrica com atividade de hidrólise peptídica, e a região reguladora, situada nas extremidades, realiza função de reconhecimento do substrato, remoção e desdobramento da cadeia de ubiquitina, por meio de um processo dependente do ATP.

Nos proteassomas presentes em células de mamíferos, a estrutura central do complexo proteolítico possui 2 anéis α externos idênticos e 2 anéis β internos idênticos. Cada anel β abriga 3 subunidades catalíticas (β_1 , β_2 e β_5) que exibem diferentes preferências de substrato, referidas como caspase-like (CL), tripsina-like (TL) e quimotripsina-like (ChTL) (DICK et al., 1998).

Figura 1 - Figura esquemática da estrutura do proteassoma 26S.

Complexo proteolítico composto pela região central 20S e tampa reguladora 19S, além de suas subunidades catalíticas, β_1 , β_2 e β_5 . Adaptado de Kubiczкова et al. (2014).

Para selecionar as proteínas que devem ser direcionadas para a câmara interna do complexo e degradadas, estas são marcadas pela ligação covalente de

cadeias de poliubiquitina (ubiquitinação) que juntamente com a proteólise formam o sistema ubiquitina-proteassoma (UPS, do inglês *Ubiquitin Proteasome System*), bastante explorado como um alvo para descoberta de fármacos (HUANG; DIXIT, 2016; RABL et al., 2008).

A inibição do complexo proteassoma já é uma estratégia validada para o tratamento de mieloma múltiplo (MM), e também tem sido apontado como alvo para outras neoplasias, incluindo tumores sólidos (KISSELEV; VAN DER LINDEN; OVERKLEEF, 2012; RAEDLER, 2015; RAJAN; KUMAR, 2016).

Esforços para a validação desse alvo como terapia nos últimos anos levou a aprovação do Bortezomibe como quimioterápico anticâncer em 2003 (MEINERS et al., 2008; ORLOWSKI; KUHN, 2008). Nos ensaios iniciais, o Bortezomibe apresentou citotoxicidade contra linhagens celulares de câncer, especialmente aquelas derivadas do mieloma múltiplo. Estas descobertas *in vitro* também se traduziram em eficácias *in vivo* promissoras em modelos de xenoenxerto de malignidades hematológicas e não hematológicas em camundongo (ADAMS et al., 1999; HUBER; GROLL, 2012; NAWROCKI et al., 2004; TEICHER et al., 1999).

O Bortezomibe é um ácido dipeptídeo borônico que forma uma ligação covalente com o resíduo catalítico da treonina presente nas subunidades $\beta 5$ e $\beta 1$ do proteassoma e inibe, preferencialmente, o sítio ChTL do proteassoma (CHEN et al., 2011; GROLL et al., 2006). Seu mecanismo de ação impede a ocorrência de cascatas de sinalização intracelular, levando a célula à apoptose. A principal via responsável pela morte celular corresponde ao aumento dos níveis de I κ B que permanece ligado ao NF- κ B, impedindo seu deslocamento para o núcleo e ativação, por transcrição, de genes envolvidos na sobrevivência celular e de moléculas proliferativas e antiapoptóticas (BRUNTON, 2012).

Uma segunda geração de inibidores surge, e, entre eles, vale destacar o Carfilzomibe, que é um inibidor que se liga fortemente a subunidade ChTL e pertence ao grupo químico das epóxi-cetonas. Apresenta inibição irreversível do proteassoma e estrutura química diferente do Bortezomibe, o que levou a uma resposta mais sustentada em estudos pré-clínicos, resultando em efeitos antiproliferativos e proapoptóticos em linhagens celulares de câncer hematológico (DEMO et al., 2007). Em 2012, foi aprovado para o tratamento do mieloma múltiplo em pacientes que apresentaram progressão da doença mesmo após tratamento com o Bortezomibe.

O grupo epóxi reage fortemente com o resíduo N-terminal de treonina catalítica do proteassoma, e este mecanismo altamente seletivo elimina o potencial de atividade fora do alvo com outras proteases celulares, o que pode contribuir para uma melhor tolerabilidade *in vivo* (F. et al., 2009; GROLL et al., 2000; KUHN et al., 2007).

Há também um outro tipo de inibidor do proteassoma, este apresenta em sua estrutura um anel γ -lactama- β -lactona. Desse grupo, é importante destacar a salinosporamida A (Marizomibe), substância isolada a partir da bactéria marinha *Salinispora tropica*. É um potente inibidor que inibe a proliferação celular *in vitro* de carcinoma de cólon humano (HCT-116), carcinoma de pulmão (NCI-H226), glioblastoma (SF-539), melanoma (SK-MEL-28) e mama (MDA-MB-435) com concentrações inibitórias abaixo de 11 ng/mL. Apresenta inibição 35 vezes maior do que o composto omuralida, que foi utilizado como controle positivo em alguns estudos (FELING et al., 2003). Após três anos da sua descoberta, em 2003, a salinosporamida A ingressou na fase I de testes clínicos para o tratamento de pacientes com mieloma múltiplo, linfomas, leucemias e tumores sólidos, além de outras enfermidades como doenças neurodegenerativas e infecciosas (COOKSON, 2006; CRUNKHORN, 2016; CZESNY et al., 2009; GULDER; MOORE, 2010; KHARE et al., 2016).

Figura 2 - Inibidores do proteassoma.

Aprovados para uso na clínica: Bortezomibe (2003) e Carfilzomibe (2012).

Fonte: (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)

O proteassoma também tem sido considerado como um alvo para o tratamento de glioblastoma. Em estudos com animais, o Marizomibe (salinosporamida A)

distribuiu-se no cérebro a 30% dos níveis sanguíneos em ratos e inibiu significativamente a atividade do proteassoma no tecido cerebral de macacos. Acredita-se que esses resultados relacionam-se ao potencial de penetrar a barreira hematoencefálica que o Marizomibe apresenta (DI *et al.*, 2015; DI *et al.*, 2016).

