



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

POLICETÍDEOS CITOTÓXICOS DA ESPONJA MARINHA
Plakortis angulospiculatus

EVELYNE ALVES DOS SANTOS

FORTALEZA
2016

EVELYNE ALVES DOS SANTOS

POLICETÍDEOS CITOTÓXICOS DA ESPONJA MARINHA

Plakortis angulospiculatus

Tese submetida à coordenação do curso de pós-graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para a obtenção do título de doutora em Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Leticia Veras Costa-Lotufo

Co-orientadora: Dra. Paula Christine Jimenez

FORTALEZA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S234p Santos, Evelyne Alves dos Santos.
POLICETÍDEOS CITOTÓXICOS DA ESPONJA MARINHA *Plakortis angulospiculatus* /
Evelyne Alves dos Santos Santos. – 2016.
118 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2016.
Orientação: Profa. Dra. Letícia Veras Costa-Lotufo.
Coorientação: Profa. Dra. Paula Christine Jimenez.

1. Esponja. 2. Policetídeos. 3. toxicidade. I. Título.

CDD 615.1

EVELYNE ALVES DOS SANTOS

POLICETÍDEOS CITOTÓXICOS DA ESPONJA MARINHA

Plakortis angulospiculatus

Tese submetida à coordenação do curso de pós-graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para a obtenção do título de doutora em Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Leticia Veras Costa-Lotufo

Co-orientadora: Dra. Paula Christine Jimenez

Aprovada em: 19/07/2016

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Leticia Veras Costa-Lotufo (Orientadora)
Universidade de São Paulo - USP

Profa. Dra. Paula Christine Jimenez (Co-orientadora)
Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP

Prof. Dr. Éverson Miguel Bianco
Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP

Profa. Dra. Janaina Serra Azul Monteiro Evangelista
Universidade Estadual do Ceará - UECE

Profa. Dra. Flávia Almeida Santos
Universidade Federal do Ceará- UFC

Profa. Dra. Otília Deusdênia Loiola Pessoa
Universidade Federal do Ceará - UFC

*Ao meu pai (in memoriam), pelo amor e apoio
incondicional em todos os momentos, principalmente no
seguimento dos meus estudos,*

AGRADECIMENTOS

À Dra. **Letícia Costa-Lotuf**, pela orientação científica deste trabalho, e pela dedicação, paciência, incentivo e confiança depositada em mim, durante os últimos anos. Agradeço imensamente por todo o seu entusiasmo e alegria na convivência diária no laboratório e fora dele, inspirando-me na carreira de cientista, por vezes tão árdua.

À Dra. **Paula Jimenez** (Paulinha), co-orientadora desta tese, pela amizade e sábios conselhos, seja no âmbito científico ou pessoal. As contribuições sempre indispensáveis, os diálogos, o incentivo, que tanto me norteiam nesse caminho da ciência, a hospitalidade nas várias estadas em Santos. Sou inteiramente grata por essa orientação que ultrapassa a tese, bem como o imenso carinho nos mais diversos momentos.

Ao Dr. **Diego Wilke**, parte integrante deste trabalho, por sua permanente solicitude e contribuição nesta tese e em tantos outros projetos, além da amizade e carinho, sou imensamente grata.

Ao Dr. **Elthon Ferreira**, participante integral deste trabalho, agradeço por toda a ajuda na parte experimental, em coletas e também pela ótima companhia dentro e fora do laboratório, além das palavras de incentivo, carinho e amizade.

Ao colegas de laboratório, que se tornaram grandes amigos nestes anos de doutorado, que começou no ECOTOX (*in memoriam*), lugar onde fui imensamente bem recebida, agradeço à **Larissa Guimarães**, pela disposição sempre em ajudar, excelente convívio, amizade e carinho; à **Arinice Costa**, cuja amizade perdura desde os tempos da graduação; à **Marcionília Pimentel**, **Renan Daku**, **Karine Pires**, **Allyson Queiroz** e **Évila Damasceno**, pelo carinho, companheirismo, torcida e pela partilha de tantos momentos importantes, geralmente com muitas risadas, tornando o laboratório um lugar de excelente convívio, além das pessoas que já passaram por lá: Allan e Fiamma, deixando saudades, assim como as caminhadas no calçadão e saídas pra tomar açaí entre um experimento e outro.

Aos colegas do LaBBMar, recém-criado, mas com uma equipe muito especial, agradeço à **Katharine Gurgel, Kayanny Ferreira, Carol Vasconcelos, Alexia Assef** e os mais recentes integrantes, Thaís e Andréa, pela amizade e afeto.

Ao **Danilo Rocha**, que também fez parte deste trabalho, pela disposição em ajudar e pelas contribuições neste e em outros projetos, assim como pelo apoio e companheirismo.

À **Thiciana Souza, Ceiza Menezes, Amanda Lemos** e **Dra. Otilia Pessoa**, pela parceria na realização da parte química deste trabalho e suas importantes contribuições.

Aos colegas do LAFARMAR, o qual tive o prazer de vê-lo nascer e fazer parte deste início, com pessoas que adentraram há pouco na minha vida e já são tão queridas, agradeço às meninas da iniciação mais jovens e competentes, **Amanda Hirata, Letícia Mei** e **Cristine Araújo** pelo carinho e companheirismo, além das queridas Msc. Bianca Sahm e Dra. Paola Branco, por toda a ajuda na longa estadia em São Paulo, carinho, apoio e companheirismo no laboratório.

À Dra. **Glauca Santelli**, por me receber gentilmente em seu laboratório assim como seus alunos, sempre dispostos em ajudar durante a realização dos meus experimentos.

À Dra. **Lúcia Lopes**, do laboratório de sinalização redox, ICB-USP, pela gentileza em fornecer suas dependências para a realização dos meus experimentos, além de contar com a incrível ajuda da Dra. **Simone Sartoretto** e **Sidney**, sempre muito solícitos e pacientes.

Aos colegas do Departamento de Farmacologia, ICB-USP, pela amizade e convívio nos meses longe de casa, **Vanessa Franco, Simone Sartoretto, Renée Oliveira**.

À vó **Clemilda** (*in memoriam*), que sempre me incentivou a seguir meus estudos e infelizmente não me viu graduada, acredito que estaria muito orgulhosa neste momento

Aos meus pais, pelo constante incentivo, ensinamentos e amor.

À todos demais familiares e amigos que sempre me acolhem com carinho e torcem pelo meu sucesso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudo concedida, para a realização deste trabalho.

RESUMO

POLICETÍDEOS CITOTÓXICOS DA ESPONJA MARINHA *Plakortis angulospiculatus*

Como parte do estudo de bioprospecção para a identificação de compostos com potencial anticâncer de organismos da costa brasileira, investigamos a citotoxicidade do extrato etanólico da esponja marinha *Plakortis angulospiculatus*, reconhecida como fonte de endoperóxidos cíclicos com várias atividades farmacológicas, inclusive citotóxica. O fracionamento bioguiado do extrato levou ao isolamento de 4 policetídeos com anel dihidrofurano (**3**, **4**, **5**, **6**), endoperóxidos cíclicos de 5 (**1**) e 6 membros (**2**, **7**, **9**, **10**), incluindo 3 plakortídeos inéditos, 7,8-dihidroplakortídeo E (**1**), **2** e **10**, além dos conhecidos, espongosoritina A (**5**), plakortídeo P (**9**) e derivados. Ao compararmos a citotoxicidade dos dois grupos de compostos em células tumorais humanas de cólon (HCT-116) e próstata (PC-3M), e não tumoral (MRC-5) pelo ensaio do MTT, observamos perfis diferentes de atividade, onde compostos com anel dihidrofurano foram, em geral, menos ativos, e exibiram citotoxicidade tempo-dependente, enquanto os plakortídeos com anéis de 6 membros exibiram maior citotoxicidade e efeito independente do tempo de incubação. Os mecanismos de ação citotóxicas dos compostos **2**, **3**, **5**, **7** e **9** foram investigados usando células HCT-116. Estudos com citometria de fluxo indicaram redução da densidade celular acompanhado de redução de células com membrana íntegra nas maiores concentrações testadas, com exceção do composto **2**. Análises do ciclo celular indicaram que **3** e **5** induziram bloqueio de G_0/G_1 , enquanto **2**, **7** e **9** causaram bloqueio na fase G_2/M , com presença de figuras mitóticas e efeito independente da polimerização de microtúbulos, demonstrada por microscopia confocal. A avaliação de **2** e **9** em linhagem tumoral de mama (MCF-7) não revelou mudanças no ciclo celular, porém, aumentou a fragmentação de DNA, um indicativo de morte celular por apoptose. Através do teste de azul de tripan, verificamos um sinergismo entre plakortídeo P (**9**) e ciclosporina A, um inibidor da enzima calcineurina, demonstrado pela diminuição de mais de 80% da viabilidade das células HCT-116, quando comparado às células tratadas somente com plakortídeo P (**9**) ou com ciclosporina A, indicando um possível envolvimento de vias de sinalização dependentes de cálcio no efeito exercido pelo plakortídeo P. Palavras-chave: esponja, policetídeos, citotoxicidade

ABSTRACT

CITOTOXIC POLIKETIDES FROM MARINE SPONGE *Plakortis angulospiculatus*

As part of a bioprospecting study to identify compounds from marine organisms with anticancer potential compounds from the Brazilian coast, we investigated the cytotoxicity of an ethanolic extract derived from the marine sponge *Plakortis angulospiculatus*, widely known as a source of cyclic endoperoxides with various pharmacological activities, including cytotoxic. The bioguided fractionation of the extract led to the isolation of 4 polyketides with a dihydrofuran ring (**3**, **4**, **5**, **6**), 5- (**1**) and 6- membered cyclic endoperoxides (**2**, **7-10**), including three new plakortides, 7,8-dihydroplakortide E (**1**), **2** and **10**, and known compounds such as spongisoritin A (**5**), plakortide P (**9**). To compare the cytotoxicity of both groups in human tumor cells of colon (HCT-116), prostate (PC-3M) and non-tumor (MRC-5) by the MTT assay, we observed different activity profiles, as compounds that contained a dihydrofuran ring were generally less active and displayed a time-dependent activity. Six membered cyclic plakortides, on the other hand, exhibited greater cytotoxicity and time-independent effect. The modes underlying the cytotoxic actions of **2**, **3**, **5**, **7**, and **9** were further investigated using HCT-116 cells. Flow cytometry studies demonstrated cell density reduction accompanied by a reduction in membrane integrity at higher concentrations, with the exception of **2**. Further inspection through cell cycle analyses indicated that **3** and **5** induced blockage at G₀/G₁. To the contrary, **2**, **7** and **9** delivered a G₂/M arrest and presence of mitotic figures, however this effect was independent of microtubule polymerization, as demonstrated by confocal microscopy. The evaluation of plakortides **2** and **9** on breast cancer cell line (MCF-7) revealed no changes on cell cycle, but increased DNA fragmentation, indicating cell death by apoptosis. Using the trypan blue assay, we verified a synergistic effect between plakortide P (**9**) and cyclosporin A, a calcineurin inhibitor, which induced a decrease of over 80% in viability of HCT-116 cells when compared to cells treated only with plakortide P (**9**) or cyclosporin A, which suggests the involvement of calcium-dependent pathways in the effect presented by plakortide P.

Key words: sponge, poliketides, cytotoxicity

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Número de novos compostos isolados a partir de organismos marinhos de 2001 a 2013..	15
Figura 2. Estruturas químicas dos nucleosídeos da esponja <i>Cryptotheca crypta</i> , espongotimidina e espongouridina e e derivados, vidarabina e citarabina..	16
Figura 3. Estruturas químicas e fontes dos fármacos derivados de produtos marinhos no mercado farmacêutico.	17
Figura 4 - Número de compostos isolados de esponjas marinhas e suas bioatividades no período de 2001-2010..	21
Figura 5 - Estruturas químicas da halicondrina B e eribulina, com destaque para o grupo químico em comum.....	22
Figura 6 - Estruturas de peróxido e endoperóxidos cíclicos de 5 (1,2-dioxolanos) e 6 membros (1,2-dioxanos e 1,2-dioxenos)	25
Figura 7. Estruturas químicas dos endoperóxidos Plakortina e Condrilina	26
Figura 8 - Exemplos de estruturas químicas de policetídeos obtidos de esponjas. ..	26
Figura 9 - Exemplos de policetídeos obtidos de esponjas do gênero <i>Plakortis</i>	28
Figura 10. Exemplos de policetídeos obtidos de esponjas do gênero <i>Plakortis</i>	29
Figura 11 - Estruturas químicas de alguns policetídeos isolados da esponja <i>P. angulospiculatus</i>	30
Figura 12 - Compostos isolados de invertebrados e microorganismos marinhos do Ceará.	32
Figura 13 - Esquema do desenho experimental da tese.	36
Figura 14 - Foto da esponja <i>Plakortis angulospiculatus</i> , de coloração marrom	37
Figura 15 - Mapa identificando a praia e local de coleta da esponja no litoral do Ceará.	37
Figura 16 - Estruturas químicas, nomes dos compostos isolados, e seus respectivos códigos, do extrato etanólico da esponja <i>Plakortis angulospiculatus</i>	39
Figura 17 - Efeitos dos compostos na densidade celular e integridade de membrana em células HCT-116.....	48
Figura 18 - Histogramas representativos dos efeitos dos plakortídeos 3 e 5 (a) e 2, 7, 9 (b) na distribuição do ciclo celular de HCT-116.....	50

Figura 19 - Fotomicrografias de células HCT-116, coradas com corante panótico após 24 horas de incubação com com DMSO (-), doxorrubicina, 0,25 μ M (+), compostos 3 e 5 (50 μ M), plakortídeos 2 , 7 e 9 na concentração de 5 μ M.....	52
Figura 20 - Fotomicrografias de células HCT-116 após incubação com 0,15% de DMSO (-) e 50 nM paclitaxel (+) após 24 horas de incubação e analisadas em microscópio confocal.....	54
Figura 21 - Fotomicrografias de células HCT-116 após incubação com compostos 3 e 5 (50 μ M), após 24 horas de incubação e analisadas em microscópio confocal....	55
Figura 22 - Fotomicrografias de células HCT-116 após incubação com plakortídeos 2, 7 e (5 μ M) 9 (2,5 μ M) após 24 horas de incubação e analisadas em microscópio confocal.....	56
Figura 23 - Histogramas representativos dos efeitos dos plakortídeos 2 e 9 na distribuição do ciclo celular de MCF-7.....	58
Figura 24 - Porcentagem da população de células em sub-G ₁ após incubação com plakortídeos 2 e 9 em células tumorais HCT-116 e MCF-7.....	59
Figura 25 - Fotomicrografias de células MCF-7, coradas com corante panótico após 24 horas de incubação com com DMSO (-), plakortídeo 2 (10, 20 μ M) e 9 (2,5 e 5 μ M).....	60
Figura 26 - Microfotografias de células MCF-7 após incubação com plakortídeos 2 (10 μ M) 9 (2,5 μ M) após 24 horas de incubação e analisadas em microscópio confocal.....	61
Figura 27 - Porcentagem de células viáveis após incubação do plakortídeo P (9) e ciclosporina A (Cs A) nas concentrações 2,5 e 5 μ M por 24 horas..	62
Figura 28 - Estruturas químicas do plakortídeo E e 7,8 diidroplakortídeo E (1).	65
Figura 29 - Estruturas químicas dos plakortídeos H, 4-epi-plakortídeo H, e plakortídeo 2 e suas diferenças estruturais.....	66
Figura 30 - Estruturas químicas dos plakortídeos P, e 10 e suas diferenças estruturais, destacadas em vermelho.....	67
Figura 31- Estruturas químicas dos compostos artemisina e plakortídeos F, G, H. ...	73
Figura 32- Sumário dos resultados..	76
Figura 33. Fluxograma do fracionamento bioguiado a partir do extrato etanólico de <i>P. angulospiculatus</i>	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fármacos anti-câncer de origem marinha em ensaios clínicos.....	19
Tabela 2. Compostos derivados de esponjas marinhas em ensaios pré-clínicos e clínicos	23
Tabela 3. Linhagens celulares e tipos histológicos utilizadas na avaliação da citotoxicidade.....	40
Tabela 4. Atividade citotóxica in vitro dos plakortídeos (1 a 10) obtidas da CLAE em linhagens tumorais de cólon (HCT-116), próstata metastática (PC-3M), carcinoma de mama (MCF-7) e fibroblasto normal (MRC-5) pelo ensaio do MTT após 72 horas e 24 horas de incubação.).....	47
Tabela 5. Porcentagem de células HCT-116 nas fases G ₀ /G ₁ , S e G ₂ /M após incubação com compostos 2, 3, 5, 7 e 9 por 24 horas.	49
Tabela 6. Porcentagem de células MCF-7 nas fases G ₀ /G ₁ , S e G ₂ /M após incubação com plakortídeos 2 e 9 por 24 horas.....	57
Tabela 7. Atividade citotóxica in vitro do extrato etanólico da esponja <i>P. angulospiculatus</i> em linhagem tumoral de cólon (HCT-116) avaliadas pelo ensaio do MTT após 72 horas de incubação.....	94
Tabela 8. Atividade citotóxica in vitro das frações A a D em linhagem tumoral de cólon (HCT-116) avaliadas pelo ensaio do MTT, 72 horas de incubação..	94
Tabela 9. Atividade citotóxica in vitro das frações C1 a C8 em linhagem tumoral de cólon (HCT-116) avaliadas pelo ensaio do MTT após 72 horas de incubação.	95

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1. Produtos Naturais Marinhos	12
1.2. Esponjas como fonte de produtos naturais marinhos	20
1.3. Potencial farmacológico de esponja de gênero Plakortis	24
1.4. A pesquisa de produtos naturais marinhos no Ceará – UFC	30
2. JUSTIFICATIVA	31
3. OBJETIVOS	34
3.1. Objetivo geral	34
3.2. Objetivos específicos	34
4. MÉTODOS	35
4.1. Delineamento experimental	35
4.2. Coleta e identificação da esponja <i>Plakortis angulospiculatus</i>	36
4.3. Obtenção do extrato bruto	37
4.4. Fracionamento bioguiado	37
4.5. Determinação estrutural de compostos	38
4.6. Atividade citotóxica in vitro	39
4.6.1. <i>Linhagens celulares</i>	39
4.6.2. <i>Cultura das linhagens celulares</i>	39
4.6.3. <i>Teste de MTT</i>	40
4.7. Estudos de mecanismos de ação	42
4.7.1. <i>Análise morfológica – Coloração diferencial por corante panótico</i>	42
4.7.2. <i>Determinação da integridade de membrana e densidade celular</i>	42
4.7.3. <i>Avaliação do ciclo celular e fragmentação nuclear</i>	43
4.7.4. <i>Microscopia confocal</i>	44
4.7.5. <i>Avaliação da atividade antiproliferativa por teste de exclusão de tripan</i>	44
5. RESULTADOS	46
5.1. Avaliação da atividade citotóxica dos plakortideos isolados em células tumorais e normal in vitro	46
5.2. Avaliação da viabilidade e densidade celular	48
5.3. Avaliação do ciclo celular	49
5.4. Morfologia celular	51

5.5. Análise do citoesqueleto por microscopia confocal	53
5.6. Efeitos dos plakortídeos 2 e 9 em MCF-7.....	57
5.7. Viabilidade celular após co-tratamento da ciclosporina A e plakortídeo P (9)	62
6. DISCUSSÃO	63
7. CONCLUSÃO	77
REFERÊNCIAS.....	78
ANEXO I. Métodos para extração da esponja <i>P. angulospiculatus</i> e fracionamento químico	91
ANEXO II. Citotoxicidade de extrato e frações	94
ANEXO II. Determinação estrutural dos compostos isolados	96

1. INTRODUÇÃO

1.1. Produtos Naturais Marinhos

A natureza tem sido utilizada, historicamente, como fonte de substâncias para o tratamento de diversas doenças, com diversos relatos da sua utilização terapêutica por civilizações antigas como mesopotâmicos e egípcios há mais de 2000 anos a.C. (NEWMAN; CRAGG, 2016).

Desde as primeiras substâncias naturais isoladas com finalidade terapêutica, como a morfina da papoula *Papaver somniferum* em 1803 e a penicilina do fungo *Penicillium notatum* em 1929, mais de 1 milhão de entidades químicas de origem natural foram descobertas e diversas incorporadas aos medicamentos, contribuindo com cerca de 60% dos fármacos utilizados atualmente na clínica terapêutica. Estas moléculas naturais possuem diversas atividades farmacológicas, como anticâncer, antimicrobiano, antiviral, anti-inflamatório, antifúngico, antimalárico, antituberculose, dentre outras. (CARTER, 2011; DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012; HARVEY, 2008; NEWMAN; CRAGG, 2012).

Os organismos marinhos, por sua vez, ainda não representam uma parcela significativa na terapia alopática, formada particularmente por substâncias de organismos terrestres, sobretudo, plantas e microorganismos. Contudo, são reconhecidos como profícua fonte de metabólitos com potencial biomédico, principalmente em virtude das condições singulares do ambiente marinho e da grande biodiversidade presente neste ecossistema.

O ecossistema marinho representa o maior bioma da Terra, com oceanos cobrindo aproximadamente 70% da superfície terrestre e abrigando parte considerável dos grupos de organismos. Dos 36 filos existentes, 34 são encontrados em ambiente marinho e aproximadamente metade destes, são considerados estritamente marinhos (ARRIETA; ARNAUD-HAOND; DUARTE, 2010). Porém, apesar desta enorme extensão, é o ambiente menos explorado e entendido, em grande parte devido às dificuldades tecnológicas em explorá-lo e mimetizá-lo em laboratório. Estima-se que menos de 5% deste ecossistema e menos de 0,01% do sedimento de grandes profundidades tenham sido estudados detalhadamente (RAMIREZ-LLODRA *et al.*, 2010).

A utilização terapêutica de organismos marinhos data desde antiguidade, onde relatos esporádicos mostram seu uso como parte da medicina tradicional de povos chineses e japoneses para tratamento de diversas doenças como bócio, problemas menstruais, infecções e até câncer (NEWMAN; CRAGG, 2016). No início do século 20, reportaram o isolamento de alguns metabólitos como esteróides, presentes em diversos animais marinhos além de estudos farmacológicos com tetrodotoxina isolada de peixes tetraodontiformes (DORÉE, 1909; HENZE, 1909; TAHARA, 1910). Entretanto, a pesquisa de produtos naturais marinhos com fins biotecnológicos somente recebeu destaque na metade do século 20, principalmente devido à escassa tecnologia para acessar suas grandes profundidades (COLWELL, 2002; DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012; NEWMAN; CRAGG, 2016; THAKUR; THAKUR; MÜLLER, 2005).

Assim, devido ao conhecimento limitado associado ao ambiente e organismos marinhos, a pesquisa de compostos bioativos incidiu inicialmente naqueles mais visíveis e de fácil coleta, conduzidos randomicamente em águas costeiras (MONTASER; LUESCH, 2011). Porém, avanços na tecnologia de equipamentos de mergulho e coleta em grandes profundidades, incluindo o desenvolvimento de veículos operados remotamente (VORs), permitiu prospectar áreas antes inacessíveis. Juntamente, com a evolução de técnicas de isolamento e síntese química, um número expressivo de compostos vem sendo reportado nos últimos anos, ultrapassando os 20 mil produtos naturais marinhos descritos desde os estudos iniciais desenvolvidos nos anos 50 por Bergman e Feeney (BERGMANN; FEENEY, 1951; GERWICK; MOORE, 2012; MAYER *et al.*, 2013)

Diante da peculiaridade do ambiente marinho, processos evolutivos selecionaram aqueles organismos com capacidade de se adaptar e sobreviver nas condições, por vezes hostis, como mudanças de pressão, temperatura e salinidade. Um ambiente com intensa predação, competição por espaço e comida, assim como comunicação inter e intraespécies, favoreceu a produção de metabólitos secundários com as mais variadas funções biológicas (JIMENO *et al.*, 2004; MARTINS *et al.*, 2014).

Esses metabólitos chamaram a atenção de pesquisadores dado a suas estruturas singulares, parte destas, nunca antes reportadas para organismos

terrestres, indicando, portanto, uma fonte de novos compostos bioativos com grande potencial biotecnológico (REEN *et al.*, 2015).

O sucesso dos produtos marinhos pode ser exemplificado por diversas aplicações biotecnológicas, tanto no campo da pesquisa quanto na indústria, como a descoberta e desenvolvimento de proteínas fluorescentes (GFPs), originalmente descritos da água-viva *Aequorea victoria*, com aplicações na pesquisa biomédica, biologia celular e molecular (MOCS, 2007). Adicionalmente, organismos marinhos extremófilos fornecem enzimas utilizadas na indústria alimentícia, ao participar da produção de caviar e como fonte de β -galactosidases para eliminação da lactose no leite (CAVICCHIOLI *et al.*, 2002).

Na pesquisa científica, os produtos de extremófilos também encontram uso, como enzimas altamente termoestáveis aplicadas na técnica de reação em cadeia de polimerase empregada em biologia molecular. As microalgas, por sua vez, são utilizadas na produção de biopolímeros utilizados nas indústrias de alimentos, cosméticos e saúde humana e até no desenvolvimento de biocombustíveis. Ácidos graxos insaturados, minerais e vitaminas de origem marinha também são utilizados como cosmeceuticos (KIM, VENKATESAN; MARTINS *et al.*, 2014).

A despeito da diversidade das aplicações biotecnológicas dos produtos marinhos, o maior destaque vai para farmacologia e saúde humana. Investigações sistemáticas de ambientes marinhos como fontes de compostos bioativos com finalidade terapêutica somente ocorreu de forma mais intensa nos anos 70, em virtude de programas de screening de produtos naturais desenvolvidos por grandes centros, a exemplo do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI-USA).

Inicialmente as pesquisas com produtos naturais marinhos foram concentradas em invertebrados, tais como esponjas, ascídias, corais, moluscos e briozoários, em parte, devido à abundância das espécies e facilidade da coleta, compreendendo aproximadamente 60% de todos os animais descritos como fonte de produtos marinhos desde 1990 (FENICAL; JENSEN, 2006; HUNT; VINCENT, 2006). Esta primeira década teve o registro de 2.500 compostos isolados, chegando a mais de 8.000 na última década (Figura 1) (BLUNT *et al.*, 2015, 2016; DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012; FAULKNER, 2000).

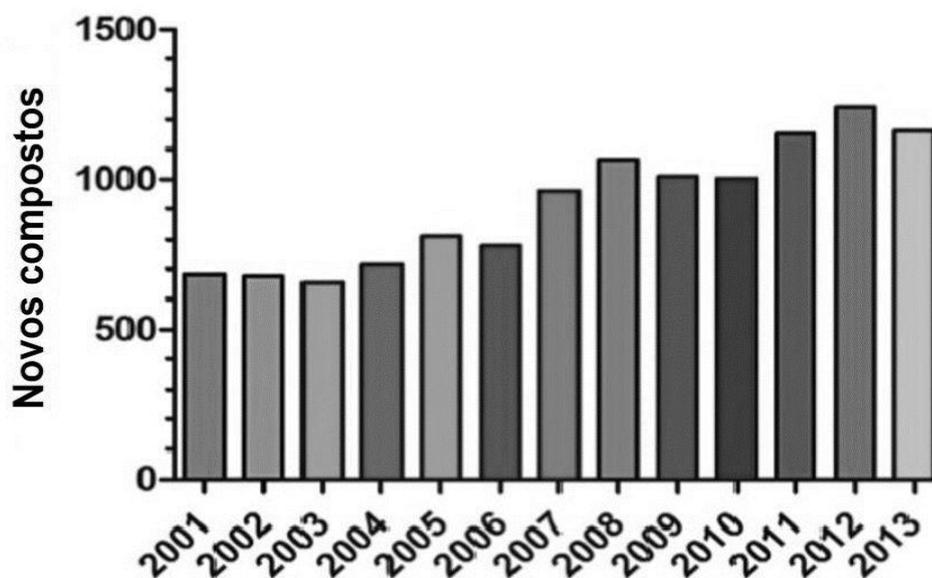


Figura 1. Número de novos compostos isolados a partir de organismos marinhos de 2001 a 2013. Fonte: (ROMANO *et al.*, 2016).

As atividades biológicas descritas para produtos naturais marinhos são as mais diversas, podendo-se citar: antiviral, antimicrobiano, antidepressivo, antifúngico, antimalárico, ansiolítico e, particularmente, citotóxico e antitumoral. (BLUNT *et al.*, 2012, 2015, 2016; CRAGG; NEWMAN, 2006; FAULKNER, 2000, 2002; MAYER *et al.*, 2013; MONTASER; LUESCH, 2011; NEWMAN; CRAGG, 2004, 2007).

As estruturas químicas diferenciadas e mecanismos de ação incomuns relacionadas aos produtos naturais marinhos levaram a um expressivo número de compostos adentrarem ensaios clínicos, onde até o momento, 8 fármacos foram aprovados, sendo, em sua maioria, antineoplásicos (figura 3). Já em fases de testes clínicos somam-se 18 compostos e, em fase pré-clínica há um número ainda maior (GERWICK; MOORE, 2012; MAYER *et al.*, 2010; NEWMAN; CRAGG, 2004).

Os primeiros fármacos de origem marinha a serem utilizados na clínica foram inspirados nos nucleosídeos espongiuridina e espongotimidina, isolados da esponja caribenha *Cryptotheca crypta* por Bergmann e Feeney em 1951, que posteriormente levaram ao desenvolvimento dos fármacos ARA-A (vidarabina) e ARA-C (citarabina) (figura 2), aprovadas para o tratamento de herpes e câncer, respectivamente. A citarabina, por sua vez, ainda é o medicamento de escolha para tratamento de leucemia mieloide, meningeal e linfoma não-Hodking e continua em

ensaios clínicos para o tratamento de outros tipos de câncer em combinação com outros antitumorais (clinicaltrials.gov.br).

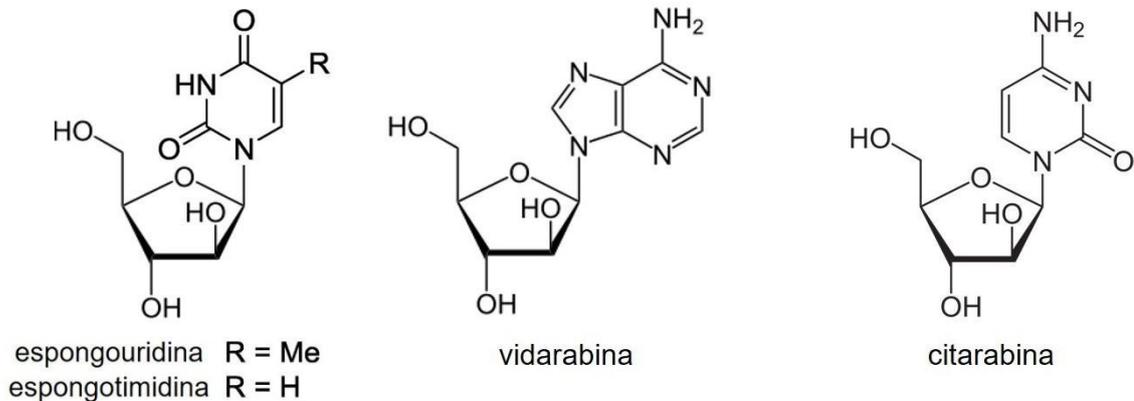


Figura 2. Estruturas químicas dos nucleosídeos da esponja *Cryptotheca crypta*, espongotimidina e espongouridina e derivados, vidarabina e citarabina. Fonte: www.lookfordiagnosis.com.

Mais de 20 anos após a entrada da citarabina no mercado, o analgésico ziconotida (Prialt[®]), derivado da ω -conotoxina isolada do molusco *Conus magnus* recebeu aprovação do FDA (do inglês, US Food and Drug Administration) e EMEA (European Medicines Agency) em 2004 e 2005 respectivamente, para o tratamento de dor crônica severa associada ao câncer, AIDS e neuropatias. (GERWICK; MOORE, 2012; NEWMAN; CRAGG, 2004; WALLACE, 2006). Também, em 2004, o medicamento com ação antitrigliceridemia Lovaza[®] foi aprovado para uso clínico, cuja composição possui ésteres etílicos de ácido graxo proveniente de óleos de peixe, efeito já conhecido por diminuir as taxas de triglicerídeos após ingestão (GLUECK *et al.*, 2012).

Como mencionado anteriormente, a maior parte dos compostos em testes clínicos são antineoplásicos e a tendência se confirma quando, entre os medicamentos aprovados, tem-se metade destes para tratamento de tumores. O alcalóide trabectedina (ET-743, Yondelis[®]), originalmente isolado da ascídia caribenha *Ecteinascidia turbinata*, com citotoxicidade reportada em 1970 por Sigel e colaboradores. A trabectedina é um agente alquilante de DNA e interage com proteínas envolvidas no sistema de reparo de DNA. Este fármaco foi aprovado para uso clínico em 2007 para o tratamento de sarcomas de tecidos moles, tumores de mama, próstata e sarcoma pediátrico, e também continua em testes clínicos para o

tratamento de outros tipos de tumores (D'INCALCI; GALMARINI, 2010; MONK *et al.*, 2012).

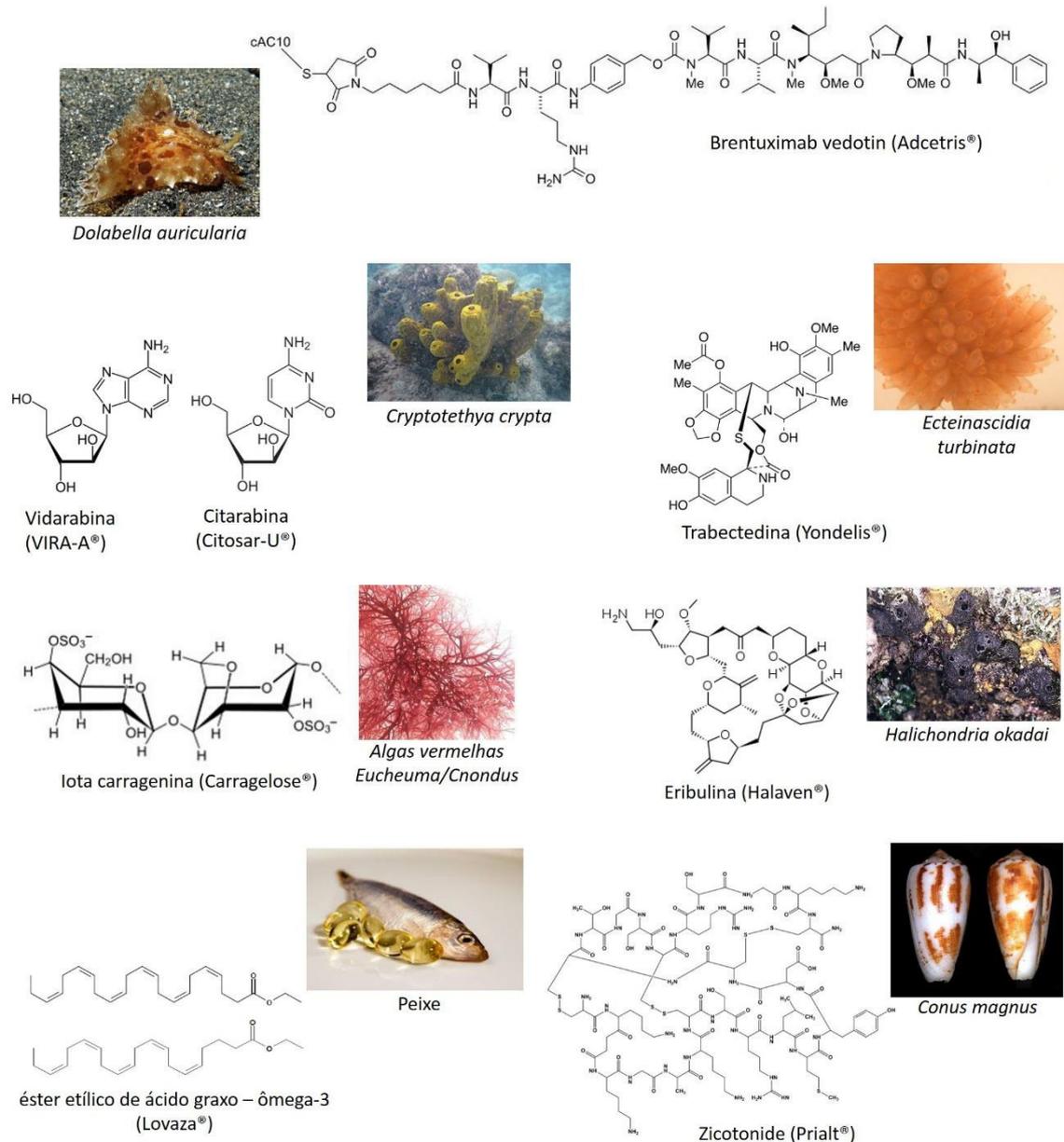


Figura 3. Estruturas químicas e fontes dos fármacos derivados de produtos marinhos no mercado farmacêutico. Fonte: Modificado de MARTINS *et al.*, 2014.

