



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA SUR
ÁREA DE CONOCIMIENTO DE CIENCIAS DEL MAR
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE BIOLOGÍA MARINA

TESIS

**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y CITOTÓXICA DE DIFERENTES
MORFOLOGÍAS DE LA ESPONJA *Aplysina gerardogreeni* DE PUNTA
ARENA DE LA VENTANA, B.C.S., MÉXICO.**

QUE COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO MARINO

PRESENTA:

ABIGAIL GÁNDARA ZAMUDIO

DIRECTOR:

DOCTORA CLAUDIA JUDITH HERNÁNDEZ GUERRERO

LA PAZ, BAJA CALIFORNIA SUR, OCTUBRE DE 2011

La presente tesis se realizó en el Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICIMAR-IPN) bajo la dirección de la Dr. Claudia Judith Hernández Guerrero, dentro de los proyectos “Variación temporal de la bioactividad y comunidad microbiana asociada a la esponja *Aplysina* spp.” SIP20100862 y Búsqueda de actividad antimicrobiana en bacterias heterótrofas asociadas a la esponja *Haliclona* sp. de la Bahía de La Paz, BCS, México. SIP 20111046.

DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedicó a todas las personas que me apoyaron incondicionalmente en este viaje en especial:

A mi pa' *Juan Ignacio Gándara Méndez*, por enseñarme la pasión por la vida, el amor y respeto por la naturaleza y por darme la fuerza para enfrentar todas las adversidades del camino. Por darme la confianza de emprender mi vuelo y que donde quiera que se encuentre sé que estaría orgulloso de mi.

A mi mamá *Maricela Zamudio Hernández*, por su amor incondicional, por ser mi mejor amiga y por su fortaleza para dejarme alcanzar mis sueños.

A mi hermano *Anson*, por cuidar de mis papás en mi ausencia, por ser una de las más grandes alegrías en mi vida.

A mi esposo *Rodrigo*, por ser mi mejor amigo, confidente, compañero, por amarme y aguantarme aún en mis peores momentos, por darme fuerzas cuando sentí que no podía más.

A mi hijo, *Juanito*, que aunque muy pequeño, es la mayor motivación y alegría de mi vida.

Por supuesto a mis gordas *Soni* y *Tony*, por su amistad, por sus locuras, por todo lo vivido en estos años, saben que siempre estarán en mi corazón.

A *Claudia Hernández*, por brindarme su tiempo, paciencia y amistad para realizar este trabajo.

A todos ustedes, muchas GRACIAS desde el fondo de mi corazón.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todos los que me apoyaron y orientaron en la realización de éste trabajo en especial:

A mi directora de tesis, Dra. Claudia Hernández Guerrero, quien me ha brindado su tiempo y esfuerzo desde un inicio.

A la Dra. Bárbara González Acosta, por su tiempo y orientación en la realización de los ensayos genéticos; y ayuda en los ensayos de actividad antibacteriana.

A la M. en C. Ruth Noemí Aguilar Ramírez, por su apoyo en los ensayos de actividad antibacteriana.

Al Dr. Carlos Sánchez Ortiz, por sus valiosos comentarios que enriquecieron notablemente este trabajo.

A la Dra. Janeth Gutierrez Uribe, por su ayuda en la realización de las pruebas de actividad citotóxica.

A CICIMAR-IPN, por prestar sus instalaciones para la realización de esta tesis, sin ello no hubiera sido posible.

INDICE

	Pag.
RELACIÓN DE FIGURAS Y TABLAS.....	I
GLOSARIO.....	III
ABREVIATURAS.....	VI
RESUMEN.....	VII
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	3
JUSTIFICACIÓN.....	13
IDENTIFICACIÓN Y DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA.....	13
HIPÓTESIS.....	14
OBJETIVOS.....	15
METODOLOGÍA.....	16
Material biológico y recolecta de los ejemplares.....	16
Obtención de los extractos orgánicos.....	18
Evaluación de la actividad antibacteriana.....	19
Análisis estadístico.....	21
Evaluación de la actividad citotóxica.....	21
Extracción del ADN.....	22
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y electroforesis.....	23
Secuenciación y determinación de las unidades genéticas.....	24

RESULTADOS.....	25
Tipos de morfologías.....	25
Obtención de extractos orgánicos.....	27
Evaluación y análisis estadístico de la actividad antibacteriana de los extractos de las diferentes morfologías de <i>A. gerardogreeni</i>	28
Actividad citotóxica.....	33
Extracción de ADN.....	34
Secuenciación.....	35
Determinación de unidades génicas.....	37
DISCUSIÓN.....	40
CONCLUSIONES.....	50
ANEXO I.....	52
BIBLIOGRAFÍA.....	54

