

HIAGO FERNANDO DO ROSARIO

**Análise citotóxica do extrato bruto de tentáculos extraídos de
três espécies de cnidários (Ceriantharia e Actiniaria) em duas
linhagens celulares tumorais**

**Assis
2020**

HIAGO FERNANDO DO ROSARIO

**Análise citotóxica do extrato bruto de tentáculos extraídos de
três espécies de cnidários (Ceriantharia e Actiniaria) em duas
linhagens celulares tumorais**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências e Letras, Assis, para a obtenção do título de Mestre em Biociências (Área de Conhecimento: Caracterização e Aplicação da Diversidade Biológica)

Orientador: Sérgio Nascimento Stampar.

ASSIS

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Laura Akie Saito Inafuko - CRB 8/9116

R789a Rosário, Hiago Fernando do
Análise citotóxica do extrato bruto de tentáculos
extraídos de três espécies de cnidários (Ceriantharia e
Actiniaria) em duas linhagens celulares tumorais / Hiago
Fernando do Rosário. Assis, 2020.
63 f. : il.

Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual
Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências e Letras, Assis
Orientador: Dr. Sergio Nascimento Stampar

1. Citotoxicidade de mediação celular. 2. Morte celular. 3.
Toxinas marinhas. 4. Celenterado. 5. Neoplasias. I. Título.

CDD 578.77



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Análise citotóxica da composição de toxinas extraídas de três espécies de Cnidaria em duas linhagens celulares

AUTOR: HIAGO FERNANDO DO ROSÁRIO

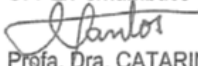
ORIENTADOR: SÉRGIO NASCIMENTO STAMPAR



Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em BIOCÊNCIAS, área: Caracterização e Aplicação da Diversidade Biológica pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. SÉRGIO NASCIMENTO STAMPAR
Departamento de Ciências Biológicas / UNESP/Assis

Prof. Dr. CARLOS DANIEL PÉREZ
UFPE/Pernambuco


Profa. Dra. CATARINA DOS SANTOS
Depto. de Ciências Biológicas / UNESP/Assis

Assis, 12 de março de 2020

AGRADECIMENTOS

Primeiramente queria agradecer ao universo, pois só com o caos presente nele eu consegui escrever essa dissertação

Agradeço muito ao meu orientador, Sérgio N. Stampar, por ter confiado em mim em primeiro lugar, mesmo depois dos problemas que eu tive, permitiu que continuasse batalhando, confiando em mim, algo que eu ainda não acredito, e também me oferecendo uma oportunidade para que eu pudesse continuar a fazer algo que eu gosto junto da pesquisa, que é dar aula.

Muito, mas muito obrigado, e todo o amor que eu poderia dar, para a mulher da minha vida, Laura, a pessoa que me deu um lar em Assis, que me deu seres de luz maravilhosos (Gamora e Juditi), que ocuparam meu tempo e escutaram minhas análises sem sentido sobre esse trabalho. Meu amor, sem você eu seria uma pessoa muito menor, muito mais fraco, sem vida, você me impulsiona a novas alturas, novos lugares, faz eu lutar todo dia, e acima de tudo isso, acredita em mim e nos meus sonhos, e por isso eu nunca disse um eu te amo mais sincero na minha vida, e todos os que eu tenho dito, todo dia para você, são assim.

Muito obrigado minha família, meus avos, meus tios, meu pai e minha mãe, e especialmente a minha irmã, que trabalharam duro para que eu permanecesse em Assis e continuasse esse sonho meu que é estudar e ser cientista. Sem eles eu não teria pessoas para todo dia procurar uma maneira de melhorar e dar orgulho.

Igor, Pedro, Azz, Tito, Caio, Murilo e Higor, obrigado pelas risadas e papos qualquer coisa no Wolverinos! Vocês tornaram a minha jornada da graduação e do mestrado muito mais leve, cheio de histórias, jogos, problemas e soluções. Com vocês eu sou eu mesmo, bem otário, mas ainda assim eu mesmo. O prédio do Wolverinos sempre vai existir, mais alto e retardado do que nunca.

Ao Buteco do d20, meu projeto de paixão que infelizmente larguei por maiores prioridades, e aos meninos que fazem parte, sucesso! Um projeto cheio de dedicação e boa vontade como esse só pode alcançar a fama e a fortuna.

Muito obrigado Professora Karina Alves, de Toledo, por todo puxão de orelha e grito comigo, não tenho dúvida de o que eu tenho de bom como pesquisador, eu aprendi com você. Obrigado por me ajudar com a graduação, com esse trabalho e com a minha jornada como cientista. O meu mais sincero obrigado, e as minhas mais sinceras desculpas por ser um aluno/estagiário/orientando tão preguiçoso

Aos companheiros de LEDA e LAINV, que me ajudaram com esse mestrado, seja com críticas duras, porém cheias de verdades e desejos de melhora, ou seja com risadas e conversas longas e gostosas, muitas vezes sobre ciência, vocês me ajudaram a perceber como sou um profissional da área também, e tenho meus pensamentos e críticas sobre o trabalho de pesquisador

A TODOS VOCÊS, MUITO, MUITO OBRIGADO!

Rosário, Hiago Fernando do. **Análise citotóxica do extrato bruto de tentáculos extraídos de três espécies de cnidários (Ceriantharia e Actiniaria) em duas linhagens celulares tumorais.** 2020. 63 f. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências). - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências e Letras, Assis, 2020.

RESUMO

Acredita-se que o filo Cnidaria seja um dos mais antigos a se ter presença de toxina, devido a sinapomorfia do grupo: cnidoblastos. O composto de toxinas presente nos Cnidaria apresenta uma gama de efeitos nocivos aos humanos, porém demonstram um grande potencial para uso médico, principalmente pelas suas capacidades citolíticas. Neste trabalho analisamos a capacidade citotóxica do extrato bruto do tentáculo de três espécies de Cnidaria (Os ceriantos *Ceriantheomorphe brasiliensis* e *Pachycerianthus multiplicatus* e a anêmona de mar *Actinia bermudensis*) em células MCF-7 e HEP-2, através de ensaios de MTT e imagens, onde o extrato bruto de *Ceriantheomorphe brasiliensis* apresentou uma IC50 de 50 ug/ml para células MCF-7, e o de *Actinia bermudensis* com uma IC50 de 120 ug/ml a 60 ug/ml para células MCF-7 e de 120 ug/ml a 30 ug/ml para células HEP-2. Estes resultados corroboram com os estudos já realizados na área, onde a presença de citolisinas na peçonha de alguns cnidários atua em células cancerígenas provocando morte celular, despontando como potenciais candidatos de origem natural para a produção de agentes que atuam no combate ao câncer. Os extratos brutos de *Ceriantheomorphe brasiliensis* e *Actinia bermudensis* induziram morte celular nas linhagens celulares, mas são necessários mais estudos afim de aferir a extensão dessa capacidade e o real potencial de ambos os extratos.

Palavras-Chave: Câncer. Toxinas. Cnidária. Anthozoa. Ceriantharia. Actiniaria. MCF7. Hep-2.

Rosário, Hiago Fernando do. **Cytotoxic analysis of crude tentacle extract from three species of cnidarians (Ceriantharia and Actiniaria) in two tumor cell lines.** 63 p

2020. Dissertation (Masters in Biosciences). São Paulo State University (UNESP), School of Sciences, Humanities and Languages, Assis, 2020.

ABSTRACT

It is believed that the phylum Cnidaria is one of the oldest to have the presence of toxin, due to the group's synapomorphy: cnidoblasts. The toxin compound present in Cnidaria presents a range of harmful effects to humans, but they demonstrate a great potential for medical use, mainly due to their cytolytic capacities. In this study, we analyzed the cytotoxic capacity of the crude tentacle extract of three species of Cnidaria (*Cerianthus* *Ceriantheomorphe brasiliensis* and *Pachycerianthus multiplicatus* and sea anemone *Actinia bermudensis*) in MCF-7 and HEP-2 cells, through MTT assays and image tests, where the crude extract of *Ceriantheomorphe brasiliensis* showed an IC₅₀ of 50 µg/ml for MCF-7 cells, and that of *Actinia bermudensis* with an IC₅₀ of 120 µg/ml at 60 µg/ml for MCF-7 cells and 120 µg/ml at 30 µg/ml for HEP-2 cells. These results corroborate with the studies already carried out in the area, where the presence of cytotoxins in the venom of some cnidarians acts on cancer cells causing cell death, emerging as potential candidates of natural origin for the production of agents that can be used in the fight against cancer. The crude extracts of *Ceriantheomorphe brasiliensis* and *Actinia bermudensis* induced cell death in cell lines, but further studies are needed in order to assess the extent of this capacity and the real potential of both extracts.

Keywords: Cancer. Toxins. Cnidaria. Anthozoa. Ceriantharia. Actiniaria. MCF7. Hep-2.

Sumario

1. Introdução geral.....	9
1.1. Filo Cnidaria.....	9
1.2. Toxina de Cnidaria.....	12
1.3. Cancer.....	14
1.4. Estudos na área.....	16
Objetivos.....	19
2.Capitulo 1.. Analise citotóxica do extrato bruto de tentáculos extraídos de três espécies de cnidários (Ceriantharia e Actiniaria) em duas linhagens celulares tumorais.....	20
Resumo.....	20
2.2Introdução.....	21
2.3Materiais e métodos.....	23
2.3.1Extração da toxina.....	23
2.3.2Células para experimentação.....	23
2.3.3 <i>Quantificação de proteínas presentes no extrato.</i>	23
2.3.4Ensaio de citotoxicidade.....	23
2.4.Resultados.....	25
2.5.Discussão.....	42
2.6.Conclusão final.....	49
2.7Agradecimentos.....	49
2.8.Referencias.....	50
3.Conclusão geral.....	57
4.Referencias.....	58

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Filo Cnidaria

Cnidaria é um filo altamente diversificado que abrange cerca de 11.000 espécies, incluindo anêmonas-do-mar, corais e águas-vivas (Appeltans et al., 2012). O filo Cnidaria apresenta dois grandes subfilos: Medusozoa, que abrange organismos que podem apresentar fase medusoide no seu ciclo de vida, e Anthozoaria, representada por organismos bentônicos e polipoides, com ausência de fase medusoide. Um dos grupos pertencentes a Anthozoaria, e o menos estudado, é o Ceriantharia cujos representantes são comumente conhecidos por anêmonas-de-tubo ou ceriantos (Tiffon, 1987; Daly et al., 2007).

A sinapomorfia mais evidente entre todos os representantes deste filo é a presença de cnidas (van Iten et al., 2014). Essas estruturas são produtos celulares produzidos pelo complexo de Golgi de células especializadas chamadas de cnidoblastos, e o nematocisto, um tipo de cnidoblasto presente em todos os cnidários, que possuem substâncias tóxicas que auxiliam na proteção, alimentação e habitação (Marques & Collins, 2004; Fautin, 2009; Beckmann & Özbek, 2012). Além disso, estima-se que dos filos que compõem o reino Metazoa, Cnidaria seja o com derivação mais antiga a conter toxinas, o qual evoluiu desde a era neoproterozoica, 650 milhões de anos atrás (van Iten et al., 2014).

As cnidas podem ser encontradas em diversas partes corporais nos cnidários e são classificadas em três tipos morfológicos (Östman, 2000; Özbek et al., 2009): nematocistos (únicos com toxina e presentes em todos os cnidários), espirocistos (adesivos não tóxicos e presentes unicamente em Hexacorallia e Ceriantharia) e pticocistos, sendo estes últimos adesivos não tóxicos e exclusivos de Ceriantharia (Mariscal et al., 1977).

Apesar de algumas diferenças funcionais e morfológicas, todos os cnidários possuem nematocistos (David et al., 2008; Fautin, 2009). Essas cnidas possuem a função primordial de liberar e injetar toxinas em seus predadores ou presas mediante a um estímulo químico ou físico (Mariottini & Pane, 2010), auxiliando na captura de presas e defesa territorial e contra predadores. Ainda,

a toxina liberada por essa estrutura também pode influenciar disputas intraespecíficas e interespecíficas (Bigger, 1980; Kass-Simon & Scappaticci, 2002). Além disso, nematocistos possuem alta concentração de proteínas e polipeptídios, que agem como hemolisinas, enzimas, e neurotoxinas as quais são nocivas aos seres humanos, podendo causar cardiotoxicidade, inchaço, dores, paralisia, dermatite e necrose de tecidos (Martins et al., 2009).

Ceriantharia é um dos três clados pertencentes a classe Anthozoa, incluído Hexacorallia e Octocorallia (Stampar et al., 2014). Indivíduos que pertencem a subclasse Ceriantharia apresentam, entre outras características, dois tipos de tentáculos: Os labiais, que circundam a boca, e os marginais, que são dispostos a margem do disco oral (Stampar et al., 2016). Hoje, estima-se a presença de 85 espécies nesta subclasse (Molodtsova, 2004; Stampar et al., 2015).



Figura 1: *Ceriantemorphe brasiliensis* Carlgren, 1931. Credito: Hellen Ceriello



Figura 2: *Pachyceriantus multiplicatus* Carlgren, 1912. Foto: Hellen Ceriello

A subclasse Hexacorallia, representada pelos corais verdadeiros anêmonas do mar, corais negros e zoantários, como sugerido pelo nome, possui simetria hexâmera (apesar de que simetrias de oito ou dez lados possam ocorrer dentro desta subclasse), podem ser encontradas em colônias ou solitários (Daly et al., 2007), e apresentam 3.152 espécies descritas válidas (Appeltans et al., 2012).

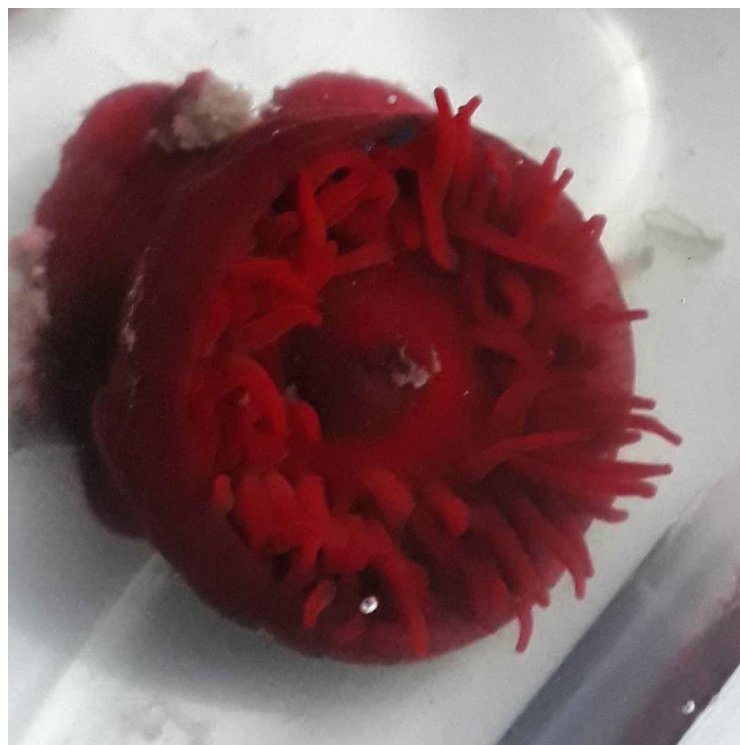


Figura 3: *Actinia bermudensis* McMurrich, 1889. Foto: Sérgio N. Stampar

1.2 Toxinas de Cnidaria

O ambiente marinho é um dos mais complexos e ricos ecossistemas da Terra. Diferentes condições, físicas e químicas, foram fatores importantes para a produção de uma variedade de moléculas de estruturas únicas. Essas moléculas, produzidas no difícil ambiente marinho, apresentam diversos tipos de atividades biológicas (Jain et al., 2008).

A peçonha de Cnidaria é uma mistura de componentes tóxicos que são expelidos quando os nematocistos, organelas especializadas, são ativadas via situações químicas ou mecânicas. Os compostos que compõem a toxina incluem toxinas formadoras de poros (PFT – *pore-forming toxins*), enzimas (metaloproteases e fosfolipases), neurotoxinas (Peptídeos ricos em cisteína e moduladores dos canais de íon), toxinas hemostáticas e hemorrágicas, e aminas biogênicas (histamina, serotonina) (Anderluh & Macek, 2002; Jouiaei et al., 2015). No geral, a peçonha de cnidários contém 3.5 – 6.5 kDa de toxinas do canal Na^+ , 3 – 5 kDa de toxinas do canal de K^+ , e ~20 kDa de toxinas formadoras de poros (Honma et al., 2006). Existem outros compostos não tóxicos produzidos por cnidária que são estudados devido ao interesse em suas atividades biológicas, como propriedades bioflorescentes (Ip et al., 2007).

As citolisinas, um grupo que faz parte da toxina formadora de poros dos cnidários, são capazes de comprometer a estrutura e permeabilidade seletiva da membrana celular (Crinigoj Kristan et al., 2009), logo, como a vida da célula depende desses fatores citados, é uma estratégia interessante o desenvolvimento desse tipo de molécula. As citolisinas são classificadas em quatro grupos de polipeptídios, baseados na sua principal funcionalidade e em sua estrutura primária: Tipo I, de 5 a 8 kDa, possuem atividade anti-histamínica; O tipo II, que compreende proteínas de 20 kDa, são as mais estudadas na literatura e podem ser inibidas por esfingomielina. O tipo II também leva o nome de actinoporina, e tem a capacidade de formar poros seletivos de cátions, através da sua habilidade de se ligar aos fosfolípidos das membranas celulares (Suput, 2009). O tipo III são citolisinas de 30 a 40 kDa, representadas apenas pelas proteínas do gênero de anêmona de mar *Urticina* (Anderluh et al., 2011), já as de tipo IV são produzidas apenas pela anêmona de mar *Metridium senile*, único representante deste grupo (Anderluh & Macek, 2002).

As citolisinas estão bem distribuídas entre os venenos de cnidária, porém existem algumas que não estão localizadas nos nematocistos, como as hidrolisinas e alguns integrantes da família MACPF, mesmo que não atuem como “toxinas clássicas”, elas ainda têm funções no desenvolvimento, digestão da presa e imunidade do animal. Até mesmo existem dentro de algumas espécies de Cnidaria, fosfolipases que podem destruir a integridade da membrana celular, assim agindo como citolisinas (Oshiro et al., 2004; Cline et al., 1995)

As actinoporinas levam esse nome ao gênero *Actinia*, na qual foi identificada primeiramente, mas também é uma das citolisinas mais espalhadas pelo filo, e até mesmo em táxons mais distantes (Kem, 1988; Gutierrez-Aguirre et al., 2006). Actinoporinas são pequenos monômeros, secretados aproximadamente com 20 kDa, e são conhecidas por se ligarem especificamente, a esfingomiélin em membranas lipídicas, formando poros transmembranas, que levam a um desbalanço osmótico, e por fim, a morte celular. A presença de colesterol na membrana pode promover, indiretamente, a atividade de formação de poros da actinoporina (Barlic et al., 2004), assim como a falta de esfingomiélin na membrana celular da anêmona do mar (sendo substituída por um análogo que possui fosfocolina) garante que a actinoporina não vá se ligar a sua membrana celular, logo, permitindo que os indivíduos dessa espécie possam atacar membranas das suas presas ou predadores, sem que sejam atingidas pelos malefícios da sua própria toxina (Meinardi et al. 1995).

Como as actinoporinas pertencem a uma família multigenica em indivíduos de espécies, é possível que ela tenha evoluído com propósitos de defesa, alimentação e relações intraespecíficas, e essa gama de participações em funções biológicas putativas também podem explicar a presença e liberação das actinoporinas em outras partes do corpo da anêmona do mar, não só no nematocisto (Frazão et al., 2012; Anderluh et al., 1999; Macek, 1999; Basulto et al., 2006). Não só a capacidade de formar poros nas membranas celulares permeia as actinoporinas, mas também existem estudos sobre actinoporinas isoladas da anêmona de couro, *Heteractis crispa*, que demonstraram atividade anticâncer, através da indução de apoptose independente do gene p53, importante na capacidade da célula tumoral em evitar a morte celular programada (Fedorov et al., 2010; Johnstone et al., 2002).

1.3 Câncer

As células de um organismo multicelular trabalham de forma coordenada e conjunta, e distúrbios moleculares que consigam quebrar essa dinâmica podem acarretar em danos e até mesmo doenças (Bruce et al., 2007). Uma mutação, neste cenário, pode conceder algumas vantagens seletivas, podendo por exemplo, permitir que essa célula se divida e cresça mais rapidamente do que as células vizinhas, formando assim a origem de um tumor (Alberts, 2008). Mas o tumor não é apenas uma massa proliferativa de células, mas na realidade um tecido complexo composto de camadas bem distintas de vários tipos celulares que interagem entre si (Hanahan & Weinberg, 2011), e existem várias formas que podem disparar a proliferação de células tumorigênicas, como fatores genéticos, químicos e poluição, para se citar algumas (Hanahan & Weinberg, 2011; Yuan et al., 2016).

Os tumores podem ser classificados, de forma histológica, com uma base de critérios definidos, como o tecido de origem das células, seu comportamento, morfologia, e o tipo básico de célula (Louis, 1978), e são divididos em dois grupos: Os tumores benignos e os tumores malignos. Os benignos não invadem tecidos próximos e crescem de maneira lenta, através de uma expansão da massa celular, logo, podem ser destruídos ou removidos sem maiores complicações. Já os malignos conseguem invadir e se espalhar para outros órgãos e tecidos (Weinberg, 2013), e essa capacidade de invasão dos tumores malignos é essencial para o câncer, já que a mesma permite que ela possa gerar tumores secundários, chamados de metástase, em outras partes do corpo.