O antineoplásico mesilato de eribulina (Halaven®) consiste em um análogo do poliéter macrocíclico halicondrina B, originalmente isolado da esponja *Halichondria okadai* por Hirata e Uemura em 1986 e ganhou aprovação para entrar no mercado farmacêutico em 2010 para o tratamento de câncer de mama metastático. Como mecanismo de ação, a eribulina interfere com a dinâmica da

tubulina diferentemente de outros compostos, como os taxóis (JORDAN *et al.*, 2005; OKOUNEVA *et al.*, 2008).

O desenvolvimento do fármaco brentuximab vedotin (Adcetris[®]), aprovado em 2011 pelo FDA está relacionado com conjugados droga-anticorpo, onde fármacos antitumorais são entregues à célula tumoral pela ligação do anticorpo. Nesse caso, o princípio ativo monometilauristatina E é ligada ao anticorpo anti-CD30, uma proteína presente na membrana de células de linfoma de Hodgkin A. O fármaco foi baseado na estrutura da dolastina 10, originalmente isolada do nudibrânquio *Dolabella auricularia* em 1972, que chegou aos testes clínicos, porém foi descontinuada por toxicidade e falta de eficácia (BAUER; BRÖNSTRUP, 2014; HOFFMAN; BLESSING; LENTZ, 2003; PETTIT *et al.*, 1987; VAISHAMPAYAN *et al.*, 2000).

O medicamento oral Panobinostat (Farydak[®]), foi o último fármaco de origem marinha a ser aprovado para uso clínico, em 2015. Análogo sintético da psammaplina A, originalmente isolada da esponja marinha do gênero *Psammaplysina*, é indicado à portadores de mieloma múltiplo que fizeram uso de terapias padrão com bortezomibe e agentes imunomoduladores e continua em ensaios clínicos para o tratamento de linfoma, como demonstrado na tabela 1.

Por fim, as carrageninas pertencentes a família de polissacarídeos sulfatados extraídos de macroalgas vermelhas, conhecidas pelas suas propriedades gelificante e estabilizadora na indústria de alimentos, foi aprovada em 2008 para utilização clínica como agente antigripal em apresentação inovadora contendo Iota-carragenina (Carragelose[®]), a fim de diminuir os sintomas do resfriado, sendo vendido como fármaco isento de prescrição (ECCLES *et al.*, 2010).

Os compostos de origem marinha em fase clínica são, na sua maioria, antitumorais, sendo que muitas dessas moléculas são modificações estruturais de compostos já aprovados como trabectedina (Lurbinectina e Joromicina) ou imunoconjugação de produtos naturais, similares ao Brentuximab vedotin. Além desses, os diversos compostos de outras fontes marinhas, estão descritos na tabela 1.

Tabela 1. Fármacos anti-câncer de origem marinha em ensaios clínicos. Fonte: Food and drug administration (FDA).

FÁRMACO	CLASSE QUÍMICA	ORGANISMO MARINHO	TIPO DE TUMOR	FASE CLÍNICA
Glembatumumabe vedotin*	peptídeo	Molusco/bactéria	Melanoma avançado, mama, pulmão, osteossarcoma	Fase II
Pinatuzumabe vedotin*	peptídeo	Molusco/bactéria	Linfoma não Hodgkin	Fase II
Polatuzumabe vedotin*	peptídeo	Molusco/bactéria	Linfoma não Hodgkin	Fase II
Lifastuzumabe vedotin*	peptídeo	Molusco/bactéria	Ovário, pulmão	Fase I,II
DSTP-3086S*	peptídeo	Molusco/bactéria	Câncer de próstata metastático resistente	Fase I
HuMab-TF-011-vcMMAE*	peptídeo	Molusco/bactéria	cervical, endometrial, próstata, renal, esôfago, pulmão	Fase I
GSK2857916*	peptídeo	Molusco/bactéria	Mieloma múltiplo refratário	Fase I
ASG-5Me*	peptídeo	Molusco/bactéria	Próstata, gástrico, pâncreas	Fase I
SGN-75*	peptídeo	Molusco/bactéria	Linfoma não-Hodgkin, renal	Fase I
Plitidepsina Aplidina®	peptídeo	Ascídia/bactéria <i>Aplidium albicans</i>	Mieloma múltiplo refratário	Fase I, III
Plinabulina	diketopiperazina	Fungo <i>Aspergillus ustus</i>	Pulmão avançado	Fase III
Jorumicina Zalypsis®	alcalóide	Molusco/bactéria	Sarcoma de Ewing	Fase II
Lurbinectina	alcalóide	ascícia	Tumores resistentes à compostos de platina	Fases I, II, III
Salinosporamida A Marizomib®	β -lactâmico	Bactéria <i>Salinispora tropica</i>	Glioma estágio IV, Mieloma refratário	Fase I, II
PM060184	policetídeo	Esponja <i>Liphoplocama lithis</i>	Melanoma metastático, Leucemia mielóide aguda, Linfoma de Hodgkin, Tumores sólidos, pulmão, glioma recorrente	Fase I, II
Panobinostat Farydak®	alcalóide	Esponja <i>Psammaphysina sp.</i>	Linfoma	Fase II, III
Elidepsina Irvalec®	peptídeo	Molusco/bactéria	Tumores sólidos avançados	Fase II
Estaurosporina	alcalóide	Bactéria	Leucemia mielóide aguda	Fase I, II

* Fármacos ligados à anticorpo

A contribuição dos produtos naturais marinhos na terapia anticâncer é bastante evidente, tendo em vista a quantidade expressiva de fármacos antitumorais que adentraram nos testes clínicos, reforçando o potencial dos organismos marinhos como fonte de novos compostos, além de propiciarem a descoberta de novos alvos terapêuticos (COSTA-LOTUFO *et al.*, 2009; NEWMAN; CRAGG; BRANCH, 2015).

1.2. Esponjas como fonte de produtos naturais

Esponjas marinhas representam os organismos multicelulares mais primitivos do grupo Metazoa, com aproximadamente 8.730 espécies descritas (BELARBI *et al.*, 2003; world porifera database). São animais pertencentes ao filo Porifera, predominantemente aquáticos, e geralmente são filtradores e sésseis (VACELET; DUPORT, 2004). As esponjas habitam múltiplos ambientes, de rios a oceanos, de regiões tropicais à polares, águas costeiras à altas profundidades. Essa habilidade para sobreviver em diversas condições, envolveu a seleção de um aparato bioquímico eficiente e responsável pela produção de uma diversidade de metabólitos que atuam como defesa química contra fatores de estresse como predação, competição por espaço, crescimento de organismos incrustantes e infecção microbiana, essenciais para adaptação e sobrevivência nestes diferentes ambientes (HOOPER, VAN SOEST, 2002). Vários destes compostos são citotóxicos, e são liberados através do muco a fim de criar uma zona em volta da esponja que impede o crescimento de outros seres incrustantes (PERDICARIS; VLACHOGIANNI; VALAVANIDIS, 2013).

A alta diversidade estrutural relacionadas à estes metabólitos, além do papel ecológico desempenhado pelos mesmos, despertou o interesse de químicos de produtos naturais em avaliar o potencial biotecnológico destas substâncias, principalmente como agentes anticâncer e antimicrobiano (BLUNT *et al.*, 2011; CHAVES-FONNEGRA *et al.*, 2008; JOSEPH; SUJATHA, 2010; PETERS *et al.*, 2010; SOKOLOVER; ILAN, 2007).

A importância médica de compostos bioativos oriundos de esponjas já é conhecida há bastante tempo. Arndt (1928) relatou que esponjas eram animais criptotóxicos e utilizavam seus metabólitos para proteção contra invasores. Também mencionou o agente irritante oriundo das esponjas *S. domuncula* e *Geodia aijdonium* nos séculos 19 e 20 (WEINER; MULLER, 2003).

Desde os primeiros trabalhos de Bergmann e Feeney, em 1951, as esponjas são o filo dominante na descoberta de metabólitos secundários com potencial farmacológico e conta até o momento, com mais de 5300 substâncias bioativas obtidas de esponjas e microorganismos associados, correspondendo a 38% de todos os produtos marinhos reportados, seguidos de cnidários (20%), tunicados (20%) e algas vermelhas (9%) (MEHBUB *et al.*, 2014).

Diversas classes químicas foram reportadas para os metabólitos derivados de esponjas (figura 4), incluindo alcalóides, ésteres, ácidos graxos, glicosídeos, cetonas, lipídios, macrolídeos, álcoois, peptídeos, policetídeos, quinonas, esteróides, esteróis e terpenos exibindo atividades antiprotozoária, anti-inflamatória, antidiabética, anti-HIV, antibacteriana e particularmente antitumoral (BLUNT *et al.*, 2012, 2013, 2014, 2015; CUTIGNANO *et al.*, 2013; FAROKHI *et al.*, 2013; JEON *et al.*, 2013; KATAVIC *et al.*, 2013; KIM *et al.*, 2013; MOMOSE *et al.*, 2013).

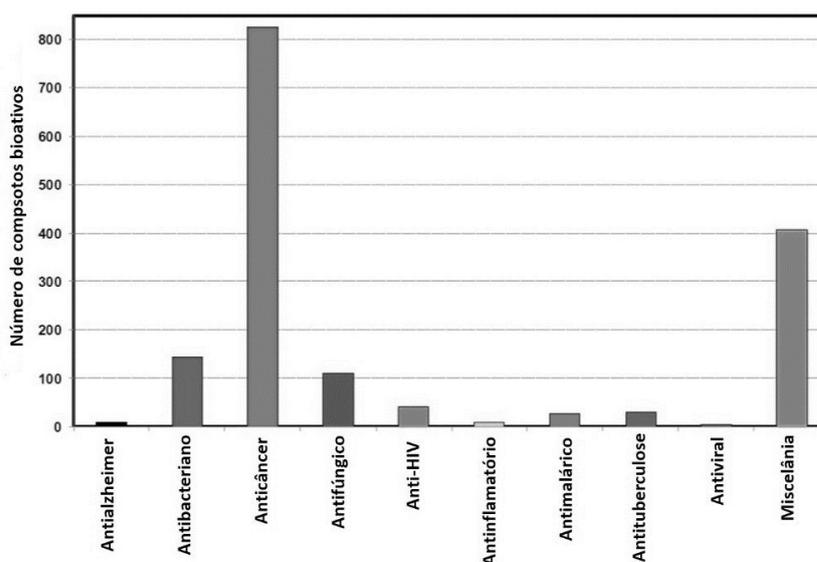
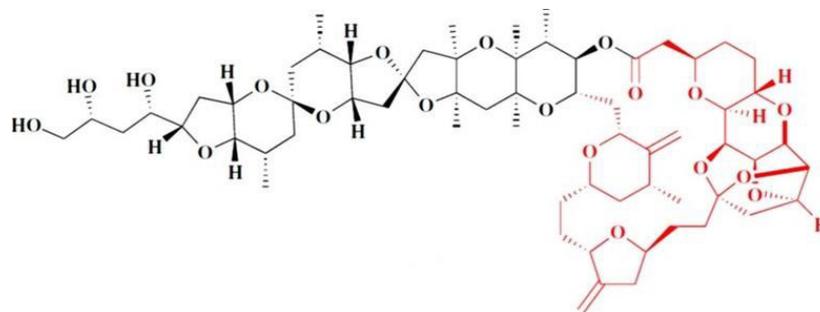
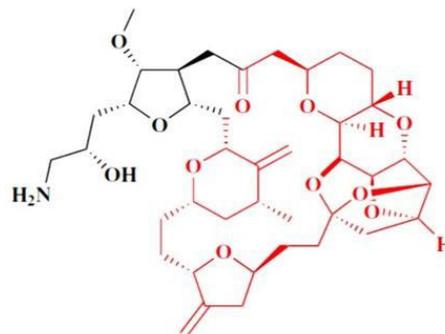


Figura 4 - Número de compostos isolados de esponjas marinhas e suas bioatividades no período de 2001-2010. Fonte: (Mehbub *et al.*, 2014).

Concentrando-se nos fármacos em uso clínico derivados de esponjas marinhas, a halicondrina B (figura 5) foi um dos primeiros compostos testados no programa de screening do NCI (EUA) no seu painel de 60 células tumorais, porém, apesar da confirmação da potente atividade anticâncer, estudos clínicos não foram realizados devido à falta de suprimento adequado. No entanto, o composto sintético mesilato de eribulina, derivado da halicondrina B (figura 5) entrou em ensaios clínicos em 2002, sendo aprovada para uso clínico 8 anos depois para o tratamento de câncer de mama metastático. Tais medicamentos reforçam o potencial das esponjas como fonte de fármacos para terapia de câncer.



Halicondrina B



Eribulina

Figura 5 - Estruturas químicas da halicondrina B e eribulina, com destaque para o grupo químico em comum. Fonte: CRAGG; NEWMAN, 2013.

Quanto aos compostos em testes pré-clínicos e clínicos, podemos citar a pirazina-2, isolada originalmente da esponja do gênero *Hamacanthis* e que está atualmente em testes pré-clínicos (PINCHUK *et al.*, 2013), o policetídeo PM-060184 derivado da esponja de Madagascar *Lithoplocamia lithistoides*, que recentemente entrou em testes clínicos de fase I, além do antiangiogênico Panabinostat

originalmente isolado da esponja *Psammaplysina sp.* e atualmente em fase II e III de testes clínicos, como demonstrado na tabela 2 (clinical trial.gov.us).

Tabela 2. Compostos derivados de esponjas marinhas em ensaios pré-clínicos e clínicos

COMPOSTO	ESPONJA	ALVO MOLECULAR	STATUS ATUAL
NVP-LAQ824 (derivado sintético da Psammaplina)	<i>Psammaplysilla sp.</i>	HDAC/DNMT	descontinuado
Panobinostat (derivado sintético da Psammaplina)	<i>Psammaplysilla sp.</i>	HDAC	Fase I/III
E7974 (derivado da Hemiasterlina)	<i>Hemiasterella minor</i>	Microtúbulos	Descontinuado
HTI-286 (derivado sintético da Hemiasterlina)	<i>Cymbastella sp.</i>	Tubulina	descontinuado
PM060184	<i>Lithoplocamia lithistoides</i>	Microtúbulos	Fase I
Discodermolídeo	<i>Discodermia dissolute</i>	Tubulina	descontinuado
LAF-389 (derivado sintético da Bengamida B)	<i>Jaspis cf. coraciae</i>	Metionina aminopeptidase	descontinuado
KRN-7000 (derivado sintético da agelasfina)	<i>Agelas mauritanus</i>	Ativação de células NKT V α 24	descontinuado
Laulimalídeo	<i>Cacospongia mycofijiensis</i>	Tubulina	Pré-clínico
Pelorusídeo A	<i>Mycale hentscheli</i>	Tubulina	Pré-clínico
Salicilialamidas A, B	<i>Haliclona sp.</i>	Vo-ATPase	Pré-clínico
Variolinas	<i>Kirkpatrickia variolosa</i>	Cdk	Pré-clínico
Dictiodendrinas	<i>Dictyodendrilla verongiformis</i>	Telomerase	Pré-clínico
Espongistatina 1	<i>Spirasterella sp</i>	Tubulin	Pré-clínico
Pirazina -2	<i>Hamacanthins</i>	PDGFR	Pré-clínico

Como profícua fonte de produtos naturais, novos compostos continuam a ser isolados e estudados quanto ao potencial farmacológico, sobretudo anticâncer, que conta com relatos de alvos e mecanismos de ação incomuns, como demonstrado na tabela 2. O alcalóide Agelasina B, originalmente obtido de esponja

do gênero *Agelas*, inibe a enzima Ca^{2+} -ATPase do retículo sarco/endoplasmático, (SERCA), aumentando a concentração de cálcio na célula tumoral, culminando em apoptose (PIMENTEL *et al.*, 2012). As hyrtioreticulinas isoladas da *Hyrtio reticulatus*, por sua vez, inibem a formação do intermediário ubiquitina E-1, importante na via ubiquitina-proteassoma (YAMANOKUCHI *et al.*, 2012). Mais além, o fenol aeroplysinina, da *Aplysia aerophoba*, induz degradação da β -catenina, proteína que regula a adesão célula-célula (PARK *et al.*, 2016), ao passo que as xetoquinonas isoladas da *Petrosia alfiani*, inibem o fator de indução de hipóxia (DU *et al.*, 2012), tornando-se moléculas promissoras para o tratamento do câncer.

Apesar dos exemplos citados, a fonte limitada dos produtos naturais marinhos, em geral, principalmente invertebrados, continua sendo o principal gargalo, impedindo compostos com grande potencial farmacológico de avançarem em testes clínicos, como demonstrado na tabela anterior (tabela 2). Porém, estudos que buscam viabilizar produção eficiente de produtos derivados de esponjas, ao aliar a química combinatória, o desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármaco alvo-direcionada, a engenharia genética, ou a prospecção de microorganismos associados produtores dessas moléculas bioativos, tem se mostrado promissores quanto à sustentabilidade do desenvolvimento de fármacos marinhos (SHAKERI; SAHEBKAR, 2015).

1.3. Potencial farmacológico de esponjas do gênero *Plakortis*

Esponjas marinhas da família Plakinidae são comumente encontradas em regiões tropicais, com números equivalentes nos três oceanos, com 72 espécies descritas em 5 gêneros, sendo eles *Plakortis* (SCHULZE, 1880), *Plakinastrella* (SCHULZE, 1880), *Plakina* (SCHULZE, 1880), *Placinolopha* (TOPSENT, 1897 e *Corticium* (SCHMIDT, 1862) (VAN SOEST *et al.*, 2016)

O gênero *Plakortis* possui 22 espécies descritas no mundo e 7 delas são encontrados presentes no Brasil: *P. halichondrioides* (WILSON, 1902); *P. angulospiculatus* (CARTER, 1879); *P. insularis* (MORAES; MURICY, 2003); *P. microrhabdifer* (MORAES; MURICY, 2003); *P. petrupaulensis* (DOMINGOS, MORAES, MURICY, 2013); *P. spinalis* (DOMINGOS; MORAES; MURICY, 2013); e *P. potiguarensis* (DOMINGOS; MORAES; MURICY, 2013).

Esponjas do gênero *Plakortis* são reconhecidas fontes de endoperóxidos cíclico, assim como outros policetídeos com atividade farmacológica. Policetídeos são a classe de metabólitos secundários mais importante na pesquisa de novos fármacos, e são biosintetizados a partir de acetil-coenzima A (AcetilCoA) e malonil-CoA, por enzimas policetídeos sintases e demonstram enorme diversidade estrutural e bioatividade, incluindo endoperóxidos. Estes, são produtos naturais que possuem a função peróxido (ROOR1), como demonstrado na figura 6, onde a cadeia lateral (R) corresponde a qualquer produto orgânico. Estas moléculas têm sido isoladas de diferentes fontes, como, fungos, plantas, e, particularmente, de esponjas.

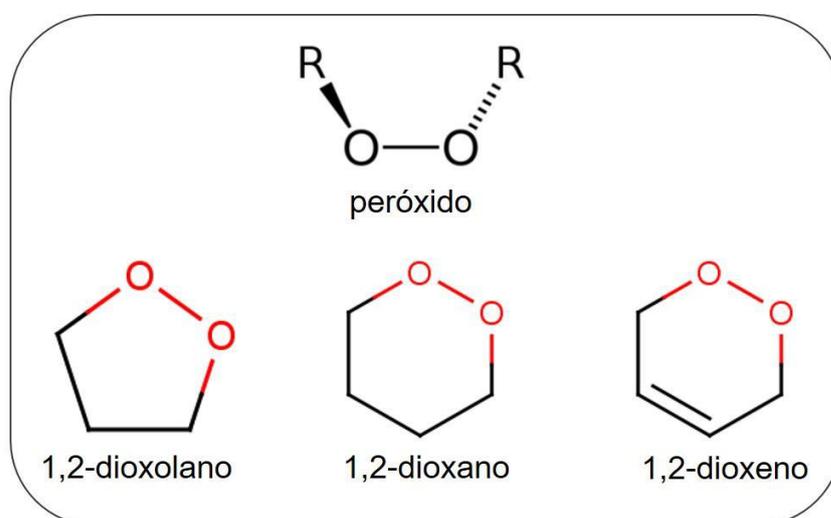


Figura 6 - Estruturas de peróxido e endoperóxidos cíclicos de 5 (1,2-dioxolanos) e 6 membros (1,2-dioxanos e 1,2-dioxenos), com o grupo peróxido destacado em vermelho. Fonte: <http://www.chemspider.com>.

Faulkner e Higgs (1978) isolaram e estudaram o policetídeo, plakortina (Figura 7) do extrato etanólico da esponja *Plakortis halicondroides*, um dos primeiros endoperóxidos cíclicos marinhos, ao qual foi atribuída atividade antibiótica. Weels, em 1976, obteve o metabólito condrilina isolado da esponja do gênero *Condrilla* que, mais tarde, mostrou-se citotóxico para células leucêmicas de camundongo e ativadores da Ca^{2+} -ATPase do retículo sarco/endoplasmático (SERCA).

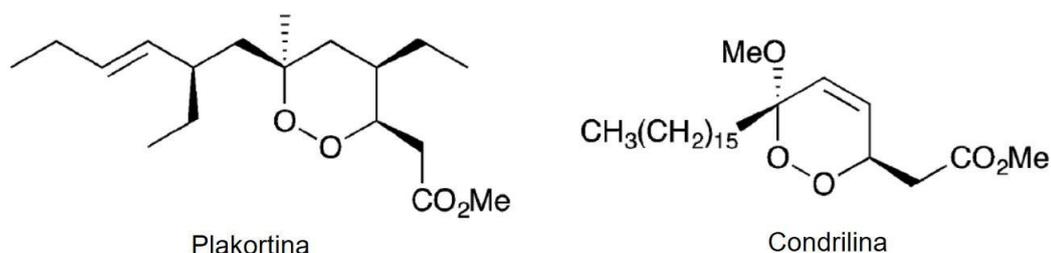


Figura 7. Estruturas químicas dos endoperóxidos Plakortina e Condriлина. Fonte: NORRIS; PERKINS, 2016.

Vale ressaltar que, ainda nos dias atuais, os endoperóxidos cíclicos continuam a ser isolados e caracterizados, demonstrando a sua importância para a química de produtos naturais, bem como para a farmacologia (JAMISON; DALISAY; MOLINSKI, 2016). Esta classe possui uma ampla diversidade química, acompanhada de diversas atividades biológicas como: antimalárica, tripanossomicida, leishmanicida, antifúngica, antineuroinflamatória e citotóxica, (CAFIERI *et al.*, 1999; CHIANESE *et al.*, 2014; DAVIS *et al.*, 2013; FATTORUSSO *et al.*, 2002; GOCHFELD; HAMANN, 2001; JIMÉNEZ-ROMERO *et al.*, 2010; LIU *et al.*, 2011; MURAYAMA *et al.*, 1989; OLI *et al.*, 2014; PERRY *et al.*, 2001; QUINOVA *et al.*, 1986; WELLS, 1976).

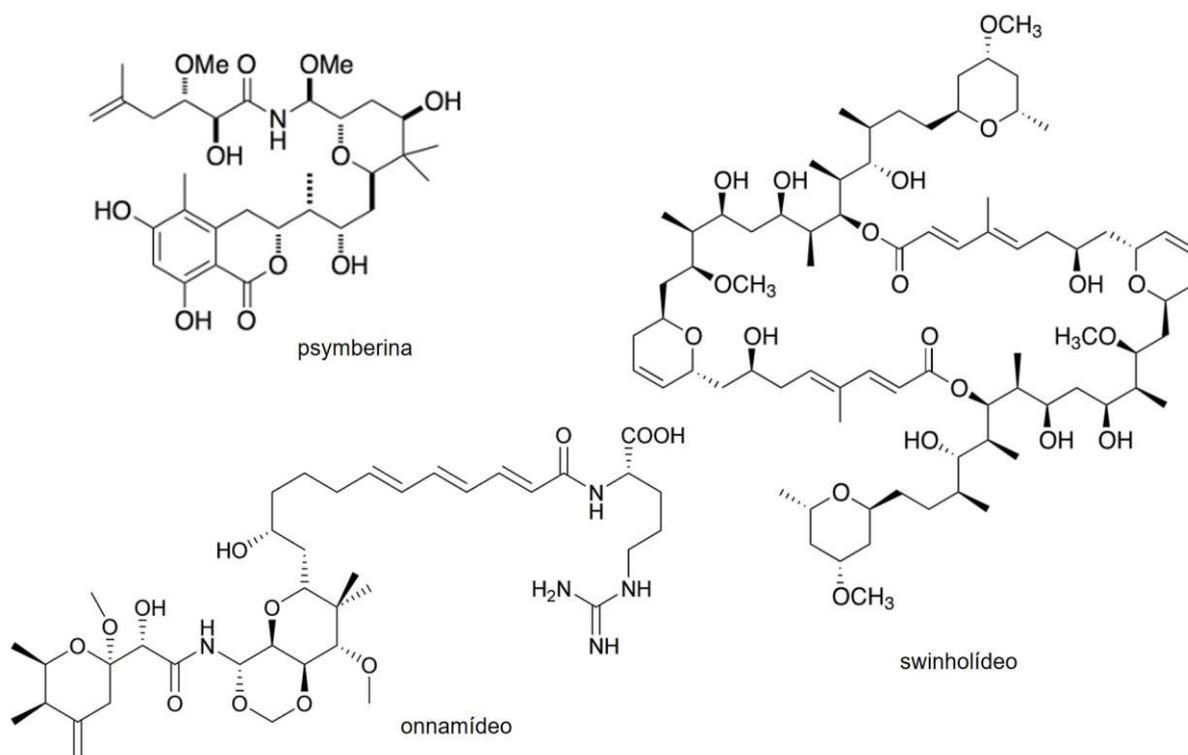


Figura 8 - Exemplos de estruturas químicas de policetídeos obtidos de esponjas. Fonte: <http://www.scbt.com>; NORRIS; PERKINS, 2016.

Muitos policetídeos foram e continuam sendo isolados de esponjas, como os compostos citotóxicos swinholídeo (ANDRIANASOLO *et al.*, 2005; BEWLEY; HOLLAND; FAULKNER, 1996), onnamídeo (PIEL *et al.*, 2004) e psymberina (FISCH *et al.*, 2009), que parecem ser produzidos por microorganismos associados, demonstrados na figura 8 (DELLA SALA *et al.*, 2013). Devido aos simbioses produtores de policetídeos não serem cultiváveis, em sua maioria, estudos de metagenômica tem sido uma importante ferramenta na investigação da origem biossintética destes tipos de compostos (DELLA SALA *et al.*, 2013; URIA; PIEL, 2009).

A produção de policetídeos por microorganismos associados à esponjas marinhas do gênero *Plakortis* tem sido discutida na literatura, apesar de já serem reportadas para outros tipos de esponjas, além de considerar que cerca de metade da sua biomassa corresponde a bactérias (VACELET, 1975), o que explicaria a diversidade de metabólitos encontradas neste gênero (LAROUCHE *et al.*, 2007). Porém, apesar destas crescentes evidências, Della Sala e colaboradores sugeriram, pela primeira vez, ao utilizar *P. simplex*, que as bactérias podem não ser somente a única fonte de policetídeos de esponjas (DELLA SALA *et al.*, 2013).

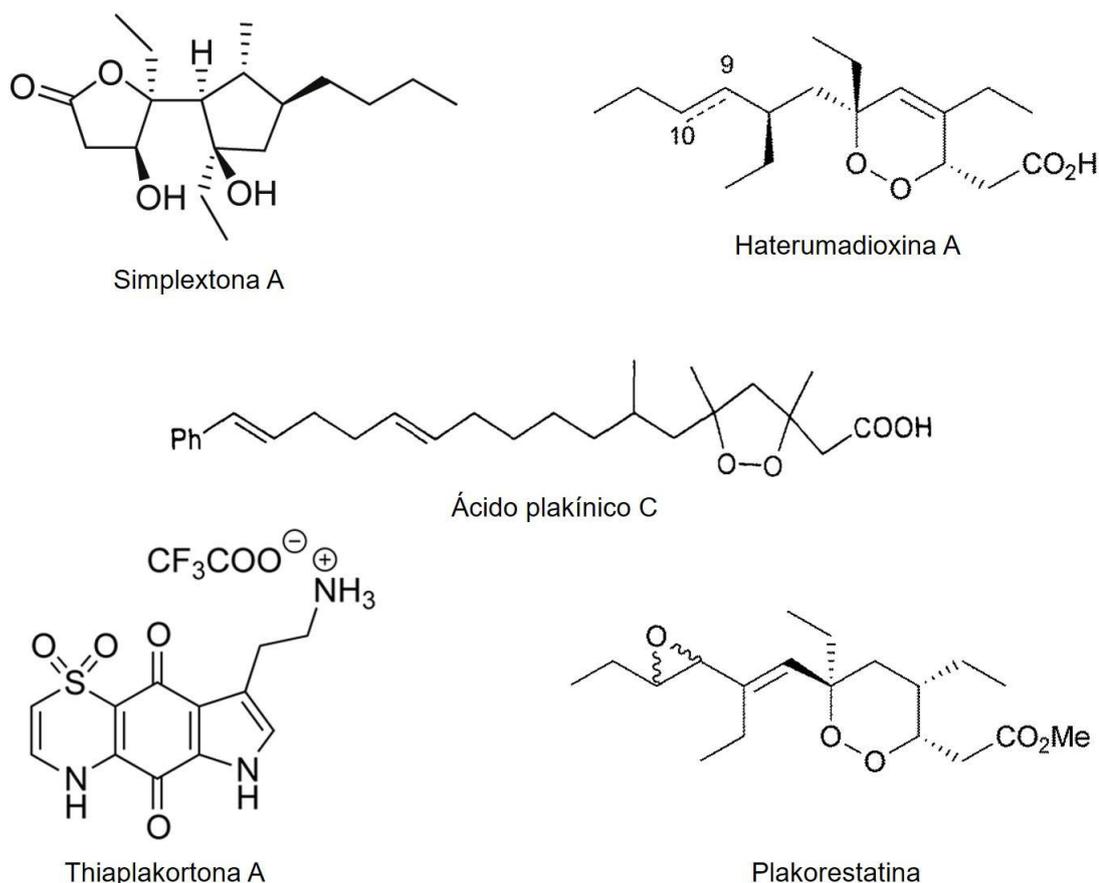


Figura 9 - Exemplos de policetídeos obtidos de esponjas do gênero *Plakortis*. Fonte: DAVIS *et al.*, 2013; NORRIS; PERKINS, 2016.

Como exemplos de policetídeos isolados de esponjas do gênero *Plakortis* com potencial farmacológico podemos citar, as Simplextonas A e B, isolada da esponja *Plakortis simplex*, citotóxicas para linhagens tumorais de cólon, estômago e cérvix (LIU *et al.*, 2011). Proveniente da esponja *P. lita*, os compostos Haterunadioxina A e thiaplakortonas (DAVIS *et al.*, 2013) demonstraram citotoxicidade para células tumorais e, também atividade antimalárica. Ácidos plakínicos C (figura 9) e D, assim como os análogos ácidos epiplakínicos demonstraram citotoxicidade em linhagens tumorais de cólon, leucemia e carcinoma (DEMBITSKY; GLORIOZOVA; POROIKOV, 2007).

Petit e colaboradores, ao realizar o estudo de extratos de esponjas da espécie *Plakortis nigra*, isolaram os agentes antineoplásticos plakorestatinas 1 e 2 (PETTIT *et al.*, 2004), e os ácidos epiplakínicos (SANDLER *et al.*, 2002). Já a investigação do extrato de *Plakortis zygompha* resultou no isolamento dos ácidos espiculóicos e ácidos zigônifcos que apresentaram atividade citotóxica contra

linhagens de células tumorais e atividade antituberculose (BERRUE *et al.*, 2007; BERRUÉ *et al.*, 2005).

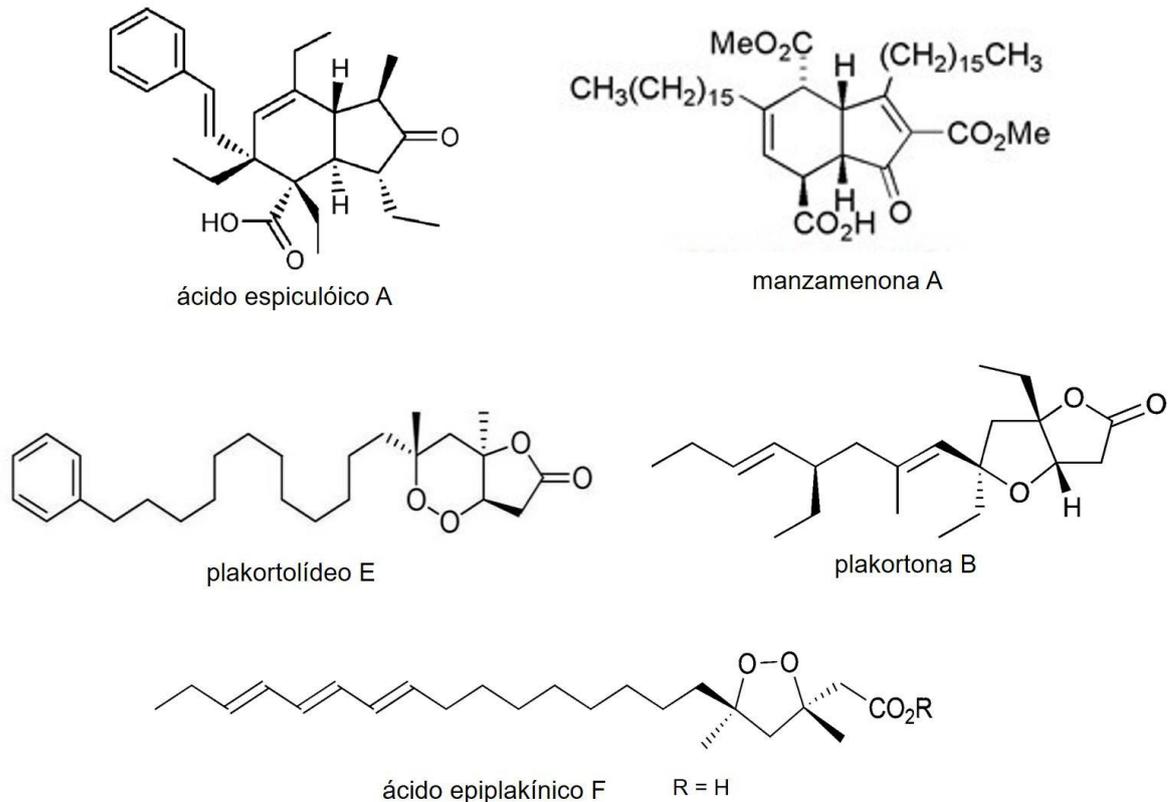


Figura 10. Exemplos de policetídeos obtidos de esponjas do gênero *Plakortis*. Fonte: MATSUMURA *et al.*, 2009; NORRIS; PERKINS, 2016.

Da esponja *P. halicondrioides*, por sua vez, foram isoladas as plakortonas, que revelaram-se potentes ativadoras da SERCA, e portanto, promissoras no desenvolvimento de fármacos para distúrbios cardíacos (PATIL *et al.*, 1996). Tsukamoto e colaboradores (1992) isolaram os ácidos graxos manzamenonas, cuja manzamenona A mostrou atividade contra linhagens de células tumorais L1210 (leucemia) e KB (carcinoma) (KOBAYASHI *et al.*, 1993; TSUKAMOTO *et al.*, 1992). Plakortólídeos foram isolados de diversas espécies, como *P. halicondrioides*, onde Sol Jimenez e colaboradores isolaram os plakortídeos citotóxicos e inibidores do parasita *Plasmodium falciparum* (DEL SOL JIMÉNEZ; GARZÓN; RODRÍGUEZ, 2003).

A espécie *Plakortis angulospiculatus* foi objeto de prévios estudos químico-farmacológicos, onde pode-se citar os estudos de Gunasekera e colaboradores (1990) que reportaram atividade antifúngica contra *Candida albicans*,

Aspergillus nidulans e citotóxica para leucemia murina (P-388) relacionada aos policetídeos isolados de *P. angulospiculatus* proveniente da Venezuela. Os estudos de Kushlan e Faulkner (1991), no ano seguinte, que isolaram a plakinidona com atividade antimicrobiana contra *S. aureus* e *B. subtilis*. Em 1998, os trabalhos de Campagnone e Piña (1998) reportaram atividade leishmanicida contra *Leishmania mexicana* para peróxidos cíclicos isolados de uma espécime coletada no Palau. Partes das estruturas químicas destes compostos estão dispostas na figura 11.