RELACIÓN DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Ubicación del arrecife rocoso Punta Arena de la Ventana, Baja California Sur.....	18
Figura 2. Proporción de cada morfología con base en su peso húmedo.....	25
Figura 3. Perfil cromatográfico de las diferentes morfologías.....	28
Figura 4. Halos de inhibición de las cuatro morfologías frente a <i>S. aureus</i> ...	29
Figura 5. Diferencias en los halos de inhibición (mm) obtenidos para <i>S. aureus</i> , entre las concentraciones probadas en las distintas morfologías.....	29
Figura 6. Diferencias en los halos de inhibición (mm) entre las distintas morfologías a diferentes concentraciones frente a la cepa <i>S. aureus</i>	30
Figura 7. Valores de actividad antibacteriana frente a <i>S. aureus</i> en las diferentes morfologías.....	30
Figura 8. Halos de inhibición de las cuatro morfologías frente a <i>E. coli</i>	31
Figura 9. Diferencias en los halos de inhibición (mm) obtenidos frente a <i>E. coli</i> , entre las concentraciones probadas	32
Figura 10. Diferencias en los halos de inhibición (mm) entre las distintas morfologías a diferentes concentraciones frente a la cepa <i>E. coli</i>	32
Figura 11. Valores de actividad antibacteriana frente a <i>E. coli</i> en las diferentes morfologías.....	33
Figura 12. Producto de PCR de las variantes morfológicas.....	35

Figura 13. Secuencias alineadas de las cuatro morfologías en donde se muestran los sitios variables encontrados.....	36
Figura 14. Árbol de distancias N-J (bootstrap 1000 repeticiones) de las cuatro morfologías encontradas en Punta Arena de la Ventana, B.C.S.....	38
Figura 15. Árbol de distancia N-J (bootstrap 1000 repeticiones) de varias especies del género <i>Aplysina</i> , incluyendo las morfologías tipo I, II, III y IV.....	39

RELACIÓN DE TABLAS

Tabla I. Revisión bibliográfica de metabolitos secundarios y actividades biológicas de distintas especies de <i>Aplysina</i>	6
Tabla II. Descripción de las diferentes morfologías de <i>Aplysina</i> spp. de la zona de Punta Arena de la Ventana, B.C.S.....	26
Tabla III. Relación del rendimiento de cada morfología respecto a su peso fresco y la cantidad de extracto obtenido.....	27
Tabla IV. Porcentaje de viabilidad de las líneas celulares frente a los extractos de las cuatro morfologías.....	34
Tabla V. Relación de las especies más similares encontradas en la NCBI para las secuencias de las cuatro morfologías de <i>Aplysina</i>	37

GLOSARIO

Absorbancia: cantidad de luz que absorbe una muestra a una longitud de onda dada; es directamente proporcional a la concentración de moléculas en la muestra.

Actividad biológica: o bioactividad, es el efecto benéfico o adverso de una sustancia sobre un organismo vivo.

Alcaloide: compuesto heterocíclico nitrogenado, procedente del metabolismo de aminoácidos. Con notables propiedades fisiológicas y toxicológicas, que se ejercen fundamentalmente sobre el sistema nervioso central.

Alineamiento de secuencias: es un procedimiento bioinformático que sirve para representar y comparar dos o más secuencias o cadenas de ADN, ARN, o proteínas, para resaltar sus zonas de similitud, que podrían indicar relaciones funcionales o evolutivas entre los genes o proteínas consultados.

Antibacteriano: fármaco o sustancia capaz de inhibir el crecimiento y desarrollo de bacterias o su eliminación sin dañar el organismo infectado.

Antifúngico: o antimicótico, es aquella sustancia que tiene la capacidad de evitar el crecimiento de algunos tipos de hongos o incluso de provocar su muerte.

Cefalosporina: antibióticos usados en el tratamiento de la septicemia, neumonía, meningitis, infecciones de la vía biliar, peritonitis e infecciones urinarias.

Cepa: en microbiología, conjunto de virus, bacterias u hongos que tienen el mismo patrimonio genético.

Citotóxico: Agente o sustancia que daña o mata las células o los tejidos.

Conulosa: superficie con proyecciones cónicas redondeadas o espinosas.