O processo em si da metástase começa com o desprendimento de algumas células do tumor primário e entram ativamente no estroma próximo, e em seguida no sistema linfático ou circulatório. Quando na corrente, tanto sanguínea quanto linfática, essas células conseguem se espalhar para órgãos distantes, saindo da corrente e adentrando ao órgão/tecido alvo (Weinberg, 2013; Engers & Gabbert, 2000).

As primeiras características identificadas do câncer foram divididas em seis capacidades biológicas que vão sendo atingidas em vários passos durante

o desenvolvimento do tumor humano, isto é, da evolução da célula normal até o seu estado neoplásico (Hanahan & Weinberg, 2011) (Figura 4).

Todas essas características oferecem alvos em potenciais para tratamentos terapêuticos anticâncer, como por exemplo, a capacidade em resistir a morte celular programada tem levado os pesquisadores a tentarem induzir apoptose em células cancerígenas. O campo de pesquisa sobre os mecanismos do câncer vive em constante crescimento, com novas características ainda sendo descobertas (Hanahan & Weinberg, 2011).

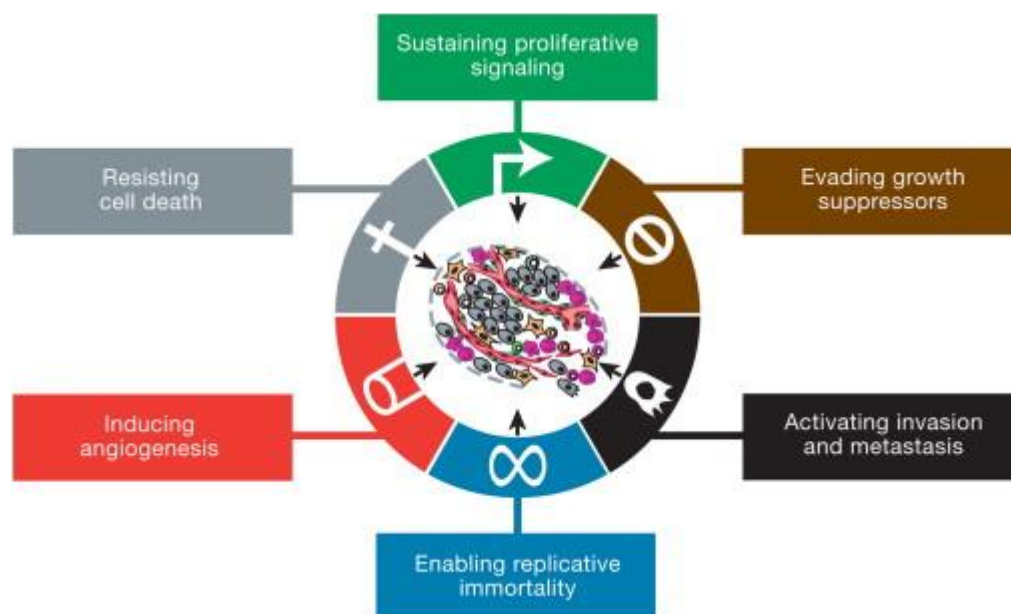


Figura 4: As principais características do câncer, como descritas por Hanahan & Weinberg, 2011. No sentido horário: sustento dos sinais de proliferação, resistência contra supressores de crescimento, ativação da sua capacidade de invasão e metástase, continua replicação das suas células, indução da angiogenese e resistência contra morte celular programada.

O câncer pode ser classificado dependendo da origem do tecido e o tipo de célula que se tornou cancerígena (Cooper, 2000). Sarcomas tem origem no tecido conjuntivo ou células musculares, já os carcinomas surgem de células epiteliais, sendo o tipo mais comum que acomete os humanos. Os cânceres que não se encaixam nessas duas categorias mais “amplas” incluem os linfomas, que origina do sistema linfático, e leucemia, que são derivadas dos tecidos formadores de células sanguíneas (Albert, 2008).

O câncer de mama é o câncer mais comum entre as mulheres brasileiras, só em 2014 a SIM (sistema de informação sobre mortalidade) registrou 14.622 óbitos de mulheres devido ao câncer de mama, sendo essa a principal causa de morte por câncer em mulheres no Brasil. Em 2017, foi estimado em 57.960 os novos casos dessa doença (Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2015), e nas últimas três décadas, houve um aumento na mortalidade causada pela doença nas cinco macrorregiões do Brasil (Azevedo e Silva, 2011).

1.4 Estudos na área

Estudos já demonstraram que produtos extraídos de organismos marinhos apresentam vários tipos de atividades biológicas, podendo exercer influência sobre patologias humanas e doenças infecciosas, assim como características anti-inflamatórias, antitumorais e antivirais (Mayer & Lehmann, 2001; Mayer et al., 2009), apontando assim um potencial uso para a indústria da farmácia, devido ao grande leque de ações sobre sistemas biológicos.

Mesmo com uma enorme variedade de substâncias e atividades biológicas, chegando na casa dos 14.000 produtos, e já existem alguns fármacos provenientes de organismos marinhos em farmácias, como Yondelis® e Prialt®, mas a relação de fármacos prontos para uso humano e o potencial encontrado no ambiente marinho é contrastante, principalmente devido as estruturas únicas encontradas (Proksch et al., 2002).

Apesar dessas características, há um problema logístico para o desenvolvimento dessas drogas baseadas em animais marinhos seria o fornecimento de matéria-prima, já que a produção de fármacos poderia mexer com o número de indivíduos de uma população, destruição do ambiente e até mesmo casos de extinção, caso essas drogas entrassem no mercado sem produções sustentáveis (Proksch et al., 2003; Newman et al., 2000). Algumas estratégias podem ser tomadas com relação ao problema de sustentabilidade, como a síntese artificial dos componentes ativos desses produtos, assim como o cultivo desses organismos (Mendola, 2000).

Um estudo demonstrou que a peçonha extraída do tentáculo do cifozoário *Pelagia noctiluca* (Medusozoa, Scyphozoa), comumente encontrada no mar

mediterrâneo, possui atividade analgésica e antibutirilcolienesterase, e a aplicação desta descoberta pôde implicar em avanços no estudo de doenças neurodegenerativas progressivas, pois a inibição da butirilcolinesterase no sistema nervoso humano pode ser útil no tratamento de doenças como Alzheimer (Ayed et al., 2012).

Moléculas bioativas também foram descobertas em antozoários como, por exemplo, as prostaglandinas (15R) -PGA2 encontradas em *Plexaura homomalla* Esper, 1794 (Weinheimer & Spraggins, 1969), o extrato de *Sarcophyton* sp, que demonstrou grande capacidade antitumoral, provocando apoptose em células do câncer de mama (Dobretsov et al., 2016), compostos prostanoides extraídos de *Clavularia viridis*, que não só foram capazes de inibir o crescimento de células leucêmicas (HL-60), mas também demonstrou uma seletividade para células leucêmicas, quando a citotoxicidade foi comparada com células normais ou células HeLa (Honda et al., 1985), ou mesmo a equinotoxina extraída de *Actinia equina*, que teve uma atividade antitumoral in vitro em células de Ehrlich (Adenocarcinoma mamário de camundongos fêmeas) e em células L1210 (Leucemia linfóide), e capacidades in vivo da equinotoxina em células de Ehrlich implantadas em camundongos (Giraldi et al., 1976).

Devido a miríade de caminhos que a apoptose celular possui para sua ativação, além dos testes realizados com as toxinas para analisar sua citotoxicidade e capacidade antitumoral, muitos estudos procuram identificar os métodos que as toxinas ativam a apoptose em células cancerígenas.

Por exemplo, o veneno de *Heteractis magnifica* apresentou um resultado significativo com relação a sobrevivência celular de duas linhagens cancerígenas, a T47D (Adenocarcinoma originado no ducto da mama) e as MCF7 (células cancerígenas da mama, com o gene p53 do tipo selvagem), induzindo apoptose nessas células através da ativação de caspases (Ramezanzpour et al., 2013), ou um estudo com uma espécie muito próxima a *H. magnifica*, a *Heteractis crispa*, onde actinoporinas isoladas do seu veneno demonstraram a capacidade de induzir apoptose em células cancerígenas deficientes do gene p53, isto é, uma apoptose independente do p53 (Fedorov et al., 2010). Essa é uma descoberta interessante para o campo de estudo das toxinas de Cnidaria, pois a maioria das neoplasmas tem uma mutação ou deficiência do gene p53.

Duas frações da toxina de *Stichodactyla haddoni*, F1 (30-50 kDa) e F2 (10-30 kDa) tiveram ótimos resultados na linhagem cancerígena de células do pulmão (células A549), e a indução de apoptose nas células, mas através do caminho do stress mitocondrial (Abdzadeh et al., 2020) e a própria toxina, e por conseguinte, suas frações, são extraídas do muco produzido pelo animal, e não pelo nematocisto, corroborando a evidencia de que outras estruturas anatômicas podem liberar toxinas, tendo diferentes localizações em diferentes espécies (Moran et al., 2012; Bastos et al., 2016) ou podem ser produzidas pela microbiota que mora no mucus

Quando pensamos nessa área, associamos os estudos e os esforços com as anêmonas do mar, mas ainda em Anthozoa temos os corais, e mesmo que as anêmonas do mar e os corais possuam diferenças, eles ainda pertencem a mesma classe, e podem ter compostos similares. Um estudo já citado no texto demonstra a ação antitumoral de *Sarcophyton sp* em células MCF7, também notando características de células que sofreram apoptose, como aumento da vacuolização e fragmentação nuclear (Dobretsov et al., 2016).

Outro estudo visou a identificação e análise de novos peptídeos citotóxicos extraídos de *Sarcophyton glaucum* e sua ação citotóxica em células HeLa (Células de câncer na cervical), onde três novos peptídeos tiveram ação antitumoral nas células HeLa, mas não houve nas células controle (não cancerígenas), indicando uma droga anticancerígena em potencial (Quah et al., 2019). Assim como extratos de quatro corais encontrados nas ilhas Togian, na indonésia, tiveram suas capacidades citotóxicas testadas, onde a espécie *Sinularia sp 2* teve um bom resultado na inibição do crescimento de células MCF7 e HCT-116 (Zubair et al., 2018).

Mas as toxinas de Cnidaria demonstram muito mais do que essas capacidades antitumorais, na literatura existem alguns exemplos que demonstram as citolisinas extraídas de anêmonas do mar, devido sua capacidade de formar poros em membranas celulares, podem facilitar a entrada de drogas no citosol, aumentando assim a eficácia de agentes anticâncer convencionais, como por exemplo um estudo com o veneno extraído de *Bunodeopsis globulifera*, que aumentou a atividade citotóxica da cisplatina, um agente quimioterápico conhecido, em células A549 (Soletti et al., 2008; Monroy-Estrada et al., 2013). Até mesmo outras capacidades farmacológicas das toxinas

foram testadas, como a toxina de *Palythoa caribaeorum* demonstrando uma ação antiparasitária contra *Giardia intestinalis*, possivelmente alterando o equilíbrio osmótico que existe em sua membrana celular, e também potencial na área agrária como inseticida, já que essa mesma toxina apresentou efeitos paralisantes *in vivo* em grilos (Lazcano-Pérez et al., 2018)

Todos esses estudos são importantes, porém acima de tudo, existe uma certa lacuna com relação a extratos brutos de toxinas de Cnidaria. Conhecer os efeitos totais do extrato bruto da toxina, *in vivo* e *in vitro*, que encapsula diversos componentes é tão importante quanto saber os efeitos de uma parte da toxina em particular (Suput, 2009).

OBJETIVO

O objetivo do trabalho foi a análise da capacidade citotóxica do extrato bruto dos tentáculos dos ceriantos *Ceriantheomorphe brasiliensis* e *Pachycerianthus multiplicatus*, e da anêmona do mar *Actinia bermudensis*, em células MCF-7 (célula tumorigênica do câncer de mama) e células HEP-2 (Carcinoma epitelial).

Capítulo 1.

Análise citotóxica do extrato bruto de tentáculos extraídos de três espécies de cnidários (Ceriantharia e Actiniaria) em duas linhagens celulares tumorais.

Hiago Fernando do Rosario¹, Sergio N. Stampar¹

1. Unesp - Universidade Estadual Paulista, FCL/Assis, Departamento de Ciências Biológicas, Laboratório de Evolução e Diversidade Aquática – LEDA, Brasil

Correspondência

Hiago Fernando do Rosário

hiagoofernando@gmail.com

RESUMO

Acredita-se que o filo Cnidaria seja um dos mais antigos a se ter presença de toxina, devido a sinapomorfia do grupo: cnidoblastos. O composto de toxinas presente nos Cnidaria apresenta uma gama de efeitos nocivos aos humanos, porém demonstram um grande potencial para uso médico, principalmente pelas suas capacidades citolíticas. Neste trabalho analisamos a capacidade citotóxica do extrato bruto do tentáculo de três espécies de Cnidaria (Os ceriantos *Ceriantheomorphe brasiliensis* e *Pachycerianthus multiplicatus* e a anêmona de mar *Actinia bermudensis*) em células MCF-7 e HEP-2, através de ensaios de MTT e imagens, onde o extrato bruto de *Ceriantheomorphe brasiliensis* apresentou uma IC₅₀ de 50 µg/ml para células MCF-7, e o de *Actinia bermudensis* com uma IC₅₀ de 120 µg/ml a 60 µg/ml para células MCF-7 e de 120 µg/ml a 30 µg/ml para células HEP-2. Estes resultados corroboram com os estudos já realizados na área, onde a presença de citolisinas na peçonha de alguns cnidários atua em células cancerígenas provocando morte celular, despontando como potenciais candidatos de origem natural para a produção de agentes que atuam no combate ao câncer. Os extratos brutos de *Ceriantheomorphe brasiliensis* e *Actinia bermudensis* induziram morte celular nas linhagens celulares, mas são necessários mais estudos afim de aferir a extensão dessa capacidade e o real potencial de ambos os extratos.

Palavras-Chave: Câncer. Toxinas. Cnidária. Anthozoa. Ceriantharia. Actiniaria. MCF7. Hep-2.

2.2.Introdução

Cnidaria é um filo altamente diversificado que abrange cerca de 11.000 espécies, incluindo anêmonas-do-mar, corais e águas-vivas (Appeltans et al., 2015). A sinapomorfia mais evidente entre todos os representantes deste filo é a presença de cnidas (van Iken et al., 2014). Essas estruturas são produtos celulares produzidos pelo complexo de Golgi de células especializadas chamadas de cnidoblastos, e possuem substâncias tóxicas que auxiliam na proteção, alimentação e habitação (Marques & Collins, 2004; Fautin, 2009; Beckmann & Özbek, 2012). Um dos grupos menos estudado é o Ceriantharia, cujos representantes são comumente conhecidos por anêmonas-de-tubo ou ceriantos (Tiffon, 1987; Daly et al., 2007).

Ceriantharia é um dos três clados pertencentes a classe Anthozoa, incluído Hexacorallia e Octocorallia (Stampar et al., 2014). Indivíduos que pertencem a subclasse Ceriantharia apresentam, entre outras características, dois tipos de tentáculos: Os labiais, que circundam a boca, e os marginais, que são dispostos a margem do disco oral (Stampar et al., 2016), estes que foram usados nesse trabalho. Hoje, estima-se a presença de 85 espécies nesta subclasse (Molodtsova, 2004; Stampar et al., 2015).

A subclasse Hexacorallia, denominados corais ou anêmonas verdadeiras, como sugerido pelo nome, possui simetria hexâmera (apesar de que simetrias de oito ou dez lados possam ocorrer dentro desta subclasse), podem ser encontradas em colônias ou solitários (Brusca & Brusca, 2007; Daly et al., 2007). Existem cerca de 4300 espécies pertencentes a esta subclasse (Dumencq & van Praët, 1987).

Apesar de algumas diferenças funcionais e morfológicas, todos os cnidários possuem nematocistos (David et al., 2008; Fautin, 2009). Essas cnidas possuem a função primordial de liberar e injetar toxinas em seus predadores ou presas mediante a um estímulo químico ou físico (Mariottini & Pane, 2010). Essas toxinas, presentes nos nematocistos, possuem alta concentração de proteínas e polipeptídeos, que agem como hemolisinas, enzimas, e neurotoxinas as quais são nocivas aos seres humanos, podendo causar cardiotoxicidade, inchaço, dores, paralisia, dermatite e necrose de tecidos (Martins et al., 2009).

Mesmo com os diversos efeitos nocivos ao contato com as toxinas dos cnidários, seu estudo pode abrir novos caminhos e opções na área da farmacologia. Por exemplo, a presença de atividade antibutirilcolinesterase na peçonha extraída do tentáculo do cifozeário *Pelagia noctiluca* (Meduzosoa, Scyphozoa) (Ayed et al., 2012), implicando que, no caso da aplicação da descoberta, haveríamos um novo caminho a ser tomado no tratamento de doenças neurodegenerativas progressivas. Já no campo da oncologia, temos um estudo que demonstra a atividade antitumoral da equinotoxina extraída de *Actinia equina* em células cancerígenas do tumor de Ehrlich (Giraldi et al., 1976).

Já na literatura existem alguns exemplos que demonstram as citolisinas extraídas de anêmonas do mar, devido sua capacidade de formar poros em membranas celulares, podem facilitar a entrada de drogas no citosol, aumentando assim a eficácia de agentes anticâncer convencionais, como por exemplo um estudo com o veneno extraído de *Bunodeopsis globulifera*, que aumentou a atividade citotóxica da cisplatina, um agente quimioterápico conhecido, em células A549 (Soletti et al., 2008; Monroy-Estrada et al., 2013).

As citolisinas, presentes na composição de toxinas dos cnidários, apresentam capacidade de formar poros em membranas celulares, desestabilizando a pressão osmótica e permitindo a perda de conteúdo intracelular, levando a célula a morte (Macek et al., 1997; Tejuca et al., 2001). Tal capacidade pode ser exemplificada com um estudo sobre actinoporinas isoladas de *Heteractis crispa*, que demonstrou atividade anticâncer, através da indução de apoptose independente do gene p53, importante na capacidade da célula tumoral em evitar a morte celular programada (Fedorov et al., 2010; Johnstone et al., 2002).

Logo, este estudo visa a análise da citotoxicidade do extrato bruto extraído dos tentáculos de *Ceriantheomorphe brasiliensis*, *Actinia bermudensis* e *Pachycerianthus multiplicatus* em células cancerígenas da mama (MCF7) e células HEP-2, tendo em mente a falta de estudos a cerca destas espécies, assim como a busca por novos caminhos no combate ao câncer.

2.3. Materiais e métodos.

2.3.1. Extração do extrato bruto dos tentáculos.

Os espécimes *Ceriantheomorphe brasiliensis* e *Actinia bermudensis* foram coletados na Praia do Pântano do Sul, Florianópolis – SC, já o espécime de *Pachycerianthus multiplicatus* foi coletado em Moray Firth, ao norte da Escócia. As amostras de tentáculos foram retiradas diretamente do animal com uma pinça, e mantidas em água do mar. Um método denominado quente-frio, onde as amostras são congeladas em nitrogênio líquido e logo após colocadas em um banho-maria quente, foi utilizado visando a quebra do tecido dos tentáculos através do choque, proporcionado pelas rápidas alterações de temperatura. Logo após as amostras foram centrifugadas três vezes a 6000 RPM, por 5 minutos. O conteúdo foi aliquoteado e estocado a - 20 °C. Durante o estudo houve a perda do espécime de *Ceriantheomorphe brasiliensis*.

2.3.2 Células para experimentação

Para os testes de citotoxicidade da composição de toxinas, serão usadas células MCF-7 (tumorigênica) e as células HEP-2, mantidas em culturas *in vitro*, em uma estufa umedecida a 37 °C e 5% de CO₂, meio de cultura DMEM/F12 (Sigma) suplementado com 5% de soro fetal bovino e acrescido de antimicóticos e antibióticos.

2.3.3 Quantificação de proteínas presentes no extrato

A concentração de proteínas presente no extrato bruto dos tentáculos foi quantificada usando o kit Pierce BCA Protein Assay, seguindo as instruções presentes no mesmo. Resumidamente, o reagente foi preparado misturando 50 partes do reagente BCA A com 1 parte do reagente BCA B. 10 µl do BCA Standard foi pipetado nos micros poços da plaquinha, e logo depois 200 µl do reagente preparado. A microplaca então foi encubada por 20 minutos, e a absorbância dos micros poços foi medida em 560 nm.

2.3.4 Ensaio de citotoxicidade

A análise da citotoxicidade foi avaliada através dos ensaios de viabilidade celular, utilizando o método de MTT. Após a aplicação de diferentes

concentrações do extrato bruto, nas células MCF7 e nas células HEP-2 (em uma microplaca de 96 poços), houveram dois períodos onde as concentrações foram mantidas na microplaca, 24 horas e 48 horas, até a realização do ensaio de MTT. Após a aplicação de 50ul de MTT por poço, foi esperado 4 horas até a formação do sal de formazana, seguida da administração de 50ul DMSO por poço na microplaca, e sua leitura, em 560nm, foi medida, considerando o grupo controle (sem aplicação da toxina), como 100% viáveis. Imagens tiradas, em um aumento de 10 vezes logo após o termino das 24h e 48h das aplicações das concentrações também foram analisadas. As concentrações utilizadas estão presentes na Tabela 1, o número elevado de concentrações de *Ceriantheomorphe brasiliensis* é devido ao uso de dois estoques provenientes de duas extrações realizadas em momentos diferentes.