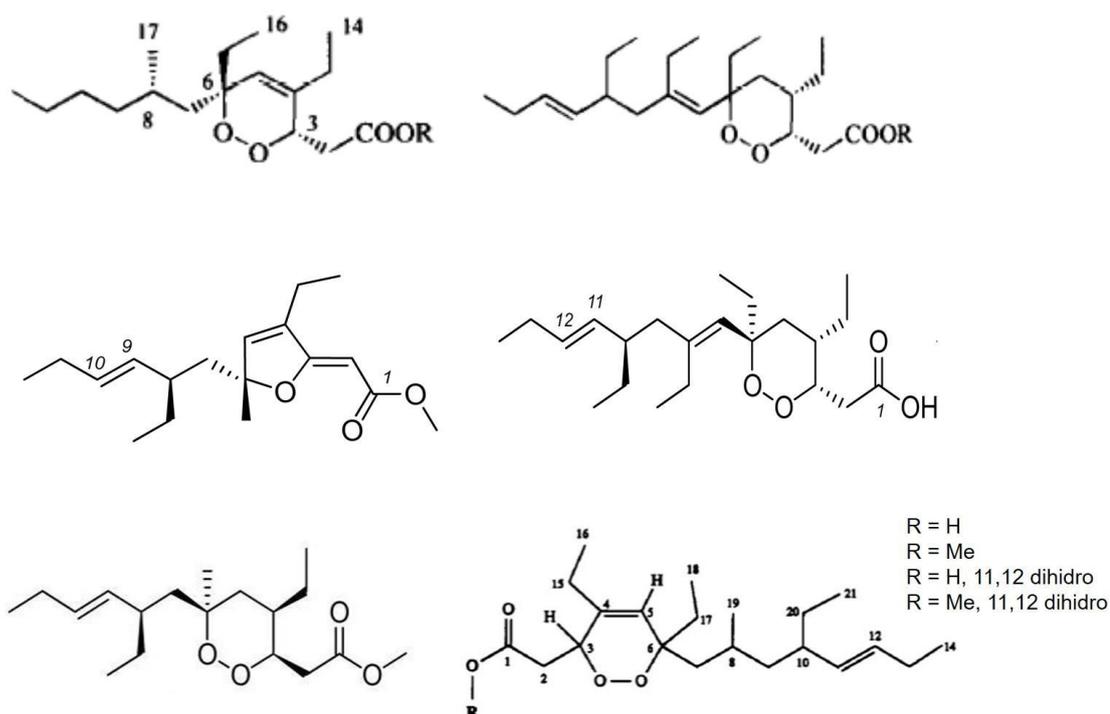


Figura 11 - Estruturas químicas de alguns policetídeos isolados da esponja *P. angulospiculatus*. Fonte: COMPAGNONE *et al.*, 1998; EPIFANIO; PINHEIRO; ALVES, 2005; GUNASEKERA *et al.*, 1990; KOSSUGA *et al.*, 2008; KUSHLAN; FAULKNER, 1991.

No Brasil, os estudos da composição química de espécimes de *P. angulospiculatus*, culminaram no isolamento de policetídeos novos e conhecidos, como plakortina, plakortideo P e espongosoritina A. Entre as atividades biológicas descritas, tem-se o potencial antibacteriano contra *Leucothrix mucor*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Aerococcus viridans* (EPIFANIO; PINHEIRO; ALVES, 2005), atividade antiparasitário contra *Leishmania chagasi* e *Trypanosoma cruzi*, bem como propriedades antineuroinflamatórias e citotóxicas contra linhagens celulares tumorais de leucemia, melanoma, cólon e glioblastoma (KOSSUGA *et al.*, 2008).

1.4. A pesquisa de produtos naturais marinhos no Ceará – UFC

As pesquisas com produtos naturais marinhos no Brasil tiveram início no núcleo de pesquisas de produtos naturais da Universidade Federal do Rio de Janeiro na década de 60 (KELECOM, 1997). No litoral cearense, há cerca de 15 anos, foi iniciado um programa para estudo do potencial biotecnológico de produtos naturais marinhos envolvendo pesquisadores da Universidade Federal do Ceará de diversas áreas do conhecimento, além de colaboradores de outros estados.

Inicialmente, focado nos estudos com invertebrados como esponjas, ascídias e cnidários, esse programa evidenciou a ocorrência de substâncias com potentes propriedades farmacológicas, além de uma lacuna no conhecimento da biodiversidade marinha nessa reunião (JIMENEZ *et al.*, 2003, 2004). Como exemplos de compostos antitumorais interessantes (Figura 12) isolados a partir de invertebrados marinhos, temos: duas 7-oxo-estaurosporinas da ascídia *Eudistoma vancouveri* (JIMENEZ *et al.*, 2012), o alcalóide ptilocaulina da esponja *Monanchora arbuscula* (FERREIRA *et al.*, 2011), os aminoácidos lipídicos do zoantídeo *Protopalythoa variabilis* (WILKE *et al.*, 2009, 2010), e os anfidinolídeos do octoral *Stragulum bicolor* (SOUSA *et al.*, 2015).

Mais recentemente, estes estudos passaram também a enfocar os microorganismos simbiotes e aqueles associados ao sedimento marinho (ABREU *et al.*, 2014; ANDREO *et al.*, 2012; GUIMARÃES *et al.*, 2014; JIMENEZ *et al.*, 2013; SOUSA *et al.*, 2012) reforçando ainda mais, o potencial terapêutico das substâncias produzidas no litoral brasileiro.

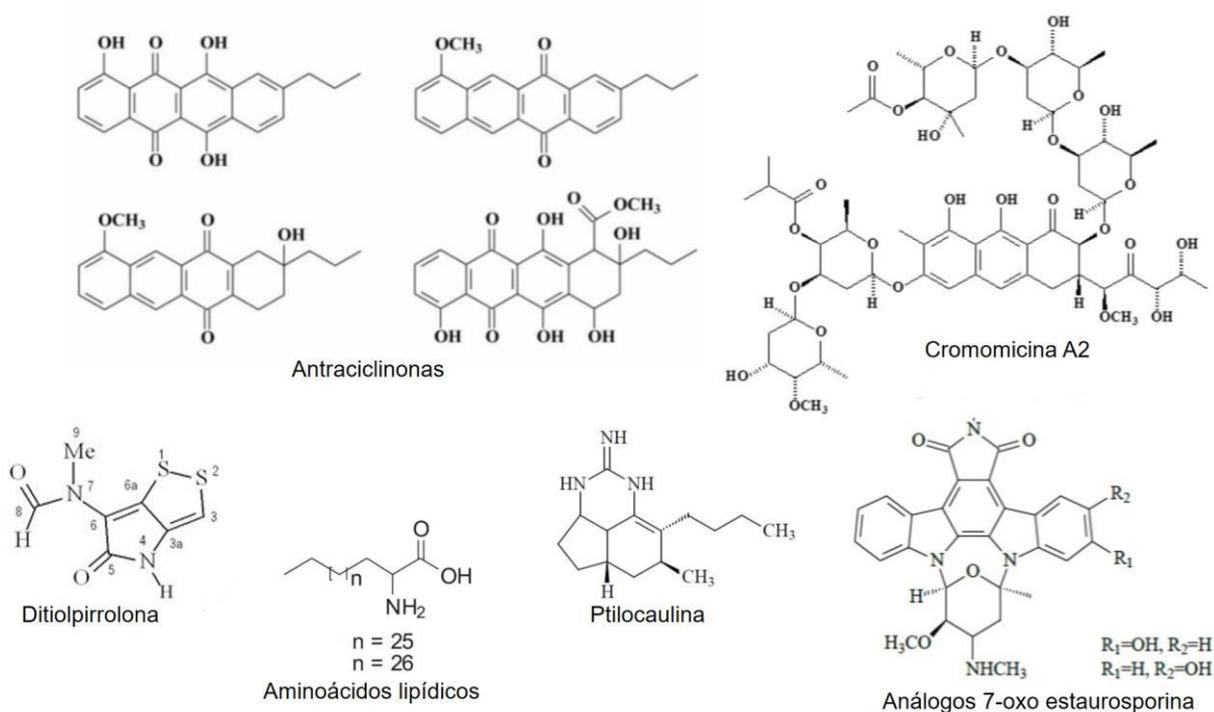


Figura 12 - Compostos isolados de invertebrados e microorganismos marinhos do Ceará. Fonte: (ABREU *et al.*, 2014; FERREIRA *et al.*, 2011; GUIMARÃES *et al.*, 2014; JIMENEZ *et al.*, 2012; SOUSA *et al.*, 2012; WILKE *et al.*, 2009).

2. JUSTIFICATIVA

A contribuição dos produtos naturais na terapia anticâncer, assim como na descoberta de novos alvos terapêuticos, é bastante evidente (NEWMAN; CRAGG, 2016). A atuação desses fármacos com mecanismos de ação distintos no tratamento de tumores avançados ou refratários à quimioterapia convencional se faz extremamente importante em virtude da necessidade de novas estratégias de tratamento (CRAGG; NEWMAN, 2006; NEWMAN; CRAGG, 2004). Porém, apesar de importantes avanços no entendimento das neoplasias, o câncer se apresenta como a principal causa de morte por doença no mundo, com estimativas de ocorrência de 600 mil de casos incidentes no Brasil para o biênio 2016-2017 (OMS 2016; INCA, 2016).

Muitos dos fármacos utilizados na quimioterapia do câncer apresentam como característica comum a citotoxicidade, embora os alvos intracelulares sejam

diversos, como: tubulinas, topoisomerases, DNA, receptores tirosinas quinase, proteínas envolvidas no ciclo celular, dentre outros (CRAGG; GROTHAUS; NEWMAN, 2009; NAGLE *et al.*, 2004).

A quimioterapia tem como principal objetivo, a erradicação das células neoplásicas, sem prejudicar os tecidos normais. Entretanto, a maioria dos agentes quimioterápicos não satisfazem esse critério, atuando de forma não-específica, o que explica a maior parte dos efeitos colaterais do tratamento quimioterápico (KATZUNG, 2006; KUMMAR *et al.*, 2007). A possibilidade de resistência ao agente antitumoral também representa uma das principais causas de falhas no tratamento (RAGUZ; YAGÜE, 2008; TAN *et al.*, 2010).

A importância do entendimento do modo de ação e identificação de alvos para compostos antiproliferativos está relacionado com o melhor entendimento da base molecular do câncer, portanto estudos nesse sentido são essenciais para o desenvolvimento de fármacos a partir de produtos naturais (LUESCH, 2006). Diante deste cenário, a elucidação do mecanismo de ação de novos agentes antitumorais e o melhor entendimento das alterações genotípicas e fenotípicas podem garantir um tratamento com maior eficácia e especificidade e menor índice de resistência, o que continuam sendo de grande valia para o tratamento do câncer.

Para o tratamento, principalmente, de novas doenças ou daquelas resistentes a fármacos já existentes, há a necessidade do desenvolvimento de novos quimioterápicos (XIONG *et al.*, 2013). Diante dessa problemática, os organismos marinhos têm sido uma importante alternativa para o desenvolvimento de novos medicamentos anticâncer, haja visto a quantidade expressiva de compostos antineoplásicos em fases pré-clínica e clínica, além daqueles presentes no mercado farmacêutico utilizados no tratamento de tumores avançados ou refratários à quimioterapia convencional, descrito na tabela 1 (GERWICK; MOORE, 2012; MARTINS *et al.*, 2014; NEWMAN; CRAGG, 2016, 2012), evidenciando a contribuição de extrema relevância na terapia de câncer.

Com o vasto potencial farmacológico de biodiversidade marinha, contido nos 573 km de zona costeira cearense, ainda pouco explorado nesse sentido, a investigação de novas substâncias terapêuticas para o tratamento do câncer se faz de grande relevância. Nesse contexto, as esponjas marinhas desempenham importante papel na prospecção de novos produtos naturais, visto que são as

principais contribuidoras de farmacóforos com potencial anticâncer com a habilidade de interagir com diversos alvos implicados na carcinogênese, como elementos do citoesqueleto, fator nuclear kappa B (NFkB), fatores de indução de hipóxia (HIF), proteína de resistência ao câncer de mama (BRCP), receptores nucleares, glicoproteína P, metaloproteinases (MMPs), proteína quinase C (PKC), dentre outros (SHAKERI; SAHEBKAR, 2015).

Assim, entre os esforços despendidos na bioprospecção de metabólitos secundários oriundos de invertebrados marinhos da costa cearense com potencial anticâncer por nosso grupo de pesquisa, avaliamos a citotoxicidade de metabólitos secundários obtidos da esponja *Plakortis angulospiculatus* (Homosclerophorida, Plakinidae), previamente reportada com propriedades antifúngicas, antimicrobianas e citotóxicas (COMPAGNONE *et al.*, 1998; EPIFANIO; PINHEIRO; ALVES, 2005; GUNASEKERA *et al.*, 1990; KOSSUGA *et al.*, 2008; KUSHLAN; FAULKNER, 1991) com o intuito de identificar novos compostos e estudar seus modos de ação.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Realizar a prospecção de substâncias com potencial anticâncer a partir do extrato bruto da esponja marinha *Plakortis angulospiculatus* coletada no litoral do Ceará.

3.2. Objetivos específicos

- Isolar e caracterizar metabólitos citotóxicos para células tumorais a partir do extrato da esponja marinha *Plakortis angulospiculatus*;
- Identificar características estruturais das moléculas obtidas, buscando reconhecer os atributos funcionais relacionados à citotoxicidade e mecanismo de ação;
- Avaliar os efeitos dos compostos obtidos sobre a proliferação celular tumoral, ciclo celular, citoesqueleto e vias dependentes de cálcio.

MÉTODOS

4.1. Delineamento Experimental

Iniciamos este trabalho, com a coleta da esponja *P. angulospiculatus*, seguida do fracionamento, purificação e identificação dos compostos guiados pelo ensaio de citotoxicidade (MTT). Os compostos isolados foram submetidos ao teste do MTT 72 e 24 horas em linhagens celulares tumorais (HCT-116, PC-3M, MCF-7) e não tumorais (MRC-5) a fim de estabelecer a atividade citotóxica de cada substância. Baseado nos valores de CI_{50} , as amostras foram submetidas a testes para avaliar possíveis mecanismos de ação citotóxica, utilizando métodos como citometria de fluxo, para avaliar viabilidade, densidade e ciclo celular, microscopia ótica e confocal, na intenção de visualizar alterações morfológicas após o tratamento com as substâncias escolhidas, como ilustrado na figura 13. Os métodos utilizados estão detalhados a seguir.

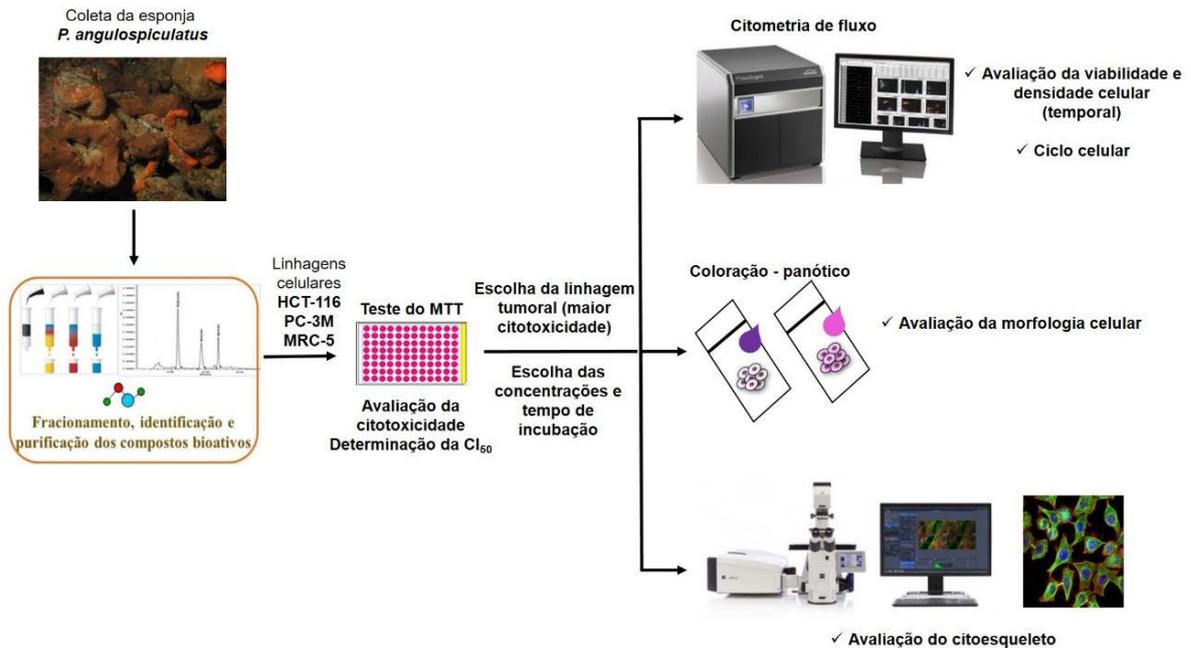


Figura 13 - Esquema do desenho experimental da tese.

4.2. Coleta e identificação da esponja

Espécimes de *P. angulospiculatus* (Figura 14) foram coletados no litoral oeste do Ceará, Praia de Flexeiras ($3^{\circ}13'7,29''\text{S}$ – $39^{\circ}15'48,40''$) em Março de 2014, pelo prof. Dr. Eduardo Hadju, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Após a coleta, o material foi acondicionado em gelo e transportado para o laboratório para ser processado. Uma pequena porção foi preservada em etanol 96% para identificação da espécie, que foi catalogada com o código MNRJ 17753 e depositada na coleção de poríferos do museu nacional da Universidade Federal do Rio de Janeiro. A figura 15 destaca o local de coleta.

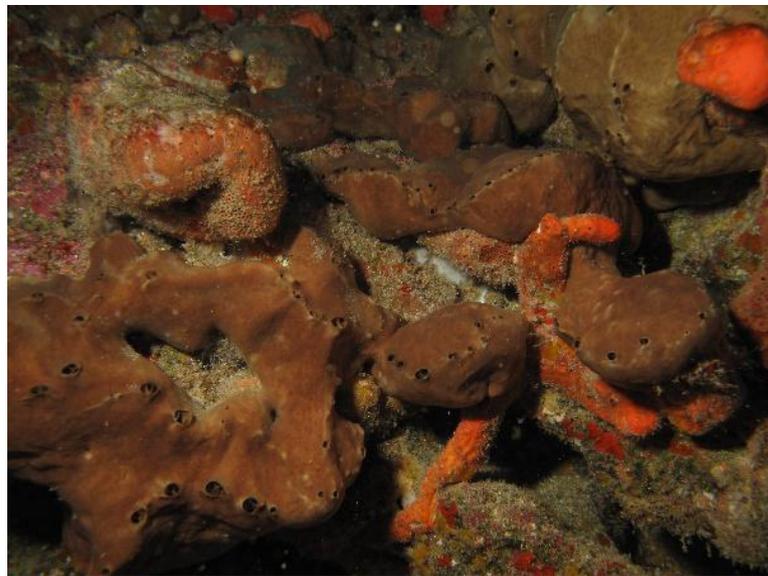


Figura 14 - Foto da esponja *Plakortis angulospiculatus*, de coloração marrom. Fonte: Hadju, E.

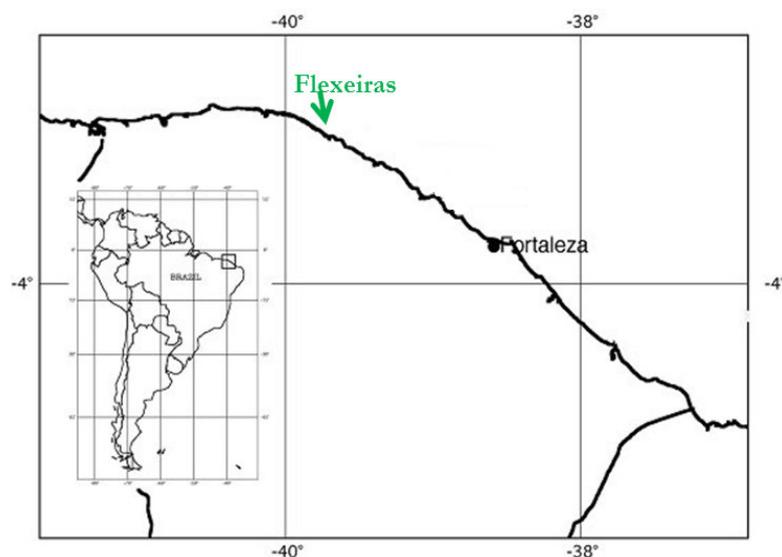


Figura 15 - Mapa identificando a praia e local de coleta da esponja no litoral do Ceará.

4.3. Isolamento e determinação estrutural dos policetídeos

A extração da esponja *P.angulospiculatus*, isolamento e determinação estrutural dos compostos foram realizados pelo laboratório de Análise Fitoquímica de Plantas Medicinais II (LAFIPLAM), do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, coordenado pela prof. Dra. Otília Pessoa. Os métodos utilizados estão detalhados no ANEXO I.

Os espectros obtidos das análises de infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear (RNM), espectrometria de massa (MS) e rotação óptica (VER ANEXO III), pareados aos dados previamente publicados na literatura especializada indicaram que os compostos isolados são peróxidos cíclicos, mais precisamente do grupo dos plakortídeos, incluindo 2 compostos considerados inéditos, nomeados de 7,8-dihidropalakortídeo E (1), (2) e 11,12-dihidropalakortídeo P (10), relacionados à plakortídeos já conhecidos, plakortídeo E e H. A estruturas químicas, nomenclatura e códigos dos policetídeos isolados e nomes dos compostos estão listados a seguir.

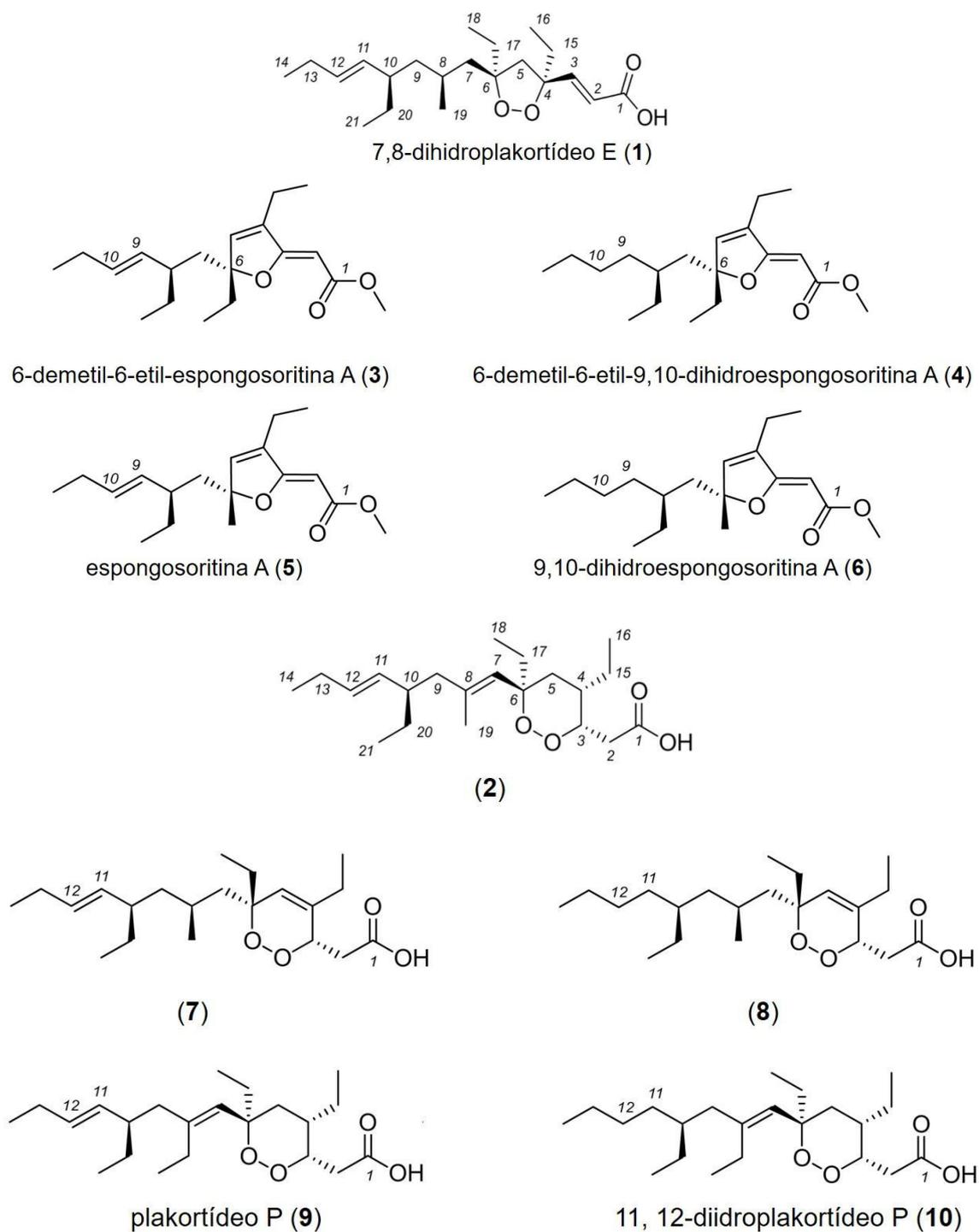


Figura 16 - Estruturas químicas, nomes dos compostos isolados, e seus respectivos códigos, do extrato etanólico da esponja *Plakortis angulospiculatus*.

4.4. Avaliação da atividade citotóxica in vitro

4.4.1. Linhagens celulares

As linhagens celulares humanas utilizadas para os ensaios de citotoxicidade e mecanismo de ação foram obtidas por doação do Instituto do câncer dos Estados Unidos ou adquiridas do banco de células do Rio de Janeiro.

Tabela 3. Linhagens celulares e tipos histológicos utilizadas na avaliação da citotoxicidade.

Linhagem celular	Tipo histológico	Doença
HCT-116	Cólon	Carcinoma colorectal
PC-3M	Próstata (derivado de sítio metastático – osso)	Adenocarcinoma de próstata
MCF-7	Mama	Adenocarcinoma de mama
MRC-5	Fibroblasto	Pulmão fetal (não tumoral)

4.4.2. Cultivo das linhagens celulares

As linhagens celulares foram manuseadas em cabine de fluxo laminar vertical e incubadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ (SANYO[®], modelo MCO-19AIC). As linhagens foram cultivadas em garrafas de 25 cm² (SARSTEDT[®]) utilizando meio de cultura RPMI 1640 (GIBCO[®]) suplementado com 10% de soro fetal bovino (GIBCO[®]) e 1% penicilina (10.000 U/mL)/estreptomicina (10.000 µg/mL) (GIBCO[®]). A proliferação celular das culturas foi monitorada por observação em microscópio de inversão (modelo TCM 400; Nikon[®]) e repicadas em novo meio de cultura quando necessário. Para desprendimento das células aderidas utilizou-se tripsina-EDTA (GIBCO[®]) 0,5% diluída 10x em tampão de fosfato salino (PBS - GIBCO[®]).

4.4.3. Teste do MTT

O teste do MTT foi realizado no intuito de monitorar a atividade citotóxica de extratos, frações e compostos isolados após as etapas de fracionamento. Este ensaio consiste numa análise colorimétrica que quantifica indiretamente as células viáveis baseada na conversão do sal de MTT ((brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-

Difeniltetrazólio) (Sigma-Aldrich®), um composto de cor amarela, à formazan, de coloração púrpura, através da enzima succinato desidrogenase presente nas mitocôndrias ativas de células viáveis. Este ensaio foi realizado frente a linhagens celulares tumorais e normal, possibilitando a avaliação da citotoxicidade de forma qualitativa (valor de porcentagem de inibição da proliferação) e quantitativa (valor da concentração inibitória média (CI₅₀) (MOSMANN, 1983). Doxorubicina foi utilizada como controle positivo do experimento.

As células foram cultivadas em placas de 96 poços (SARSTEDT®) numa concentração de 5×10^4 células/mL (200 µL por poço). Após 24 horas, as amostras foram adicionadas em concentrações de 1 e 10 µg/mL ou em diluições seriadas (0.00064 – 50 µg/mL) e incubadas 24 ou 72 horas. Após 69 horas de incubação, 150 µL do sal de MTT (0,5 mg/mL) foi adicionado em cada poço e a placa reincubada por mais 3 horas. Após este período, o sobrenadante foi desprezado, o precipitado dissolvido em 150 µL de DMSO, seguida da leitura da absorbância a 570 nm em espectrofotômetro de placa Multiskan FC (Fisher Scientific®).

Alíquotas de cada fração (VER ANEXO I), foram dissolvidos em DMSO (P.A.) em soluções-estoque de 10 mg/mL e submetidas ao teste de citotoxicidade (MTT) em célula tumoral de adenocarcinoma de cólon (HCT-116). Da mesma forma, os compostos isolados também foram testados quanto à sua citotoxicidade também em células tumorais de próstata metastática (PC-3M), mama (MCF-7) e a linhagem não tumoral MRC-5.

Análise dos dados:

Para análise da porcentagem de inibição da proliferação tumoral, o valor da absorbância foi convertido em porcentagem em relação ao controle negativo. O valor de CI₅₀ e intervalo de confiança foram calculados por regressão não-linear utilizando o programa GraphPad Prism 5.0 (Intuitive Software for Science).

4.5. Estudos de mecanismo de ação

Para a avaliação do mecanismo citotóxico dos compostos isolados escolhidos utilizamos as linhagens HCT-116 e MCF-7.

4.5.1. Análise morfológica – Coloração diferencial por corante panótico

A coloração diferencial por corante panótico permite diferenciar o citoplasma do núcleo, possibilitando, assim, a análise de algumas estruturas celulares. A análise microscópica das células tratadas permite identificar alterações e fornecer subsídios para sugerir o mecanismo de ação do composto em estudo.

Células das linhagens tumorais de HCT-116 e MCF-7 foram cultivadas em lamínulas dentro de placas de 24 poços na concentração de 5×10^4 cells/mL, inubadas por 24 horas e tratadas com as substâncias **3**, **5** (50 μ M, 100 μ M), **2**, **7** (5 μ M, 15 μ M) e **9** (2.5 μ M, 5 μ M), 0.4% DMSO (v/v) (controle negativo) e doxorubicina 0.25 μ M (controle positivo). Após 24 horas de exposição, as células foram fixadas, coradas usando o kit para células hematológicas (Quick Panoptic Kit, Laboclin[®], Paraná) e montadas em lâminas. As células foram examinadas e fotografadas em microscópio óptico BX-41 (Olympus[®]), no aumento de 200x e 400x.

4.5.2. Determinação da Integridade de membrana e densidade celular

A citometria de fluxo é uma técnica que permite realizar análises multiparamétricas de células em suspensão marcadas com corantes fluorescentes, através da análise do desvio da luz incidente sobre as células e emissão de fluorescência (SHAPIRO, 1995).

Este ensaio se baseia na dispersão da luz incidente sobre as células e na capacidade do fluorocromo iodeto de propídeo (PI) penetrar nas células, cuja membrana esteja rompida (não-viáveis) e intercalar ao DNA nuclear, emitindo alta fluorescência vermelha enquanto as células viáveis emitem baixa fluorescência. Células HCT-116 e MCF-7 foram cultivadas em placas de 24 poços na concentração de 5×10^4 cells/mL, incubadas com substâncias por 24 horas nas concentrações 50 μ M e 100 μ M (**3** e **5**), 5 e 15 μ M (**2**, **7**), 2,5 μ M e 5 μ M (**9**), 0,4% DMSO (v/v) (controle

negativo) e 0,25 μ M de doxorubicina (controle positivo). Em seguida, as células foram descoladas com 0.05% tripsina-EDTA (GIBCO[®]), centrifugadas (2000rpm/5 min.) e ressuspensa em solução de 5 μ g/mL de iodeto de propídeo (SIGMA - ALDRICH[®]). Após 5 minutos de incubação no escuro, 10000 eventos foram adquiridos no citômetro de fluxo Accuri C6 (BD Biosciences GIBCO[®]) em região que excluía debris e doublets.

4.5.3. Avaliação do ciclo celular e fragmentação do DNA

Este ensaio permite determinar a integridade e o conteúdo de DNA nas diferentes fases do ciclo celular ($G_0/G_1 - 2n$, $G_2/M - 4n$) podendo inferir em qual fase do ciclo a célula se encontra. Assim, para avaliar se a citotoxicidade dos compostos-teste interfere no ciclo celular além da detecção de DNA fragmentado, comum em processos de apoptose, utilizou-se o iodeto de propídeo (PI) (SIGMA - ALDRICH[®]) que possui a capacidade de se ligar ao DNA emitindo alta fluorescência vermelha.

Células HCT-116 e MCF-7 foram cultivadas em placas de 24 poços na concentração de 5×10^4 células/mL, incubadas com substâncias por 24 horas nas concentrações 50 μ M e 100 μ M (3 e 5), 5 e 15 μ M (2, 7) 2,5 μ M e 5 μ M (9), 0.4% DMSO (v/v) (controle negativo) e 0,25 μ M de doxorubicina (controle positivo). Em seguida, as células foram descoladas com solução de 0.05% de tripsina-EDTA (GIBCO[®]), centrifugadas e resuspendidas em solução de 5 μ g/mL de PI, 0.1% citrato de sódio e 0.1% de Triton X-100. Após 30 min de incubação no escuro, 10000 eventos foram adquiridos no citômetro de fluxo Accuri C6 (BD Biosciences[®]) em região que excluía debris e doublets. Os histogramas foram adquiridos no canal FL3 (comprimento de onda Excitação/Emissão: 488/620 nm) em escala linear. O perfil do ciclo celular foi analisado pelo programa ModFit LT 4.0 (Verity Software House) e histogramas representados nas figuras 18 e 24 foram desenvolvidos no programa Flow Jo X (Tree Star).

Análise dos dados:

As diferenças entre os grupos experimentais foram determinados por análise de variância ANOVA seguida de teste de Dunnett com nível de significância de 5% ($p < 0.05$) realizado no programa GraphPad 5.0 (Intuitive Software for Science).

4.5.4. Microscopia confocal

Microscopia confocal é uma técnica que permite a construção de imagens tridimensionais com alta resolução de estruturas celulares marcadas por fluorocromos específicos, através da utilização de um orifício de abertura, o pinhole, que permite uma maior definição da imagem em amostras mais espessas que o plano focal. Desse modo, utilizamos desta técnica para visualizar eventuais alterações no citoesqueleto celular que possam estar sendo induzidas pela(s) substância(s) teste(s) ao analisar microfilamentos de tubulina, assim como núcleo e nucléolos.

Células HCT-116 e MCF-7 foram cultivadas em placas de 24 poços na concentração de 5×10^4 cells/mL, incubadas com substâncias por 24 horas nas concentrações 50 μ M (3 e 5), 5 μ M (2, 7) 2,5 μ M (9), 0.4% DMSO (v/v) (controle negativo), 0,25 μ M de doxorrubicina (controle positivo) e paclitaxel 50 nM. Após a incubação, as células foram lavadas com tampão PBS, fixadas com formaldeído (3.7%) por 30 minutos, permeabilizadas com Triton-X (0.25%) por 30 minutos e contracoradas com os fluorocromos 4'-6-diamino-2-phenylindole dilactate (DAPI, Life Technologies[®]) na concentração de 1 μ M para coloração do núcleo e Faloidina conjugada com FITC (1:100). Tubulina foi marcada com anti-tubulina-Alexa Fluor 647 (Life Technologies[®]) na concentração de 1:200. Células foram examinadas em microscópio confocal LSM 710 (Zeiss[®]).

4.5.5. Avaliação da atividade antiproliferativa por teste de exclusão por azul de tripan

O ensaio com corante vital, azul de Tripan, permite a distinção visual das células viáveis daquelas não viáveis, uma vez que este corante é capaz de penetrar em todas as células, porém somente as células com membrana íntegra, bombeiam o corante para fora, diferenciando-se das células mortas, que adquirem coloração

azul. Este ensaio permitiu contabilizar o número de células HCT-116 após tratamento com plakortídeo P (9) e ciclosporina A, e dessa forma, avaliar o efeito antiproliferativo destes compostos isolados e em combinação após 24 horas de incubação. Após o período de exposição, as células foram lavadas com 200 μ L de PBS, desprendidas após adição de 150 μ L de tripsina-EDTA 0,25% e permanência de 3 minutos em estufa incubadora (37°C, atmosfera de 5% de CO₂). Em seguida, uma alíquota de 90 μ L foi retirada da suspensão de células e adicionada a 10 μ L do azul de Tripán 4% (GIBCO®). Desta solução, células foram contadas em câmara de Neubauer e diferenciadas visualmente por microscópio ótico, em viáveis e não viáveis. O número de células contadas em cada experimento foi expresso como a média normalizada \pm erro padrão da média de 3 experimentos independentes (realizados em duplicata).

Análise dos dados:

As diferenças entre os grupos experimentais foram determinados por análise de variância ANOVA seguida de teste de Dunnett com nível de significância de 5% ($p < 0.05$) realizado no programa GraphPad 5.0 (Intuitive Software for Science).

RESULTADOS

5.1. Avaliação da atividade citotóxica dos plakortídeos isolados em células tumorais e normal *in vitro*

Os plakortídeos isolados (figura 16) foram submetidos ao teste do MTT contra 3 linhagens celulares tumorais e 1 linhagem não tumoral *in vitro* após 72 horas e 24 horas de incubação. De acordo com os resultados, expostos na tabela 6, os plakortídeos **2**, **3**, **5**, **7**, **8** e **9** foram considerados citotóxicos após 72 horas de incubação por apresentarem valores de CI_{50} abaixo de 10 μM .

O plakortídeo inédito, dihidroplakortídeo E (**1**), não apresentou citotoxicidade ($CI_{50} > 141,8 \mu M$) nas linhagens celulares testadas. Já o **2** demonstrou alta citotoxicidade para a linhagem tumoral de cólon (HCT-116) com valor de CI_{50} de 2,8 μM e seletividade para células tumorais, com toxicidade 18 vezes maior para HCT-116 que na célula não tumoral MRC-5.

