MARCEL SHINITI URABAYASHI

**Prospecção de Moléculas Bioativas em Esponjas
Marinhas da Espécie *Amphimedon viridis*:
Estudos Celulares e Moleculares**

Tese apresentada ao Instituto de
Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Doutor
em Ciências (Biologia Celular e
Tecidual).

São Paulo
2015

MARCEL SHINITI URABAYASHI

**Prospecção de Moléculas Bioativas em Esponjas
Marinhas da Espécie *Amphimedon viridis*:
Estudos Celulares e Moleculares**

Tese apresentada ao Instituto de
Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Doutor
em Ciências.

Área de Concentração: Biologia
Celular e Tecidual

Orientador: Profa. Dra. Glaucia
Maria Machado Santelli

Versão Original

São Paulo
2015

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Urabayashi, Marcel Shiniti.

Prospecção de moléculas bioativas em esponjas marinhas da espécie *Amphimedon viridis*: estudos celulares e moleculares / Marcel Shiniti Urabayashi. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Profa. Dra. Gláucia Maria Machado Santelli.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento. Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual. Linha de pesquisa: Estudo da biologia celular e molecular de esponjas marinhas.

Versão do título para o inglês: Prospection of bioactive molecules in *Amphimedon viridis* sea sponges species: cell and molecular studies.

1. *Amphimedon viridis* 2. Esponja marinha 3. Moléculas bioativas 4. RNA 5. Citotoxicidade 6. Transcriptoma I. Santelli, Profa. Dra. Gláucia Maria Machado II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual III. Título.

ICB/SBIB014/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Marcel Shiniti Urabayashi.

Título da Tese: Prospecção de moléculas bioativas em esponjas marinhas da espécie *Amphimedon viridis*: estudos celulares e moleculares.

Orientador(a): Profa. Dra. Gláucia Maria Machado Santelli.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB Nº **307/09**, referente ao projeto intitulado: “*Identificação e caracterização de moléculas bioativas em esponjas marinhas: estudos moleculares e celulares*” sob a responsabilidade de **Marcel Shiniti Urabayashi**, foi analisado na presente data pela CEEA - COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL e pela CEPSh - COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 15 de maio de 2009.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEEA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A. ZANOTTO
Vice-Coordenador da CEPsh - ICB/USP

DEDICATÓRIA

Aos meus pais e meu irmão, por todo
apoio ao longo da vida.

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra. Gláucia Maria Machado Santelli, por mais de uma década de orientação e conselhos que sempre me encorajaram a superar os mais desafiadores obstáculos e tornaram melhores os dias de trabalhos.

À Dra. Paula Rezende Teixeira, pela ajuda, amizade e conselhos ao longo de tantos anos.

Ao Prof. Dr. Márcio Reis Custódio, do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da USP, por todo auxílio desde a coleta e identificação de esponjas até os conselhos e credibilidade para a realização do trabalho.

Ao Prof. Dr. Pedro Ismael Silva Jr., do Centro de Toxinologia Aplicada do Instituto Butantan, por toda colaboração e auxílio no estudo dos compostos.

À Prof. Dra. Luciana Retz de Carvalho, da Seção de Ficologia do Instituto de Botânica de São Paulo, por toda colaboração e auxílio no isolamento dos compostos.

À Prof. Dra. Marisa Rangel, por toda amizade e conselhos por tantos anos.

Ao Centro de Biologia Marinha da Universidade de São Paulo (CEBIMar/USP) por fornecer toda infraestrutura e equipamento necessário para realização de coletas do material biológico. Aos funcionários do CEBIMar e em especial aos técnicos Eduardo, Joseilto e Joseph (*in memoriam*) por todo auxílio.

Ao Roberto Cabado Modia Jr., pelo auxílio na aquisição de imagens e ilustrações gráficas.

Aos mais antigos colegas Beatriz Cortez, Evandro e Paula por todos os bons momentos vividos no laboratório. Aos atuais e ex-membros, do Laboratório de

Biologia Celular e Molecular (BioCeM) do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, por fazerem do ambiente de trabalho muito mais agradável a cada dia.

Aos meus pais e meu irmão por todo amor e incentivo.

A Heydi por todo amor, apoio e companheirismo.

À FAPESP pelo suporte financeiro.

EPÍGRAFE

“O que as vitórias têm de mau é que não são definitivas. O que as derrotas têm de bom é que também não são definitivas.”

José Saramago

RESUMO

URABAYASHI, M. S. **Prospecção de moléculas bioativas em esponjas marinhas da espécie *Amphimedon viridis*: estudos celulares e moleculares**. 2015. 68 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Organismos multicelulares e sésseis são algumas características do filo Porifera. Eles têm importância ecológica e evolutiva; eles filtram a água do mar e as espécies de esponjas marinhas estão entre os animais mais primitivos do grupo Metazoa. Esponjas marinhas também são importante fonte de novas moléculas bioativas, embora existam vários compostos descritos a partir do filo Porifera. Este estudo teve como objetivo a busca de novos compostos de *Amphimedon viridis* (Demospongiae) através de métodos envolvendo biologia celular e estudos moleculares. A análise química do extrato bruto da esponja é um método clássico de descoberta de novas drogas. Metabólitos secundários e peptídeos são geralmente os resultados neste tipo de pesquisa, utilizando diferentes e consecutivos protocolos de purificação. Neste estudo de uma amostra de extrato aquoso esponja separada numa coluna Sephadex®-G25 foi purificado por HPLC, numa tentativa de isolar uma única molécula. O ensaio de biologia molecular é o lado oposto da análise química. Com uma base de dados de RNA e a análise *in silico* espera-se que o RNAm pode ser relacionado com a molécula precursora do composto bioativo ou mesmo o seu gene. A dissociação de células a partir da matriz da esponja é um método importante para a extração de RNA otimizado em quantidade e qualidade. O RNA total foi sequenciado em um aparelho *next generation* e o sequenciamento do transcriptoma foi resolvido por um conjunto de bioinformática utilizando o método *De novo* sobre os dados brutos. Frações extrato bruto do organismo e dados de RNAm a partir de células isoladas da esponja podem ser comparados por uma abordagem de comparação dos dados. Ensaio de MTS foram utilizados para analisar a bioatividade e microscopia confocal foi a principal ferramenta para examinar os danos em células tumorais (T47D). As análises *in silico* do RNA mensageiro podem ser uma alternativa para pesquisar metabolitos das esponjas.

Palavras-chave: *Amphimedon viridis*. Esponja marinha. Moléculas bioativas. RNA. Citotoxicidade. Transcriptoma.

ABSTRACT

URABAYASHI, M. S. **Prospection of bioactive molecules in *Amphimedon viridis* sea sponges species: cell and molecular studies.** 2015. 68 p. Philosophy Doctor Thesis (Cell and Tissue Biology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Multicellular and sessile organisms are some features of the phylum Porifera. They have ecological and evolutionary importance; they filter seawater and the species of sea sponges are among the most primitive animals of Metazoa group. Sea sponges are also important source for new bioactive molecules although there are several number of compounds reported from the phylum Porifera. This study aimed the search of new compounds from *Amphimedon viridis* (Demospongiae) through cell biology and molecular methods. The chemical analysis of sponge crude extract is a classic method in drug discovery. Secondary metabolites and peptides are usually the results in this type of research using different and consecutives purification protocols. In this study a sample of sponge aqueous extract separated in a sephadex-G25 column was purified by HPLC in an attempt to isolate a single molecule. The molecular biology assay is the opposite way of the chemical analysis. With a RNA databank and *in silico* analysis is expected that the mRNA may be related with the precursor molecule of the bioactive compound or even its gene. The dissociation of cells from the sponge matrix was an important method to the optimized RNA extraction in quantity and quality. The total RNA was sequenced in a next generation sequencing and the transcriptome was solved by bioinformatics using a *De novo* assembly on the raw data. Crude extract fractions of the organism and mRNA data from sponge-isolated cells were obtained to a next step cross-data approach. MTS assays were used to analyze the bioactivity and confocal microscopy was the main tool to scan the damage in tumor cells (T47D). The mRNA *in silico* study may be another alternative to search metabolites from sponges.

