



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
(UFMG)
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
LaßB - Laboratório de Biotecnologia e Bioensaios

PROJETO DE PESQUISA

Título do projeto: Seleção e cultivo de fungos sob modulação para elicitação de metabólitos secundários como modelos de fármacos anti-Alzheimer

Coordenadora: Profa. Jacqueline Aparecida Takahashi

I. Introdução e justificativa

A descoberta de como curar doenças letais e a produção em larga escala de medicamentos foi, sem dúvida, um dos maiores impulsionadores da prosperidade humana e do bem-estar no planeta. Porém, em 2019, o número de pessoas afetadas por demência foi estimado em 50 milhões, com a previsão preocupante de esse número ser triplicado até 2050 e novos fármacos são ainda necessários. Fungos produzem metabólitos já utilizados como medicamentos como penicilina, cefalosporina, ciclosporina A e estatinas, além de inibidores de acetilcolinesterase, úteis em distúrbios neurodegenerativos. Ferramentas modernas como manipulação genética baseada em análise transcriptômica, indução de mutações, clonagem e inserção de plasmídeos heterólogos em espécies com genomas conhecidos permitiram a produção de grandes quantidades de metabólitos por espécies anteriormente não produtoras. Moduladores epigenéticos podem ativar rotas biossintéticas envolvendo genes transcricionais previamente silenciados em fungos, levando à expressão de novos metabólitos. A epigenética compreende modificações nucleares que produzem fenótipos hereditários na expressão gênica, porém sem modificar o sequenciamento genético do DNA.

II. Objetivos geral e específicos

Geral

Produzir extratos e metabólitos fúngicos capazes de inibir a acetilcolinesterase, uma enzima chave envolvida na doença de Alzheimer

Específicos

Cultivar fungos usando moduladores de cromatina (epigenéticos)

Determinar perfis cromatográficos dos extratos por CLAE, cultivar fungos em escala ampliada para isolar e identificar metabólitos bioativos

Otimizar o processo e estudar sua sustentabilidade

Formar recursos humanos

Divulgar o trabalho em periódicos indexados e congressos

III. Metodologia

Os fungos serão cultivados em triplicata, na presença de moduladores epigenéticos por 28 dias, a 25 °C. Controles são realizados. Após crescimento fúngico, extratos serão obtidos e 5 condições de cultivo serão selecionadas, segundo rendimento, performance na plataforma multi-ensaios e perfil cromatográfico demonstrando presença de metabólitos elicitados. Os metabólitos serão identificados por RMN ou espectrometria de massas, sem purificação prévia e seu potencial de neuroproteção será avaliado em *Drosophila melanogaster*.

IV. Cronograma de execução

Atividade	Mês de execução	Indicador de desempenho
Reativação de linhagens, obtenção e armazenamento dos dados morfológicos	1	Dados morfológicos de 20 espécies armazenados
Cultivo dos fungos selecionados sob modulação epigenética com moduladores de cromatina	2-4	20 espécies cultivadas 20 extratos produzidos em triplicata
Bioensaios de inibição de acetilcolinesterase	4	60 extratos testados; 60 laudos emitidos
Determinação dos perfis por CLAE na plataforma de desreplicação dos extratos fúngicos	5	20 perfis determinados e comparados com o perfil basal (controle)
Seleção de cinco condições para cultivos em escala ampliada	5	Lista de priorização de extratos segundo rendimento, performance na plataforma multi-ensaios e perfil cromatográfico com presença de metabólitos elicitados
Cultivos em escala ampliada, isolamento biomonitorado e determinação estrutural dos compostos bioativos	6-10	Pelo menos dez substâncias isoladas e identificadas (2 por extrato)
Bioensaios com os compostos isolados	11-12	Pelo menos dez substâncias testadas com IC50 determinado
Quantificação das substâncias bioativas nos extratos	13-14	Cinco substâncias mais ativas quantificadas nos extratos
Ensaio de reprodutibilidade	15-20	Repetição do cultivo para produção das 5 substâncias mais promissoras; confirmação da atividade biológica e do rendimento.
Otimização do processo e estudo de sua sustentabilidade	21-24	Condição de cultivo e/ou purificação dos 3 metabólitos mais ativos melhorada, gerando menos resíduos

Formação de recursos humanos	1-24	2 orientações de iniciação científica; 1 orientação de pós-doutorado
Participação e apresentação de trabalhos em congressos	10, 16 e 22	Participação para divulgação dos resultados em pelo menos 3 congressos nacionais ou internacionais
Preparo de PITCH	12 e 24	2 PITCHs preparados
Redação e submissão de artigos científicos	10-24	5 artigos publicados
Redação de relatório técnico	1-24	2 relatórios preparados

V. REFERÊNCIAS

Cherblanc et al., Perspectives on natural product epigenetic modulators in chemical biology and medicine. *Nat. Prod. Rep.*, 2013, 30, 605-624. *Disease International: London, UK, 2019*; Available online: <https://www.alz.co.uk/research/world-report2019>

Jimenez, P.E.; Tovar, J.; Mosquera, O.M.; Cardozo, F. Actividad Neuroprotectora de solanum ovalifolium (solanaceae) Contra la Toxicidad Inducida Por Rotenona en *Drosophila melanogaster*. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, v. 13, p. 26-34, 2017.

Lima M.T.N.S., dos Santos L.B., Bastos R.W., Nicoli, J.R., Takahashi J.A., 2018, Antimicrobial activity and acetylcholinesterase inhibition by extracts from chromatin modulated fungi, *Brazilian Journal of Microbiology*, 49, 169-176.

Takahashi, J. A., Barbosa, B. V., Martins, B. D. A., P Guirlanda, C., & AF Moura, M. (2020). Use of the Versatility of Fungal Metabolism to Meet Modern Demands for Healthy Aging, Functional Foods, and Sustainability. *Journal of Fungi*, 6(4), 223.

Zelik, P.; Lukesova, A.; Voloshko, Ludmila N.; Stys, D.; Kopecky, J. Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in cyanobacteria of the genus *Nostoc*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 2009; 24(2), 531-536