

ATIVIDADE ANTICÂNCER *in vitro* DE *Tedania ignis* (PORÍFERA: DEMOSPONGIAE) EM CÉLULAS PC-3

ANTICANCER ACTIVITY *in vitro* OF *Tedania ignis* (PORÍFERA: DEMOSPONGIAE) IN
PC-3 CELLS.

Mário Luan Silva de Medeiros¹

Emanuelle Fontenele Rabelo²

Silvia Catarina Salgado Oloris³

Michele Dalvina Correia da Silva⁴

RESUMO

O ambiente marinho é uma das principais fontes de novas entidades bioativas. Há poucos estudos sobre o potencial biotecnológico de organismos marinhos do litoral Nordeste Brasileiro. Esse estudo objetivou verificar o efeito citotóxico de um extrato aquoso da espécie *Tedania ignis* sobre a linhagem celular de câncer de próstata PC-3. Para tal, amostras da esponja foram colhidas na praia da Baixa Grande, litoral oeste do Rio Grande do Norte, Brasil. Células PC-3 foram tratadas com extrato aquoso de *Tedania ignis* em 3 diferentes concentrações (1000, 500 and 100 µg / mL). A viabilidade celular foi determinada pelo MTT e teste de exclusão pelo corante vital azul de tripan. As concentrações de 500 µg/mL e 100 µg/mL do extrato demonstraram efeito citotóxico e antiproliferativo sobre a linhagem PC-3, já a concentração de 1000 µg/mL mostrou atividade levemente citotóxica. Conclui-se que o extrato de *Tedania ignis* apresenta potencial biotecnológico e atividade anticâncer *in vitro*.

Palavras-chave: Anticâncer. Citotoxicidade. Esponja. Próstata.

ABSTRACT

The marine environment is a major source of new bioactive products. There are few studies of the biotechnological potential of marine organisms of the Brazilian Northeast coast. This study aimed to determine the cytotoxic effect of an aqueous extract of *Tedania ignis* species on prostate cancer cell line PC-3. Samples were collected from the sponge on the Baixa Grande beach, in the west coast of Rio Grande do Norte, Brazil. PC-3 cells were treated with *Tedania ignis* aqueous extract at three different concentrations (1000, 500 and 100 µg / mL). Cell viability was determined by MTT assay and trypan blue exclusion test. Concentrations of 500 µg/mL and 100 µg/mL of the extract showed cytotoxic and antiproliferative effect on PC

¹ Biotecnologista e Mestrando em Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Departamento de Ciências Animais, UFERSA, Mossoró, RN, Brasil. e-mail marioluan@oi.com.br.

² Professora Dr^a. Emanuelle Fontenele Rabelo, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Departamento de Ciências Animais, UFERSA. Mossoró, RN, Brasil. e-mail rabelo.ef@ufersa.edu.br.

³ Dr^a. Silvia Catarina Salgado Oloris, Fundação Ezequiel Dias, FUNED. Belo Horizonte, MG, Brasil. e-mail silviacso@yahoo.com.

⁴ Professora Dr^a. Michele Dalvina Correia da Silva, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Departamento de Ciências Animais, UFERSA. Mossoró, RN, Brasil. e-mail micheledalvina@ufersa.edu.br.

- 3 cell line, whereas concentration of 1000 µg/mL showed slightly cytotoxic activity. We conclude that the *Tedania ignis* aqueous extract presents biotechnological potential and in vitro anticancer activity.

Keywords: Anticancer. Cytotoxicity. Sponge. Prostate.

1 INTRODUÇÃO

O litoral brasileiro, com 8000 Km de litoral representa uma grande fonte para prospecção de novas entidades químicas biologicamente ativas (BERLINCK et al., 2004; Costa-Lotufo et al., 2009; Dresch et al., 2005; Montanari & Bolzani, 2001). Sendo o ambiente marinho, uma das principais fontes existentes para o isolamento de novas entidades bioativas, considerado a última grande fronteira (Fenical, 1998). Exemplos dessas substâncias são o C-nucleosídeo, potente antitumoral; o monoalido, inibidor da fosfolipase A₂ – PLA₂ (Fernandes et al., 2004); o lufarolido, citotóxico em células de linfoma humano; a halincondrina B, a dehidrodidemnina B utilizado para o tratamento de melanoma (Munro et al., 1999; Rinehart, 2000); as briostatinas, efetivo contra melanoma, câncer renal e colo-retal; as dolastatinas, potente atividade citotóxica e a escteinascidia 743 (ET-743), tóxico em várias linhagens de tumores (PONCET, 1999; VIEGAS et al., 2006).