<i>Ceriantheomorphe brasiliensis</i>	<i>Actinia bermudensis</i>	<i>Pachycerianthus multiplicatus</i>
0.54 ug/ml	1.875 ug/ml	1.46 ug/ml
1.09 ug/ml	3.75 ug/ml	2.92 ug/ml
2.18 ug/ml	7.5 ug/ml	5.84 ug/ml
4.37 ug/ml	15 ug/ml	11.68 ug/ml
8.75 ug/ml	30 ug/ml	23.375 ug/ml
17.5 ug/ml	60 ug/ml	46.75 ug/ml
25 ug/ml	120 ug/ml	93.5 ug/ml
35 ug/ml	240 ug/ml	187 ug/ml
50 ug/ml	480 ug/ml	374 ug/ml
70 ug/ml	-----	-----
100 ug/ml	-----	-----
140 ug/ml	-----	-----
200 ug/ml	-----	-----
400 ug/ml	-----	-----
800 ug/ml	-----	-----
1600 ug/ml	-----	-----

Tabela 1: Concentrações, em microgramas por mililitro, dos extratos brutos utilizados no estudo.

2.4.Resultados

Células HEP-2

A toxina extraída de *Actinia bermudensis* demonstrou grandes efeitos, principalmente em suas maiores concentrações. Como visto na Figura 5 as concentrações de 480 ug/ml, 240 ug/ml e 120 ug/ml mataram 85% ou mais das células nos micropoços durante o teste de 24h, e esse padrão se repete no teste de 48h (Figura 6), não só demonstrando a capacidade citotóxica da toxina, mas também seu efeito sobre o crescimento das células. A IC50 da toxina de *Actinia bermudensis*, ou seja, a concentração da toxina capaz de matar 50% da cultura celular, pode ser colocada entre 60 ug/ml e 30 ug/ml no teste de 24h, e entre 120 ug/ml e 60 ug/ml no teste de 48h, sendo os efeitos dose-dependente.

Já a toxina de *Pachygerianthus multiplicatus* não apresentou efeitos sobre as células nos testes de 24h e 48h, logo, não demonstrando capacidades antitumorais ou até mesmo sobre o crescimento das células, demonstrado nas Figuras 7 e 8.

Nas Figuras 9 e 10, retiradas diretamente dos micropoços com concentrações do extrato bruto de *Actiniaria bermudensis*, é possível notar que no controle celular e na concentração mais baixa existem poucos espaços ou nenhum espaço entre as células, e a sua morfologia permanece mais estável, já em concentrações mais elevadas os espaços entre as células estão presentes, assim como as células apresentam formas estranhas.

Nas figuras 11 e 12, que são os micropoços tratados com concentrações do extrato bruto de *Pachygeriantus multiplicatus*, não há diferenças entre o micropoço do controle celular e dos micropoços com as concentrações, indicando que não houve algum tipo de ação sobre as células.

Na figura 13, foram destacados círculos desfocados em volta das células, denominados corpos apoptóticos, esses mesmos presentes também em concentrações onde houve morte celular acima de 50%, podendo indicar o tipo de mecanismo de morte celular que ocorreu dentro das janelas de tempo de 24h e 48h.

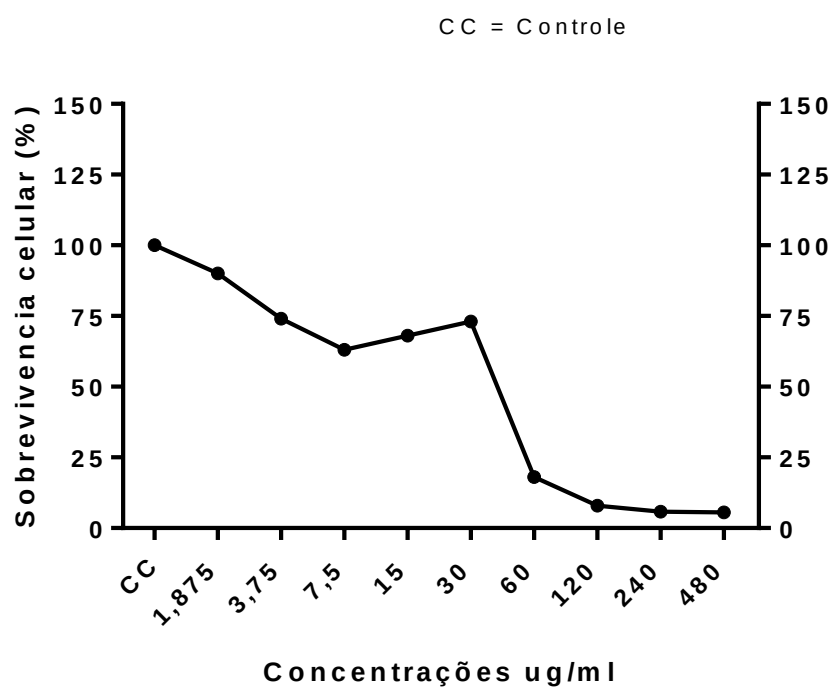
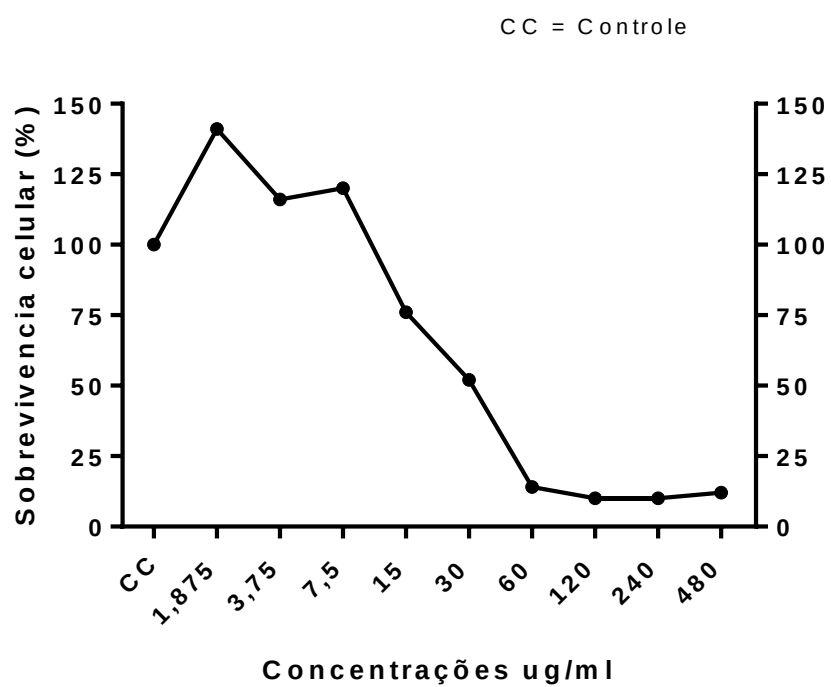


Figura 5: Sobrevivência celular (%) de células hep-2, quando tratadas com diferentes concentrações do extrato bruto de *Actinia bermudensis* durante 24h. Nas três maiores concentrações houve uma baixa sobrevivência celular, voltando a aumentar a partir de 30 ug/ml.

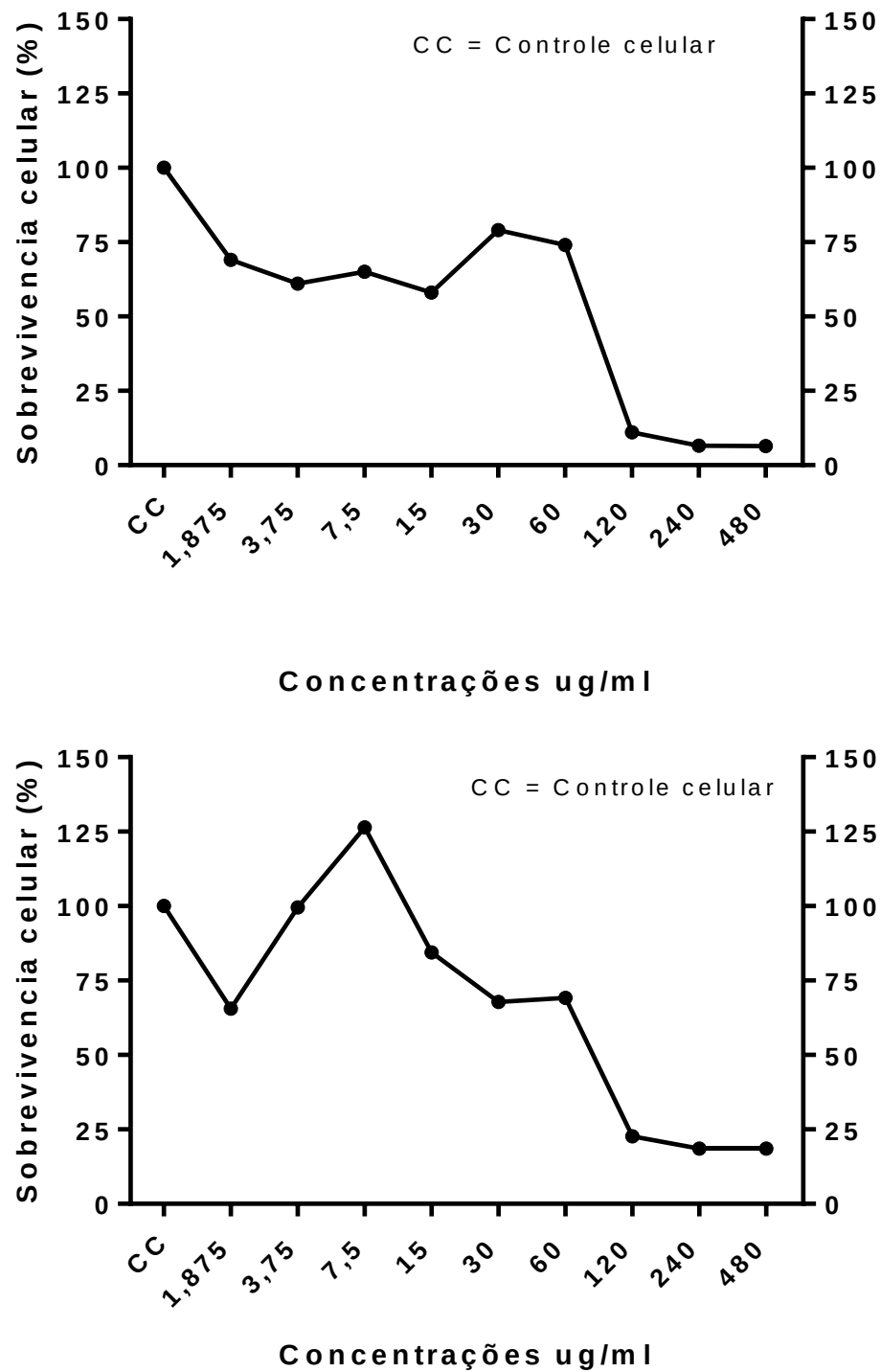


Figura 6: Sobrevivência celular (%) de células hep-2, quando tratadas com diferentes concentrações do extrato bruto de *Actinia bermudensis* durante 48h. O padrão de funcionamento é o mesmo que a aplicação durante as 24h

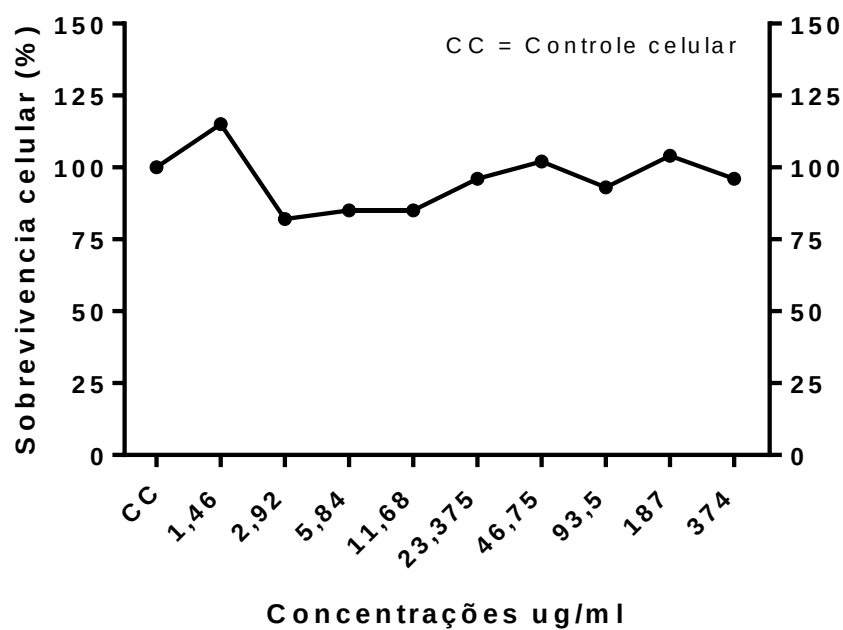
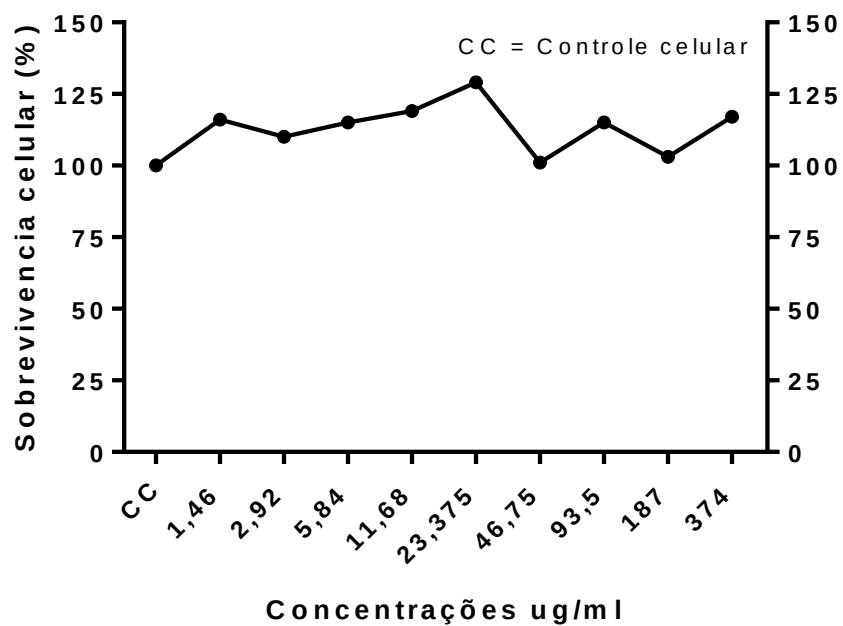


Figura 7: Sobrevivência celular (%) de células hep-2, quando tratadas com diferentes concentrações do extrato bruto de *Pachycerianthus multiplicatus* durante 24h. Nota-se que as concentrações não obtiveram tanto efeito, nunca eliminando 50% ou mais das células

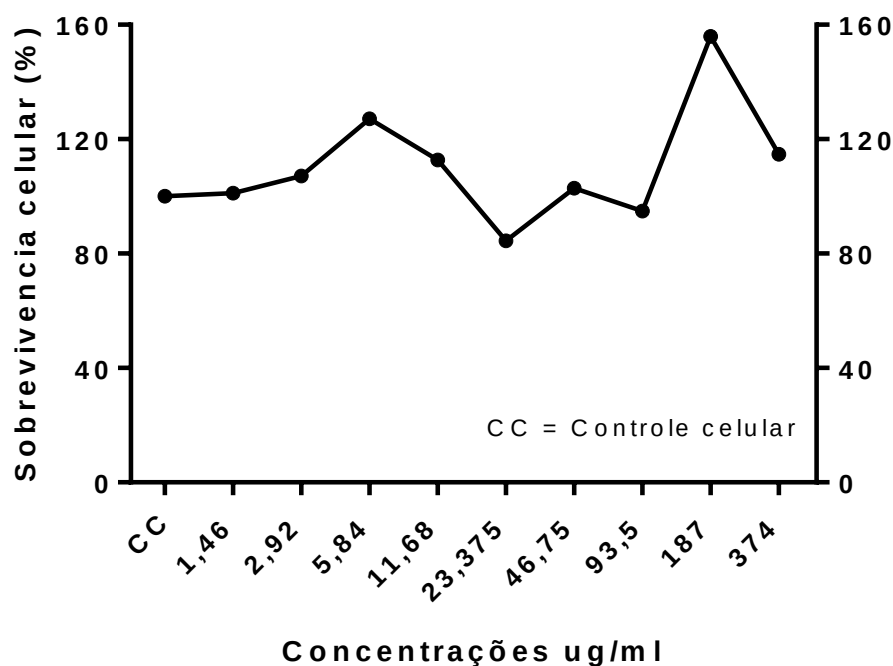
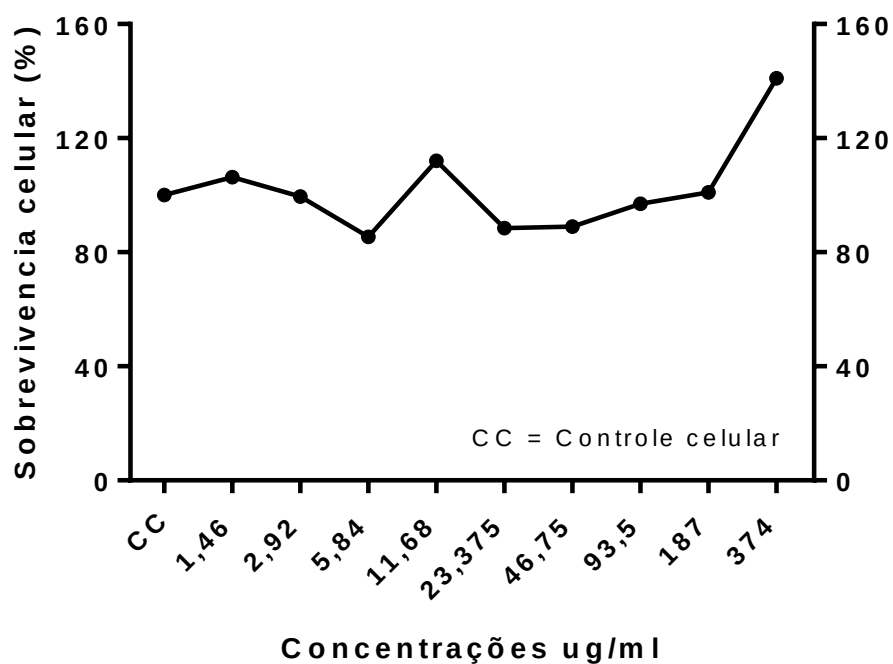


Figura 8: Sobrevivência celular (%) de células hep-2, quando tratadas com diferentes concentrações do extrato bruto de *Pachycerianthus multiplicatus* durante 48h. Mesmo com as células sendo tratadas por mais tempo, as concentrações da toxina não obtiveram 50% ou mais de morte celular.