A citotoxicidade dos plakortídeos com anel dihidrofurano (**3** – **6**), foi, em geral, baixa, com valores de CI_{50} variando de 5,4 a 171 μM para células tumorais, com ênfase na atividade significativa dos compostos **3** e **5**, que exibiram valores de CI_{50} de 8,1 e 5,4 μM , respectivamente, contra a linhagem tumoral HCT-116. Estes compostos também demonstraram atividade citotóxica dependente do tempo, pois os valores de CI_{50} aumentaram consideravelmente (cerca de 8,2 vezes) com a redução do tempo de exposição de 72 horas para 24 horas. Quando comparado a citotoxicidade em células não tumorais, somente o composto **3** foi considerado seletivo, sendo cerca de 20 vezes mais potente para células tumorais HCT-116 que para células não tumorais MRC-5.

Para o grupo com anel oxigenado de 6 membros (**2**, **7-10**), a atividade citotóxica foi considerada maior que no outro grupo, com valores de CI_{50} variando de 0,2 a 10 μM , porém demonstraram baixa seletividade para células tumorais, com exceção do composto inédito **2** descrito anteriormente. A citotoxicidade destes plakortídeos não foram afetados pelo tempo de incubação, exibindo valores de CI_{50} similares após 24 e 72 horas de incubação.

Tabela 4. Atividade citotóxica in vitro dos plakortídeos (1 a 10) obtidas da CLAE em linhagens tumorais de cólon (HCT-116), próstata metastática (PC-3M), carcinoma de mama (MCF-7) e fibroblasto normal (MRC-5) pelo ensaio do MTT após 72 horas e 24 horas de incubação. CI_{50} e IC 95% (μM) obtidas a partir da média e respectivos erro padrão da média de 2 experimentos independentes em duplicata determinados por regressão não-linear gerada no programa GraphPad Prism 5.0. + representa o controle positivo (doxorrubicina).

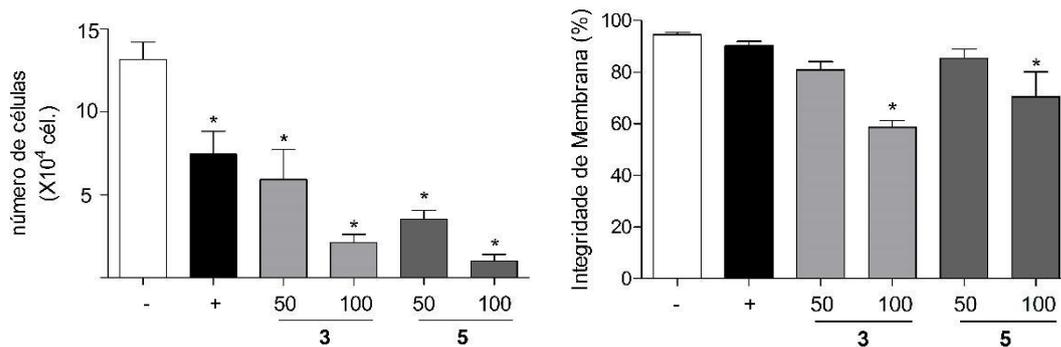
Amostras	CI_{50} (μM)					IC – inte rval o de con fian ça
	72h			24h		
	HCT-116	PC-3M	MRC-5	HCT-116	MCF-7	
1	> 141,8	> 141,8	>141,8	-	-	D ian te da cito toxi cid ad e do s pla kor tíd
2	2,8 1,9 – 4,2	11,7 9,3 – 14,7	51,1 16,9 – 154,7	14,5 9,3 – 22,7	21,1 15,41 – 29,0	
3	8,1 4,7 – 13,8	> 163,1	> 163,1	59,1 25,4 – 137,7	-	
4	19,1 11,9 – 30,6	> 162,1	92,1 34,8 – 243,9	> 162,1	-	
5	5,4 2,6 – 10,9	25,1 4,2 – 149,4	3,3 1,2 – 9,6	44,3 -	-	
6	36,6 16,4 – 81,4	> 171,0	52,3 9,0 – 303,4	> 171,0	-	
7	3,8 3,0 – 4,8	3,7 1,9 – 5,9	2,0 1,13 – 3,6	6,2 2,2 – 17,1	-	
8	10,5 6,5 – 16,7	2,8 2,1 – 3,9	0,5 0,2 – 0,9	-	-	
9	3,6 1,7 – 7,9	2,2 1,3 – 3,8	0,2 0,01 – 0,3	3,2 0,5 – 8,1	5,6 2,91 – 10,9	
10	64,8 14,4 – 292,7	20,5 8,6 – 47,9	31,1 15,1 – 63,9	26,9 19 – 37	-	
+	0,02 0,02 – 0,03	0,36 0,2 - 0,7	2,0 0,7 – 5,0	1,9 0,6 – 6,3	-	

os demonstrada anteriormente, escolhemos 5 compostos (2, 3, 5, 7 e 9), com representantes dos 2 grupos incluindo os compostos espongosoritina A (5) e plakortídeo P (9) para avaliar o mecanismo da citotoxicidade em células tumorais. Inicialmente, desenvolvemos estudos em citometria de fluxo, seguidos de avaliação morfológica.

5.2. Avaliação da viabilidade e densidade celular

Na determinação da densidade de células HCT-116 tratadas com plakortídeos **2**, **3**, **5**, **7** e **9**, verificou-se redução significativa do número de células tratadas com plakotídeos **3** e **5** nas concentrações de 50 e 100 μM (Figura 18a). Este efeito foi acompanhado da redução da integridade de membrana na concentração de 100 μM (Controle = 94,45%; (5) = 70,45%). Para os plakortídeos **7** e **9** observou-se diminuição da densidade celular acompanhado de redução do número de células com membrana íntegra (7=75,51%; 9=76,31%), visualizados nas maiores concentrações, enquanto o composto **2** não exibiu nenhum dos efeitos nas concentrações testadas (figura 18b).

a)



b)

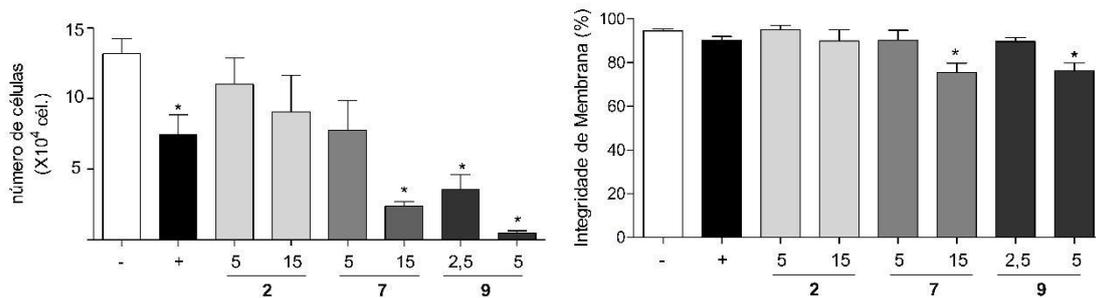


Figura 17 - Efeitos dos compostos na densidade celular e integridade de membrana em células HCT-116. a) Efeitos dos compostos 3 e 5 na densidade celular e integridade de membrana. b) Efeitos dos plakortídeos 2, 7 e 9 na densidade celular e integridade de membrana. Células foram incubadas com plakortídeos nas concentrações 50 e 100 μM (3 e 5), 5 e 15 μM (2, 7) e 2,5 e 5 μM (9) por 24 horas e analisadas por citometria de fluxo após marcação com iodo de propídeo. O controle negativo representa o veículo utilizado para a diluição dos compostos (DMSO, -), o controle positivo representa doxorubicina 0,25 μM (+). Dados são apresentados como médias \pm erro padrão da média, de três experimentos independentes conduzidos em triplicata. Dez mil eventos foram analisados por replicata. * $p < 0,05$ foi obtido em comparação com controle negativo por teste de variância ANOVA seguido do teste de comparação de Dunnet.

5.3. Avaliação do ciclo celular

Ao utilizar a técnica de citometria de fluxo, comparamos o efeito destes compostos sobre o ciclo de células HCT-116, e observou-se um aumento de células em fase G_0/G_1 após tratamento com compostos **3** e **5**, com efeito mais proeminente para o composto **5**, com valores de 67,46% e 69,38%, para as concentrações de 50 e 100 μM , enquanto o controle negativo apresentou 48,47% das células em fase G_0/G_1 (Tabela 7).

Tabela 5. Porcentagem de células HCT-116 nas fases G_0/G_1 , S e G_2/M após incubação com compostos 2, 3, 5, 7 e 9 por 24 horas.

Compostos	[] μM	Fase ciclo celular (%)		
		G_0/G_1	S	G_2/M
-	-	48,47 \pm 2,7	31,81 \pm 2,0	19,78 \pm 1,8
+	0,25	25,60 \pm 1,7	6,36 \pm 0,8	68,06 \pm 2,2
	5	56,18 \pm 4,7	21,55 \pm 4,3	22,26 \pm 3,0
2	15	56,66 \pm 3,1	14,70 \pm 3,4 ^b	28,74 \pm 5,4
	50	56,94 \pm 1,2	27,99 \pm 3,2	15,07 \pm 2,1
3	100	56,49 \pm 1,5	10,62 \pm 6,1 ^b	32,90 \pm 5,2
	50	67,46 \pm 1,5 ^a	21,04 \pm 2,9	14,29 \pm 2,2
5	100	69,38 \pm 2,0 ^a	15,86 \pm 2,0 ^b	17,87 \pm 4,5
	5	43,78 \pm 3,1	27,54 \pm 4,3	28,68 \pm 6,6
7	15	45,53 \pm 1,8	21,44 \pm 5,5	33,09 \pm 4,3 ^c
	2,5	35,61 \pm 2,9 ^a	19,84 \pm 1,1	45,13 \pm 4,1 ^c
9	5	32,25 \pm 3,7 ^a	17,22 \pm 6,3 ^b	45,76 \pm 4,9 ^c

Dados estão representados como média \pm E.P.M., de 3 experimentos em triplicata. Diferenças significativas comparadas com respectivo grupo controle negativo. DMSO foi utilizado como controle negativo e doxorrubicina como controle positivo. ^{a,b,c} $p \leq 0.05$.

O tratamento com plakortídeo **9**, nas duas concentrações avaliadas, induziu aumento significativo da porcentagem de células na fase G₂M (45,13% e 45,76%) quando comparado com o controle (19,78%), enquanto este efeito foi visualizado somente na maior concentração do plakortídeo **7** (33,09%), porém não foi exibido pelo plakortídeo **2** em qualquer concentração testada. Gráficos representativos na figura 19.

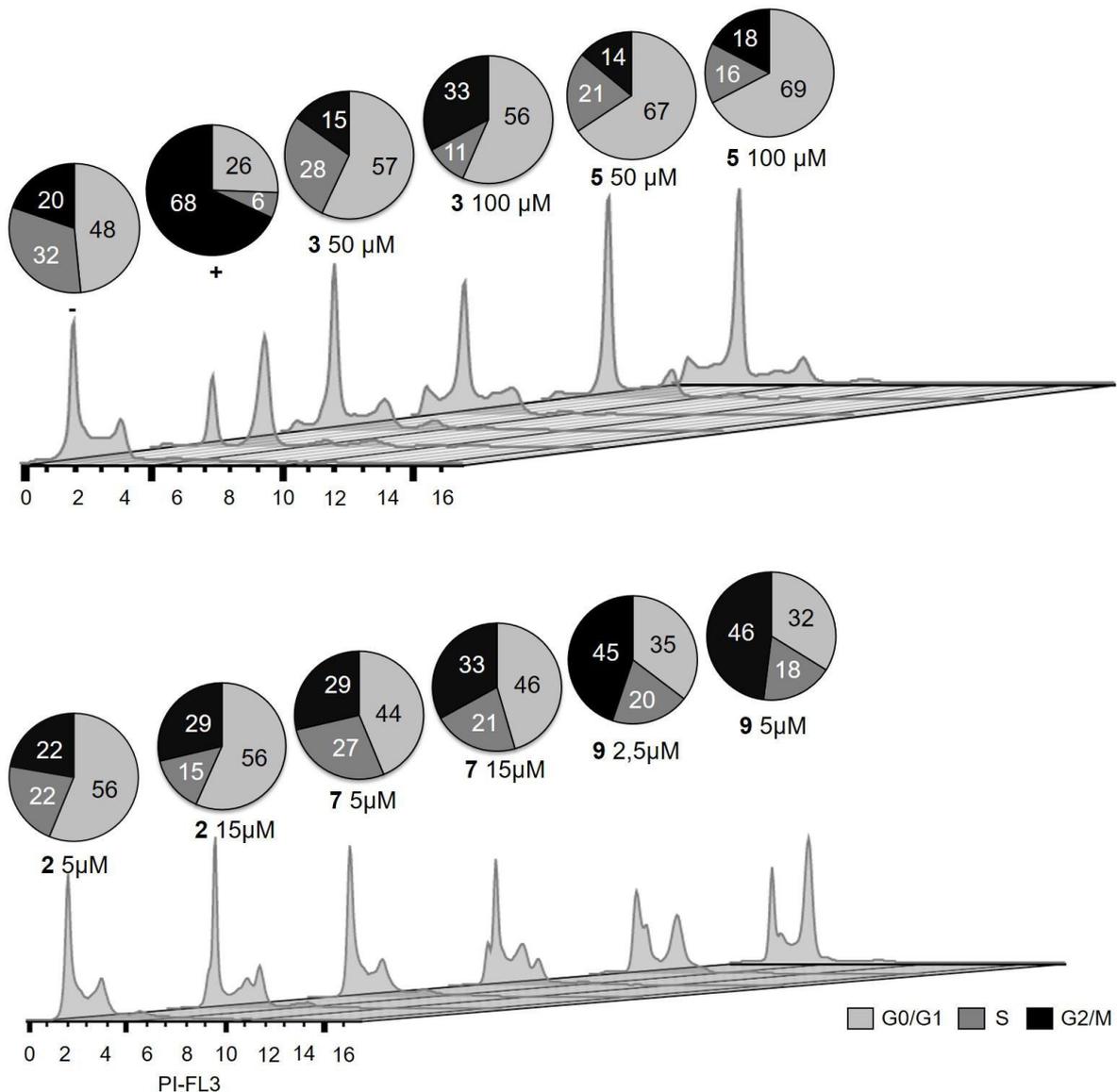


Figura 18 - Histogramas representativos dos efeitos dos plakortídeos **3** e **5** (a) e **2**, **7**, **9** (b) na distribuição do ciclo celular de HCT-116. Células foram tratadas com DMSO (-), 0,25 μM de doxorrubicina (+), **3** e **5** (50 μM e 100 μM) por 24 horas e analisado por citometria de fluxo. Dez mil eventos foram adquiridos por replicata. As porcentagens das fases G₀/G₁, S e G₂/M foram analisadas usando o programa ModFit LT 4.0. *p<0.05 comparado ao grupo controle por teste de variância ANOVA, seguido do teste de comparação de Dunnett. Média dos valores de porcentagem de fases em representados em gráficos de pizza acima dos histogramas respectivos de cada concentração.

5.4. Morfologia celular

Análises microscópicas de células HCT-116 tratadas com os compostos em estudo e coradas com kit panótico revelaram a presença de células em mitose após o tratamento com plakortídeos **2**, **7** e **9**, mais evidente para o plakortídeo P (**9**) na concentração de 5 μM , corroborando com os achados na análise do ciclo celular, causando aparente bloqueio em mitose (figura 20).

Contrariamente, os compostos **3** e **5** não apresentaram células em mitose em quantidades significativas, nem sinais de morte celular na concentração de 50 μM (figura 20). Já na concentração de 100 μM , devido ao grande número de células mortas, não foi possível realizar microfotografias.

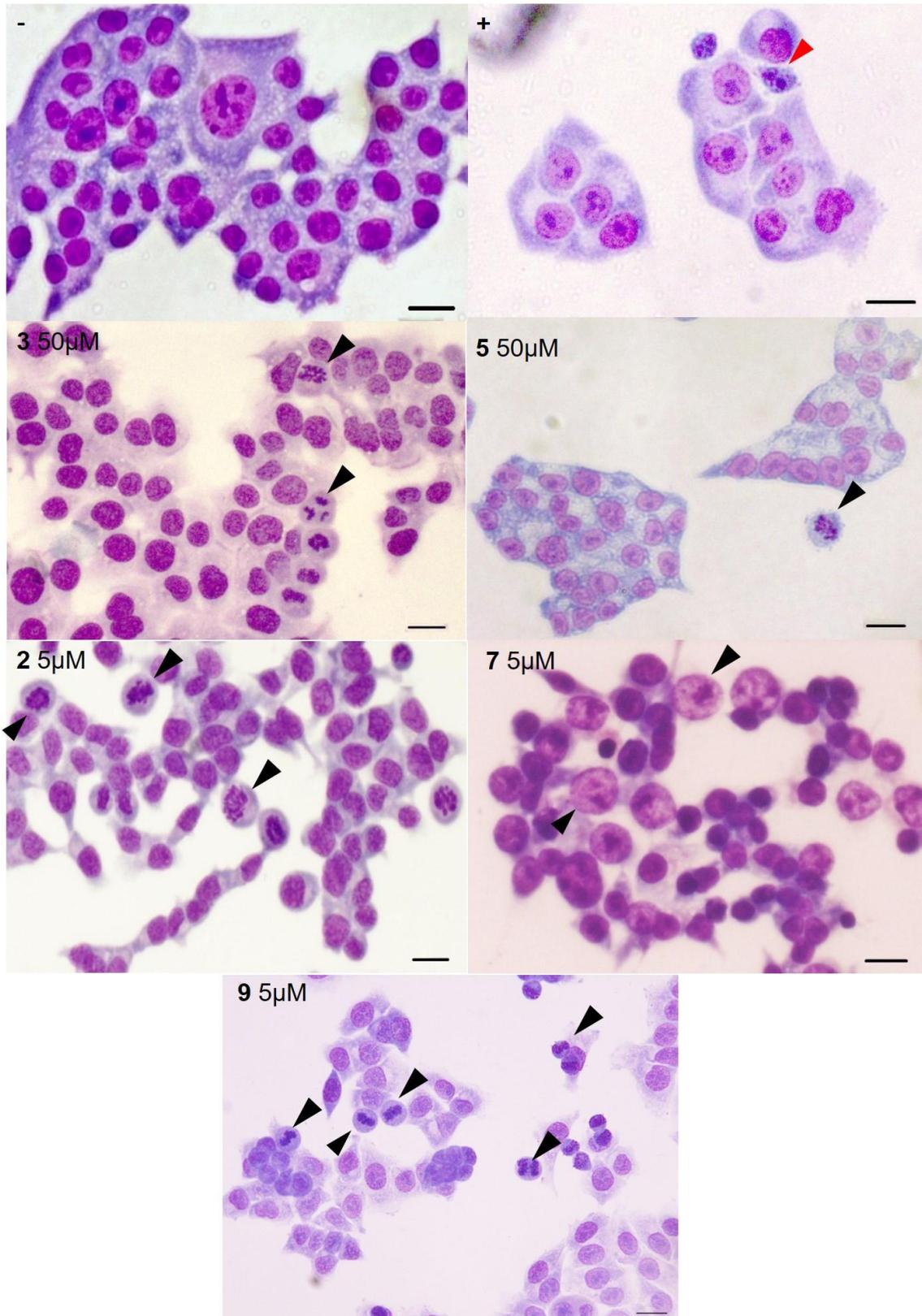


Figura 19 - Fotomicrografias de células HCT-116, coradas com corante panótico após 24 horas de incubação com com DMSO (-), doxorubicina, 0,25 μM (+), compostos **3** e **5** (50 μM), plakortídeos **2**, **7** e **9** na concentração de 5 μM . Ilustrações representativas de cada tratamento analisadas em microscópio óptico, sob aumento de 200X. Setas pretas identificam células em mitose; Setas vermelhas indica fragmentação nuclear.

5.5. Análise do citoesqueleto por microscopia confocal

Estudos conduzidos utilizando a microscopia confocal, com a intenção de analisar o citoesqueleto e, mais precisamente, a possível interferência dos compostos em estudo nos microtúbulos, células HCT-116 foram incubadas por 24 horas com os compostos **3** e **5**, na concentração de 50 μM e plakortídeos **2** e **7** na concentração de 5 μM , e **9** na concentração de 2,5 μM .

Como demonstrado na figura 23, células tratadas com plakortídeos **2** e **9** demonstraram a formação do fuso mitótico, porém, o processo aparentemente não se completa, onde células aparecem bloqueadas em anáfase (figura 23, setas brancas), contrariamente ao efeito do paclitaxel, que causa bloqueio do fuso mitótico com acúmulo de células em metáfase (figura 21, setas amarelas).

Os compostos **3** e **5**, por sua vez, não apresentaram células bloqueadas em mitose, corroborando com o que foi observado na análise do ciclo celular, e também seu efeito independe da polimerização da tubulina ou interferência no citoesqueleto, como demonstrado na figura 22.

Diante dos efeitos, aparentemente, antimitóticos dos endoperóxidos em células HCT-116, decidimos avaliar os compostos **2** e **9** em outra linhagem tumoral, MCF-7 quanto aos seus efeitos sobre o citoesqueleto e ciclo celular.

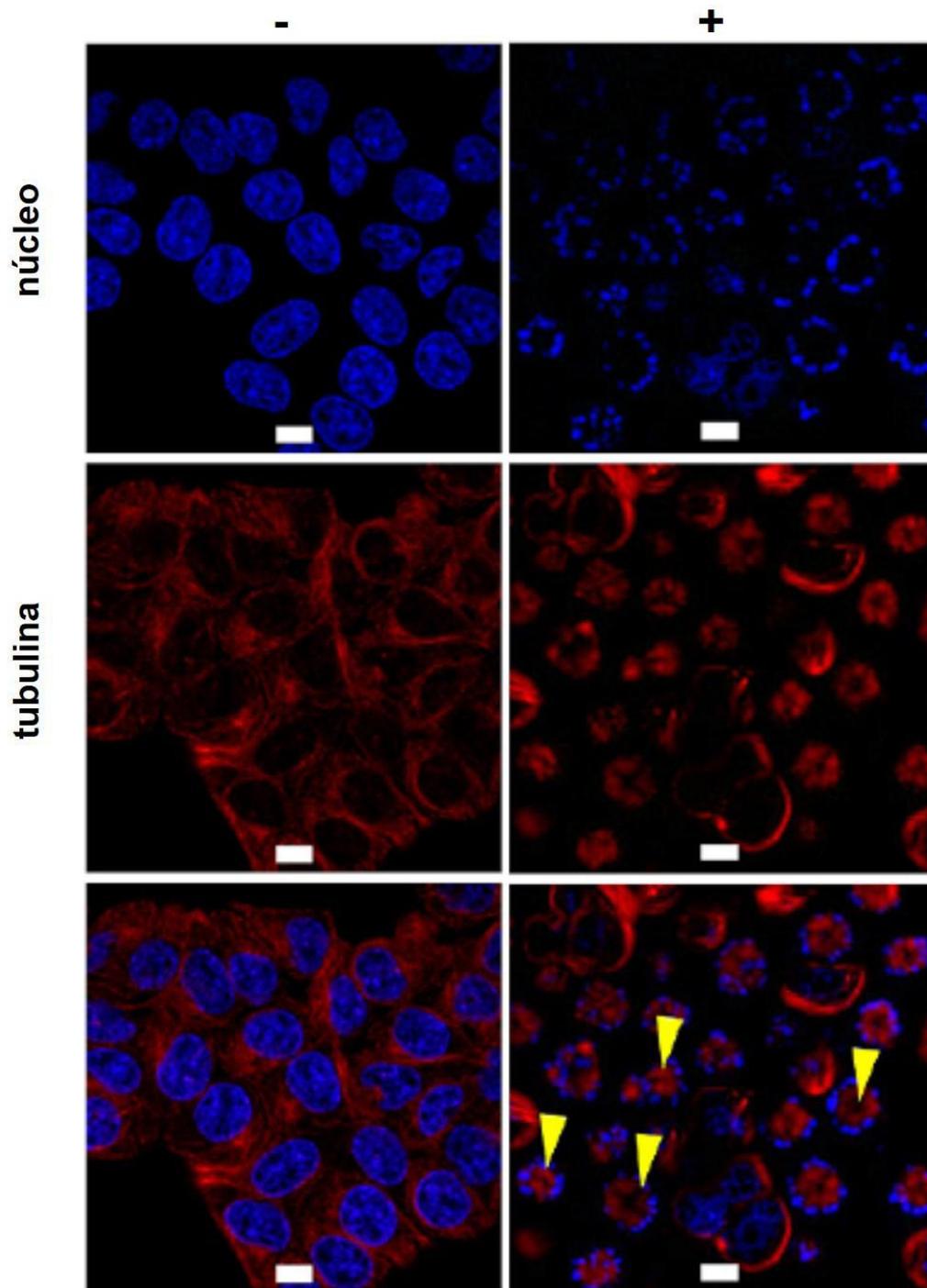


Figura 20 - Fotomicrografias de células HCT-116 após incubação com 0,15% de DMSO (-) e 50 nM paclitaxel (+) após 24 horas de incubação e analisadas em microscópio confocal. Setas amarelas indicam células mitóticas. Os núcleos foram corados com DAPI (azul) e α -tubulina foi marcada com anticorpo Alexa Fluor 647- α -tubulina (vermelho). Imagens foram feitas em microscópio confocal 710 LSM (Zeiss) sob aumento de 630 \times . Barra denota 10 μ m.

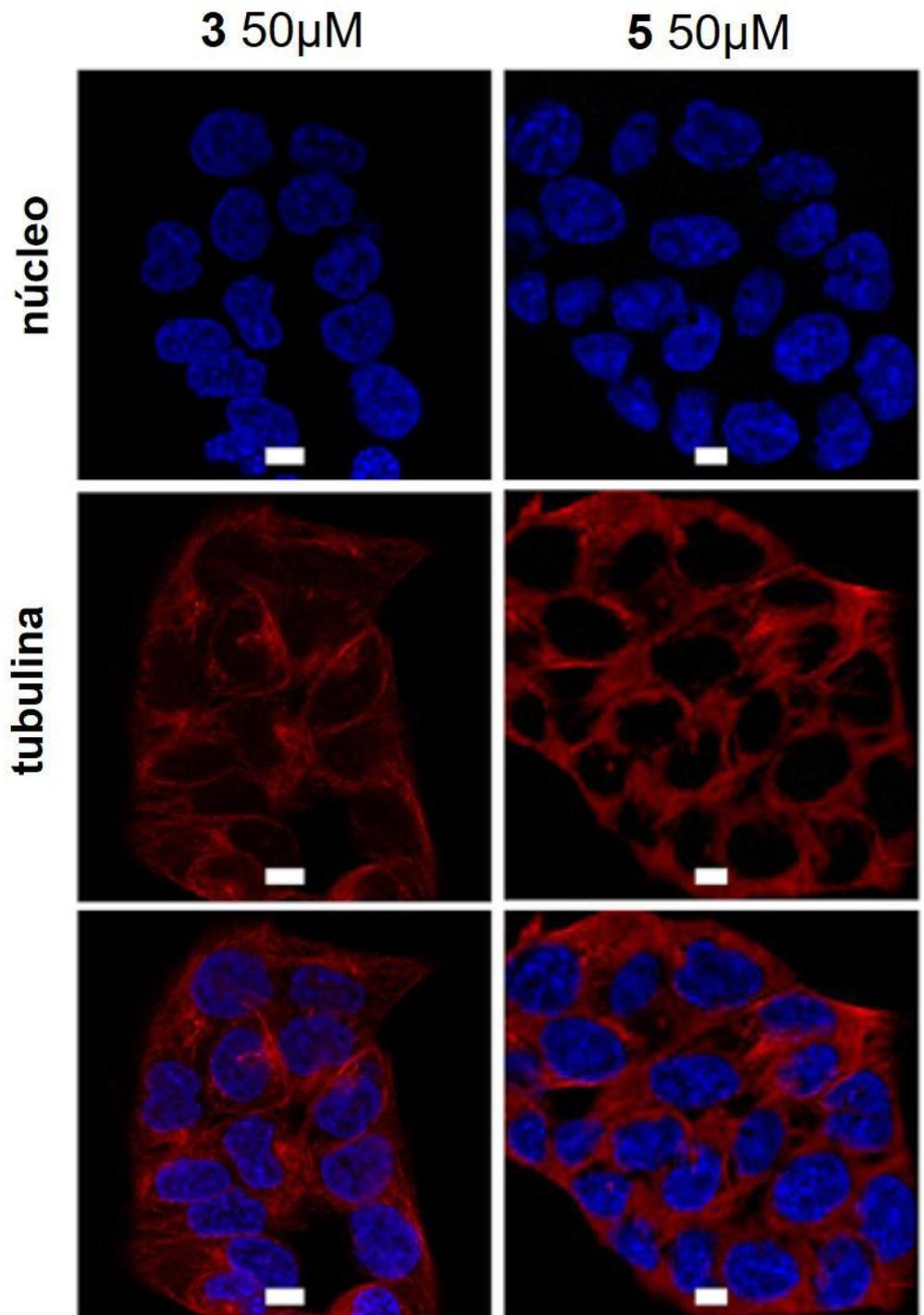


Figura 21 - Fotomicrografias de células HCT-116 após incubação com compostos 3 e 5 ($50 \mu\text{M}$), após 24 horas de incubação e analisadas em microscópio confocal. Os núcleos foram corados com DAPI (azul) e α -tubulina foi marcada com anticorpo Alexa Fluor 647- α -tubulina (vermelho). Imagens foram feitas em microscópio confocal 710 LSM (Zeiss) sob aumento de $630\times$. Barra denota $10 \mu\text{m}$.

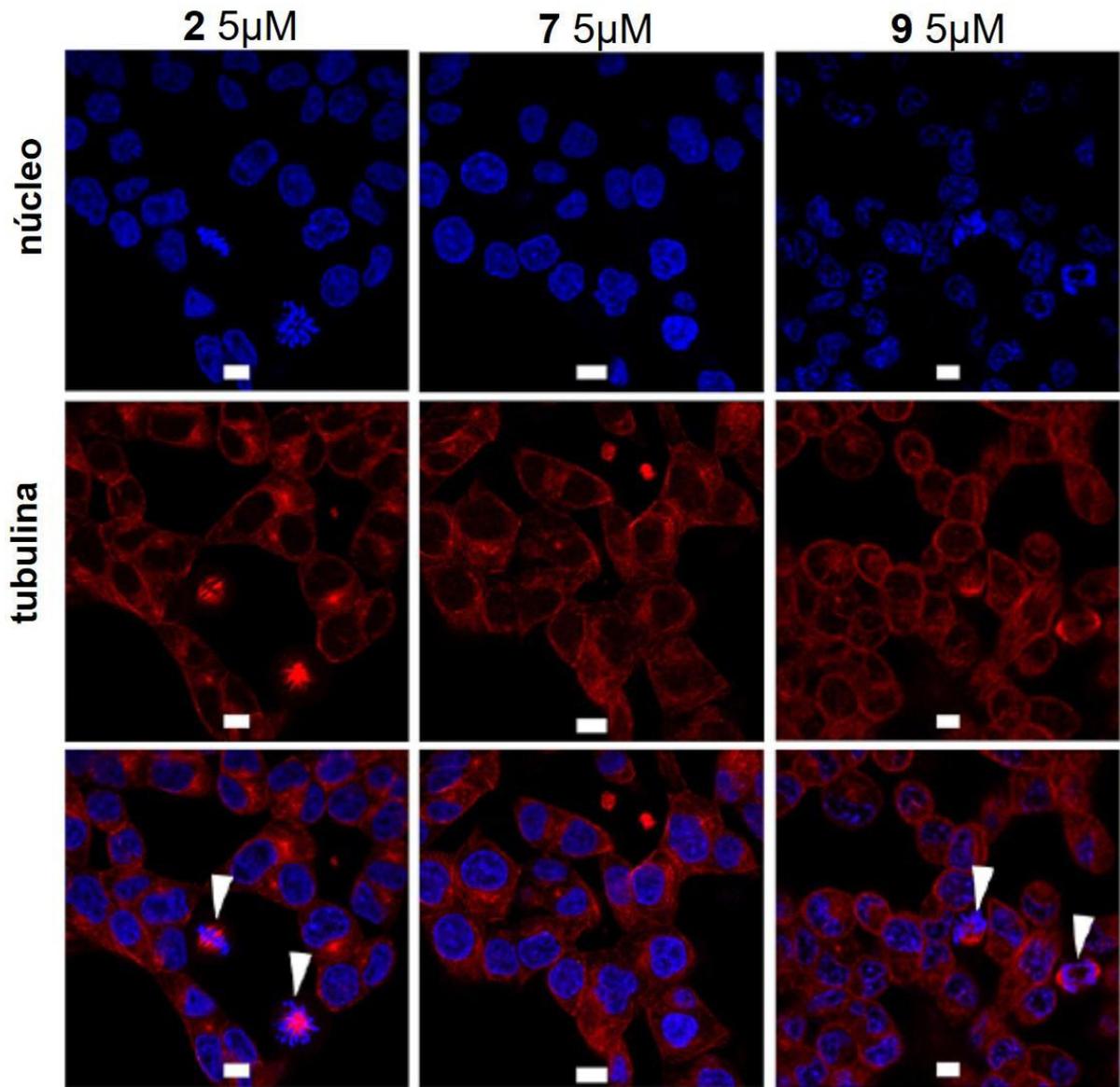


Figura 22 - Fotomicrografias de células HCT-116 após incubação com plakortídeos 2, 7 e (5 μM) 9 (2,5 μM) após 24 horas de incubação e analisadas em microscópio confocal. Os núcleos foram corados com DAPI (azul) e α -tubulina foi marcada com anticorpo Alexa Fluor 647- α -tubulina (vermelho). Imagens foram feitas em microscópio confocal 710 LSM (Zeiss) sob aumento de 630 \times . O controle negativo corresponde (-) DMSO (0,15%) e 50 nM paclitaxel ao controle positivo (+). Setas brancas indicam células mitóticas. Barra denota 10 μm .

5.6. Efeitos dos plakortídeos 2 e 9 em MCF-7

Para analisar os efeitos dos plakortídeos **2** e **9** sobre o ciclo de células MCF-7, utilizamos a citometria de fluxo, onde não observamos bloqueio de nenhuma das fases do ciclo celular, somente discretas diminuições da porcentagem de células nas fases S e G₂/M para o plakortídeo **9**, ao compará-lo com o controle negativo, como demonstrado na tabela 8 e figura 24.

Tabela 6. Porcentagem de células MCF-7 nas fases G₀/G₁, S e G₂/M após incubação com plakortídeos 2 e 9 por 24 horas.

Plakortídeos	[] μM	Fase ciclo celular (%)		
		G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
-	-	36,93	37,24	15,49
+	1	25,33 ^a	25,38 ^b	40,38 ^c
2	10	34,38	36,39	13,41
	20	38,23	32,33	13,05
9	2,5	38,67	32,98	13,37
	5	41,21	29,01 ^b	11,84 ^c

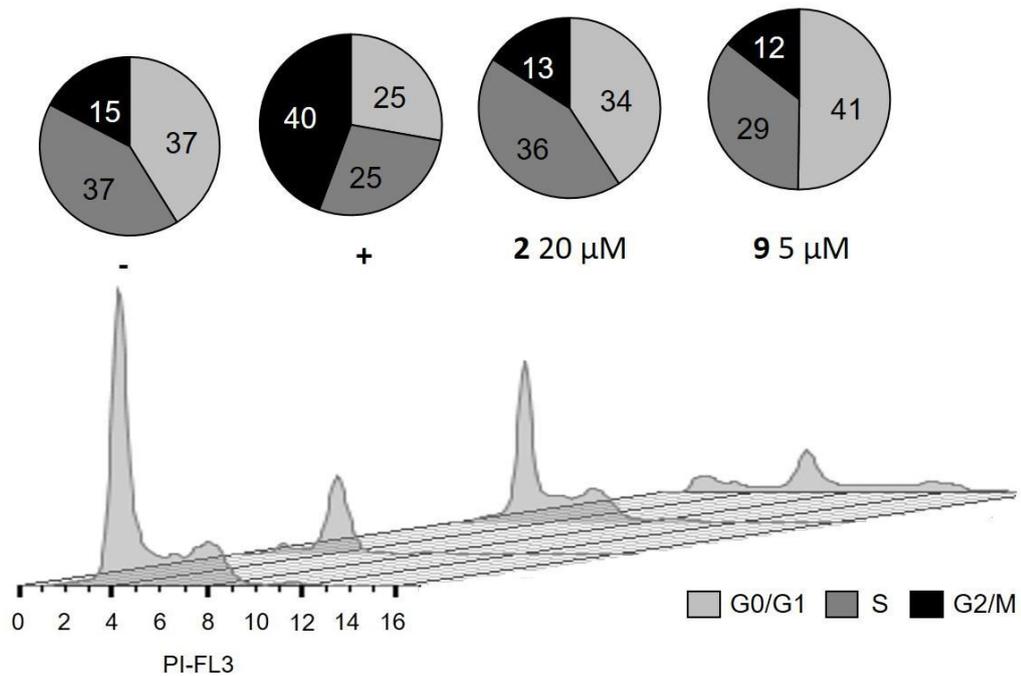


Figura 23 - Histogramas representativos dos efeitos dos plakortídeos **2** e **9** na distribuição do ciclo celular de MCF-7. Células foram tratadas com DMSO (-), 1 μ M de doxorubicina (+), plakortídeos **2** e **9** (20 μ M e 5 μ M, respectivamente) por 24 horas e analisado por citometria de fluxo. Dez mil eventos foram adquiridos por replicata. As porcentagens das fases G₀/G₁, S e G₂/M foram analisadas usando o programa Flow Jo. *p<0.05 comparado ao grupo controle por teste de variância ANOVA, seguido do teste de comparação de Dunnett. Média dos valores de porcentagem de fases em representados em gráficos de pizza acima dos histogramas respectivos de cada concentração.

