

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

CURSO BIOTECNOLOGIA

Bioprospecção de moléculas com atividade antitumoral e genotóxica do sobrenadante
de bactérias isoladas de alimento larval de abelha sem ferrão

Ana Júlia Tavares Oliveira

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Biotecnologia, da Universidade
Federal de Uberlândia, para obtenção do
grau de Bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia - MG

Junho/2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

CURSO BIOTECNOLOGIA

Bioprospecção de moléculas com atividade antitumoral e genotóxica do sobrenadante
de bactérias isoladas de alimento larval de abelha sem ferrão

Ana Júlia Tavares Oliveira

Prof. Dr. Robson José de Oliveira Júnior

M.e Ricardo Campos Lino

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Biotecnologia, da Universidade
Federal de Uberlândia, para obtenção do
grau de Bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia - MG

Junho/2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

CURSO BIOTECNOLOGIA

Bioprospecção de moléculas com atividade antitumoral e genotóxica do sobrenadante
de bactérias isoladas de alimento larval de abelha sem ferrão

Ana Júlia Tavares Oliveira

Prof. Dr. Robson José de Oliveira Júnior

M.e Ricardo Campos Lino

Instituto de Biotecnologia

Homologado pela coordenação do Curso
de Biotecnologia em __/__/__

Prof. Dr. Nilson Nicolau Junior

Uberlândia – MG

Junho/2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

CURSO BIOTECNOLOGIA

Bioprospecção de moléculas com atividade antitumoral e genotóxica do secretoma de
bactérias isoladas de alimento larval de abelha sem ferrão

Ana Júlia Tavares Oliveira

Aprovado pela Banca Examinadora em: / / Nota: _____

Nome e assinatura do presidente da Banca Examinadora

Uberlândia – MG

Junho/2023

Dedico esse trabalho aos meus pais e minha irmã
que me apoiaram e sempre me falaram para viver
meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu orientador Robson José de Oliveira Junior por todo ensinamento e confiança em mim.

Agradeço meus pais e minha irmã por sempre me ajudarem e me incentivarem.

Agradeço a todos os meus amigos que sempre estiveram junto comigo em todos os passos da graduação.

Agradeço também a todos os meus companheiros e amigos de laboratório que estiveram comigo e me auxiliaram durante todo esse processo.

RESUMO

O câncer é um problema de saúde mundial com altos índices de mortalidade. A quimioterapia está entre os principais métodos terapêuticos de escolha, no entanto apresenta adversidades, principalmente no que diz respeito a alta toxicidade para as células normais e quimioresistência dos tumores, o que demonstra a necessidade de estudos para o desenvolvimento de novos fármacos. Os secretomas são o conjunto de proteínas que a célula secreta para o meio extracelular, contendo diversas biomoléculas complexas, com as mais diversas características, o que o torna uma excelente fonte para a prospecção de moléculas bioativas. Assim, esse estudo teve como objetivo estudar a atividade citogenotóxica de 5 secretomas de microrganismos encontrados no alimento larval de abelhas sem ferrão. O ensaio de redução da resazurina não demonstrou citotoxicidade dos secretomas em células de linhagens tumorais e não tumorais e o ensaio de genotoxicidade não apresentou resultados significativos quanto a indução de micronúcleos. Entretanto, vale ressaltar que apesar das biomoléculas presentes nos secretomas não terem apresentado efeito citogenotóxico para as células tumorais, elas podem ser efetivas para outras patologias.

Palavras-chave: câncer, quimioterapia, sobrenadante

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Câncer.....	1
1.2. Quimioterapia.....	3
1.3. Secretoma bacteriano.....	3
2. OBJETIVO.....	5
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	5
3.1. Manutenção das linhagens <i>in vitro</i>.....	5
3.2. Produção do secretoma.....	5
3.3. Ensaio de citotoxicidade por redução da resazurina.....	6
3.4. Ensaio de genotoxicidade <i>in vitro</i>.....	6
3.5. Análises estatísticas.....	7
4. RESULTADOS.....	7
5. DISCUSSÃO.....	14
6. CONCLUSÃO.....	16
7. REFERÊNCIAS.....	16

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer

O câncer é o resultado de alterações genéticas em uma única célula somática, as quais estão ligados ao mecanismos de divisão celular. Essas mutações geram células capazes de proliferar continuamente não dependendo de características fisiológicas, como fatores de crescimento e hormônios (PRADO, 2014). Assim, é uma doença que tem como característica a neoplasia, sendo considerado um distúrbio clonal. Além disso, áreas epigenéticas, transcriptômicas e proteômicas estão sendo cada vez mais associadas ao câncer por meio das vias de sinalização, as quais podem ser reguladas por elas (MALTA *et al.*, 2018).

A carcinogênese ou oncogênese é o nome dado à formação do câncer, esse processo é dividido em três fases principais: inicial, promoção e progressão. No estágio inicial os agentes cancerígenos atuam modificando o DNA, nele ainda não é possível identificar o câncer, porém as células já estão geneticamente modificadas. A segunda fase é a de promoção, nela agentes oncopromotores vão transformar a célula iniciada em maligna, de forma lenta e gradual. Por fim, há a progressão do tumor que é a multiplicação descontrolada e irreversível das células anormais, progredindo para os primeiros sintomas observáveis clinicamente da doença (INCA, 2022b).

Os tumores podem ser classificados como benignos ou malignos, a diferença entre eles está nas características apresentadas pelas células (PRADO, 2014). Para ser classificado como tumor maligno, é necessário apresentar as seguintes características: crescimento desordenado das células, e capacidade de migração das células para outras regiões do corpo, este processo é nomeado de metástase. Já os tumores benignos, são uma massa de células, a qual permanece em seu tecido ou órgão de origem, ou seja, não são capazes de realizarem metástase. (ALVES; TAVARES; BORGES, 2020).

Existem vários tipos de cânceres, dentre eles se tem os sarcomas, os quais têm origem no tecido mesenquimal e apresentam clinicamente uma grande variedade de comportamento, uma probabilidade alta de ser agressivos e possuem uma tendência a metástase mínima (NACEV *et al.*, 2020). Já o melanoma se origina nos melanócitos (células produtoras de melanina), sendo que esse tipo de câncer na região Sul é mais incidente quando comparado as demais Regiões para ambos os sexos (GUO *et al.*, 2020; INCA, 2022a).