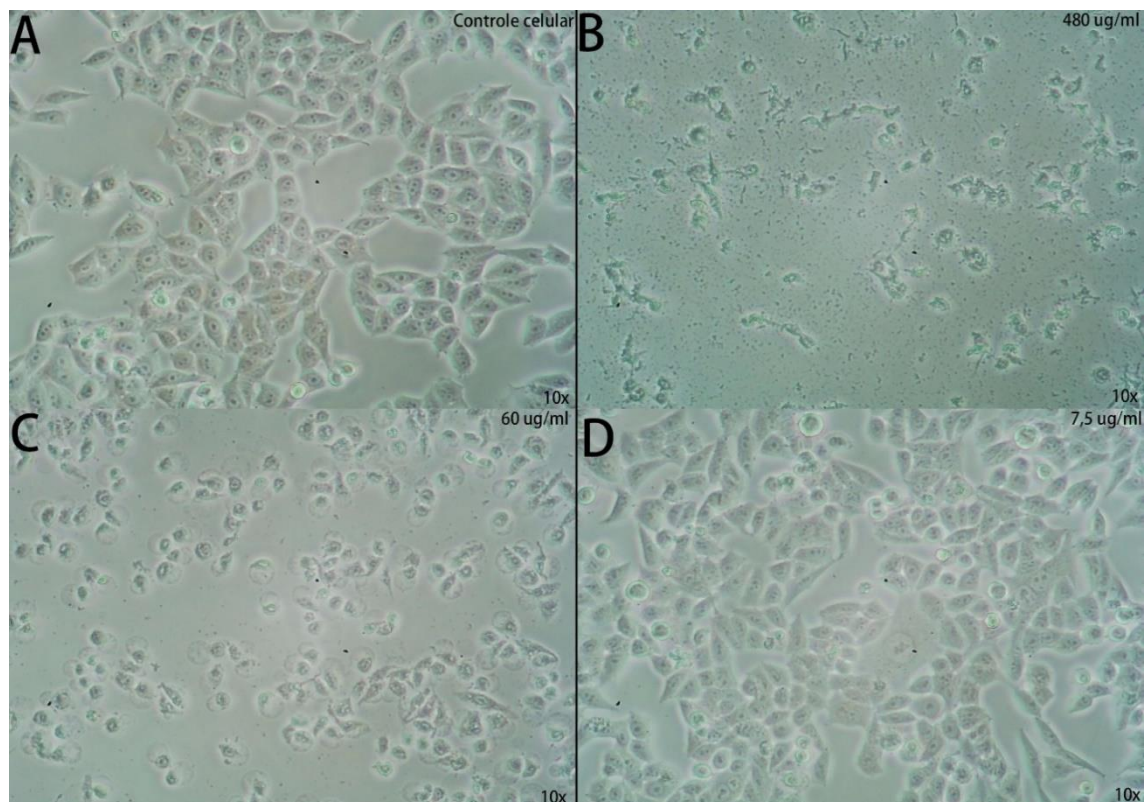


Figura 9: Ação citotóxica *in vitro* da composição de toxinas de *Actinia bermudensis* em células hep-2 durante 24h, no zoom ótico de 10x

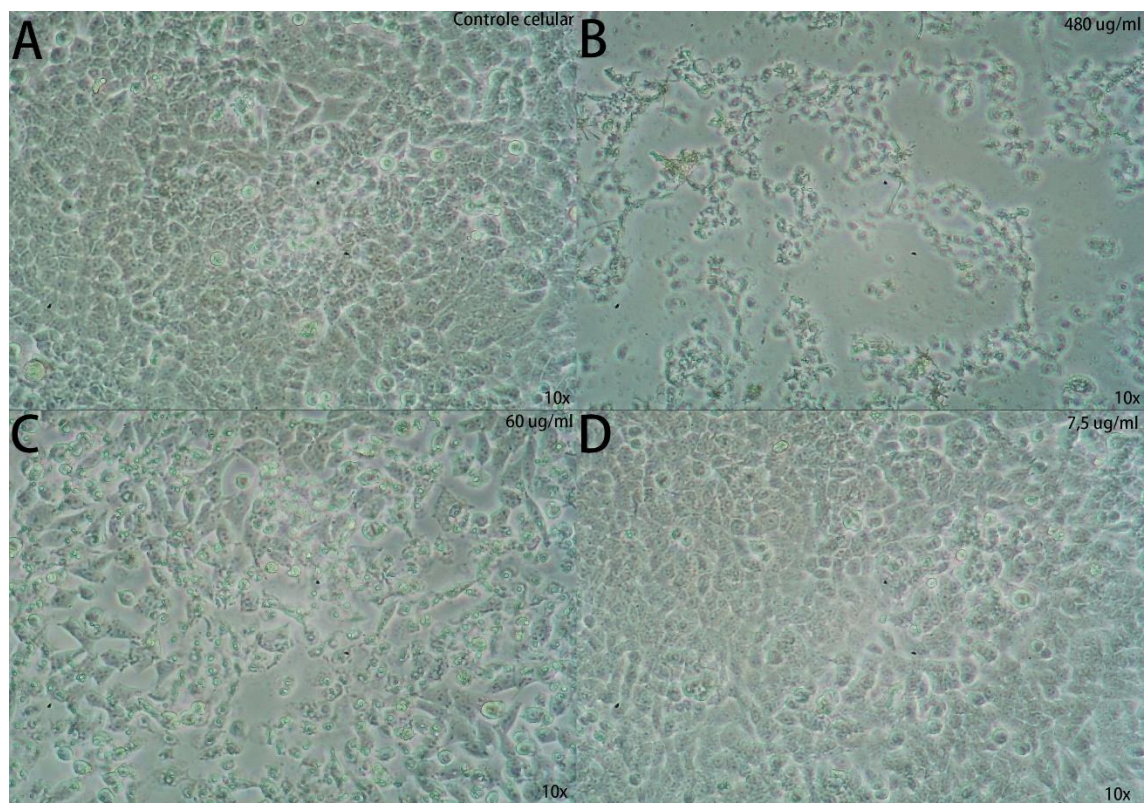


Figura 10: Ação citotóxica *in vitro* da composição de toxinas de *Actinia bermudensis* em células hep-2 durante 48h, no zoom ótico de 10x.

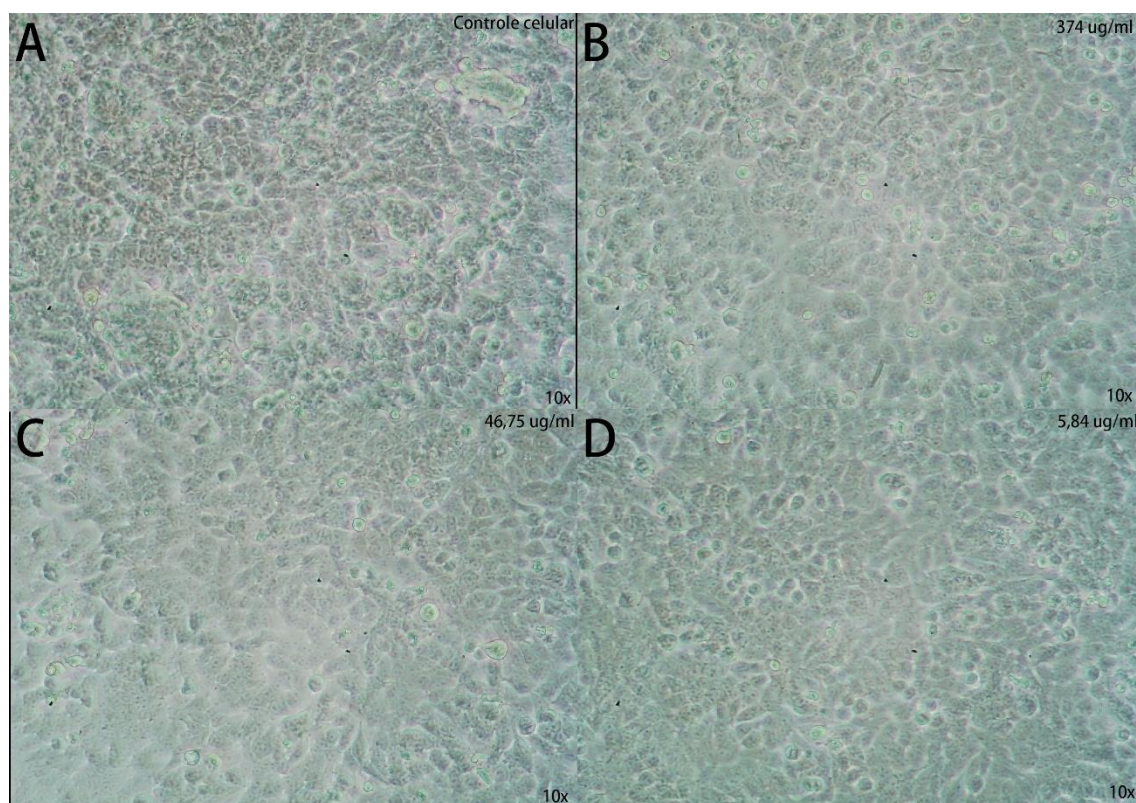


Figura 11: Ação citotóxica *in vitro* da composição de toxinas de *Pachycerianthus multiplicatus* em células hep-2 durante 24h, no zoom ótico de 10x.

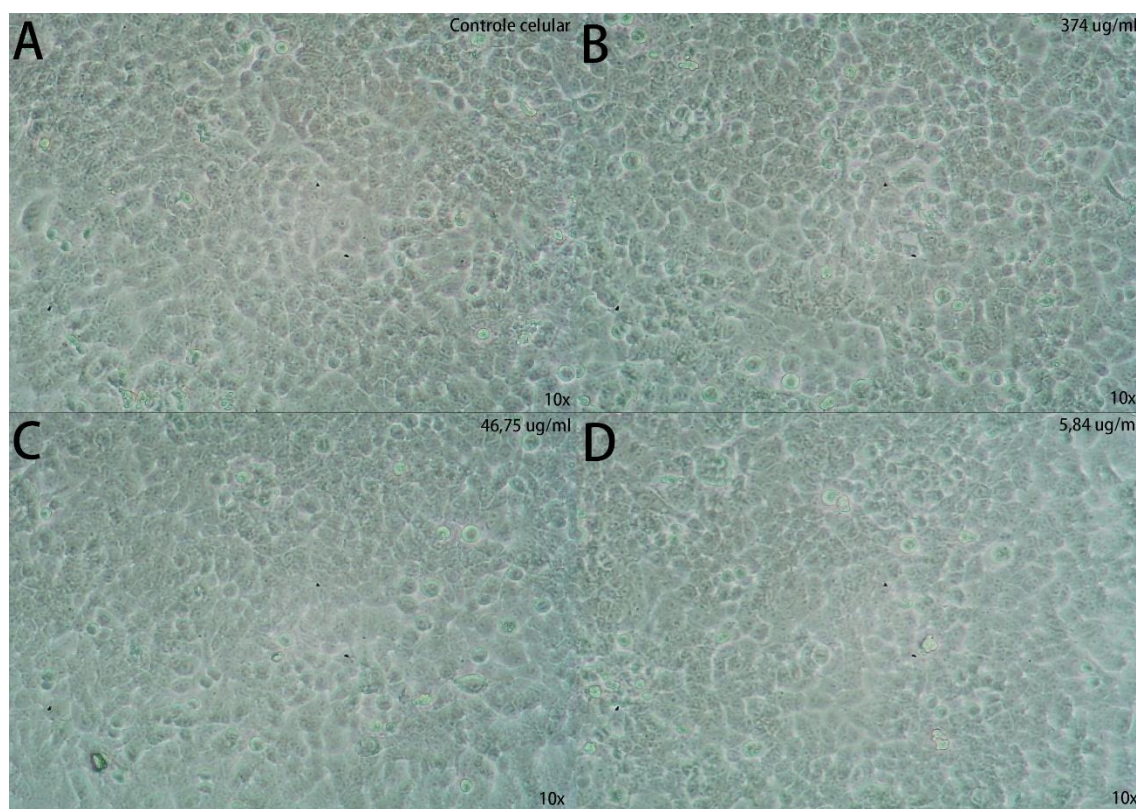


Figura 12: Ação citotóxica *in vitro* da composição de toxinas de *Pachycerianthus multiplicatus* em células hep-2 durante 48h, no zoom ótico de 10x.

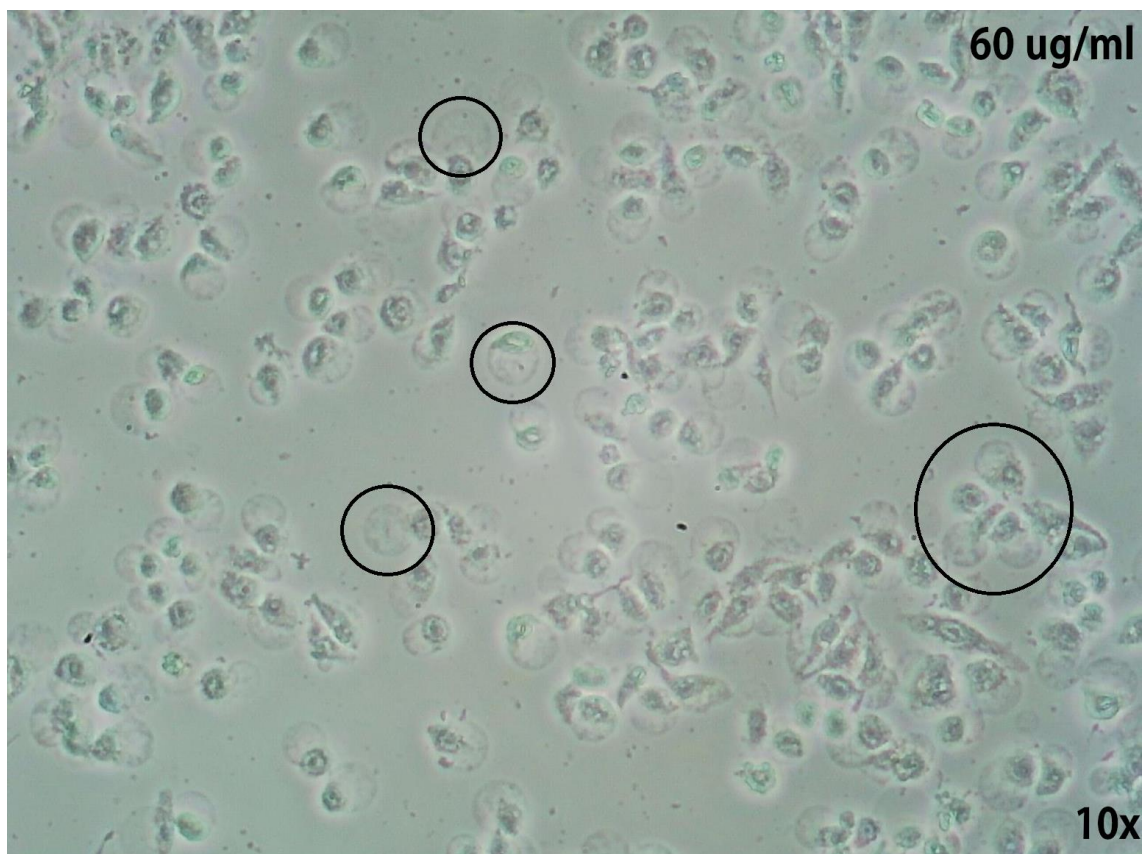


Figura 13: Corps apoptóticos presentes em células hep-2 tratadas com uma concentração de 60 ug/ml da toxina de *Actinia bermudensis* durante 24h.

Células MCF7

As toxinas extraídas de *Ceriantheomorphe brasiliensis* e *Actinia bermudensis* demonstram efeito citotóxico nas células tratadas por 24h, sendo que as maiores concentrações apresentaram os melhores resultados. A toxina extraída de *Ceriantheomorphe brasiliensis* apresentou um IC50 de 50 ug/ml, e os efeitos sobre as células foram dose-dependente, como demonstrado na figura 14.

Já a toxina extraída de *Actinia bermudensis* apresentou também efeitos dose-dependente nas células, porém com sua IC50 podendo ser colocada entre 120 ug/ml e 30 ug/ml (Figura 15), onde o mesmo padrão de funcionamento ocorrido nas células Hep-2 pode ser notado. A toxina de *Pachycerianthus multiplicatus* não apresentou efeitos na célula, mesmo em concentrações mais altas (Figura 17).

Nos testes de 48h, a toxina de *A.bermudensis* continuou demonstrando efeitos nas células, de maneira dose-dependente, com uma IC50 entre 120 ug/ml e 60 ug/ml (Figura 16). Já a de *P. multiplicatus* não apresentou efeitos nas células, durante o teste de 48h, mesmo nas concentrações mais elevadas (Figura 18). As concentrações que mataram 50% ou mais de células, tanto de *C. brasiliensis* quanto de *A.bermudensis*, apresentaram a presença de corpos apoptóticos, indicando o tipo de mecanismo de morte ocorrido nas células.

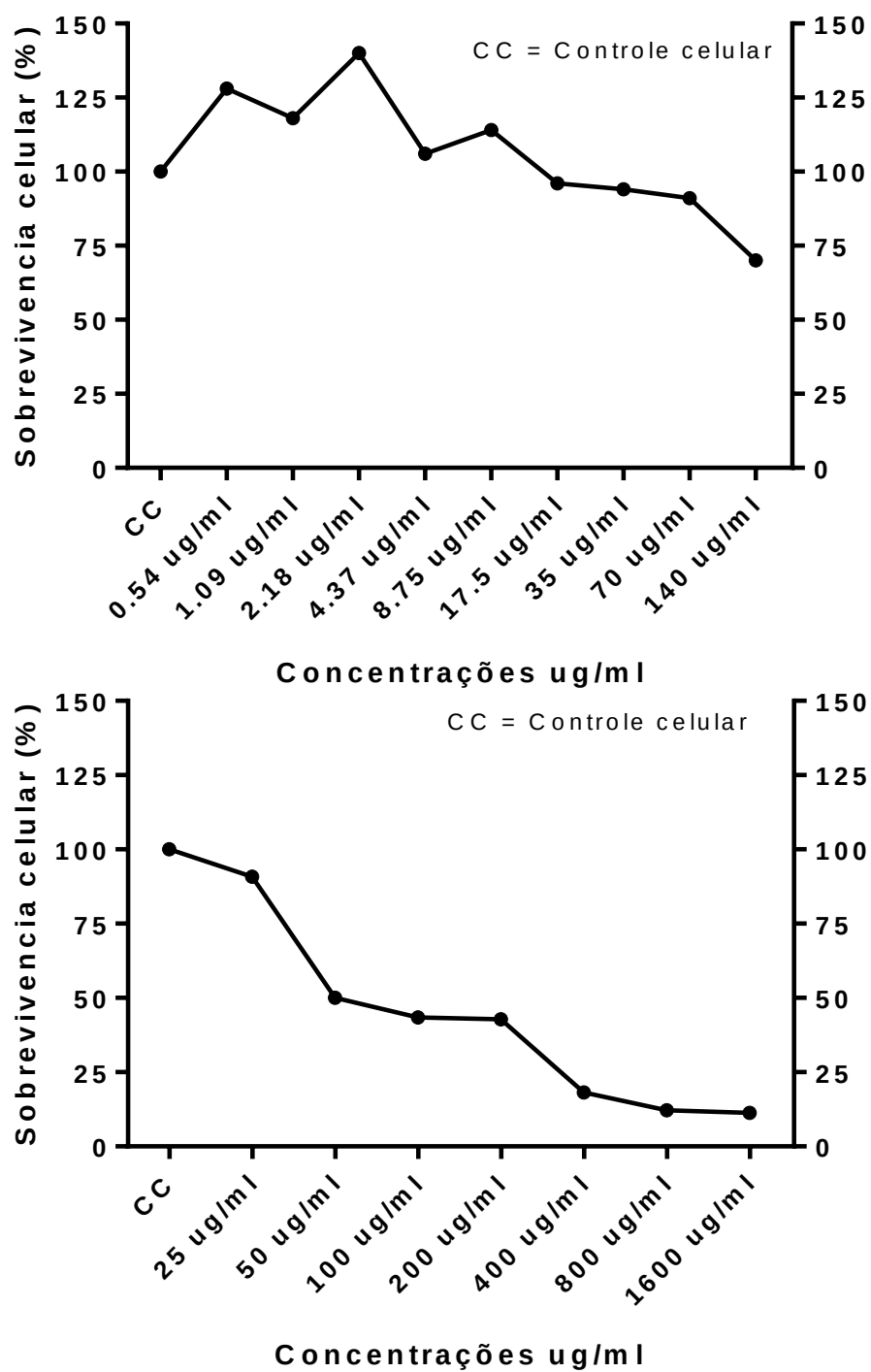


Figura 14: Sobrevivência celular (%) de células MCF7, quando tratadas com diferentes concentrações da toxina de *Ceriantheomorpha brasiliensis* durante 24h. As maiores concentrações mataram mais de 70% das células, e a IC50 ficou em 50 ug/ml

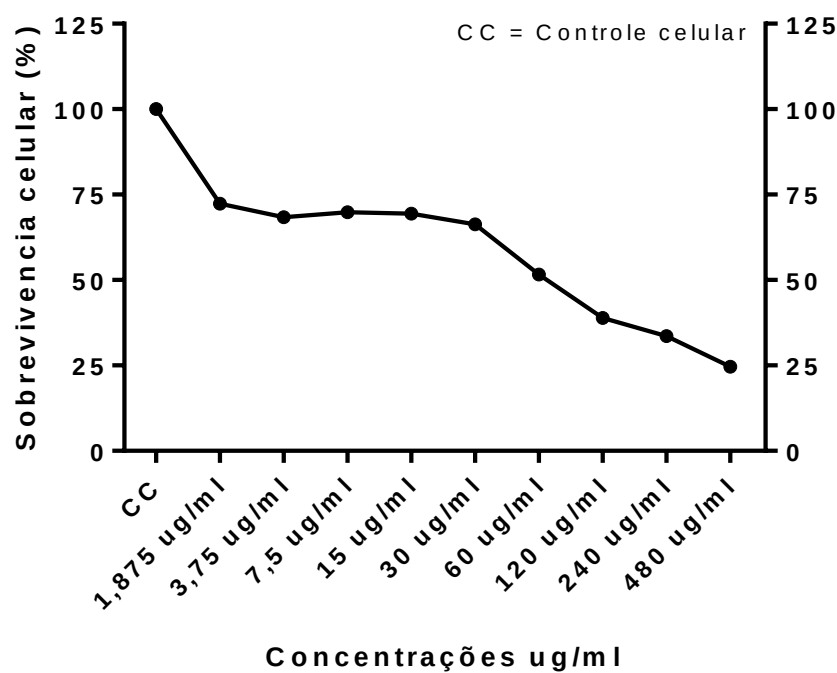
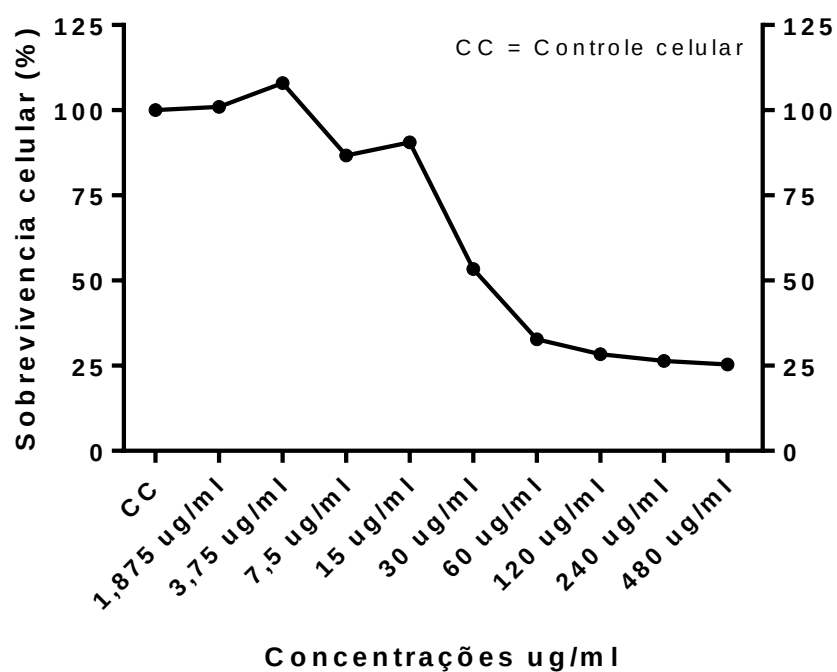