Electroforesis: técnica para la separación de moléculas según su movilidad en un campo eléctrico. Dependiendo de la técnica, la separación obedece en distinta medida a la carga eléctrica de las moléculas y a su masa.

Enzima: catalizador biológico, normalmente una proteína, que mediatiza y promueve un proceso químico sin ser ella misma alterada o destruida.

Esteroles: esteroides de 27 a 29 átomos de carbono. Su estructura química deriva del esterano; se añade una cadena lateral de más de 8 átomos de carbono en el carbono 17 y un grupo hidroxilo (-OH) en el carbono 3.

Fármaco: droga, medicamento.

Fenotipo: características detectables de un organismo (estructural, bioquímico, fisiológico o conductual) determinado por una interacción entre su genotipo y su medio.

Ficiforme: ficoide, en forma de higo.

Gen: unidad de herencia transmitida de generación en generación. Secuencia ordenada de nucleótidos en la molécula de ADN que codifican para diferentes proteínas.

Genotipo: totalidad de la información genética que posee un organismo en particular, en forma de ADN.

Hemoglutinante: referente a la aglutinación de corpúsculos sanguíneos, especialmente de los eritrocitos, por aglutininas específicas.

Homocedasticidad: se presenta cuando la varianza de los errores estocásticos en el análisis de la regresión es la misma para cada observación i .

Intraespecífica: relaciones que ocurren entre organismos de la misma especie.

Interespecífica: relaciones que ocurren entre organismos de diferentes especies.

Leuconoide: forma de organización más compleja de las esponjas, con una gran cantidad de cámaras vibrátiles.

Metabolito secundario: compuestos orgánicos sintetizados por el organismo que no tienen un rol directo en el crecimiento o reproducción del mismo, pero que pueden brindar una ventaja competitiva.

Morfología: parte de la biología que estudia la forma de los seres orgánicos y de las modificaciones o transformaciones que experimenta.

Neighbor-Joining: (N-J) es un modelo de agrupamiento para la creación de árboles fenéticos (fenogramas), basados en la similitud o distancia genética entre las especies o secuencias, usualmente se emplean secuencias de ADN o de proteínas.

Plasticidad morfológica: es la habilidad de los organismos para que un genotipo pueda cambiar y producir diferentes fenotipos debido a la exposición a factores bióticos y abióticos.

Primer: iniciador o cebador; secuencias sintéticas de oligonucleótidos usadas para reconocer por apareamiento complementario secuencias blanco de ADN.

Producto natural: compuestos finales del metabolismo secundario de los organismos; algunas veces son particulares para ciertas clases de organismos y pueden tener efectos farmacológicos.

Secuenciación: conjunto de métodos y técnicas bioquímicas para determinar el orden de los nucleótidos (A, C, G y T) en un oligonucleótido de ADN.

Tirosina: uno de los 20 aminoácidos que forman las proteínas, no es esencial en mamíferos y se sintetiza a partir de la hidroxilación de la fenilalanina.

Triptófano: aminoácido esencial en la nutrición humana. Es un aminoácido hidrófobo y es esencial para promover la liberación de serotonina.

Trombina: es una enzima, no es parte de la sangre, se forma por el proceso de coagulación sanguínea; degrada el fibrinógeno a monómeros de fibrina.

Variación intraespecífica: variación fenotípica relacionada con el sexo, la edad, las estaciones, los gradientes ambientales, la ubicación geográfica, de una especie.

ABREVIATURAS

- ADN:** ácido desoxirribonucleico.
- CCF:** cromatografía en capa fina.
- CO1:** citocromo c oxidasa subunidad I.
- CO₂:** bióxido de carbono.
- DMSO:** dimetilsulfóxido.
- dNTP's:** desoxirribonucleótido trifosfato.
- HepG₂:** línea de células cancerígenas del hígado.
- LB:** colorante azul de bromofenol y sacarosa o glicerol.
- MCF7:** línea de células de cáncer de mama.
- MgSO₄:** sulfato de magnesio.
- NIH3T3:** línea de células no transformadas (fibroblastos murino).
- nm:** nanómetros.
- pb:** pares de bases.
- PBS:** buffer de fosfato salino.
- PC3:** línea de células cancerígenas de la próstata.
- PCR:** reacción en cadena de la polimerasa.
- SBD:** base de datos del código de barras para esponjas (sponge barcoding database).
- SBF:** suero bovino fetal.
- V:** volts.

