

POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE LAS ESPONJAS EN LA PRODUCCIÓN DE NUEVOS FÁRMACOS: PERSPECTIVAS Y LIMITACIONES

Águila-Ramírez, R. N.^{ab}, C. J. Hernández-Guerrero^a & B. González-Acosta

Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas-IPN. Av. Instituto Politécnico Nacional S/N. Col. Playa Palo de Santa Rita. C.P. 23060. La Paz, Baja California Sur, México. ^aBecarios COFAA-EDI. ^bBecario CONACYT. email: raguilar@ipn.mx

RESUMEN. La búsqueda de productos naturales con actividad farmacológica a partir de esponjas marinas tiene un gran potencial debido a las interesantes actividades que algunos compuestos presentan en ensayos clínicos, principalmente en la búsqueda de compuestos anticancerígenos y antivirales. Sin embargo, también existen diversas problemáticas que pueden frenar el desarrollo de un nuevo compuesto. Por lo que en esta revisión se pretende dar un panorama general de las perspectivas y limitantes que se presentan en la búsqueda de nuevos compuestos a partir de esponjas en el medio natural, en el establecimiento de cultivos de esponjas, de primorfs y células madre como una alternativa o el aislamiento de bacterias asociadas a ellas que produzcan dichos metabolitos con la finalidad de realizar modificaciones genéticas que permitan una producción biotecnológica.

Palabras clave: Biotecnología, esponja, bacteria, fármacos.

Biotechnical potential of sponges in new pharmaceuticals production: perspectives and limits

ABSTRACT. The search for natural products with pharmacological activity of marine sponges has great potential due to the interesting activities that some compounds have in clinical trials, mainly in the search of anticancer and antiviral compounds. However, there are various problems that may limit the development of a new compound. In this review we intended to give an overview of the perspectives and limitations that occur in the search of new compounds from sponges of the natural environment, in the establishment of culture of sponges, primorph and stem cells as an alternative, or isolated bacteria from sponges which are the metabolites producers to development genetic modifications for a biotechnological production.

Keywords: Biotechnology, sponge, bacteria, drugs.

Águila-Ramírez, R. N., C. J. Hernández-Guerrero & B. González-Acosta. 2011. Potencial biotecnológico de las esponjas en la producción de nuevos fármacos: perspectivas y limitaciones. *CICIMAR Oceánides*, 26(2): 31-46.

PRINCIPALES METABOLITOS AISLADOS DE ESPONJAS

El potencial de los organismos marinos como fuente de nuevos productos naturales es muy prometedor. La búsqueda de éstos organismos productores de moléculas de interés se ha enfocado a especies de cuerpo blando, sésiles o dotadas de un movimiento lento ya que su supervivencia no se basa en la velocidad de natación ni en defensas físicas, sino en la generación de un arsenal químico, producto de adaptaciones metabólicas que les permiten sintetizar compuestos que les confieren una ventaja adaptativa en el ambiente marino. Estos compuestos pueden ser exudados al medio en respuesta a una amenaza, para atraer a su presa, y en algunos casos pueden ser acumulados en el organismo para disuadir o causar la muerte al depredador que los ingiere (Jiménez *et al.*, 2007).

La investigación de organismos marinos en la búsqueda de compuestos bioactivos con potencial terapéutico se ha ido incrementando año con año (Bhakuni & Rawat, 2005; Blunt & Munro, 2007; Blunt *et al.*, 2009), principalmente

en el área de enfermedades oncológicas. Hoy en día existe una larga lista de compuestos de origen marino con potencial terapéutico en ensayos preclínicos y clínicos para el tratamiento de diversas enfermedades, y otros que ya están en el mercado. Entre estos podemos mencionar a la erubilina (Halaven^{MR}), un nuevo medicamento contra el cáncer de seno, que es un análogo sintético de la halichondrina B la cual fue aislada originalmente de la esponja *Halichondria okadai* y posteriormente de la esponja *Lissodendoryx* spp. (Uemura *et al.*, 1985). Labriostatina 1, aislada del briozoario *Bugula neritina* y de la esponja *Lufariella variabilis*, así como la trabectedina o ecteinascidina 743 (ET-743) aislada de la ascidia *Ecteinascidia turbinata* (Guan *et al.*, 1993) y comercializada con el nombre de Yondelis.

En el medio marino, las esponjas (Phylum Porifera) son, hasta el momento, la mayor fuente de metabolitos secundarios marinos bioactivos. Estos metazoarios son sésiles, filtradores, por lo que circulan grandes cantidades de agua a través de su sistema acuífero capturando partículas de materia orgánica y por consiguiente el 70% de las bacterias sus-

pendidas en la misma (Brümer & Nickel, 2003). Por otro lado, las esponjas sintetizan una gran variedad de metabolitos secundarios con fines defensivos (defensa directa, indirecta e inmune) y competitivos (competencia por espacio) (Müeller *et al.*, 2004). La presencia y concentración de estos metabolitos secundarios dependen de factores tales como: las condiciones del hábitat (luz, corrientes, profundidad, temperatura, cantidad de nutrientes) (Carballo, 2002), el grado de depredación, competencia y factores internos (estadio de desarrollo y reproducción) (Thompson *et al.*, 1987; Pawlik, 2002; Unson *et al.*, 1994).

Las esponjas han sido, durante los últimos cincuenta años, un objeto atractivo de estudio para la química de productos naturales marinos debido al gran número de metabolitos secundarios producidos, a la novedad estructural que muestran y su potencial terapéutico en el tratamiento de enfermedades humanas (Tabla 1). Además, son la mayor fuente de metabolitos secundarios marinos con potencial biomédico descubiertos a la fecha (Faulkner, 1997; Duckworth & Battershill, 2003; Blunt *et al.*, 2009; Koopmans *et al.*, 2009).

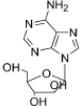
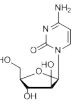
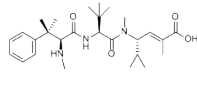
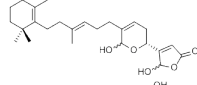
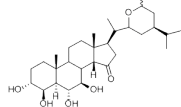
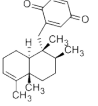
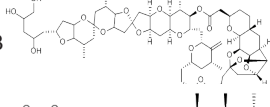
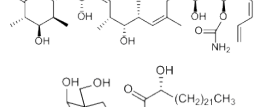
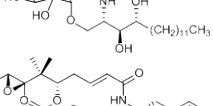
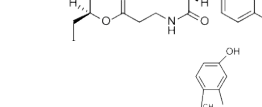
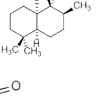
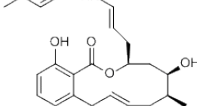
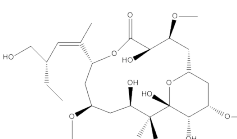
El uso de las esponjas en la búsqueda de productos naturales marinos inició en los años 50's con el aislamiento de los nucleósidos de arabinosa: espongotimidina y espongouridina a partir de la esponja *Cryptotethia crypta* (Bergmann & Feeney, 1950). Estos fueron usados como modelos para la síntesis de los compuestos ara-A (Vidarabina®) y ara-C (Cytarabina®), los cuales son compuestos antivirales y anticancerígenos (Kobayashi, 2000; Proksch *et al.*, 2002). Estos arabino-nucleósidos, a su vez, sirvieron de base para el desarrollo del antiviral AZT (Retrovir) y el antitumoral gemcitabina (Gemzar) (Kobayashi, 2000). El estudio químico y farmacológico de las esponjas, fue iniciado por Nigrelli y colaboradores (1959), cuando un compuesto con actividad antibiótica, denominado ectonina, fue aislado del extracto crudo etéreo de la esponja *Microciona prolifera*. A partir de entonces, se incrementó el interés en la búsqueda de compuestos con actividad biológica (antiviral, antimicrobiana, citotóxica, antiinflamatoria, etc.) en esponjas marinas (Armstrong *et al.*, 1999; Brümer & Nickel, 2003; Faulkner, 2002; Donia & Hamann, 2003; Blunt *et al.*, 2007).

De acuerdo a Mayer y Gustafson (2008), el objetivo principal de la investigación global en productos naturales marinos, a más de 54 años del hallazgo de los nucleósidos espongotimidina y espongouridina, es el descubrimiento de agentes antitumorales nuevos y de uso clínico derivados de organismos marinos. Por tal moti-

vo en años recientes, el interés en las esponjas se ha incrementado dado el descubrimiento de esteroides (como agosterol A, orostanol, aragusterol A, peroxisterol) (Aoki *et al.*, 1998; Fukuoka *et al.*, 2000; Gauvin *et al.*, 2000; Miyamoto *et al.*, 2001), proteínas (como las lectinas aisladas de *Chondrilla nucula*, *Haliclona cratera* y *Cliona varians*, o las glucoproteínas aisladas de *Pachymatisma johnstonii*) (Pajic *et al.*, 2002; Gad, 2005; Queiroz *et al.*, 2009), y otros compuestos con actividad citotóxica (Zhang *et al.*, 2003).