Figura 15: Sobrevivência celular (%) de células MCF7, quando tratadas com diferentes concentrações da toxina de *Actinia bermudensis* durante 24h, com sua IC50 ficando entre 120 ug/ml e 60 ug/ml

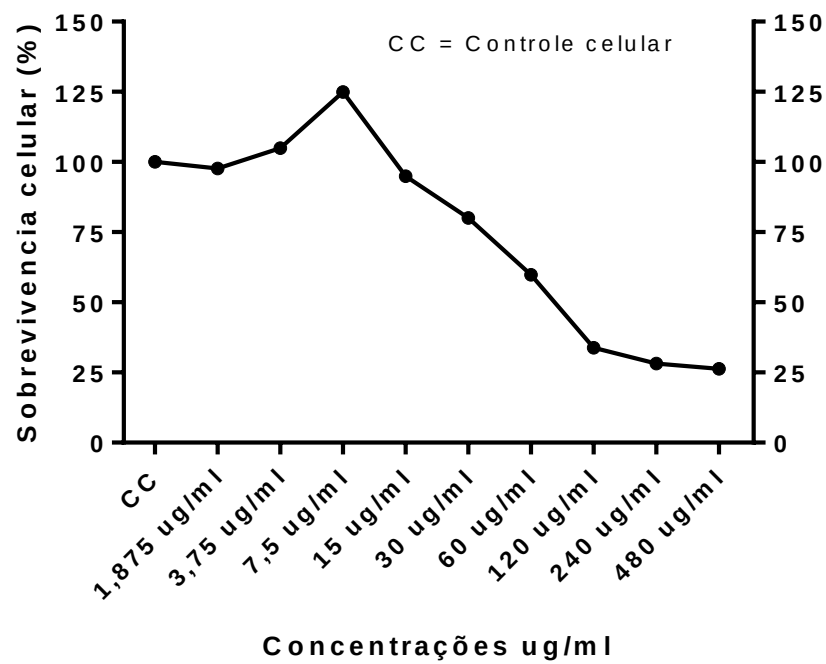
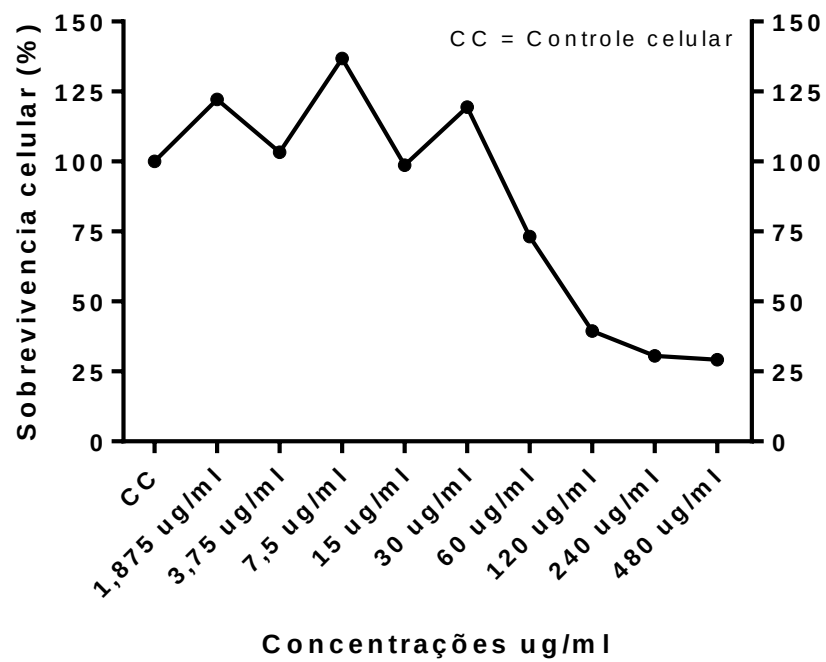


Figura 16: Sobrevivência celular (%) de células MCF7, quando tratadas com diferentes concentrações da toxina de *Actinia bermudensis* 48h, onde a IC50 pode ser colocada entre 120 ug/ml e 60 ug/ml

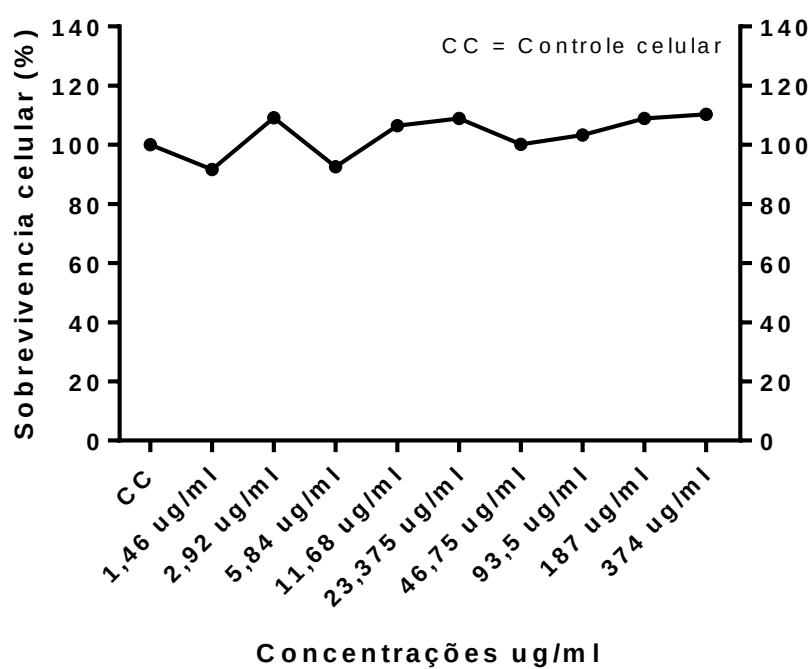
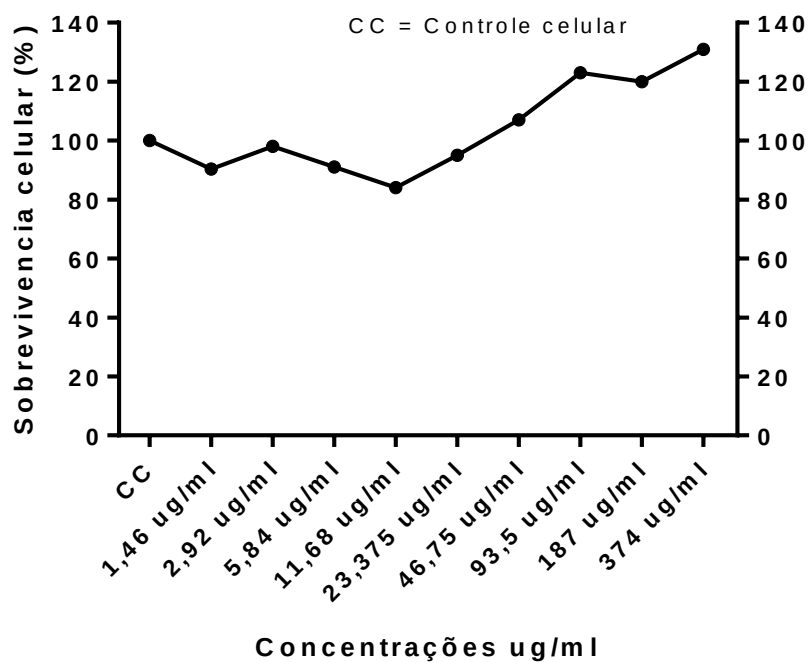


Figura 17: Sobrevivência celular (%) de células MCF7, quando tratadas com diferentes concentrações da toxina de *Pachycerianthus multiplicatus* durante 24h. Não houve efeito citotóxico, mesmo em concentrações mais elevadas

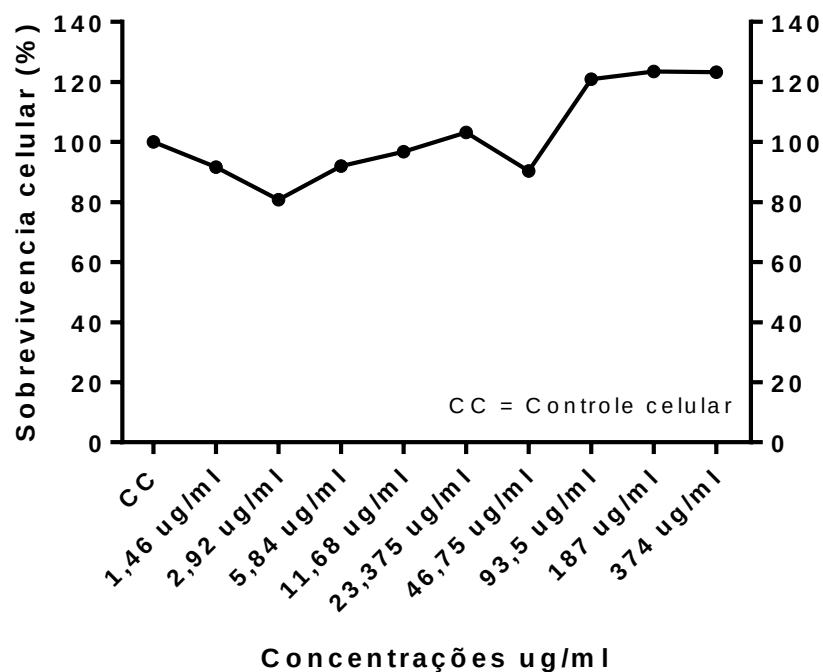
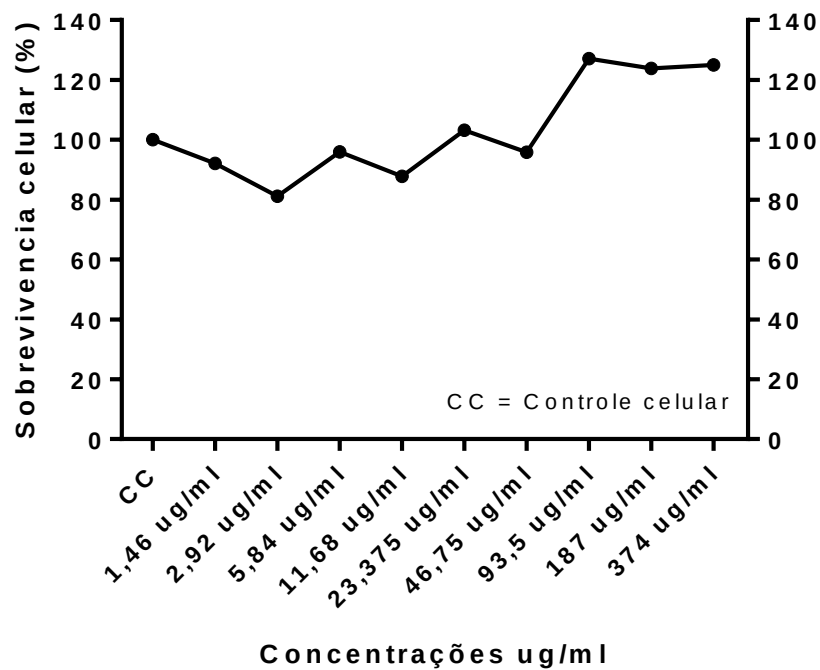


Figura 18: Sobrevivência celular (%) de células MCF7, quando tratadas com diferentes concentrações da toxina de *Pachycerianthus multiplicatus* 48h. Não houve nenhum tipo de efeito da toxina sobre as células, mesmo em concentrações mais elevadas.

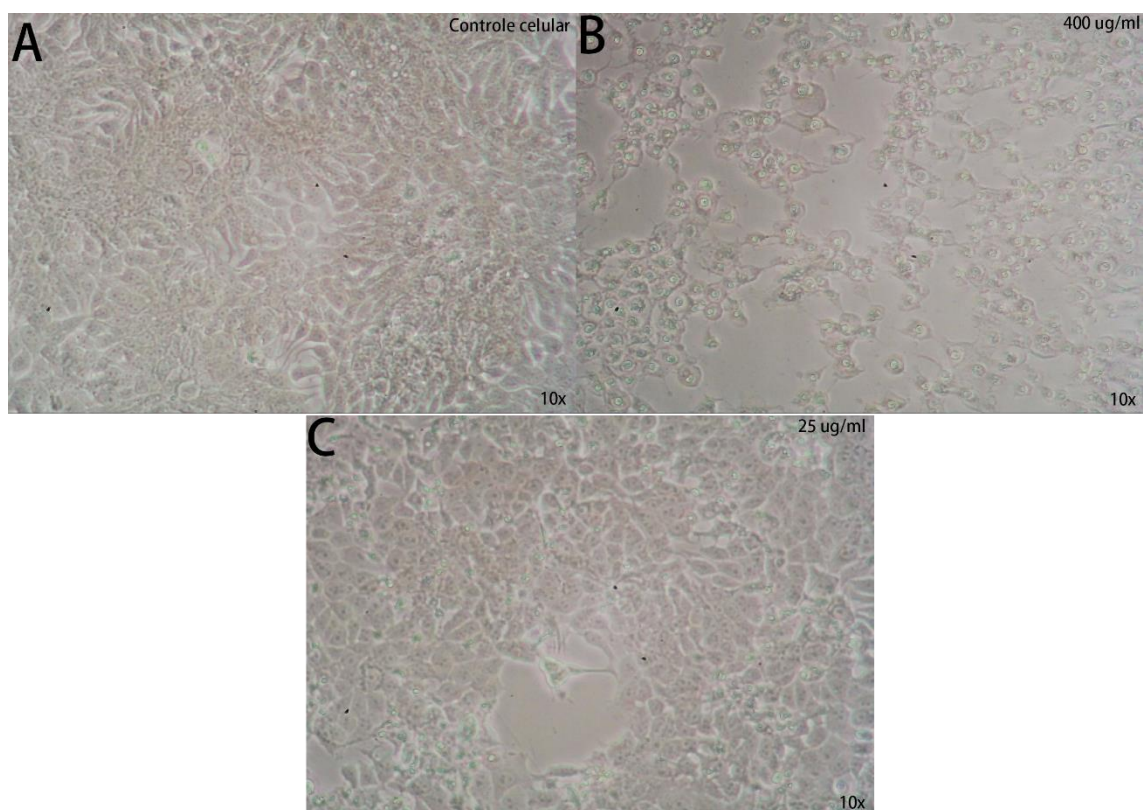


Figura 19: Ação citotóxica *in vitro* da composição de toxinas de *Ceriantheomorphe brasiliensis* em células MCF7 durante 24h, no zoom ótico de 10x.

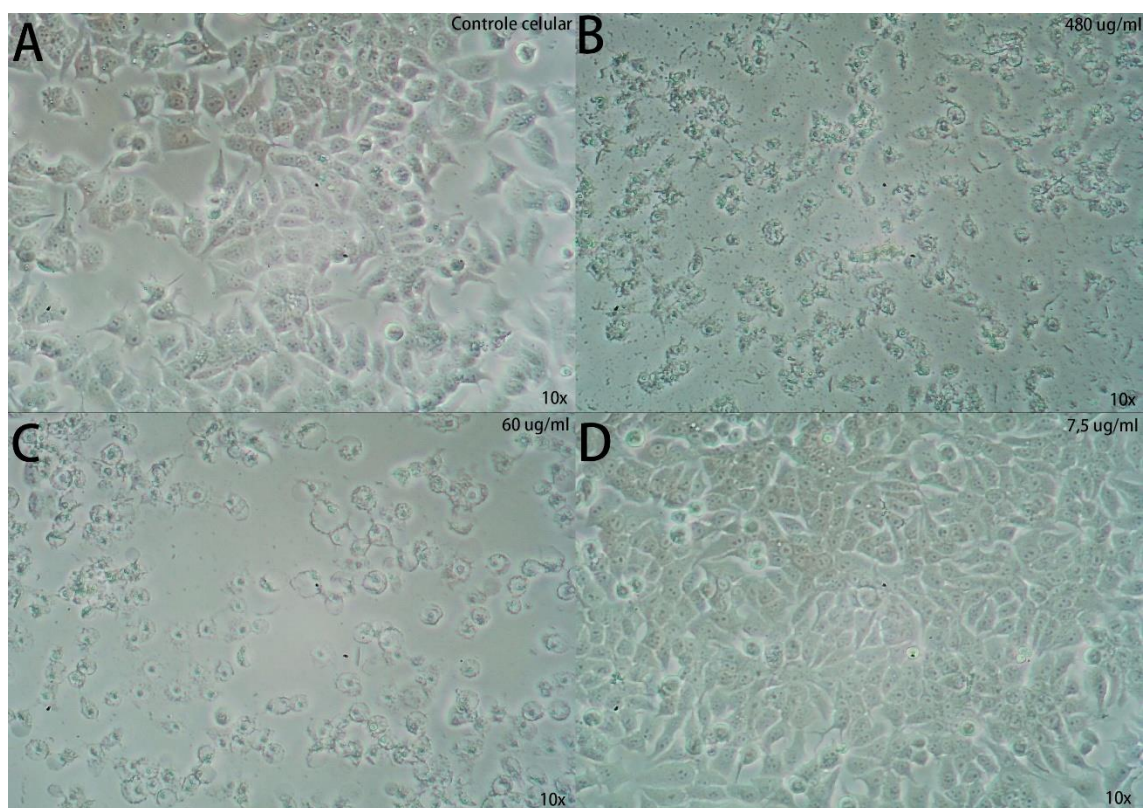


Figura 20: Ação citotóxica *in vitro* da composição de toxinas de *Actinia bermudensis* em células MCF7 durante 24h, no zoom ótico de 10x.

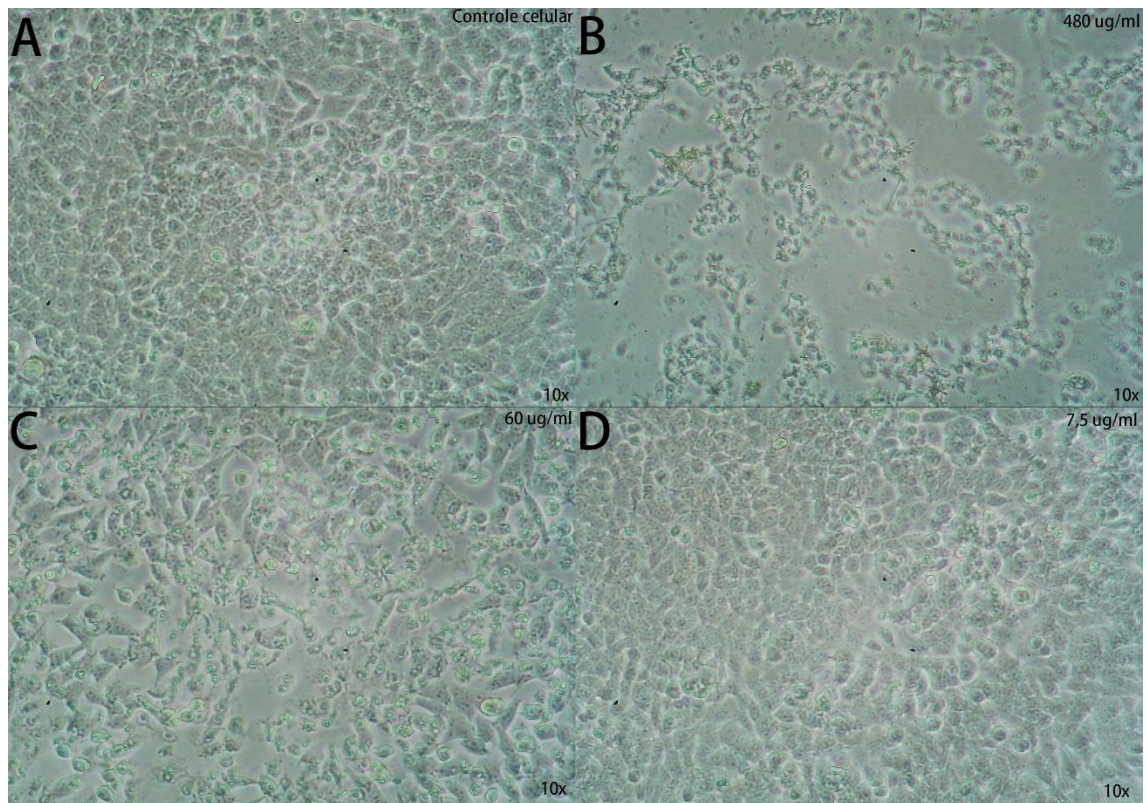


Figura 21: Ação citotóxica *in vitro* da composição de toxinas de *Actinia bermudensis* em células MCF7 durante 48h, no zoom ótico de 10x.