Além disso, a Estimativa de 2023 de Incidência de câncer no Brasil aponta que para cada ano do triênio 2023 a 2025 o número de novos casos de câncer seja de 704 mil, se excluir o câncer de pele não melanoma são 483 mil casos. Mais específico para o câncer de pele do tipo melanoma, é estimado que tenha 8.980 novos pacientes, sendo que na região Sul é mais incidente quando comparado com outras regiões do Brasil (INCA, 2023a).

O câncer ainda é a principal causa de morte entre hispânicos e americanos de origem asiática, segundo pesquisas feitas nos Estados Unidos (SIEGEL *et al.*, 2021). Além disso, a taxa de sobrevivência global em 5 anos é de 68% para brancos e 63% para negros (SIEGEL *et al.*, 2021). Segundo a folha informativa de 2020 da Organização Pan-americana de Saúde o câncer é a segunda principal causa de morte no mundo e é responsável por 9,6 milhões de mortes em 2018. Estes dados deixam explícito a urgência no desenvolvimento de novas terapias que ajudem a combater esse grande problema de saúde pública.

Segundo TAVARES *et al.*, 2019, dentro dos tratamentos oncológicos, tem-se principalmente: cirurgia, quimioterapia, radioterapia, hormonioterapia, terapia alvo e imunoterapia. A escolha da melhor terapia depende do grau do tumor no paciente, sendo a quimioterapia a abordagem terapêutica mais amplamente utilizada. Na maioria das vezes as abordagens terapêuticas são usadas em conjunto para se obter uma maior chance de cura.

1.2. Quimioterapia

A quimioterapia é um dos possíveis tratamentos para o câncer, a qual busca impedir ou dificultar o crescimento das células cancerígenas (ALVES; TAVARES; BORGES, 2020). A quimioterapia pode ser administrada de diferentes formas, alguns exemplos são: via oral, intravenosa, intramuscular, subcutânea, intratecal e tópica. A resposta a esse tratamento é muito variável, sendo que alguns pacientes podem ter um bom resultado com um ou dois ciclos, enquanto outros precisam de oito ou mais (INCA, 2023b).

Os quimioterápicos são drogas citotóxicas que podem ter mecanismos de ação envolvendo a síntese e função macromolecular, a qual pode ser inferida na síntese de DNA, RNA ou de proteínas. Essa interferência leva a célula a processos de diferenciação, senescência ou apoptóticos (ELISE; KELLER, 2016). Esses medicamentos têm como objetivo atacar células que se dividem rapidamente e não são específicos. Dessa forma, é possível que ele também ataque as células saudáveis e cause efeitos colaterais não desejáveis no organismo (TAVARES *et al.*, 2019). Os sintomas podem incluir perda de cabelo, anemia, leucopenia, trombocitopenia, hiperpigmentação, enjojo, nefrotoxicidade, ototoxicidade, neurotoxicidade e outros (INCA, 2023b).

Além disso, ainda há problemas relacionados a quimio-resistência que limita a eficácia do tratamento (PRIHANTONO; FARU, 2021). Havendo uma exposição prolongada a um tipo de quimioterápico as células tumorais podem desenvolver mecanismos de reparo do DNA modificado por esses medicamentos, esses reparos são feitos por proteínas poli (ADP-ribose) polimerase (PARP) que são ativadas e recrutam enzimas para realizar o reparo (KARAM REBOLHO ORIENTADORA; REGINA BONINI DOMINGOS, [*s. d.*]).

1.3. Sobrenadante bacteriano

As bactérias são seres procariontes e unicelulares, podendo viver isoladas ou em grupos. A secreção de proteínas ocorre em todos os tipos de bactéria: gram-positiva e gram-negativa. Entretanto, os mecanismos em que isso ocorre podem ter algumas diferenças entre as duas. As duas principais vias de secreção de proteínas são: da Sec (secreção) e da Tat (translocação de arginina dupla) (TSOLIS *et al.*, 2019). A rota Sec é encontrada no retículo endoplasmático e atua em proteínas não-dobradas (unfolded), as quais irão se dobrar em sua estrutura nativa no lado *trans* da membrana. Já a Tat transloca proteínas dobradas através das membranas biológica, e acredita-se que seu papel fisiológico é expandir o grupo de substratos translocáveis à estruturas já dobradas (NATALE; BRÜSER; DRIESSEN, 2008).

Após a síntese proteica, essas moléculas podem seguir dois caminhos distintos. O primeiro seria a maturação e transporte para o meio extracelular, sendo as proteínas que seguem essa via chamadas de secretadas. E o segundo é ser inserida na membrana celular, sendo ditas como proteínas de superfície. Sendo assim, o secretoma bacteriano é definido como o conjunto das proteínas transportadas na célula e secretadas para o meio extracelular (ZUBAIR *et al.*, 2020). O estudo do secretoma bacteriano envolve a análise das proteínas que o organismo produz e secreta para o exterior da célula, podendo ser em resposta a uma variação ambiental ou não (FERREIRA *et al.*, 2009).

Os secretomas bacterianos podem ser fonte de diversas biomoléculas, por exemplo proteínas, enzimas e citocinas com diferentes atividades biológicas em células eucariotas, podendo ser aplicadas em várias doenças e patologias. Em estudos preliminares, o grupo de pesquisa do LABGEN/IBTEC detectou atividade antimicrobiana em alguns secretomas de uma cepa bacteriana encontrada no alimento larval de abelhas sem ferrão. Atualmente, há uma preocupação global sobre a dificuldade no combate de patógenos resistentes e assim a busca por novos medicamentos com função antimicrobiana é extremamente necessária (SANTOS *et*

al., 2022). Uma vez que foi encontrado um secretoma com atividade antimicrobiana em uma cepa bacteriana, é extremamente interessante que se avalie a atividade genotóxica desse secretoma para avaliação da segurança de seu uso.

Com as estimativas de números de cânceres no Brasil e no mundo é sempre necessário que haja estudos sobre medicamentos nessa patologia. A quimioterapia é um dos tratamentos mais utilizados para todos os tipos de câncer, e devido aos problemas aqui apresentados que esse tipo de terapia pode ter é preciso de pesquisas para o desenvolvimento de medicamentos que sejam menos tóxicos para o organismo humano e possa combater a quimiorresistência dos tumores.