Zhang (2018) avaliaram, *in vitro* e *in vivo*, a eficácia antiproliferativa de um nanodisco lipídico carregado com Carfilzomibe ligado ao D-peptídeo DA7R (DA7R-ND/CFZ) utilizando linhagem celular de glioblastoma, U87MG. Os resultados mostraram supressão tumoral e aumento da sobrevida dos ratos portadores do tumor intracranial. O Carfilzomibe (Kyprolis®) é um derivado sintético da epoximicina, substância produzida pelo actinomiceto Q996-17, isolado de uma amostra de solo coletada na Índia (HANADA *et al.*, 1992; KIM; CREWS, 2013).

Durante os últimos anos, o potencial dos inibidores do proteassoma vem sendo amplamente testado. Sua atividade perturba tanto a homeostase das proteínas como o ciclo celular, por meio da ativação dos programas de morte celular. Os trabalhos desenvolvidos com esses tipos de compostos revelaram que numerosos tipos de cânceres exibem uma função aberrante do sistema ubiquitina proteassoma (UPS) e, portanto, o tratamento com tais inibidores pode apresentar uma estratégia bem-sucedida (CHEN; MADURA, 2005; HOELLER; DIKIC, 2009).

Dentro das diversas estratégias para prospecção de compostos com atividade anticâncer, vem ganhando destaque os ensaios alvo-direcionados, que permitem encontrar substâncias mais seletivas, reduzindo os efeitos colaterais do tratamento. Essa abordagem parte de um alvo celular específico que é fundamental para a sobrevida celular, como é caso de algumas proteínas inibidoras de apoptose, enzimas e complexo proteolítico proteassoma. Nessa ideia, os produtos naturais apresentam moléculas com disposição estrutural que facilita a ligação a determinados alvos, além de fortes interações moleculares (CARLSON, 2010; LA CLAIR, 2010).

1.3 Produtos naturais marinhos

Os produtos naturais são de grande importância para a humanidade desde a antiguidade. Suas propriedades farmacológicas são utilizadas no tratamento de diversas doenças e sua gama de estruturas moleculares possibilita o desenho de novos fármacos e a descoberta de novos alvos para diversas quimioterapias. São amplamente explorados e o desenho de substâncias sintéticas que mimetizam seus

grupos farmacofóricos só vem aumentando. Por meio de programas computacionais, a descoberta de novas moléculas de origem natural está sendo aperfeiçoada. Avanços em bioinformática promovem a exploração de genes biossintéticos que produzem metabólitos secundários bioativos, o que ajuda a prever suas estruturas químicas e vias de biossíntese (KIM; MOORE; YOON, 2015; NEWMAN; CRAGG, 2016a ; RODRIGUES et al., 2016). Dentre os produtos naturais, vale destacar os de origem marinha que estão em ampla fase de descoberta e expansão e já apresentam oito substâncias aprovadas para uso clínico, sendo 5 destes com atividade anticâncer (GERWICK; MOORE, 2012).

Os mares e oceanos abrigam mais de 90% da biodiversidade do planeta entre macro e micro-organismos (HILL; FENICAL WILLIAM, 2010; JIMENO et al., 2008), e essa diversidade biológica está ligada a uma variedade de metabólitos, que são produzidos devido a intensas pressões ecológicas. Segundo Newman e Cragg (2016b), o ambiente marinho apresenta substâncias extremamente potentes, com atividades antitumorais, anti-inflamatórias, analgésicas e imunomoduladoras.

Os estudos com produtos naturais marinhos iniciaram na década de 50, com o isolamento dos arabinucleosídeos espongouridina e espongotimidina da esponja marinha *Cryptotethya crypta*, que serviram de inspiração para síntese do ARA-C, ARA-A e AZT, utilizados para tratamento de leucemia, *Herpes* vírus e AIDS, respectivamente (BERGMANN; BURKE, 1956; BERGMANN; FEENEY, 1951; BERGMANN; STEMPIEN, 1957; NEWMAN; CRAGG, 2012). Os produtos naturais apresentam mecanismos de ação incomuns, devido a sua estrutura química atípica, o que lhes permite serem testados e usados na clínica (GERWICK; MOORE, 2012).

Em 2003, um trabalho desenvolvido por Jimenez e colaboradores utilizou 10 espécies de ascídias abundantes no litoral cearense, entre elas *Euherdmania* sp. e *Eudistoma vannamei*, para verificação da atividade citotóxica de seus extratos. Seis espécies de ascídias apresentaram extratos com atividade biológica em pelo menos um dos testes empregados. O extrato de *E. vannamei* mostrou a mais alta citotoxicidade em todas as células tumorais testadas, com CI_{50} variando de $< 2 \mu\text{g/mL}$ para células leucêmicas CEM a $23,8 \mu\text{g/mL}$ para células de melanoma murinho B16 (JIMENEZ et al., 2003). Já o extrato da *Euherdmania* sp. também apresentou citotoxicidade nas quatro linhagens de células testadas com valores de CI_{50} variando de $24,3 \mu\text{g/mL}$ em

CEM a 53,0 µg/mL em HL-60, sendo, portanto, o primeiro relato de atividade citotóxica para esse gênero.

As ascídias pertencem ao Filo Chordata, Sub-filo Tunicata, Classe Ascidiacea. São animais que se alimentam filtrando água do mar e possuem notocorda em sua fase larval, além de serem dominantes em muitas comunidades marinhas, tendo uma ampla distribuição geográfica (LAMBERT, 2005; WATTERS, 2018). Um estudo de Palanisamy, Rajendran e Marino (2017) forneceu um relato de aproximadamente 580 compostos, isolados de ascídias no período de 1994 a 2014, com atividades antibacteriana, anti-inflamatória, anti-viral, hipoglicemiante, antiproliferativa e antiparasitária.

Existem numerosos relatos de substâncias bioativas oriundas de ascídias do gênero *Eudistoma* (PALANISAMY; RAJENDRAN; MARINO, 2017), que inclui 161 espécies descritas (<http://www.marinespecies.org>). *Eudistoma vannamei*, por sua vez, é uma ascídia colonial tropical endêmica no litoral nordestino do Brasil (Lotufo & Silva, 2006). Este organismo, juntamente com os micro-organismos associados, tem sido um estudado pelo nosso grupo de pesquisa nos últimos 15 anos como uma fonte inestimável de produtos naturais bioativos. Neste contexto, substâncias de diversas classes químicas já foram isoladas dessa ascídia, incluindo estaurosporinas, antraciclinonas, dicetopiperazinas, alcalóides de pirimidina e uma ditiolpirrolona (ABREU et al., 2014; JIMENEZ et al., 2012; SOUSA et al., 2012; TAKEARA et al., 2015).