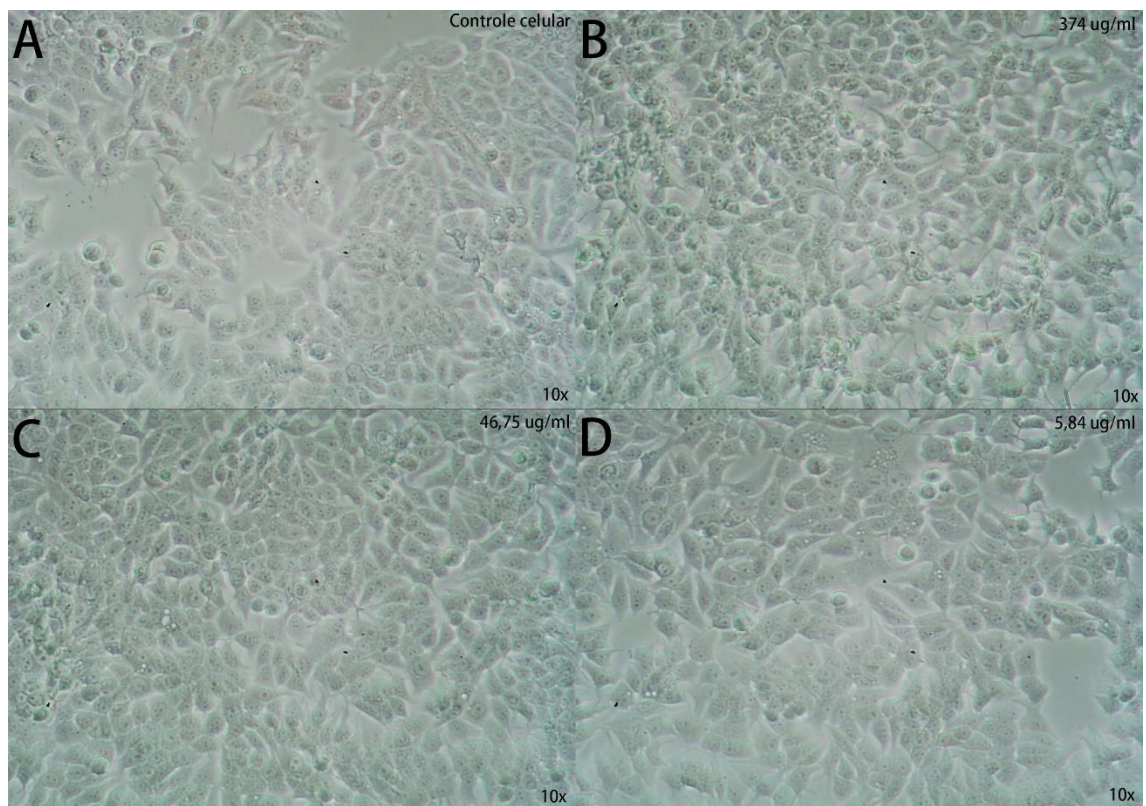


Figura 22: Ação citotóxica *in vitro* da composição de toxinas de *Pachycerianthus multiplicatus* em células MCF7 durante 24h, no zoom ótico de 10x.

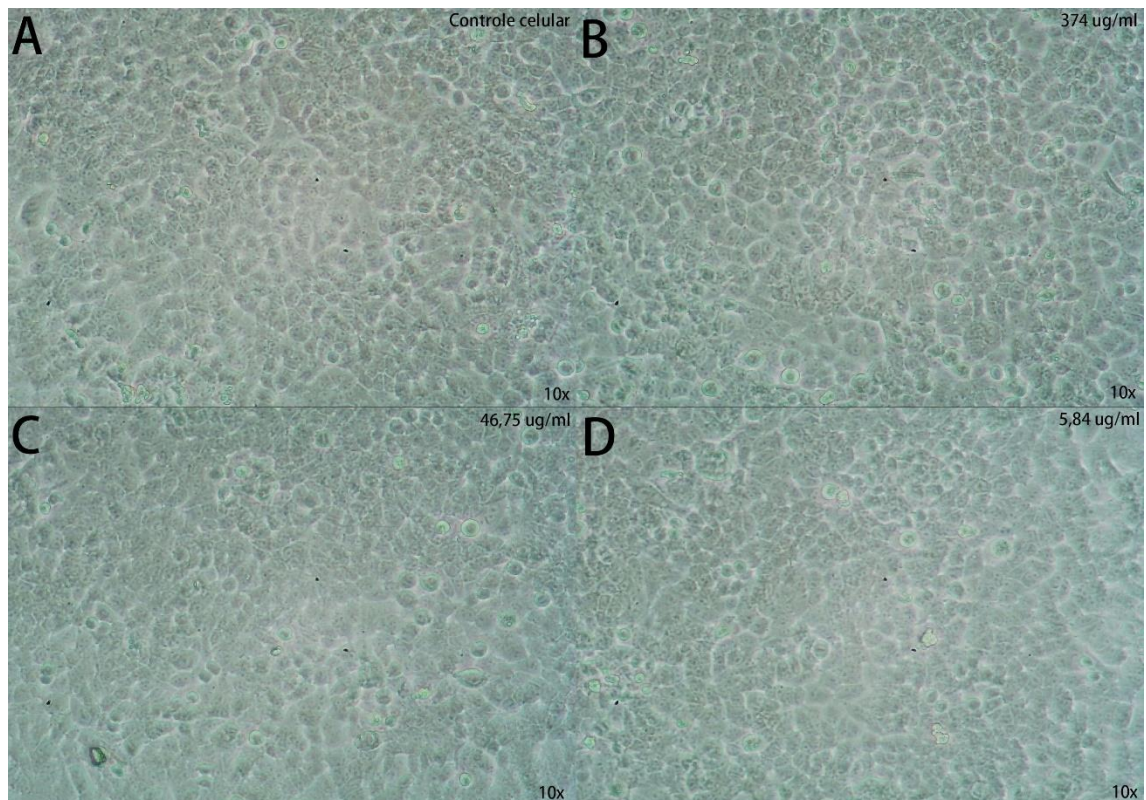


Figura 23: Ação citotóxica *in vitro* da composição de toxinas de *Pachycerianthus multiplicatus* em células MCF7 durante 48h, no zoom ótico de 10x.

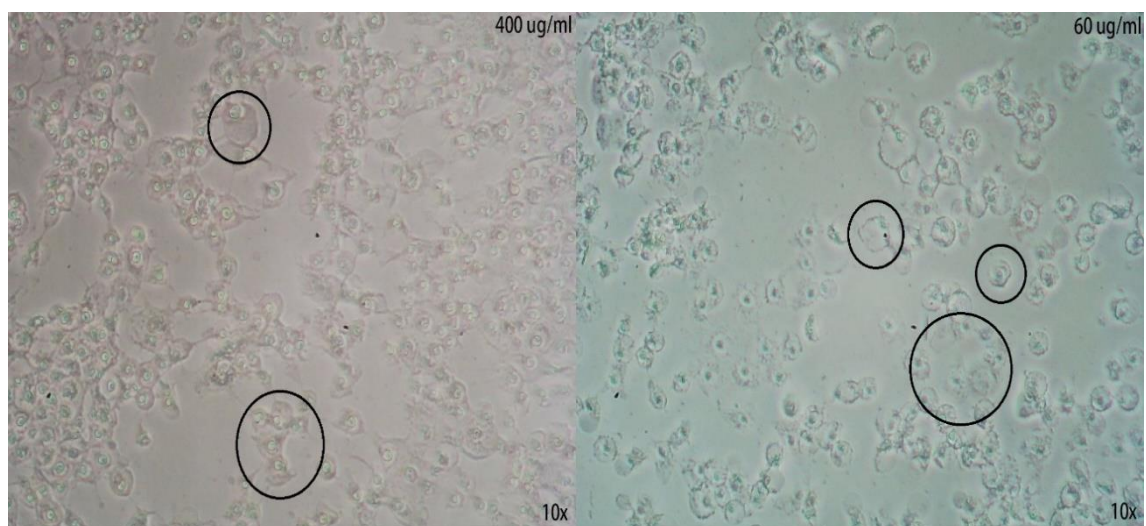


Figura 24: Corpos apoptóticos presentes nas células MCF7, tanto na concentração de 400 ug/ml da toxina de *Ceriantheomorphe brasiliensis* (Esquerda da imagem), quanto na concentração de 60 ug/ml da toxina de *Actinia bermudensis* (Direita na imagem). Os corpos apoptóticos estão presentes nas concentrações que mataram 50% ou mais das células presentes.

2.5.Discussão

O ambiente marinho possui uma complexidade muito grande, e possui uma rica gama de compostos com ações biológicas diversas (Jain et al., 2008), portanto, carregando consigo um grande interesse econômico. Seguindo essa linha, o estudo da citotoxicidade dessas toxinas se torna necessário, para que se possa avaliar com mais clareza a sua utilidade, assim como sua viabilidade econômica e farmacêutica. Este trabalho demonstrou a capacidade antitumoral do extrato bruto extraído dos tentáculos de duas espécies de Cnidaria, *Ceriantemorphe brasiliensis* e *Actinia bermudensis* em células MCF7, onde a IC50 de *C.brasiliensis* ficou em 50 ug/ml e a de *A.bermudensis* entre 120 ug/ml e 60 ug/ml.

Na literatura existem outros trabalhos que testam toxinas de Cnidaria em células MCF7, por exemplo, o extrato cru do octocoral *Sarcophyton sp* teve uma IC50 de 97 ug/mL, uma IC50 menor que a de *C.brasiliensis* e comparada a de *A.bermudensis*, porém esse mesmo extrato conseguiu induzir apoptose nas células, através da análise do núcleo celular das MCF7, procurando por indicadores de apoptose, como núcleo celular fragmentado, semelhante ao ocorrido nas imagens apresentadas nesse estudo. O uso de fibroblastos como controle celular positivo ajuda na comparação da citotoxicidade entre células cancerígenas e células saudáveis, conseguindo delinear as capacidades do composto, no caso do extrato de *Sarcophyton sp* não houve efeitos significativos, logo, sendo benéfico para o futuro do mesmo como potencial droga terapêutica (Dobretsov et al., 2016).

O extrato do coral *Sinularia sp* também demonstrou capacidade antitumoral em células MCF7, com uma IC50 de 47 ug/ml, podendo se comparar a IC50 de *C.brasiliensis*, sendo menos tóxica em linhagens celulares não-cancerígenas, o que soma ainda mais para o potencial do extrato da espécie como futuro agente terapêutico contra o câncer, usando de agentes quimioterapêuticos como a doxorrubicina e o fluorouracil, de padrão positivo para comparação da eficácia anti-tumoral do composto, sendo o extrato de *Sinularia sp* semelhante aos usados nesse estudo, ou seja, material além da peçonha presente em nematocistos, com resultados parecidos na mesma linhagem celular (Zubair et al., 2018). Outras partes anatômicas de Cnidaria podem liberar toxinas, o que permite que outros extratos, como mucos e estruturas corporais,

possam ser estudadas além do nematocisto na procura de compostos biologicamente ativos (Moran et al., 2012; Bastos et al., 2016).

O extrato de *Heteractis magnifica* apresentou ação citotóxica em duas linhagens do câncer de mama (MCF7 e T47D), onde 15 ug/ml conseguiram menos de 10% de sobrevivência celular. Outros pontos analisados foram o aumento significativo da ativação das caspases -3, -8 e -9 quando as células MCF7 foram tratadas com 40 ul/ml do extrato, e o desregulamento do controle do ciclo celular com um tratamento de 40 ul/ml do extrato, tendo um aumento no pico sub G1, com uma queda concomitante na fase G1, comprovando ainda mais a presença de apoptose nos testes dessa concentração. A ativação das caspases apenas reitera a ocorrência de apoptose nas células, podendo ser esse aumento de ativação decorrente das duas vias apoptóticas conhecidas, a via intrínseca e a via extrínseca (Ramezanpour et al., 2013; Lowe et al., 2004).

ECHC (2-ethoxycarbonyl-2- β -hydroxy-a-nor-cholest-5-ene-4one), um extrato de *Acropora formosa*, apresentou ação citotóxica em células MCF7, com uma IC50 de 350 ug/ml durante uma aplicação de 24h, mas não demonstrou toxicidade quando a mesma concentração foi aplicada em células HBL100 saudáveis, demonstrando uma especificidade do composto para com células cancerígenas, já que essa mesma concentração do composto matou cerca de 35% das células saudáveis. Comparativos de imagens permitiram a análise da morfologia das células HBL100 tratadas apenas com meio e com a concentração de 350ug/ml, demonstrando que as células tratadas possuíam a mesma morfologia celular que as células saudáveis, logo, sem efeitos sobre as células vivas. O ECHC demonstrou uma citotoxicidade muito menor em células MCF7 do que as apresentadas por *C.brasiliensis* e *A.bermudensis*, IC50 50ug/ml e entre 120 ug/ml e 30 ug/ml, o que demonstra um potencial citotóxico maior para as duas espécies deste trabalho (Ramalingan & Rajaram, 2018).

O composto ECHC, em um estudo anterior, demonstrou capacidade citotóxica em células A549 (câncer de pulmão), com uma IC50 de 300 ug/ml, e não apresentou nenhuma toxicidade em células HBL100 saudáveis, matando apenas 31% das células viáveis com essa mesma concentração. Análises morfológicas das células, tanto HBL100 quanto A549, e as células HBL100, mesmo tratadas com concentrações de 500 ug/ml não demonstraram mudanças morfológicas, já as células A549, quando tratadas com a IC50, apresentaram

formação de “bolhas” apoptóticas, diminuição de tamanho quando comparado com células A549 não tratadas com o composto. O composto também aumentou a expressão de proteína BAX, uma proteína apoptóticas, assim como regulou negativamente proteína Bcl2, uma proteína anti-apoptótica, isso em concentrações de 350 ug/ml durante 24h, assim como diminuiu a expressão de proteínas MMP2 e MMP9, que tem um papel chave contribuindo para a angiogênese e a invasão de células cancerígenas em outros tecidos, ou metástase, indicando um potencial anitmetastático do composto (Bauvois, 2012; Aalinkel et al., 2011; Vaikundamoorthy et al., 2016). MMPs, supostamente, tem papéis essenciais na regulação de várias funções celulares, como multiplicação, angiogênese, diferenciação celular e migração (Bauvois, 2012). Esses dois estudos demonstram a importância de testes em várias linhagens celulares, como apresentados nesse estudo, onde houve apoptose causada pelo extrato bruto em duas linhagens celulares diferentes, mas com números de sobrevivência celular distintos, onde podemos inferir que as diferenças celulares entre essas duas linhagens tiveram papéis atuantes nesses resultados.

Duas frações extraídas do veneno de *Cassiopea andromeda* tiveram sua toxicidade testada em células do câncer de pulmão coletadas diretamente de pacientes do Surgery Center of Imam Khomeini, Tehran Medical University, Irã, assim como células saudáveis a pelo menos 5 cm de distância do tumor. Uma das frações (40 kDa) demonstrou uma IC50 de 240 ug/ml para células do cancer de pulmão, mas não apresentou toxicidade nas células vizinhas do cancer. A fração também aumentou a produção de espécies reativas de oxigênio, ou ROS (sigla em inglês), em mitocôndrias isoladas das células cancerígenas, cujo possui participação crucial em processos biológicos normais e processos patológicos anormais. O mesmo ROS pode causar danos oxidativos, que em resposta a diversos estímulos, pode estimular a ativação de fatores de transcrição e indução da apoptose, através da liberação do citocromo c. Alguns agentes quimioterápicos como a cisplatina e bleomicina podem causar aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (Matés and Sánchez-Jiménez, 2000; Pelicano et al., 2004; Mirshamsi et al., 2017).

Toxinas extraídas dos nematocistos de *Chrysaora helvola* inibiram o crescimento de células MCF7 e CNE-2 (uma linhagem de câncer da nasofaringe), de uma maneira dose-dependente, em teste de 48h, com uma IC50

de 12 ug/ml e 1.6 ug/ml, respectivamente, com as células CNE-2 demonstrando uma maior sensibilidade a toxina. Esse mesmo extrato de toxinas aumentou a ativação da caspase -4, que não está envolvida em nenhuma das duas vias apoptóticas, mas se encontra presente em uma apoptose mediada pelo estresse no retículo endoplasmático. Existe a possibilidade que essa indução da apoptose seja realizada por alguma via independente de caspase (Huang et al., 2010; Urra et al., 2013; Qu et al., 2016). Duas frações de pesos moleculares diferentes (< 3 kDa e 30 – 100 kDa), extraídas do disco oral de *Stichodactyla haddoni* apresentaram efeito inibitório em células MCF7 durante 24h e 48h, na mesma magnitude de um agente quimioterápico, a doxorrubicina, com uma IC50 de 1400 ug/ml, muito maior do que as IC50 de *C.brasiliensis* e *A.bermudensis*. A metodologia de aplicação usada em Yavari et al., 2019 é semelhante à usada nesse trabalho, com pequenas modificações como a presença da doxorrubicina de controle positivo, logo, em comparativo entre os dois trabalhos, os extratos de *C.brasiliensis* e *A.bermudensis* demonstram maior potencial citotóxico, sendo necessários testes de identificação de apoptose e se os dois extratos são tóxicos a células humanas saudáveis para um melhor panorama. O peso das frações usadas por Yavari et al., 2019 se liga ao conhecimento de que as citolisinas, um grupo presente nas toxinas de cnidária capaz de comprometer a estrutura da membrana celular, variam em quatro tipos, indo de 5 – 8 kDa a 40 kDa (Tipo III) (Yavari et al., 2019; Anderluh & Macek, 2002).

O uso da própria maquinaria da célula é um método extremamente efetivo, e com uma grande chance de sucesso entre os métodos não cirúrgicos. E ter a apoptose como objetivo a ser atingido com as moléculas testadas é ótimo plano, já que a capacidade de não sofrer da célula cancerígena é não específica, ou seja, está presente em todos os tipos de câncer. Existem vários tipos de drogas e extratos que atuam em diferentes estágios das vias extrínsecas e intrínsecas, mas existem dois tipos de situações mais “comuns”, que são a estimulação da produção de proteínas pró-apoptóticas, e a supressão de proteínas anti-apoptóticas (Liu & Zhu, 2017; Bao et al., 2017; Villa-Pulgarin et al., 2017)

A presença desses corpos apoptóticos indicam que as células passaram pela apoptose, normalmente causada pelas citolisinas presentes na toxina de Cnidaria, logo, indicando a presença desse grupo de polipeptídios nas toxinas testadas nesse trabalho. Em um estudo ainda não publicado sobre a

caracterização da toxina de *C.brasiliensis*, foi encontrado um tipo de citolisina e alguns tipos de fosfolipase, que em alguns casos podem agir como citolisinas, desregulando a integridade da membrana celular (Oshiro et al., 2004; Cline et al., 1995).

A presença de citolisinas na toxina de *A.bermudensis* pode ser inferida através dos resultados apresentados neste trabalho, assim como supostamente pode conter a presença de equinotixinas, uma actinoporina encontrada em *Actinia equina*, uma espécie irmã a *Actinia bermudensis*. Essa equinotoxina foi testada *in vivo* e *in vitro*, em células do tumor de Ehrlich e L1210 (leucemia), apresentando resultados satisfatórios antitumorais *in vitro* nas duas células e *in vivo* em células do tumor de Ehrlich inoculadas em camundongo (Giraldi et al., 1976).

A quantidade de estudos em células MCF7 é compreensível, já que o câncer de mama é o tipo mais comum que acomete mulheres, sendo responsável por 15% dos óbitos por câncer em mulheres e 30% dos novos casos (Siegel et al., 2019), e a resistência adquirida a agentes anticancerígenos durante o tratamento, mas existem outros trabalhos usando toxinas de Cnidaria em uma miríade de linhagens cancerígenas e também para outros fins.

O câncer é uma doença global, que acomete 6 milhões de pessoas por ano, sendo uma das principais causas de morte no mundo, assim como um grande peso na economia mundial. O câncer nada mais é do que uma proliferação anormal de células e tecidos, possuindo fatores de risco dos mais diversos, como genética, mutações de genes relacionados ao câncer e até mesmo um tipo de dieta específica. Existem alguns tratamentos para o câncer disponibilizados para a população, como quimioterapia (que visa a indução de apoptose de células cancerígenas) e cirurgias de remoção, mas infelizmente são limitados por fatores como eficácia, efeitos colaterais, e características inatas ao câncer, como a metástase (Siegel et al., 2019; Macdonald et al., 2018; Kumar & Adki, 2018; Miller et al., 2019). A metástase em si começa com o desprendimento de algumas células do tumor de origem, ou tumor primário, que conseguem adentrar no sistema linfático ou circulatório, e quando nessas correntes, consegue se espalhar para tecidos/órgãos mais distantes (Weinberg, 2013; Engers & Gabbert, 2000).

Uma actinoporina isolada de *Heteractis crisper* demonstrou atividade citotóxica em células HeLa, THP-1 (Leucemia monocítica), SNU-C4 (Câncer de colon), MDA MB 231 (Câncer de mama), HL-60 (Leucemia) e em células JB6 Cl41 de camundongo, com as respectivas IC50: 2.26 nM, 1.11 nM, 4.66 nM, 4.64 nM, 1.06 nM e 0.57 nM. A actinoporina conseguiu induzir apoptose independente do gene p53, uma característica observada em agentes anticarcinogênicos conhecidos, como o gingerol, a curcumina, a genisteína, entre outros (Fedorov et al., 2010; Park et al., 2006; Tsvetkov et al., 2005; Lian et al., 1999).