2. OBJETIVO

Neste sentido, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a capacidade antitumoral e genotóxica *in vitro* dos secretomas bacterianos obtidos do alimento larval de abelhas sem ferrão depositadas no banco de microrganismo do LABGEN/IBTEC - UFU em células tumorais de sarcoma murino (TG180) e melanoma murino (B16F10) e não tumorais de miócito murino (C2C12), com o intuito de se encontrar moléculas que inibam o crescimento desses importantes tipos tumorais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Manutenção das linhagens *in vitro*

As linhagens tumorais utilizadas foram sarcoma (TG180) e melanoma (B16F10). Já para as células não-tumorais utilizou miócito (C2C12). Elas foram cultivadas *in vitro* em meio RPMI-1640 (Gibco, Pasley, UK) com suplementação de HEPES, L-glutamina, penicilina, estreptomicina (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) e soro fetal bovino inativado por aquecimento (Cultilab, 40, Campinas, Brasil) e mantidas em estufa a 37°C e 5% CO₂ de acordo com as orientações dos fabricantes.

3.2. Produção do secretoma

Para a produção do sobrenadante os microrganismos foram inoculados em 5 mL de BHI e incubados a 37°C por 24 horas. Uma alíquota de 200 µL do caldo bacteriano foi inoculada em 50 mL de caldo LB e incubados a 31°C±1 por 48h, sob agitação em shaker a 200 rpm. O caldo obtido foi centrifugado a 10.000 giros por 4 minutos, para sedimentação das células bacterianas. O sobrenadante gerado foi coletado, filtrado com filtro para de 0,22 micras e liofilizado.

Este estudo foi realizado com 5 sobrenadantes, produzidos a partir de microrganismos isolados das abelhas sem ferrão *Melipona quadrifascita*, *Melipona scutellaris* e *Tetragonisca angustula*, provenientes da Coleção de Microrganismos Isolados de Abelha sem Ferrão do Laboratório de Genética Do Instituto de Biotecnologia UFU (CoMISBee).

3.3. Ensaio de citotoxicidade por redução da resazurina

O ensaio de viabilidade celular foi realizado pelo método de redução da resazurina. As linhagens celulares foram incubadas em 100 µL de meio de cultura RPMI-1640 completo em uma microplaca estéril de 96 poços com o secretoma da bactéria, cada poço deve conter um número de 10⁵ de células. A microplaca foi incubada a 37°C em uma estufa com 5% de CO₂ por 24 horas. Após essa etapa do tratamento, foi acrescentado a cada poço 20 µL do agente revelador resazurina, podendo ser lido após 4 horas de incubação nas mesmas condições ditas anteriormente.

Os experimentos foram realizados em triplicatas. A leitura da placa foi feita em uma leitora de placa com comprimentos de onda de 570 e 600nm e as absorbâncias foram utilizadas na fórmula de cálculo da viabilidade celular.

3.4. Ensaio de genotoxicidade *in vitro*

O ensaio de genotoxicidade foi feito pelo teste de micronúcleo *in vitro* utilizando a linhagem C2C12. Foram escolhidas três concentrações do secretoma que apresentarem

viabilidade celular acima de 50%. As células foram cultivadas na presença dos secretomas por 24 horas e por mais 24 horas na presença de citocalasina b. Após esse período, elas foram fixadas em PBS/formol 10%, coradas com o fluorocromo Hoechst 33258 e analisadas em microscópio invertido de fluorescência. Foi contado um valor mínimo de 2000 células binucleadas por concentração e apenas os micronúcleos presentes em células binucleadas foram considerados na determinação da frequência de micronúcleos.

3.5. Análises estatísticas

As comparações entre os grupos de dados das linhagens utilizadas foram feitas usando o teste de variância One-way (ANOVA), seguido pelo pós-teste de Bonferroni. Valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significantes. O processamento e plotagem de dados foram realizados usando aplicativos especializados GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc., EUA).

4. RESULTADOS

Primeiramente, foram produzidos os secretomas conforme a metodologia e a partir destes liofilizados, foi utilizado 5 deles para a realização dos testes de citotoxicidade e de genotoxicidade. Sendo eles: MQ-1B, MQ-27, MQ-9A, MS-31 e MS-24. O meio de cultura usado na produção dos secretomas, chamado LB, foi utilizado como controle negativo nos dois experimentos, a fim de analisar se ele seria tóxico ou não.

Após, foram realizados os testes de citotoxicidade. Esse experimento tem por finalidade determinar se os secretomas possuem capacidade de inibir a proliferação celular ou ocasionar danos e lesões às células que podem levar a morte celular. Nesse contexto, é baseado em reações

de oxidação-redução da resazurina, esse composto é usado como um indicador REDOX que irá sofrer alteração colorimétrica em resposta à redução metabólica celular.

Assim, esse teste foi realizado para os 5 secretomas nas seguintes linhagens celulares murinas tumorigênicas de sarcoma (TG180) e melanoma (B16F10) e também de miócito (C2C12). Foram feitas 6 microplacas de 96 poços, duas para cada linhagem celular, com dois tratamentos diferentes. O primeiro tratamento foi feito com os secretomas MR-1B, MR-27 e MR-9A e o segundo foi os secretomas MS-3, MS-24 e também o caldo LB. O tratamento foi realizado com 7 concentrações diferentes, sendo elas: 1000 $\mu\text{g/mL}$, 500 $\mu\text{g/mL}$, 250 $\mu\text{g/mL}$, 125 $\mu\text{g/mL}$, 62.5 $\mu\text{g/mL}$, 31.25 $\mu\text{g/mL}$, 15.625 $\mu\text{g/mL}$. Após essa etapa, foram então lidas na leitora de placa (espectrofotômetro) a 570 e 600 nm. Sendo possível observar as fotos de cada uma das placas feitas abaixo.

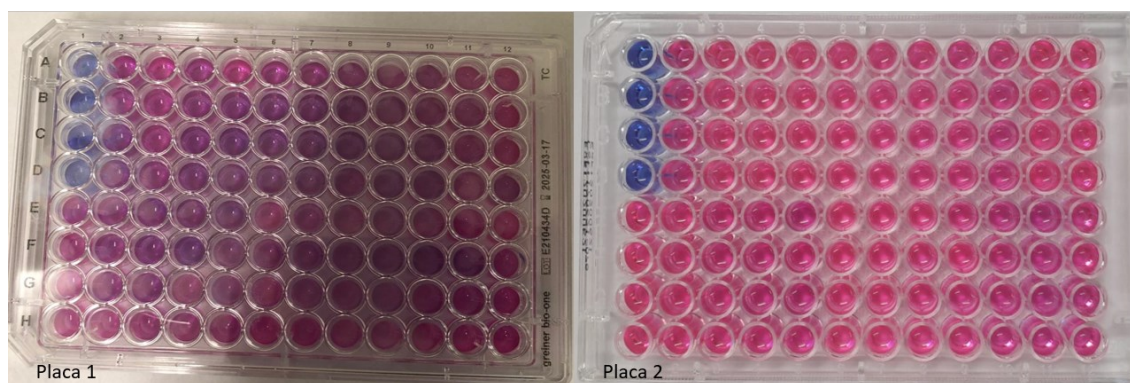


Imagem 1: microplacas da linhagem celular tumorigênica de melanoma (B16F10), sendo a placa 1 primeiro tratamento e a placa 2 o segundo tratamento