Esponjas marinhas têm sido fontes de isolamento de biomoléculas ativas tais como lectinas (Dresch et al., 2008; Dresch et al., 2012; Engel et al., 1992; Mebs et al., 1985; Medeiros et al., 2010; Pajic et al., 2002; Queiroz et al., 2008; Ueda et al., 2013), inibidores de proteases (Pascual et al., 2007), alcalóides (Cavalcanti et al., 2008; Sepčić et al., 1997; Tucker et al., 2003), poliacetilenos (Kim et al., 2002) e outros metabólitos secundários (Valentin et al., 2011). Alguns compostos já foram isolados de esponjas marinhas com potencial antitumoral. É o caso dos aurantosídeos A e B, caliculina A, discodermide, girolline, motuporina, topsentim, dentre outros (Brown et al., 2001).

Acredita-se que o grande sucesso das esponjas marinhas ao disponibilizar em sua estrutura moléculas com diversas aplicações na área farmacêutica, está na sua capacidade de produzir substâncias defensivas em resposta a algum estímulo do ambiente, como infecção, mudança nutricional, competição, predação, simbiose com micro-organismos e que podem exercer efeitos benéficos e/ou maléficos sobre o organismo humano e de outros animais (Chin et al., 2006; Jimenez et al., 2007; Silva et al., 2014; Pessoa et al., 2006; Turque et al., 2007).

Tedania ignis (Duchassaing & Michelotti, 1864) se encontra distribuída por toda a costa brasileira, apresenta cor alaranjada brilhante, com espículas que provocam irritação em

contato com a pele humana sendo conhecida popularmente como esponja de fogo. A espécie já foi descrita por possuir atividades biológicas como anti-inflamatória, analgésica e antitumoral, sobre linhagens de carcinoma adrenal e leucemia. Já de espécies do mesmo gênero, foi confirmada atividade com efeito antimicrobiano e antimalárico (Brown et al., 2001; Constantino et al., 2009; Dias, 2006; Goclik et al., 1999; Iwata et al., 2005; Villate et al., 1998; Wulff, 2006).

Embora seja conhecido que os organismos marinhos apresentem a capacidade de produzir compostos químicos de grande importância biotecnológica, há uma carência de trabalhos reportando a atividade biológica de esponjas do litoral Nordeste do Brasil, além da ausência da prospecção de bioprodutos de origem marinha. Diante do exposto, o presente artigo objetivou verificar o efeito citotóxico *in vitro* do extrato aquoso da espécie *T. ignis* sobre a linhagem PC-3, confirmando seu potencial na busca de novas drogas de origem marinha com atividade anticâncer.

2 METODOLOGIA

2.1 COLETA DAS AMOSTRAS

Amostras da esponja *Tedania ignis* foram coletadas no mês de novembro de 2011 na Praia da Baixa Grande, município de Areia Branca, Estado do Rio Grande do Norte, Brasil (GPS 04°55'36.2" S, 37°08'55.4" W). Uma amostra de aproximadamente 500g foi coletada manualmente utilizando de espátula armazenada em frascos estéreis, sendo 100g da amostra fixada em etanol 70% para posterior confirmação taxonômica no Laboratório de Ecologia Marinha, do Departamento de Ciências Animais, da Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O restante da amostra foi congelada para posterior preparação do extrato.

2.1.2 Preparação do extrato

Para o extrato aquoso (EA), 10 g do material foi triturado em liquidificador industrial com 100 mL de água destilada, sendo posteriormente centrifugado a 1100 RPM por 10 min a 4°C, em seguinte, o sobrenadante foi retirado, filtrado em papel de filtro e liofilizado. O extrato permaneceu armazenado a 5°C até o momento da utilização.

2.2 MANUTENÇÃO DA LINHAGEM CELULAR PC-3

A linhagem celular de câncer de próstata PC-3 foi cedida pelo Laboratório de Biotecnologia de Polímeros Naturais, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, sendo as células mantidas em frascos plásticos para cultura (25 cm², TPP®) com o meio de cultura RPMI-1640 (Gibco®) complementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco®) e 1% de estreptomicina/penicilina (Invitrogen®), incubadas a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ (Revco®). As células foram plaqueadas quando necessário, utilizando o procedimento tripsina e EDTA para a liberação celular.