Desafortunadamente, la utilización de los productos naturales marinos como un recurso potencial para el desarrollo de nuevos fármacos se ve obstaculizada por varias limitaciones significativas, ya que cuando un compuesto obtenido a partir de una fuente marina es identificado como un posible candidato a fármaco, se deben de considerar los siguientes aspectos relacionados con el suministro del compuesto: rendimiento y variaciones en la concentración del compuesto, abundancia del organismo del cual se extrajo el compuesto de interés (fuente), facilidad y costo de la recolección del organismo y el derecho soberano sobre el recurso. Este último, es el aspecto más importante a considerar para el desarrollo de fármacos potenciales, ya que el Convenio sobre Diversidad Biológica (CDB) de las Naciones Unidas firmado durante la Conferencia de las Naciones Unidas sobre Medio Ambiente y Desarrollo, establece que los países miembros se comprometen a la conservación y uso sustentable de los recursos naturales, así como a la distribución justa y equitativa de los ingresos resultantes de la comercialización de productos basados en recursos naturales (www.conabio.gob.mx). Así mismo debe de cumplir con una serie de pruebas preclínicas y clínicas. Particularmente en el caso de las esponjas, existen algunos factores que contribuyen a que el proceso de implementación sea más lento. Los compuestos aislados tienen a menudo rendimientos muy bajos, por ejemplo, *Lissodendrox* sp. presenta rendimientos de extracción de 400 µg kg⁻¹ del compuesto halichondrina B (Koopmans *et al.*, 2009). La concentración del compuesto latrunculina B, oscila entre 0.35 a 1.2% del peso seco de la esponja *Negombata magnifica* (White & Kawasaki, 1992; Hadas *et al.*, 2005) y la espongistatina 1 y 9 se encuentran en sólo 2.2 x 10⁻⁷% y 3.4 x 10⁻⁷% del peso seco de la esponja, respectivamente (Norcross & Paterson, 1995). Además, la mayoría de las esponjas son escasas en su entorno natural o tienen una distribución limitada que no permite grandes recolectas. Incluso si son comunes, el impacto a largo plazo de las recolectas masivas para el desarrollo de fármacos, si los compuestos demuestran ser clínica-

Tabla 1. Compuestos aislados de esponjas marinas, actividad y estatus.
Table 1. Isolated compounds from marine sponges, activity, and status.

Especie	Compuesto	Actividad	Fase	Fuente	
<i>Cryptothetia crypta</i>	Ara A		Antiviral	Comercial	Pomponi, 1999
<i>Cryptothetia crypta</i>	Ara C		Anti-leucémica	Comercial	Munro <i>et al.</i> 1999
<i>Cymbastela</i> sp., <i>Hemiasterella minor</i> , <i>Siphonochalina</i> sp.	HTI 286		Anti-cancerígeno	II	Ettinger 2006
<i>Luffariella variabilis</i>	Manoalida		Anti-inflamatorios	II	Soriente <i>et al.</i> , 1999
<i>Petrosia contignata</i>	Contignasterol		Anti-inflamatorios Anti-asma	I/ II	Müller <i>et al.</i> , 2004
<i>Dysidea avara</i>	Avarona		Anti-leucémica HIV-1	I	Tandon & Chhor, 2005
<i>Lissodendoryx</i> <i>Halicondria okadai</i>	Halicondrina B		Anti-cancerígeno	I	Simmons <i>et al.</i> , 2005
<i>Discodermia disoluta</i>	Discodermollida		Anti-tumoral	I	Mickel, 2005
<i>Agelas mauritianus</i>	Agelasphina		Inmunoterapia del cáncer	I	Mickel <i>et al.</i> , 2004
<i>Dysidea arenaria</i>	Arenastatina A		Citotóxico	I	Murakami <i>et al.</i> , 2004
<i>Dysidea avara</i>	Avarol		Anti-inflamatorios HIV-1	Preclínico	Müller <i>et al.</i> , 2004
<i>Haliclona</i> sp.	Salicylihalamida A		Cáncer de mama, colon, renal y melanoma	Preclínico	Beutler & McKee, 2003
<i>Mycale hentscheli</i>	Pelorusida A		Citotóxico	Preclínico	Gaitanos <i>et al.</i> , 2004

mente exitosos, traería como consecuencia la inevitable destrucción de los ecosistemas marinos (Salomon *et al.*, 2004). Como resultado de esto, las investigaciones farmacológicas y el desarrollo de muchos productos naturales derivados de esponjas están limitadas por la necesidad de tener suficiente cantidad de extracto para las pruebas de laboratorio (Carballo *et al.*, 2009). Un buen ejemplo de ello, es el caso del compuesto halicondrina B; la proporción compuesto:biomasa es desfavorable, ya que se requiere 1 tonelada de la esponja *Lissodendoryx* sp. para obtener 300 mg de una mezcla de dos análogos del compuesto halocondrin (Proksch *et al.*, 2002). Este compuesto ha sido aislado también de las esponjas *Halichondria okadai*, *Phakellia carteri*, *Axinella cf. carteri* y *Lissodendoryx* spp. Las poblaciones naturales de estas especies, están restringidas a áreas muy pequeñas y no son suficientes para abastecer las cantidades necesarias del compuesto a una escala comercial (Brümer & Nickel, 2003). En la mayoría de los casos, las poblaciones de esponjas son demasiado pequeñas, inaccesibles y con una tasa de crecimiento lento que depende de la especie y factores ambientales (Pomponi, 1999).

MÉTODOS ALTERNATIVOS PARA LA OBTENCIÓN DE LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS

La síntesis química de productos naturales bioactivos o sustancias análogas es una de las primeras consideraciones para suplementar la cantidad de compuesto necesario para el desarrollo de un fármaco y es la opción preferida por la industria farmacéutica ya que permite controlar la introducción de modificaciones estructurales para la generación de análogos, eliminando así la complejidad molecular innecesaria y mejorando la actividad biológica (Paterson & Anderson, 2005). Sin embargo, en muchas ocasiones esta opción es eliminada debido a la complejidad de muchos de los compuestos aislados de esponjas, que si bien tienen mecanismos novedosos de acción y alta selectividad, son difíciles de sintetizar, lo que en ocasiones los hace incosteables económicamente y a menudo no cumplen las exigencias, incluso a nivel de ensayos preclínicos (Brümer & Nickel, 2003).

El cultivo de esponjas para estos fines es al parecer una estrategia prometedora debido a los considerables avances realizados en la actualidad, tanto con métodos *in situ* como *ex situ*. En comparación con otros invertebrados marinos, por ejemplo, cnidarios, se ha desarrollado poca investigación en acuicultura de esponjas o para cultivo de células (Brümer &

Nickel, 2003).

Las esponjas presentan dos tipos de reproducción, la sexual por gametos y la asexual mediante fragmentación y gemación siendo así capaces de formar una nueva esponja, y cuando no se separan, forman una colonia. La reproducción asexual es la base de los métodos para cultivar esponjas. El método tradicional para cultivarlas consiste en cortar a las esponjas adultas en trozos pequeños (explantos) (Osinga *et al.*, 1999).

Las investigaciones para el desarrollo comercial del cultivo de esponjas con fines biomédicos se han incrementado (Duckworth *et al.*, 1999; Pronzato *et al.*, 1999). Estos estudios sugieren que es necesario establecer un arte de cultivo para cada tipo de crecimiento en esponjas (incrustante, amorfa, tubular) y las condiciones ambientales óptimas y requerimientos para su crecimiento y supervivencia tanto en cultivos *in situ* como *ex situ*, con la finalidad de incrementar la producción de compuestos activos (De Voogd, 2007). Al respecto, los primeros estudios realizados con este fin, fueron los de Duckworth *et al.* (1997) y Pronzato *et al.* (1999) en la costa nororiental de Nueva Zelanda y en el Mediterráneo Occidental, respectivamente. De Caralt *et al.* (2010) probaron tres métodos de cultivo alternativos para *Dysidea avara* optimizando las estructuras de fijación de las esponjas, atravesando los explantos en cuerdas horizontales, dentro de jaulas pequeñas, o adheridas a un sustrato metálico. La eficiencia del cultivo fue evaluada mediante la determinación de la supervivencia, el crecimiento y la bioactividad del metabolito avarol. Los resultados encontrados muestran que el método de la jaula mejora la supervivencia de los explantos, el método de adhesión fue mejor para el crecimiento y el método de la cuerda para la bioactividad.

Duckworth *et al.* (1997) mencionan que además del material utilizado para la fijación del explanto, la apropiada selección del lugar en los sistemas abiertos son claves para el éxito de un cultivo debido a que la localidad tiene influencia tanto en el crecimiento de la esponja como en la síntesis de los metabolitos secundarios (Osinga *et al.*, 1999; 2003). Lo anterior ha sido demostrado en un cultivo de la esponja *Raspailia agminata* donde se obtuvo un incremento de biomasa y supervivencia del 25% y 84% respectivamente en una zona protegida, de forma contraria en una zona expuesta se presentaron pérdidas del 33% y 54% en biomasa y supervivencia (Duckworth *et al.*, 1997).