Keywords: *Amphimedon viridis*. Sea sponge. Bioactive molecules. RNA. Cytotoxicity. Transcriptome.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Fluxo de água em uma esponja marinha	16
Figura 2 – Etapas da cromatografia em Sephadex G25 do extrato de <i>Amphimedon viridis</i> aquoso (AVA I-22)	25
Figura 3 – Protocolo ilustrado de dissociação celular de <i>Amphimedon viridis</i> para extração de RNA	29
Figura 4 – Procedimentos usados para sequenciamento e análise das sequencias a partir do RNA total	31
Figura 5 – Características das linhagens RPE 1 e T47D	34
Figura 6 – Curva dose resposta da porcentagem de células viáveis das linhagens RPE e T47D pelas diferentes concentrações de AVA I-22	35
Figura 7 – Fotomicrografias obtidas por microscopia confocal de varredura a laser de células RPE1	37
Figura 8 – Fotomicrografias obtidas por microscopia confocal de varredura a laser de células T47D	38
Figura 9 – Projeção ortogonal de células T47D tratadas com AVA I-22	39
Figura 10 – Gráfico correspondente ao teste de hemólise da fração AVA I-22	41
Figura 11 – Placas dos testes antimicrobianos	42
Figura 12 – Cromatograma de HPLC	44
Figura 13 – Gel de prata da fração AVA I-22	45
Figura 14 – Cromatogramas da filtração em leituras de 214 nm	47
Figura 15 – Células de <i>Amphimedon viridis</i> em cultura	49
Figura 16 – Análise por BLAST das sequencias de cDNA gerado a partir do RNA mensageiro. Sequencias referentes as células extraídas por centrifugação a 106 G	50
Figura 17 – Análise por BLAST das sequencias de cDNA gerado a partir do RNA mensageiro. Sequencias referentes ao sobrenadante centrifugado a 1699 G	51
Figura 18 – Gráfico da distribuição de agrupamentos de genes classificados por função	56
Figura 19 – Gráfico da distribuição de agrupamentos de genes classificados por função	57

Figura 20 – Classificação das sequências obtidas das células de acordo com o Gene Ontology_____58

Figura 21 - Classificação das sequências obtidas do sobrenadante de acordo com o Gene Ontology_____59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Compostos marinhos extraídos de esponjas marinhas de 2001 a 2010__21

Tabela 2 – Porcentagens de células viáveis e frações do extrato bruto_____33

Tabela 3 – Sequências analisadas por BLAST associadas com atividade citotóxica55

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
3 OBJETIVO	23
4 MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1 Espécie de esponja	24
4.2 Extrato Bruto	24
4.2.1 <i>Teste de Proliferação celular</i>	26
4.2.2 <i>Teste de ação hemolítica</i>	26
4.2.3 <i>Teste antimicrobianos</i>	27
4.2.4 <i>Imunofluorescência</i>	27
4.2.5 <i>Análise cromatográfica do extrato bruto</i>	28
4.3 Preparação e análise da biblioteca de cDNA	28
4.3.1 <i>Extração de RNA</i>	28
4.3.2 <i>Sequenciamento</i>	30
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5.1 Extrato bruto	32
5.1.1 <i>Atividade biológica</i>	32
5.1.2 <i>Composição da fração</i>	43
5.2 Transcriptoma	48
6 CONCLUSÃO	60
REFERÊNCIAS	61
ANEXOS	67

1 INTRODUÇÃO

Esponjas estão entre os mais primitivos animais multicelulares (MÜLLER, 1998) e cuja classificação taxonômica baseada em estudos moleculares e celulares recentes tem consolidado o filo Porifera como o grupo mais basal dos organismos pertencentes ao grupo Metazoa (MÜLLER; MÜLLER, 2007; SRIVASTAVA et al., 2010). Com cerca de 8 mil espécies descritas, todos os organismos pertencentes ao filo Porifera são aquáticos, sésseis, e na sua maioria filtradores, além de espécies carnívoras de grande profundidade tendo sido descritas aproximadamente 90 esponjas de hábitos carnívoros até o final do século 20 (VACELET, 2007).

A estrutura de organização do corpo dos animais do filo Porifera é simples com poucos tipos celulares descritos e com esqueleto de espículas (figura 1) que podem ter composição inorgânica, de sílica ou calcário, e orgânica, de colágeno. A forma e tamanho destas estruturas podem variar. As espículas podem conferir ao organismo, além da função primordial de sustentação, uma defesa física, ou mecânica, contra epibiontes e predadores. Outro mecanismo de defesa utilizado por esponjas é a defesa química que consiste na síntese de moléculas bioativas, enfatizando (1) aquelas que têm papel protetor contra predadores, sendo sintetizadas por organismos sésseis (ou seus simbiontes) como as esponjas marinhas e também (2) as que representam proteção contra microrganismos patogênicos ou naturalmente presentes no ambiente. Os mecanismos de defesa química desenvolvidos pelos seres vivos de diferentes espécies constituem rica fonte de moléculas bioativas que ainda tem muito a ser explorada. De todos os organismos, os animais marinhos constituem a principal fonte de moléculas citotóxicas (MUNRO et al., 1999).

Figura 1 – Fluxo de água em uma esponja marinha.

Representação esquemática da estrutura de uma esponja, tipos celulares, estruturas principais e o fluxo de água no organismo. Modificado de:

<http://www.anselm.edu/homepage/jpitocch/genbi101/diversity4invertebrates1.html>

2 REVISÃO DA LITERATURA

O primeiro nucleosídeo biologicamente ativo isolado da esponja *Tectitethya crypta* (de Laubenfels, 1949) por Bergmann e Feeney (1951), sendo atualmente utilizado no tratamento de leucemias (OLIVER et al., 1994) fez dos organismos marinhos um alvo importante na busca por novas substâncias, culminando na descoberta de numerosos compostos com interessantes atividades biológicas. Os nucleosídeos Ara-U (espongouridina) e Ara-T (espogotimidina), isolados de *T. crypta*, são precursores de outras moléculas de uso farmacológico, como o AZT (azidotimidina). Dentre os filos de organismos marinhos testados na procura destes compostos, destaca-se o filo Porifera graças a diversidade estrutural de seus metabólitos com atividade citotóxica (FUSETANI; MATSUNAGA, 1993; OSINGA et al., 1998; ZHANG et al., 2003), antibióticas, antivirais e anti-inflamatórias. Três gêneros de esponjas (*Haliclona*, *Petrosia* e *Discodermia*) produzem poderosos agentes anticâncer, anti-inflamatórios, porém o cultivo dessas espécies não foi estudado ainda (BLUNT et al., 2004).

Dentre os primeiros peptídeos isolados de esponjas marinhas encontram-se as discoderminas A – H, isoladas da esponja *Discodermia* sp., citotóxicos contra as linhagens tumorais P388 (leucemia de murino) e A549 (pulmão humano), e que inibem a clivagem de ovos de ouriço com IC₅₀ de 0,2 a 20µg/mL. A citotoxicidade das discoderminas deve-se a produção de poros na membrana plasmática das células tratadas (SATO et al., 2000).

Outros compostos citotóxicos, os geodiamolídeos, foram primeiramente isolados da esponja caribenha *Geodia* sp. (CHAN; TINTO, 1987; TINTO et al., 1998) e posteriormente encontrados na esponja brasileira *Geodia corticostylifera* (RANGEL et al., 2006). Esses compostos, os geodiamolídeos A, B, H e I, mostraram-se seletivamente citotóxicos em linhagens de tumor de mama humana T47D e MCF-7 não tendo efeito em linhagens de células normais como BRL3A (células epiteliais de fígado de rato) e em culturas primárias de fibroblastos humanos. Os geodiamolídeos desestabilizam os filamentos de actina das células tratadas, mantendo os microtúbulos íntegros. Por meio de estudos sobre o efeito de geodiamolídeo em culturas 3D de

células tumorais de mama humana, mostramos que como consequência de sua ação sobre os microfilamentos, este peptídeo diminui a mobilidade celular, mantendo sua seletividade para células tumorais e dentre elas, seu efeito foi mais efetivo sobre a linhagem mais agressiva (FREITAS et al., 2008). Outros compostos também conhecidos por sua capacidade de desestabilizar filamentos de actina, como os jaspamídeos isolados de esponjas do gênero *Jaspis* sp., inibem o crescimento de tumores de mama, de próstata (CREWS et al., 1986) e de melanoma (MENEZES, 2011).

Dentre as moléculas de atividade antitumoral destaca-se o composto manoalideo de uma esponja do Oceano Pacífico gerou mais de 300 análogos químicos, dentre os quais um número significativo chegou aos testes pré-clínicos. Além disso, um alcalóide de aminoacridina, dercitina, foi isolado da esponja de grande profundidade *Dercitus* spp. que possui atividade citotóxica em concentrações baixas na faixa de nanomolares em estudos com animais, prolongando a vida de camundongos portadores do tumor ascístico P388, sendo ativo também contra células de melanoma B15 e células pequenas de carcinoma de pulmão de Lewis. A halicondrina-B, um poliéter macrolídeo da esponja japonesa *Theonella* spp., gerou muito interesse como um potencial agente anti-câncer. As theopederinas são estruturalmente relacionadas ao mycalamideo-A, da esponja *Mycale* spp. coletada na Nova Zelândia, e o onnamideo-A, da esponja *Theonella* spp. coletada em Okinawa, que mostraram citotoxicidade *in vitro* e atividade antitumoral *in vivo* em muitos sistemas de leucemia e modelos de tumores sólidos (CHAKRABORTY et al., 2009).