2.3 CURVA DE CRESCIMENTO

A curva de crescimento celular foi realizada durante 48 horas. Foram colocadas 1x10⁴ células/placa em placas de petri (35 x 10 mm, TPP®), e a viabilidade celular quantificada a cada 12 horas pelo método de exclusão do corante azul de tripan.

2.4 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade celular foi determinada pelo teste de exclusão do corante vital azul de tripan em células PC-3 (câncer de próstata) durante um período de incubação de 24 horas. As células foram distribuídas em placa de 96 poços de cultura estéreis de poliestireno (1x10⁴ células/mL), sendo poços determinados como tratamento contendo as concentrações de 1000 µg/mL, 500 µg/mL e 100 µg/mL do extrato. Após o período de incubação as células foram contadas em câmara de Neubauer, sendo o teste realizado em duplicata. Considerou-se como controle poços contendo somente as células e o meio de cultura RPMI-1640.

2.5 BIOENSAIO DO MTT

O bioensaio utilizado foi o descrito por Mosmann (1983). A citotoxicidade das concentrações do extrato foi verificada em linhagem celular PC-3 usando do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-íol)-2, difeniltetrazólio, Anresco®), por 24 horas de incubação a

37°C, 5% de CO₂, em atmosfera umidificada. Para tanto, 5 x 10⁴ células/placa foram cultivadas em placas de cultura estéreis de poliestireno (35 x 10 mm) contendo meio de cultura RPMI-1640 e as concentrações de 1000 µg/mL, 500 µg/mL e 100 µg/mL do (EA). Posteriormente, o meio foi retirado e acrescentado à solução de MTT (0,5 mg/mL) diluída em meio RPMI-1640, sendo as células incubadas por mais 3 horas. A seguir, a solução total foi removida e um volume de 1 mL de DMSO (dimetilsulfóxido) acrescentado. A leitura da absorbância realizou-se no espectrofotômetro UV-Mini 1240 (Shimadzu®) a 570 nm. A doxorrubicina (5 µg/mL), antineoplásico padrão, foi utilizada como controle positivo e meio contendo somente a concentração de células como controle negativo. Todo o ensaio foi realizado em triplicata.

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As comparações entre os tratamentos foram avaliadas usando análise de variância (ANOVA) de uma via nos ensaios com as células PC-3, seguida de pós-teste de Student Newman Keul's. Valores de $p < 0.05$ foram considerados significantes. Para as análises e elaboração dos gráficos, utilizou-se como ferramenta o software GraphPadPrism® versão 5.0.

3 RESULTADOS E ANÁLISE

3.1 VIABILIDADE CELULAR

Para o ensaio de proliferação celular, as células aderentes da linhagem PC-3 comportam-se de forma a não apresentarem diferenciação *in vitro*, apresentando um tempo de duplicação entre 10 a 14 horas, indicando a possibilidade de uso experimental na perspectiva de encontrar novas entidades químicas citotóxicas (Kaighn et al., 1979; Kochuparambil et al., 2011).

Diante disso, o estudo verificou a curva de crescimento celular em um período de 48 horas (FIGURA 1). Observando-se um tempo de 14 horas para que ocorra o dobramento celular e de 36 a 48 horas para que haja a morte celular.

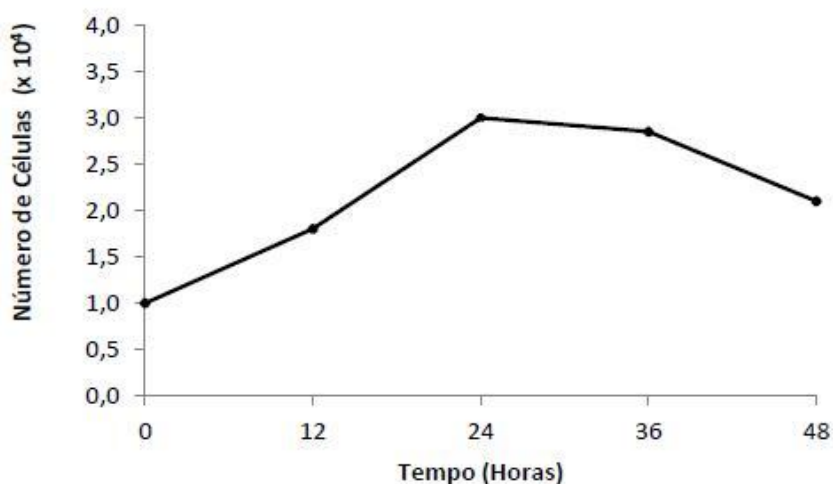


Figura 1: Curva de crescimento celular da linhagem PC-3, estabelecida e padronizada na Universidade Federal Rural do Semi-Árido.