RESÚMEN

Las esponjas del género *Aplysina* (Verongida; Demospongia) son un recurso de gran interés bioquímico ya que segregan metabolitos secundarios derivados de la dibromotirosina con actividades antimicóticas, antibacterianas, antitumorales y antivirales. Estudios realizados con la esponja *Aplysina gerardogreeni*, han mostrado que presenta actividad antibacteriana y citotóxica con variaciones en las diferentes épocas del año; por otro lado, el género presenta una alta variabilidad morfológica. En este estudio, los organismos recolectados se separaron de acuerdo a sus diferentes formas, colores y texturas, resultando un total de cuatro morfologías identificadas *a priori* como *A. gerardogreeni*. Se ha observado que los cambios en la morfología de una misma especie, pueden determinar la presencia de un determinado compuesto de interés farmacológico o industrial, por lo que resulta interesante evaluar si las variaciones en la morfología pueden propiciar diferencias significativas en la bioactividad como una respuesta a la variación intra-específica. Se obtuvieron los extractos orgánicos de las muestras con una mezcla de metanol-acetona 1:1 y se realizaron ensayos de actividad antibacteriana frente a las cepas patógenas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, mediante el método de difusión en agar, empleando seis concentraciones (200, 150, 100, 50, 25 y 12.5 $\mu\text{g disco}^{-1}$) para cada una de las morfologías. En ambos casos, se observaron diferencias significativas en la bioactividad entre las morfologías, siendo la morfología III la que presentó la mayor actividad con halos promedio de 26.63 mm frente a la cepa *S. aureus* y 14.13 mm frente a *E. coli* a una concentración de 200 $\mu\text{g disco}^{-1}$. En los ensayos de actividad citotóxica, se observó que inhiben el crecimiento celular por arriba del 90%, frente a todas las líneas de células cancerígenas, así como en la línea de células no transformadas, lo que indica su alta toxicidad. Para observar si las morfologías de *Aplysina* recolectadas, presentan diferencias o semejanzas a nivel molecular se realizó la extracción de ADN del gen mitocondrial CO1. El alineamiento y la creación de los árboles de distancia N-J mostraron la formación de dos clados distintos lo que sugiere que las morfologías encontradas posiblemente corresponden a dos especies. De esta forma, las variaciones en la bioactividad pueden no ser resultado de una variación intra-específica sino más bien, a una variación inter-específica.

Palabras clave: esponjas, *Aplysina*, morfología, actividad antibacteriana, actividad citotóxica, variabilidad genética.

INTRODUCCIÓN

El océano es considerado como una fuente potencial de novedosos fármacos, ya que es un recurso único que provee una gran variedad de productos naturales obtenidos principalmente de invertebrados como esponjas, medusas, anémonas, corales, briozoarios, moluscos, equinodermos, tunicados y crustáceos, al igual que bacterias y cianobacterias (Donia y Hamann, 2003; Bhakuni y Rawat, 2005). De los cuales, las esponjas son una de las fuentes más interesantes debido a la gran cantidad de metabolitos que se han aislado a partir de ellas, aproximadamente 6,668 nuevos compuestos con novedosas estructuras químicas e interesantes actividades biológicas (Munro y Blunt, 2009).

Las esponjas del orden Verongida (Porífera; Demospongia) son un recurso de gran interés bioquímico (León-Deniz, 2000). Desde el punto de vista químico se caracterizan por presentar una bioquímica única; sintetizan un alto porcentaje de esteroides y sobre todo diversos metabolitos bromados derivados de la tirosina (Rogers *et al.*, 2005). Dentro de este orden, el género *Aplysina*, ha sido muy estudiado químicamente, lo cual se justifica por los compuestos derivados de la dibromotirosina y los alcaloides derivados del triptófano que presentan diversas actividades antimicóticas, antibacterianas, antitumorales y antivirales (eg. Fattorusso *et al.*, 1972; Tymiak *et al.*, 1981; Acosta y Rodríguez, 1992; Gunasekera y Cross, 1992; De Oliveira *et al.*, 2006; Compagnone *et al.*, 1999).

Por otro lado, el género resulta interesante debido a que presenta una alta plasticidad, mostrando así un gran número de morfologías y coloraciones relacionadas con la diversidad del hábitat (Pinheiro y Hajdu, 2001).