Blunt et al. (2004, 2005, 2014, 2006, 2007, 2008, 2009, 2010, 2011, 2012, 2013) apresentam ampla revisão dos produtos marinhos bioativos, abordando dados de trabalhos publicados até recentemente. É interessante notar que a íntima associação das esponjas com simbiontes pode ser responsável por estes compostos. Outro dado interessante foi mostrado por Mohamed et al. (2008) demonstrando que a aquicultura de esponjas altera a composição de espécies simbiontes o que levaria a produção de compostos bioativos diferentes daqueles encontrados na natureza.

Na defesa contra microrganismos, os peptídeos antimicrobianos (AMPs), sintetizados naturalmente ou quando o organismo é desafiado por uma infecção, foram

descritos em numerosas espécies de pro e eucariotos e são consideradas moléculas efetoras do sistema imune inato (BULET; STÖCKLIN, 2005). De modo geral os peptídeos antimicrobianos são hidrofóbicos, termoestáveis, com massa em torno de 10kDa e atuam na membrana plasmática, perfurando ou rompendo-a (KOCZULLA; BALS, 2003; MYGIND et al., 2005). Desde a descrição inicial de 2 peptídeos bioativos com ação antimicrobiana em *Hyalophora cecropia* – cecropins A e B (STEINER et al., 1981), já mais de 200 outros peptídeos foram descritos. É importante observar que algumas destas moléculas, como as cecropinas, são específicas para bactérias enquanto que outras, como a melitina (melittin) do veneno da abelha, atuam tanto sobre células bacterianas como nas eucarióticas. Cecropins, posteriormente também descritas em células de intestino de mamíferos (LEE et al., 1992), consiste de 34-39 aminoácidos.

O principal problema na terapia tanto de infecções por microrganismo como no câncer é o desenvolvimento de resistência, embora os mecanismos envolvidos em cada caso sejam diferentes. Nas infecções bacterianas a resistência ocorre usualmente em decorrência de modificações da parede externa da bactéria, mecanismo que normalmente não interfere com a ação dos AMPs. Outro aspecto importante é a especificidade que é possível conseguir através da síntese de peptídeos quiméricos, que apresentam grande eficiência em matar agentes microbianos de modo seletivo, redirecionando o AMP para microrganismo de interesse e não aqueles contra os quais foi produzido. Uma vez que são moléculas pequenas e muitas delas passíveis de síntese *in vitro*, podem ser também modificadas para melhorar sua eficiência e estabilidade no soro. Em alguns organismos, principalmente em bactérias intestinais, as AMPs podem funcionar como feromônios, controlando o tamanho de populações bacterianas, de modo que esta se comporta a semelhança de um organismo multicelular.

As drogas usadas nas quimioterapias convencionais buscam atingir um destes aspectos e o principal problema que compromete seu sucesso é o desenvolvimento de resistência pela célula tumoral. A busca por novos compostos com atividades antitumorais tem como objetivo a detecção de substâncias que atuem principalmente nos seguintes alvos: reversão da resistência a múltiplas drogas, inibidores de

topoisomerasas, intercaladores de DNA, inibidores da síntese de nucleotídeos, agonistas ou antagonistas da transdução de sinais, antagonistas de proteínas tirosina-quinase e que atuem sobre os microtúbulos.

A identificação de novos compostos bioativos com atividade antitumoral é relevante para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas contra infecções e câncer. Nos últimos anos, o nosso grupo tem trabalhado na identificação de compostos bioativos derivados de organismos marinhos. Nesses estudos foram analisadas mais de cem espécies, tendo sido encontrados compostos positivos em pelo menos 10% delas (FREITAS et al., 2008; PRADO et al., 2004; RANGEL et al., 2006). Destes os mais potentes foram purificados e suas estruturas e mecanismos de ação estão em fase final de estudo. Alguns como os geodiamolídeos mostram seletividade por células tumorais além de atividade antimicrobiana.

Além disso, estudos como o de Custódio et al. (2004) demonstram que é possível ainda manter culturas de células de esponjas *in vitro*. Tal sistema de cultura permite isolar fungos, bactérias e protozoários associados às esponjas em sistemas abertos.

Abraham et al. (2010) apresentam dados de um composto extraído da esponja vermelha *Callyspongia siphonella* capaz de reverter a resistência a drogas de células tumorais. Nos estudos de tumores destacam-se algumas drogas extraídas de esponjas marinhas que possuem um grande potencial farmacológico (tabela 1).

Tabela 1 – Compostos marinhos extraídos de esponjas marinhas de 2001 a 2010 (MEHBUB et al., 2014).

Orders of Sponges	Anti-Alzheimer's	Antibacterial	Antituberculosis	Anticancer/Cytotoxicity	Antifungal	Anti-inflammatory	Antimalarial	Anti-HIV	Antiviral	Miscellaneous	Total
Agelasida	0	17	0	11	6	0	6	0	0	14	54
Astrophorida	0	8	6	97	7	0	1	5	3	22	149
Axinellida	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	8
Chondrosida	0	0	0	3	3	0	0	0	0	0	6
Choristida	0	0	0	12	0	0	0	0	0	12	24
Clathrinida	0	4	3	3	2	0	0	0	0	0	12
Dendroceratida	0	4	0	14	3	3	0	0	0	14	38
Dictyoceratida	0	38	3	182	11	2	1	5	0	90	332
Hadromerida	0	2	3	45	1	0	0	5	0	18	74
Halichondrida	1	18	4	99	16	1	2	1	0	31	173
Haplosclerida	8	15	2	100	20	0	7	4	0	73	229
Homosclerophorida	0	2	3	55	10	0	9	1	0	34	114
Leucosolenida	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	3
Lithistida	0	5	2	38	9	2	0	16	0	16	88
Lyssacinosida	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
Ocilosclerida	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Poecilosclerida	0	17	5	143	21	1	1	4	1	34	227
Spirophorida	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	4
Unknown	0	0	0	2	0	0	0	0	0	7	9
Verongida	0	14	0	17	5	0	0	0	0	34	70
Total	9	145	31	828	114	9	27	41	4	407	1615

No ano de 2008 foram descritos 278 metabólitos de esponjas marinhas, sendo que os metabólitos secundários foram localizados nos tecidos das esponjas pela técnica de MALDI-TOF. Dentre esses compostos, alguns foram extraídos de esponjas coletadas no Brasil como a *Plakortis angulospiculatus*, de onde foi extraído a plakortenona, e a *Aplysina fulva*, de onde foi extraído a aplysinafulvina (BLUNT et al., 2010). Esponjas do gênero *Xestospongia* possuem diversas moléculas bioativas com diferentes características farmacológicas, porém alguns desses compostos devem estar associados aos organismos simbiotes da esponja (ZHOU et al., 2010). O principal método de extração e identificação dos compostos extraídos de esponjas marinhas, mesmo em trabalhos recentes, é por cromatografia líquida dos extratos brutos de esponjas (ABRAHAM et al., 2010; RANGEL et al., 2006; SAKURADA et al., 2010; SEPCIC et al., 2010; WILLIAMS et al., 2009).

Em oposição aos métodos mais tradicionais de isolamento e descoberta de novos compostos, artigos mostraram ser possível a utilização de um método prático e de baixo custo para o isolamento e identificação de RNA mensageiros. Estes RNAs codificam elementos efetores ou reguladores de defesa inata, utilizando hibridação subtrativa supressora e sucessivas reações de PCR para gerar bibliotecas de cDNA expressos diferencialmente (ALTINCICEK; VILCINSKAS, 2007; ALTINCICEK et al., 2008).

3 OBJETIVO

O presente projeto almejou a identificação de compostos bioativos em esponjas marinhas da espécie *Amphimedon viridis*. Nossa metodologia abordou estudos dos compostos bioativos extraídos a partir de extratos brutos e compostos purificados destes, bem com sequencias obtidas do transcriptoma da mesma espécie.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Espécie de esponja

As amostras da espécie *Amphimedon viridis* (anexo 1) foram coletadas por mergulho livre em momento de maré baixa pela manhã, juntamente com o substrato, na Praia Preta do Norte em São Sebastião, estado de São Paulo. Vivas, as esponjas foram transportadas em recipientes plásticos contendo água do mar ao laboratório para realização dos experimentos.