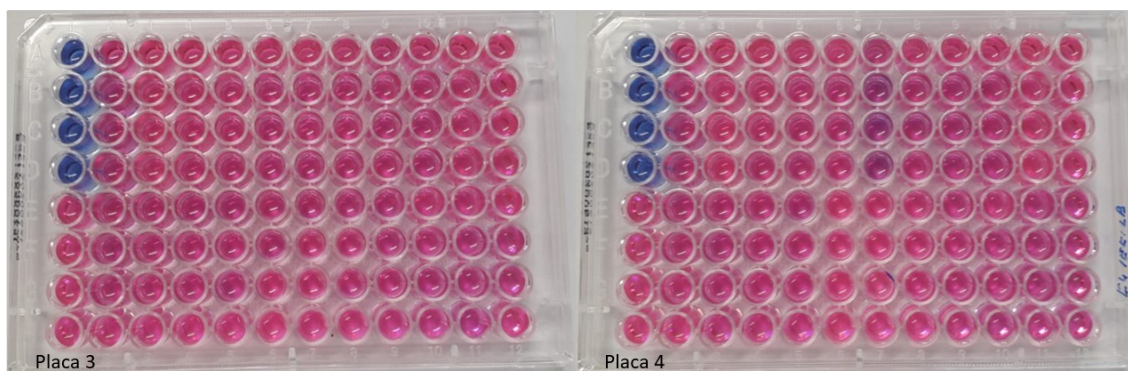


Imagem 2: microplacas da linhagem celular de miócito (C2C12), sendo a placa 3 primeiro tratamento e a placa 4 o segundo tratamento

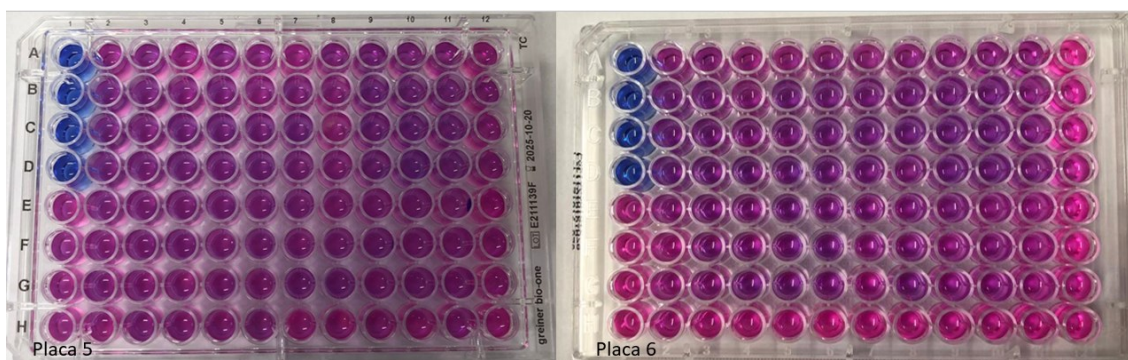


Imagem 3: microplacas da linhagem celular tumorigênica de sarcoma (TG180), sendo a placa 5 primeiro tratamento e a placa 6 o segundo tratamento

Nos 96 poços da placa pode ser observado diferentes colorações entre a cor Rosa e Azul. Os poços que possuem a coloração mais para o espectro azul indicam que houve morte celular, considerando que não houve metabolismo celular para realizar a redução da resazurina. Já as partes que permaneceram na cor rosa, houve metabolização nas células e então houve a redução da resazurina para resorufina, esse último composto tendo uma cor rosa forte.

A partir dos dados obtidos na leitura de absorbância é possível formar a curva do IC50 com auxílio do software GraphPad Prism 8. O IC50 é a concentração capaz de matar 50% das células no experimento. Abaixo tem os gráficos de 1 a 6 de cada secretoma feito.