O ensaio da viabilidade celular mostrou que o extrato aquoso da espécie *T. ignis* apresentou efeito inibitório no processo de proliferação celular (FIGURA 2). Sendo as concentrações de 500 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$ as que causaram maior inibição, verificando-se um decréscimo na viabilidade maior que 50% do total das células referente ao grupo controle.

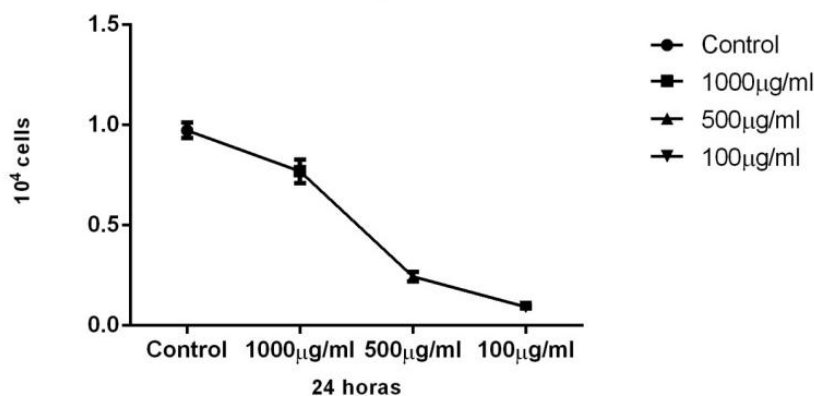


Figura 2: Efeito, na viabilidade celular, do extrato de *Tedania ignis* nas concentrações de 1000 $\mu\text{g/mL}$, 500 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$ sobre a linhagem PC-3. As concentrações 500 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram efeito inibitório estatisticamente significativo na viabilidade celular. $p < 0,05$.

De acordo com a escala de citotoxicidade proposta por Sletten & Dahl (1999) e Lonroth & Dahl (2003), a concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ do EA apresentou atividade levemente citotóxica (80 a 89 %) de viabilidade celular comparado com o grupo controle, sendo esse efeito considerado basal. Já as concentrações de 500 $\mu\text{g/mL}$ e de 100 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram citotoxicidade severa sobre a linhagem PC-3 ($< 50\%$) (FIGURA 3).

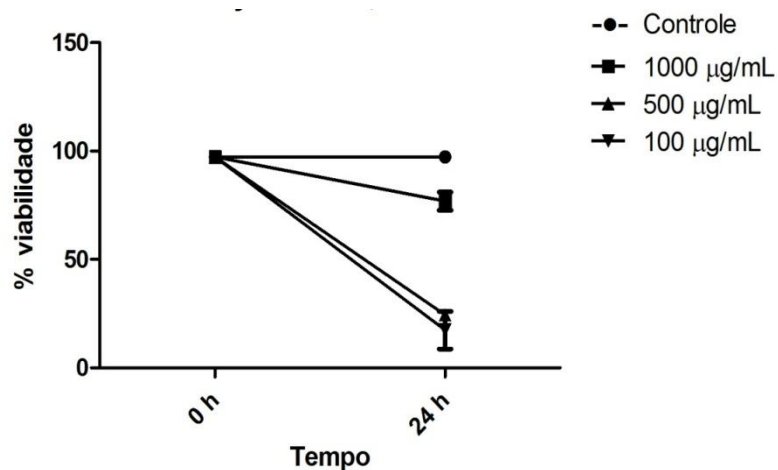


Figura 3: Efeito antiproliferativo severo do extrato de *Tedania ignis* sobre a linhagem PC 3 em um período de 24 horas de tratamento, possuindo efeito estatisticamente significativo as concentrações de 500 µg/mL e 100 µg/mL do extrato. $p < 0.05$.