En el caso de esponjas de aguas pro-

fundas, se ha logrado cultivar con éxito a *Lissodendoryx* sp., fuente de los compuestos antitumorales de la serie de las halichondrinas, manteniéndola en cultivo *in situ* en aguas someras. Si bien, es cierto que los organismos de aguas profundas (80 a 100 m de profundidad) tienen requerimientos más críticos para su desarrollo (baja temperatura, alta presión), existe una gran oportunidad de lograr su transferencia tecnológica y desarrollo económico, sin embargo, en este tipo de cultivo no se tiene completo control de las condiciones ambientales ni de la producción de compuestos (Pomponi, 2001).

Por otro lado, se han descrito cultivos de explantos en sistemas semicerrados o cerrados para varias especies, entre ellas *Geodia cydonium* (Müller *et al.*, 1999), *Pseudosuberites andrewsi* (Osinga *et al.*, 1999; 2003), *Chondrosia reniformis* (Brümmer & Nickel, 2003), *Geodia baretii* (Hoffmann *et al.*, 2003) y muchas otras morfológicamente distintas (Battershill & Page, 1996; Duckworth *et al.*, 1997) con las que han probado distintos parámetros y tipos de alimentación utilizando microalgas (Osinga *et al.*, 1998) o combinaciones de microalgas con bacterias (Fry, 1971).

En cuanto a la obtención de productos naturales, la concentración de los metabolitos en las esponjas cultivadas es muy variable (Page *et al.*, 2005). Algunas esponjas que han sido cultivadas con este fin, han tenido tasas de crecimiento muy buenas, estas esponjas de rápido crecimiento son en su mayoría especies carnosas que no tienen que invertir grandes recursos para la formación del esqueleto. Los estudios han demostrado que la producción de metabolitos en las esponjas cultivadas en sistemas cerrados es a veces inferior a los obtenidos en esponjas cultivadas en el mar (Koopmans *et al.*, 2009).

Conociendo el efecto de los factores ambientales en la biosíntesis de los metabolitos y entendiendo el papel ecológico de éstos, podrían usarse para promover la producción y cantidad de metabolitos. Si la función ecológica de algún metabolito de interés, por ejemplo, es disuadir a los depredadores, podría ser posible imitar la depredación haciendo un corte a la esponja poco antes de la cosecha para promover la producción de metabolitos. Sin embargo, la respuesta al cultivo es variable entre especies y sitios (Duckworth, 2009) y como resultado de esto, los esfuerzos de investigación tanto farmacéuticos como académicos siguen centrados en el desarrollo de técnicas de acuicultura eficientes.

Otra alternativa para producir biomasa de

esponjas para la obtención de compuestos bioactivos es el cultivo *in vitro* de esponjas como células disociadas o tejidos axénicos, que pueden proveer un sistema definido y libre de microorganismos para la producción de metabolitos de esponjas (Wijffels, 2007), aunque el principal problema que enfrenta este tipo de cultivos es que no hay un área en las esponjas, con la cual se pueda iniciar un cultivo primario axénico. Esto es debido a que cerca del 40% de la biomasa total de las esponjas está conformada por microorganismos los cuales pueden o no ser simbioses obligados y requeridos en la producción de un metabolito de interés (Sipkema *et al.*, 2003; Koopmans *et al.*, 2009). Este proceso ha sido difícil debido a la falta de conocimiento sobre las condiciones de cultivo necesarios para su proliferación (Pomponi & Willoughby, 1994; Sipkema 2004; Sipkema *et al.*, 2005). Durante las últimas décadas, se han realizado intentos para establecer el cultivo y finalmente, una línea celular (Pomponi & Willoughby, 1994; Pomponi *et al.*, 1997; Rinkevich *et al.*, 1998; Rinkevich, 1999; De Rosa *et al.*, 2001), sin embargo, hasta la fecha los cultivos celulares se han caracterizado por la falta de crecimiento, o por la duda sobre el origen de las células en crecimiento, ya que las células de la esponja se confunden fácilmente con protozoos o thraustochytridos, un grupo de protistas eucariotas heterótrofos que son muy comunes en el medio marino, y que pueden estar presentes como contaminantes (Koopmans *et al.*, 2009). En vista de la facilidad de contaminación, debe comprobarse periódicamente la autenticidad de las células en cultivo utilizando métodos de ADN (Sipkema *et al.*, 2003) o el análisis de la presencia de metabolitos específicos (Pomponi *et al.*, 1997).

De acuerdo con Pomponi Y Willoughby (1994) existen tres aspectos fundamentales que deben tomarse en cuenta para obtener células individuales en suspensión y, consecutivamente un cultivo primario: la disociación del tejido de la esponja, un enriquecimiento selectivo utilizando gradientes de centrifugación y la aplicación de antibióticos. El establecimiento de cultivos celulares es un largo proceso que requiere de por lo menos un conocimiento fundamental acerca de los requerimientos nutricionales, bioquímica e inmunología de las células de esponjas (Osinga *et al.*, 1999). La composición de los medios de cultivo es un factor importante para el éxito del cultivo. En varios estudios, se ha utilizado un medio de cultivo para células animales adicionado con nuevos componentes que se supone son cruciales para las células de la esponja como aminoácidos, vitaminas, sales, glucosa, suplementos orgánicos, hormonas, factores de crecimiento,

piruvato, vitamina C y cloruro de sodio, estos tres últimos aumentan significativamente la viabilidad celular (De Caralt *et al.*, 2007c). Los estudios actuales continúan enfocados en los métodos para aislar las células, en el desarrollo óptimo del medio de cultivo con la adición de precursores de crecimiento y en el uso de arqueocitos (células totipotentes que pueden diferenciarse en otros tipos de células funcionales) (De Caralt *et al.*, 2007c).

Se ha observado que el tejido de *Suberites domuncula* y *Geodia cydonium* tiene una alta actividad de telomerasa, lo que indica una gran capacidad de proliferación. Sin embargo, las células pierden rápidamente esta actividad después de la disociación en las suspensiones de células individuales, lo que indica la necesidad de contacto célula-célula y el contacto con factores de adhesión extracelular para proliferar (Kozioł *et al.*, 1998), esto explica el poco éxito en la producción de líneas celulares. Por ello, se ha desarrollado una propuesta de un cultivo multicelular conocido como sistema de cultivo de primorfos (agregados multicelulares de la esponja generalmente de forma esférica producidos en un cultivo de células en suspensión).

En el trabajo realizado por Müller *et al.* (2000) encontraron que las células individuales de la esponja *Dysidea avara* contenían una cantidad mínima de avarol, mientras que en los primorfos se encontró una considerable cantidad del metabolito. Estos datos indican que los sistemas de primorfos son una buena opción para la producción *in vitro* de metabolitos secundarios y confirma que al menos para esta esponja, las células individuales no son capaces de proliferar, ni de producir los compuestos.

Además de esta tecnología, se han abierto nuevas posibilidades para el cultivo de células como el uso de embriones y larvas. Los embriones están presentes en gran número en las esponjas maduras y podrían ser una fuente prometedora de células para cultivos continuos, debido a que están compuestos de menos tipos celulares que las células adultas y la mayoría de sus células son células madre (blastómeros). Se ha reportado que el uso de embriones reduce el nivel de contaminación bacteriana exógena en cultivos de células de invertebrados (Rinkevich, 2005), aunque existe aún la proliferación de bacterias simbióticas por transmisión vertical de padres a embriones en algunas especies de esponjas (Usher *et al.*, 2004; De Caralt *et al.*, 2007a). Sin embargo, la mayoría de las bacterias simbióticas de las esponjas son extracelulares y no pueden sobrevivir fuera del mesohilo (Wang, 2006). Aunque

los embriones parecen ser una fuente óptima de células madre, las larvas también contienen este tipo de células en un número elevado y son más fáciles de obtener. Recientemente, se ha explorado cómo obtener larvas de individuos adultos maduros que se mantienen en acuarios bajo condiciones controladas. Estos individuos maduros liberan espontáneamente cientos de larvas (De Caralt *et al.*, 2007b), que pueden establecerse y desarrollarse en juveniles sanos. La obtención de grandes cantidades de larvas de esponjas maduras en el laboratorio podrían permitir tener un stock de células madre durante todo el año para el desarrollo de los cultivos celulares (ya sea como células aisladas o agregados) por lo que este enfoque parece ser prometedor.

RELACIÓN ENTRE ESPONJAS Y BACTERIAS SIMBIÓTICAS

Las esponjas albergan microorganismos tales como, cianobacterias, bacterias heterotróficas, algas unicelulares y hongos. Estos, habitan los espacios extra e intracelulares (mesohilo) (Proksch *et al.*, 2002) y algunas veces constituyen parte importante de la biomasa del hospedero, como es el caso de la esponja *Aplysina aerophoba* en la cual el 40% de su biomasa total está conformada por microorganismos. Cabe mencionar que los microorganismos simbióticos pueden llegar a constituir hasta el 60% del volumen total de una esponja (Hentschel *et al.*, 2003; Usher *et al.*, 2004). Los beneficios que estos simbióticos pueden proveer a la esponja son una mejora nutricional por la incorporación de materia orgánica disuelta en el agua marina, un mejor transporte de metabolitos a través del mesohilo de la esponja, un mejoramiento de la rigidez estructural y de la defensa química ante agentes amenazadores mediante la producción de compuestos bioactivos, como los antibióticos, compuestos antifúngicos y otros que proveen una respuesta directa (dual), indirecta o inmune (Osinga *et al.*, 2001).