Na comparação da fragmentação nuclear induzida pelos plakortídeos **2** e **9** nas linhagens celulares HCT-116 e MCF-7, observamos que somente em MCF-7 houve aumento da população de células em subG1, consideradas com DNA fragmentado, após exposição do plakortídeo **9** na concentração de 5 μ M (Figura 25).

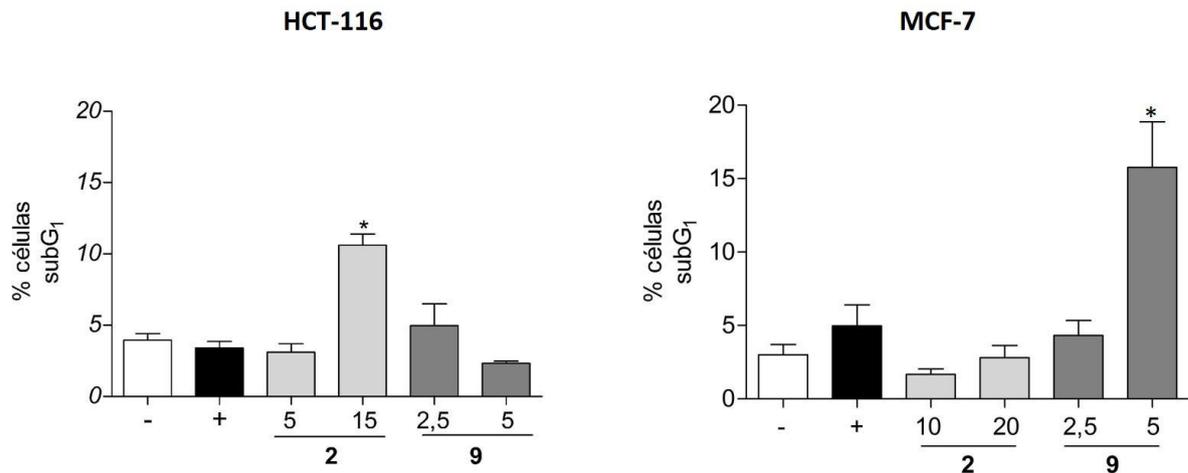


Figura 24 - Porcentagem da população de células em sub-G₁ após incubação com plakortídeos **2** e **9** em células tumorais HCT-116 e MCF-7. Células foram tratadas com DMSO (-), 1 ou 0,25 μM de doxorubicina (+), plakortídeo **2** (5, 10, 15 μM) e **9** (2,5 e 5 μM) por 24 horas e analisado por citometria de fluxo. Dez mil eventos foram adquiridos por replicata. As porcentagens de células sub-G₁ foram analisadas usando o programa Flow Jo. *p<0.05 comparado ao grupo controle por teste de variância ANOVA, seguido do teste de comparação de Dunnett.

Ao avaliarmos a morfologia das células MCF-7 tratadas com os plakortídeos **2** e **9** verificamos que o padrão não se repetiu como em HCT-116, ou seja, não verificamos aumento do número de células em mitose, como demonstrado na figura 26, retificando o que foi observado no ciclo celular. As características mais marcantes observadas nestas análises se referem à morte celular, como, fragmentação e condensação nuclear na concentração de 10μM do plakortídeo **2**. Na maior concentração do tratamento, há intensa rarefação celular com células aparentemente em necrose, como também observado para o plakortídeo P nas concentrações testadas.

A microscopia confocal revelou que o efeito citotóxico exercido por estes plakortídeos não interferem na dinâmica dos microtúbulos, nem no centrômero, mostrados na figura 27, como estruturas aparentemente normais.

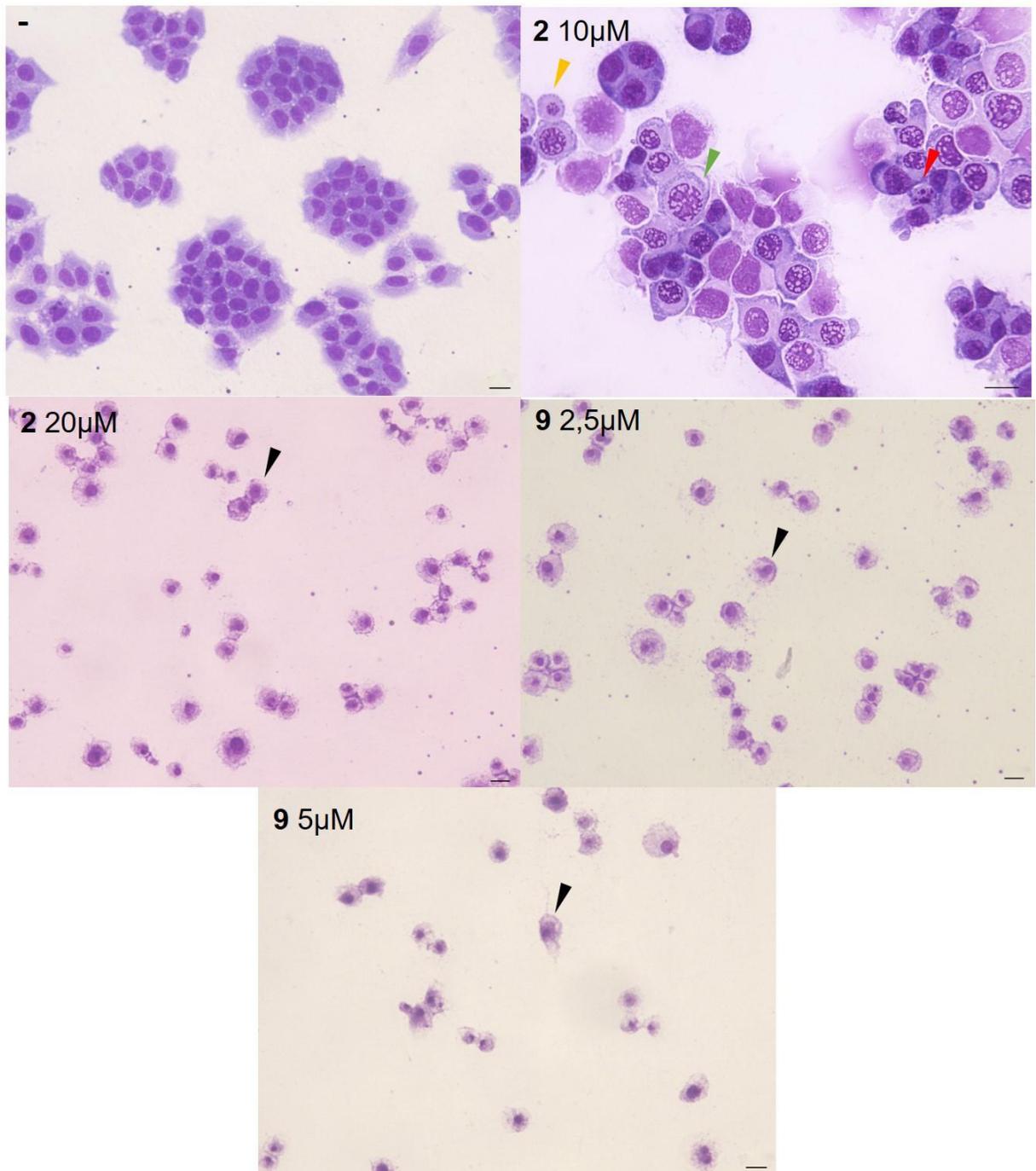


Figura 25 - Fotomicrografias de células MCF-7, coradas com corante panótico após 24 horas de incubação com com DMSO (-), plakortídeo 2 (10, 20 μM) e 9 (2,5 e 5 μM). Ilustrações representativas de cada tratamento analisadas em microscópio óptico, sob aumento de 200X, com exceção da concentração de 10 μM do plakortídeo 2 (400X). Setas pretas identificam células em necrose; Setas vermelhas: condensação nuclear; Setas amarelas: fragmentação nuclear; Setas verdes: vacúolos nos nucleares.

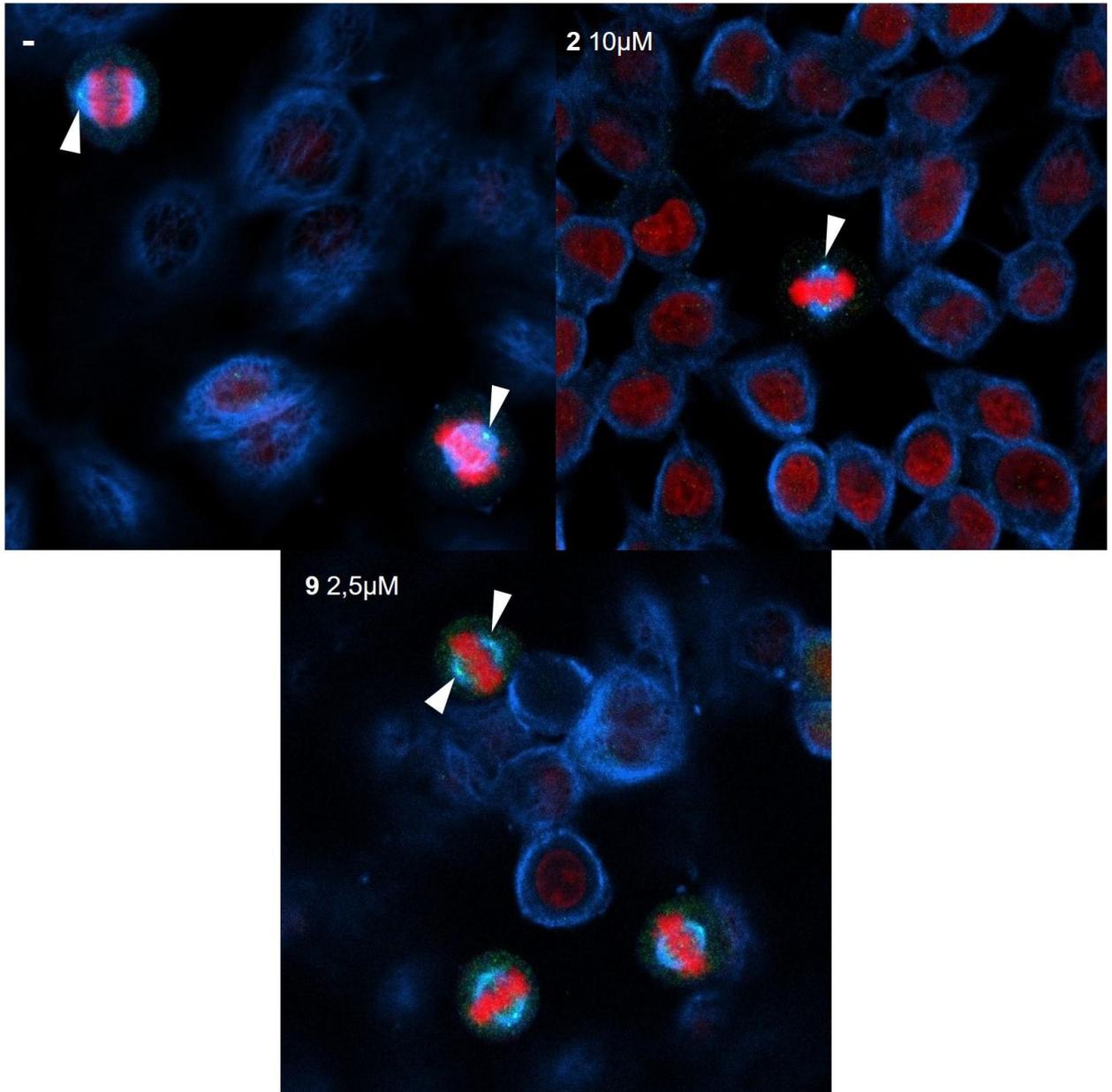


Figura 26 - Microfotografias de células MCF-7 após incubação com plakortídeos 2 (10 μM) 9 (2,5 μM) após 24 horas de incubação e analisadas em microscópio confocal. Os núcleos foram corados com iodeto de propídeo (vermelho), α -tubulina foi marcada com anticorpo anti- α -tubulina-Cy5 (azul) e centrômeros marcados com anticorpo anti- γ -tubulina, em verde. Imagens foram feitas em microscópio confocal 710 LSM (Zeiss) sob aumento de 400x. O controle negativo corresponde (-) DMSO (0.15%). Setas brancas indicam centrômeros.

5.7. Avaliação preliminar do envolvimento de Ca^{2+} -calmodulina no efeito do plakortídeo P (9)

Para verificar possível envolvimento de vias dependentes de Ca^{2+} -calmodulina na ação citotóxica do plakortídeo P (9), utilizamos ciclosporina A, um inibidor de calcineurina, uma enzima dependente de calmodulina. Para tanto, analisamos o número de células viáveis após o co-tratamento do plakortídeo P (9), nas concentrações 2,5 e 5 μM , com ciclosporina A, também nas concentrações 2,5 e 5 μM após 24 horas de incubação. Ao compararmos a quantidade de células viáveis dos co-tratamentos entre plakortídeo P (9) a 5 μM e ciclosporina A a 2,5 e 5 μM com as substâncias isoladas, verificamos uma diminuição significativa, de até 80% de células viáveis quando comparados tratamento com plakortídeo P (5 μM) apenas (Figura 28). Também verificamos uma diminuição significativa de células viáveis ao comparar os co-tratamentos de 5 μM com a ciclosporina isolada, indicando, portanto um sinergismo da ação citotóxica destes 2 compostos, evidenciando a participação de Ca^{2+} -calmodulina no efeito citotóxico do plakotídeo P (9).

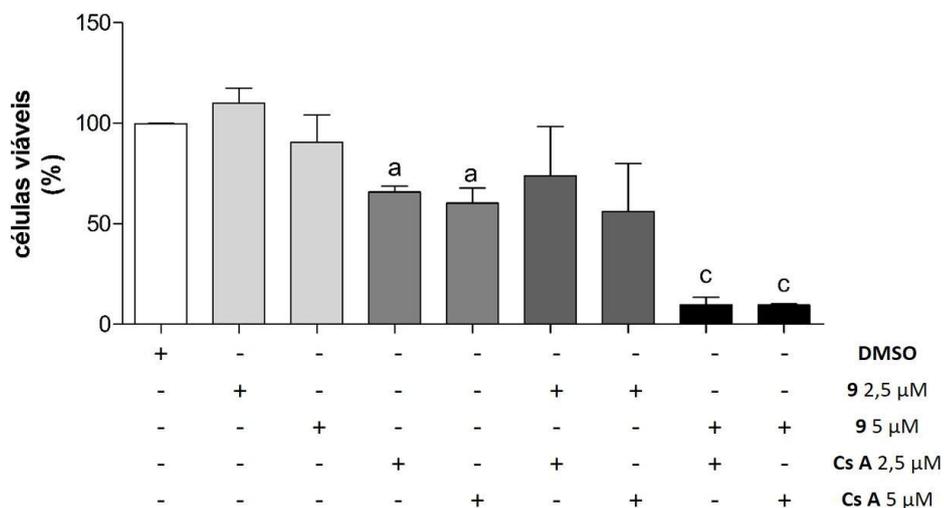


Figura 27 - Porcentagem de células viáveis após incubação do plakortídeo P (9) e ciclosporina A (Cs A) nas concentrações 2,5 e 5 μM por 24 horas. Células foram incubadas com plakortídeo P e ciclosporina A nas concentrações 2,5, 5 μM por 24 horas e contadas em microscópio óptico com corante vital azul de tripan. O controle negativo representa o veículo utilizado para a diluição dos compostos (DMSO, -). Dados são apresentados como médias normalizadas \pm erro padrão da média, de três experimentos independentes conduzidos em triplicata. * $p < 0.05$ foi obtido em comparação com controle negativo por teste de variância ANOVA seguido do teste de comparação de Dunnet.

6. DISCUSSÃO

Como primeira causa de morte por doença no mundo, o câncer é considerado um grave problema de saúde pública e, em virtude das altas taxas de óbito, reações adversas graves, reincidência tumoral e falta de tratamento adequado, faz-se necessário a contínua pesquisa de novos fármacos. Nesse contexto, os organismos marinhos têm realizado sua maior contribuição para o arsenal da terapia oncológica nas últimas décadas, seja por seus produtos naturais ou por compostos derivados, desenvolvidos com êxito para uso clínico, particularmente para neoplasias que demandam novos tratamentos, como tumores refratários à quimioterapia convencional ou em estágios avançados.

Dentre os organismos marinhos, as esponjas recebem destaque por serem consideradas as maiores fontes de metabólitos secundários bioativos com diversas aplicações farmacêuticas e contribuírem para a maior parte dos fármacos oriundos de produtos naturais marinhos (BLUNT *et al.*, 2015). Foi observado que os metabólitos citotóxicos produzidos para atender funções ecológicas específicas, além da ampla diversidade e complexidade desses compostos, possuíam também habilidade de interagir com diversos alvos implicados na carcinogênese, o que fez com que esses produtos naturais recebessem destaque, principalmente como agentes antitumorais (SHAKERI; SAHEBKAR, 2015). Diante disso, esponjas da família Plakinidae, particularmente as do gênero *Plakortis*, são reconhecidas fontes de compostos com grande potencial terapêutico de interesse para o desenvolvimento de fármacos, particularmente com atividade citotóxica.

Com o intuito de analisar o potencial anticâncer de compostos derivados de esponjas no litoral cearense, investigamos a química e a bioatividade do extrato etanólico da esponja *Plakortis angulospiculatus*. O extrato bruto mostrou-se citotóxico para adenocarcinoma de cólon (HCT-116), com valor de CI_{50} de 0,26 $\mu\text{g/mL}$, o que estimulou o isolamento de compostos, através de sequências de fracionamentos por cromatografias, guiados pelo ensaio do MTT, resultando no isolamento de 10 compostos.

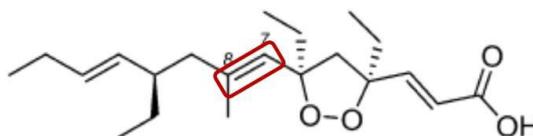
O rendimento dos compostos isolados foi consistente com a literatura, visto que um dos gargalos no desenvolvimento de fármacos de fonte marinha reside na baixa ocorrência dos compostos bioativos nos organismos hospedeiros (COSTA-

LOTUFO *et al.*, 2009). Neste trabalho o rendimento dos compostos variou de 0,14 a 0,89%, confirmando tal fato (NEWMAN; CRAGG, 2004; COSTA-LOTUFO *et al.*, 2009).

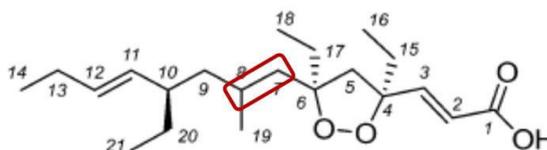
Utilizando a combinação de técnicas de espectroscopia, HRESIMS (espectrometria de massa de alta resolução com ionização por eletrospray), RMN 1H e RMN 13C (ressonância magnética nuclear de próton e carbono 13) aliados à comparação com dados na literatura (ver anexo II) foram identificados compostos pertencentes a grupos de policetídeos e endoperóxidos cíclicos de 5 e 6 membros, comuns a esponjas pertencentes a esta família (NORRIS; PERKINS, 2016)

Os compostos foram nomeados: 7,8-diidroplakortídeo E (**1**, 5,1 mg), (**2**, 5,8 mg), 6-desmetil-6-etilespongosoritina A (**3**, 33 mg), 6-desmetil-6-6-demetil-6-etil-9,10-diidroespongosoritina A (**4**, 4,4 mg), espongosoritina A (**5**, 29,4 mg), 9,10-diidroespongosoritina A (**6**, 6,2 mg), (**7**, 14,7 mg), (**8**, 5,2 mg), plakortídeo P (**9**, 4,6 mg), e 11, 12-diidroplakortídeo P (**10**, 25 mg).

Destes, 3 compostos não exibiram registros na literatura, considerados, portanto, inéditos. São eles: 7,8-diidroplakortídeo E (**1**), (**2**) e 11, 12-diidroplakortídeo P (**10**), análogos dos endoperóxidos cíclicos oxigenados plakortídeos E, H e P (Figuras 29, 30 e 31) Com base nos espectros de RMN COSYg, HBMC e NOESY, o composto **1** foi identificado como similar ao endoperóxido cíclico de 5 membros, plakortídeo E, previamente reportado em outras espécies do gênero *Plakortis* (OLI *et al.*, 2014; PATIL *et al.*, 1996), diferenciando apenas pela ligação dupla entre os carbonos 7 e 8 (Figura 29).



Plakortídeo E



7,8 dihidroplakortídeo E (1)

Figura 28 - Estruturas químicas do plakortídeo E e 7,8 dihidroplakortídeo E (1) com destaque para a diferença estrutural entre os dois compostos (em vermelho).

Em contraste com plakortídeo **1**, os dados de RMN do composto **2** foram compatíveis com uma estrutura contendo grupo endoperóxido cíclico de 6 membros consistentes com o plakortídeo H e o diastereoisômero 4-epi-plakortídeo H (diferença estrutural demonstrada na figura 30), cuja maior diferença está na esterificação no C-1 presente no plakortídeo H e seu isômero, enquanto o composto **2** possui o grupo ácido carboxílico, além do grupo etila do C-6, que se apresenta para trás do plano no plakortídeo H, contrariamente ao plakortídeo **2**. A ligação entre os C-4 e C-15 também apresenta isomeria diferente quando comparados o epi-plakortídeo H e o plakortídeo **2** (Figura 30).

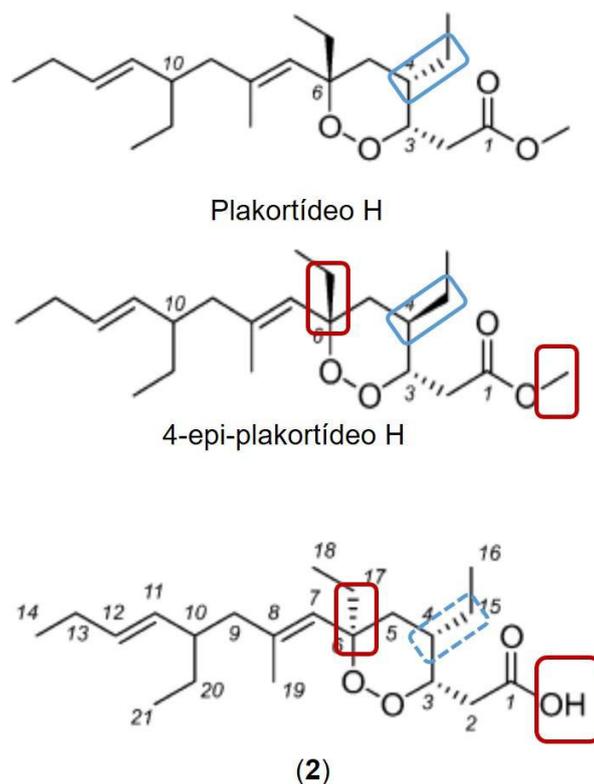


Figura 29 - Estruturas químicas dos plakortídeos H, 4-epi-plakortídeo H, e plakortídeo **2** e suas diferenças estruturais. Retângulo em vermelho representa diferenças entre epi-plakortídeo H e **2**. Retângulo azul representa diferenças entre plakortídeo H e 4-epi-plakortídeo H.

O composto **10** exibiu alta similaridade estrutural com o plakortídeo P, também isolado da esponja *P. angulospiculatus*, exibindo ligação dupla entre C-11 e C-12, além das ligações entre C-6 e C-7 e o grupo etila no C-10 que se apresentam para fora do plano no plakortídeo P (**9**), enquanto no composto **10**, permanece no plano do observador.

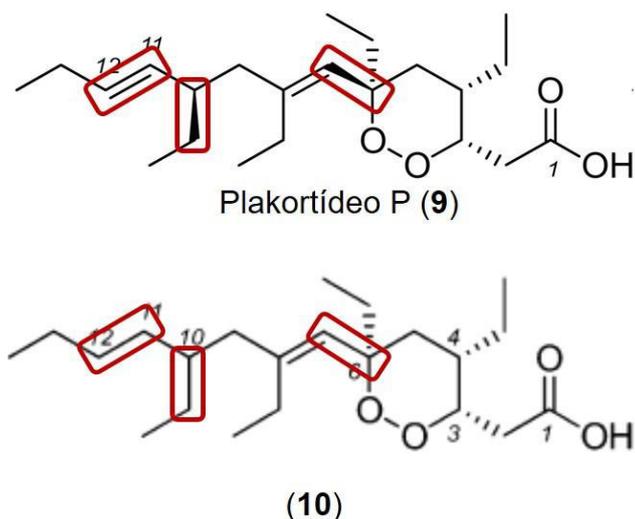


Figura 30 - Estruturas químicas dos plakortídeos P, e **10** e suas diferenças estruturais, destacadas em vermelho.

Os demais compostos isolados neste estudo já foram reportados na literatura, como os policetídeos com anel diidrofurano, espongosoritina A (**5**), obtido a partir de extrato de esponja do gênero *Spongosorites sp.* (CAPON et al., 2005), e seus análogos **3**, **4** e **6** (EPIFANIO; PINHEIRO; ALVES, 2005), bem como o endoperóxido plakortídeo P (**9**), isolado previamente da esponja *P. halichondrioides* (DEL SOL JIMÉNEZ; GARZÓN; RODRÍGUEZ, 2003), e seus derivados 1,2 dioxenos, **7** e **8**.

Ao analisarmos a bioatividade destes compostos, observamos que os grupos de policetídeos, endoperóxidos de 5 e 6 membros, apresentaram padrões de citotoxicidade diferentes, especialmente na relação tempo-dependência e seletividade. Os policetídeos **3** - **6**, que possuem um anel diidrofurano em sua estrutura, mostraram-se, em geral, menos citotóxicos que os demais, com atividade significativa observada somente para os compostos **3** e **5** em células da linhagem HCT-116 após 72 horas de incubação, com valores de CI_{50} de 8,1 e 5,4 μM , respectivamente.

Estes mesmos compostos também demonstraram citotoxicidade tempo-dependente, visto que seus valores de CI_{50} aumentaram 8,2 vezes com a redução do tempo de exposição de 72 para 24 horas ($CI_{50} = 59,1$ e 44,3 μM , respectivamente), o que denota que a ligação dupla entre C-9 e C-10 parece desempenhar importante função na citotoxicidade, visto que estes dois compostos contém este tipo de ligação, ao passo que os outros dois compostos deste grupo, **4** e **6**, não possuem

essa dupla ligação. Ao compararmos a citotoxicidade em células não-tumorais, somente o composto **3** se mostrou mais seletivo, cerca de 20 vezes mais citotóxico para a linhagem tumoral HCT-116 que para linhagem não tumoral MRC-5. A seletividade, neste caso, parece estar relacionada com o grupo etil presente no C-6, já que o composto **5** possui em seu lugar um metil e ambos tiveram citotoxicidade similares contra HCT-116. Este mesmo grupo etil presente no C-6 parece denotar maior seletividade para a linhagem tumoral HCT-116, visto que **3** apresentou-se mais de 20 vezes mais citotóxico para HCT-116 que para a linhagem tumoral de próstata metastática PC-3M. Vale ressaltar, que esta consiste em uma linhagem mais resistente à fármacos.

A bioatividade da espongosoritina A (**5**) e alguns derivados já havia sido relatado na literatura, quando **5** demonstrou toxicidade em náupilos de artemia (EPIFANIO; PINHEIRO; ALVES, 2005). Kossuga e colaboradores (2008) também descreveram moderada atividade antiparasitária e hemolítica e baixa citotoxicidade contra macrófagos murinos, com CI_{50} de 86 μ M, para **5**. Mais além, estes autores também avaliaram a citotoxicidade em 4 linhagens tumorais, onde os compostos **4 - 6** exibiram valores de CI_{50} entre 22 e 57 μ M, similares ao nosso estudo. Entretanto, a espongosoritina A (**5**), quando analisada por Kossuga e colaboradores (2008), revelou-se inativa, com valor de CI_{50} acima de 80 μ M, incluindo para a linhagem tumoral HCT-116. Contrariamente, no nosso estudo, este composto demonstrou maior citotoxicidade contra HCT-116, com valor de CI_{50} 17 vezes menor ao reportado naquele trabalho.

O grupo de endoperóxidos cíclicos com 6 membros, representado pelos compostos **2, 7-9**, demonstraram maior citotoxicidade que os compostos **3-6**, com valores de CI_{50} variando de 0,2 a 10 μ M. Em geral, os endoperóxidos cíclicos de 6 membros demonstraram baixa seletividade, com exceção do composto **2**, que apresentou-se 18 vezes mais tóxico para células tumorais HCT-116 quando comparada à linhagem não tumoral MRC-5.

Também não houve seletividade quanto à célula tumoral, já que os valores de CI_{50} para HCT-116 e PC-3M foram similares, com exceção, novamente, ao composto **2**, que demonstrou discreta seletividade para a linhagem de cólon HCT-116, exibindo 4 vezes maior citotoxicidade que para a célula tumoral de

próstata PC3-M. A citotoxicidade destes compostos também não foi afetada com o tempo de exposição, demonstrando valores de CI_{50} similares (Tabela 7).

O valor de CI_{50} do plakortídeo P (**9**) foi cerca 10 vezes menor que seu análogo (**10**), que somente difere estruturalmente pela ligação dupla entre C-11 e C-12 no plakortídeo P, indicando a importância dessa pequena diferença na atividade biológica.

Diante do potencial antitumoral destes endoperóxidos, selecionamos 5 compostos de maior atividade com representantes dos dois grupos - **3** e **5**, representando os endoperóxidos cíclicos de 5 membros, e **2**, **7** e **9**, representando os endoperóxidos cíclicos de 6 membros) para posterior avaliação biológica. Primeiramente, avaliamos densidade e viabilidade celular em células HCT-116 por citometria de fluxo, com base nos valores de CI_{50} de 24 horas. Assim, utilizamos as concentrações de 50 e 100 μ M para compostos **3** e **5**, e 5 e 15 μ M para plakortídeos **2** e **7**, enquanto que para o composto mais citotóxico (**9**) avaliamos em concentrações menores (2,5 e 5 μ M).

Após 24 horas de incubação com os compostos **3** e **5**, observamos diminuição do número de células dependente da concentração em todas as concentrações testadas, acompanhada da redução da integridade da membrana celular na concentração de 100 μ M, o que evidencia morte celular, pelo menos na maior concentração testada.

Em estudos anteriores, plakortídeo P (**9**) demonstrou atividade antineuroinflamatória e antiparasitária, com alta seletividade contra *Leishmania chagasi* (KOSSUGA *et al.*, 2008). Quanto à citotoxicidade em células tumorais, testes no painel de 60 linhagens de tumores humanos do NCI indicaram falta de seletividade, com valores CI_{50} variando de 0,01-1,9 μ M (DEL SOL JIMÉNEZ; GARZÓN; RODRÍGUEZ, 2003). Nossos dados corroboraram, ao também demonstrar alta citotoxicidade, porém baixa seletividade, visto que os valores de CI_{50} são similares entre as linhagens tumorais, além de mostrar-se mais citotóxico para a célula não tumoral MRC-5 (CI_{50} = 0,2 μ M) (Tabela 7).

Tal falta de seletividade impede, por muitas vezes, que um composto com grande potencial anticâncer entre em testes clínicos ou no mercado farmacêutico, tendo em vista, as graves reações adversas que possa vir a acarretar. Em face deste problema, o processo de síntese química é uma poderosa ferramenta, visto

que, juntamente com estudos de estrutura-atividade, leva a identificação dos grupos farmacofóricos das substâncias de interesse. No caso dos endoperóxidos, o farmacóforo consiste no anel com grupo peróxido e estudos estão sendo realizados quanto ao desenvolvimento de métodos sintéticos que melhorem aspectos farmacocinéticos e farmacodinâmicos deste tipo de moléculas, a exemplo da artemisina (BURAGOHAİN *et al.*, 2014), o que possibilita o desenvolvimento de novos agentes farmacológicos com o grupo endoperóxido.

Para o grupo endoperóxido cíclico de 6 membros, observamos que o plakortídeo P (**9**) mostrou-se mais ativo que **2** e **7**, após 24 horas de incubação ($CI_{50} = 3,2 \mu M$), com significativa diminuição da densidade celular à $2,5 \mu M$ acompanhado de morte celular na maior concentração ($5 \mu M$). Os efeitos do plakortídeo **7** somente foram observados na concentração de $15 \mu M$ e plakortídeo **2** não apresentou efeito significativo nas concentrações testadas (5 e $15 \mu M$) (Figura 18).

Ao analisarmos o perfil do ciclo celular após incubação com os compostos, observamos que houve um padrão distinto entre os 2 grupos de endoperóxidos. Os compostos **3** e **5**, endoperóxidos cíclicos de cinco membros, exibiram bloqueio das células tumorais na fase G_0/G_1 , com efeito mais pronunciado para a espongosoritina A, com 69,38% das células em G_0/G_1 , enquanto no controle negativo haviam 48,47% de células nesta fase do ciclo celular (Tabela 7, Figura 19). Em contraste com **3** e **5**, os endoperóxidos cíclicos de 6 membros demonstraram bloqueio em G_2/M , com efeito mais pronunciado para o plakortídeo P (**9**) com cerca de 48% das células em G_2/M enquanto no controle negativo haviam 15% das células nesta fase do ciclo celular. (Tabela 7, Figura 19)

A combinação de métodos de microscopia confirmou o bloqueio do ciclo celular em na fase M (mitose) demonstrados para plakortídeos **2**, **7** e **9**, ao visualizarmos o aumento de células com núcleo condensado, característico da fase mitótica, quando comparados ao controle. Este efeito foi mais pronunciado em células tratadas com plakortídeo P (**9**) (Figura 20).

Diversos compostos naturais atuam durante a mitose, particularmente no citoesqueleto, incluindo vários compostos antineoplásicos isolados de esponjas, que possuem os microtúbulos como alvo (MILLER; SINGH; NORTHCOTE, 2010), como halicondrina, espongistatina, hemiasterlina, dictiostatina, discodermolídeo,

laurilalídeo, pelorusídeo A e zampanolídeo (KINGSTON, 2009; SAITO *et al.*, 2004). Diante deste fato, decidimos analisar os microtúbulos por microscopia confocal após incubação com os compostos em estudo. Como demonstrado na figura 23, células HCT-116 tratadas com plakortídeos **2** e **9** aparecem bloqueadas em anáfase, aparentemente, com formação do fuso mitótico, porém tal processo não é completado, sugerindo que o efeito é exercido independente da polimerização da tubulina. Diferentemente, a ação do paclitaxel, utilizado como controle positivo, resultou em uniforme bloqueio da formação do fuso mitótico e acumulação de células em metáfase (Figura 21). Estes efeitos, como se esperava, não foram observados para os compostos **3** e **5**, já que aparentemente os seus efeitos não estão relacionados à mitose, tampouco ao citoesqueleto.

Ao observarmos o aparente efeito antimitótico dos endoperóxidos em células HCT-116, decidimos avaliar os plakortídeos **2** e **9**, os quais tínhamos em maiores quantidades, em outra linhagem tumoral, a MCF-7 (adenocarcinoma de mama humano), no intuito de comparar os efeitos destes compostos. Com as concentrações de 10 e 20 μM para o plakortídeo **2** e 2,5 e 5 μM para o plakortídeo P (**9**), avaliamos seus efeitos no ciclo celular de MCF-7, e interessante, não observamos o bloqueio das células em nenhuma das fases do ciclo celular, exibindo valores de 13,05% e 11,84% de células em G2M, enquanto o controle exibiu 15,49%, demonstrando, portanto, o não acúmulo de células nesta fase, como contrariamente foi demonstrado para HCT-116.

O número de células com núcleo fragmentado, sugestivo de morte por apoptose, também se apresentou de forma diferente, particularmente para o plakortídeo P (**9**), já que em HCT-116 não houve aumento desta população quando comparada ao controle. Em MCF-7, verificamos um aumento significativo na população sub-G₁ na maior concentração testada (5 μM), porém ainda discreto (16%), já que não foi observado na microscopia devido a grande rarefação celular induzida nesta concentração.

Na análise de estruturas do citoesqueleto, microtúbulos e centrômero, após tratamento com plakortídeos **2** e **9**, observamos, que, assim como demonstrado em HCT-116, os efeitos destes compostos nesta célula (MCF-7) também não parecem interferir no citoesqueleto e dinâmica dos microtúbulos.