A toxina de *Pelagia noctiluca*, quando aplicada em HCT 116 (câncer de cólon), demonstrou excelente atividade antitumoral com uma IC50 de 320 µg/ml e fragmentação do DNA, uma das características marcantes da apoptose. (Ayed et al 2011; Saraste, 2000). Toxinas de *Nemopilema nomurai* e *Cyanea nozakii* apresentaram ação citotóxica quando aplicadas por 24h em células A431 (Carcinoma epitelial), com uma IC50 68.6 µg/ml e 40.9 µg/ml, assim como ação hemolítica em eritrócitos de ovelha, com EC50 de 69.69 µg/ml e 63.62 µg/ml, respectivamente. Entender a ação de proteínas hemolíticas é importante para elucidar os efeitos tóxicos das picadas de água-viva, principalmente de espécies que vem tendo blooms em áreas de importância econômica. (Dong et al., 2010; Li et al., 2013; Pang et al., 2018).

O extrato bruto de *Chiropsalmus quadrigatus* demonstrou uma inibição do crescimento em células U251, C6 e ECV 304, e aumentou a expressão do gene p53, diferente de outro estudo citado neste texto onde a apoptose era p53 independente (Sun et al., 2002). Duas frações (30 – 50 kDa e 10 – 30 kDa) derivadas do muco de *Stichodactyla haddoni* apresentam um enorme potencial como candidatas a terapia contra o câncer, pois apresentaram diminuição em 50% da viabilidade celular com uma IC50 de 8.4 µg/ml (isto para a fração 1, que foi a mais citotóxica) e também regulação positiva de proteínas pró-apoptóticas (BAX e BAK) e uma supressão do gene anti-apoptótico BCL2 (Abdzadeh et al., 2020).

Além dos testes com extratos brutos e frações, um novo caminho a ser tomado é o dos transcriptomas. Um transcriptoma de um peptídeo de *Actinia tenebrosa* demonstrou uma atividade citotóxica moderada em duas linhagens celulares do câncer de mama, e a síntese de peptídeos via transcriptoma pode ser tomada como alternativa a uma produção sustentável de moléculas para

terapia do câncer, caso drogas baseadas nessas moléculas produzidas por animais marinhos adentrassem no mercado, podendo acarretar problemas ecológicos como destruição de ambientes, número de indivíduos de uma população e afins (Elnahriry et al., 2019; Proksch et al., 2002; Newman et al., 2000; Mendola, 2000).

Os extratos de Cnidaria, além de terem um potencial para a descoberta de novos agentes terapêuticos contra o câncer, podem servir como “melhoradores” aos agentes quimioterapêuticos já existentes. Extratos derivados da toxina de *Bunodeopsis globulifera*, assim como seu extrato bruto, aumentaram a capacidade antitumoral da cisplatina, um conhecido agente quimioterápico, indicando o uso da cisplatina abaixo da sua IC50 (quando utilizada em conjunto com os extratos), o que pode levar a diminuição dos efeitos colaterais causados pela quimioterapia (Monroy-Estrada et al., 2013). Os compostos Bc2 e EqTx-II foram extraídos das toxinas de *Bunodosoma caissarum* e *Actinia equina*, respectivamente, não só demonstraram ação citotóxica em células U87 e A172 (ambas de glioblastoma, com a U87 tendo o gene p53 tipo selvagem e a A172 o gene p53 tipo mutante), como em concentrações consideradas não-citotóxicas melhoraram as capacidades de três agentes quimioterápicos, o Ara-C, a vincristina e a doxorrubicina, com aumentos da ação em até 300 vezes (Soletti et al., 2008).

Saindo do campo da oncologia, extratos da toxina de Cnidaria apresentam características que possam levar a futuros caminhos em outras áreas. O extrato bruto de *Palythoa caribaeorum* apresenta ações hemolíticas, anti-giardial e ação inseticida, com paralisia gradual em grilos, demonstrando potencial no controle de pragas e na agricultura (Lazcano-Pérez et al., 2018). Já compostos isolados de *Macrorhynchia philippina* tiveram resultados moderados contra *Trypanosoma cruzi*, porém esses efeitos foram as duas formas do *T. cruzi*, amastigota e tripomastigota, uma característica crucial para o tratamento da doença de chagas (Lima et al., 2019; Chatelain, 2015). A toxina dos nematocistos de *Pelagia noctiluca* tiveram efeitos analgésicos e antibutirilcolinesterase, sem induzir toxicidade aguda. A ação analgésica da toxina de *Pelagia noctiluca* foi cerca de 128 vezes maior que a do paracetamol, testada através da contorção induzida por ácido ascético em camundongos, logo, podemos considerar o

potencial da toxina como agente no tratamento de dores e doenças neurodegenerativas (Ayed et al., 2012; Sakthivel, 1999).

A área de estudo sobre as toxinas de Cnidaria ainda é um grande continente a ser explorado, já que entre mais de 1100 espécies de anêmonas do mar, apenas cerca de 4% dos compostos que habitam nas toxinas foram examinados (Prentis et al., 2018), onde 33,5% dos produtos naturais de origem marinha descobertos até 2012 são pertencentes ao filo Cnidaria.

2.5.Conclusão final

Este estudo nos permitiu analisar a citotoxicidade do composto de toxinas de *Ceriantheomorpha brasiliensis*, *Actinia bermudensis* e *Pachycerianthus multiplicatus* e aferir sua capacidade antitumoral em células MCF7 e HEP-2. As espécies usadas nesse estudo carecem de informações acerca dos seus extratos, e o campo de estudo em linhagens cancerígenas oferece um terreno fértil para podemos aferir seu potencial, tanto como futuro agente terapêutico ou até mesmo sendo usado com produtos mais convencionais no combate ao câncer, a fim de aumentar a ação e diminuir a concentração usada. Os resultados obtidos aqui nos permitem inferir alguns pontos sobre o funcionamento desse extrato bruto, como sua capacidade de formar corpos apoptóticos, evidenciando a indução a apoptose, e a ação quase semelhante em duas linhagens celulares tumorais diferentes. Estudos em outras linhagens celulares, cancerígenas ou não, serão necessárias para que se consiga identificar a ação desses extratos, assim como seu efeito em células humanas saudáveis, sempre visando a elucidação do funcionamento e dos mecanismos do extrato.

2.6.Agradecimentos

Esse estudo foi realizado graças aos companheiros do Laboratório de evolução e diversidade aquática (LEDA) e do Laboratório de imunologia de neutrófilos e vírus (LAINV) da UNESP Assis.

2.7.Referencias

- Aalinkeel, R., Nair, B. B., Reynolds, J. L., Sykes, D. E., Mahajan, S. D., Chadha, K. C., Schwartz, S. A. (2011). **Overexpression of MMP-9 Contributes to Invasiveness of Prostate Cancer Cell Line LNCaP**. Immunological Investigations, 40(5), 447–464.
- Abdzadeh, E., Heidari, B., & Hadavi, M. (2020). **Sea anemone (Stichodactyla haddoni) induces apoptosis in lung cancer A549 cells: an in vitro evaluation of biological activity of mucus derivatives**. Biologia.
- Akers, J. C., Gonda, D., Kim, R., Carter, B. S., & Chen, C. C. (2013). **Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies**. Journal of Neuro-Oncology, 113(1), 1–11.
- Anderluh, G., Macek, P. (2002) **Cytolytic peptide and protein toxins from sea anemones (Anthozoa: Actiniaria)**. *Toxicon* 40, 111–124.
- Appeltans, W., Ahyong, S.T., Anderson, G., Angel, M.V., Artois, T., Bailly, N, et al. (2012). **The magnitude of global marine species diversity**. Curr Biol.;22: 2189–2202.
- Ayed, Y., Boussabbeh, M., Zakhama, W., Bouaziz, C., Abid, S., & Bacha, H. (2011). **Induction of cytotoxicity of Pelagia noctiluca venom causes reactive oxygen species generation, lipid peroxidation induction and DNA damage in human colon cancer cells**. Lipids in Health and Disease, 10(1), 232.
- Ayed, Y., Dellai, A., Ben Mansour, H., Bacha, H., Abid, S. (2012). **Analgesic and antibutyrylcholinestasic activities of the venom prepared from the Mediterranean jellyfish Pelagia noctiluca**. Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob. 11, 15.
- Bao, H., Zhang, Q., Zhu, Z. et al. (2017) **BHX, a novel pyrazoline derivative, inhibits breast cancer cell invasion by reversing the epithelial-mesenchymal transition and down-regulating Wnt/ β -catenin signalling**. Sci Rep 7, 9153
- Bastos, C. L. Q., Varela, A. S., Ferreira, S. P., Nornberg, B. F., and Boyle, R. T. (2016). **Who knows not where an anemone does wear his sting? Could polypeptides released from the columnar vesicles of *Bunodosoma cangicum* induce apoptosis in the ZF-L cell line?** *Toxicon* 124, 73–82.
- Bauvois, B. (2012). **New facets of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 as cell surface transducers: Outside-in signaling and relationship to tumor progression**. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer, 1825(1), 29–36.

- Beckmann, A., Özbek, S. (2012). **The nematocyst: a molecular map of the cnidarian stinging organelle**. *Int. J. Dev. Biol.* 56, 577e582.
- Botana, L. M. (2014). **Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology, and Detection**, CRC Press.
- Brusca, R.C., Brusca, G.J. (2002). **Invertebrates 2nd ed.** Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts.
- Chatelain, E. (2015). **Chagas Disease Drug Discovery**. *Journal of Biomolecular Screening*, 20(1), 22–35.
- Cline, E., Wiebe, L., Young, J., Samuel, J. (1995). **Toxic effects of the novel protein UPI from the sea anemone**. *Pharmacological Research*, 32(5).
- Daly, M, Brugler, M.R, Cartwright, P, Collins, A.G, Dawson, M.N, Fautin, D.G, et al. (2007). **The phylum Cnidaria: A review of phylogenetic patterns and diversity 300 years after Linnaeus**. *Zootaxa*. Magnolia Press;1668: 127–182.
- David, C.N., Özbek, S., Adamczyk, P., Meier, S., Pauly, B., Chapman, J., Hwang, J.S., Gojbori, T., Holstein, T.W. (2008). **Evolution of complex structures: minicollagens shape the cnidarian nematocyst**. *Trends Genet.* 24, 431e438.
- Dobretsov S., Tamimi Y., Al-Kindi MA., Burney I. **Screening for Anti-Cancer Compounds in Marine Organisms in Oman**. *Sultan Qaboos Univ Med J.* 2016;16(2)
- Dong, Z., Liu, D., & Keesing, J. K. (2010). **Jellyfish blooms in China: Dominant species, causes and consequences**. *Marine Pollution Bulletin*, 60(7), 954–963.
- Doumenc, D.A., Van Praët, M. (1987) **ORDRE des Actiniaires, ordre des Ptychodactiaires, ORDRE des Corallimorphes**. In: Grassé, P.P. (Ed), *Traite de Zoologie*, Tome III, Fascicule 3, Cnidaires Anthozoaires. Masson, Paris, pp. 257–401.
- Elnahriry, K. A., Wai, D. C. C., Krishnarjuna, B., Badawy, N. N., Chittoor, B., MacRaid, C. A., ... Norton, R. S. (2019). **Structural and functional characterisation of a novel peptide from the Australian sea anemone *Actinia tenebrosa***. *Toxicon*, 168, 104–112.
- Fautin, D.G. (2009). **Structural diversity, systematics, and evolution of cnidae**. *Toxicon* 54, 1054e1064.
- Fedorov S., Dyshlovoy S., Monastyrnaya M., Shubina L., Leychenko E., Kozlovskaya E., Jin J.O., Kwak J.Y., Bode A.M, Dong Z., Stonik V. (2010). **The anticancer effects of actinoporin RTX-A from the sea anemone *Heteractis crispa* (= *Radianthus macrodactylus*)**. *Toxicon* 55:811–817

- Ghavami, S., Hashemi, M., Ande, S., Yeganeh, B., Xiao, W., Eshraghi, M., Bus, C., Kadkhoda, K., Wiechec, E., Halayko, A., *et al.* **Apoptosis and cancer: Mutations within caspase genes.** *J. Med. Genet.* 2009, 46, 497–510.
- Giraldi, T., Ferlan, I., Romeo, D. (1976). **Antitumour activity of equinatoxin.** *Chem.-Biol. Interact.* 13, 199–203.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). **Hallmarks of Cancer: The Next Generation.** *Cell*, 144(5), 646–674.
- Hu, W., Kavanagh, J. J. (2003). **Anticancer therapy targeting the apoptotic pathway.** *The Lancet Oncology*, 4(12), 721–729.
- Huang, X.L., Zhang, Z.H., *et al.*, (2010). **Endoplasmic reticulum stress contributes to vitamin E succinate-induced apoptosis in human gastric cancer SGC-7901 cells.** *Cancer Lett.* 296, 123–131.
- Jain, R., Sonawane, S., Mandrekar, N. (2008). **Marine organisms: Potential source for drug discovery.** *Curr. Sci.* 94, 292.
- Kumar, M. S., Adki, K. M. (2018). **Marine natural products for multi-targeted cancer treatment: A future insight.** *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 105, 233–245.
- Johnstone, R. W., Ruefli, A. A., & Lowe, S. W. (2002). **Apoptosis.** *Cell*, 108(2), 153–164.
- Lazcano-Pnrez, F., Zavala-Moreno, A., Rufino-Gonzalez, Y., Ponce-Macotella, M., Garcia-Arredondo, A., Cuevas-Cruz, M., ...Arreguin-Espinosa, R. (2018). **Hemolytic, anticancer and anti-giardial activity of *Palythoa caribaeorum* venom.** *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 24(1).
- Li, R., Yu, H., Xing, R., Liu, S., Qing, Y., Li, K., ... Li, P. (2013). **Isolation and in vitro partial characterization of hemolytic proteins from the nematocyst venom of the jellyfish *Stomolophus meleagris*.** *Toxicology in Vitro*, 27(6), 1620–1625.
- Lian, F., Li, Y., Bhuiyan, M., Sarkar, F.H., (1999). **p53-independent apoptosis induced by genistein in lung cancer cells.** *Nutr. Cancer* 33, 125–131.
- Lima, M. L., Romanelli, M. M., Borborema, S. E. T., Johns, D. M., Migotto, A. E., Lago, J. H. G., Tempone, A. G. (2019). **Antitrypanosomal activity of isololiolide isolated from the marine hydroid *Macrorhynchia philippina* (Cnidaria, Hydrozoa).** *Bioorganic Chemistry*, 89, 103002.
- Liu, Y., Zhu, X. (2017) **Endoplasmic reticulum-mitochondria tethering in neurodegenerative diseases.** *Transl Neurodegener* 6, 21
- Lowe, S. W., Cepero, E., Evan, G. (2004). **Intrinsic tumour suppression.** *Nature*, 432(7015), 307–315.

- Macdonald, S., Cunningham, Y., Patterson, C., Robb, K., Macleod, U., Anker, T., Hilton, S. (2018). **Mass media and risk factors for cancer: the under-representation of age.** BMC Public Health, 18(1).
- Macek, M., Jr, Mackova, A., Hamosh, A., Hilman, B. C., Selden, R. F., Lucotte, G., ... Cutting, G. R. (1997). **Identification of common cystic fibrosis mutations in African-Americans with cystic fibrosis increases the detection rate to 75%.** American journal of human genetics, 60(5), 1122–1127.
- Macrander, J., Daly, M. (2016). **Evolution of the Cytolytic Pore-Forming Proteins (Actinoporins) in Sea Anemones.** Toxins, 8(12), 368.
- Mariottini, G.L., Pane, L. (2010). **Mediterranean jellyfish venoms: A review on scyphomedusae.** Mar. Drugs, 8, 1122–1152.
- Marques, A.C., Collins, A.G. (2004). **Cladistic analysis of Medusozoa and cnidarian evolution.** Invertebr. Biol. 123, 23e42.
- Martins, R.D., Alves, R.S., Martins, A.M., Barbosa, P.S., Evangelista, J.S., Evangelista, J.J., Ximenes, R.M., Toyama, M.H., Toyama, D.O., Souza, A.J., et al. (2009). **Purification and characterization of the biological effects of phospholipase A (2) from sea anemone Bunodosoma caissarum.** Toxicon, 54, 413–420.
- Matés, J. M., & Sánchez-Jiménez, F. M. (2000). **Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy.** The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 32(2), 157–170.
- Mendola, D. (2000). **Aquacultural production of bryostatin 1 and ecteinascidin 743.** In *Drugs from the sea*; Fusetani, N., Ed.; Karger: Basel. pp. 120–133.
- Miller, K. D., Nogueira, L., Mariotto, A. B., Rowland, J. H., Yabroff, K. R., Alfano, C. M., ... Siegel, R. L. (2019). **Cancer treatment and survivorship statistics, 2019.** CA: A Cancer Journal for Clinicians.
- Mirshamsi, M. R., Omranipour, R., Vazirizadeh, A., Fakhri, A., Zangeneh, F., Mohebbi, G. H., ... Pourahmad, J. (2017). **Persian Gulf Jellyfish (Cassiopea andromeda) Venom Fractions Induce Selective Injury and Cytochrome C Release in Mitochondria Obtained from Breast Adenocarcinoma Patients.** Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP, 18(1), 277–286.
- Molodtsova, T.N (2004). **On the taxonomy and presumable evolutionary pathways of planktonic larvae of Ceriantharia (Anthozoa, Cnidaria).** Hydrobiologia 530(531): 261–266.
- Monroy-Estrada, H. I., Chirino, Y. I., Soria-Mercado, I. E., & Sánchez-Rodríguez, J. (2013). **Toxins from the Caribbean sea anemone Bunodeopsis globulifera increase cisplatin-induced cytotoxicity of lung adenocarcinoma cells.** Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases, 19(1), 12.

- Moran, Y., Genikhovich, G., Gordon, D., Wienkoop, S., Zenkert, C., Ozbek, S., et al. (2012). **Neurotoxin localization to ectodermal gland cells uncovers an alternative mechanism of venom delivery in sea anemones.** *Proc. Biol. Sci.* 279, 1351–1358.
- Newman, D. J., Cragg, G. M., Snader, K. M. (2000). **The influence of natural products upon drug discovery.** *Nat. Prod. Rep.*, 17, 215-234.
- Oshiro, N., Kobayashi, C., Iwanaga, S., Nozaki, M., Namikoshi, M., Spring, J., Nagai, H. (2004). **A new membrane-attack complex/perforin (MACPF) domain lethal toxin from the nematocyst venom of the Okinawan sea anemone *ActinERIA villosa*.** *Toxicon*, 43, 225–228.
- Pang, M., Xu, J., Liu, Y., & Zhang, X. (2018). **Comparative study of the hemolytic and cytotoxic activities of nematocyst venoms from the jellyfish *Cyanea nozakii* Kishinouye and *Nemopilema nomurai* Kishinouye.** *Journal of Oceanology and Limnology*, 36(4)
- Park, Y.J., Wen, J., Bang, S., Park, S.W., Song, S.Y., (2006). **[6]-Gingerol induces cell cycle arrest and cell death of mutant p53-expressing pancreatic cancer cells.** *Yonsei Med. J.* 47, 688–697.
- Pelicano, H., Carney, D., & Huang, P. (2004). **ROS stress in cancer cells and therapeutic implications.** *Drug Resistance Updates*, 7(2), 97–110.
- Poon, I. K. H., Lucas, C. D., Rossi, A. G., & Ravichandran, K. S. (2014). **Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential.** *Nature Reviews Immunology*, 14(3), 166–180.
- Prentis, P.J., Pavasovic, A., Norton, R.S. (2018). **Sea Anemones: Quiet Achievers in the Field of Peptide Toxins.** *Toxins*, 10(1), 36.
- Proksch, P., Edrada-Ebel, R.A., Ebel, R. (2002) **Drugs from the sea—opportunities and obstacles.** *Mar. Drugs*, 1, 5–17.
- Qu, X., Xia, X., Lai, Z., Zhong, T., Li, G., Fan, L., & Shu, W. (2016). **Apoptosis-like cell death induced by nematocyst venom from *Chrysaora helvola* Brandt jellyfish and an in vitro evaluation of commonly used antidotes.** *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 180, 31–39.
- Ramalingam, V., Rajaram, R. (2018). **2-ethoxycarbonyl-2- β -hydroxy-a-nor-cholest-5-ene-4-one: Extraction, structural characterization, antimicrobial, antioxidant, anticancer and acute toxicity studies.** *Steroids*.
- Ramezanpour, M., da Silva, K. B., Sanderson, B. J. S. (2013). **The effect of sea anemone (*H. magnifica*) venom on two human breast cancer lines: death by apoptosis.** *Cytotechnology*, 66(5)

- Sakthivel A. (1999) **Biomedical activity of Conus lentiginosus and Conus mutabilis from Mumbai coast** [M. F. Sc., Dissertation]. CIFE Mumbai India.
- 60
- Saraste, A. (2000). **Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis.** Cardiovascular Research, 45(3), 528–537.
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2019). **Cancer statistics, 2019.** CA: A Cancer Journal for Clinicians, 69(1), 7–34.
- Soletti, R.C., Pinto de Faria, G., Vernal, J., Terenzi, H., Anderluh, G., Borges, H.L., Moura-Neto, V., Gabilan, N.H., (2008). **Potential of anticancer-drug cytotoxicity by sea anemone pore-forming proteins in human glioblastoma cells.** Anticancer Drugs 19, 517–525.
- Stampar, S.N., Maronna, M.M., Kitahara, M.V., Reimer, J.D., Morandini, A.C. (2014). **Fast-evolving mitochondrial DNA in Ceriantharia: a reflection of hexacorallia paraphyly?** PLoS One.;9: e86612.
- Stampar, S.N., Beneti, J.S., Acuña, F.H., Morandini, A.C. (2015). **Ultrastructure and tube formation in Ceriantharia (Cnidaria, Anthozoa).** *Zoologischer Anzeiger-A Journal of Comparative Zoology* 254:67-71.
- Stampar, S. N., Maronna, M. M., Raimor, J. D., Beneti, J. S., Morandini, A. C. (2016). **Ceriantharia in current systematics: life cycles, morphology and genetics.** Springer International Publishing Switzerland. s.v., s.n., s.p.
- Sun, L.-K., Yoshii, Y., Hyodo, A., Tsurushima, H., Saito, A., Harakuni, T., ... Morine, N. (2002). **Apoptosis induced by box jellyfish (Chiropsalmus Quadrigatus) toxin in glioma and vascular endothelial cell lines.** Toxicon, 40(4), 441–446.
- Tiffon, Y. (1987). **Ordre des Cérianthaires.** In: Grassé P (ed) *Traité de Zoologie: Anatomie, Systématique, Biologie – Cnidaires/Anthozoaires – Tome III.* Masson, Paris, pp 210–256
- Tsvetkov, P., Asher, G., Reiss, V., Shaul, Y., Sachs, L., Lotem, J., (2005). **Inhibition of NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 activity and induction of p53 degradation by the natural phenolic**
- Urra, H., Dufey, E., et al., (2013). **When ER stress reaches a dead end.** Biochim. Biophys. Acta 1833, 3507–3517.
- Vaikundamoorthy, R., Sundaramoorthy, R., Krishnamoorthy, V., Vilwanathan, R., Rajendran, R. (2016). **Marine steroid derived from Acropora formosa enhances mitochondrial-mediated apoptosis in non-small cell lung cancer cells.** Tumor Biology, 37(8), 10517–10531.
- Van Iken, H., Marques, A.C., Leme, J.D.M., Pacheco, M.L.F., Simões, M.G., (2014). **Origin and early diversification of the phylum Cnidaria Verrill: major**

developments in the analysis of the taxon's Proterozoic-Cambrian history.