Reiswig (1974) acuñó el término "bacterio-esponja" para describir a especies de esponjas con una biomasa significativa de microorganismos. Se ha estimado el número de bacterias en el tejido de *Aplysina aerophoba* y en el extracto de la esponja *Rhopaloeides odorabile* ($6.4 \times 10^8 \text{ g}^{-1}$ y $1.5 \times 10^8 \text{ ml}^{-1}$, respectivamente). Estos números exceden la cantidad de bacterias en el agua marina por dos y cuatro órdenes de magnitud (Friedrich *et al.*, 2001; Webster & Hill, 2001). Vacelet & Donadey (1977) realizaron estudios con 11 especies de Demospongiae mediante microscopía electrónica de transmisión identificándose dos diferentes tipos de

asociaciones entre los microorganismos y la esponja: 1) esponjas con tejido denso (bacterioesponjas) con alta abundancia (HMA) y diversidad de morfotipos microbianos y 2) esponjas de tejidos irrigados o menos densos (LMA) con baja abundancia y normalmente un solo morfotipo bacteriano (Hentschel *et al.*, 2006). Esta interesante dicotomía en asociaciones microbianas y esponjas ha recibido poca atención, posiblemente porque la mayoría de los estudios recientes se han centrado en los aspectos evolutivos (Thacker, 2005) y en especies productoras de metabolitos secundarios farmacológicamente activos (Haygood *et al.*, 1999; Moore, 1999).

En el medio natural, los metabolitos secundarios producidos por los microorganismos cumplen múltiples funciones relacionadas con su supervivencia. Su producción está sujeta a complejas redes reguladoras, y en general, es inducida en la fase estacionaria en condiciones de nutrientes limitados. En el mesohilo, la producción de sustancias antimicrobianas juega un papel importante en la relación antagonista bacteria-bacteria, se cree que los compuestos antimicrobianos les confieren una ventaja selectiva en el momento de la competencia con otras bacterias que habitan el mismo nicho ecológico. Otra función importante de los metabolitos secundarios producidos por bacterias es la capacidad que le da a un microorganismo para escapar de la digestión mediante la prevención de la fagocitosis por los arqueocitos de la esponja, una propiedad que será crucial para su supervivencia. Los arqueocitos son células ameboides individuales del huésped que ingieren bacterias a través de la fagocitosis por absorción de nutrientes. Los microorganismos asociados producen metabolitos secundarios a fin de repeler los arqueocitos y evitar la digestión (Hentschel *et al.*, 2001).

La relación biológica entre bacterias y esponjas ha obtenido un considerable interés como fuente generadora de productos naturales. Debido a la similitud entre los compuestos aislados de macro y microorganismos, se ha especulado que los microorganismos simbiotes son los verdaderos responsables de la producción de productos naturales en esponjas y otros invertebrados marinos. Estas especulaciones están basadas en numerosos compuestos aislados de esponjas, los cuales presentan similitudes estructurales sorprendentes y en algunos casos son idénticos a los productos naturales de origen microbiano, pero aun no se ha demostrado un microorganismo que sea común entre las especies de esponjas estudiadas en la actualidad, por lo que una explicación alternativa a la presencia de compuestos

similares en esponjas, podría ser la evolución convergente en función de la estructura y complejidad de los compuestos. Investigaciones recientes donde el microorganismo simbiote es aislado y cultivado para la producción de compuestos, confirman la similitud estructural existente entre los compuestos producidos por invertebrados marinos y microorganismos, por lo que resulta importante aclarar el papel de los microorganismos simbiotes en invertebrados marinos ricos en productos naturales activos.

¿QUIÉN ES EL VERDADERO PRODUCTOR DEL COMPUESTO BIOACTIVO?

Se considera que los microorganismos simbióticos son responsables de producir un buen número de compuestos bioactivos aislados a partir de organismos marinos particularmente de esponjas y otros invertebrados (Siebert *et al.*, 2004). La principal razón para adjudicar un origen microbiano a un compuesto en particular puede ser la semejanza estructural, parcial o casi total, entre el compuesto aislado y otros compuestos de origen microbiano (Hentschel *et al.*, 2001; Proksch *et al.*, 2002; Piel, 2004; Salomon *et al.*, 2004; Hildebrand *et al.*, 2004).

Algunos aspectos que pueden constituirse como indicios de que la producción se da por parte de los microorganismos simbióticos son, 1) que la abundancia del microorganismo en cuestión, se correlacione con la cantidad del producto natural aislado; 2) que el microorganismo se encuentre en las mismas porciones o tejidos de varios hospederos de la misma especie o en varios ejemplares recolectados en localidades diversas o por lo menos distantes, y 3) cuando especies taxonómicamente distintas contienen el mismo metabolito. Cuando se cumplen estas características se podría sospechar de la participación de los microorganismos (Hentschel *et al.*, 2001).

Si bien, existe la especulación de una contribución de los microorganismos en el metabolismo secundario de las esponjas, es aún difícil probarlo (Faulkner *et al.*, 1997). A fin de proporcionar evidencia inequívoca, el microorganismo tiene que producir el compuesto de interés en condiciones de laboratorio. Sin embargo, una vez fuera de su hábitat natural, las bacterias cambian a menudo su perfil metabólico, debido a las condiciones de crecimiento alterado por la falta de presión selectiva. Aún así existen diversos estudios en los cuales se demuestra la implicación de microorganismos marinos en la producción y/o acumulación de metabolitos secundarios activos. Uno de los primeros trabajos fue el de Stierle *et al.* (1988) quienes señalaron que las dicetopiperazinas aisladas de la esponja *Teadania ignis* son producidas por

Micrococcus sp., que vive en asociación con esta esponja. La esponja *Dysidea herbacea*, de amplia distribución en el Indopacífico, presenta poblaciones abundantes de cianobacterias que se han identificado como *Oscillatoria spongelliae*. A partir de ejemplares de estas cianobacterias se aislaron los sesquiterpenos espirodysina, herbadyiolida y un derivado clorado isodysidenina (Unson & Faulkner, 1993). Las células de las esponjas y de sus cianobacterias asociadas fueron separadas mediante gradientes de Ficoll y usando citometría de flujo acoplada a fluorescencia, así, las células que contenían pigmentos fotosintéticos fueron separadas de todas las células restantes. El derivado clorado se encontró asociado a las fracciones que contenían las cianobacterias, mientras aquellas fracciones no fluorescentes que incluían las células de esponjas y otro tipo de microorganismos, contenían predominantemente los sesquiterpenos (Unson *et al.*, 1994).

Los especímenes de la esponja *Theonella swinhoei* contienen y Proteobacterias filamentosas ("Candidatus *Enttheonella palauensis*") y un consorcio de múltiples especies unicelulares. Ambos tipos de bacterias fueron separadas de las células de la esponja por centrifugación diferencial. Los análisis de los extractos de las bacterias por medio de HPLC y RMN mostraron que el policetido citotóxico "swinholid A" fue predominante en la bacteria unicelular, mientras que el péptido antifungal "theopalauamida" fue detectado en la bacteria filamentosas (Bewley *et al.*, 1996; Schmidt *et al.*, 2000). La manzamina A, un compuesto que presenta efectos citotóxicos, insecticidas y antibacterianos, conocido por su utilización en ensayos clínicos frente a la malaria se aisló originalmente de esponjas del género *Haliclona* en Okinawa, y posteriormente se aisló de un microorganismo marino, perteneciente a los actinomicetos (*Micromonospora*), por lo que se sospecha que el origen de este compuesto sea por microorganismos asociados a *Haliclona* (Blunt *et al.*, 2003). Además este compuesto ha sido encontrado en 17 especies diferentes de esponjas con una amplia distribución geográfica, con lo cual queda la especulación de que podría ser producida por los microorganismos y no por las esponjas.

En algunos casos se tienen evidencias muy bien sustentadas de que los compuestos bioactivos encontrados en las esponjas son de origen microbiano, sin embargo, se ha podido comprobar, usando disociación de células seguida por una separación con gradientes de densidad, que los compuestos se localizan en fracciones celulares de esponjas. El compuesto avarol de la esponja *Dysidea avara* fue

encontrado en células esféricas (Müller *et al.*, 1986), específicamente en los coanocitos. De igual manera se encontró que el compuesto diisocyanoadociane aislado de la esponja *Amphimedon* sp., se localiza en los arqueocitos y coanocitos (Garson *et al.*, 1992). En algunos casos se ha observado que las células del tejido fino de las esponjas son las que producen los compuestos bioactivos cuando están asociadas a ellas grandes poblaciones de bacterias, lo que indicaría que éstos compuestos son sintetizados para su defensa contra depredadores y/o invasores (Richelle-Maurer *et al.*, 2003).