4.2 Extrato Bruto

Para obtenção do extrato bruto os animais, foram homogeneizados em metanol (1 kg de esponjas : 3 L de metanol) e depois filtrados em papel filtro comum. O filtrado foi seco em evaporador rotativo a vácuo a temperatura de 45 °C, obtendo assim o extrato bruto aquoso concentrado.

O extrato bruto aquoso de *Amphimedon viridis* foi fracionado em separação em coluna Sephadex G-25 (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, Estados Unidos) conforme a figura 2 e as frações testadas para avaliar a atividade biológica.

Figura 2 – Etapas da cromatografia em Sephadex G25 do extrato de *Amphimedon viridis* aquoso (AVA).

4.2.1 Teste de proliferação celular

Para os ensaios das frações dos extratos de esponjas marinhas foram utilizadas linhagens de epitélio pigmentar de retina humana (RPE1) e de carcinoma ductal invasivo de mama humana (T47D), ambas cultivadas em meio DMEM/HAM F12 suplementado com 10% v/v de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas, SP, Brasil).

O teste foi realizado com o CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega®, Madison, WI, Estados Unidos) em placas de 96 poços. Em cada poço foram plaqueadas 2×10^4 células em 100 µL de meio de cultura.

4.2.2 Teste de ação hemolítica

O protocolo de experimento de ação hemolítica foi realizado segundo Rangel et al. (1997). O sangue foi obtido de camundongos Swiss, machos (entre 25-30 g de massa total) (Biotério Central do Instituto Butantan, protocolo 459/08), colocado em um béquer com um volume aproximadamente 30 vezes maior de solução fisiológica Krebs-Henseleit (NaCl 113 mM; KH_2PO_4 1,2 mM; KCl 4 mM; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,2 mM; CaCl_2 2,5 mM; NaHCO_3 25 mM; $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ 11,1 mM) e mantido sob agitação constante por 15 minutos, para evitar coagulação do sangue. A mistura foi centrifugada 3 vezes a 3000 rpm / 5 min para lavar os eritrócitos de componentes plasmáticos, após o qual foi preparada uma suspensão de eritrócitos (SE) a 4% (V/V) em solução fisiológica de Krebs-Henseleit.

A amostra foi diluída em solução fisiológica de Krebs-Henseleit, e posteriormente colocada em uma placa de ELISA com 96 poços, em seguida adicionado 50 µL de SE a 4%. Para controle negativo será utilizada solução fisiológica e o detergente Triton X-100 a 1% como controle positivo (hemólise total). Após uma hora de incubação à temperatura ambiente sob agitação constante, o material foi submetido a centrifugação a 3000 rpm / 5 min, o sobrenadante será transferido para nova placa de ELISA e a atividade hemolítica foi medida pela absorbância a 540 nm.

4.2.3 Testes Antimicrobianos

Este experimento foi realizado em colaboração com a Dra. Marcia Regina Franzolin, do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan.

A atividade antimicrobiana do extrato aquoso obtido em coluna Sephadex G-25 de *A. viridis* foi avaliada frente às bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* (ATCC, Manassas, VA, Estados Unidos), Gram-positivas *Staphylococcus aureus* e levedura *Candida albicans* cultivadas no Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan. Amostras bacterianas foram mantidas em freezer a -80°C em glicerol a 20% e semeadas em placas contendo meio de *Tryptic Soy Broth* (TSB/BioRad, Hercules, CA, Estados Unidos). Após incubação em estufa incubadora BOD – REVCO (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos), a 37°C por 16-18 horas, a pré-cultura líquida foi diluída em solução salina (NaCl) a 0,85% até atingir uma suspensão bacteriana equivalente a $1-2 \times 10^8$ UFC / mL (padrão 0,5 da escala de McFarland), sendo semeada em placas contendo ágar Muller-Hinton com auxílio de um “swab” estéril. Um disco de papel de filtro Whatmman nº 541 (Millipore, Billerica, MA, Estados Unidos) estéril contendo a solução teste filtrada em membrana de $0,22\ \mu\text{m}$ foi colocado sobre a superfície de cada placa. Após a incubação nas mesmas condições especificadas ao início do parágrafo, as placas foram examinadas quanto à presença ou ausência de halo de inibição do crescimento bacteriano.

4.2.4 Imunofluorescência

Com base no teste de viabilidade celular, as células RPE e T47D foram submetidas a tratamento por 48h e fixadas com formaldeído 3,7% para a análise morfológica do efeito do(s) composto(s). As células foram tratadas com RNase. O DNA foi corado com iodeto de propídio e a F-actina corada com faloidina-FITC.

4.2.5 Análise cromatográfica da fração de extrato bruto

A cromatografia líquida de alta performance (HPLC) foi o método para a realização da etapa seguinte com o objetivo de isolar os compostos presentes nas frações e testar novamente se a atividade citotóxica permanecera.

4.3 Preparação e análise das bibliotecas de cDNA

4.3.1 Extração de RNA

O RNA total das esponjas será extraído das células dissociadas segundo método descrito inicialmente por Custódio et al. (1998) modificado neste estudo após sucessivos testes de extração (figura 3). O RNA das células foi extraído utilizando-se o TRIzol® (Life Technologies, La Jolla, CA, Estados Unidos), seguindo o protocolo do fabricante.

Figura 3 – Protocolo ilustrado de dissociação celular de *Amphimedon viridis* para extração de RNA (modificado de CUSTODIO et al. (1998)).

Etapas para obtenção do RNA total a partir da dissociação das células da esponja *Amphimedon viridis*, isolando o material da matriz extracelular e das espículas.

Na tentativa de obter RNA apenas de simbiontes dos indivíduos coletados, ou de uma amostra mais enriquecida com simbiontes, foram feitas duas extrações de RNA, sendo que uma seguiu o protocolo descrito na figura e outra foi feita com o sobrenadante resultante da centrifugação (a 106 G), que foi centrifugado novamente a 1699 G na tentativa de coletar os microbiontes presentes na amostra para extração de RNA.

4.3.2 Sequenciamento

O sequenciamento das amostras de RNA total obtidas juntamente com as análises *in silico* das sequências obtidas (figura 4) passaram a ser a metodologia utilizada para elucidar o transcriptoma dos indivíduos de *Amphimedon viridis* e de possíveis simbiontes neste projeto. A partir do RNA total sequenciado é possível identificar as sequências associadas a moléculas de interesse neste estudo, sem que ocorra a perda de material para análise. Essa etapa foi realizada utilizando os serviços da empresa BGI (Hong Kong, China).

Figura 4 – Procedimentos usados para sequenciamento e análise das sequências a partir do RNA total.

Etapas realizadas na empresa BGI a partir do RNA total obtido das células de *Amphimedon viridis*.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Extrato bruto

5.1.1 Atividade biológica

A partir do extrato bruto das esponjas marinhas *Amphimedon viridis* foram realizadas etapas de cromatografia com o objetivo de isolar o composto bioativo, presente no material. As frações, de 3 mL cada, obtidas pela cromatografia em coluna Sephadex® G-25 foram liofilizadas e a massa de cada uma das alíquotas foram medidas. Das cem frações, conforme a quantidade de material visível presente nos frascos e com massa superior a taxa de imprecisão da balança, foram realizados ensaios com algumas dessas frações: AVA-I 22, AVA-I 34, AVA-I 51, AVA-I 61. Essas frações foram testadas em células T47D utilizando o teste de viabilidade celular por CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay em placas de 96 poços, para avaliar se alguma fração era potencialmente citotóxica (tabela 2). Com base nos resultados obtidos o trabalho prosseguiu com os estudos da fração AVA-I 22.

Outras frações também foram testadas mas apresentaram resultados negativos para citotoxicidade. As frações AVA I-34, AVA I-51 e AVA I-61 estimularam a proliferação das células tumorais T47D, ao contrário da fração AVA I-22, segundo os dados apresentados na tabela 2. Estas frações podem indicar presença de um composto com atividade proliferativa, semelhante ao observado no trabalho de Costa (2005), porém em extratos brutos de espécies de esponjas marinhas diferentes da *A. viridis*.

A curva de crescimento das duas linhagens celulares foi padronizada para a estimativa do tempo ideal de tratamento das células (figura 5). O teste de viabilidade da fração AVA-I 22 tanto com a linhagem normal RPE1 quanto com a linhagem tumoral T47D apresentou valores de IC₅₀ muito próximos e com efeitos mais expressivos na linhagem normal, sob uma concentração menor (figura 6). O resultado pode indicar uma maior sensibilidade da linhagem RPE1 ao composto presente na fração AVA-I 22. Outro aspecto da ação do extrato, é que cerca de 20% das células tumorais são resistentes mesmo em altas concentrações da fração, conforme a figura 7.

Tabela 2 – Porcentagens de células viáveis e frações do extrato bruto.