O gênero *Euherdmania*, por outro lado, ainda é pouco estudado, apresentando até o momento 15 espécies descritas (www.marinespecies.org). Monniot ((MONNIOT, 1983)1983) descreveu a *Euherdmania fasciculata*, uma espécie nova coletada em Guuadalupe – Caribe, que possui semelhança morfológica com a espécie desse trabalho, mas ainda são necessários dados moleculares que possam confirmar se correspondem de fato a mesma espécie ou não. De todo o modo, esse trabalho é bastante pioneiro, uma vez que não existem estudos envolvendo a microbiota e nem o metabolismo secundário de ascídias desse gênero.

Dos produtos obtidos de ascídias é importante destacar, pela sua relevância clínica, a Trabectedina (ET-743, Yondelis®) obtida da *Ecteinascidia turbinata* e aprovada pela agência regulatória européia (EMA) em 2007. Esse fármaco é um agente alquilante de DNA utilizado no tratamento de sarcomas de tecidos mole e câncer de ovário (J. MONK et al., 2012).

Os organismos marinhos possuem uma variedade de metabólitos secundários, provavelmente como aparato de defesa. Contudo, a maior parte desses metabólitos são produzidos por micro-organismos endossimbióticos. Estudos demonstraram que alguns compostos isolados inicialmente de invertebrados marinhos são, na verdade, sintetizados por bactérias (CHEN; FU; WANG, 2017; MOHAPATRA; BAPUJI; SREE, 2002), como é o caso da briostatina, produzida pela *Candidatus Endobugula sertula*, bactéria simbiote do briozoário *Bugula neritina* (DAVIDSON et al., 2001).

Em um estudo de Buedenbender et al (2017) espécies de actinomicetos associadas a três ascídias australianas foram investigadas. A análise metabolômica confirmou que a maioria dos metabólitos eram sintetizados pelos Actinomicetos, principalmente aqueles dos gêneros *Streptomyces* e *Micromonospora*.

O potencial dos micro-organismos marinhos na busca de novos fármacos também é fundamentado na importância histórica dos micro-organismos terrestres como fonte de fármacos e, de fato, esforços dedicados neste sentido já possibilitaram o isolamento de inúmeros metabólitos secundários a partir desses grupos. (WILLIAMS, 2008).

Embora sejam necessárias técnicas diferenciadas para o isolamento e cultivo de micro-organismos marinhos, muitos dos princípios desenvolvidos para a fermentação industrial podem ser aplicados para a obtenção dos metabólitos secundários em larga escala, o que resolve tanto a questão da disponibilidade de material como minimiza o impacto ecológico (JENSEN et al., 2000).

Os micro-organismos marinhos desenvolveram um aparato metabólico bastante peculiar que é, de certo modo, muito mais versátil que o de micro-organismos terrestres. Condições únicas de pH, temperatura, pressão, oxigênio, luz, nutrientes e salinidade permitem que ostentem atividades biológicas especiais. Essa característica lhes confere uma enorme capacidade adaptativa, o que garantiu a sua sobrevivência em ambientes às vezes extremos, e favoreceu a produção de metabólitos nunca antes observados para organismos terrestres (ZHANG et al., 2005).

Considerando os fortes indícios de que os micro-organismos associados sejam os verdadeiros responsáveis pelo elaborado arsenal de metabólitos secundários isolados de invertebrados marinhos, a produção desses compostos é viável e sustentável. Uma atrativa solução para a prospecção racional dos recursos do mar é fornecer a esses simbiotes meios de cultivo apropriados, para um suficiente

fornecimento desses metabólitos, por meio da fermentação biológica de micro-organismos marinhos.

Os actinomicetos são considerados o grupo mais promissor para produção de compostos antibacterianos e citotóxicos. A estreptomicina, um exemplo icônico de fármaco antimicrobiano, é obtida de actinomiceto do gênero *Streptomyces* (MIAO; DAVIES, 2010). Esse gênero é responsável por cerca de 7600 compostos com atividade biológica. Os actinomicetos terrestres desse gênero foram os primeiros a serem estudados e suas substâncias bioativas se tornaram medicamentos. Tal gênero foi primeiramente descrito em 1943 por Waksman e Henrici e seus representantes colonizam diversos ambientes, sejam eles terrestres ou marinhos (LI et al., 2011; SANTHANAM et al., 2012).

Mais de 85% dos antibióticos naturais descobertos são provenientes de bactérias do gênero *Streptomyces*. Fármacos em estudos clínicos para tratamento de tumores também têm sido obtidos a partir de micro-organismos deste grupo, como é o caso das antraciclinas. Compostos dessa classe, daunorubicina e doxorubicina, ambas produzidas por *Streptomyces peucetius*, possuem potente atividade citotóxica com mecanismo de ação que envolve espécies reativas de oxigênio e dano ao DNA (OLANO; CARMEN, 2009).

Apesar do considerável arsenal de drogas já existente para o tratamento dos diversos tipos de cânceres e do sucesso terapêutico em vários tratamentos, ainda não se chegou a um composto ideal. Assim, a busca por compostos mais seletivos, com menos efeitos colaterais, maior potência terapêutica e menor índice de resistência para a terapia do câncer é de extrema relevância. Portanto, torna-se imperativa a necessidade de encontrar, desenvolver, e introduzir no arsenal médico, novas opções terapêuticas mais eficientes (COSTA-LOTUFO et al., 2009).

Levando em consideração que a rica biodiversidade marinha do Brasil ainda é pouco explorada, o potencial farmacológico dos micro-organismos marinhos e a carência por substâncias antitumorais, é de grande relevância o estudo dos compostos obtidos a partir desses micro-organismos. Além disto, também é estratégica a busca por novos compostos com atividade farmacológica, ampliando o conhecimento e buscando ajudar na solução da problemática do câncer.