Investigaciones realizadas con ejemplares de la esponja *Aplysina gerardogreeni* han dado lugar al aislamiento de diversos compuestos con actividad antimicobacteriana, bacteriana y citotóxica (León-Deniz, 2000; Encarnación *et al.*, 2000; Encarnación-Dimayuga *et al.*, 2003; Hernández-Guerrero, 2007). Además, se ha observado que la actividad biológica presenta variaciones a lo largo de las diferentes épocas del año (Betancourt-Lozano *et al.*, 1998; Montes-Plascencia *et al.*, 2010). Sin embargo, poco se conoce acerca de la existencia de una variabilidad en la bioactividad dependiendo de la morfología que presenten. En el arrecife rocoso de Punta Arena de la Ventana en Baja California Sur, *A. gerardogreeni* presenta diferentes morfologías y los estudios de actividad biológica que se han realizado no han tomado en consideración este factor, por lo que en este trabajo se pretende evaluar si existen variaciones en la bioactividad como una respuesta a la variación morfológica intra-específica. Lo cual, resulta importante para futuros trabajos, ya que cuando se realizan estudios científicos sobre los metabolitos secundarios con posibles aplicaciones biotecnológicas, es importante identificar con certeza los organismos que producen los compuestos con la actividad deseada para hacer más eficiente su rendimiento y poder evaluar exitosamente su potencial farmacológico.

ANTECEDENTES

Durante las últimas cinco décadas, los productos naturales marinos han atraído la atención de biólogos y químicos. A la fecha, aproximadamente 16,000 productos naturales han sido aislados de organismos marinos y se han reportado cerca de 15,800 publicaciones que cubren revisiones, aislamiento, síntesis, determinación de actividad biológica y estudios ecológicos, entre otros (Bhakuni y Rawat, 2005).

La importancia de estos metabolitos secundarios que se han aislado, se debe a que en algunos casos, poseen estructuras químicas inusuales; o a que exhiben actividades biológicas con potencial biomédico para combatir enfermedades parasitarias, fúngicas, bacterianas, cancerígenas y virales (Proksch *et al.*, 2002; Donia y Hamann, 2003; Bhakuni y Rawat, 2005; Blunt *et al.*, 2009). En el medio marino, la mayoría de estos compuestos funcionan como armas químicas y potentes inhibidores de los procesos fisiológicos de sus presas, depredadores y competidores (Haefner, 2003).

En años recientes, la bioprospección de los productos naturales marinos ha arrojado un número considerable de nuevos candidatos para fármacos. La mayoría de estas sustancias aún continúan en fase preclínica, aunque algunas han avanzado exitosamente a las últimas etapas de los ensayos clínicos como la dolastatina 10, ecteinascidina-743, kahalalidina F y la aplidina; mientras que otras se encuentran en el mercado, como la citarabina (Ara-C) que se emplea en el tratamiento de algunas leucemias y linfomas no Hodgkinianos, el antiviral

vidarabina (Ara-A) (Bergmann y Burke, 1955; Bergmann y Feeney, 1950; 1951; Donia y Hamann, 2003; Haefner, 2003; Thakur y Thakur, 2006), las cefalosporinas (antibiótico), el analgésico ziconotide, el ácido okadaico y la ficoeritrina, entre otros (Thakur y Thakur, 2006).

Las esponjas con una edad de más de 600 millones de años de antigüedad, son los organismos sésiles pluricelulares más sencillos, no poseen órganos ni tejidos, sólo tienen células con funciones diferenciadas, pero sorprendentemente, son capaces de producir una mayor cantidad y diversidad de metabolitos secundarios en comparación con otros organismos marinos: doce veces más que cnidarios y algas, siete más que tunicados y cinco más que moluscos y equinodermos. Por ello, son uno de los grupos más estudiados, en lo que se refiere a compuestos con actividad biológica (Rodríguez, 2003; Brusca y Brusca 2005). En la actualidad existen 5,500 especies de esponjas, de las cuales 1,185 han sido estudiadas en busca de compuestos químicos, teniendo hasta el momento según la base de datos MarinLit, un registro de alrededor de 6,668 novedosos metabolitos, (Munro y Blunt, 2009; Valle *et al.*, 2009). Muchos de ellos poseen enormes posibilidades biotecnológicas (Thakur y Müller, 2004; Wijffels, 2007) y un alto potencial para la búsqueda de nuevas drogas con usos terapéuticos (Blunt *et al.*, 2008 en Regalado *et al.*, 2010; Wijffels, 2007; Valle *et al.*, 2009), particularmente contra el cáncer (Mayer *et al.*, 2009; 2007; Mayer, 2002 en Regalado *et al.*, 2010).