Linhagem B16F10

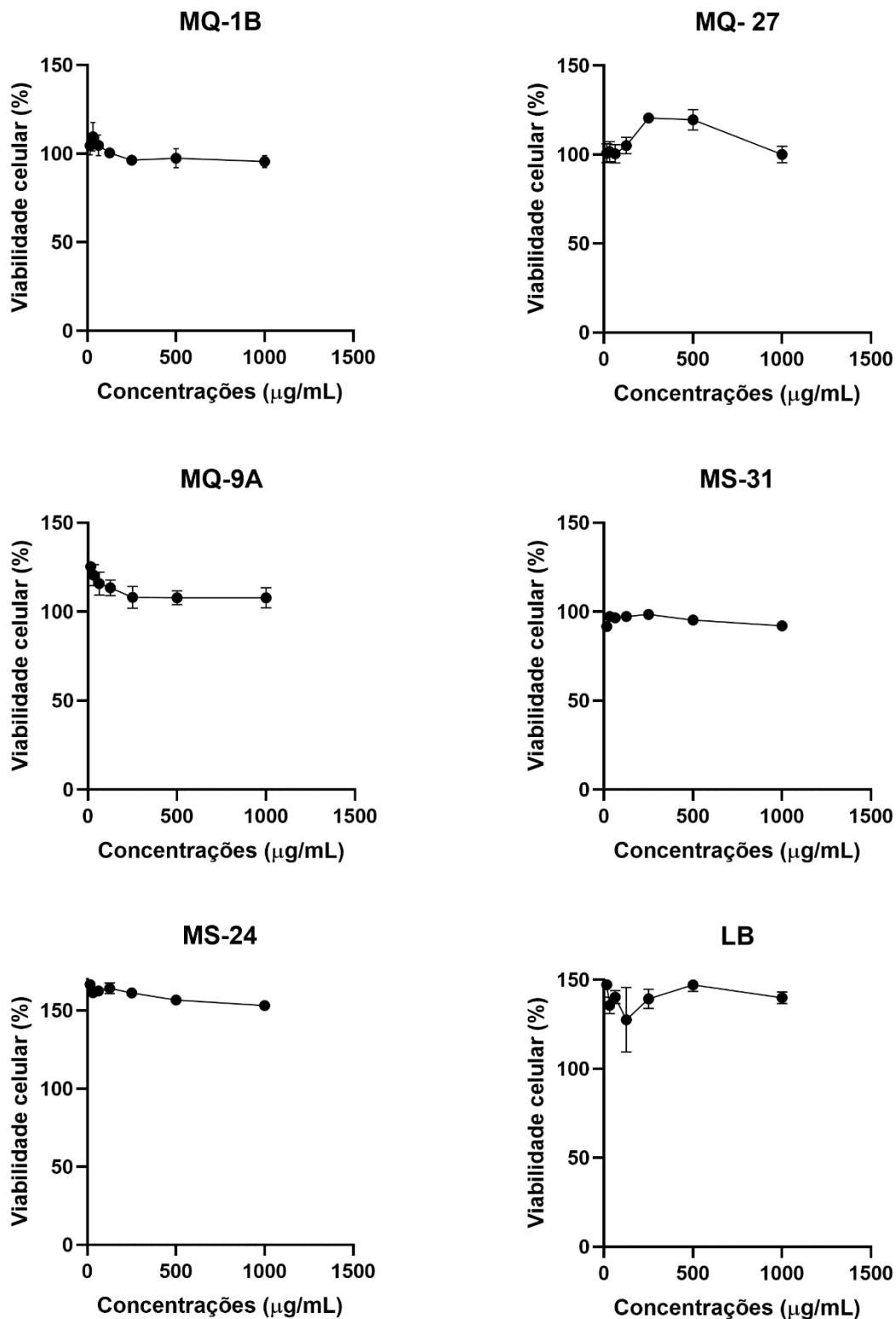


Imagem 4: Gráficos viabilidade celular linhagem B16F10 de melanoma murino.

Linhagem C2C12

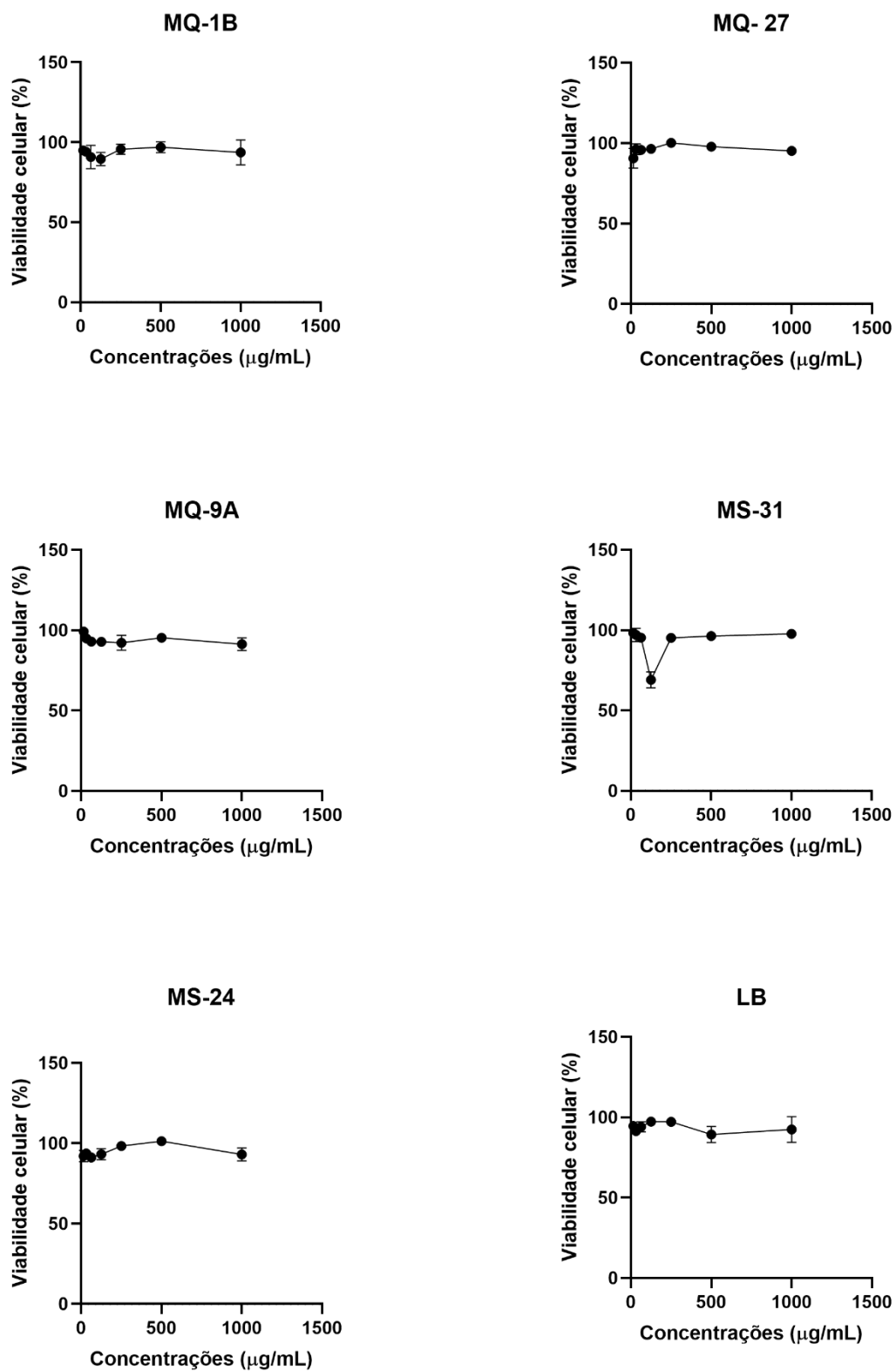


Imagem 5: Gráficos viabilidade celular linhagem C2C12 de miócito murino.