6 CONCLUSÃO

Diante dos dados expostos, o presente trabalho apresenta a identificação de substâncias inibidoras do proteassoma (TMC-86A, dihidroeponemicina e derivados) no extrato de uma bactéria marinha do gênero *Streptomyces* isolada da ascídia *Euherdmania* sp. Os resultados químicos sugerem a presença de novos compostos clorados também com função de inibição enzimática. Apesar da confirmação de inibidores do proteassoma na composição da fração, não foi possível observar semelhante expressão genética e proteica para as células tratadas com inibidores purificados. Os dados propõem até o momento que os tratamentos das linhagens tumorais de glioma e glioblastoma com a fração obtida do extrato da bactéria BRA-346 dispara a resposta ao estresse do retículo e interferem no sistema ubiquitina-proteassoma. Em virtude da ativação de mais de uma via no mecanismo que envolve a ação dessa fração, a continuidade dos seus estudos se faz necessária para elucidação de outras substâncias que possam estar envolvidas com a citotoxicidade mostrada nas linhagens de câncer de cérebro, pois tal citotoxicidade traz a possibilidade de investigação de nova terapia para esse tipo de câncer. Vale comentar que o perfil de resposta diferente apresentado pela fração nos modelos utilizados em relação aos inibidores usados com controles-positivos sugere a possibilidade de um mecanismo de ação peculiar. Esses resultados ressaltam a importância dos micro-organismos marinhos como fonte de moléculas citotóxicas, mostrando uma peculiar biodiversidade química desses micro-organismos, além da necessidade de melhor investigar o potencial antitumoral de suas moléculas.

REFERÊNCIAS

- ABREU, P. A. et al. Identification of Pyrroloformamide as a Cytokinesis Modulator. **ChemBioChem**, v. 15, n. 4, p. 501–506, 3 mar. 2014.
- ADAMS, J. et al. Proteasome Inhibitors: A Novel Class of Potent and Effective Antitumor Agents. **Proteasome Inhibitors: A Novel Class of Potent and Effective Antitumor Agents. Direct**, p. 2615–2622, 1999.
- ADAMS, J. Proteasome Inhibition in Cancer: **Cancer Research**, v. 28, n. 6, p. 613–619, 2001.
- ADAMS, P. D. et al. research papers PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution research papers. p. 213–221, 2010.
- ALLARD, P. et al. Integration of Molecular Networking and In-Silico MS/MS Fragmentation for Natural Products Dereplication. **Analytical Chemistry**, v. 88, n. 6, p. 3317–3323, 15 mar. 2016.
- AVRIL, T.; VAULÉON, E.; CHEVET, E. Endoplasmic reticulum stress signaling and chemotherapy resistance in solid cancers. **Oncogenesis**, v. 6, n. 8, p. e373, 28 ago. 2017.
- BERGMANN, W.; BURKE, D. C. Contributions to the Study of Marine Products. XL. The Nucleosides of Sponges. IV. Spongosine. **Journal of Organic Chemistry**, v. 21, n. 2, p. 226–228, 1956.
- BERGMANN, W.; FEENEY, R. J. Contributions to the study of marine products. XXXII. The nucleosides of sponges. **Journal of Organic Chemistry**, v. 16, n. 6, p. 981–987, 1951.
- BERGMANN, W.; STEMPIEN, M. F. Contributions to the Study of Marine Products. XLIII. The Nucleosides of Sponges. V. The Synthesis of Spongosine. **Journal of Organic Chemistry**, v. 22, n. 12, p. 1575–1577, 1957.
- BERRIDGE, M. V.; TAN, A. S. Characterization of the Cellular Reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular Localization, Substrate Dependence, and Involvement of Mitochondrial Electron Transport in MTT Reduction. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 303, n. 2, p. 474–482, jun. 1993.
- BLUNT, J. W. et al. Marine natural products. **Natural Product Reports**, v. 32, n. 2, p. 116–211, 2015.
- BOCHTLER, M. et al. The proteasome. **Annu Rev Biophys Biomol Struct**, v. 28, p.

295–317, 1999.

BOOTH, L. et al. OSU-03012 suppresses GRP78/BiP expression that causes PERK-dependent increases in tumor cell killing. **Cancer Biology & Therapy**, v. 13, n. 4, p. 224–236, 15 fev. 2012.

BRUNTON, L.L. Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 12^a ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2012.

BUEDENBENDER, L. et al. Taxonomic and metabolite diversity of actinomycetes associated with three Australian ascidians. **Diversity**, v. 9, n. 4, 2017.

BUSH K T; GOLDBERG A L; NIGAM S K. Proteasome inhibition leads to a heat-shock response, induction of endoplasmic reticulum chaperones, and thermotolerance. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 14, p. 9086–9092, 1997.

CALFON, M. et al. IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. **Nature**, v. 415, n. 6867, p. 92–96, jan. 2002.

CARLSON, E. E. Natural Products as Chemical Probes. **ACS Chemical Biology**, v. 5, n. 7, p. 639–653, 16 jul. 2010.

CHAO, C.-C. et al. Ca²⁺ store depletion and endoplasmic reticulum stress are involved in P2X7 receptor-mediated neurotoxicity in differentiated NG108-15 cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 113, n. 4, p. 1377–1385, abr. 2012.

CHEN, D. et al. Bortezomib as the First Proteasome Inhibitor Anticancer Drug: Current Status and Future Perspectives. **Current Cancer Drug Targets**, v. 11, n. 3, p. 239–253, 1 mar. 2011.

CHEN, L.; FU, C.; WANG, G. Microbial diversity associated with ascidians: a review of research methods and application. **Symbiosis**, v. 71, n. 1, p. 19–26, 2017.

CHEN, L.; MADURA, K. Increased proteasome activity, ubiquitin-conjugating enzymes, and eEF1A translation factor detected in breast cancer tissue. **Cancer Research**, v. 65, n. 13, p. 5599–5606, 2005.

CHEN, L et al. Enhanced Degradation of Misfolded Proteins Promotes Tumorigenesis. **Cell Reports**, v. 18, p. 3143–3154, 2017.

CHOMCZYNSKI, P. Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Extraction. v. 159, p. 156–159, 1987.

COMBA, A. et al. Arginylated Calreticulin Increases Apoptotic Response Induced by Bortezomib in Glioma Cells. **Molecular Neurobiology**, v. 56, n. 3, p. 1653–1664, 18 mar. 2019.