Fração\concentração	7,5 µg/mL	15 µg/mL	30 µg/mL	60 µg/mL	120 µg/mL
AVA-I 22	110,77%	44,52%	23,11%	20,89%	20,67%
AVA-I 34	108,29%	106,51%	92,17%	136,93%	143,83%
AVA-I 51	146,07%	126,79%	134,33%	121,74%	116,22%
AVA-I 61	167,52%	174,28%	169,83%	157,6%	142,44%

Valores de porcentagem de células viáveis em relação ao grupo controle (100%) em cada uma das concentrações de tratamento de cada fração.

Figura 5 – Características das linhagens RPE 1 e T47D.

A, B, C e D) Fotomicrografias obtidas por microscópio invertido de contraste de fase. A e B) Células RPE1. C e D) Células T47D. Gráfico de crescimento das linhagens RPE1 (em azul) e T47D (em vermelho) com plaqueamento inicial de 5×10^4 células/placa.

Figura 6 – Curva dose resposta da porcentagem de células viáveis das linhagens RPE e T47D pelas diferentes concentrações de AVA-I 22.

O IC_{50} para as duas linhagens é entre 31,25 $\mu\text{g/mL}$ 62,5 $\mu\text{g/mL}$. O plaqueamento inicial foi de 2×10^4 células/poço e as concentrações testadas foram de 3,906 $\mu\text{g/mL}$, 7,812 $\mu\text{g/mL}$, 15,625 $\mu\text{g/mL}$, 31,25 $\mu\text{g/mL}$, 62,25 $\mu\text{g/mL}$, 125 $\mu\text{g/mL}$, 250 $\mu\text{g/mL}$ e 500 $\mu\text{g/mL}$. As barras correspondem ao desvio padrão com $p < 0,05$.

Com base no teste de viabilidade celular, as células RPE e T47D foram submetidas a tratamento por 48h com a fração “AVA-I 22” (a concentração de 10 µg/mL, valor abaixo do IC₅₀) e fixadas com formaldeído 3,7% para a análise morfológica do efeito do(s) composto(s) (figuras 7, 8 e 9). As células foram fixadas em formaldeído 3,7% e tratadas com RNase. O DNA foi corado com iodeto de propídeo e a F-actina foi corada com faloidina-FITC.

Em ambas linhagens ocorre a desestabilização dos filamentos de actina após 48 horas de tratamento com a fração. Nas células RPE1 é possível observar uma concentração maior de actina filamentosa na região cortical das células, mesmo após a recuperação por 48 horas porém, menos intensa que nas células fixadas após o tratamento (figura 7). As células T47D tratadas formam-se agregossomos, que são inclusões proteicas formadas a partir de um estresse proteolítico. A figura 9 mostra a projeção ortogonal das células tratadas, com detalhe dos agregossomos. Nas células após a recuperação, não são mais observadas essas estruturas, conforme o registrado nas imagens da figura 8. As fibras de actina filamentosa não apresentam a mesma morfologia, do grupo controle, após a recuperação dando indícios de um dano permanente na linhagem tumoral. O efeito da fração AVA I-22 é semelhante ao observado nas células tratadas com jaspamídeo no trabalho de Menezes (2011).

Figura 7 – Fotomicrografias obtidas por microscopia confocal de varredura a laser de células RPE1.

A) Células RPE controle. B) submetidas a tratamento com o cromatografado AVA-I 22 (10 µg/mL) por 48 horas. C) Células recuperadas em meio de cultura sem a fração. Em verde a F-actina corada com faloidina-FITC e em vermelho o núcleo corado com iodeto de propídeo.

Figura 8 – Fotomicrografias obtidas por microscopia confocal de varredura a laser de células T47D.

A) Células T47D controle. B) Submetidas a tratamento com o cromatografado AVA-I 22 (10 µg/mL) por 48 horas. C) Células recuperadas em meio de cultura sem a fração. As setas em B apontam para os agregossomos formados após o tratamento das células. Em verde a F-actina corada com faloidina-FITC e em vermelho o núcleo corado com iodeto de propídeo.

Figura 9 – Projeção ortogonal de células T47D tratadas com AVA I-22.

Células T47D submetidas a tratamento com o cromatografado AVA-I 22 (10 $\mu\text{g/mL}$) por 48 horas. Acima a projeção ortogonal correspondente a secção formada pela linha verde. À direita a projeção ortogonal correspondente a secção formada pela linha vermelha. Em verde a F-actina corada com faloidina-FITC e em vermelho o núcleo corado com iodeto de propídeo.

A fração AVA-I 22 também apresentou atividade hemolítica (figura 10) com lise de metade dos eritrócitos no mesmo intervalo de concentrações que o IC₅₀. Após observar a ação citotóxica e hemolítica da fração, foram realizados experimentos na tentativa de desvendar que compostos estão presentes nesta fração, que promoviam os efeitos observados em células. A cromatografia líquida de alta performance (HPLC) foi o método utilizado com o objetivo de isolar os compostos presentes na fração AVA I-22 e testar novamente se ainda existia a atividade citotóxica.

Nos testes antimicrobianos com bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922), Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) e levedura (*Candida albicans*), houve a formação de um halo de inibição (figura 11). Porém, a concentração elevada da fração AVA I-22 no teste antimicrobiano, proporcional pequeno halo formado se comparado ao controle positivo, pode indicar que a molécula de atividade antimicrobiana está presente em baixa quantidade nessa fração.

Figura 10 – Gráfico correspondente ao teste de hemólise da fração AVA-I 22.

Concentrações testadas foram de 3,906 μg/mL, 7,812 μg/mL, 15,625 μg/mL, 31,25 μg/mL, 62,25 μg/mL, 125 μg/mL, 250 μg/mL e 500 μg/mL. As barras correspondem ao desvio padrão com $p < 0,05$.

Figura 11 – Placas dos testes antimicrobianos.

Foram aplicados 45 μ L/disco da fração AVAI-22 a concentração de 2,4 mg/mL. A) *Escherichia coli*. B) *Staphylococcus aureus*. C) *Candida albicans*. No destaque estão os halos formados pela amostra de AVA I-22 e pelo controle positivo (hipoclorito de sódio a 50% v/v em água).

5.1.2 Composição da fração

A fração com atividade citotóxica resultante do fracionamento com coluna Sephadex-G25® gerou 4 grandes picos de absorbância quando purificada em aparelho de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) com coluna C-18 semi-preparativa (figura 12). As amostras resultantes foram coletadas e testadas novamente em culturas celulares, porém não apresentaram atividade citotóxica. A fração AVA I-22, deixou de apresentar a mesma atividade que possuía antes da purificação por este método. A(s) molécula(s) citotóxicas pode(m) ter ficado retida(s) na coluna ou simplesmente perdeu-se a bioatividade após o procedimento.

A fração AVA I – 22 foi submetida a uma eletroforese de proteínas em gel de SDS-poliacrilamida 15% para verificar a presença ou não de elementos proteicos. Foram utilizados 2 µL do padrão de peso molecular PAGE Ruler ® para comparação do peso. Após 2h de corrida o gel foi então corado em solução de nitrato de prata a 0,2% com formaldeído a 0,076%, depois o gel foi revelado em solução de carbonato de sódio (figura 13), indicando a presença de 3 compostos com pesos moleculares diferentes.

Figura 12 – Cromatograma de HPLC.

Obtido da fração AVA I-22 em 40 minutos de corrida em HPLC utilizando-se um método isocrático com 18% de acetonitrila em água destilada e deionizada. A amostra originou 5 picos de absorbância sendo que o pico 1 (ao redor de 50 segundos de corrida) corresponde a injeção do material. Os demais picos (2, 3, 4 e 5) seguem a ordem cronológica da purificação.

Figura 13 – Gel de prata da fração AVA I-22.

Em A a fotografia do gel de SDS-poliacrilamida com a amostra de AVA I – 22 e o padrão de peso molecular. Em B as bandas que foram recortadas para a extração do material.

A partir dos dados do gel, foi possível estimar a massa dos compostos que compõem a fração (entre 10 e 17 kDa). A tentativa de extrair os compostos do gel, por meio de diálise, não foi bem sucedida devido a baixa quantidade dos mesmos. Podemos considerar a possibilidade do(s) composto(s) com bioatividade estar nessa faixa de peso molecular e com atividade mesmo em pequenas quantidades.

O método de filtração em aparelho HPLC ÄKTApurifier também foi utilizado para tentar isolar os compostos da fração AVA I-22. O fluxo utilizado foi de 1 mL/min, loop de 5 mL, coluna Superose 12 10/300 e as leituras foram feitas a 214nm, sendo que, para o padrão de peso molecular, foi utilizado a lisozima (14 kDa) em 35 minutos de corrida. O resultado da cromatografia (figura 14) mostra um pico de maior absorbância próximo ao peso molecular da lisozima, porém com absorbância bem baixa (cerca de 50 mAU) se comparado a da lisozima (cerca de 3000 mAU). As amostras coletadas também foram testadas e não tiveram resultado positivo de atividade citotóxica.