Linhagem TG180

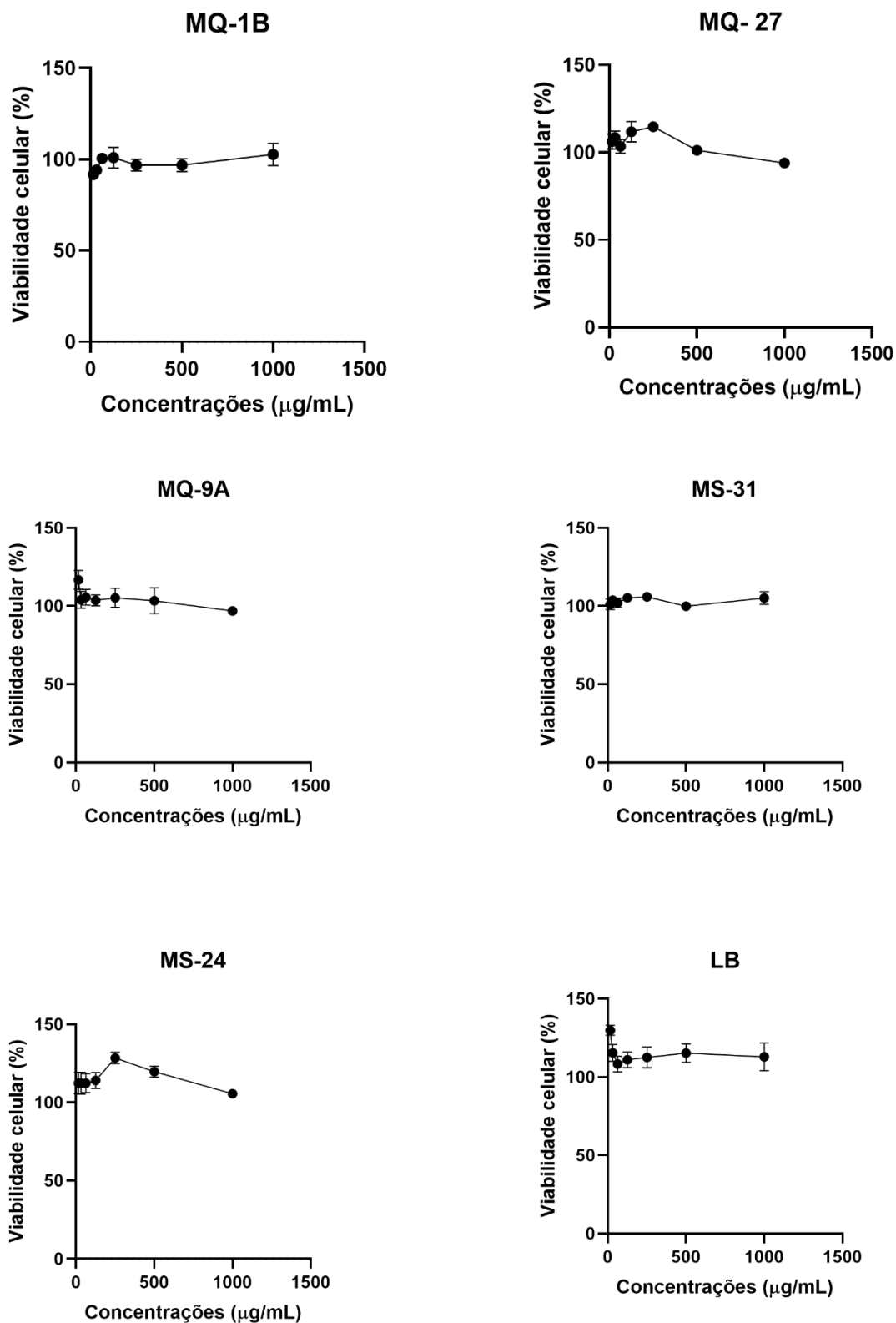


Imagem 6: Gráficos viabilidade celular linhagem TG180 de sarcoma murino.

Assim, todos os IC50 foram listados na tabela 1. Com esses dados, pode ser observado que os IC50 desses secretomas foram elevados, não sendo considerados citotóxicos nas concentrações utilizadas para o grupo de células testados.

LINHAGEM	MQ-1B	MQ-27	MQ-9A	MS-31	MS-24	LB
B16F10	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
TG180	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
C2C12	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000

Tabela 1: IC50 dos secretomas testados nas respectivas linhagens celulares.

Por fim, realizou-se o teste de genotoxicidade para as células não-tumorais da linhagem C2C12. Este teste representa uma avaliação de danos cromossômicos ocorridos quando as células são expostas a agentes genotóxicos, a partir da indução de micronúcleos. O teste de micronúcleo foi realizado utilizando as 3 maiores concentrações de cada secretoma usado no ensaio de citotoxicidade (1000 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL), um controle negativo (meio LB) e um controle positivo de Metilmetanosulfonato (MMS) na concentração de 0,3mM. Esse último é um agente alquilante, que causa danos cromossômicos no DNA e portanto induz a formação de micronúcleos.

Assim, foi obtido o gráfico abaixo no qual é possível concluir que não houve resultados positivos para a indução de micronúcleos, uma vez que não foi observada frequência de micronúcleos nos extratos avaliados, assim como no controle negativo. Já no controle positivo observou-se a presença de micronúcleos. Dessa forma, esses compostos não foram capazes de induzir genotoxicidade frente ao modelo experimental utilizado.

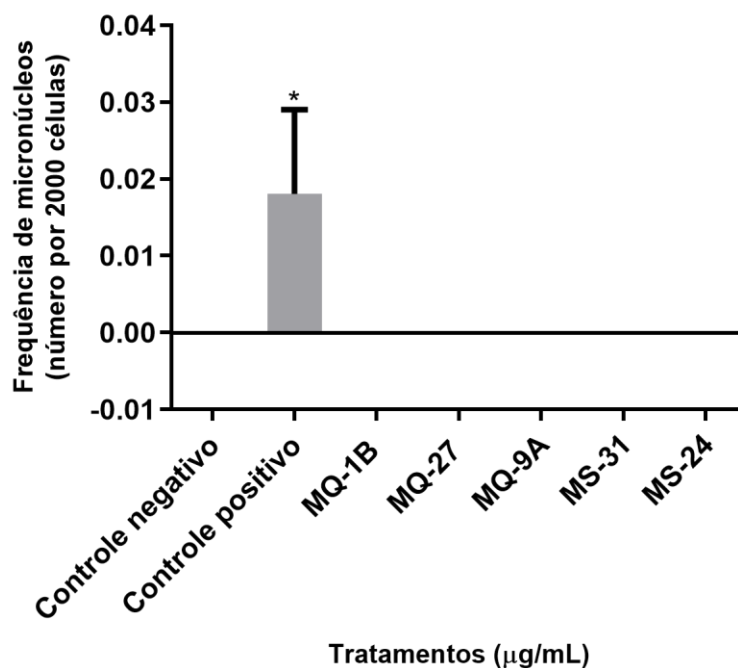


Imagem 7: Gráfico representativo da frequência de micronúcleos em células da linhagem C2C12 tratadas com os cinco diferentes secretomas.