Los primeros estudios con estos organismos fueron realizados en los años 50's por Bergmann y colaboradores cuando aislaron tres novedosos nucleósidos: espongosina, espongotimidina y espongouridina a partir de la esponja del Caribe *Cryptotethia crypta* (Bergmann y Feeney, 1950; 1951; Bergmann y Burke, 1955). En la actualidad, estos metabolitos secundarios han dado lugar a los arabinonucleósidos Ara-A (vidarabina) y Ara-C (citarabina), fármacos auxiliares en el tratamiento de enfermedades virales y tumorales; cabe mencionar que son los únicos medicamentos obtenidos a partir de esponjas que son comercializados (Bergmann y Feeney, 1951; 1950; Bergmann y Burke, 1955; Rodríguez, 2003); aunque, existen cerca de 20 compuestos que se encuentran en fases clínicas o preclínicas con actividades biológicas prometedoras como antivirales, antitumorales, antibacterianas y antiinflamatorias (Kobayashi, 2000; Rodríguez, 2003; Koopmans *et al.*, 2009).

Las esponjas del orden Verongida, son una fuente importante de compuestos derivados de la dibromotirosina, además de producir un alto porcentaje de esteroides. A estos compuestos se les han atribuido actividades antibacterianas, citotóxicas y antivirales. (Ciminiello *et al.*, 1994; 1996; Teeyapant *et al.*, 1993). A partir del género *Aplysina*, se han aislado una gran cantidad de compuestos derivados de la dibromotirosina, así como alcaloides derivados del triptófano que presentan diversas actividades biológicas. En la tabla I se muestra una revisión de estos compuestos, haciendo énfasis en los metabolitos obtenidos de *Aplysina gerardogreeni*.

Tabla I. Revisión bibliográfica de metabolitos secundarios y actividades biológicas de distintas especies de *Aplysina*.

Fuente	Compuesto	Actividad	Cita
<i>A. aerophoba</i> (-----) (Islas Canarias) (-----) (Mediterráneo)	aeroplisinina-1 dibromoverongia-quinol aeroplisinina-1 y dienona Isofistularina-3 Aplisinamisina-I Aerofobina-2, Aerotionina	Inhibición del crecimiento celular (actividad citostática). Antibacteriana frente a <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> y <i>Bacillus subtilis</i> . Citotóxica frente a cáncer cervicouterino. Antibiótica frente a <i>Alteromonas</i> , <i>Moraxella</i> y <i>Vibrio</i> sp. Algicida frente a <i>Coscinodiscus wailesii</i> y <i>Prorocentrum minimum</i> . Como agente disuasorio de depredación de <i>Blennius sphinx</i> .	Kreutera <i>et al.</i> , 1992. Teeyapant <i>et al.</i> , 1993 Weiss <i>et al.</i> , 1996. Thoms <i>et al.</i> , 2004.
<i>A. archeri</i> (-----) (Bahamas) (Venezuela)	Fistularina 3 11-ketofistularina 3 Compuesto 1 Proteína aglutinante (aglutinina) de tipo lectina.	Inhíbe el crecimiento del virus de la leucemia felina. Antifúngica Hemaglutinante	Gunasekera y Cross, 1992. Ciminiello <i>et al.</i> , 1996. Bonay y Fresno, 2000.
<i>A. caissara</i> (Brasil)	-----	Antituberculosis (<i>Mycobacterium tuberculosis</i>) Citotóxica (Hepatomas).	Azevedo <i>et al.</i> , 2008.
<i>A. cauliformis</i> (Puerto Rico) Caribe (Venezuela)	aplisinamisinas I, II y III aplisinamisina II aplisinamisina III Proteína aglutinante (aglutinina) del tipo lectina.	Baja actividad antibacteriana frente a <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Citotóxica frente a cáncer de colon. Citotóxica frente a cáncer de mama, colon y leucemia. Hemaglutinante	Rodríguez y Piña, 1993. Bonay y Fresno, 2000.
<i>A. cavernicola</i> (Mediterráneo)	aplisinamisina-I aerofobina-2 aerotionina 3,4-dihidroxiquinolina -2-ácido carboxílico 7-bromocavernicolenona	Como agente disuasorio en la alimentación de <i>Blennius sphinx</i> . Moderadamente antibacteriana	Thoms <i>et al.</i> , 2004 D'Ambrosio <i>et al.</i> , 1985.
<i>A. chiriquensis</i> (Pacífico suroeste de Panamá)	aeroplisinina-1	Antiplasmódica (<i>Plasmodium falciparum</i>) y Antitripanosómica (<i>Trypanosoma cruzi</i>).	Gutiérrez <i>et al.</i> , 2005.