3.2 ENSAIO DO MTT

As concentrações de 500 µg/mL e 100 µg/mL foram as que obtiveram o maior efeito citotóxico sobre a linhagem de câncer de próstata PC-3 (FIGURA 4). Já a concentração 1000 µg/mL não apresentou atividade citotóxica satisfatória referindo-se aos grupos controle.

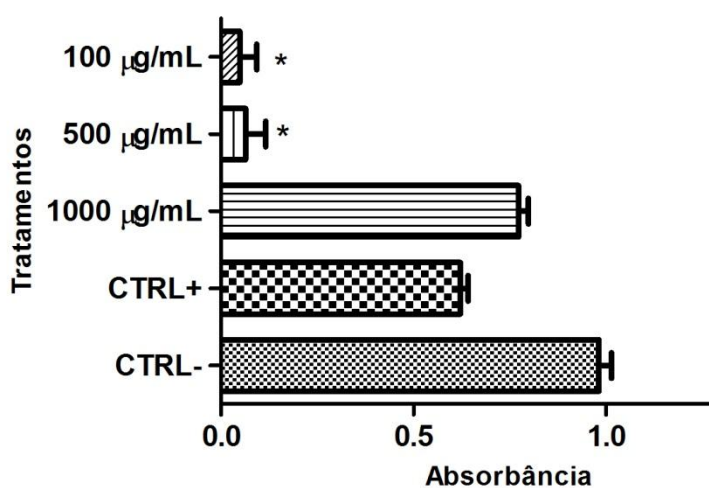


Figura 4: Efeito citotóxico do extrato aquoso da espécie *Tedania ignis* sob a linhagem celular PC-3. As concentrações 500 µg/mL e 100 µg/mL classificadas estatisticamente com efeito citotóxico significativo. $p < 0.05$.

O extrato aquoso de *T. ignis* acarretou efeito citotóxico severo significativo nas menores concentrações (500 e 100 µg/mL) comparado ao grupo controle, que continha

somente a concentração de 5×10^4 células/placa e ao grupo controle positivo, como 5 µg/mL do antineoplásico doxorrubicina.

Este estudo fornece evidências de que o extrato aquoso da esponja *T. ignis* atua como um agente citotóxico sobre células de câncer de próstata da linhagem PC-3. No modelo *in vitro* utilizado para a viabilidade celular, o extrato provocou efeitos negativos no desenvolvimento celular, impedindo assim que houvesse divisão celular, causando a morte celular. Estudos anteriores mostraram que extratos aquosos ou hidroalcoólicos de outras espécies de esponjas têm apresentado ações biológicas variadas, foi verificada citotoxicidade, desagregação e diminuição da proliferação celular sobre linhagem celular de neuroblastoma BE(2)-M17 (Ferreira et al., 2011), bloqueio do ciclo celular e indução de apoptose sobre células SW-13 (Brown et al., 2004) e citotoxicidade sobre a linhagem celular T47D (Prado et al., 2004). Extratos polares e não-polares de esponjas têm mostrado atividade citotóxica e neurotóxica (Rangel et al., 2001), bem como citotoxicidade sobre linhagens celulares de cânceres humanos (Beedessee et al., 2012).

Em um estudo realizado por Brown et al. (2001), foi mostrado que a viabilidade celular de um extrato hidroalcoólico da espécie *T. ignis* em uma concentração de 1000 µg/mL sobre células da linhagem SW-13 (carcinoma adrenal humano), não apresentou efeito antiproliferativo, permanecendo com uma viabilidade de 73%, comparado ao grupo controle. No presente estudo, foi verificado que a concentração de 1000 µg/mL não apresentou efeito citotóxico significativo sobre a linhagem PC-3, confirmando o resultado encontrado por Brown et al. (2001). Diante desse resultado é importante ressaltar que o complexo químico de qualquer entidade química possui relevante interferência no processo de absorção da mesma pela célula, podendo interferir na sua proliferação, na adesão e na função celular (Oliveira, 2009), o que não foi verificado nessa concentração testada.

O extrato de *T. ignis* provocou um efeito antiproliferativo sobre a linhagem PC-3, principalmente na concentração de 100 µg/mL, esse efeito dá-se pelo fato do complexo químico da esponja possuir um variável mecanismo farmacodinâmico, aumentando significativamente o seu potencial terapêutico, além de sua rica composição de estruturas químicas altamente complexas (Costa-Lotufu et al., 2009; Mebs et al., 1985; Sevcik & Barboza, 1983).