5. DISCUSSÃO

O grupo de pesquisadores do LABGEN/IBTEC - UFU realizou um estudo em que descreveram a microbiota presente no alimento larval de quatro espécies de abelha sem ferrão brasileiras, sendo elas *Frieseomelitta varia*, *Melipona quadrifasciata*, *Melipona scutellaris* e *Tetragonisca angustula*. Esses microrganismos realizam papéis essenciais na manutenção das colônias, maturação do pólen e fermentação do mel. Nesse contexto, determinaram que os filos bacterianos mais abundantes foram *Firmicutes* e *Proteobacteria* e foram divididos em 26 gêneros diferentes, sendo o mais abundante o *Lactobacillus* (SANTOS *et al.*, 2023). Assim, também foi observado que esses microrganismos poderiam ser fonte para descoberta de compostos bioativos, pois podem produzir moléculas com atividades antioxidantes, antimicrobianas, anticancerígenas, as quais são características importantes para desenvolvimento de novos medicamentos e terapias para doenças.

As bactérias encontradas no alimento larval de abelha sem ferrão possuem propósitos biotecnológicos como, por exemplo, o uso em probióticos, agentes de controle biológicos, produtores de enzimas e biomoléculas ativas para tratamento de patologias. Assim, o grupo do LABGEN/IBTEC - UFU também realizou um estudo para análise da atividade antimicrobiana dos secretomas, visto que há uma preocupação global sobre a resistência de alguns patógenos sobre medicamentos já existentes sendo necessária a pesquisa de novas moléculas para tratamento.

Por meio deste trabalho, foi demonstrado que os sobrenadantes apresentaram atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, incluindo cepas multirresistentes. Entretanto, também apresentaram maior efeito em bactérias patogênicas sensíveis do que em cepas resistentes e alguns deles restabeleceram o efeito dos antibióticos testados em cepas resistentes de bactérias Gram-positivas. Os autores concluíram que é necessário pesquisas adicionais para que as biomoléculas sejam utilizadas como antibióticos isolados ou em sinergia com outros antimicrobianos já existentes no mercado em uma forma de terapia combinada (SANTOS et al., 2022). Dessa forma, como essas moléculas possuem potencial de serem usadas para tratamento em seres humanos e animais, é importante que essas moléculas não sejam citotóxicas e genotóxicas, com o intuito de não gerar efeitos adversos, fato que o presente trabalho conseguiu demonstrar.

Os probióticos derivados de microbiotas de abelhas também tem sido grande alvo de atenção nos últimos estudos, eles são caracterizados como microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro. Eles têm mostrado diferentes propriedades, incluindo diminuir a ocorrência de diarreia, alergia, intolerância à lactose e câncer (MUSTAR; IBRAHIM, 2022). Desse modo, as moléculas secretadas desses microrganismos poderiam ter propriedades citogenotóxicas que atuariam no

câncer sarcoma e melanoma de forma a serem usadas como moléculas para tratamento em quimioterapia.

Além disso, estão sendo realizados estudos para investigar a microbiota do intestino das abelhas melíferas. SADIK et al. selecionaram cepas probióticas potenciais para serem aplicadas em formulações de alimentos e dentro disso fizeram teste de atividade antitumoral em câncer de cólon. Esse teste resultou em uma redução significativa na viabilidade da linha celular e indicaram que três microrganismos tiveram propriedades antiproliferativas, uma deles sendo do gênero *Lactobacillus*, o *Lactobacillus salivarius*. Esse gênero é um dos três mais presentes nos secretomas usados no projeto, sendo assim poderia ter a possibilidade de uma atividade parecida de retardar o crescimento celular nos cânceres melanoma e sarcoma, entretanto este fato não foi observado após os ensaios realizados.

6. CONCLUSÃO

Um dos principais tipos de tratamento para o câncer é a quimioterapia, entretanto esses fármacos são muito tóxicos e danosos ao paciente. Dessa forma, o objetivo da pesquisa era bioprospectar novas biomoléculas capazes de eficientemente matar células cancerígenas e ao mesmo tempo não serem tóxicas ao organismo, realizando testes de citogenotoxicidade em células normais.

Conforme os dados obtidos os cinco secretomas analisados não foram genotóxicos para a linhagem não-tumoral de miócito (C2C12) testada, pois não houve indução de micronúcleos nas maiores concentrações utilizadas na pesquisa. E também não foram citotóxicas, já que no

ensaio de citotoxicidade não obtiveram bons resultados em eliminar as células em linhagens cancerígenas de sarcoma (TG180) e melanoma (B16F10).

Assim, a hipótese de que essas biomoléculas pudessem ser novos quimioterápicos foi refutada, porém elas ainda podem ser utilizadas em outras patologias. Por exemplo, os secretomas foram usados para testes de atividade antimicrobiana e apresentaram bons resultados. Neste contexto, o fato do secretoma não ter apresentado citotoxicidade e genotoxicidade em nossos experimentos é positivo para possibilitar um futuro uso clínico.

7. REFERÊNCIAS

ALVES, Erica Assis; TAVARES, Gabriel Guimarães; BORGES, Leonardo Luiz. Importância Da Atenção Farmacêutica Para a Quimioterapia Antitumoral. **Revista Brasileira Militar de Ciências**, vol. 6, nº 15, 2020. <https://doi.org/10.36414/rbmc.v6i15.35>.

ELISE, Fernanda; KELLER, Márcia. Quimioterapia : Efeitos Colaterais e Influência no Estado Nutricional de Pacientes Oncológicos Chemotherapy : Side Effects and Influence on the Nutritional Status of Cancer Patients. , p. 100–105, 2016. .

FERREIRA, Rafael Marini; FERREIRA, Rafael Marini; PROF, Orientador; APARECIDO, Jesus. SECRETOMA DA BACTÉRIA FITOPATOGÊNICA *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita filho”**, 2009. .

GUO, Lu; KANG, Jum Soon; KANG, Nam Jun; CHOI, Young Whan. S-petasin induces apoptosis and inhibits cell migration through activation of p53 pathway signaling in melanoma B16F10 cells and A375 cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, vol. 692, nº August, p. 108519, 2020. DOI 10.1016/j.abb.2020.108519. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108519>.

INCA. Câncer de pele melanoma. 2022a. .