Tais achados sugerem que os endoperóxidos, particularmente, plakortídeos **2** e **9**, possuem alvos de ação diferentes responsáveis pela citotoxicidade em linhagens tumorais diferentes. Estimativas mostram que compostos naturais podem interagir com mais de um alvo e que 50% de todos os fármacos podem interagir com mais de 5 alvos diferentes, o que denota, por muitas vezes, efeitos indesejáveis (HU *et al.*, 2014). Mais além, considerando que os compostos apresentam modos de ação diferentes em modelos celulares diferentes, dada a heterogeneidade associada à maioria dos tumores, não é de se esperar que um mesmo fármaco tenha a mesma performance em vários tipos celulares (JAEGER; DURAN-FRIGOLA; ALOY, 2015).

No entanto, a ampla diversidade estrutural relacionada às atividades biológicas seletivas e específicas suporta a hipótese de que os produtos naturais possuem um ou vários alvos biológicos (CRAGG; NEWMAN, 2006), o que reforça a importância de se investigar o modo de ação destas moléculas, assim como, a identificação de alvos moleculares.

Diante dessa perspectiva, ao buscar na literatura estudos biológicos de plakortídeos e compostos relacionados, vimos que o mecanismo antitumoral deste grupo de moléculas ainda não está esclarecido. Apesar da formação de espécies reativas de oxigênio atribuída a citotoxicidade de grupos endoperóxidos, como demonstrado para aminoperóxidos e o fármaco antimalárico artemisina (CRESPOR-TIZ; WEI, 2012; ZHU *et al.*, 2013) outro mecanismo de ação tem-se mostrado interessante, sobretudo para plakortídeos.

Estudos iniciados por Patil e colaboradores em 1996, relacionaram a atividade antifúngica de plakortídeos F, G e H (Figura 32) com a ativação da enzima Ca^{2+} -ATPase do retículo sarco/endoplasmático (SERCA), mecanismo também proposto para a artemisina (figura 32), cuja atividade antimalária e anticâncer é atribuída ao grupo endoperóxido (ECKSTEIN-LUDWIG *et al.*, 2003; JUNG *et al.*, 2005; SHANDILYA *et al.*, 2013; UHLEMANN *et al.*, 2005).

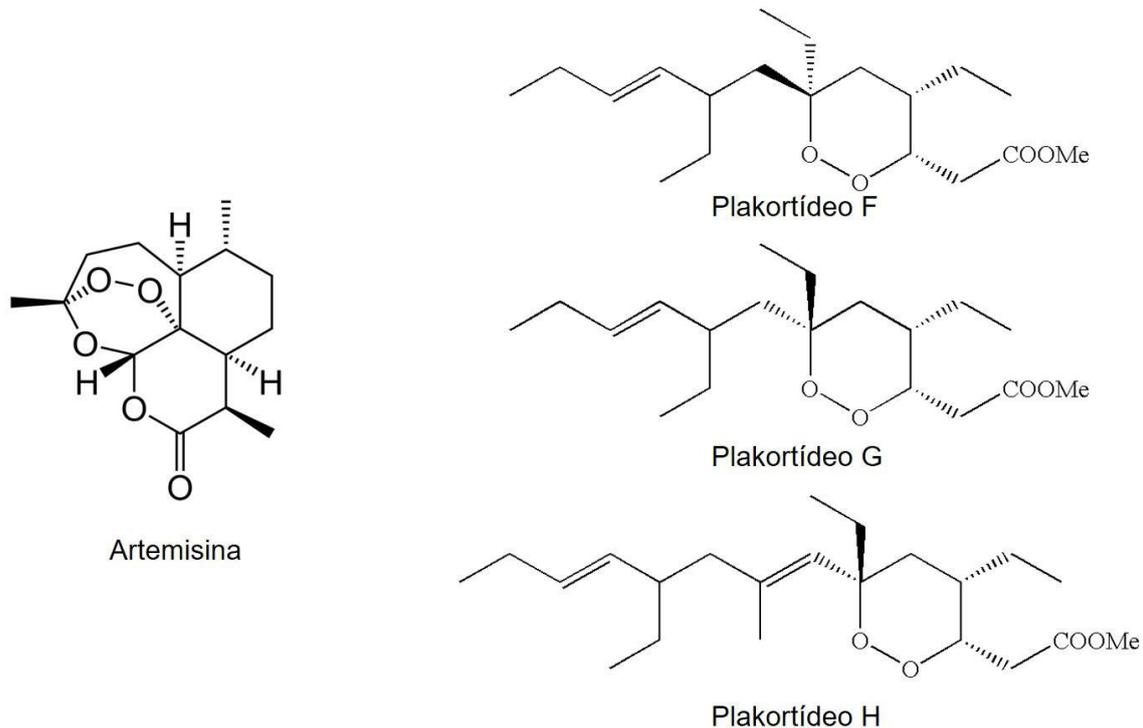


Figura 31- Estruturas químicas dos compostos artemisina e plakortídeos F, G, H.

O antiarrítmico amiodarona conhecido por induzir influxo de cálcio em células cardíacas, foi utilizado por Zhang e Rao (2007) ao demonstrar os efeitos do Ca^{2+} em modelo de *S. cerevisiae*. Utilizando a ferramenta de microarranjo de DNA, observou-se que, dos 46 genes reprimidos por amiodarona, mais da metade também apresentou inibição por altos níveis de cálcio. De fato, a amiodarona causou bloqueio de células de levedura nas fases G_0/G_1 e G_2/M , sendo a última mediada por calcineurina. A exposição de culturas sincronizadas de leveduras à amiodarona, sugeriu tal efeito na saída das células da mitose, visto que, enquanto que a progressão do ciclo celular de S para G_2/M foi temporariamente aumentada, a progressão de G_2/M para G_1 foi completamente bloqueada.

Com abordagem similar, Xu e colaboradores (2011) compararam os efeitos antifúngicos do plakortídeo F com altos níveis de Ca^{2+} e amiodarona, onde identificaram que as suas respostas transcricionais mostraram-se similares, portanto, indicativo de estresse dos níveis de cálcio. Vários destes genes estavam relacionados com o ciclo celular e modulados por calcineurina, sugerindo que o efeito do plakortídeo F estaria relacionado com desregulação dos níveis de cálcio. A adição de inibidores de calcineurina, ciclosporina e FK506 (tacrolimus) demonstrou inversão dos padrões de expressão gênica vista em plakortídeo F e amiodarona, o

que reforçou a hipótese da participação de vias moduladas por calcineurina na ação antifúngica deste plakortídeo, o qual também induz o bloqueio de fases G_0/G_1 e G_2/M , e cuja estrutura química possui alta similaridade com o plakortídeo P e análogos.

Diante do exposto acima, verificamos aumento da ação citotóxica do plakortídeo P após co-tratamento com o inibidor de calcineurina, ciclosporina A. É possível observar claramente uma redução significativa de células viáveis no tratamento com 5 μ M de plakortídeo P (**9**) com ciclosporina, tanto a 2,5 com a 5 μ M, quando comparado à exposição ao plakortídeo P isoladamente, ou à ciclosporina A isoladamente, demonstrando um efeito sinérgico entre os dois compostos. Estes resultados sugerem, portanto, que a citotoxicidade este composto pode estar envolvida com vias dependentes de calcineurina, o que já foi demonstrada anteriormente para o plakortídeo F (XU *et al.*, 2011). Vale ressaltar que inibidores de calcineurina foram reportados por seus efeitos sobre proliferação e viabilidade celular em diversos tipos de células tumorais, incluindo a sua utilização em combinação com outros quimioterápicos (BAGGOTT *et al.*, 2012; GARDNER *et al.*, 2014; SATO *et al.*, 2011; SHIRAZI; KONTOYIANNIS, 2013; SIAMAKPOUR-REIHANI *et al.*, 2011).

De fato, o cálcio é importante em vários processos fisiológicos, incluindo proliferação, sobrevivência celular e regulação do ciclo celular, onde este é essencial nas transições de G_1/S , G_2/M e transição de metáfase-anáfase na mitose. Em consequência da sua relevância, vários estudos reportam seu papel também em mecanismos de carcinogênese, metástase e angiogênese (BERRIDGE, 1995; JÄGER *et al.*, 2004; KAHL; MEANS, 2003; RIZZUTO; POZZAN, 2006; SAIDAK; MENTAVERRI; BROWN, 2009).

Proteínas dependentes de cálcio, como calmodulina (CaM), e enzimas moduladas por esta, como calcineurina (CaN) e quinases dependentes de calmodulina (CaMKs), além do fator nuclear de transcrição de célula T (NFAT), esta regulada por calcineurina, desempenham, conseqüentemente, importantes funções na tumorigênese, encontrando-se superexpressas em vários tipos de tumores e são alvos de diversos estudos para identificação de novos alvos anticâncer (BACKS *et al.*, 2010; CHIN; MEANS, 2000; COURTWRIGHT *et al.*, 2009; GACHET; GHYSDAEL, 2009; GERLACH *et al.*, 2012; GREGORY *et al.*, 2010; JAULIAC *et al.*,

2002; KÖENIG *et al.*, 2010; MEDYOUF; GHYSDAEL, 2008; MORRIS; DELORENZO; TOMBES, 1998; PAN; XIONG; CHEN, 2013; PEROTTI *et al.*, 2012; SHANG *et al.*, 2003).

Tais proteínas dependentes de cálcio desempenham também importante papel na regulação do ciclo celular principalmente na regulação do complexo ciclina D/cdk4, como calcineurina e CaMKI, na fase G₁, e CaMKII nas transições das fases G₂/M e metáfase-anáfase durante a mitose (BACKS *et al.*, 2010; MORIN *et al.*, 1994; MORRIS; DELORENZO; TOMBES, 1998; PETZELT, 2001; RASMUSSEN; RASMUSSEN, 1994; RODRIGUEZ-MORA *et al.*, 2005).

As proteínas NFAT, por sua vez, regulam expressão de vários genes envolvidos na carcinogênese, em que sua desregulação foi observada previamente em diversos tumores e microambientes tumorais e tem sido objeto de pesquisas anticâncer (GERLACH *et al.*, 2012; GREGORY *et al.*, 2010; JAULIAC *et al.*, 2002; KÖENIG *et al.*, 2010).

Assim, diante da relevância da participação de vias de sinalização dependentes de Ca²⁺ no desenvolvimento tumoral e controle do ciclo celular (COTICCHIA *et al.*, 2009; KAHL; MEANS, 2003; MEDYOUF; GHYSDAEL, 2008), adicionalmente ao efeito antimitótico induzido pelo plakortídeo P e a possível relação com a modulação dos níveis de cálcio e vias dependentes de Ca²⁺/CaM, pode-se considerar o envolvimento destas vias no bloqueio em mitose induzido pelo composto **9** (plakortídeo P). A relação da citotoxicidade de seu análogo, plakortídeo F, foi comprovadamente relacionada ao aumento da incorporação de cálcio intracelular, porém, considerando o plakortídeo P (**9**) aqui estudado, esta hipótese ainda necessita de futura investigação.

Sumarizando os resultados apresentados nesta tese, vimos que, endoperóxidos constituem, de fato, uma fonte de moléculas com potencial efeito anticâncer, principalmente os plakortídeos com grupo peróxido cíclico de 6 membros, por exibir maior citotoxicidade, sugerindo que a bioatividade reside na presença dos grupos 1,2-dioxano e 1,2-dioxeno, contrariamente ao análogo do plakortídeo E, que possui o anel 1,2-dioxolano que demonstrou inatividade (figura 29). Este grupo 1,2-dioxano, por sua vez, parece estar relacionado com o bloqueio das células HCT-116 em G₂/M. O anel dihidrofurano presente nos compostos espongosoritina (**5**) e análogos (**3**, **4**, **6**), que também demonstrou citotoxicidade,

induziu o bloqueio das células em G_0/G_1 . A figura 33 resume os dados encontrados neste estudo sobre a relação estrutura e atividade dos plakortídeos isolados da esponja marinha *Plakortis angulospiculatus*, coletas no litoral do Ceará.

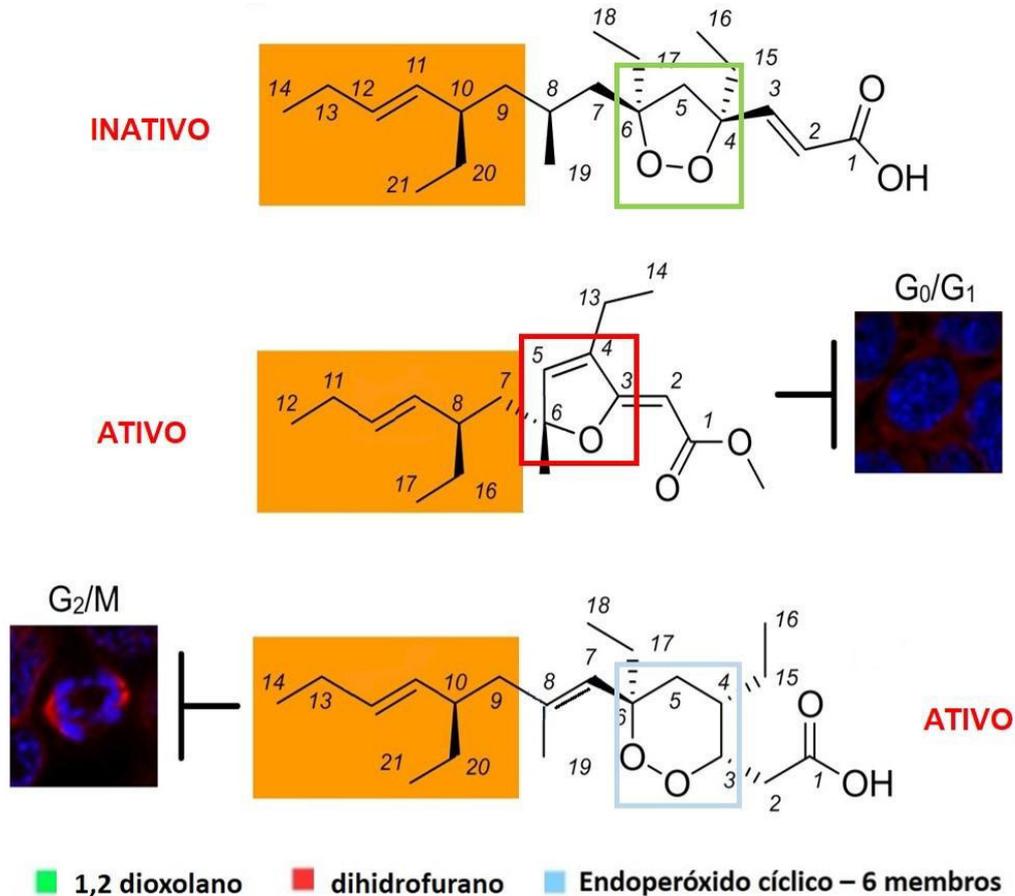


Figura 32- Sumário dos resultados. Os grupos de policetídeos compartilham a mesma estrutura química (em laranja), porém, a atividade citotóxica difere quanto à presença dos grupos diidrofurano (em verde), endoperóxido cíclico de 5 membros e 6 membros, com consequente bloqueio das fases G_0/G_1 ou G_2/M .

Assim, este trabalho ressalta a importância do estudo de estrutura-atividade de compostos anticâncer, ao demonstrar que o estudo de produtos naturais é ainda mais elucidativo quando abordado por uma ótica comparativa. Mais além, a investigação e melhor compreensão dos mecanismos de ação envolvidos na atividade biológica de moléculas marinhas é de extrema relevância na pesquisa e consequente desenvolvimento de fármacos mais potentes, seletivos e seguros.

7. CONCLUSÃO

O presente estudo reportou o isolamento e identificação de 10 policetídeos, incluindo endoperóxidos derivados do extrato alcóolico da esponja *Plakortis angulospiculatus*. Destes, 3 foram inéditos: o 7,8-diidroplakortídeo E (**1**) e os plakortídeos **2**, e **10**. Apesar destes compostos compartilharem uma via biossintética comum e da similaridade estrutural entre os mesmos, demonstraram efeitos citotóxicos diferentes em células humanas, onde compostos com grupo dihidrofurano demonstraram citotoxicidade tempo-dependente, enquanto os endoperóxidos cíclicos de 6 membros exibiram maior citotoxicidade independente do tempo de exposição. Estudos biológicos mais detalhados revelaram que estes grupos também apresentaram perfis de atividades diferentes, visto que os compostos que possuem o grupo dihidrofurano, bloquearam células na fase G₀/G₁ enquanto aqueles com grupos 1,2-dioxanos e 1,2-dioxenos bloquearam células em G₂/M, com acúmulo de figuras mitóticas. Para o plakortídeo **9**, o efeito sobre o ciclo celular parece envolver vias dependentes de Ca²⁺-calmodulina, embora mais estudos mecanísticos ainda sejam necessários para corroborar estas observações preliminares. Neste cenário, os achados aqui reforçam a importância do desenvolvimento de estudos de estrutura-atividade de grupos endoperóxidos provenientes de produtos naturais e da investigação de seus modos de ação citotóxica, além de validarem a esponja *Plakortis angulospiculatus* como profícua fonte de metabólitos com potencial anticâncer.

REFERÊNCIAS

- ABREU, P. A. et al. Identification of pyrroloformamide as a cytokinesis modulator. **ChemBioChem**, v. 15, n. 4, p. 501–506, 2014.
- ANDRÉO, M. A. et al. Systematic UPLC-ESI-MS/MS study on the occurrence of staurosporine and derivatives in associated marine microorganisms from eudistoma vannamei. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 2, p. 335–343, 2012.
- ANDRIANASOLO, E. H. et al. Isolation of swinholide A and related glycosylated derivatives from two field collections of marine cyanobacteria. **Organic Letters**, v. 7, n. 7, p. 1375–1378, 2005.
- ARRIETA, J. M.; ARNAUD-HAOND, S.; DUARTE, C. M. What lies underneath: conserving the oceans' genetic resources. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 43, p. 18318–24, 2010.
- BACKS, J. et al. The gamma isoform of CaM kinase II controls mouse egg activation by regulating cell cycle resumption. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 1, p. 81–6, 2010.
- BAGGOTT, R. R. et al. Disruption of the interaction between PMCA2 and calcineurin triggers apoptosis and enhances paclitaxel-induced cytotoxicity in breast cancer cells. **Carcinogenesis**, v. 33, n. 12, p. 2362–2368, 2012.
- BAUER, A.; BRÖNSTRUP, M. Industrial natural product chemistry for drug discovery and development. **Natural product reports**, v. 31, n. 1, p. 35–60, 2014.
- BELARBI, E. H. et al. Producing drugs from marine sponges. **Biotechnology Advances**, v. 21, n. 7, p. 585–598, 2003.
- BERGMANN, W.; FEENEY, R. J. Contributions to the study of marine products. XXXII. The nucleosides of sponges. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 16, p. 981–987, 1951.
- BERRIDGE, M. J. Calcium signalling and cell proliferation. **BioEssays**, v. 17, n. 6, p. 491–500, 1995.
- BERRUE, F. et al. The marine sponge *Plakortis zyggompha*: a source of original bioactive polyketides. **Tetrahedron**, v. 63, n. 10, p. 2328–2334, 2007.
- BERRUÉ, F. et al. Iso-, nor-, and dinor-spiculoic acids A, polyketides from the marine sponge *Plakortis zyggompha*. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 4, p. 547–549, 2005.
- BEWLEY, C. A.; HOLLAND, N. D.; FAULKNER, D. J. Two classes of metabolites from *Theonella swinhoei* are localized in distinct populations of bacterial symbionts. **Experientia**, v. 52, n. 7, p. 716–22, 1996.

BLUNT, J. W. et al. Marine natural products. **Natural product reports**, v. 28, n. 2, p. 196–268, 2011.

BLUNT, J. W. et al. Marine natural products. **Natural product reports**, v. 29, n. 2, p. 144–222, 2012.

BLUNT, J. W. et al. Marine natural products. **Natural product reports**, v. 30, n. 2, p. 237–323, 2013.

BLUNT, J. W. et al. Marine natural products. **Natural product reports**, v. 31, n. 2, p. 160–258, 2014.

BLUNT, J. W. et al. Marine natural products. **Nat. Prod. Rep.**, v. 32, n. 2, p. 116–211, 2015.

BLUNT, J. W. et al. Marine natural products. **Natural product reports**, v. 28, n. 2, p. 196–268, 2016.

BURAGOHAIN, P. et al. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters Synthesis of a novel series of artemisinin dimers with potent anticancer activity involving Sonogashira cross-coupling reaction. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, n. 1, p. 237–239, 2014.

CAFIERI, F. et al. Metabolites from the sponge *Plakortis simplex*. II. Isolation of four bioactive lactone compounds and of a novel related amino acid. **Tetrahedron**, v. 55, n. 48, p. 13831–13840, 1999.

CAPON, R. J. et al. Spongisoritin A: A new polyketide from a fijian marine sponge, *Spongisorites* sp. **Australian Journal of Chemistry**, v. 58, n. 1, p. 18–20, 2005.

CARTER, G. T. Natural products and Pharma 2011: strategic changes spur new opportunities. **Natural product reports**, v. 28, n. 11, p. 1783–9, 2011.

CAVICCHIOLI, R. et al. **Low-temperature extremophiles and their applications** **Current Opinion in Biotechnology**, 2002.

CHAVES-FONNEGRA, A. et al. Clionapyrrolidine A - A metabolite from the encrusting and excavating sponge *Cliona tenuis* that kills coral tissue upon contact. **Journal of Chemical Ecology**, v. 34, n. 12, p. 1565–1574, 2008.

CHIANESE, G. et al. Endoperoxide polyketides from a Chinese *Plakortis simplex*: Further evidence of the impact of stereochemistry on antimalarial activity of simple 1,2-dioxanes. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 17, p. 4572–4580, 2014.

CHIN, D.; MEANS, A. R. Calmodulin: A prototypical calcium sensor. **Trends in Cell Biology**, v. 10, n. 8, p. 322–328, 2000.

COLWELL, R. R. **Fulfilling the promise of biotechnology** **Biotechnology Advances**, 2002.

COMPAGNONE, R. S. et al. Antileishmanial cyclic peroxides from the palauan sponge *Plakortis aff. angulospiculatus*. **Tetrahedron**, v. 54, n. 13, p. 3057–3068, 1998.

COSTA-LOTUFO, L. V. et al. Organismos marinhos como fonte de novos fármacos: historico & perspectivas. **Quimica Nova**, 2009.

COTICCHIA, C. M. et al. Calmodulin modulates Akt activity in human breast cancer cell lines. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 115, n. 3, p. 545–560, 2009.

COURTWRIGHT, A. et al. Secreted frizzled-related protein 2 stimulates angiogenesis via a calcineurin/NFAT signaling pathway. **Cancer Research**, v. 69, n. 11, p. 4621–4628, 2009.

CRAGG, G. M.; GROTHAUS, P. G.; NEWMAN, D. J. Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. **Chemical reviews**, v. 109, n. 7, p. 3012–43, jul. 2009.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. **Natural product sources of drugs: plants, microbes, marine organisms, and animals**. Section Title: Pharmacology. **Anais...**2006

CRESPO-ORTIZ, M. P.; WEI, M. Q. Antitumor activity of artemisinin and its derivatives: From a well-known antimalarial agent to a potential anticancer drug. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, 2012.

CUTIGNANO, A. et al. Mycalol: A natural lipid with promising cytotoxic properties against human anaplastic thyroid carcinoma cells. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 52, n. 35, p. 9256–9260, 2013.

D'INCALCI, M.; GALMARINI, C. M. A review of trabectedin (ET-743): a unique mechanism of action. **Molecular cancer therapeutics**, v. 9, n. 8, p. 2157–2163, 2010.

DAVIS, R. A. et al. Thiaplakortones A-D: Antimalarial thiazine alkaloids from the Australian marine sponge *plakortis lita*. **Journal of Organic Chemistry**, v. 78, n. 19, p. 9608–9613, 2013.

DEL SOL JIMÉNEZ, M.; GARZÓN, S. P.; RODRÍGUEZ, A. D. Plakortides M and N, bioactive polyketide endoperoxides from the Caribbean marine sponge *Plakortis halichondrioides*. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 5, p. 655–661, 2003.

DELLA SALA, G. et al. Polyketide genes in the marine sponge *Plakortis simplex*: A new group of mono-modular type I polyketide synthases from sponge symbionts. **Environmental Microbiology Reports**, v. 5, n. 6, p. 809–818, 2013.

DEMBITSKY, V. M.; GLORIOZOVA, T. A.; POROIKOV, V. V. Natural Peroxy Anticancer Agents. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 6, p. 571–589, 1 jun. 2007.

DIAS, D. A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery. **Metabolites**, v. 2, n. 4, p. 303–336, 2012.

DOMINGOS, C.; MORAES, F.; MURICY, G. Four new species of Plakinidae (Porifera: Homoscleromorpha) from Brazil. **Zootaxa**, v. 3718, n. 6, p. 530–544, 2013.

DU, L. et al. Structures and mechanisms of antitumor agents: Xestoquinones uncouple cellular respiration and disrupt HIF signaling in human breast tumor cells. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 9, p. 1553–1559, 2012.

ECCLES, R. et al. Efficacy and safety of an antiviral Iota-Carrageenan nasal spray: a randomized, double-blind, placebo-controlled exploratory study in volunteers with early symptoms of the common cold. **Respiratory research**, v. 11, p. 108, 2010.

ECKSTEIN-LUDWIG, U. et al. Artemisinins target the SERCA of Plasmodium falciparum. **Nature**, v. 424, n. 6951, p. 957–961, 2003.

EPIFANIO, R. D. A.; PINHEIRO, L. S.; ALVES, N. C. Polyketides from the marine sponge *Plakortis angulospiculatus*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 6 B, p. 1367–1371, 2005.

FAROKHI, F. et al. Antimalarial activity of axidjiferosides, new β -galactosylceramides from the African sponge *Axinyssa djiferi*. **Marine Drugs**, v. 11, n. 4, p. 1304–1315, 2013.

FATTORUSSO, E. et al. Activity against *Plasmodium falciparum* of cycloperoxide compounds obtained from the sponge *Plakortis simplex*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 50, n. 6, p. 883–888, 2002.

FAULKNER, D. J. Marine natural products. **Natural Product Reports**, v. 17, n. September 1999, p. 7–55, 2000.

FAULKNER, D. J. Marine natural products. **Natural Product Reports**, v. 19, n. 1, p. 1–48, 2002.

FENICAL, W.; JENSEN, P. R. Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria. **Nature chemical biology**, v. 2, n. 12, p. 666–673, 2006.

FERREIRA, E. G. et al. Guanidine alkaloids from *Monanchora arbuscula*: Chemistry and antitumor potential. **Chemistry and Biodiversity**, v. 8, n. 8, p. 1433–1445, 2011.

FISCH, K. M. et al. Polyketide assembly lines of uncultivated sponge symbionts from structure-based gene targeting. **Nature chemical biology**, v. 5, n. 7, p. 494–501, 2009.

GACHET, S.; GHYSDAEL, J. Calcineurin/NFAT signaling in lymphoid malignancies. **General Physiology and Biophysics**, v. 28, 2009.

GARDNER, L. A. et al. Inhibition of calcineurin combined with dasatinib has direct

and indirect anti-leukemia effects against BCR-ABL1. **Am. J. Hematol**, v. 89, p. 896–903, 2014.

GERLACH, K. et al. Transcription factor NFATc2 controls the emergence of colon cancer associated with IL-6-dependent colitis. **Cancer Research**, v. 72, n. 17, p. 4340–4350, 2012.

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.

GLUECK, C. J. et al. Titrating lovaza from 4 to 8 to 12 grams/day in patients with primary hypertriglyceridemia who had triglyceride levels >500 mg/dl despite conventional triglyceride lowering therapy. **Lipids in Health and Disease**, v. 11, n. 1, p. 143, 2012.

GOCHFELD, D. J.; HAMANN, M. T. Isolation and biological evaluation of filiformin, plakortide F, and plakortone G from the Caribbean sponge *Plakortis* sp. **Journal of Natural Products**, v. 64, n. 11, p. 1477–1479, 2001.

GREGORY, M. A. et al. Wnt/Ca²⁺/NFAT Signaling Maintains Survival of Ph⁺ Leukemia Cells upon Inhibition of Bcr-Abl. **Cancer Cell**, v. 18, n. 1, p. 74–87, 2010.

GUIMARÃES, L. A. et al. Chromomycin A2 induces autophagy in melanoma cells. **Marine Drugs**, v. 12, n. 12, p. 5839–5855, 2014.

GUNASEKERA, S. P. et al. Two new bioactive cyclic peroxides from the marine sponge *Plakortis angulospiculatus*. **Journal of Natural Products**, v. 53, n. 3, p. 669–674, 1990.

HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**, 2008.

HOFFMAN, M. A.; BLESSING, J. A.; LENTZ, S. S. A phase II trial of dolastatin-10 in recurrent platinum-sensitive ovarian carcinoma: A Gynecologic Oncology Group study. **Gynecologic Oncology**, v. 89, n. 1, p. 95–98, 2003.

HUNT, B.; VINCENT, A. C. J. Scale and sustainability of marine bioprospecting for pharmaceuticals. **Ambio**, v. 35, n. 2, p. 57–64, 2006.

JAEGER, S.; DURAN-FRIGOLA, M.; ALOY, P. Drug sensitivity in cancer cell lines is not tissue-specific. **Molecular cancer**, v. 14, n. 1, p. 40, 2015.

JÄGER, H. et al. Blockage of intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels inhibit human pancreatic cancer cell growth in vitro. **Molecular pharmacology**, v. 65, n. 3, p. 630–638, 2004.

JAMISON, M. T.; DALISAY, D. S.; MOLINSKI, T. F. Peroxide Natural Products from *Plakortis zyggompha* and the Sponge Association *Plakortis halichondrioides*-*Xestospongia deweerdtiae*: Antifungal Activity against *Cryptococcus gattii*. **Journal of natural products**, 2016.

- JAULIAC, S. et al. The role of NFAT transcription factors in integrin-mediated carcinoma invasion. **Nature cell biology**, v. 4, n. 7, p. 540–544, 2002.
- JEON, J. E. et al. Cytotoxic diterpenoid pseudodimers from the Korean sponge *Phorbas gukhulensis*. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 9, p. 1679–1685, 2013.
- 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. Cytotoxic and Antimicrobial Activities in Hydromethanolic Extracts of Sponges (Porifera) from the Northeastern Brazilian Coast. **Arquivo De Ciências Do Mar**, 2004.
- 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.
- JIMENEZ, P. C. et al. Cytotoxicity of actinomycetes associated with the ascidian *Eudistoma vannamei* (Millar, 1977), endemic of northeastern coast of Brazil. **Lat. Am. J. Aquat.**, v. 41, n. 2, p. 335–343, 2013.
- JIMÉNEZ-ROMERO, C. et al. Bioactive cycloperoxides isolated from the Puerto Rican sponge *Plakortis halichondrioides*. **Journal of Natural Products**, v. 73, n. 10, p. 1694–1700, 2010.
- 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, 2004.
- JORDAN, M. A. et al. The primary antimetabolic mechanism of action of the synthetic halichondrin E7389 is suppression of microtubule growth. **Molecular cancer therapeutics**, v. 4, n. 7, p. 1086–1095, 2005.
- JOSEPH, B.; SUJATHA, S. Pharmacologically Important Natural products from Marine Sponges. **Journal of Natural Products**, v. 52, n. 4, p. 5–12, 2010.
- JUNG, M. et al. Three-dimensional structure of *Plasmodium falciparum* Ca²⁺-ATPase (PfATP6) and docking of artemisinin derivatives to PfATP6. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 15, n. 12, p. 2994–2997, 2005.
- KAHL, C. R.; MEANS, A. R. Regulation of Cell Cycle Progression by Calcium/Calmodulin-Dependent Pathways. **Endocrine Reviews**, v. 24, n. March, p. 719–736, 2003.
- KATAVIC, P. L. et al. Structure and stereochemistry of an anti-inflammatory anhydrosugar from the Australian marine sponge *Plakinastrella clathrata* and the synthesis of two analogues. **Tetrahedron**, v. 69, n. 37, p. 8074–8079, 2013.
- KELECOM, A. Marine natural products in Brazil. Part 1. Isolation and structure determination. **Ciencia e Cultura Sao Paulo**, v. 49, n. 5/6, p. 321–330, 1997.

KIM, H. et al. Phosphoiodins A and B, unique phosphorus-containing iodinated polyacetylenes from a Korean sponge *Placospongia* sp. **Organic Letters**, v. 15, n. 1, p. 100–103, 2013.

KINGSTON, D. G. I. Contributed Reviews Tubulin-Interactive Natural Products as Anticancer Agents 1. p. 507–515, 2009.

KOBAYASHI, J. et al. Manzamenones G and H, new dimeric fatty-acid derivatives from the Okinawan marine sponge *Plakortis* sp. **Tetrahedron**, v. 49, n. 27, p. 5955–5960, 1993.

KÖENIG, A. et al. NFAT-Induced Histone Acetylation Relay Switch Promotes c-Myc-Dependent Growth in Pancreatic Cancer Cells. **Gastroenterology**, v. 138, n. 3, p. 1189–1199.e2, 2010.

KOSSUGA, M. H. et al. Antiparasitic, antineuroinflammatory, and cytotoxic polyketides from the marine sponge *Plakortis angulospiculatus* collected in Brazil. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 3, p. 334–339, 2008.

KUSHLAN, D. .; FAULKNER, D. J. A NOVEL PERLACTONE FROM THE CARIBBEAN SPONGE PLAKORTIS ANGULOSPICULATUS. **Journal of natural products**, v. 54, n. 5, p. 1451–1454, 1991.

LAROCHE, M. et al. Cellular localisation of secondary metabolites isolated from the Caribbean sponge *Plakortis simplex*. **Marine Biology**, v. 151, n. 4, p. 1365–1373, 2007.

LIU, X. F. et al. Simplextones A and B, unusual polyketides from the marine sponge *plakortis simplex*. **Organic Letters**, v. 13, n. 12, p. 3154–3157, 2011.

LUESCH, H. Towards high-throughput characterization of small molecule mechanisms of action. **Molecular bioSystems**, v. 2, n. 12, p. 609–620, 2006.

MARTINS, A. et al. Marketed marine natural products in the pharmaceutical and cosmeceutical industries: Tips for success. **Marine Drugs**, 2014.

MATSUMURA, D. et al. Total synthesis of (+)-spiculoic acid A. **Tetrahedron Letters**, v. 50, n. 26, p. 3356–3358, 2009.

MAYER, A. M. S. et al. The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective. **Trends in Pharmacological Sciences**, 2010.

MAYER, A. M. S. et al. Marine pharmacology in 2009-2011: Marine compounds with antibacterial, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of . **Marine Drugs**, v. 11, n. 7, p. 2510–2573, 2013.

MEDYOUF, H.; GHYSDAEL, J. The calcineurin/NFAT signaling pathway: A novel therapeutic target in leukemia and solid tumors. **Cell Cycle**, 2008.

MEHBUB, M. F. et al. Marine sponge derived natural products between 2001 and 2010: Trends and opportunities for discovery of bioactives. **Marine Drugs**, v. 12, n. 8, p. 4539–4577, 2014.

MILLER, J. H.; SINGH, A. J.; NORTHCOTE, P. T. Microtubule-stabilizing drugs from marine sponges: Focus on peloruside A and zampanolide. **Marine Drugs**, 2010.

MOMOSE, R. et al. Hyrtimomines A-C, new heteroaromatic alkaloids from a sponge hyrtios sp. **Organic Letters**, v. 15, n. 8, p. 2010–2013, 2013.

MONK, B. J. 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. 3754–69, 2012.

MONTASER, R.; LUESCH, H. Marine natural products: a new wave of drugs? **Future medicinal chemistry**, v. 3, n. 12, p. 1475–1489, 2011.

MORIN, N. et al. The proteolysis-dependent metaphase to anaphase transition: calcium/calmodulin-dependent protein kinase II mediates onset of anaphase in extracts prepared from unfertilized *Xenopus* eggs. **Embo J**, v. 13, n. 18, p. 4343–4352, 1994.

MORRIS, T. A.; DELORENZO, R. J.; TOMBES, R. M. CaMK-II inhibition reduces cyclin D1 levels and enhances the association of p27kip1 with Cdk2 to cause G1 arrest in NIH 3T3 cells. **Exp Cell Res**, v. 240, n. 2, p. 218–227, 1998.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55–63, 1983.

MURAYAMA, T. et al. Plakorin, a potent Ca²⁺-ATPase activator from the Okinawan marine sponge *Plakortis* sp. **Experientia**, v. 45, n. 9, p. 898–899, 1989.

NAGLE, D. G. et al. Mechanism targeted discovery of antitumor marine natural products. **Current medicinal chemistry**, v. 11, n. 13, p. 1725–56, 2004.

NEWMAN, D.; CRAGG, G. Drugs and Drug Candidates from Marine Sources: An Assessment of the Current “State of Play”. **Planta Medica**, v. 82, n. 09/10, p. 775–789, 18 fev. 2016.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Marine natural products and related compounds in clinical and advanced preclinical trials. **Journal of Natural Products**, 2004.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of natural products**, v. 70, n. 3, p. 461–77, mar. 2007.