Dessa rica complexidade de substâncias químicas que provocam mecanismos biológicos diversificados, podemos citar a Tedanolide, uma substância isolada da *T. ignis* em 1984 o qual demonstrou uma rigorosa atividade inibitória no crescimento celular em linhagens KB, PS e leucemia murina P338 (Iwata et al., 2005). Outras substâncias com características

de polímeros do tipo alquilpiridíneos também provocaram a formação de poros na membrana celular, promovendo muitas ações biológicas em células, tais como citotoxicidade (Tucker et al., 2003) hemólise, ação anti-colinesterase (Sepčić et al., 1997), genotoxicidade e poliploidia (Cavalcanti et al., 2008). Poliacetilenos também tem sido relatados como possíveis inibidores de proteínas necessárias para a replicação do DNA (Kim et al., 2002), desenvolvendo efeito citotóxico.

Diversos extratos de espécies de esponjas marinhas também têm apresentado outras proteínas constituintes, tais como inibidores de dipeptidil-peptidases IV (serino aminopeptidases ligadas à membrana, com sítio ativo voltado para a face extracelular) (Pascual et al., 2007), uma proteína formadora de poros na membrana (Mangel et al., 1992) e uma proteína citolítica, conhecida como suberitina (Cariello & Zanetti, 1979). Outras biomoléculas comumente extraídas em soluções aquosas como proteínas, podem ser responsáveis pela ação citotóxica e antiproliferativa do extrato aquoso de *T. ignis*, como alcalóides, poliacetilenos também podem estar presentes em extratos aquosos e desenvolver citotoxicidade. Tais biomoléculas desenvolvem funções que podem influenciar a integridade celular e, assim, promover deficiências estruturais e funcionais, podendo resultar em morte celular, como foi verificado ao utilizar as concentrações de 500 e 100 µg/mL do extrato da esponja *T. ignis*.

A rica composição química que o filo Porífera compõe é muito extensa (Sevcik & Barboza, 1983) e estudos de fracionamento dos diversos compostos bioativos do extrato são necessários para uma melhor elucidação da substância química e o seu respectivo sítio de atividade biológica.

Assim, o presente estudo contribuiu com o desenvolvimento na prospecção de novos bioprodutos de origem marinha com atividade anticâncer *in vitro*, nesse caso possuindo efeito citotóxico sobre células cancerígenas de próstata humana.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em conclusão, o presente estudo observou uma severa atividade citotóxica do extrato aquoso da espécie *Tedania ignis* sobre a linhagem celular de câncer de próstata PC-3, atividade essa que depende tanto da complexa composição química do extrato quanto das diferentes concentrações do extrato, tendo as concentrações de 500 µg/mL e 100 µg/mL as que provocaram o efeito citotóxico. Evidenciando assim o grande potencial da região do

litoral do Nordeste do Brasil como uma fonte potencial de se descobrir compostos com promissoras atividades biotecnológicas, em especial no combate ao câncer.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Laboratório de Biotecnologia de Polímeros Naturais, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN pela doação da linhagem celular.

REFERÊNCIAS

- BROWN, J. W. et al. Effects of marine sponge extracts on mitogen-activated protein kinase (MAPK/ERK_{1,2}) activity in SW-13 human adrenal carcinoma cells. **Toxicol**, v. 39, p. 1835-1839, 2001.
- BERLINCK, R. G. S. et al. Challenges and Rewards of Research in Marine Natural Products Chemistry in Brazil. **Journal Natural Products**, v. 67, p. 510–522, 2004.
- BROWN, J. W. et al. Extracts from two marine sponges lower cyclin B1 levels, cause a G2/M cell cycle block and trigger apoptosis in SW-13 human adrenal carcinoma cells. **Toxicol**, v. 43, p. 841-846, 2004.
- BEEDESSEE, G. et al. Cytotoxic activities of hexane, ethyl acetate and butanol extracts of marine sponges from Mauritian Waters on human cancer cell lines. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 34, p. 397-408, 2012.
- CARIELLO, L. & ZANETTI, L. Suberitine; the toxic protein from the marine sponge *Suberites domuncula*. **Comparative Biochemistry Physiology, Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 64, p. 15–19, 1979.
- CHIN, Y. W. et al. Drug discovery from natural sources. **Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 8, p. 239-253, 2006.
- CAVALCANTI, B. C. et al. Cytotoxicity and genotoxicity of ingenamine G isolated from the Brazilian marine sponge *Pachychalina alcaloidifera*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 147, p. 409-415, 2008.
- COSTA-LOTUFO, L. V.; WILKE, D. V.; JIMENEZ, P. C. Organismos Marinhos como Fonte de Novos Fármacos: histórico e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, p. 703-716, 2009.
- COSTANTINO, V. et al. Tedanol: a potent anti-inflammatory ent-pimarane diterpene from the Caribbean Sponge *Tedania ignis*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 7542-7547, 2009.