INCA. Como surge o câncer. 2022b. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/como-surge-o-cancer>.

INCA. **Ministério da Saúde Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva Ministério da Saúde Instituto Nacional de Câncer.** [S. l.: s. n.], 2023a.

INCA. Tratamento de quimioterapia . 2023b. .

KARAM REBOLHO ORIENTADORA, Gabriela; REGINA BONINI DOMINGOS, Claudia. **Quimiorresistência em células da linhagem de câncer de mama canino CF41 e sua relação com a PARP e seu inibidor.** [S. l.: s. n.], [s. d.].

MALTA, Tathiane M.; SOKOLOV, Artem; GENTLES, Andrew J.; BURZYKOWSKI, Tomasz; POISSON, Laila; WEINSTEIN, John N.; KAMIŃSKA, Bożena; HUELSKEN, Joerg; OMBERG, Larsson; GEVAERT, Olivier; COLAPRICO, Antonio; CZERWIŃSKA, Patrycja; MAZUREK, Sylwia; MISHRA, Lopa; HEYN, Holger; KRASNITZ, Alex; GODWIN, Andrew K.; LAZAR, Alexander J.; CAESAR-JOHNSON, Samantha J.; ... WIZNEROWICZ, Maciej. Machine Learning Identifies Stemness Features Associated with Oncogenic Dedifferentiation. **Cell**, vol. 173, nº 2, p. 338-354.e15, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.034>.

MUSTAR, Suraiami; IBRAHIM, Nurliayana. A Sweeter Pill to Swallow: A Review of Honey Bees and Honey as a Source of Probiotic and Prebiotic Products. **Foods**, vol. 11, nº 14, 1 jul. 2022. <https://doi.org/10.3390/foods11142102>.

NACEV, Benjamin A.; JONES, Kevin B.; INTLEKOFER, Andrew M.; YU, Jamie S.E.; ALLIS, C. David; TAP, William D.; LADANYI, Marc; NIELSEN, Torsten O. The

epigenomics of sarcoma. **Nature Reviews Cancer**, vol. 20, n° 10, p. 608–623, 2020. DOI 10.1038/s41568-020-0288-4. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41568-020-0288-4>.

NATALE, Paolo; BRÜSER, Thomas; DRIESSEN, Arnold J M. Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane—Distinct translocases and mechanisms. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, vol. 1778, n° 9, p. 1735–1756, 2008. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.07.015>.

PRADO, Bernardete Bisi Franklin do. Influência dos hábitos de vida no desenvolvimento do câncer. **Ciência e Cultura**, vol. 66, n° 1, p. 21–24, 2014. <https://doi.org/10.21800/s0009-67252014000100011>.

PRIHANTONO; FARU, Muhammad. Breast cancer resistance to chemotherapy: When should we suspect it and how can we prevent it? **Annals of Medicine and Surgery**, vol. 70, n° August, p. 102793, 2021. DOI 10.1016/j.amsu.2021.102793. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.amsu.2021.102793>.

SADIK, Mahmoud W; SAMIR, Rasha; KHALAFALLA, Galal M; ALI, Mahmoud A M; MOHAMED, Rasha S. **NOVEL POTENTIAL PROBIOTICS FROM GUT MICROBIOTA OF HONEYBEES (APIS MELLIFERA) IN CLOVER FEEDING SEASON IN EGYPT.** [*S. l.: s. n.*], 2019. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/337945057>.

SANTOS, Ana Carolina Costa; BORGES, Luiza Diniz Ferreira; ROCHA, Nina Dias Coelho; DE CARVALHO AZEVEDO, Vasco Ariston; BONETTI, Ana Maria; DOS SANTOS, Anderson Rodrigues; DA ROCHA FERNANDES, Gabriel; DANTAS, Raquel Cristina Cavalcanti; UEIRA-VIEIRA, Carlos. Bacteria, yeasts, and fungi associated with larval food of

Brazilian native stingless bees. **Scientific reports**, vol. 13, n° 1, p. 5147, 1 dez. 2023. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-32298-w>.

SANTOS, Ana Carolina Costa; MALTA, Serena Mares; DANTAS, Raquel Cristina Cavalcanti; COELHO ROCHA, Nina Dias; ARISTON DE CARVALHO AZEVEDO, Vasco; UEIRA-VIEIRA, Carlos. Antimicrobial activity of supernatants produced by bacteria isolated from Brazilian stingless bee's larval food. **BMC Microbiology**, vol. 22, n° 1, 1 dez. 2022. <https://doi.org/10.1186/s12866-022-02548-4>.

SIEGEL, Rebecca L.; MILLER, Kimberly D.; FUCHS, Hannah E.; JEMAL, Ahmedin. Cancer Statistics, 2021. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, vol. 71, n° 1, p. 7–33, 2021. <https://doi.org/10.3322/caac.21654>.

TAVARES, Isabella Morais; BOTELHO, Bruno Henrique Lopes Lourenço; DONADEL, Guilherme; COLLA, Itaruã Marchi; BELETTINI, Salviano Tramontin; LOURENÇO, Emerson Luiz Botelho; VELASQUEZ, Leonardo Garcia. Efeitos da Curcuma longa em animais sadios submetidos a quimioterapia. **Brazilian Journal of Development**, vol. 5, n° 12, p. 30697–30719, 2019. <https://doi.org/10.34117/bjdv5n12-183>.

TSOLIS, Konstantinos C.; HAMED, Mohamed Belal; SIMOENS, Kenneth; KOEPFF, Joachim; BUSCHE, Tobias; RÜCKERT, Christian; OLDIGES, Marco; KALINOWSKI, Jörn; ANNÉ, Jozef; KORMANEC, Jan; BERNAERTS, Kristel; KARAMANOU, Spyridoula; ECONOMOU, Anastassios. Secretome dynamics in a gram-positive bacterial model. **Molecular and Cellular Proteomics**, vol. 18, n° 3, p. 423–436, 2019. <https://doi.org/10.1074/mcp.RA118.000899>.

ZUBAIR, Muhammad; KHAN, Farhan Anwar; MENGHWAR, Harish; FAISAL, Muhammad; ASHRAF, Muhammad; RASHEED, Muhammad Asif; MARAWAN, Marawan

A.; DAWOOD, Ali; CHEN, Yingyu; CHEN, Huanchun; GUO, Aizhen. Progresses on bacterial secretomes enlighten research on Mycoplasma secretome. **Microbial Pathogenesis**, vol. 144, n° March, p. 104160, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104160>.