COOKSON, M. R. Hero versus antihero: The multiple roles of α -synuclein in

- neurodegeneration. **Experimental Neurology**, v. 199, n. 2, p. 238–242, jun. 2006.
- COSTA-LOTUFO, L. V. et al. Organismos marinhos como fonte de novos fármacos: histórico & perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 703–716, 2009.
- CRUNKHORN, S. Antimalarials: Novel proteasome inhibitor combats malaria. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 15, n. 4, p. 232, 2016.
- CUSACK, J. C. et al. Advances in Brief Enhanced Chemosensitivity to CPT-11 with Proteasome Inhibitor PS-341 : Implications for Systemic Nuclear Factor- κ B Inhibition 1. **Genetics and Molecular Biology**, p. 3535–3540, 2001.
- CZESNY, B. et al. The proteasome inhibitor epoxomicin has potent Plasmodium falciparum gametocytocidal activity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 10, p. 4080–4085, 2009.
- DADEY, D. Y. A. et al. The ATF6 pathway of the ER stress response contributes to enhanced viability in glioblastoma. **Oncotarget**, v. 7, n. 2, 12 jan. 2016.
- DANG, L.; JIN, S.; SU, S. M. IDH mutations in glioma and acute myeloid leukemia. **Trends in Molecular Medicine**, v. 16, n. 9, p. 387–397, 2010.
- DAVIDSON, S. K. et al. Evidence for the Biosynthesis of Bryostatins by the Bacterial Symbiont “ Candidatus Endobugula sertula ” of the Bryozoan Bugula neritina. v. 67, n. 10, p. 4531–4537, 2001.
- DAVIS, M. E. GBM treatment overview. **Clin J Oncol Nurs**, v. 20, n. 5, p. 1–14, 2016.
- DEMO, S. D. et al. Antitumor Activity of PR-171, a Novel Irreversible Inhibitor of the Proteasome. *Cancer Research*, [s.l.], v. 67, n. 13, p.6383-6391, 1 jul. 2007. American Association for Cancer Research (AACR).
- DI, K. et al. Marizomib activity as a single agent in malignant gliomas: Ability to cross the blood-brain barrier. **Neuro-Oncology**, v. 18, n. 6, p. 840–848, 2016.
- DICK, T. P. et al. Contribution of Proteasomal β -Subunits to the Cleavage of Peptide Substrates Analyzed with Yeast Mutants. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 40, p. 25637–25646, 2 out. 1998.
- DING, F. et al. The role of the ubiquitin-proteasome pathway in cancer development and treatment. **Front Biosci (Landmark Ed.)**, v. 19, p. 886-895, 2014.
- DOMINGUEZ-BAUTISTA, J. A. et al. Loss of lysosome-associated membrane protein 3 (LAMP3) enhances cellular vulnerability against proteasomal inhibition. **European Journal of Cell Biology**, v. 94, n. 3–4, p. 148–161, mar. 2015.
- EMSLEY, P.; COWTAN, K. research papers Coot : model-building tools for molecular graphics research papers. p. 2126–2132, 2004.

- EUGÊNIO, A. I. P. et al. Proteasome and heat shock protein 70 (HSP70) inhibitors as therapeutic alternative in multiple myeloma. **Oncotarget**, v. 8, n. 70, p. 114698–114709, 2017.
- F., P. et al. Carfilzomib can induce tumor cell death through selective inhibition of the chymotrypsin-like activity of the proteasome. **Blood**, v. 114, n. 16, p. 3439–3447, 2009.
- FELING, R. H. et al. Salinosporamide A: A highly cytotoxic proteasome inhibitor from a novel microbial source, a marine bacterium of the new genus *Salinospira*. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 42, n. 3, p. 355–357, 2003.
- FRANKLAND-SEARBY, S.; BHAUMIK, S. R. The 26S proteasome complex: An attractive target for cancer therapy. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, v. 1825, n. 1, p. 64–76, 2012.
- FRIEDMAN, H. S.; KERBY, T.; CALVERT, H. Temozolomide and treatment of malignant glioma. **Clinical Cancer Research**, v. 6, n. 7, p. 2585–2597, 2000.
- GERWICK, W. H.; MOORE, B. S. Lessons from the past and charting the future of marine natural products drug discovery and chemical biology. **Chemistry and Biology**, v. 19, n. 1, p. 85–98, 2012.
- GOLDBERG, A. L. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. **Nature**, v. 426, n. 18/25 December, p. 895–899, 2003.
- GOLDBERG, A. L. Functions of the proteasome: from protein degradation and immune surveillance to cancer therapy. **Biochemical Society Transactions**, v. 35, n. 1, p. 12–17, 2007.
- GOLDBERG, A. L. Development of proteasome inhibitors as research tools and cancer drugs. **Journal of Cell Biology**, v. 199, n. 4, p. 583–588, 2012.
- GOODENBERGER, M. L.; JENKINS, R. B. Genetics of adult glioma. **Cancer Genetics**, v. 205, n. 12, p. 613–621, 2012.
- GROLL, M. et al. A gated channel into the proteasome core particle. **Nature Structural Biology**, v. 7, n. 11, p. 1062–1067, 2000.
- GROLL, M. et al. Crystal structure of the boronic acid-based proteasome inhibitor bortezomib in complex with the yeast 20S proteasome. **Structure**, v. 14, n. 3, p. 451–456, 2006.
- GULDER, T. A. M.; MOORE, B. S. Salinosporamide Natural Products: Potent 20 S Proteasome Inhibitors as Promising Cancer Chemotherapeutics. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 49, n. 49, p. 9346–9367, 3 dez. 2010.
- GUTIERREZ, D. A. et al. A new pyridazinone exhibits potent cytotoxicity on human

cancer cells via apoptosis and poly-ubiquitinated protein accumulation. 2019.

HANADA, M. et al. Epoxomicin, a new antitumor agent of microbial origin. **The Journal of antibiotics**, v. 45, n. 11, p. 1746–52, 1992.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57–70, jan. 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–74, 2011.

HE, Y.; KAINA, B. Are There Thresholds in Glioblastoma Cell Death Responses Triggered by Temozolomide? **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 7, p. 1562, 28 mar. 2019.