Faulkner *et al.* (2000) especulan que es más probable que los metabolitos bioactivos de las esponjas sean producidos por microorganismos simbiotes, debido a que la enorme diversidad de bacterias asociadas a las esponjas, sugiere una capacidad metabólica de estos. Además, es difícil eliminar la posibilidad de que un compuesto bioactivo sea producido por bacterias, incluso si el compuesto se encuentra localizado en las células de la esponja. Por lo que es importante tener en cuenta siempre esta posibilidad en el estudio de compuestos bioactivos derivados de esponjas de importancia farmacéutica. En algunos casos, una cuidadosa investigación microbiológica se recompensa con el aislamiento del microbio que produce el compuesto de interés (Hill, 2004), por ello, el estudio de la simbiosis representa un paso clave para mejorar la disponibilidad y cantidad de varios productos naturales de interés farmacéutico, que de otro modo serían inaccesibles.

En demospongas es evidente que existe una asociación esponja-microorganismo altamente específica para la producción de un compuesto bioactivo en particular, sin embargo, los mecanismos de esta interacción son poco conocidos, al igual que el efecto de la variación espacio-temporal en la calidad y cantidad del compuesto (Thomas *et al.*, 2010).

Tradicionalmente, los estudios para caracterizar la diversidad bacteriana suponen que las técnicas de cultivo permiten recuperar la mayor parte de los microorganismos en una muestra. Sin embargo, estos estudios se basan en cultivos puros, en donde una sola cepa es aislada y cultivada individualmente. Ahora con el empleo de técnicas moleculares con las que se trata de identificar el total de las bacterias presentes en una comunidad, se ha podido comprobar que únicamente entre 0.1 y 10% de las bacterias en el ambiente son cultivables (Rondon *et al.*, 1999; Watts *et al.*, 1999; Tiedje & Stein, 1999; Handelsman *et al.*, 2002; Torsvik & Øvreås, 2002). En el caso de las espon-

jas, el porcentaje de la comunidad microbiana cultivable varía entre especies, Santavy *et al.* (1990) estimaron que únicamente entre el 3 y el 11% de la población total de bacterias de *Ceratoporella nicholsoni* pudo ser cultivada. Webster y Hill (2001) concluyeron que la comunidad bacteriana heterótrofa cultivable representaba sólo el 0.1% del total de la comunidad microbiana de *Rhopaloides odorabile* y el 0.15% de la población total de bacterias de *Aplysina aerophoba* (Friedrich *et al.*, 2001). Estos resultados son consistentes con el 1% estimado para microorganismos cultivables en ecosistemas microbianos (Hentschel *et al.*, 2003). Este bajo porcentaje se debe principalmente a que se desconocen los requerimientos nutricionales y las condiciones fisicoquímicas necesarias para el desarrollo de un gran número de grupos microbianos en su ambiente natural. Además, hay poca información sobre las relaciones simbióticas, comensales o parasitarias que mantienen los miembros de una comunidad microbiana (McDougald *et al.*, 1998; Tiedje & Stein, 1999; Zengler *et al.*, 2002; Keller & Zengler, 2004).

La selectividad de las condiciones del cultivo ha sido una gran preocupación para los investigadores ya que las cepas seleccionadas pueden llegar a ser la población dominante en condiciones de cultivo, pero puede tratarse de cepas en poca proporción dentro de la esponja (Wang, 2006). Se ha pensado que éstas pueden requerir nutrientes particulares que sólo se encuentran en condiciones naturales y algunos nutrientes tal vez sólo sean proporcionados por microorganismos asociados. En la naturaleza, es común encontrar comunidades bacterianas en las que coexisten varias especies y géneros de bacterias, en estas comunidades pueden existir dependencias metabólicas complejas. Así en los cultivos puros, aunque los nutrientes sean adecuados, algunos microorganismos no crecen si no mantienen múltiples relaciones microbianas (Li *et al.*, 2007). Algunos microorganismos marinos no son capaces de crecer solos en medios artificiales pero pueden formar colonias en presencia de otros microorganismos (Kaeberlein *et al.*, 2002). El enfoque de la microbiología tradicional tiene como primer paso el obtener cultivos puros de bacterias (axénicos) y, tal vez, esto ocasiona que sólo se desarrollen parte de los miembros de la comunidad. Otra posibilidad, es que los medios típicos de crecimiento sean demasiado ricos, aún los medios mínimos tienen un exceso de carbono, nitrógeno o fósforo, y podrían inhibir el crecimiento de microorganismos que en condiciones naturales, viven precariamente. No hay una explicación satisfactoria para entender la baja proporción de bacterias

cultivables, y este fenómeno ha sido una limitación para los estudios de diversidad microbiana. Estudios recientes han demostrado que con un cuidadoso diseño experimental pueden ser fácilmente cultivados incluso los miembros de grupos de bacterias considerados anteriormente como incultivables (Hentschel *et al.*, 2001).

Los avances y la disponibilidad de herramientas moleculares han proporcionado una mejora en las condiciones de aislamiento, cultivo e identificación de las comunidades de microorganismos simbiotes de esponjas que hasta ahora han eludido los esfuerzos de cultivo. Si consideramos la información genómica existente de los microorganismos simbiotes se podrían seleccionar las herramientas necesarias para su cultivo basándonos en la información preexistente de microorganismos filogenéticamente relacionados (Hentschel *et al.*, 2001; Wilkesman, 2007). Sin embargo, una vez logrado el cultivo del microorganismo asociado, en condiciones controladas para la producción comercial de un metabolito bioactivo, aún se debe de identificar y estandarizar la habilidad del microorganismo para producir el compuesto por varias generaciones (Remya *et al.*, 2010).

PERSPECTIVAS DE LA MODIFICACIÓN GENÉTICA PARA UNA PRODUCCIÓN BIOTECNOLÓGICA

El hecho de que solo el 1% de la comunidad microbiana puede ser cultivada en laboratorio, implica que una gran variedad de productos naturales producidos por microorganismos aun son desconocidos o no han sido explotados. Han surgido nuevas técnicas de cultivo o métodos independientes de cultivo que implican la expresión de grupos de genes heterólogos y estrategias de bioconversión quimio-enzimática que han permitido el acceso a esos recursos naturales que antes eran inaccesibles (Van Lanen & Shen, 2006). Estos nuevos métodos para el descubrimiento de productos naturales están relacionados con los avances en la secuenciación de ADN, biosíntesis y bioinformática, que han permitido la rápida identificación de los genes responsables de la producción de algunos productos naturales con actividad biológica, además de generar predicciones por computadora de las estructuras químicas basadas en la información genética. Estas predicciones pueden ser utilizadas en el aislamiento e identificación de nuevas entidades químicas, con la finalidad de eliminar las probabilidades de aislar un compuesto conocido, además de proveer información fisicoquímica que ayude a diseñar condiciones de fermentación para la

producción de un fármaco potencial. El conocimiento molecular de los genes responsables de la biosíntesis de metabolitos secundarios, especialmente relacionados con péptidos (*non ribosomal peptide synthetases*, o NRPS) y macrólidos policétidos (*poliketide synthetases* o PKS) y la posibilidad de combinar distintos módulos para alterar estructuras definidas son un salto significativo en el actual descubrimiento de fármacos a partir de productos naturales marinos (De la Calle, 2007).

La metagenómica, herramienta en la que fragmentos del genoma de una comunidad compleja se analizan, transfieren y se expresan en un huésped adecuado (Stein *et al.*, 1996; Handelsman, 2004), tiene una gran variedad de aplicaciones que, en un futuro cercano, serán el centro de la investigación en productos naturales marinos. Estas aplicaciones han surgido como una opción atractiva para permitir la evaluación de grandes fragmentos de genoma microbiano presente en los ambientes marinos (Cowan *et al.*, 2005), aplicando vectores de clonación (cromosomas artificiales bacterianos (BAC) y cósmidos), técnicas de aislamiento de ADN y metodologías avanzadas de detección sistemática mediante la instrumentación robótica (Lorenz, 2005). Las aplicaciones de la metagenómica han sido particularmente exitosas en los ambientes terrestres, donde se han identificado genes implicados en la producción de antibióticos, resistencia a los antibióticos y enzimas de degradación, entre otros (Handelsman, 2004; Suenaga *et al.*, 2007).

Diversas estrategias biotecnológicas han resuelto el complicado reto de conseguir un suministro recurrente de algunos de los metabolitos que se encuentran en cantidades mínimas en invertebrados marinos. El descubrimiento de que en los procariontes, los genes de los productos naturales se presentan habitualmente agrupados, hizo posible clonar una ruta completa en un vector (Handelsman *et al.*, 1998). Muchos genes de productos naturales son modulares y pueden producir enzimas multifuncionales, tienen un alto grado de plasticidad. Al intercambiar y mover genes dentro de esta agrupación, se pueden producir enzimas híbridas que son capaces de sintetizar un conjunto ilimitado de nuevas moléculas (Kennedy & Hutchinson, 1999). Un ejemplo de esto es la clonación de la ruta biosintética de genes de *Streptomyces* que ha permitido la producción de nuevos compuestos mediante la mezcla de antibióticos producidos por diferentes cepas bacterianas (Hopwood, 1999; Schmeisser *et al.*, 2007).

La biología combinatoria es una estrategia de mezcla al azar de múltiples genes de más de una especie que produce metabolitos, que ha sido generada por el desarrollo de vectores para transferir ADN en las bacterias usando cósmidos para transferir ADN de 30 a 40 kb. Esto permite que la información genética para 30 a 400 enzimas sea transferida en un solo tiempo a un vector comercial. El ADN es entonces transcrito usando promotores sintéticos para crear una nueva ruta biosintética. Mediante la transferencia de genes de microorganismos marinos en un clon se podrían obtener compuestos biológicamente activos que nunca han sido observados en la naturaleza (Bernan *et al.*, 1997; Schmeisser *et al.*, 2007).