Figura 14 – Cromatogramas da filtração em leituras de 214 nm.

A) Lisozima (14 kDa) utilizada como padrão. B) A amostra de AVA I-22.

5.2 Transcriptoma

Aproximadamente 1/3 das células isoladas pelo método apresentado na figura 3 foi mantido em cultura por 3 dias (figura 15). A formação de primorfos, agregados celulares de morfologia esférica, observada ao longo deste período serviu como parâmetro para averiguar a viabilidade das células no momento da extração do RNA. As células em condições propícias formaram os primorfos observados na figura 15.

As sequências de cDNA obtidas por esse sequenciamento por “small reads” (utilizando o Illumina HiSeq2000), que sequencia pequenos fragmentos que depois são concatenados. Os dados referentes a qualidade das sequências estão descritos no anexo 2. Foram realizadas análises *in silico* em que apenas sequências que codificavam alguma mensagem foram armazenadas. As mensagens associadas a moléculas com funções conhecidas foram então classificadas e comparadas quantitativamente conforme os gráficos apresentados na figura 16 e 17.

Figura 15 – Células de *Amphimedon viridis* em cultura.

Fotomicrografias da cultura celular (primorfos) de *Amphimedon viridis*. A e B) células dissociadas e colocadas em meio de cultura. C) Cultura celular após 24h da dissociação das esponjas. D) Cultura celular após 48h da dissociação das esponjas.

Figura 16 – Análise por BLAST das sequências de cDNA gerado a partir do RNA mensageiro. Sequências referentes as células extraídas por centrifugação a 106 G.

Figura 17 – Análise por BLAST das sequências de cDNA gerado a partir do RNA mensageiro. Sequências referentes ao sobrenadante centrifugado a 1699 G.

Com base no objetivo do projeto, foi realizada uma busca por moléculas associadas a toxicidade ou mesmo a mensagens de toxinas presentes no RNA mensageiro de *A. viridis*, originando os dados da tabela 3. Além de moléculas com funções conhecidas existem, em grande número, sequências sem funções específicas conhecidas (figura 18 e 19) em grande quantidade, extraído tanto do preparado de células quanto do material enriquecido com simbioses. A segunda classe de sequências mais numerosas, figuras 18 e 19, são moléculas associadas a replicação, recombinação e reparo de DNA.

A partir dos resultados obtidos por gel de poliacrilamida-SDS da figura 13 e nos cromatogramas de filtração da figura 14, foram realizadas buscas no banco de sequências obtidas a partir do RNA mensageiro de *Amphimedon viridis* tendo como base as massas de 10kDa, 17kDa e um valor intermediário entre 10kDa e 17kDa. Em um primeiro momento, as sequências apresentadas na tabela 3 foram cogitadas como possíveis componentes de atividade citotóxica, presentes no extrato bruto e no transcriptoma deste estudo, por estarem diretamente associadas a toxinas. Pelo número de cópias de semelhantes presentes no material extraído das células (11 no caso), em relação ao número de sequências semelhantes no material enriquecido com simbioses (apenas 1), pode-se inferir que a subunidade alpha de stonustoxina deve ser um transcrito de origem da própria esponja. Os números de transcritos relacionados a verrucotoxina do material celular de *A. viridis* (5 encontrados neste estudo) em comparação aos 4 do material oriundo dos simbioses (somados os resultados para verrucotoxina e neoverrucotoxina), não permitem nenhuma tendência com relação a origem dos RNA mensageiros. Considerando-se as massas, das moléculas associadas a toxinas, comparando-se as massas referentes ao gel de poliacrilamida, pode-se considerar que o efeito da fração AVA I-22 do extrato bruto pode estar relacionado a outras moléculas de menor tamanho.

As sequências obtidas com maior similaridade à proteínas com 10 kDa foram: “BBSome-interacting protein 1”, “10 kDa heat shock protein” e “Photosystem II 10 kDa polypeptide”. A proteína de “heat shock” e o polipeptídeo do fotossistema II são moléculas em que a atividade não deve estar relacionada com a citotoxicidade observada do extrato bruto. A “BBSome-interacting protein 1” é uma possibilidade

interessante uma vez que a subunidade da BBSome está relacionada diretamente com a estabilidade dos microtúbulos (LOKTEV et al., 2008).

A sequência com maior similaridade a molécula com massa entre 10 kDa e 17 kDa (no caso com 14 kDa) foi a “phosphohistidine phosphatase-like”. Essa enzima é similar a molécula descrita em um transcriptoma da serpente *Crotalus adamanteus* (ROKYTA et al., 2012), uma viperidae venenosa que possui 35,4% de seus transcritos relacionados a toxinas, na sua maioria proteases.

A “Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N” foi a molécula com maior similaridade a sequência com peso de 17 kDa dentre as sequências obtidas a partir do RNA de *Amphimedon viridis*. Os heterodímeros contendo a enzima E2 conjugadora de Ubiquitina são responsáveis pela síntese das cadeias de poliubiquitininas. Esse processo de poliubiquitinização impede que proteínas sejam degradadas pelo complexo proteassoma, intermediando ativação de transcritos de genes alvos (DAVID et al., 2010; HOFMANN; PICKART, 1999).

Os gráficos das figuras 16 e 17 mostram que não houve grande diferença entre o RNA extraído das células centrifugadas a 106 G do material sobrenadante centrifugado a 1699 G, em relação a distribuição de espécies com sequências semelhantes. Existe também uma redução no número de genes associados a replicação, recombinação e reparo de DNA, que passa de 2000 no RNA extraído das células para pouco mais de 1500 do material do sobrenadante (figura 18 e 19). Embora os gráficos sejam semelhantes, a análise mais específica, como realizada na tabela 3, pode indicar uma origem do transcrito, bem como uma diferença de expressão da molécula analisada, não apenas considerando a classificação das sequências por funções.

Embora o número de sequências similares a subunidade alfa da stonustoxina induzisse uma tendência da sua presença no extrato bruto, a massa de aproximadamente 80 kDa (tabela 3) e a comparação com as massas de componentes da fração AVA I-22 (figura 13) diminuíram consideravelmente a probabilidade deste composto ser protagonista neste estudo. A sequência similar a “Phosphohistidine phosphatase-like” de 14 kDa de massa encontrada em nosso banco de sequências, juntamente com os dados das figuras 13 e 14, podem indicar esta como componente da

fração AVA I-22 do extrato e possível responsável pela atividade citotóxica observada do extrato bruto de *Amphimedon viridis*, nos experimentos.

As sequências correspondentes aos RNAs mensageiros foram classificadas de acordo com o Gene Ontology, gerando os gráficos das figuras 20 e 21. Os perfis dos gráficos são semelhantes, e é importante destacar o alto número de moléculas relacionadas com atividade catalítica (5084 do material celular e 4904 do sobrenadante). Dentre essas moléculas, enzimas integrantes do metabolismo do organismo, como ATP sintases, ribonucleases e quinases, são os tipos mais frequentes de moléculas associadas com atividade catalítica.

Existem sequências presentes no transcriptoma de *Amphimedon viridis*, como a similar à proteína hipotética LOC100631528 (identificada em *Amphimedon queenslandica*), que não possuem função descrita na literatura. Em meio a todos os transcritos sequenciados de *A. viridis*, existem 8683 de sequências similares proteínas hipotéticas, sendo que 73,69% correspondem a sequências destas proteínas com similaridade às descritas em *A. queenslandica*. Muitas dessas moléculas podem estar associadas tanto ao efeito citotóxico resultante do tratamento de células com o extrato bruto neste estudo, quanto a moléculas conservadas no gênero *Amphimedon* spp., que podem contribuir para a classificação filogenética molecular deste táxon.

Embora alguns dados apresentados sugerem que o princípio bioativo do extrato bruto seja uma molécula descrita na literatura como a “Phosphohistidine phosphatase-like”, citada anteriormente, os dados do estudo de biologia molecular do transcriptoma de *A. viridis* mostram que ainda existem muitas moléculas promissoras para estudos futuros a partir deste trabalho.

Tabela 3 – Sequências analisadas por BLAST associadas com atividade citotóxica.