HETZ, C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, n. 2, p. 89–102, 18 fev. 2012.

HEUER, H. et al. Analysis of Actinomycete Communities by Specific Amplification of Genes Encoding 16S rRNA and Gel-Electrophoretic Separation in Denaturing Gradients. v. 63, n. 8, p. 3233–3241, 1997.

HIDESHIMA, T. et al. NF- κ B as a therapeutic target in multiple myeloma. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 19, p. 16639–16647, 2002.

HILL, R. T.; FENICAL WILLIAM, W. Pharmaceuticals from marine natural products: Surge or ebb? **Current Opinion in Biotechnology**, v. 21, n. 6, p. 777–779, 2010.

HIRAMATSU, N. et al. Translational and posttranslational regulation of XIAP by eIF2 α and ATF4 promotes ER stress-induced cell death during the unfolded protein response. **Molecular Biology of the Cell**, v. 25, n. 9, p. 1411–1420, maio 2014.

HOELLER, D.; DIKIC, I. Targeting the ubiquitin system in cancer therapy. **Nature**, v. 458, n. 7237, p. 438–444, 2009.

HOUGHTON, P. et al. The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. v. 42, p. 377–387, 2007.

HUANG, X.; DIXIT, V. M. Drugging the undruggables: Exploring the ubiquitin system for drug development. **Cell Research**, v. 26, n. 4, p. 484–498, 2016.

HUBER, E. M.; GROLL, M. Inhibitors for the Immuno- and Constitutive Proteasome: Current and Future Trends in Drug Development. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 51, n. 35, p. 8708–8720, 27 ago. 2012.

<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/index.asp?ID=2>>, acessado em dezembro de 2018.

J. MONK, B. et al. Trabectedin as a New Chemotherapy Option in the Treatment of Relapsed Platinum Sensitive Ovarian Cancer. **Current Pharmaceutical Design**, v. 18, n. 25, p. 3754–3769, 2012.

JASPARS, M. et al. The marine biodiscovery pipeline and ocean medicines of tomorrow. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 96, n. 01, p. 151–158, 19 fev. 2016.

JENSEN, P. R. et al. Marine Microorganisms and Drug Discovery : Current Status and Future Marine Microorganisms and Drug Discovery : Current Status and. n. August 2015, 2000.

JIMENEZ, P. C. et al. Biological activity in extracts of ascidians (Tunicata, Ascidiacea) from the northeastern Brazilian coast. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 287, n. 1, p. 93–101, 2003.

JIMENEZ, P. C. et al. Structure elucidation and anticancer activity of 7-oxostaurosporine derivatives from the Brazilian endemic tunicate Eudistoma vannamei. **Marine Drugs**, v. 10, n. 5, p. 1092–1102, 2012.

JIMENO, J. et al. New Marine Derived Anticancer Therapeutics — A Journey from the Sea to Clinical Trials. **Marine Drugs**, v. 2, n. 1, p. 14–29, 2008.

KABSCH, W. XDS. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, v. 66, n. 2, p. 125–132, 1 fev. 2010.

KHARE, S. et al. Proteasome inhibition for treatment of leishmaniasis, Chagas disease and sleeping sickness. **Nature**, v. 537, n. 7619, p. 229–233, 8 set. 2016.

KIM, E.; MOORE, B. S.; YOON, Y. J. Reinvigorating natural product combinatorial biosynthesis with synthetic biology. **Nature Chemical Biology**, v. 11, n. 9, p. 649–659, 2015.

KIM, K. B.; CREWS, C. M. From epoxomicin to carfilzomib: Chemistry, biology, and medical outcomes. **Natural Product Reports**, v. 30, n. 5, p. 600–604, 2013.

KIM, S. S. et al. Effective treatment of glioblastoma requires crossing the blood-brain barrier and targeting tumors including cancer stem cells: The promise of nanomedicine. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 468, n. 3, p. 485–489, 2015.

KIND, T.; FIEHN, O. Metabolomic database annotations via query of elemental compositions : Mass accuracy is insufficient even at less than 1 ppm. v. 10, p. 1–10,

2006.

KISSELEV, A. F.; VAN DER LINDEN, W. A.; OVERKLEEF, H. S. Proteasome Inhibitors: An Expanding Army Attacking a Unique Target. **Chemistry & Biology**, v. 19, n. 1, p. 99–115, jan. 2012.

KLEIGREWE, K. et al. Combining Mass Spectrometric Metabolic Profiling with Genomic Analysis: A Powerful Approach for Discovering Natural Products from Cyanobacteria. 2015.

KLEIHUES, P.; OHGAKI, H. Primary and secondary glioblastomas: From concept to clinical diagnosis. **Neuro-Oncology**, v. 1, n. 1, p. 44–51, 1 jan. 1999.

KOGUCHI, Y. et al. TMC-86A, B and TMC-96, New Proteasome Inhibitors from *Streptomyces* sp. TC 1084 and *Saccharothrix* sp. TC 1094. II. Physico-chemical Properties and Structure Determination. **The Journal of Antibiotics**, v. 53, n. 1, p. 63–65, 2000.

KUBICZKOVA, L. et al. Proteasome inhibitors - molecular basis and current perspectives in multiple myeloma. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 18, n. 6, p. 947–961, jun. 2014.

KUHN, D. J. et al. Potent activity of carfilzomib, a novel, irreversible inhibitor of the ubiquitin-proteasome pathway, against preclinical models of multiple myeloma. **Blood**, v. 110, n. 9, p. 3281–3290, 1 nov. 2007.

LA CLAIR, J. J. Natural product mode of action (MOA) studies: A link between natural and synthetic worlds. **Natural Product Reports**, v. 27, n. 7, p. 969–995, 2010.

LAMBERT, G. REVIEW / SYNTHÈSE Ecology and natural history of the protochordates 1. n. Herdman 1882, p. 34–50, 2005.

LASKOWSKI, R. A. et al. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**, v. 26, n. 2, p. 283–291, 1 abr. 1993.