Gracias a la aplicación de nuevas herramientas moleculares, biosíntesis y metagenómica que han mostrado una biodiversidad marina que va más allá de lo imaginable, el aislamiento, identificación, síntesis y biosíntesis de nuevas e innovadoras moléculas con potencial farmacológico seguirá en incremento.

CONCLUSIÓN

Con todo el panorama planteado anteriormente, no cabe duda de que la búsqueda de compuestos con actividad biológica a partir de organismos marinos tiene un gran potencial farmacológico, y dentro de los organismos de mayor interés, las esponjas han demostrado ser las mayores productoras de compuestos bioactivos con interesantes actividades. Sin embargo, en muchos casos el desarrollo de los fármacos se ve obstaculizado por la limitada cantidad de los compuestos, ya que con frecuencia se encuentran en pequeñas cantidades en el tejido de la esponja. Dado que la síntesis química de los productos naturales puede ser muy problemática y costosa debido a su complejidad estructural, es necesaria la búsqueda de métodos alternativos para una producción sustentable del recurso con el cual se obtenga la cantidad suficiente de compuesto que se requiere para los ensayos, hasta ahora se tiene un gran avance en el desarrollo de estas alternativas, tanto en el cultivo de esponjas, primorfos o células madre, sin embargo, una gran cantidad de estudios se están enfocando en los microorganismos asociados a esponjas, su cultivo biotecnológico y aspectos de metagenómica, lo cual representa un potencial para la búsqueda de nuevos metabolitos que puedan ser utilizados con fines farmacológicos.

REFERENCIAS

- Aoki, S., Y. Yoshioka, Y. Miyamoto, K. Higuchi, A. Setiawan, N. Murakami, Z.S. Chen, T. Sumizawa, S. I. Akiyama & M. Kobayashi M. 1998. Agosterol A, a novel polyhydroxylated sterol acetate reversing multidrug resistance from a marine sponge *Spongia* sp. *Tetrahedron Lett.*, 39:6303-6306
- Armstrong, E., J.D. McKenzie, G.T. Goldsworthy. 1999. Aquaculture of sponges on scallops for natural products research and anti-fouling. *J Biotechnol.*, 70:163-74.
- Battershill, C.N. & M.J. Page. 1996. Sponge aquaculture for drug production. *Aquac Update*, 5-6.
- Bewley, C.A., N.D. Holland & D.J. Faulkner. 1996. Two classes of metabolites from *Theonella swinhoei* are localized in distinct populations of bacterial symbionts. *Experientia*, 52: 716-722.
- Bernan, V.S., M. Greenstein & W.M. Maiese. 1997. Microorganisms as source of new natural products, 57-90. En: Neidleman, S. & A. Laskin (Eds.) *Advances in applied microbiology*. Academic Press, 254 p.
- Bergmann, W., Feeney R.J. 1950. The isolation of a new thymine pentoside from sponges. *J. Am. Chem. Soc.*, 72:2809-2810.
- Bhakuni, D.S. & D.S. Rawat. 2005. *Bioactive Marine Natural Products*. Springer, New York, USA, and Anamaya Publisher, New Delhi, India. ISBN: 1-4020-3472-5. 400 p.
- Blunt, J.W., B.R. Copp, M.H.G. Munro, P.T. Northcote & M.R. Prinsep. 2003. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.*, 20: 1-48.
- Blunt, J.W. & Munro M.H.G. 2007. *Dictionary of Marine Natural Products with CD-ROM*. Chapman and Hall/CRC Press, Boca Raton, FL. cxix + 2415 pp. ISBN 978-0-8493-8216-1.
- Blunt, J.W., B.R. Coop, W.P. Hu, M.H.G. Munro, P.T. Northcote & M.R. Prinsep. 2009. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.*, 26(2):170-244.
- Brümmer, F. & M. Nickel. 2003. Sustainable use of marine resources: Cultivation of sponges, 143-162. En: Müller, W.E.G. (Ed.). *Sponges (Porifera)*, Progress in molecular and submolecular Biology - Marine Molecular Biotechnology. 258 p.
- Carballo, J. L. 2002. Los organismos marinos y las moléculas bioactivas. Perspectiva actual, 83-115. En: A. J. Laborda y Secretariado de Publicaciones Universidad de León (Eds). *El mar como fuente de moléculas bioactivas*. León, España. 233 p. ISBN 84-7719-796-2.
- Carballo, J., B. Yañez, E. Zubía, M.J. Ortega & C. Vega. 2009. Culture of explants from the sponge *Mycale Cecilia* to obtain bioactive mycalazal-type metabolites. *Mar. Biotech.*, DOI: 10.1007/s10126-009-9235-9
- Cowan, D, Q. Meyer, W. Stafford, S. Muyanga, R. Cameron & P. Wittwer. 2005. Metagenomic gene discovery: past, present and future. *Trends Biotechnol.*, 23(6):321-329.
- De Caralt, S., M.J. Uriz & R.H. Wijffels 2007a. Vertical transmission and successive location of symbiotic bacteria during embryo development and larva formation in *Corticium candelabrum* (Porifera: Demospongiae). *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.*, 87(6):1693-1699.
- De Caralt S., H. Ojens, M.J. Uriz & R.H. Wijffels. 2007b. Cultivation of sponge larvae: settlement, survival, and growth of juveniles. *Mar Biotechnol.*, 9(5):592-605.
- De Caralt S., M.J. Uriz & R.H. Wijffels. 2007c. Cell culture from sponges: pluripotency and immortality. *TRENDS in Biotechnology*, 25(10): 467-471.
- De Caralt, S., J. Sánchez Fontela, M.J. Uriz & R. Wijffels. 2010. *In Situ* Aquaculture Methods for *Dysidea avara* (Demospongiae, Porifera) in the Northwestern Mediterranean. *Mar. Drugs*, 8:1731-1742.
- De Rosa, S., S. De Caro, G. Tommonaro, K. Slantchev, K. Stefanov & S. Popov. 2001. Development in a primary cell culture of the marine sponge *Ircinia muscarum* and analysis of the polar compounds. *Mar. Biotechnol.*, 3:281-286.
- De Voogd, N.J. 2007. The mariculture potential of the Indonesian reef-dwelling sponge *Callyspongia* (Euplacella): growth, survival and bioactive compounds. *Aquaculture*, 262: 54-64.
- Donia, M. & M.T. Hamann, 2003. Marine natural products and their potential applications as anti infective agents. *Lancet Infect. Dis.*, 3: 338-348.
- Duckworth, A.R., C.N. Battershill & P.R. Bergquist. 1997. Influence of explants

- procedures and environmental factors on culture success of three sponges. *Aquaculture*, 156: 251-267.
- Duckworth, A.R., C.N. Battershill, D.R. Schiel & P.R. Bergquist. 1999. Farming sponges for the production of the bioactive metabolites. *Memoirs of Queensland Museum*, 44: 155-159.
- Duckworth, A.R. & C.N. Battershill. 2003. Developing farming structures for production of biologically active sponge metabolites. *Aquaculture*, 217: 139-156
- Duckworth, A.R. 2009. Farming sponges to supply bioactive metabolites and bath sponges: A review. *Mar. Biotechnol.*, 11: 669-679.
- Faulkner, D.J. 1997. Marine Natural Products. *Nat. Prod. Rep.*, 14: 259-302.
- Faulkner, D.J. 2000. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.*, 17: 7-55.
- Faulkner, D.J. 2002. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.*, 19: 1-48.
- Faulkner, D.J., M.K. Harper, M.G. Haygood, C.E. Salomon & E.W. Schmidt. 2000. Symbiotic bacteria in sponges: sources of bioactive substances, 107-119. En: Fusetani N. (Ed.). *Drugs from the Sea*, Basel: Karger. ISBN: 978-3-8055-7098-5. 158 p.
- Friedrich, A.B., I. Fischer, P. Proksch, J. Hacker, U. Hentschel. 2001. Temporal variation of the microbial community associated with the Mediterranean sponge *Aplysina aerophoba*. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 38:105-113.
- Fry, W. G. 1971. The biology of larvae of *Ophiliataspongia seriata* from two North Wales populations. En: Crisp D. J. (Ed.). *Proceedings of the Fourth European Marine Biology Symposium*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Fukuoka, K., T. Yamagishi, T. Ichihara, S. Nakaike, K. Iguchi, Y. Yamada, H. Fukumoto, T. Yoneda, K. Samata, H. Ikeya, K. Nanami, N. Hirayama, N. Narita, N. Saijo & K. Nishio. 2000. Mechanism of action of aragusterol a (YTA0040), a potent anti-tumor marine steroid targeting the G(1) phase of the cell cycle. *Int. J. Cancer*, 88(5):810-819.
- Gad, S.C. 2005. *Drug discovery handbook*. Pharmaceutical Development Series. Wiley-Interscience. John Wiley & Sons, INC., Publication. 10: 1471 p.
- Garson, M.J., J.E. Thompson, R.M. Larsen, C.N. Battershill, P.T. Murphy & P.R. Bergquist. 1992. Terpenes in sponge cell membranes: Cell separation and membrane fractionation studies with the tropical marine sponge *Amphimedon* sp. *Lipids*, 27(5): 378-388.
- Gauvin, A., J. Smadja, M. Aknin, R. Faure & E.M. Gaydou. 2000. Isolation of bioactive 5 alpha, 8 alpha-epidioxy sterols from the marine sponge *Luffariella cf. variabilis*. *Can. J. Chem.*, 78(7):986-992.
- Guan, Y., R. Sakai, K.L. Rinehart & A.H.J. Wang. 1993. Molecular and crystal structures of ecteinascidins potent antitumor compounds from the caribbean tunicate *Ecteinascidina turbinata*. *J. Biolmol. Struct. Dynam.*, 10(5):793-818.
- Hadas, E., M. Shpigel & M. Ilan. 2005. Sea ranching of the marine sponge *Negombata magnifica* (Demospongiae, Latrunculiidae) as a first step for latrunculin-B mass production. *Aquaculture*, 244: 159 -169.
- Handelsman, J., M. R. Rondon, S. F. Brady, J. Clardy & R. M. Goodman. 1998. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chem Biol.*, 5:245-249.
- Handelsman, J., M. Liles, D. Mann, C. Riesenfeld & R.M. Goodman. 2002. Cloning the metagenome: culture independent access to the diversity and functions of the uncultivable microbial world, 241-255 En: Wren B. & N. Dorrel (Eds). *Methods in Microbiology: Functional Genomics*. Academic Press. Amsterdam, Holanda.
- Handelsman, J. 2004. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 68(4):669-685.
- Haygood, M.G., E.W. Schmidt, S.K. Davidson & D.J. Faulkner. 1999. Microbial symbionts of marine invertebrates: opportunities for microbial biotechnology. *J. Mol. Microbiol. Biotech.*, 1:33-43.
- Hentschel, U., M. Schmid, M. Wagner, L. Fieseler, C. Gernert, J. Hacker. 2001. Isolation and phylogenetic analysis of bacteria with antimicrobial activities from the Mediterranean sponges *Aplysina aerophoba* and *Aplysina cavernicola*. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 35:305-35312.