DRESCH, R. R. et al. Detecção de atividade lectínica e atividade hemolítica em extratos de esponjas (Porifera) nativas da costa atlântica do Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 16-22, 2005.

DIAS, A. S. F. **Lectina da esponja marinha *Tedania ignis***: purificação, caracterização e interação com leishmanias. 2006, 68 p. Dissertação (Mestrado) — Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2005.

DRESCH, R. R. et al. ACL-I, a lectin from the marine sponge *Axinella corrugata*: Isolation, characterization and chemotactic activity. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 148, p. 23-30, 2008.

DRESCH, R. R. et al. Biological activities of ACL-I and physicochemical properties of ACL-II, lectins isolated from the marine sponge *Axinella corrugata*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 161, p. 365-370, 2012.

ENGEL, M. et al. A novel galactose- and arabinose-specific lectin from the sponge *Pellina semitubulosa*: isolation, characterization and immunobiological properties. **Biochimie**, v. 74, p. 527-537, 1992.

FERNANDES, J. et al. Alternativas contra o câncer. **Scientific American Brasil**, v. 22, p. 12-13, 2004.

FERREIRA, M. et al. Cytotoxic activity of extracts of marine sponges from NW Spain on a neuroblastoma cell line. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 32, p. 430-437, 2011.

GOCLIK, E; KÖNIG, G. M; WRIGHT, A. D. Collection and secondary metabolite investigations of marine organisms from the two Azorean Islands Faial and São Jorge. Arquipélago. **Life and Marine Sciences**, v. 17^a, p. 43-49, 1999.

GANIKO, L. et al. Paracoccin, an N-acetyl-glucosamine-binding lectin of *Paracoccidioides brasiliensis*, is involved in fungal growth. **Microbes and Infection**, v. 9, p. 695-703, 2007.

IWATA, Y; TANINO, K; MIYASHITA, M. Synthetic Studies of Tedanolide, a Marine Macrolide Displaying Potent Antitumor Activity. Stereoselective Synthesis of the C(13)-C(23). **Segment Organic Letters**, v. 7, p. 2341-2344, 2005.

JIMENEZ, P. C. et al. Cytotoxic activity of dichloromethane extract fractions obtained from *Eudistoma vannamei* (Tunicata: Ascidiacea). **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 151, p. 391-398, 2007.

KAIGHN, M. E. et al. Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). **Investigative Urology**, v. 17, p. 16-23, 1979.

KIM, D. K. et al. Polyacetylenes from a Marine Sponge *Petrosia* Sp. Inhibit Dna Replication at the Level of Initiation. **Cancer Letters**, v. 185, p. 95-101, 2002.

KOCHUPARAMBIL, S. T. et al. Anticancer efficacy of simvastatin on prostate cancer cells and tumor xenografts is associated with inhibition of akt and reduced prostate-specific antigen expression. **Journal Pharmacology Experimental Therapeutics**, v. 336, p. 496-505, 2011.

LÖNROTH, E. C. & DAHL, S. E. Citotoxicity of liquidas and powers of chemically different dental materials evaluated using dimethylthiazoldiphenyl tetrazolium and neutral red tests. **Acta Scandinavica**, v. 61, p. 52-6, 2003.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. **Journal Immunological Methodos**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MEBS, D; WEILER, I; HEINKE, H. F. Bioactive Proteins from Marine Sponges: Screening of Sponge Extracts for Hemagglutinating, Hemolytic, Ichthyotoxic and Lethal Properties and Isolation and Characterization of Hemagglutinins. **Toxicon**, v. 23, p. 955-962, 1985.

MANGEL, A. et al. Purification and characterization of a pore-forming protein from the marine sponge *Tethya lyncurium*. **European Journal Biochemistry**, v. 210, p. 499-507, 1992.