LEE, J. T.; STEELMAN, L. S.; MCCUBREY, J. A. Phosphatidylinositol 3'-Kinase Activation Leads to Multidrug Resistance Protein-1 Expression and Subsequent Chemoresistance in Advanced Prostate Cancer Cells. **Cancer Research**, v. 64, n. 22, p. 8397–8404, 15 nov. 2004.

LEVIN, N. et al. Marizomib irreversibly inhibits proteasome to overcome compensatory hyperactivation in multiple myeloma and solid tumour patients. **British Journal of Haematology**, v. 174, n. 5, p. 711–720, 2016.

LI, J. et al. *Streptomyces fildesensis* sp. nov., a novel streptomycete isolated from

Antarctic soil. p. 537–543, 2011.

LIMONTA, P. et al. Role of Endoplasmic Reticulum Stress in the Anticancer Activity of Natural Compounds. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 4, p. 961, 22 fev. 2019.

LIU, F. et al. IKK biology. **Immunological Reviews**, v. 246, n. 1, p. 239–253, 2012.

LIU, Y. et al. Targeting X box-binding protein-1 (XBP1) enhances sensitivity of glioma cells to oxidative stress. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v. 37, n. 4, p. 395–405, jun. 2011.

LIU, Y. et al. XBP1 silencing decreases glioma cell viability and glycolysis possibly by inhibiting HK2 expression. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 126, n. 3, p. 455–462, 17 fev. 2016.

LOUIS, D. N. et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. **Acta Neuropathologica**, v. 114, n. 2, p. 97–109, 2007.

LOUIS, D. N. et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. **Acta neuropathologica**, v. 131, n. 6, p. 803–20, 2016.

LOTUFO, T. M. C.; SILVA, A. M. B. Ascidiacea. In: H. Matthews-Cascon ; T. M. C. Lotufo (Ed.). *Biota marinha da Costa Oeste do Ceará*. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2006. p.221-247

MANTON, C. A. et al. Induction of cell death by the novel proteasome inhibitor marizomib in glioblastoma in vitro and in vivo. **Scientific Reports**, v. 6, n. January, p. 1–13, 2016.

MAYER, M. P.; BUKAU, B. Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 62, n. 6, p. 670–684, 2005.

MEINERS, S. et al. Proteasome inhibitors: Poisons and remedies. **Medicinal Research Reviews**, v. 28, n. 2, p. 309–327, mar. 2008.

MENG, L. et al. Eponemycin exerts its antitumor effect through the inhibition of proteasome function. **Cancer Research**, v. 59, n. 12, p. 2798–2801, 1999.

MIAO, V.; DAVIES, J. Actinobacteria : the good , the bad , and the ugly. p. 143–150, 2010.

MILLWARD, M. et al. Phase 1 clinical trial of the novel proteasome inhibitor marizomib with the histone deacetylase inhibitor vorinostat in patients with melanoma, pancreatic and lung cancer based on in vitro assessments of the combination. **Investigational New Drugs**, v. 30, n. 6, p. 2303–2317, 2012.

- MOHAPATRA, B. R.; BAPUJI, M.; SREE, A. Antifungal Efficacy of Bacteria Isolated from Marine Sedentary Organisms. v. 47, n. 1, p. 51–55, 2002.
- MONNIOT, F. Ascidies littorales de Guadeloupe. **Bull.Mus.natn.Hist.nat.**, n. 2, p. 413–422, 1983.
- MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival : Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. v. 65, p. 55–63, 1983.
- MUTH, C. et al. Primary glioblastoma multiforme tumors and recurrence. **Strahlentherapie und Onkologie**, v. 192, n. 3, p. 146–155, 8 mar. 2016.
- MYEKU, N.; FIGUEIREDO-PEREIRA, M. E. Dynamics of the degradation of ubiquitinated proteins by proteasomes and autophagy: Association with sequestosome 1/p62. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 25, p. 22426–22440, 2011.
- NAWROCKI, S. T. et al. The proteasome inhibitor bortezomib enhances the activity of docetaxel in orthotopic human pancreatic tumor xenografts. **Molecular cancer therapeutics**, v. 3, n. 1, p. 59–70, 2004.
- NEMETH, Z. H. Proteasome Inhibitors Induce Inhibitory B (I B) Kinase Activation, I B Degradation, and Nuclear Factor B Activation in HT-29 Cells. **Molecular Pharmacology**, v. 65, n. 2, p. 342–349, 1 fev. 2004.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 3, p. 311–335, 2012.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629–661, 2016a.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Drugs and Drug Candidates from Marine Sources: An Assessment of the Current “state of Play”. **Planta Medica**, v. 82, n. 9–10, p. 775–789, 2016b.
- NOTHIAS, L. et al. Bioactivity-Based Molecular Networking for the Discovery of Drug Leads in Natural Product Bioassay-Guided Fractionation. 2018.
- OIKAWA, T. et al. Eponemycin, a novel antibiotic, is a highly powerful angiogenesis inhibitor. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 181, n. 3, p. 1070–1076, dez. 1991.
- OKUNAGA, T. et al. Calreticulin, a Molecular Chaperone in the Endoplasmic Reticulum, Modulates Radiosensitivity of Human Glioblastoma U251MG Cells. **Cancer Research**, v. 66, n. 17, p. 8662–8671, 1 set. 2006.
- OLANO, C.; CARMEN, M. Antitumor compounds from actinomycetes : From gene

clusters to new derivatives by combinatorial biosynthesis Antitumor compounds from actinomycetes : from gene clusters to new derivatives by combinatorial biosynthesis. n. May 2014, 2009.

ORLOWSKI, R. Z.; KUHN, D. J. Proteasome inhibitors in cancer therapy: Lessons from the first decade. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 6, p. 1649–1657, 2008.

PALANISAMY, S. K.; RAJENDRAN, N. M.; MARINO, A. Natural Products Diversity of Marine Ascidians (Tunicates; Ascidiacea) and Successful Drugs in Clinical Development. **Natural Products and Bioprospecting**, v. 7, n. 1, p. 1–111, 2017.

RABL, J. et al. Mechanism of Gate Opening in the 20S Proteasome by the Proteasomal ATPases. **Molecular Cell**, v. 30, n. 3, p. 360–368, 2008.