<i>A. fistularis</i> (Venezuela)	esteroles y alcaloides 3,5-dibromo-1-hidroxi -4,4-dimetoxi-2,5-ciclohexadieno-1-acetamida	Antibacteriana frente a <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Salmonella tiphymurium</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>E. coli</i> , <i>P.aeruginosa</i> y <i>S. aureus</i> . Actividad antibacteriana frente a <i>E. coli</i> .	Morales <i>et al.</i> , 2000; Lanza <i>et al.</i> , 2006 Lanza <i>et al.</i> , 2006
<i>A. fistularis fulva</i> (California, USA) (-----)	Aerotionina Homoaerotionina Aplisilina A	Antiadherente e inhibe la metamorfosis de la larva velígera de gasterópodos. Antagonista del receptor de trombina.	Walker <i>et al.</i> , 1985. Gulavita <i>et al.</i> , 1995
<i>A. fistularis insularis</i> (Venezuela)	11-deoxifistularina	Citotóxica frente a cáncer de mama.	Compagnone <i>et al.</i> , 1999.
<i>A. gerardogreeni</i> (Baja california sur, México) Mazatlán (Pacífico suroeste de Panamá)	Calafianina 2-hidroxi-3,5-dibromo-4-metoxifenilacético Aerotionina Aplisinonas A-D aeroplisinina-1	Baja actividad antibacteriana frente a <i>B. subtilis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. aureus</i> resistente a metilina, <i>Micrococcus luteus</i> , <i>E. coli</i> , <i>Xanthomonas campestris</i> y <i>Acholeplasma laidlawii</i> . Inhibió el desarrollo de <i>B. subtilis</i> , <i>S. faecalis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Vibrio herveyii</i> y <i>E. coli</i> "in vitro". Actividad frente <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>M. kansasii</i> , <i>M. scrofulaceum</i> y <i>M. avium</i> . Citotóxica frente a células tumorales de carcinoma de mama, de pulmón y colon. Antiplasmódica (<i>P. falciparum</i>) y Antitripanosómica (<i>T. cruzi</i>)	Encarnación-Dimayuga <i>et al.</i> , 2006; Ogamino <i>et al.</i> , 2006. León-Deniz, 2000; 2003. Encarnación-Dimayuga <i>et al.</i> , 2003. Hernández-Guerrero <i>et al.</i> , 2007 Gutiérrez <i>et al.</i> , 2005.
<i>Aplysina lacunosa</i> (Puerto Rico) Caribe (Venezuela)	11-oxoaerotionina Proteína aglutinante (aglutinina) del tipo lectina. Extracto acuoso (saponinas, taninos, alcaloides)	Citotóxica frente a cáncer de colon. Antibacteriana frente a <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , y <i>P.aeruginosa</i> . Hemaglutinante Antibacteriana frente a <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>B. cereus</i> , <i>E. coli</i> y <i>Salmonella enteritidis</i> .	Acosta y Rodríguez, 1992. Bonay y Fresno, 2000; Kazanjian y Fariñas, 2006. Kazanjian y Fariñas, 2006.
<i>A. thiona</i> (Oaxaca, México)	2,6-Dibromo-4-acetamida-4-hidroxiciclohexadieno, éster metil hidroxidienóico y aeroplisinina-1	Antibacteriana frente a <i>S. aureus</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Salmonella typhi</i> y <i>Shigella sonnei</i>	Cruz <i>et al.</i> , 1990.

Por otra parte, en el Golfo de California se han realizado diversos estudios para evaluar la actividad biológica de extractos orgánicos de *A. gerardogreeni*. Así del extracto crudo de hexano de esta especie obtenido del Islote la Ballena, en el complejo Insular Espíritu Santo La Partida, se evaluó la actividad biológica de diez fracciones obtenidas mediante cromatografía en columna (CC), utilizando el método de difusión en agar, encontrando una actividad antimicrobiana significativa frente a las cepas de *Staphilococcus aureus*, *Streptococcus faecalis* y *Bacillus subtilis* (Navarro, 2005).