- Hentschel, U., L. Fieseler, A. Wehrl, C. Gernert, M. Steinert, J. Hacker, M. Horn. 2003. Microbial diversity of marine sponges, 59–88. En: Müller W.E.G. (Ed.). *Sponges (Porifera)*. Springer, Berlin Heidelberg, Nueva York. 253 p.
- Hentschel, U., K.M. Usher, M.W. Taylor. 2006. Marine sponges as microbial fermenters. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 55:167-177.
- Hildebrand, M., L.E. Waggoner, G.E. Lim, K.H. Sharp, C.P. Ridley & M.G. Haygood. 2004. Approaches to identify clone and express symbiont bioactive metabolite genes. *Nat. Prod. Rep.*, 21(1): 122-142.
- Hill, R.T. 2004. Microbes from marine sponges: a treasure trove of biodiversity for natural products discovery, 177–190. En: Bull, A.T. (Ed.) *Microbial diversity and bioprospecting*. ASM Press, Washington. 496 p.
- Hoffmann, F., H.T. Rapp, T. Zöller & J. Reitner. 2003. Growth and regeneration in cultivated fragments of the boreal deep water sponge *Geodia barretti* bowerbank, 1858 (Geodiidae, Tetractinellida, Demospongiae). *J. Biotech.*, 100: 109-118.
- Hopwood, D. 1999. Forty years of genetics with *Streptomyces*: from *in vivo* through *in vitro* to silico. *Microbiology*, 145:2183-2202.
- Jiménez, J.C., M. Marfil, A. Francesch, C. Cuevas, M. Alvarez & F. Albericio. 2007. Productos naturales de origen marino. *Investigación y Ciencia*, 75-83.
- Kaeberlein, T., K. Lewis & S.S Epstein. 2002. Isolating “uncultivable” microorganisms in pure culture in a simulated natural environment. *Science*, 296:1127-1129.
- Keller, M. & K. Zengler. 2004. Tapping into microbial diversity. *Nature Reviews*, 2: 141-150.
- Kennedy, J. & C.R. Hutchinson. 1999. Nurturing nature: engineering new antibiotics. *Nat. Biotechnol.*, 17:538–539.
- Kobayashi, M. 2000. Search for biological active substances from marine sponges, 46–58, En: Fusetani N. (Ed.), *Drugs from the Sea*. Basel, Krager. ISBN: 3805570988. 158 p.
- Koopmans, M., D. Martens & R.H. Wijffels. 2009. Towards commercial production of sponge medicines. *Mar. Drugs*, 7(4): 787-802.
- Koziol, C., R. Borojevic, R. Steffen & W.E.G. Müller. 1998. Sponges (Porifera) model systems to study the shift from immortal to senescent somatic cells: the telomerase activity in somatic cells. *Mech. Ageing Dev.*, 100: 107–120.
- Li, Z., L. He & X. Miao. 2007. Cultivable bacterial community from south china sea sponge as revealed by DGGE fingerprinting and 16s rDNA phylogenetic analysis. *Curr. Microbiol.*, 55 (6):465-472.
- Lorenz, P. & J. Eck. 2005. Metagenomics and industrial applications. *Nat. Rev. Microbiol.*, 3(6):510-516.
- Mayer, A.M.S. & K.R. Gustafson. 2008. Marine pharmacology in 2005-2006: Antitumor and cytotoxic compounds. *Eur. J. Cancer.*, 44:2357-2387.
- McDougald, D., S. Rice, D. Weichart & S. Kjelleberg. 1998. Nonculturability: adaptation or debilitation. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 25: 1-9.
- Mendola, D. 2003. Aquaculture of three phyla of marine invertebrates to yield bioactive metabolites: process developments and economics. *Biomol. Eng.*, 20:441–458.
- Miyamoto, T., K. Kodama, Y. Aramarki, R. Higuchi & R.W. van Soest. 2001. Orostanal, a novel abeo-sterol inducing apoptosis in leukemia cell from a marine sponge, *Stelletta hiwasaensis*. *Tetrahedron Lett.*, 42: 6349-6351.
- Moore, B.S. 1999. Biosynthesis of marine natural products: microorganisms and macroalgae. *Nat. Prod. Rep.*, 16:653-674.
- Müller, W.E., B. Diehl-Seifert, C. Sobel, A. Bechtold, Z. Kljajic & A. Dorn. 1986. Sponge secondary metabolites: biochemical and ultrastructural localization of the antimitotic agent avarol in *Dysidea avara*. *J. Histochem. Cytochem.*, 34:1687-1690.
- Müller, W.E.G., M. Wiens, R. Batel, R. Steffen, H.C. Schroder, R. Borojevic & M.R. Custodio. 1999. Establishment of a primary cell culture from a sponge: primmorphs from *Suberites domuncula*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 178:205-219.
- Müller, W.E.G. M. Böhm, R. Batel, S. De Rosa, G. Tommonaro & I.M. Müller. 2000. Application of cell culture for the production of bioactive compounds from sponges: synthesis