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**, 2012.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; BRANCH, N. P. Drugs and Drug Candidates from

- Marine Sources : An Assessment of the Current “ State of Play ”. 2015.
- NORRIS, M. D.; PERKINS, M. V. Structural diversity and chemical synthesis of peroxide and peroxide-derived polyketide metabolites from marine sponges. **Natural product reports**, v. 00, p. 1–20, 2016.
- OKOUNEVA, T. et al. Inhibition of centromere dynamics by eribulin (E7389) during mitotic metaphase. **Molecular cancer therapeutics**, v. 7, n. 7, p. 2003–2011, 2008.
- OLI, S. et al. Identification of plakortide e from the Caribbean sponge Plakortis halichondroides as a trypanocidal protease inhibitor using bioactivity-guided fractionation. **Marine Drugs**, v. 12, n. 5, p. 2614–2622, 2014.
- PAN, M.-G.; XIONG, Y.; CHEN, F. NFAT Gene Family in Inflammation and Cancer. **Current Molecular Medicine**, v. 13, n. 4, p. 543–554, 2013.
- PARK, S. et al. Cytotoxic activity of aeroplysinin-1 against colon cancer cells by promoting β -catenin degradation. **Food and Chemical Toxicology**, v. 93, p. 66–72, 2016.
- PATIL, A. D. et al. The plakortones, novel bicyclic lactones from the sponge Plakortis halichondrioides : Activators of cardiac SR-Ca²⁺-pumping ATPase. **Tetrahedron**, v. 52, n. 2, p. 377–394, 1996.
- PERDICARIS, S.; VLACHOGIANNI, T.; VALAVANIDIS, A. Bioactive Natural Substances from Marine Sponges: New Developments and Prospects for Future Pharmaceuticals. **Natural Products Chemistry & Research**, v. 1, n. 3, p. 114, 2013.
- PEROTTI, V. et al. NFATc2 Is a Potential Therapeutic Target in Human Melanoma. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 132179, p. 2652–2660, 2012.
- PERRY, T. L. et al. New peroxy lactones from the Jamaican sponge Plakinastrella onkodes, with inhibitory activity against the AIDS opportunistic parasitic infection *Toxoplasma gondii*. **Tetrahedron**, v. 57, n. 8, p. 1483–1487, 2001.
- PETERS, K. J. et al. Potential chemical defenses of Antarctic sponges against sympatric microorganisms. **Polar Biology**, v. 33, n. 5, p. 649–658, 2010.
- PETTIT, G. R. et al. The isolation and structure of a remarkable marine animal antineoplastic constituent: Dolastatin 10. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 109, n. 22, p. 6883–6885, 1987.
- PETTIT, G. R. et al. Antineoplastic agents. 535. Isolation and structure of plakorstatins 1 and 2 from the Indo-Pacific sponge Plakortis nigra. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 9, p. 1611–1613, 2004.
- PETZELT, C. Participation of the Ca²⁺-calmodulin-activated kinase II in the control of metaphase-anaphase transition in human cells. **Cell Biology International**, v. 25, n. 5, p. 403–409, 2001.
- PIEL, J. et al. Antitumor polyketide biosynthesis by an uncultivated bacterial symbiont

of the marine sponge *Theonella swinhoei*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 46, p. 16222–16227, 2004.

PIMENTEL, A. A. et al. The marine sponge toxin agelasine B increases the intracellular Ca(2+) concentration and induces apoptosis in human breast cancer cells (MCF-7). **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 69, n. 1, p. 71–83, 2012.

PINCHUK, B. et al. Marine derived hamacanthins as lead for the development of novel PDGFR?? protein kinase inhibitors. **Marine Drugs**, v. 11, n. 9, p. 3209–3223, 2013.

QUINOVA, E. et al. Heterocycles from the marine Sponge *Xestospongia* sp. **Journal of Organic Chemistry**, v. 34, n. 34, p. 4260–4264, 1986.

RAGUZ, S.; YAGÜE, E. Resistance to chemotherapy: new treatments and novel insights into an old problem. **British journal of cancer**, v. 99, n. 3, p. 387–91, 2008.

RAMIREZ-LLODRA, E. et al. Deep, diverse and definitely different: Unique attributes of the world's largest ecosystem. **Biogeosciences**, v. 7, n. 9, p. 2851–2899, 2010.

RASMUSSEN, C.; RASMUSSEN, G. Inhibition of G2/M progression in *Schizosaccharomyces pombe* by a mutant calmodulin kinase II with constitutive activity. **Molecular biology of the cell**, v. 5, n. 7, p. 785–95, 1994.

REEN, F. J. et al. Emerging concepts promising new horizons for marine biodiscovery and synthetic biology. **Marine drugs**, v. 13, n. 5, p. 2924–54, 2015.

RIZZUTO, R.; POZZAN, T. Microdomains of Intracellular Ca 2+ : Molecular Determinants and Functional Consequences. **Physiological reviews**, v. 86, n. 1, p. 369–408, 2006.

ROMANO, G. et al. Marine microorganisms as a promising and sustainable source of bioactive molecules. **Marine Environmental Research**, p. 1–12, maio 2016.

SAIDAK, Z.; MENTAVERRI, R.; BROWN, E. M. The role of the calcium-sensing receptor in the development and progression of cancer. **Endocrine Reviews**, 2009.

SAITO, S. et al. Amphidinolide H, a novel type of actin-stabilizing agent isolated from dinoflagellate. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 320, n. 3, p. 961–5, 30 jul. 2004.

SANDLER, J. S. et al. Cytotoxic ??-carbolines and cyclic peroxides from the Palauan sponge *Plakortis nigra*. **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 9, p. 1258–1261, 2002.

SATO, M. et al. Cyclosporine A induces apoptosis of human lung adenocarcinoma cells via caspase-dependent pathway. **Anticancer Research**, v. 31, n. 6, p. 2129–2134, 2011.

SHAKERI, A.; SAHEBKAR, A. Anti-Cancer Products from Marine Sponges: Progress

and Promise. **Recent Patents on Drug Delivery & Formulation**, v. 9, n. 3, p. 187–188, 14 set. 2015.

SHANDILYA, A. et al. A plausible mechanism for the antimalarial activity of artemisinin: A computational approach. **Scientific reports**, v. 3, p. 2513, 2013.

SHANG, S. et al. CaMKIV expression is associated with clinical stage and PCNA-labeling index in endometrial carcinoma. **International journal of molecular medicine**, v. 11, n. 2, p. 181–186, 2003.

SHIRAZI, F.; KONTOYIANNIS, D. P. The calcineurin pathway inhibitor tacrolimus enhances the in vitro activity of azoles against Mucorales via apoptosis. **Eukaryotic Cell**, v. 12, n. 9, p. 1225–1234, 2013.

SIAMAKPOUR-REIHANI, S. et al. The Role of calcineurin/NFAT in SFRP2 induced angiogenesis-A rationale for breast cancer treatment with the calcineurin inhibitor Tacrolimus. **PLoS ONE**, v. 6, n. 6, p. 1–9, 2011.

SOKOLOVER, N.; ILAN, M. Assessing anti-predatory chemical defences among ten eastern Mediterranean sponges. **Journal of the Marine Biological Association of the UK**, v. 87, n. 06, p. 1785–1790, 2007.

SOUSA, T. D. S. et al. Anthracyclinones from micromonospora sp. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 3, p. 489–493, 2012.

SOUSA, T. S. et al. Amphidinolide P from the Brazilian octocoral *Stragulum bicolor*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 25, n. 6, p. 600–604, 2015.

TAN, D. S. W. et al. Anti-cancer drug resistance: Understanding the mechanisms through the use of integrative genomics and functional RNA interference. **European Journal of Cancer**, v. 46, n. 12, p. 2166–2177, 2010.

THAKUR, N. L.; THAKUR, A. N.; MÜLLER, W. E. G. Marine Natural Products Drug Discovery. **Biotechnology**, v. 4, n. 6, p. 471–477, 2005.

TSUKAMOTO, S. et al. Manzamenones A-F from the Okinawan Marine Sponges *Plakortis* sp.: Novel dimeric fatty acid derivatives possessing a bicyclo (4.3.0) nonane skeleton. **Journal of Organic Chemistry**, n. 1, p. 5255–5260, 1992.

UHLEMANN, A.-C. et al. A single amino acid residue can determine the sensitivity of SERCAs to artemisinins. **Nature structural & molecular biology**, v. 12, n. 7, p. 628–629, 2005.

URIA, A.; PIEL, J. Cultivation-independent approaches to investigate the chemistry of marine symbiotic bacteria. **Phytochemistry Reviews**, v. 8, n. 2, p. 401–414, 2009.
VACELET, J. Etude en microscopie électronique de l'association entre bactéries et spongiaires du genre *Verongia* (Dictyoceratida). **Journal de Microscopie et Biologie Cellulaires**, v. 23, p. 271–288, 1975.

VACELET, J.; DUPORT, E. Prey capture and digestion in the carnivorous sponge

Asbestopluma hypogea (Porifera: Demospongiae). **Zoomorphology**, v. 123, n. 4, p. 179–190, 2004.

VAISHAMPAYAN, U. et al. Phase II study of dolastatin-10 in patients with hormone-refractory metastatic prostate adenocarcinoma. **Clinical Cancer Research**, v. 6, n. 11, p. 4205–4208, 2000.

WALLACE, M. S. Ziconotide: a new nonopioid intrathecal analgesic for the treatment of chronic pain. **Expert review of neurotherapeutics**, v. 6, n. 10, p. 1423–1428, 2006.

WELLS, J. Pergamon Press. **Tetrahedron Letters**, n. 30, p. 2637–2638, 1976.

WILKE, D. V. et al. Cytotoxic lipidic α -amino acids from the zoanthid *Protopalythoa variabilis* from the Northeastern Coast of Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 8, p. 1455–1459, 2009.

WILKE, D. V. et al. Pro-apoptotic activity of lipidic α -amino acids isolated from *Protopalythoa variabilis*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 22, p. 7997–8004, 2010.

XIONG, Z.-Q. et al. Recent Advances in the Discovery and Development of Marine Microbial Natural Products. **Marine Drugs**, v. 11, n. 3, p. 700–717, 2013.

XU, T. et al. The marine sponge-derived polyketide endoperoxide plakortide F acid mediates its antifungal activity by interfering with calcium homeostasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 4, p. 1611–1621, 2011.

YAMANOKUCHI, R. et al. Hyrtioreticulins A-E, indole alkaloids inhibiting the ubiquitin-activating enzyme, from the marine sponge *Hyrtios reticulatus*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 14, p. 4437–4442, 2012.

ZHU, P. et al. Nox4-dependent ROS modulation by amino endoperoxides to induce apoptosis in cancer cells. **Cell death & disease**, v. 4, n. 3, p. e552, 2013.

ANEXOS

ANEXO I – Métodos para extração da esponja *P. angulospiculatus* e fracionamento químico

A) Obtenção do extrato bruto

A amostra de *P. angulospiculatus* (26,1 g, peso seco) foi cortada em pedaços de aproximadamente 1 cm², imersa em etanol (250 mL), e ultrasonicado por 10 minutos. Este procedimento foi repetido 4 vezes. Os quatro extratos foram coletados e evaporados sob pressão reduzida, resultando em 3,7 g de extrato bruto.

B) Fracionamento bioguiado

O extrato bruto foi fracionado em coluna com 20 g de resina Chromabond HR-X (Machery-Nagel), eluído com solventes na seguinte sequência: H₂O (500 mL), 7:3 CH₃CN/H₂O (300 mL), CH₃CN (300 mL) e CH₂Cl₂ (300 mL), o que resultou em quatro frações com pesos de 2,08 g (H₂O), 617,2 mg (CH₃CN/H₂O), 866,2 mg (CH₃CN) e 165,2 mg (CH₂Cl₂). Este extrato foi fracionado por cromatografia líquida em coluna HR-X (Chromabond, Macherey-Nagel) eluída com solventes hexano (Hex), acetonitrila, diclorometano (DCM) e metanol (MeOH) em mistura de polaridade crescente, como demonstrado no esquema anterior. As 4 frações obtidas (A, B, C e D) foram submetidas ao teste do MTT em concentrações de 5 e 50 µg/mL. O resultado está mostrado a seguir, na tabela 4.

Por apresentar alta citotoxicidade (ver em anexo II), a fração CH₃CN (fração C) foi submetida ao fracionamento em sílica-gel 60 (EM Biosciences) com gradientes de n-hexano/EtOAc, Hex 100%, Hex/EtOAc (9,5:0,5), Hex/EtOAc (9:1), Hex/EtOAc (8,5:0,5), Hex/EtOAc (8:1), Hex/EtOAc (7:1), Hex/EtOAc (1:1). As frações 2 (200, 5 g), 3 (288, 2 g) e 5 (160 mg), por apresentaram-se mais citotóxicas, foram submetidas à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) semi-preparativa de fase normal (Modelo Class LC-10 system, Shimadzu) e C18 (Supelco) eluída com gradientes de CH₂Cl₂/MeOH e MeOH/H₂O respectivamente, levando ao isolamento dos compostos, a saber: 4 substâncias decorrentes da fração C3 e 6 compostos recuperados da fração C5. As frações e compostos puros foram monitorados por cromatografia em camada delgada borrifada com solução de vanilina/ácido

perclórico/etanol seguida de aquecimento. Abaixo está o fluxograma do fracionamento bioguiado indicando tipos de cromatografias e mistura de solventes utilizados no processamento, com destaque (em amarelo) para frações citotóxicas e compostos isolados (1-10.)

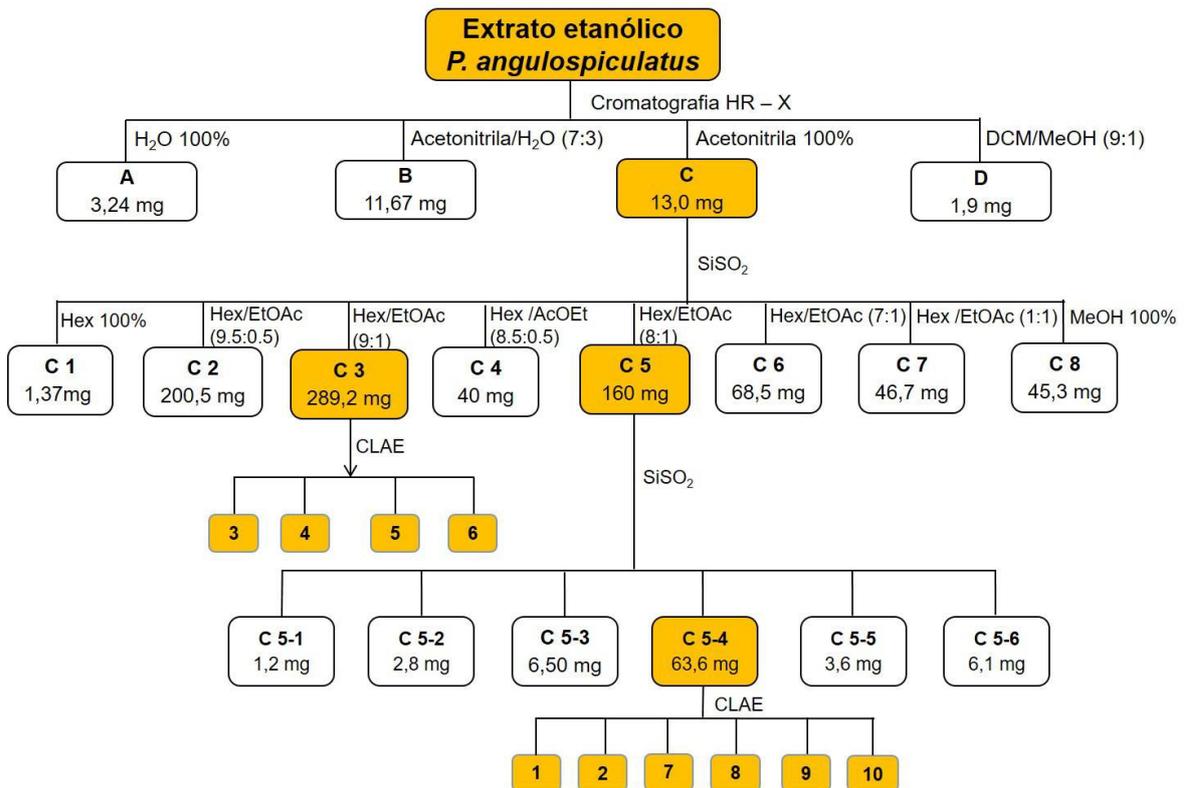


Figura 33. Fluxograma do fracionamento bioguiado a partir do extrato etanólico de *P. angulospiculatus*. Quadros indicando massa das frações, tipos de cromatografias e mistura de solventes utilizados no processamento, com destaque (em amarelo) para frações citotóxicas e compostos isolados (1 – 10).

ANEXO II– Citotoxicidade de extrato e frações

A) Inibição da proliferação celular tumoral de extrato bruto e frações

Tabela 7. Atividade citotóxica in vitro do extrato etanólico da esponja *P. angulospiculatus* em linhagem tumoral de cólon (HCT-116) avaliadas pelo ensaio do MTT após 72 horas de incubação. Valores de concentração inibitória média (CI₅₀) e intervalo de confiança (IC 95%) em µg/mL obtidas a partir da média e respectivos erro padrão da média (E.P.M). de 2 experimentos independentes em duplicata determinadas por regressão não-linear gerada no programa GraphPad Prism 5.0 .

Amostra	CI ₅₀ (µg/mL)
	HCT-116
Extrato etanólico de	0,26
<i>P. angulospiculatus</i>	0,10 – 0,64

Tabela 8. Atividade citotóxica in vitro das frações A a D em linhagem tumoral de cólon (HCT-116) avaliadas pelo ensaio do MTT, 72 horas de incubação. A inibição média da proliferação celular (%) foi obtida a partir da média de 2 experimentos independentes em duplicata calculadas no programa GraphPad Prism 5.0.

Frações	Inibição da proliferação celular (%)	
	HCT-116	
	5 µg/mL	50 µg/mL
A	27,98	41,05
B	44,82	50,77
C	86,63	101,13
D	43,82	47,45

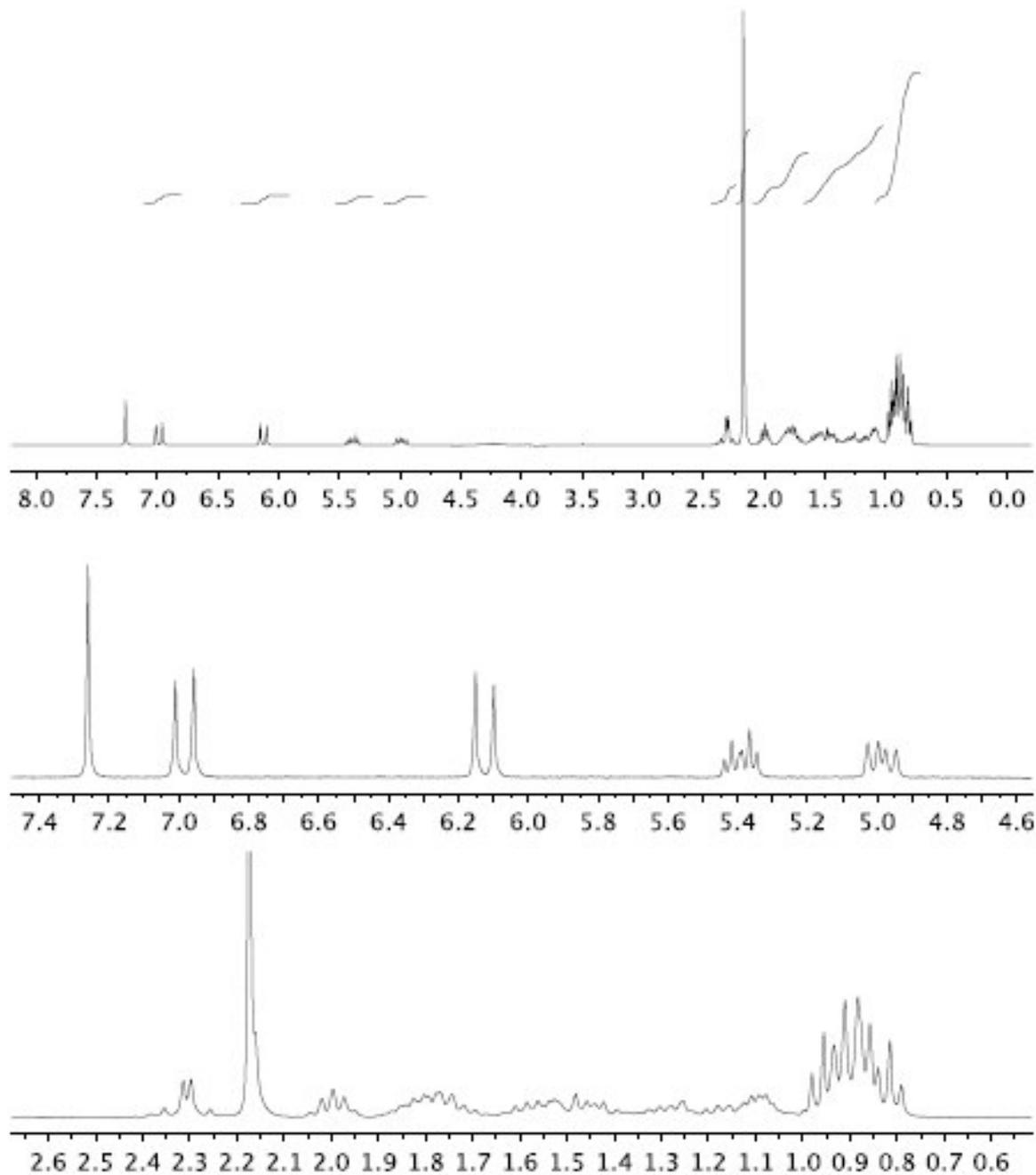
Tabela 9. Atividade citotóxica in vitro das frações C1 a C8 em linhagem tumoral de cólon (HCT-116) avaliadas pelo ensaio do MTT após 72 horas de incubação. Valores de concentração inibitória média (CI_{50}) e intervalo de confiança (IC 95%) em $\mu\text{g/mL}$ obtidas a partir da média e respectivos erro padrão da média (E.P.M). de 2 experimentos independentes em duplicata determinadas por regressão não-linear gerada no programa GraphPad Prism 5.0 .

Frações	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) HCT-116
C 1	3,62 1,84 – 7,14
C 2	5,81 2,45 – 13,80
C 3	1,63 0,84 – 3,20
C 4	12,56 4,85 – 32,51
C 5	0,31 0,23 – 0,42
C 6	2,96 1,86 – 4,72
C 7	5,87 3,64 – 9,49
C 8	> 50

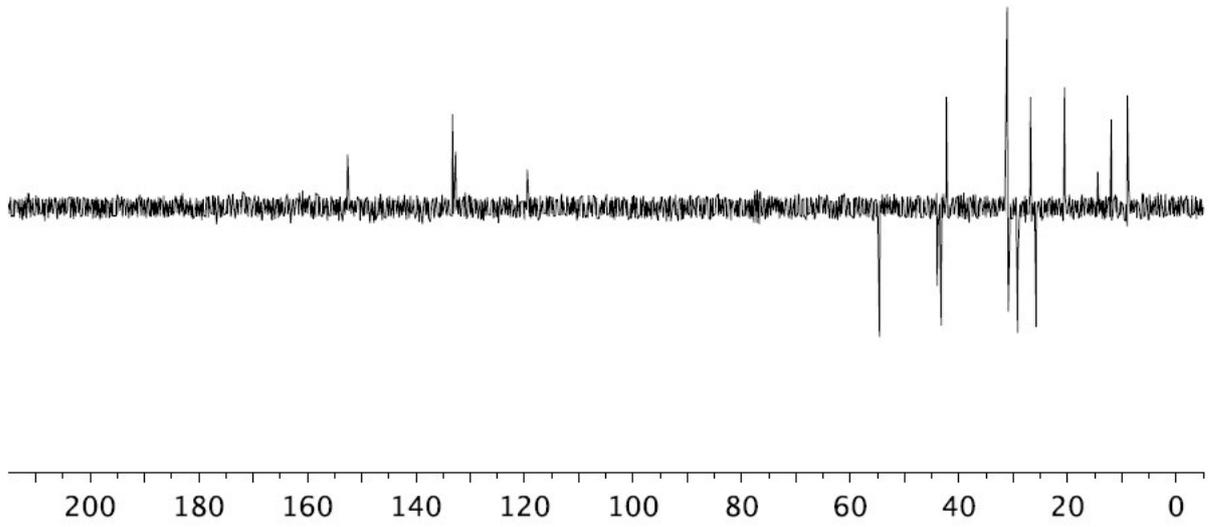
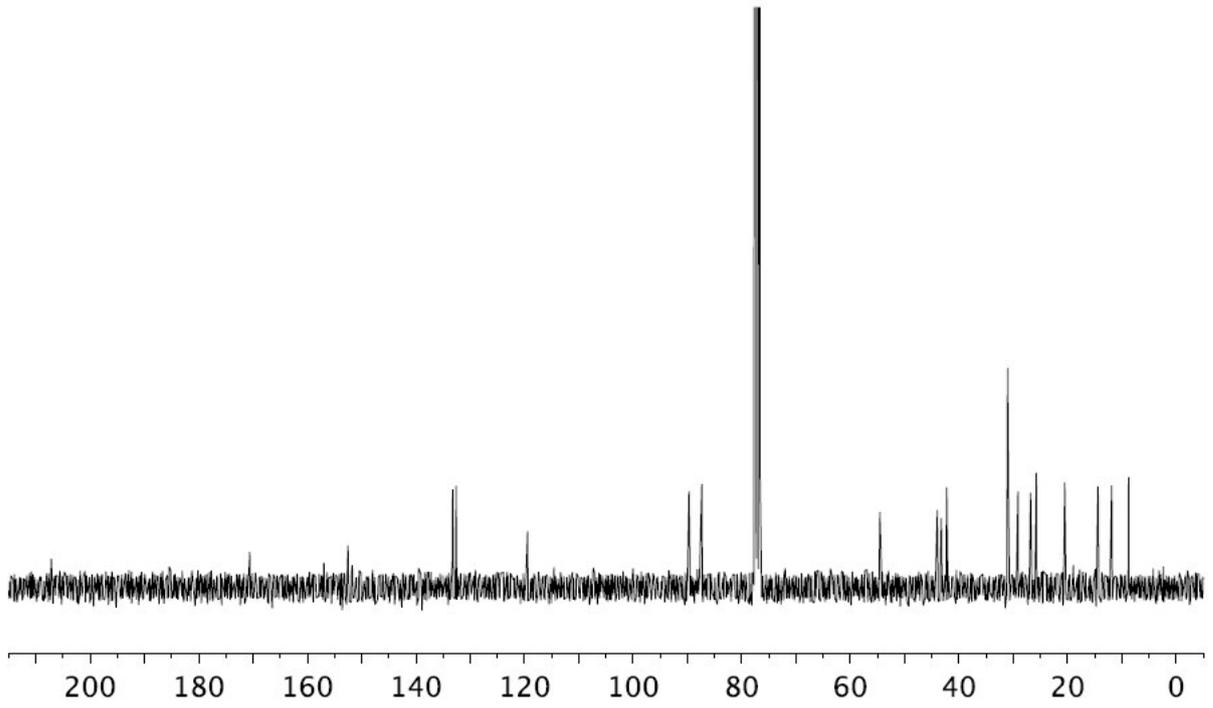
ANEXO III - Determinação estrutural dos compostos isolados

Para determinação estrutural dos compostos foram obtidos seus espectros de infravermelho (Espectômetro FT-IR 1000, Perkin-Elmer[®]), ressonância magnética (Avance DRX-500, Bruker, e espectômetro DPX-300) e massa de alta resolução (LCMS-IT-TOF, Shimadzu[®]). A rotação óptica foi mensurada por polarímetro digital (Perkin-Elmer 341 A seguir estão os espectros de RMN e gCOSY, HMBC e NOESY dos compostos 1, 2 e 10.

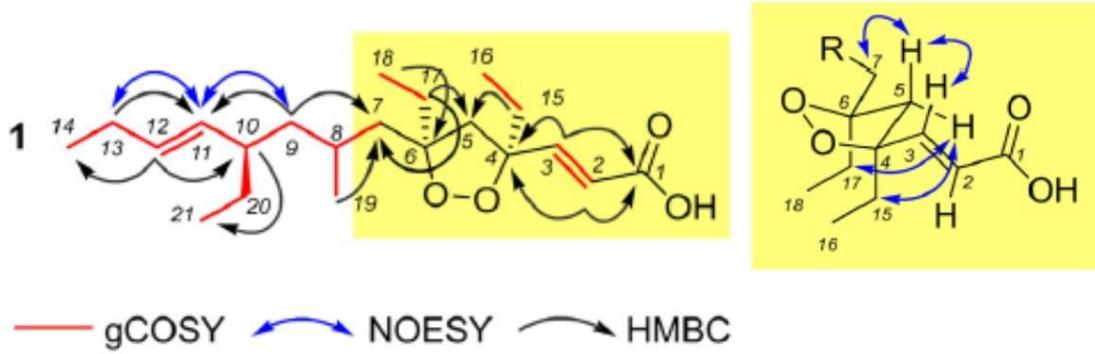
Espectro ^1H RMN (300 MHz) de 7,8 – dihidroplakortídeo E (1) em CDCl_3 .



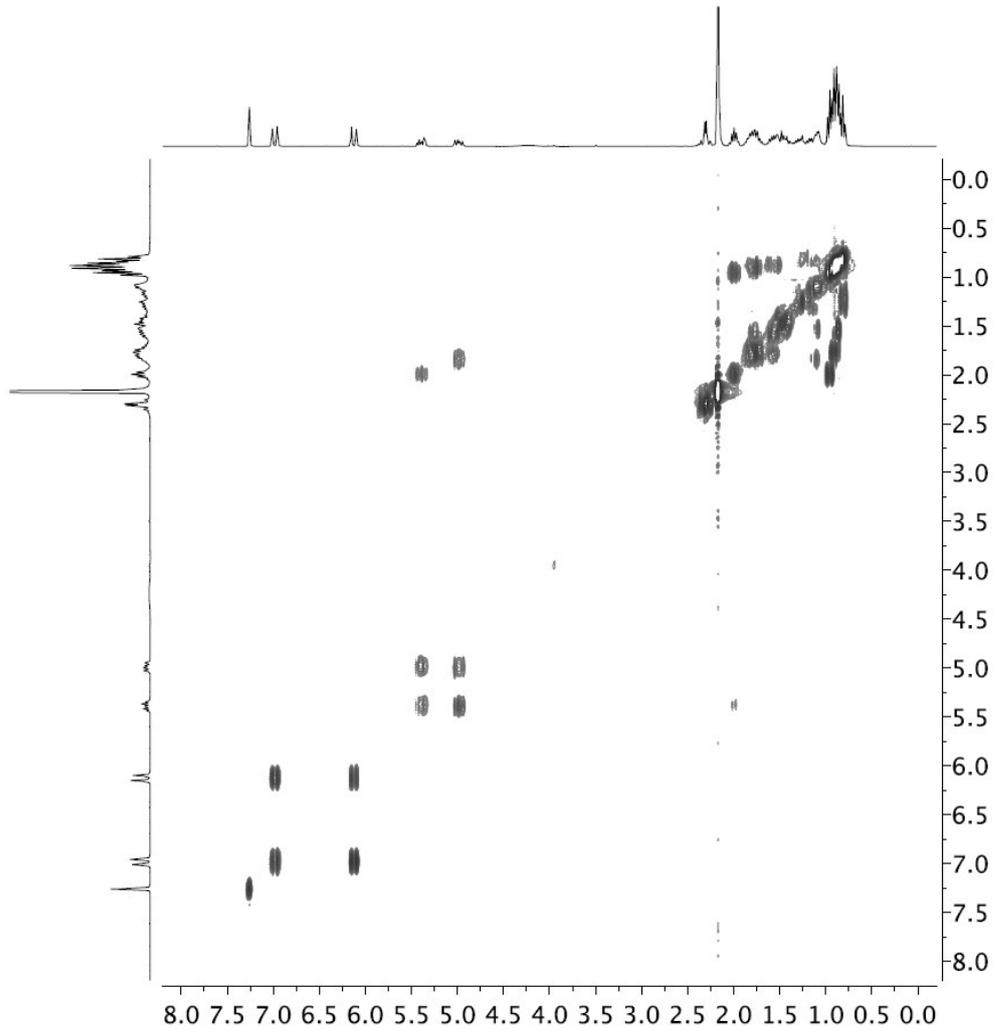
Espectro ^{13}C RMN (75 MHz) de 7,8 – dihidroplakortídeo E (1) em CDCl_3 .

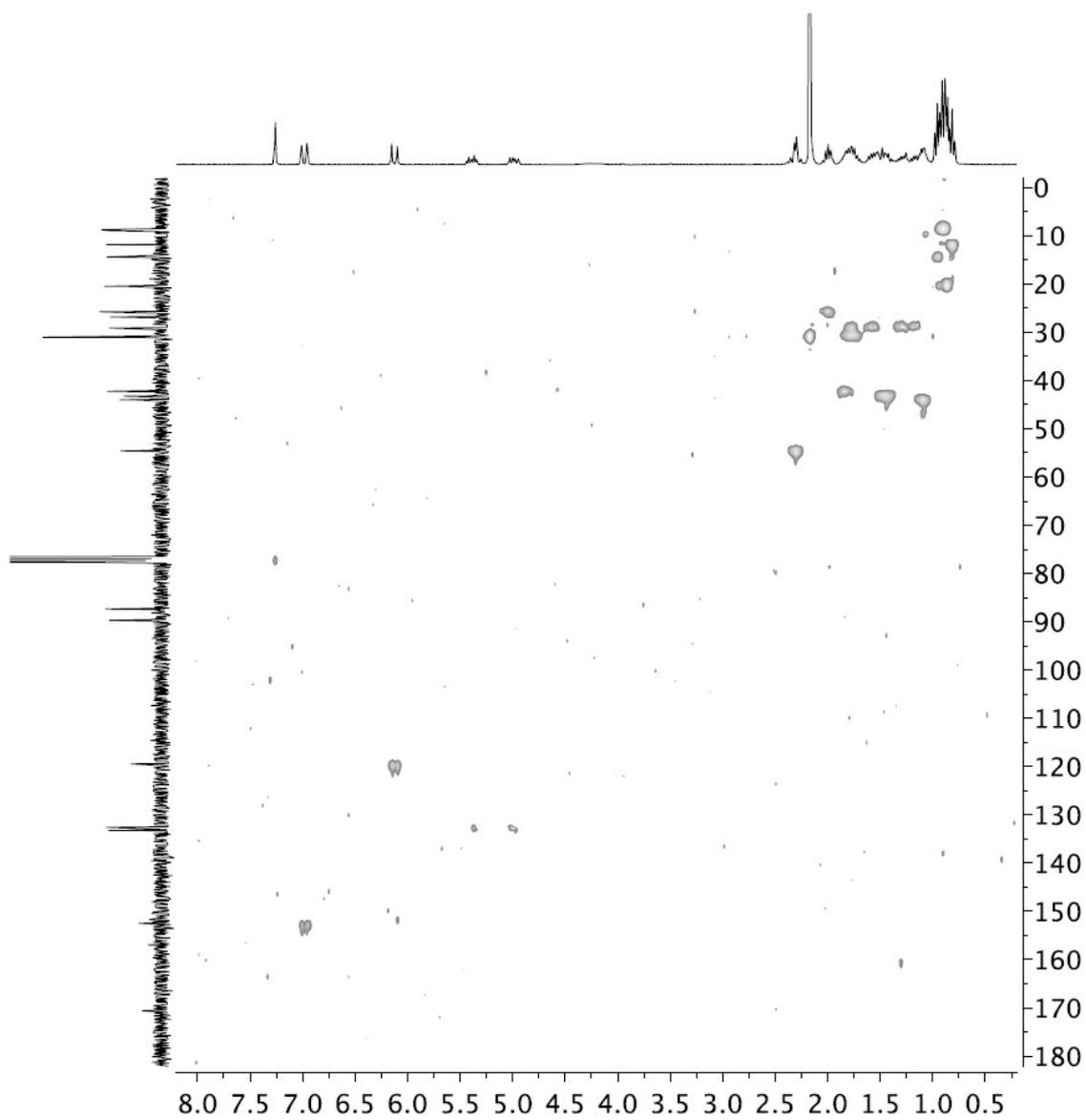


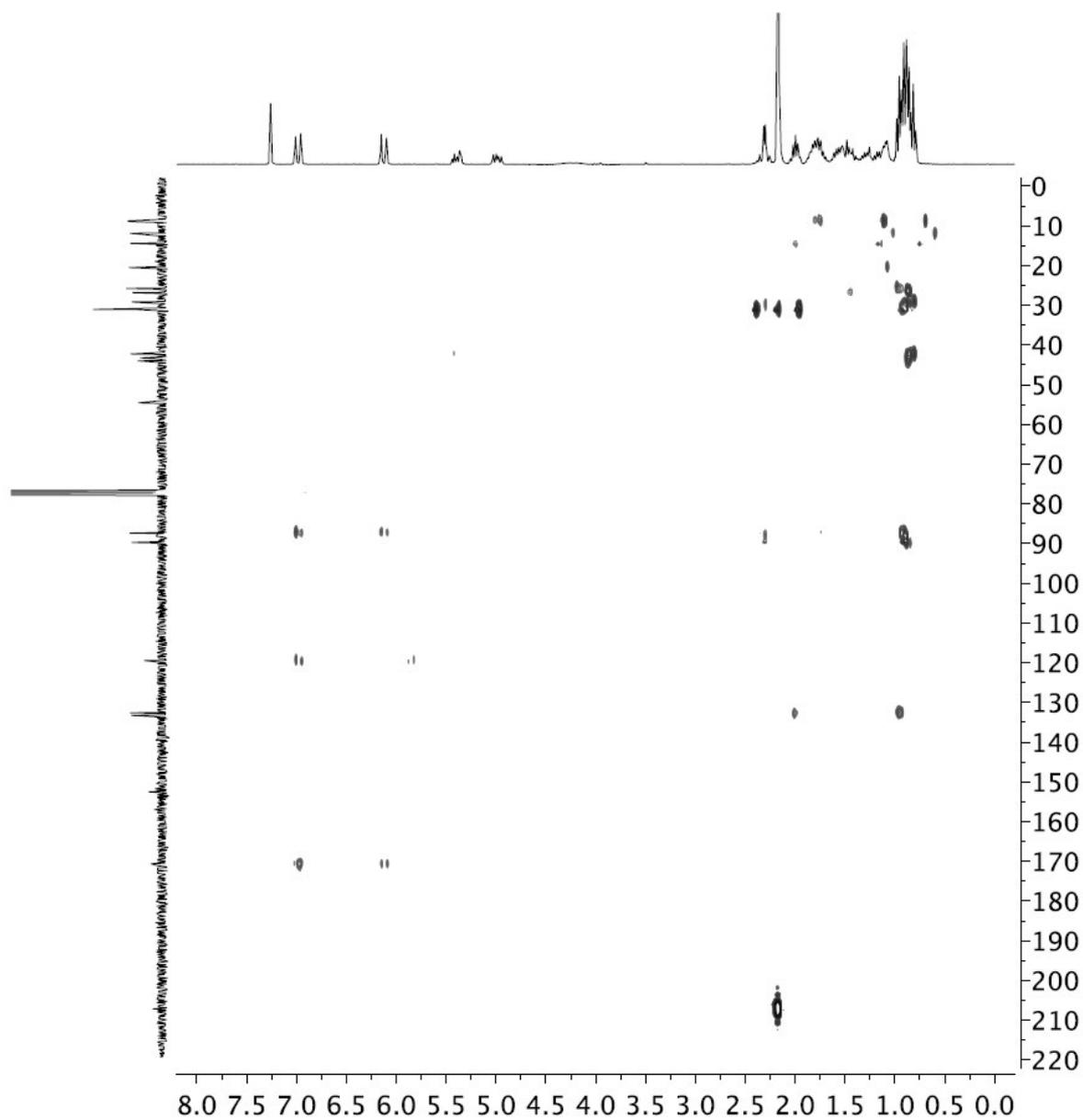
Correlações observados nos espectros gCOSY, HMBC e NOESY para o dihidroplakortídeo E (1).