Molécula de maior similaridade (espécie mais compatível)	Material de origem	Número de repetições	Massa (Da)
Stonustoxin subunit alpha (<i>Chelonia mydas</i> – Tartaruga verde)	Células	11	79.524
Delta-latroinsectotoxin-Lt1a-like (<i>Amphimedon queenslandica</i> – Esponja marinha)	Células	9	135.822
Verrucotoxin subunit beta-like (<i>Amphimedon queenslandica</i> – Esponja marinha)	Células	5	78.849
Pltotoxin-a subunit (<i>Pterois lunulata</i> – Peixe-leão)	Células	1	79.808
Delta-latroinsectotoxin-Lt1a-like (<i>Amphimedon queenslandica</i> – Esponja marinha)	Sobrenadante	6	135.822
Verrucotoxin subunit beta-like (<i>Amphimedon queenslandica</i> – Esponja marinha)	Sobrenadante	2	78.849
Neoverrucotoxin subunit beta-like (<i>Anolis carolinensis</i> - Lagarto)	Sobrenadante	1	66.853
Neoverrucotoxin subunit alpha-like (<i>Oreochromis niloticus</i> - Tilápia)	Sobrenadante	1	75.800
Stonustoxin subunit alpha-like (<i>Sarcophilus harrisii</i> – Demônio da Tasmânia)	Sobrenadante	1	79.524

Dados obtidos em relação ao material de origem e o número de sequências de comparação semelhantes. Os valores de massa foram obtidos por busca no banco de dados do UniProt.

Figura 18 – Gráfico da distribuição de agrupamentos de genes classificados por função.

Sequências referentes ao RNA extraído a do material celular a 106 G.

Figura 19 – Gráfico da distribuição de agrupamentos de genes classificados por função.

Sequências referentes ao RNA extraído do material sobrenadante a 1699 G.

Figura 20 – Classificação das sequências obtidas das células de acordo com o Gene Ontology.

Figura 21 - Classificação das sequências obtidas do sobrenadante de acordo com o Gene Ontology.

6 CONCLUSÃO

Os componentes bioativos do extrato bruto da população da esponja *Amphimedon viridis*, segundo os dados obtidos e descritos, possuem efeito citotóxico mais expressivo em células normais RPE 1 do que em células tumorais de mama T47D, além de possuir ação hemolítica. O efeito após 48 horas de tratamento levou a morte de todas as células da linhagem normal e manteve vivas 20% das células da linhagem tumoral. Os compostos presentes na fração analisada, AVA I-22, podem não estar diretamente relacionados a moléculas de toxinas conhecidas ou de atividade tóxica descrita na literatura.

Metabólitos secundários, moléculas cuja atividade citotóxica não é conhecida, pequenas moléculas de massas não detectáveis por gel de acrilamida-SDS ou inativadas após o processo de HPLC, podem ainda ser responsáveis pelos efeitos observados nos testes de viabilidade celular e de hemólise, mostrando possibilidades potencialmente inovadoras e abordagens interessantes ao desfecho deste estudo.

As sequências obtidas a partir dos RNAs mensageiros revelaram diferentes proteínas que podem não estar associadas diretamente a esponja marinha. Moléculas como por exemplo a “phosphohistidine phosphatase-like”, descrita originalmente em um transcriptoma da serpente *C. adamanteus*, pode ser um composto bioativo presente em *A. viridis*.

Os resultados gerados ao longo da elaboração deste trabalho são pioneiros na espécie *Amphimedon viridis*, e representam um importante passo no estudo do filo Porifera. Além de enfatizar o potencial farmacológico para o uso de esponjas marinhas como fonte de novos fármacos, os dados do transcriptoma da espécie podem contribuir para o conhecimento mais aprofundado da biologia celular e molecular de espécies do gênero *Amphimedon* spp., bem como para sua classificação filogenética.

REFERÊNCIAS*

ABRAHAM, I.; JAIN, S.; WU, C. P.; et al. Marine sponge-derived siphonane triterpenoids reverse P-glycoprotein (ABCB1)-mediated multidrug resistance in cancer cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 80, n. 10, p. 1497–1506, 2010. Elsevier Inc. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2948058&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 10/7/2013.

ALTINCICEK, B.; KNORR, E.; VILCINSKAS, A. Beetle immunity: Identification of immune-inducible genes from the model insect *Tribolium castaneum*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 32, n. 5, p. 585–595, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17981328>>. Acesso em: 22/5/2013.

ALTINCICEK, B.; VILCINSKAS, A. Identification of immune-related genes from an apterygote insect, the firebrat *Thermobia domestica*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 37, n. 7, p. 726–731, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17550828>>. Acesso em: 29/7/2013.

BERGMANN, W.; FEENEY, R. J. Contributions to the study of marine products. XXXII. The nucleosides of sponges. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 16, n. 6, p. 981–987, 1951. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jo01146a023>>. Acesso em: 17/7/2014.

BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; HU, W.-P.; et al. Marine natural products. **Natural product reports**, v. 24, n. 1, p. 31–86, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17268607>>. Acesso em: 10/7/2013.

BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; HU, W.-P.; et al. Marine natural products. **Natural product reports**, v. 25, n. 1, p. 35–94, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18250897>>. Acesso em: 28/5/2013.

BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; HU, W.-P.; et al. Marine natural products. **Natural product reports**, v. 26, n. 2, p. 170–244, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19177222>>. Acesso em: 24/5/2013.

BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; KEYZERS, R. A.; MUNRO, M. H. G.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. **Natural Product Reports**, Mar. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22193773>>. Acesso em: 30/7/2013.

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 14724**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2011

BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; KEYZERS, R. A; MUNRO, M. H. G.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. **Natural product reports**, v. 30, n. 2, p. 237–323, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23263727>>. Acesso em: 30/7/2013.

BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; KEYZERS, R. A; MUNRO, M. H. G.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. **Natural product reports**, v. 31, n. 2, p. 160–258, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24389707>>. Acesso em: 24/1/2014.

BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; MUNRO, M. H. G.; NORTHCOTE, P. T.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. **Natural product reports**, v. 20, n. 2, p. 1–48, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21152619>>. Acesso em: 30/7/2013.

BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; MUNRO, M. H. G.; NORTHCOTE, P. T.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. **Natural product reports**, v. 21, n. 1, p. 1–49, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21152619>>. Acesso em: 30/7/2013.

BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; MUNRO, M. H. G.; NORTHCOTE, P. T.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. **Natural product reports**, v. 22, n. 1, p. 15–61, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15692616>>. .

BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; MUNRO, M. H. G.; NORTHCOTE, P. T.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. **Natural product reports**, v. 23, n. 1, p. 26–78, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16453031>>. Acesso em: 4/6/2013.

BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; MUNRO, M. H. G.; NORTHCOTE, P. T.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. **Natural product reports**, v. 27, n. 2, p. 165–237, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20111802>>. Acesso em: 4/6/2013.

BULET, P.; STÖCKLIN, R. Insect antimicrobial peptides: structures, properties and gene regulation. **Protein and peptide letters**, v. 12, n. 1, p. 3–11, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15638797>>. .

CHAKRABORTY, C.; HSU, C.-H.; WEN, Z.-H.; LIN, C.-S. Anticancer Drugs Discovery and Development from Marine Organisms. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, 1. Nov. 2009. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1568-0266&volume=9&issue=16&spage=1536>>. .

CHAN, W.; TINTO, W. Stereostructures of Geodiamolides A and B, Novel Cyclodepsipeptides from the Marine Sponge. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 87, n. 52, p. 3091–3093, 1987. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jo00390a023>>. Acesso em: 29/7/2013.

COSTA, N. S. DA. **Estudos adicionais sobre a ação dos extratos de três esponjas marinhas em linhagens de células tumorais de mama humana**, 2005. 71 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e tecidual) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

CREWS, P.; MANES, L. V.; BOEHLER, M. Jasplakinolide, a cyclodepsipeptide from the marine sponge, SP. **Tetrahedron Letters**, Jan. 1986. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0040403900846456>>. Acesso em: 1/8/2014.

CUSTÓDIO, M. R.; HAJDU, E.; MURICY, G. Cellular dynamics of in vitro allogeneic reactions of *Hymeniacidon heliophila* (Demospongiae: Halichondrida). **Marine Biology**, v. 144, n. 5, p. 999–1010, 2004. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00227-003-1265-7>>. Acesso em: 30/7/2013.

CUSTODIO, M. R.; PROKIC, I.; STEFFEN, R.; et al. Primmorphs generated from dissociated cells of the sponge *Suberites domuncula*: A model system for studies of cell proliferation and cell death. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 105, n. 1-2, p. 45–59, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9922118>>. .

DAVID, Y.; ZIV, T.; ADMON, A.; NAVON, A. The E2 ubiquitin-conjugating enzymes direct polyubiquitination to preferred lysines. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 12, p. 8595–8604, 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2838281&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 27/5/2014.