MUNRO, M. H. G. et al. The Discovery and development of marine compounds with pharmaceutical potential. **Journal of Biotechnology**, v. 70, p. 15-25, 1999.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. Planejamento Racional de Fármacos Baseado em Produtos Naturais. **Química Nova**, v. 24, p. 105-111, 2001.

MEDEIROS, D. S. et al. A lactose specific lectin from the sponge *Cinachyrella apion*: Purification, characterization, N-terminal sequences alignment and agglutinating activity on *Leishmania promastigotes*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 155, p. 211-216, 2010.

OLIVEIRA, M. P. **Análise in vitro da Citotoxicidade e Proliferação Celular em Equivalentes de Pele Humana**. 2009, p. 71. Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

PONCET, J. The dolastatins, a family of promising antineoplastic agents. **Current Pharmaceutical Design**, v. 5, p. 139-162, 1999.

PAJIC, I. et al. A novel lectin from the sponge *Haliclona cratera*: isolation, characterization and biological activity. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 132, p. 213-22, 2002.

PRADO, M. P. et al. Effects of marine organisms extracts on microtubule integrity and cell cycle progression in cultured cells. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 313, p. 125-13, 2004.

PESSOA, C. et al. Anticancer potential of Northeast Brazilian plants. **Advances in Phytomedicine**, v. 2, p. 197-211, 2006.

PASCUAL, I. et al. Screening of inhibitors of porcine dipeptidyl peptidase IV activity in aqueous extracts from marine organisms. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 414-419, 2007.

- QUEIROZ, A. F. S. et al. Pro-inflammatory effect in mice of CvL, a lectin from the marine sponge *Cliona varians*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 147, p. 216-221, 2008.
- RINEHART, K. L. Antitumor compounds from tunicates. **Medical Research Reviews**, v. 20, p. 1-27, 2000.
- RANGEL, M. et al. Cytotoxic and neurotoxic activities in extracts of marine sponges (Porifera) from southeastern Brazilian coast. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 262, p. 31-40, 2001.
- SEVCIK, C.; BARBOZA, C. A. The Presynaptic Effect of Fractions Isolated from the Sponge *Tedania Ignis*. **Toxicon**, v. 21, p. 191-200, 1983.
- SEPČIĆ, K. et al. Biological Activities of Aqueous Extracts from Marine Sponges and Cytotoxic Effects of 3-Alkylpyridinium Polymers from *Reniera sarai*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**, v. 117, p. 47-53, 1997.
- SLETTEN, G.B. & DAHL, J.E. Cytotoxicity effects of extracts of compomers. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 57, p. 316-22, 1999.
- SILVA, M.L.; LIMA, J.M; OLORIS, S.C.S. Efeito Toxicológico *in vivo* de extrato hidroalcoólico de *Arrabidaea pulchra* (Cham.) Sandwith. **Revista Conhecimento Online, In press**, 2014.
- TUCKER, S. J. et al. The influence of alkyl pyridinium sponge toxins on membrane properties, cytotoxicity, transfection and protein expression in mammalian cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes**, v. 1614, p. 171-181, 2003.
- TURQUE, A.S. et al. Microrganismos associados a poríferos: potencial biotecnológico da microbiota associada às esponjas marinhas. **Biociência & Desenvolvimento**, v. 37, p. 64-69, 2007.
- UEDA, T. et al. Isolation of novel prototype galectins from the marine ball sponge *Cinachyrella* sp. guided by their modulatory activity on mammalian glutamate-gated ion channels. **Glycobiology**, v. 23, p. 412-25, 2013.
- VILLATE, M. L. et al. Pesquisaje de Propiedades Antiinflamatorias y Analgésicas en Extractos de Origen Marino de Cuba. **Revista Cubana Plantas Medicinales**, v. 3, p. 69-71, 1998.
- VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, p. 326-337, 2006.
- VALENTIN, B. B.; VINOD, V.; BEULAH, M. C. Biopotential of secondary metabolites isolated from marine sponge *Dendrilla nigra*. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 1, p. 299-303, 2011.
- WULFF, J. L. Sponge Systematics by Starfish: Predators Distinguish Cryptic Sympatric Species of Caribbean Fire Sponges, *Tedania ignis* and *Tedania klausi* n. sp. (Demospongiae, Poecilosclerida). **The Biological Bulletin**, v. 211, p. 83-94, 2006.