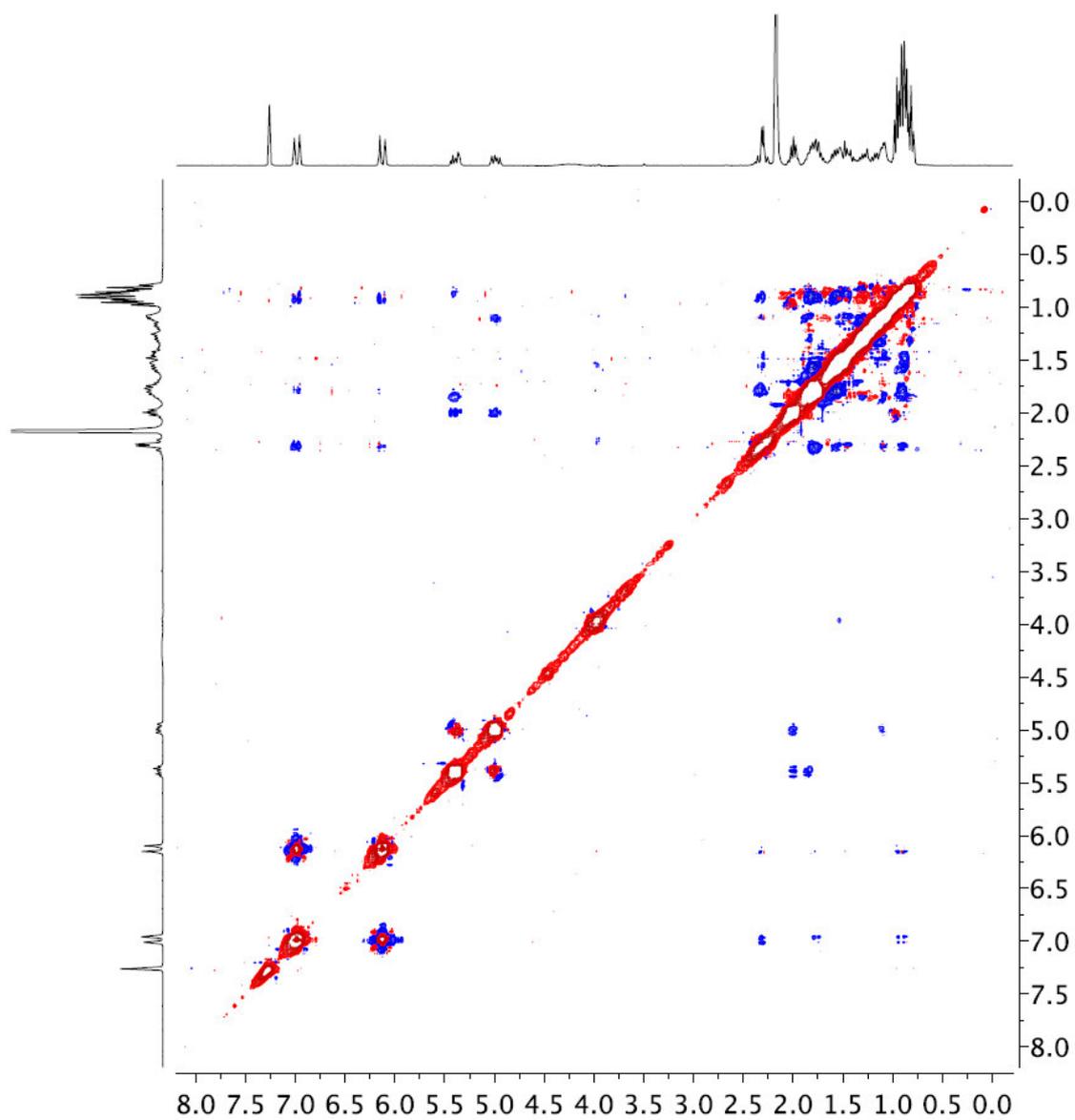
Espectro gCOSY ^1H , ^1H de 7,8 – dihidroplakortídeo E (1) em CDCl_3 .



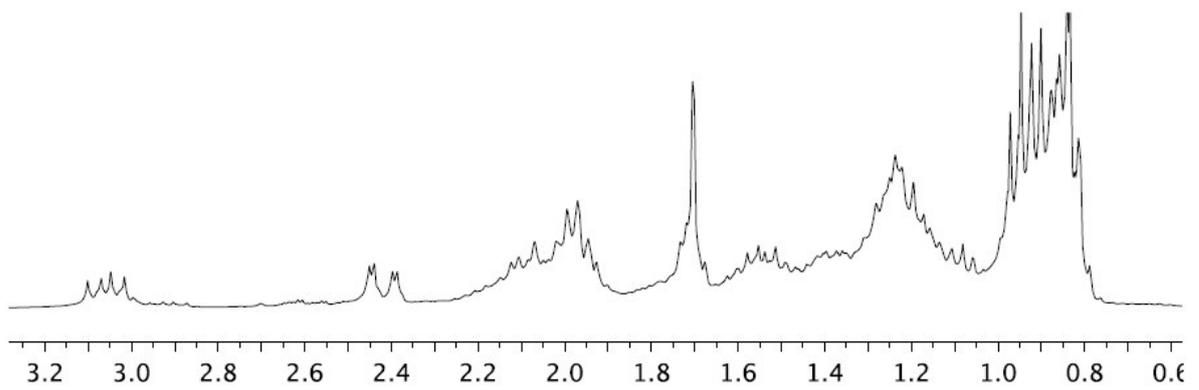
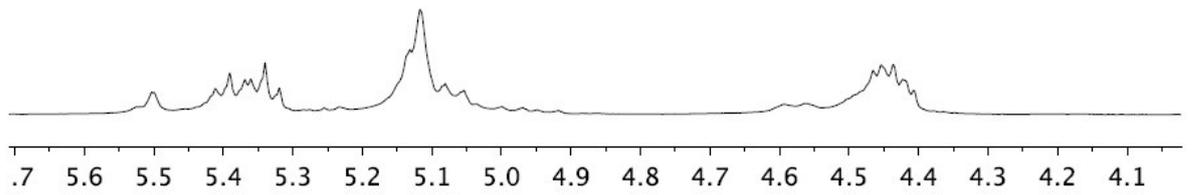
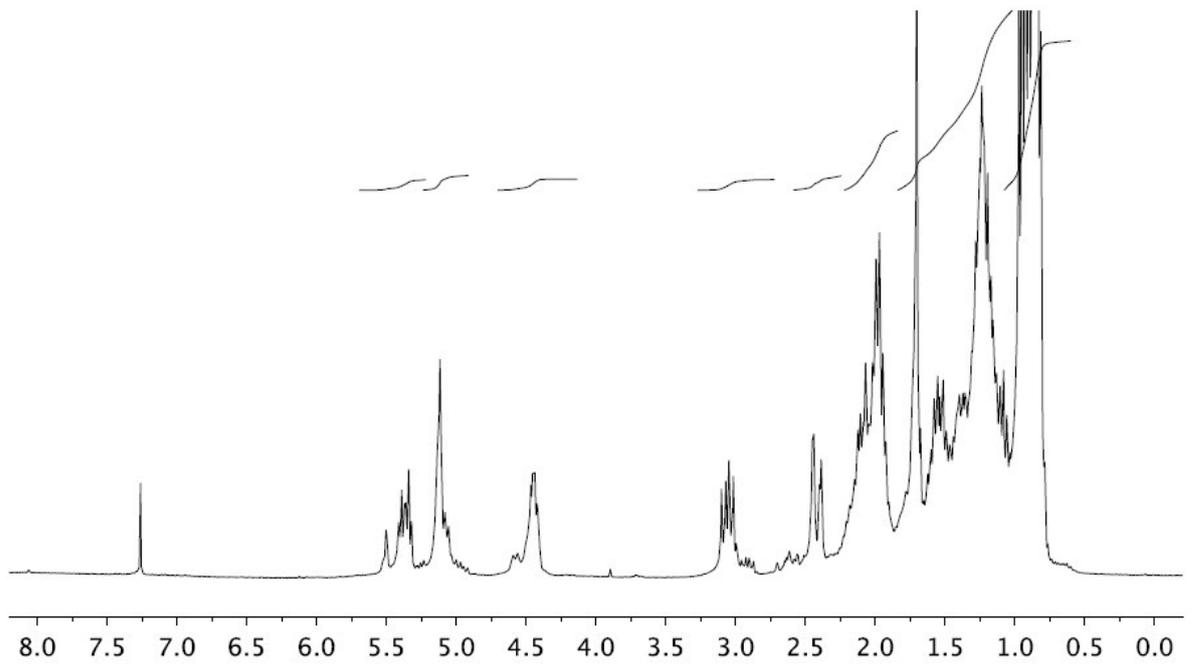
Espectro HSQC ^1H , ^{13}C de 7,8 – dihidroplakortídeo E (1) em CDCl_3 

Espectro HMBC ^1H , ^{13}C de 7,8 – dihidroplakortídeo E (1) em CDCl_3 

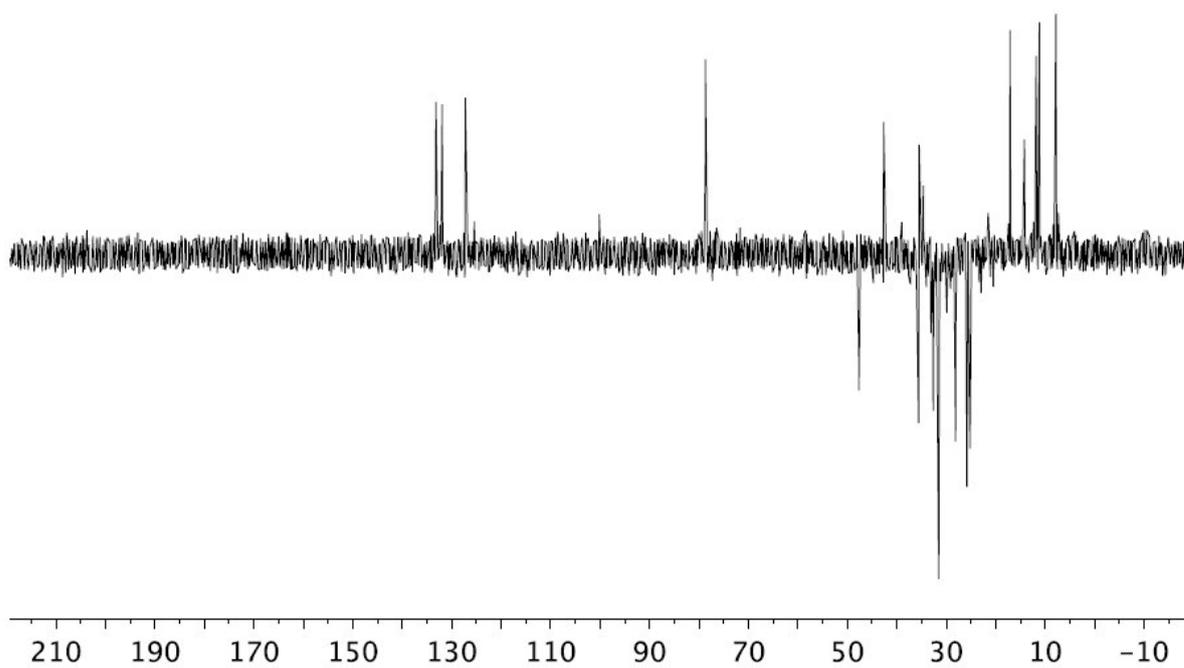
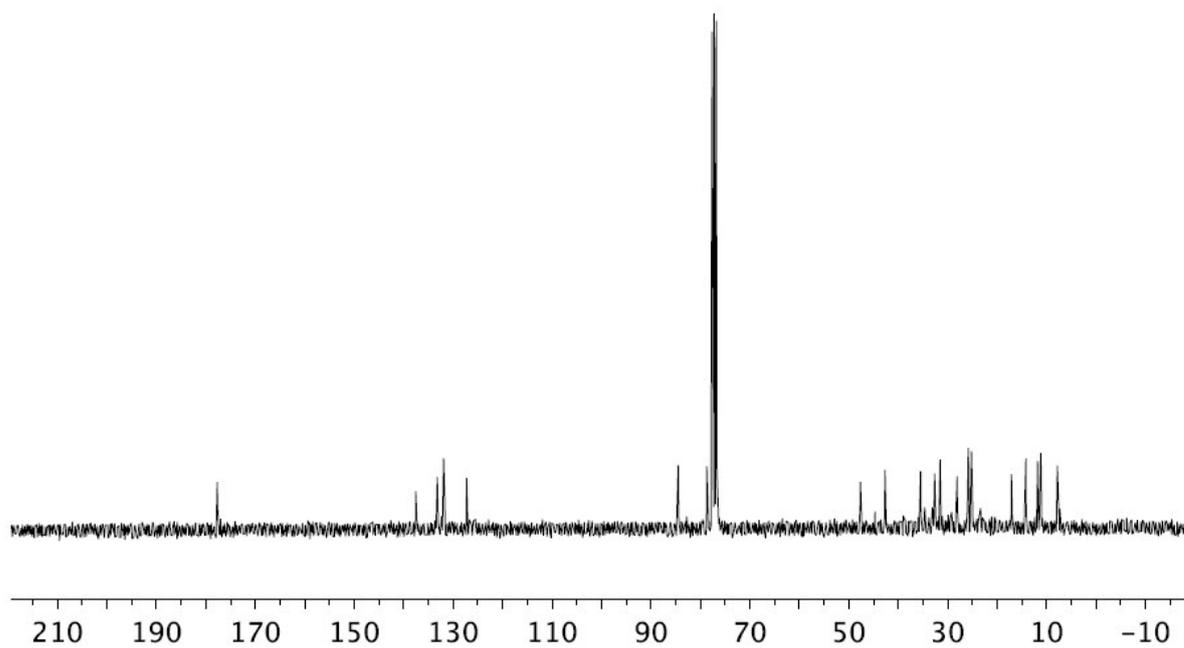
Espectro NOESY ^1H , ^1H de 7,8 – dihidroplakortídeo E (1) em CDCl_3 .



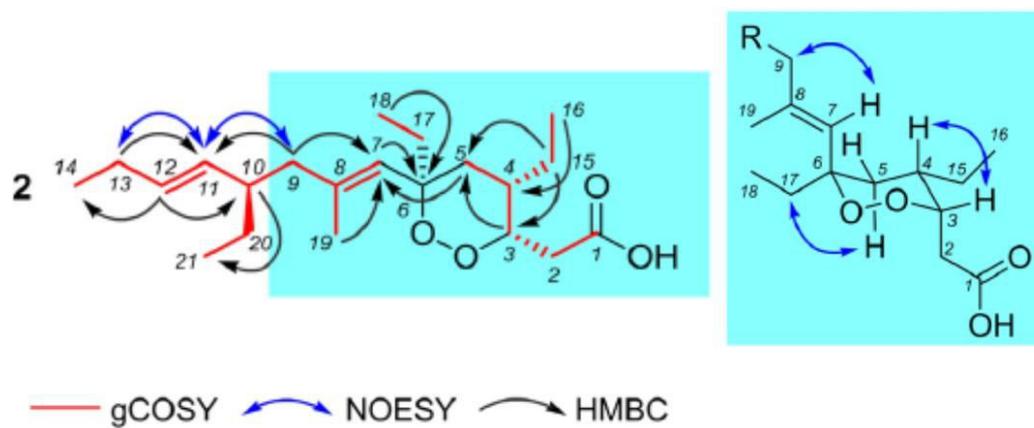
Espectro RMN ^1H (300 Mhz) do composto **2** em CDCl_3



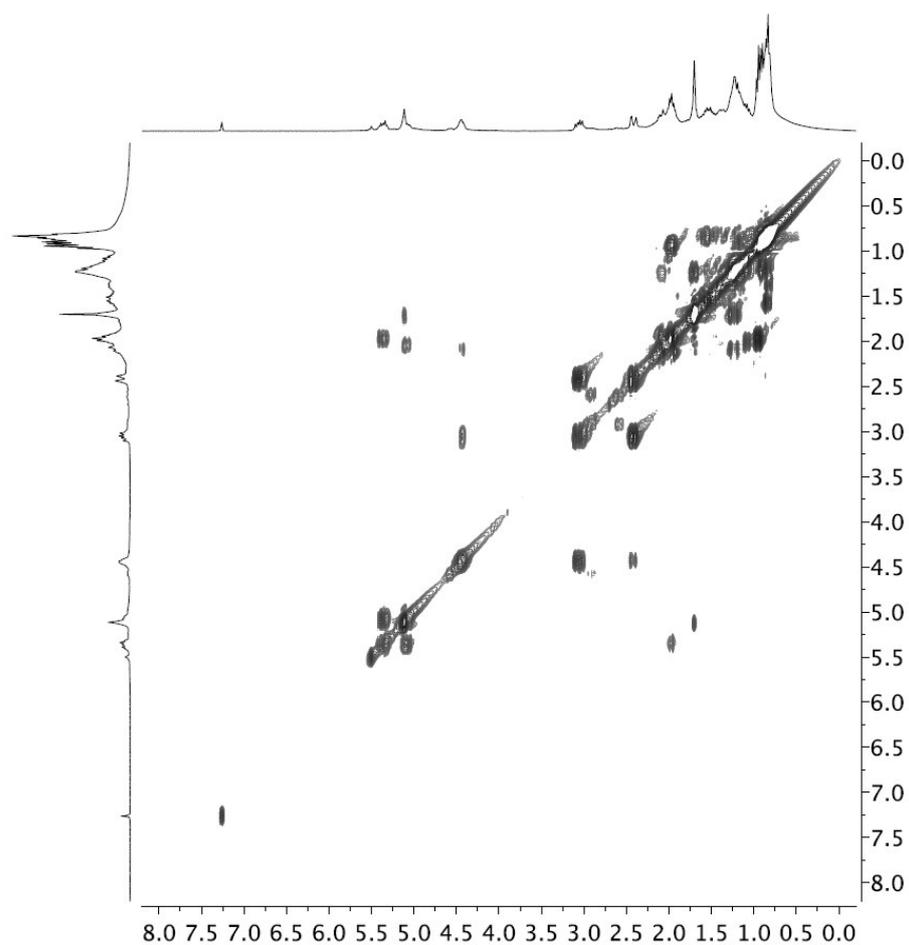
Espectro RMN ^{13}C (75 Mhz) do composto **2** em CDCl_3



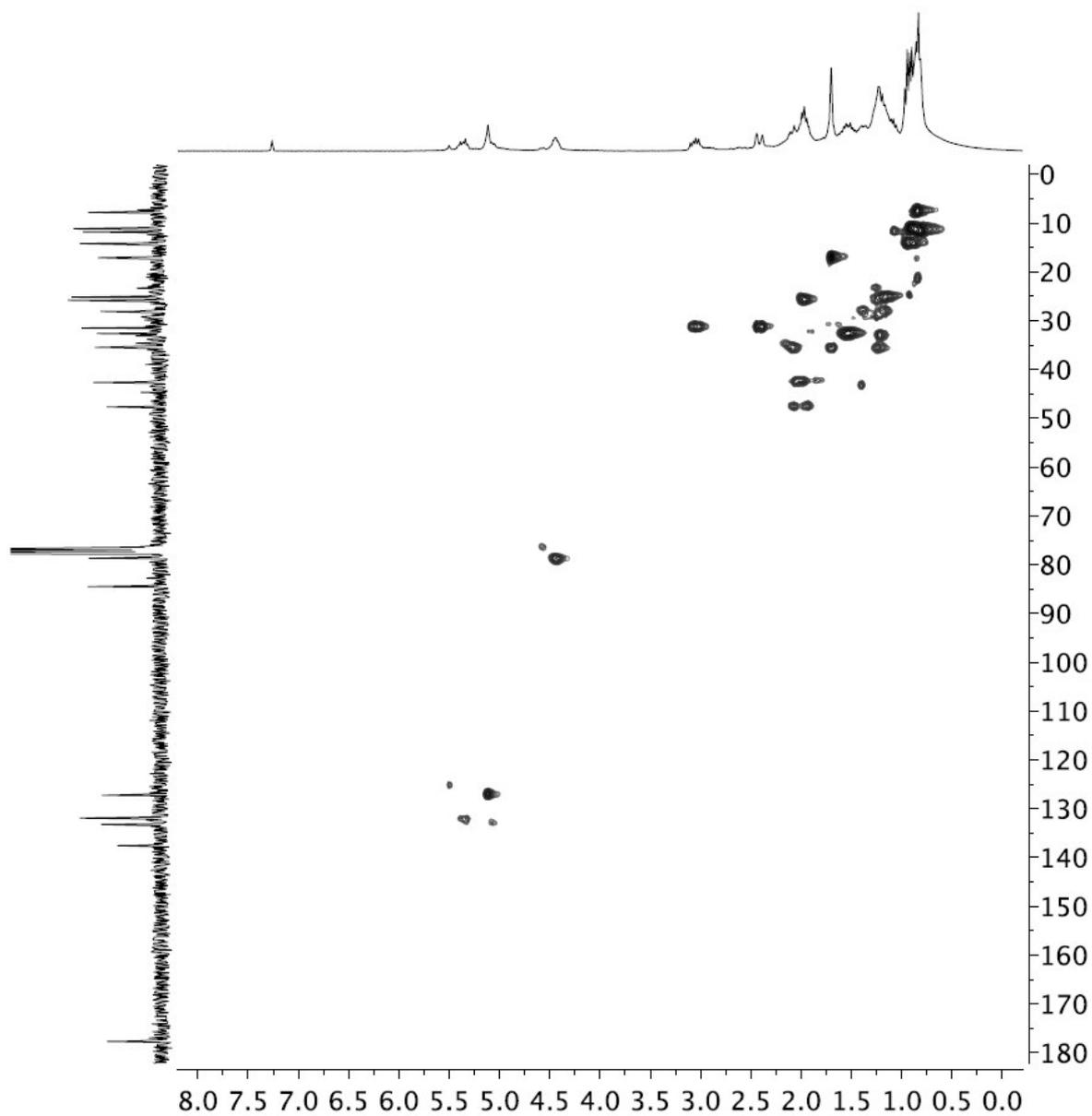
Correlações observados nos espectros gCOSY, HMBC e NOESY para o composto **2**.



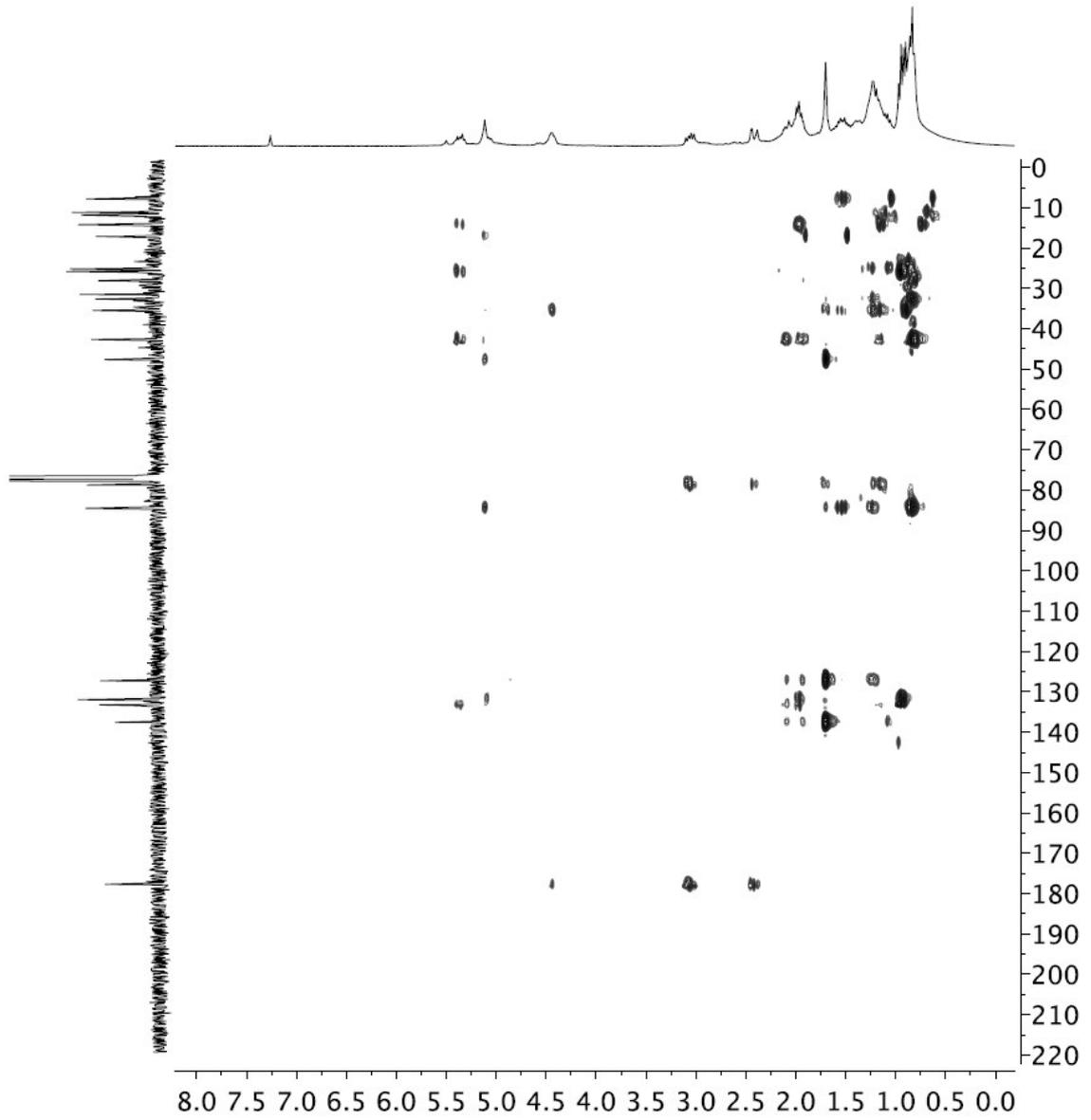
Espectro ^1H , ^1H gCOSY (75 Mhz) do composto **2** em CDCl_3



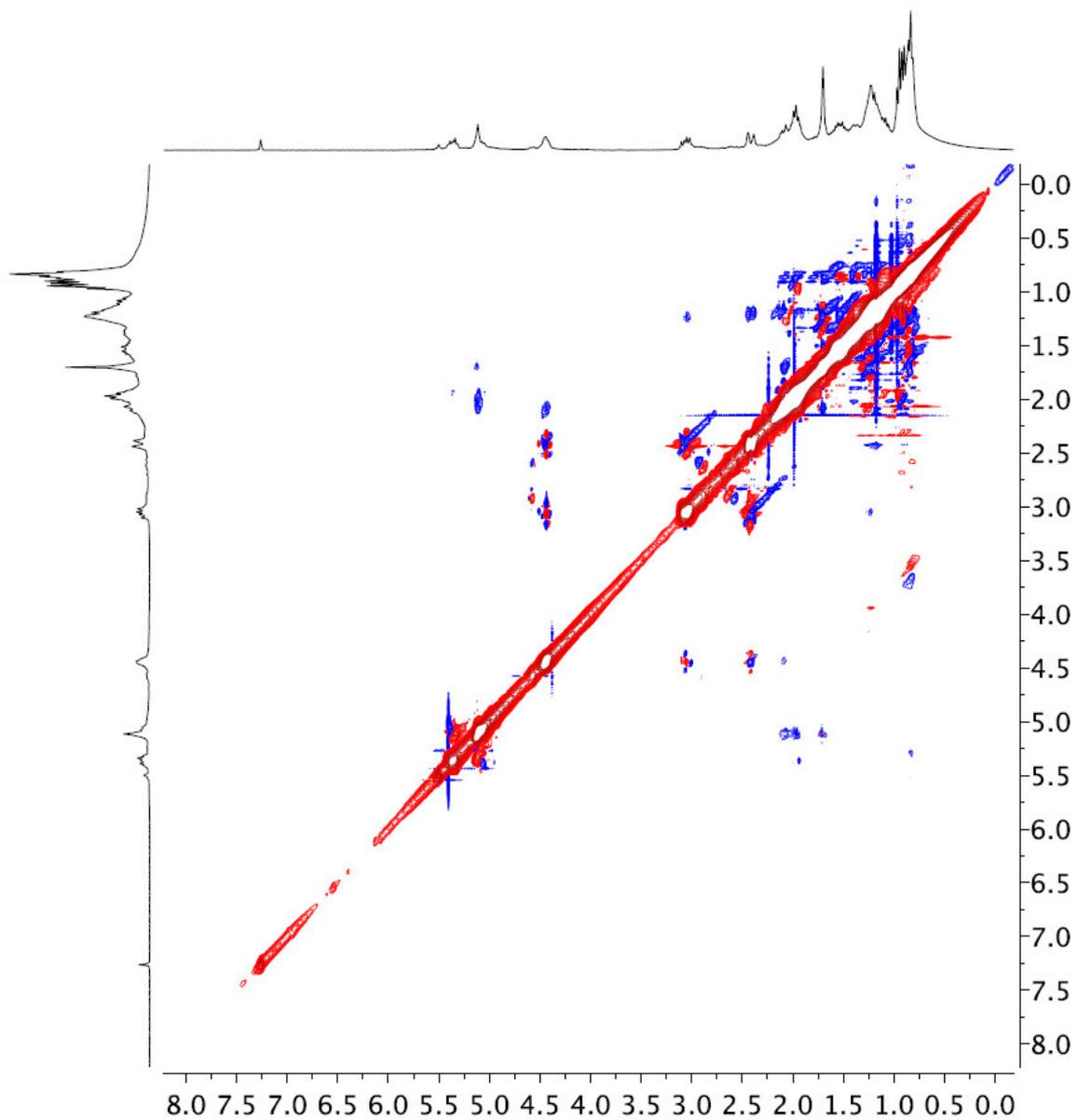
Espectro de HSQC ^1H , ^{13}C , do composto **2** em CDCl_3 .



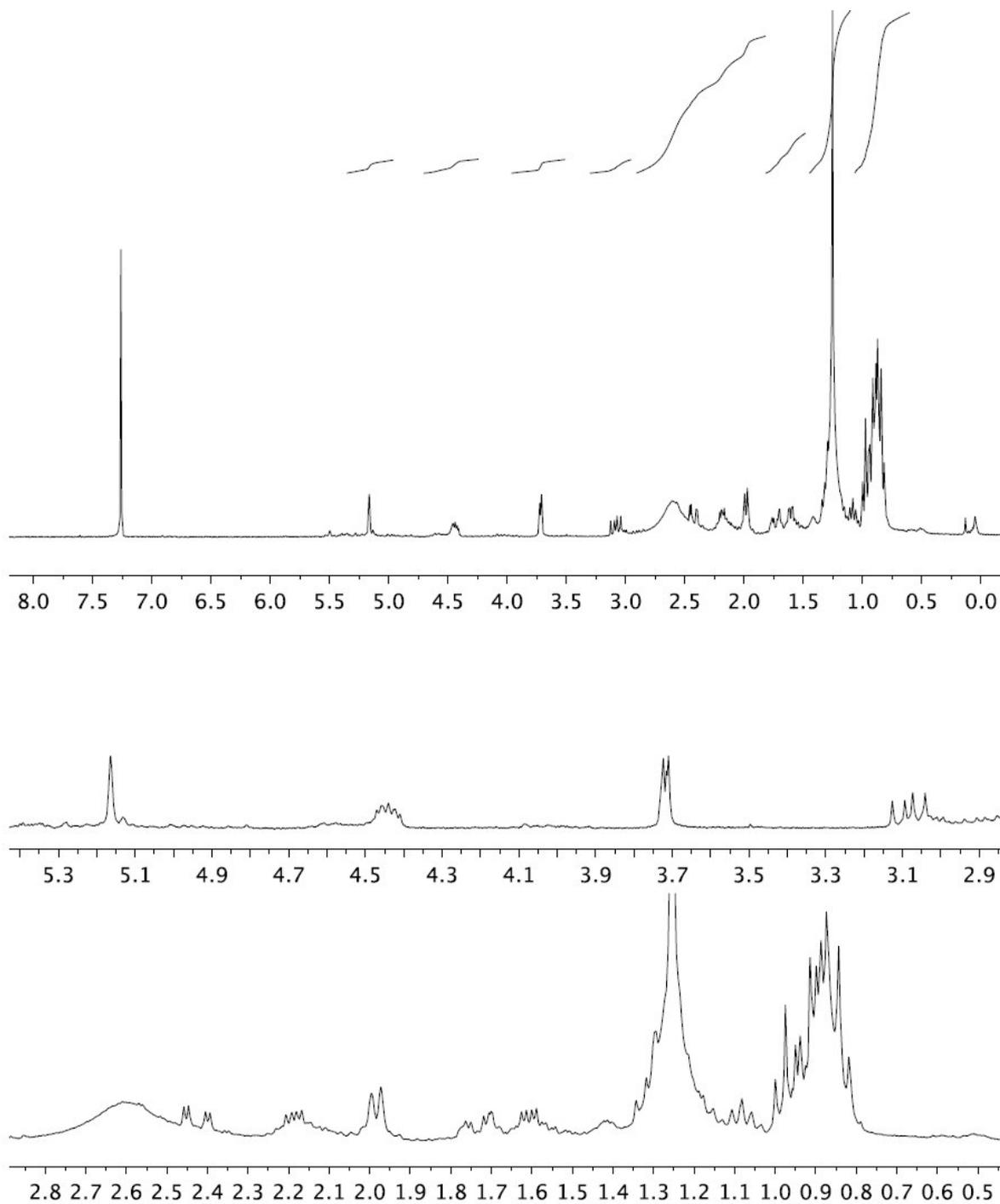
Espectro de HBMC ^1H , ^{13}C , do composto **2** em CDCl_3 .



Espectro de NOESY ^1H , ^1H , do composto **2** em CDCl_3 .



Espectro de RMN ^1H (300 Mhz) do composto **10** em CDCl_3 .



Espectro de RMN ^{13}C (75 Mhz) do composto **10** em CDCl_3 .