- of avarol by primmorphs from *Dysidea avara*. *J. Nat. Prod.*, 63: 1077–1081.
- Müller W., V. Grebenjuk, G. Le Pennee, H. Schröder, F. Brummer, U. Hentschel, I. Muller & H. Breter. 2004. Sustainable production of bioactive compounds by sponges-cell culture and gene cluster approach: a review. *Mar. Biotechnol.*, 12: 219-221.
- Nocross, R.D. & I. Paterson. 1995. Total synthesis of bioactive marine macrolides. *Chem. Rev.*, 95(6): 2041-2114.
- Osinga, R., J. Tramper & R.H. Wijffels. 1998. Optimisation of the growth medium for an *in vitro* sponge culture. *5th International Sponge Symposium*, 55 p.
- Osinga, R., J. Tramper & R.H. Wijffels. 1999. Cultivation of marine sponges. *Mar. Biotech.*, 1(6):509-532.
- Osinga, R., E. Armstrong, J.G. Burgess, F. Hofmann, J. Reitner & G. Schumann-Kindel. 2001. Sponge-microbe associations and their importance for sponge bioprocess engineering. *Hydrobiologia*, 461:55–62.
- Osinga, R., E. H. Belarbi, E.M. Grima, J. Tramper & R. H. Wijffels. 2003. Progress towards a controlled culture of the marine sponge *Pseudosuberites andrewsi* in a bioreactor. *J. Biotechnol.*, 100:141-146.
- Page, M.J., P.T. Northcote, V.L. Webb, S. Mackey & S.J. Handley. 2005. Aquaculture trials for the production of biologically active metabolites in the New Zealand sponge *Mycale hentscheli* (Demospongiae: Poecilosclerida). *Aquaculture*, 250:256–269.
- Pajic, I., Z. Kljajic, N. Dogovic, D. Sladic, Z. Juranic & M.J. Gasic. 2002. A novel lectin from the sponge *Haliclona cratera*: isolation, characterization and biological activity. *Comp. Biochem. Phys.*, 132: 213-221.
- Paterson, I. & E. A. Anderson. 2005. The renaissance of natural products as drug candidates. *Science*, 310(5747):451-453.
- Pawlik, J.R., G. McFall, & S. Zea. 2002. Does the odor from sponges of the genus *Ircinia* protect them from fish predators? *J. Chem. Ecol.*, 28:1103-1115.
- Piel, J. 2004. Metabolites from symbiotic bacteria. *Nat. Prod. Rep.*, 21: 519-538.
- Pomponi, S.A. & R. Willoughby. 1994. Sponge cell culture for production of bioactive metabolites, 395-400. *En: Van Soest, R.W.M., T.M.G Van Kempen & J.C. Braekman (Eds.). Sponges in Time and Space. Balke-ma, Rotterdam. 264 p.*
- Pomponi, S.A., R. Willoughby, M.E. Kaighn, A.E. Wright. 1997. Developments of techniques for *in vitro* production of bioactive natural products from marine sponges, 231–237. *En: Maramorosch, K. & J. Mitsuhashi (Ed.). Invertebrate cell culture: Novel directions and biotechnology applications.* Enfield, NH: Science Publishers. 296 p.
- Pomponi, S.A. 1999. The bioprocess-technological potential of the sea. *J. Biotechnol.*, 70: 5-13.
- Pomponi, S.A. 2001. The oceans and human health: The discovery and development of marine-derived drugs. *Oceanography*, 14(1):78-87.
- Proksch, P., R.A. Edrada & R. Ebel. 2002. Drugs from the seas - current status and microbiological implications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 59:125.
- Pronzato, R., G. Bavestrello, C. Cerrano, G. Magnino, R. Manconi, J. Pantelis, A. Sarà & M. Sidri. 1999. Sponge farming in the Mediterranean Sea: new perspectives. *Memoirs of the Queensland Museum*, 44: 485-491.
- Reiswig, H.M. 1974. Water transport, respiration and energetics of three tropical marine sponges. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 14:231–249.
- Richelle-Maurer, E., R. Gomez, J.C. Braekman, G. Van de Vyver, R.W.M. Van Soest, C. Devijver. 2003. Primary cultures from the marine sponge *Xestospongia muta* (Petrosiidae, Haplosclerida). *J. Biotechnol.*, 100:169–176.
- Rinkevich, B., M. Ilan & R. Blisko. 1998. Further steps in the initiation of cell cultures from embryos and adult sponge colonies. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Admin.*, 34: 753–756
- Rinkevich, B. 1999. Cell cultures from marine invertebrates: obstacles, new approaches and recent improvements. *J. Biotechnol.*, 70: 133-53.
- Rondon, M., M. Goodman & J. Handelsman. 1999. The earth's bounty: assessing and accessing the soil microbial diversity. *Trends Biotechnol.*, 17: 403-409.

- Salomon, C.E., N.A. Magarvey & D.H. Sherman. 2004. Merging the potential of microbial genetics with biological and chemical diversity: an even brighter future for marine natural product drug discovery. *Nat. Prod. Rep.*, 21: 105-121.
- Santavy, D.L., P. Willenz, R.R. Colwell. 1990. Phenotypic study of bacteria associated with the Caribbean sclerosponge, *Ceratoporella nicholsoni*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56:1750-1762.
- Schmidt, E.W., A.Y. Obraztsova, S.K. Davidson, D.J. Faulkner & M.G. Haygood. 2000. Identification of the antifungal peptide-containing symbiont of the marine sponge *Theonella swinhoei* as a novel delta-proteobacterium, "Candidatus *Entotheonella palauensis*". *Mar. Biol.*, 136:969-977.
- Schmeisser, C., H. Steele & W.R. Streit. 2007. Metagenomics, biotechnology with non-culturable microbes. *App. Microbiol. Biotechnol.*, 75(5): 955-962.
- Siebert, K., M. Busl, I. Asmus, J. Freund, A. Muscholl-Silberhorn & R. Wirth. 2004. Evaluation of methods for storage of marine macroorganisms with optimal recovery of bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70: 5912-5915.
- Sipkema, D., R. van Wielink, A.A.M. van Lammeren, J. Tramper, R. Osinga & R.H. Wijffels. 2003. Primmorphs from seven marine sponges: formation and structure. *J. Biotechnol.*, 100: 127-39.
- Sipkema, D. 2004. *Cultivation of marine sponges: from sea to cell*. Tesis de Doctorado. Wageningen University and Research Centre. Netherlands. 184 p.
- Sipkema, D., M.C. Franssen, R. Osinga, J. Tramper & R.H. Wijffels. 2005. Marine sponges as pharmacy. *Mar. Biotechnol.*, 7: 142-162.
- Stein, J.L., T.L. Marsh, K.Y. Wu, H. Shizuya & E.F. DeLong. 1996. Characterization of uncultivated prokaryotes: isolation and analysis of a 40-kilobase-pair genome fragment from a planktonic marine archaeon. *J. Bacteriol.*, 178(3):591-599.
- Stierle, A.C., J.H. Cardellina & F.L. Singleton. 1988. A marine *Micrococcus* produces metabolites ascribed to the sponge *Tedania ignis*. *Experientia*, 44: 1021.
- Suenaga, H., T. Ohnuki & F. Miyazaki. 2007. Functional screening of a metagenomic library for genes involved in microbial degradation of aromatic compounds. *Environ. Microbiol.*, 9(9):2289-2297.
- Thacker, R.W. 2005. Impacts of shading on sponge-Cyanobacteria symbioses: a comparison between host-specific and generalist associations. *Integr. Comp. Biol.*, 45:369-376.
- Thomas, T.R.A., D.P. Kavlekar & P.A. LokaBharathi. 2010. Marine drugs from sponge-microbe-association- A Review. *Mar. Drugs*, 8:1417-1468.
- Thompson, J. E., P.T. Murphy, P.R. Bergquist & E.A. Evans. 1987. Environmentally induced variation in diterpene composition of the marine sponge *Rhopaloeides odorabile*. *Biochem. Syst. Ecol.*, 15: 595-606.
- Tiedje, J. M. & J. L. Stein. 1999. Microbial diversity: strategies for its recovery, 682-692. En: Demain, A. L. & J. E. Davies (Eds). *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. ASM Press. Washington, D.C. USA.
- Torsvik, V. & L. Øvreås. 2002. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion Microbiol.*, 5:240-245.
- Uemura, D., K. Takahashi, T. Yamamoto, C. Katayama, J. Tanaka, Y. Okamura, Y. Hirata. 1985. *J. Am. Chem. Soc.*, 107: 4796-4798.
- Unson, M.D. & D.J. Faulkner. 1993. Cyanobacterial symbiont biosynthesis of chlorinated metabolites from *Dysidea herbacea* (Porifera). *Experientia*, 49: 349-353.
- Unson, M.D., N.D. Holland & D.J. Faulkner. 1994. A brominated secondary metabolite synthesized by the cyanobacterial symbiont of a marine sponge and accumulation of the crystalline metabolite in the sponge tissue. *Mar. Biol.*, 119: 1-11.
- Usher, K.M., J. Fromont, D.C. Sutton & S. Toze. 2004. The biogeography and phylogeny of unicellular cyanobacterial symbionts in sponges from Australia and the Mediterranean. *Microb. Ecol.*, 48(2):167-177.
- Vacelet, J. & C. Donadey. 1977. Electron microscope study of the association between some sponges and bacteria. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 30:301-314

- Van Lanen, S.G., & B. Shen. 2006. Microbial genomics for the improvement of natural product discovery. *Curr. Opin. Microbiol.*, 9:252-260.
- Wang, G. 2006. Diversity and biotechnological potential of the sponge-associated microbial consortia. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 33: 545-551.
- Watts, J.E.M., A.S. Huddleston-Anderson & E.M.H. Wellington. 1999. Bioprospecting, 631- 641. En Demain, A.L. & J.E. Davies (Eds.). *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. ASM Press. Washington, D.C. USA.
- Webster, N.S. & R.T. Hill. 2001. The culturable microbial community of the Great Barrier Reef sponge *Rhopaloeides odorabile* is dominated by an alpha-Proteobacterium. *Marine Biol.*, 138:843-851.
- White, J. D. & M. Kawasaki. 1992. Total synthesis of (+)-latrunculin A, an ichthyotoxic metabolite of the sponge *Latrunculia magnifica* and its C-15 epimer. *J. Org. Chem.*, 57: 5292-5300.
- Wijffels, R.H., 2007. Potential of sponge and microalgae for marine biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 26: 26-31
- Wilkesman, G. J. 2007. Simbiosis microbiana en esponjas marinas: Revisión de aspectos ecológicos. *Ciencia*, 15(2):182-192.
- Zengler, K., G. Toledo, M. Rappé, J. Elkins, E. J. Mathur, J. M. Short & M. Sëller. 2002. Cultivating the uncultured. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 99: 15681-15686.
- Zhang, W., X. Zhang, X. Cao, J. Xu, Q. Zhao & X. Yu. 2003. Optimizing the formation of *in vitro* sponge primorphs from the Chinese sponge *Stylotella agminata* (Ridley). *J. of Biotech.* 100(2):161-168.