RAEDLER, L. Velcade (Bortezomib) Receives 2 New FDA Indications: For Retreatment of Patients with Multiple Myeloma and for First-Line Treatment of Patients with Mantle-Cell Lymphoma. **American health & drug benefits**, v. 8, n. Spec Feature, p. 135–40, 2015.

RAJAN, A. M.; KUMAR, S. New investigational drugs with single-agent activity in multiple myeloma. **Blood cancer journal**, v. 6, n. 7, p. e451, 2016.

REEN, F. J. et al. **Emerging concepts promising new horizons for marine biodiscovery and synthetic biology**. [s.l: s.n.]. v. 13

ROCHA, C. R. R. et al. NRF2 and glutathione are key resistance mediators to temozolomide in glioma and melanoma cells. **Oncotarget**, v. 7, n. 30, 2016.

RODRIGUES, T. et al. Counting on natural products for drug design. **Nature Chemistry**, v. 8, n. 6, p. 531–541, 2016.

ROMANO, G. et al. Marine microorganisms as a promising and sustainable source of bioactive molecules. **Marine Environmental Research**, v. 128, p. 58–69, 2017.

ROOS, W. P. et al. Apoptosis in malignant glioma cells triggered by the temozolomide-induced DNA lesion O6-methylguanine. **Oncogene**, v. 26, n. 2, p. 186–197, 3 jan. 2007.

S.D., D. et al. Antitumor activity of PR-171, a novel irreversible inhibitor of the proteasome. **Cancer Research**, v. 67, n. 13, p. 6383–6391, 2007.

SALA, G. DELLA et al. Clogging the ubiquitin-proteasome machinery with marine natural products: Last decade update. **Marine Drugs**, v. 16, n. 12, 2018.

SANTHANAM, R. et al. *Streptomyces deserti* sp. nov., isolated from hyper-arid Atacama Desert soil. p. 575–581, 2012.

SCHMIDT, M.; FINLEY, D. Regulation of proteasome activity in health and disease.

Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research, v. 1843, n. 1, p. 13–25, 2014.

SIN, N. et al. Total synthesis of the potent proteasome inhibitor epoxomicin: A useful tool for understanding proteasome biology. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 9, n. 15, p. 2283–2288, 1999.

SKEHAN, P. et al. New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening. **JNCI Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, n. 13, p. 1107–1112, 4 jul. 1990.

SOUSA, T. S. et al. Anthracyclines from *Micromonospora* sp. n. Table 1, p. 1–5, 2012.

STUPP, R. et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. **The Lancet Oncology**, v. 10, n. 5, p. 459–466, 15 maio 2009.

SUGAWARA, K. et al. Eponemycin, a new antibiotic active against B16 melanoma. I. Production, isolation, structure and biological activity. **The Journal of antibiotics**, v. 43, n. 1, p. 8–18, 1990.

TAKEARA, R. et al. Pyrimidine alkaloids from eudistoma vancouveri. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 25, n. 6, p. 698–700, 2015.

TEICHER, B. A. et al. The proteasome inhibitor PS-341 in cancer therapy. **Clinical Cancer Research**, v. 5, n. 9, p. 2638–2645, 1999.

TRAENCKNER, E. B.; WILK, S.; BAEUERLE, P. A. A proteasome inhibitor prevents activation of NF- κ B and stabilizes a newly phosphorylated form of I κ B- α that is still bound to NF- κ B. **The EMBO Journal**, v. 13, n. 22, p. 5433–5441, nov. 1994.

TRIVELLA, D. B. B. et al. Enzyme inhibition by hydroamination: Design and mechanism of a hybrid carmaphycin-syringolin enone proteasome inhibitor. **Chemistry and Biology**, v. 21, n. 6, p. 782–791, 2014.

TSAI, S.-F. et al. Isochailactone-induced DDIT3 causes ER stress-PERK independent apoptosis in glioblastoma multiforme cells. **Oncotarget**, v. 8, n. 3, p. 4051–4061, 17 jan. 2017.

VEGGIANI, G. et al. Emerging drug development technologies targeting Ubiquitination for Cancer therapeutics. **Pharmacology & Therapeutics**, 6 mar. 2019.

VERHAAK, R. G. W. et al. Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant

Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. **Cancer Cell**, v. 17, n. 1, p. 98–110, 2010.

VILLANO, J. L.; SEERY, T. E.; BRESSLER, L. R. Temozolomide in malignant gliomas: Current use and future targets. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 64, n. 4, p. 647–655, 2009.

WAGENKNECHT, B. et al. Proteasome Inhibitor-Induced Apoptosis of Glioma Cells Involves the Processing of Multiple Caspases and Cytochrome c Release. **Journal of Neurochemistry**, v. 75, n. 6, p. 2288–2297, 29 jul. 2008.

WANG, J. et al. Inhibition of glioma growth by flavokawain B is mediated through endoplasmic reticulum stress induced autophagy. **Autophagy**, v. 14, n. 11, p. 2007–2022, 2 nov. 2018.

WANG, M. et al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. **Nature Biotechnology**, v. 34, n. 8, p. 828–837, 1 ago. 2016.

WATTERS, D. J. Ascidian toxins with potential for drug development. **Marine Drugs**, v. 16, n. 5, 2018.

WILLIAMS, P. G. Panning for chemical gold: marine bacteria as a source of new therapeutics. n. November, p. 45–52, 2008.

World Health Organization WHO programmers and projects: cancer. Disponível em: <<http://www.who.int/cancer/en>>. Acesso em: 12 fev. 2018.

YANG, J. Y. et al. Molecular Networking as a Dereplication Strategy. 2013.

ZANOTTO-FILHO, A. et al. Proteasome inhibitor MG132 induces selective apoptosis in glioblastoma cells through inhibition of PI3K/Akt and NFkappaB pathways, mitochondrial dysfunction, and activation of p38-JNK1/2 signaling. **Investigational New Drugs**, v. 30, n. 6, p. 2252–2262, 2012.

ZHANG, L. et al. Waites. p. 276–281, 2005.

ZHANG, M. et al. Veggiani. **Molecular Pharmaceutics**, v. 15, n. 6, p. 2437–2447, 2018.

ZWICKL, Peter, BAUMEISTER, Wolfgang. **The Proteasome — Ubiquitin Protein Degradation Pathway.** Springer. 2002