Palaeontology 57, 677e690.

Villa-Pulgarín, J. A., Gajate, C., Botet, J., Jimenez, A., Justies, N., Varela-M, R. E., ...

Mollinedo, F. (2017). **Mitochondria and lipid raft-located FOF1-ATP**

synthase as major therapeutic targets in the antileishmanial and

anticancer activities of ether lipid edelfosine. PLOS Neglected Tropical

Diseases, 11(8), e0005805.

Yamasaki-Miyamaoto, Y., Yamasaki, M., Tachibana, H. & Yamada, K. (2009). **Fucoidan**

induces apoptosis through activation of caspase-8 on human breast cancer

MCF-7 cells. J Agric Food Chem, 57, 8677-82.

Yavari, L., Heidari, B., Khodabandeh, S., Hadavi, M. (2019). **Inhibitory Effects of**

Crude and Filtered Extracts from Oral Disk of Sea Anemone

(Stichodactyla haddoni) on MCF-7 Cell Line. Jundishapur Journal of Natural

Pharmaceutical Products.

Zubair, M.S., Lallo, S., Rusmyanti, R., Nugrahani, A.W., Jantan, I. (2018) . **Screening**

of Antibacterial and Anticancer Activity of Soft Corals from Togean

Islands, Indonesia. Indonesian Journal of Pharmacy. p. 173.

3. Conclusão geral

Com base nos resultados obtidos, podemos avaliar a citotoxicidade da composição de toxinas da espécie *Ceriantheomorphe brasiliensis*, *Ceriantheomorphe brasiliensis*, *Actinia bermudensis* e *Pachycerianthus multiplicatus* em células MCF7 durante 24h e de *Actinia bermudensis* e *Pachycerianthus multiplicatus* durante 48h, e *Actinia bermudensis* e *Pachycerianthus multiplicatus* em células HEP-2 durante 24h e 48h a partir da aplicação das concentrações. Ainda são necessários alguns testes posteriores, como a aplicação em novas linhagens celulares cancerígenas, procurando determinar se existe alguma especificidade com relação a um tipo de câncer, também a aplicação durante maiores e menores quantidades de tempo, afim de ter um escopo maior das capacidades da composição de toxinas secretada por *Ceriantheomorphe brasiliensis*, *Actinia bermudensis* e *Pachycerianthus multiplicatus*. O estudo dos efeitos moleculares causados pela composição também é de particular interesse, tentando elucidar melhor como essa toxina ativa a apoptose em células cancerígenas, procurando distinguir cada vez mais quais vias apoptóticas esse extrato ativa. Esse trabalho pode se favorecer com estudos posteriores, como por exemplo uma maior elucidação dos componentes da toxina, até mesmo da aplicação dessa composição de toxinas em outras linhagens celulares, uma vez que não há estudos na literatura sobre as toxinas destas espécie, até mesmo tomando um caminho trilhado pelo estudo de Soletti et al., 2008, e testar a sinergia dos compostos estudados aqui com agentes quimioterápicos. Um caminho a ser tomado, fora da oncologia, seria o de testes em outros tipos de males que aplacam o corpo humano, já que a composição da toxina é tão rica de substancias diversas.

4.Referencias gerais

- Abdzadeh, E., Heidari, B., & Hadavi, M. (2020). **Sea anemone (*Stichodactyla haddoni*) induces apoptosis in lung cancer A549 cells: an in vitro evaluation of biological activity of mucus derivatives.** *Biologia*.
- Albert, B. (2008). **Cancer as a microevolutionary process.** In: 5 (ed.) *Mol Biol Cell*. Garland Science.
- Anderluh, G., Križaj, I., Štrukelj, B., Gubenšek, F., Maček, P., & Pungerčar, J. (1999). **Equinatoxins, pore-forming proteins from the sea anemone *Actinia equina*, belong to a multigene family.** *Toxicon*, 37(10), 1391–1401.
- Anderluh, G., Macek, P. (2002) **Cytolytic peptide and protein toxins from sea anemones (Anthozoa: Actiniaria).** *Toxicon* 40, 111–124.
- Anderluh, G.; Sepčić, K.; Turk, T.; Maček, P. (2011). **Cytolytic Proteins from Cnidarians—an Overview.** *Acta Chim. Slov.* 58, 724–729
- Appeltans, W., Ahyong, S.T., Anderson, G., Angel, M.V., Artois, T., Bailly, N, et al. (2012). **The magnitude of global marine species diversity.** *Curr Biol.*;22: 2189–2202.
- Ayed, Y., Dellai, A., Ben Mansour, H., Bacha, H., Abid, S. (2012). **Analgesic and antibutyrylcholinestasic activities of the venom prepared from the Mediterranean jellyfish *Pelagia noctiluca*.** *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 11, 15.
- Azevedo e Silva G., Gamarra C.J., Girianelli V.R., Valente J.G. (2011). **Tendência da mortalidade por câncer nas capitais e interior do Brasil entre 1980 e 2006.** *Rev Saúde Pública*
- Barlič, A., Gutiérrez-Aguirre, I., Caaveiro, J. M. M., Cruz, A., Ruiz-Argüello, M.-B., Pérez-Gil, J., & González-Mañas, J. M. (2004). **Lipid Phase Coexistence Favors Membrane Insertion of Equinatoxin-II, a Pore-forming Toxin from *Actinia equina*.** *Journal of Biological Chemistry*, 279(33), 34209–34216.
- Bastos, C. L. Q., Varela, A. S., Ferreira, S. P., Nornberg, B. F., and Boyle, R. T. (2016). **Who knows not where an anemone does wear his sting? Could polypeptides released from the columnar vesicles of *Bunodosoma cangicum* induce apoptosis in the ZF-L cell line?** *Toxicon* 124, 73–82.
- Basulto, A., Pérez, V. M., Noa, Y., Varela, C., Otero, A. J., & Pico, M. C. (2006). **Immunohistochemical targeting of sea anemone cytolsins on tentacles, mesenteric filaments and isolated nematocysts of *Stichodactyla helianthus*.** *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology*, 305A (3).

- Bigger, C.H. (1980). **Interspecific and intraspecific acrorhagial aggressive behaviour among sea anemones: a recognition of self and not self.** Biol. Bull. 159, 117e134.
- Botana, L. M. (2014). **Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology, and Detection**, CRC Press.
- Brinkman, D.L., Burnell, J.N. (2009). **Biochemical and molecular characterisation of cubozoan protein toxins.** Toxicon 54:1162–1173.
- Bruce, A., Alexander, J., Julian, L., Martin, R., Keith, R. & P, W. (2007). **Molecular Biology of the Cell**, New York, Garland Science.
- Brusca, R.C., Brusca, G.J. (2002). **Invertebrates 2nd ed.** Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts.
- Cline, E., Wiebe, L., Young, J., Samuel, J. (1995). **Toxic effects of the novel protein UPI from the sea anemone.** Pharmacological Research, 32(5).
- Cooper, G. (2000). **The Cell.** Sinauer Associates.
- Črnigoj Kristan, K., Viero, G., Dalla Serra, M., Maček, P., & Anderluh, G. (2009). **Molecular mechanism of pore formation by actinoporins.** Toxicon, 54(8), 1125–1134.
- Daly, M., Brugler, M.R., Cartwright, P., Collins, A.G., Dawson, M.N., Fautin, D.G, et al. (2007). **The phylum Cnidaria: A review of phylogenetic patterns and diversity 300 years after Linnaeus.** Zootaxa. Magnolia Press;1668: 127–182.
- David, C.N., Özbek, S., Adamczyk, P., Meier, S., Pauly, B., Chapman, J., Hwang, J.S., Gojbori, T., Holstein, T.W. (2008). **Evolution of complex structures: minicollagens shape the cnidarian nematocyst.** Trends Genet. 24, 431e438.
- Dobretsov S, Tamimi Y, Al-Kindi MA, Burney I. (2016). **Screening for Anti-Cancer Compounds in Marine Organisms in Oman.** Sultan Qaboos Univ Med J. 2016;16(2).
- Doumenc, D.A., Van Praët, M. (1987) **ORDRE des Actiniaires, ordre des Ptychodactiaires, ORDRE des Corallimorphares.** In: Grassé, P.P. (Ed), Traite de Zoologie, Tome III, Fascicule 3, Cnidaries Anthozoaires. Masson, Paris, pp. 257–401.
- Engers, R., & Gabbert, H. E. (2000). **Mechanisms of tumor metastasis: cell biological aspects and clinical implications.** Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 126(12), 682–692.
- Fautin, D.G. (2009). **Structural diversity, systematics, and evolution of cnidae.** Toxicon 54, 1054e1064.
- Fedorov S., Dyshlovoy S., Monastyrnaya M., Shubina L., Leychenko E., Kozlovskaya E., Jin J.O., Kwak J.Y., Bode A.M, Dong Z., Stonik V. (2010). **The anticancer**

- effects of actinoporin RTX-A from the sea anemone *Heteractis crispa* (= *Radianthus macrodactylus*).** *Toxicon* 55:811–817
- Frazao, B., Vasconcelos, V., Antunes, A. (2012). **Sea anemone (Cnidaria, Anthozoa, Actiniaria) toxins: an overview.** *Mar. Drugs* 10:1812–1851.
- Giraldi, T., Ferlan, I., Romeo, D. (1976). **Antitumour activity of equinatoxin.** *Chem.-Biol. Interact.* 13, 199–203.
- Gutiérrez-Aguirre, I., Trontelj, P., Maček, P., Lakey, J. H., & Anderluh, G. (2006). **Membrane binding of zebrafish actinoporin-like protein: AF domains, a novel superfamily of cell membrane binding domains.** *Biochemical Journal*, 398(3).
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). **Hallmarks of Cancer: The Next Generation.** *Cell*, 144(5), 646–674.
- Honma, T., Shiomi, K. (2006). **Peptide toxins in sea anemones: Structural and functional aspects.** *Mar. Biotechnol.* 8, 1–10.
- Honda, A., Yamamoto, Y., Mori, Y., Yamada, Y., Kikuchi, H. (1985). **Antileukemic effect of coral-prostanoids clavulones from the stolonifer *Clavularia viridis* on human myeloid leukemia (HL-60) cells.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 130, 515–523.
- Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. (2015). **Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil.** Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva.
- Ip, D.T., Wong, K.B., Wan, D.C. (2007). **Characterization of novel orange fluorescent protein cloned from cnidarian tube anemone *Cerianthus* sp.** *Mar. Biotechnol.* 9, 469–478
- Jain, R., Sonawane, S., Mandrekar, N. (2008). **Marine organisms: Potential source for drug discovery.** *Curr. Sci.* 94, 292.
- Johnstone, R. W., Ruefli, A. A., & Lowe, S. W. (2002). **Apoptosis.** *Cell*, 108(2), 153–164.
- Jouiaei, M.; Yanagihara, A.A.; Madio, B.; Nevalainen, T.J.; Alewood, P.F.; Fry, B.G. **Ancient Venom Systems: A Review on Cnidaria Toxins.** *Toxins* 2015, 7, 2251-2271.
- Kass-Simon, G., Scappaticci, J. (2002). **The behavioural and developmental physiology of nematocysts.** *Can. J. Zoology* 80, 1772e1794.
- Kem, W.R. (1988). **Sea anemone toxins: Structure and action,** in: D.A. Hessinger, H.M. Lenhoff (Eds.), *The Biology of Nematocysts*, Academic Press, San Diego.
- Lazcano-Pnrez, F., Zavala-Moreno, A., Rufino-Gonzalez, Y., Ponce-Macotela, M., Garcia-Arredondo, A., Cuevas-Cruz, M., ...Arreguin-Espinosa, R. (2018).

- Hemolytic, anticancer and antiangiogenic activity of *Palythoa caribaeorum* venom.** Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases, 24(1).
- Louis, C. J. (1978). ***Tumors Basic Principles and Clinical Aspects***, Churchill livingstone.
- Macek, P. (1992). **Polypeptide cytolytic toxins from sea anemones (Actiniaria).** FEMS Microbiology Letters, 105(1-3), 121–129.
- Mariottini, G.L., Pane, L. (2010). **Mediterranean jellyfish venoms: A review on scyphomedusae.** Mar. Drugs, 8, 1122–1152.
- Mariscal, R.N. (1974). Nematocysts. In: Muscatine L Lenhoff HM, editors. **Coelenterate biology: reviews and new perspectives.** New York: Academic Press. p. 129–178.
- Marques, A.C., Collins, A.G. (2004). **Cladistic analysis of Medusozoa and cnidarian evolution.** Invertebr. Biol. 123, 23e42.
- Martins, R.D., Alves, R.S., Martins, A.M., Barbosa, P.S., Evangelista, J.S., Evangelista, J.J., Ximenes, R.M., Toyama, M.H., Toyama, D.O., Souza, A.J., et al. (2009). **Purification and characterization of the biological effects of phospholipase A (2) from sea anemone Bunodosoma caissarum.** Toxicon, 54, 413–420.
- Mayer, A.M.S., Lehmann, V.B.K. (2001) **Marine pharmacology in 1999: Antitumor and cytotoxic compounds.** Anticancer Res, 21, 2489–2500.
- Mayer, A.M.S., Rodríguez, A.D., Berlinck, R.G.S., Hamann, M.T. (2009). Marine pharmacology in 2005–6: **Marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action.** Biochim. Biophys. Acta, 1790, 283–308.
- Meinardi, E., Florinchristensen, M., Paratcha, G., Azcurra, J. M., & Florinchristensen, J. (1995). **The Molecular Basis of the Self/Non-self Selectivity of a Coelenterate Toxin.** Biochemical and Biophysical Research Communications, 216(1).
- Mendola, D. (2000). **Aquacultural production of bryostatin 1 and ecteinascidin 743.** In *Drugs from the sea*; Fusetani, N., Ed.; Karger: Basel. pp. 120–133.
- Molodtsova, T.N (2004). **On the taxonomy and presumable evolutionary pathways of planktonic larvae of Ceriantharia (Anthozoa, Cnidaria).** Hydrobiologia 530(531): 261–266.
- Monroy-Estrada, H. I., Chirino, Y. I., Soria-Mercado, I. E., & Sánchez-Rodríguez, J. (2013). **Toxins from the Caribbean sea anemone Bunodeopsis globulifera**

- increase cisplatin-induced cytotoxicity of lung adenocarcinoma cells.** Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases, 19(1), 12.
- Moran, Y., Genikhovich, G., Gordon, D., Wienkoop, S., Zenkert, C., Ozbek, S., et al. (2012). **Neurotoxin localization to ectodermal gland cells uncovers an alternative mechanism of venom delivery in sea anemones.** *Proc. Biol. Sci.* 279, 1351–1358.
- Newman, D. J., Cragg, G. M., Snader, K. M. (2000). **The influence of natural products upon drug discovery.** *Nat. Prod. Rep.* 17, 215-234.
- Oshiro, N., Kobayashi, C., Iwanaga, S., Nozaki, M., Namikoshi, M., Spring, J., Nagai, H. (2004). **A new membrane-attack complex/perforin (MACPF) domain lethal toxin from the nematocyst venom of the Okinawan sea anemone *ActinERIA villosa*.** *Toxicon*, 43, 225–228.
- Ostman, C. (2000). **A guideline to nematocyst nomenclature and classification, and some notes on the systematic value of nematocysts.** *Sci. Mar.* 64, 31e46.
- Ozbek, S., Balasubramanian, P.G., Holstein, T.W. (2009). **Cnidocyst structure and the biomechanics of discharge.** *Toxicon* 54, 1038e1045.
- Proksch, P., Edrada-Ebel, R.A., Ebel, R. (2002) **Drugs from the sea—opportunities and obstacles.** *Mar. Drugs*, 1, 5–17.
- Quah, Y., Mohd Ismail, N. I., Ooi, J. L. S., Affendi, Y. A., Abd Manan, F., Teh, L.-K., ... Chai, T.-T. (2019). **Purification and identification of novel cytotoxic oligopeptides from soft coral *Sarcophyton glaucum*.** *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*, 20(1), 59–70.
- Ramezanpour, M., da Silva, K. B., Sanderson, B. J. S. (2013). **The effect of sea anemone (*H. magnifica*) venom on two human breast cancer lines: death by apoptosis.** *Cytotechnology*, 66(5)
- Sher, D., Zlotkin, E. (2009). **A hydra with many heads: protein and polypeptide toxins from hydra and their biological roles.** *Toxicon* 54: 1148–1161.
- Soletti, R.C., Pinto de Faria, G., Vernal, J., Terenzi, H., Anderluh, G., Borges, H.L., Moura-Neto, V., Gabilan, N.H., (2008). **Potentiation of anticancer-drug cytotoxicity by sea anemone pore-forming proteins in human glioblastoma cells.** *Anticancer Drugs* 19, 517–525.
- Stampar, S.N., Maronna, M.M., Kitahara, M.V., Reimer, J.D., Morandini, A.C. (2014). **Fast-evolving mitochondrial DNA in Ceriantharia: a reflection of hexacorallia paraphyly?** *PLoS One*.;9: e86612.
- Stampar, S.N., Beneti, J.S., Acuña, F.H., Morandini, A.C. (2015). **Ultrastructure and tube formation in Ceriantharia (Cnidaria, Anthozoa).** *Zoologischer Anzeiger-A Journal of Comparative Zoology* 254:67-71.

- Stampar, S. N, Maronna, M. M., Raimer, J. D., Beneti, J. S., Morandini, A. C. (2016). **Ceriantharia in current systematics: life cycles, morphology and genetics.** Springer International Publishing Switzerland. s.v., s.n., s.p.
- Suput, D. (2009). *In vivo effects of cnidarian toxins and venoms.* *Toxicon*, 54, 1190–1200
- Tejuca, M., Dalla Serra, M., Potrich, C., Alvarez, C., Menestrina, G. (2001). **Sizing the Radius of the Pore Formed in Erythrocytes and Lipid Vesicles by the Toxin Sticholysin I from the Sea Anemone *Stichodactyla helianthus*.** *Journal of Membrane Biology*, 183(2), 125–135.
- Tiffon, Y. (1987). **Ordre des Cérianthaires.** In: Grassé P (ed) *Traité de Zoologie: Anatomie, Systématique, Biologie – Cnidaires/Anthozoaires – Tome III.* Masson, Paris, pp 210–256
- van Iten, H., Marques, A.C., Leme, J.D.M., Pacheco, M.L.F., Simões, M.G., (2014). **Origin and early diversification of the phylum Cnidaria Verrill: major developments in the analysis of the taxon's Proterozoic-Cambrian history.** *Palaeontology* 57, 677e690.
- Weinberg, R. A. (2013). **The Biology of Cancer.** Garland Science.
- Weinheimer, A.J., Spraggins, R.L. (1969). **The occurrence of two new prostaglandin derivatives (15-epi-PGA2 and its acetate, methyl ester) in the Gorgonian *Plaxaura homomalla*.** *Chemistry of Coelenterates*. XV. *Tetrahedron Lett.* 10, 5185–5188.
- Yamasaki-Miyamaoto, Y., Yamasaki, M., Tachibana, H. & Yamada, K. (2009). **Fucoidan induces apoptosis through activation of caspase-8 on human breast cancer MCF-7 cells.** *J Agric Food Chem*, 57, 8677-82.
- Yuan, W., Yang, N., & Li, X. (2016). **Advances in Understanding How Heavy Metal Pollution Triggers Gastric Cancer.** *BioMed Research International*, 2016, 1–10.
- Zubair, M.S., Lallo, S., Rusmyanti, R., Nugrahani, A.W., Jantan, I. (2018) . **Screening of Antibacterial and Anticancer Activity of Soft Corals from Togean Islands, Indonesia.** *Indonesian Journal of Pharmacy*. p. 173.