FREITAS, V. M.; RANGEL, M.; BISSON, L. F.; JAEGER, R. G.; MACHADO-SANTELLI, G. M. The geodiamolide H, derived from Brazilian sponge *Geodia corticostylifera*, regulates actin cytoskeleton, migration and invasion of breast cancer cells cultured in three-dimensional environment. **Journal of Cellular Physiology**, v. 216, n. 3, p. 583–594, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18330887>>. Acesso em: 29/6/2013.

FUSETANI, N.; MATSUNAGA, S. Bioactive sponge peptides. **Chemical Reviews**, v. 93, n. 5, p. 1793–1806, 1993. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cr00021a007>>. Acesso em: 1/8/2014.

HOFMANN, R. M.; PICKART, C. M. Noncanonical MMS2-encoded ubiquitin-conjugating enzyme functions in assembly of novel polyubiquitin chains for DNA repair. **Cell**, v. 96, n. 5, p. 645–653, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10089880>>. Acesso em: 9/6/2014.

KOCZULLA, A. R.; BALS, R. Antimicrobial peptides: Current status and therapeutic potential. **Drugs**, 2003.

LEE, R. H.; SLATE, D. L.; MORETTI, R.; ALVI, K. A.; CREWS, P. Marine sponge polyketide inhibitors of protein tyrosine kinase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 184, n. 2, p. 765–772, 1992. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0006291X92906566>>. Acesso em: 1/8/2014.

LOKTEV, A. V; ZHANG, Q.; BECK, J. S.; et al. A BBSome Subunit Links Ciliogenesis, Microtubule Stability, and Acetylation. **Developmental Cell**, v. 15, n. 6, p. 854–865, 2008. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19081074>>. Acesso em: 8/6/2014.

MEHBUB, M.; LEI, J.; FRANCO, C.; ZHANG, W. Marine Sponge Derived Natural Products between 2001 and 2010: Trends and Opportunities for Discovery of Bioactives. **Marine Drugs**, v. 12, p. 4539–4577, 2014. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1660-3397/12/8/4539/>>. .

MENEZES, M. DOS S. **Papel do jaspamideo na dinâmica do citoesqueleto de actina das células de melanoma: relação com migração e Invasão**, 2011. 75 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e tecidual) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011. Universidade de São Paulo.

MOHAMED, N. M.; ENTICKNAP, J. J.; LOHR, J. E.; MCINTOSH, S. M.; HILL, R. T. Changes in bacterial communities of the marine sponge *Mycale laxissima* on transfer into aquaculture. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 4, p. 1209–1222, 2008. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2258574&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 17/7/2013.

MÜLLER, W. E. G. Origin of Metazoa: Sponges as living fossils. **Naturwissenschaften**, Jan. 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9484707>>. .

MÜLLER, W.; MÜLLER, I. Porifera: an enigmatic taxon disclosed by molecular biology/cell biology. **Porifera Research: Biodiversity, Innovation and Sustainability. Museu Nacional, Rio de Janeiro**. p.89–106, 2007. Disponível em: <http://www.researchgate.net/publication/257954142_Porifera_Research_Biodiversity_Innovation_and_Sustainability/file/3deec526798bb07302.pdf#page=99>. Acesso em: 1/8/2014.

MUNRO, M. H. G.; BLUNT, J. W.; DUMDEI, E. J.; et al. The discovery and development of marine compounds with pharmaceutical potential. **Progress in Industrial Microbiology**, v. 35, n. 1-3, p. 15–25, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10412202>>. .

MYGIND, P. H.; FISCHER, R. L.; SCHNORR, K. M.; et al. Plectasin is a peptide antibiotic with therapeutic potential from a saprophytic fungus. **Nature**, v. 437, n. 7061, p. 975–980, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16222292>>. Acesso em: 24/7/2014.

OLIVER, J. M.; ROSS, E. L.; FRANK, E. K. **Discovery of Novel Natural Products with Therapeutic Potential**. Elsevier, 1994.

OSINGA, R.; TRAMPER, J.; WIJFFELS, R. H. Cultivation of marine sponges for metabolite production: Applications for biotechnology? **Trends in Biotechnology**, 1998.

PRADO, M. P.; TORRES, Y. R.; BERLINCK, R. G. S.; et al. Effects of marine organisms extracts on microtubule integrity and cell cycle progression in cultured cells. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 313, n. 1, p. 125–137, 2004. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022098104004629>>. Acesso em: 26/5/2013.

RANGEL, M.; PRADO, M. P.; KONNO, K.; et al. Cytoskeleton alterations induced by *Geodia corticostylifera* depsipeptides in breast cancer cells. **Peptides**, v. 27, n. 9, p. 2047–2057, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16843570>>. Acesso em: 29/7/2013.

ROKYTA, D. R.; LEMMON, A. R.; MARGRES, M. J.; ARONOW, K. The venom-gland transcriptome of the eastern diamondback rattlesnake (*Crotalus adamanteus*). **BMC Genomics**, Jan. 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3472243&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

SAKURADA, T.; GILL, M. B.; FRAUSTO, S.; et al. Novel N -methylated 8-oxoisoguanines from pacific sponges with diverse neuroactivities. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 16, p. 6089–6099, 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3241477&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 29/7/2013.

SATO, K.; HORIBE, K.; AMANO, K. I.; et al. Membrane permeabilization induced by discodermidin A, a novel marine bioactive peptide. **Toxicon**, v. 39, p.259–264, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11325619>>. Acesso em: 13/8/2013.

SEPČIĆ, K.; KAUFERSTEIN, S.; MEBS, D.; TURK, T. Biological activities of aqueous and organic extracts from tropical marine sponges. **Marine Drugs**, v. 8, n. 5, p. 1550–1566, 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2885080&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 14/6/2013.

SRIVASTAVA, M.; SIMAKOV, O.; CHAPMAN, J.; et al. The Amphimedon queenslandica genome and the evolution of animal complexity. **Nature**, v. 466, n. 7307, p. 720–726, 2010.

STEINER, H.; HULTMARK, D.; ENGSTRÖM, A.; BENNICH, H.; BOMAN, H. G. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. **Nature**, v. 292, n. 5820, p. 246–248, 1981. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/292246a0>>. Acesso em: 1/8/2014.

TINTO, W. F.; LOUGH, A. J.; MCLEAN, S.; et al. Geodiamolides H and I, further cyclodepsipeptides from the marine sponge Geodia sp. **Tetrahedron**, v. 54, n. 18, p. 4451–4458, 1998. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0040402098001574>>. Acesso em: 1/8/2014.

VACELET, J. Diversity and evolution of deep-sea carnivorous sponges. **Porifera Research: Biodiversity, Innovation and Sustainability**, p.107–115, 2007. Disponível em: <[http://www.poriferabrasil.mn.ufrj.br/iss/09-book/pdf/Vacelet - Diversity and evolution of carnivorous sponges.pdf](http://www.poriferabrasil.mn.ufrj.br/iss/09-book/pdf/Vacelet-Diversity%20and%20evolution%20of%20carnivorous%20sponges.pdf)>. Acesso em: 10/2/2014.

WILLIAMS, D. E.; MARQUES, S. O.; HAJDU, E.; et al. Pyrodysinoic acid derivatives from the marine sponge Dysidea robusta. **Journal of Natural Products**, v. 72, n. 9, p. 1691–1694, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19722506>>. .

ZHANG, W.; ZHANG, X.; CAO, X.; et al. Optimizing the formation of in vitro sponge primmorphs from the Chinese sponge Stylotella agminata (Ridley). **Journal of Biotechnology**, v. 100, n. 2, p. 161–168, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12423910>>. Acesso em: 1/8/2014.

ZHOU, X.; XU, T.; YANG, X. W.; et al. Chemical and biological aspects of marine sponges of the genus Xestospongia. **Chemistry and Biodiversity**, Sep. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20860025>>. .

ANEXOS

Anexo 1 – Fotografias de *Amphimedon viridis*.

Fonte:

<http://www.poriferabrasil.mn.ufrj.br/4-especies/ceractinomorpha/haplosclerida/aviridis/aviridis.htm>

Anexo 2 – Tabelas referentes a qualidade do sequenciamento das amostras de células e do sobrenadante.

	Sample	Total Number	Total Length (nt)	Mean Length (nr)	N50	Total consensus sequence	Distinct clusters	Distinct singletons
Contig	Cells	129,529	42,828,446	331	652	-	-	-
Unigene	Cells	56,537	48,823,915	864	1421	56,537	24,295	32,242

	Sample	Total Number	Total Length (nt)	Mean Length (nr)	N50	Total consensus sequence	Distinct clusters	Distinct singletons
Contig	Supernatant	104,013	33,309,404	320	569	-	-	-
Unigene	Supernatant	55,142	32,575,338	591	1018	55,142	15,845	39,297