En otro estudio realizado en la localidad de Punta Arena de la Ventana se evaluó la actividad antibacteriana del extracto metanólico y las fracciones semi-purificadas de He/AcOEt frente a las cepas *S. aureus* y *Escherichia coli*. Los resultados mostraron halos de inhibición de 17.5 mm frente a *S. aureus* y de 9.8 mm para *E. coli*, a una concentración de 0.125 mg en ambos casos (Valencia-Agami, 2010).

También se han realizado estudios para determinar si existen diferencias en la bioactividad en las diferentes épocas del año, a este respecto Betancourt-Lozano *et al.* (1998), a partir de los extractos de *A. fistularis*, determinaron la variación de la actividad antimicrobiana a lo largo de un año y lo correlacionaron con el nivel de inquilinismo. Dado que la actividad antibacteriana estuvo siempre presente, se creó que los metabolitos son producidos de manera continua, aunque probablemente, la esponja es capaz de cambiar el mecanismo de producción de

las sustancias en presencia de algún estímulo en particular; en este caso podría tratarse de la cantidad de organismos asociados a la esponja los que ocasionan el estímulo.

En *A. gerardogreeni* de la localidad de Punta Arena de la Ventana, también se ha identificado que existe una variación estacional de la bioactividad de los extractos y en el caso de la actividad antibacteriana, la mayor actividad se presentó en otoño, con halos de inhibición de 24.6 mm y 24.4 mm frente a las cepas *S. aureus* y *E. coli* respectivamente a una concentración de 80mg mL⁻¹ (Montes-Plascencia *et al.*, 2010).

Diversos estudios han mostrado que la variabilidad en la actividad biológica de los extractos o en la producción de metabolitos secundarios en esponjas también puede estar dado por diversos factores, entre los que se pueden mencionar los ambientales (luz, disponibilidad de nutrientes, profundidad, variación estacional), presiones bióticas (competencia por el espacio, asentamiento de organismos epibióticos o depredación) o por factores a nivel intra-específico como el biológico, morfológico y genético (Turon *et al.*, 1996; Betancourt-Lozano *et al.*, 1998; Page *et al.*, 2005; Ferretti *et al.*, 2009).

En esponjas existe una amplia plasticidad morfológica que puede estar dada por variaciones genéticas o por adecuaciones a las condiciones ambientales. Así, la esponja *Agelas oroides* de Australia, puede presentar diferentes morfologías como resultado de las variaciones en los factores abióticos, presentando diferencias en

la superficie de la epidermis y en el color dependiendo de la exposición a la luz (Bavestrello *et al.*, 2003).

Algunos estudios han mostrado que dependiendo de la morfología del organismo, se puede presentar un determinado compuesto y por lo tanto modificaciones en la actividad biológica. A partir de la esponja *Haliclona* sp. recolectada en Australia, se había aislado el compuesto salicylihalamida A, al realizar un estudio separando los organismos en dos morfologías que los autores denominaron verde y café, se observó que el compuesto solamente era producido por la morfología verde (Abdo, 2007).

Al separar diferentes especies de esponjas del litoral Mediterráneo de acuerdo a su morfología en formas incrustantes, erectas y globulares se observó que las formas incrustantes presentan la mayor actividad citotóxica, las formas erectas, actividad antifúngica y antibacterial, mientras que las formas globulares presentan actividad antiviral en mayor medida (Uriz *et al.*, 1992).

Se tienen evidencias de que las variaciones en el genotipo pueden dar lugar a diferencias en la actividad biológica, sin embargo, es poco lo que se conoce acerca del componente genético que ayude a entender esta variabilidad (Uriz *et al.*, 1995).

Un ejemplo de este tipo de estudios fue el realizado por Miller *et al.*, (2001), quienes examinaron la diversidad genética y química dentro de *Latrunculia* para determinar si la variación en la química de las esponjas está ligada a la

localización geográfica o a una variabilidad genética intra-específica, y/o si es específica de las especies. Para ello realizaron un análisis multivariado para determinar si la producción de las discorhabdinas variaba predeciblemente en función de la localización geográfica, color, morfología y genotipo del organismo recolectado, y así entender si la variación en la producción de dicho compuesto es un carácter genotípico o fenotípico. No lograron determinar un carácter morfológico ni morfométrico para distinguir entre todas las especies de *Latrunculia*, y aunque los compuestos químicos variaron predeciblemente entre las especies, tampoco se pueden utilizar para distinguir especies inequívocamente. Sin embargo, al realizar un análisis multivariado considerando todos los caracteres morfométricos simultáneamente, se pueden observar variaciones significativas en las variables medidas que concuerdan con las variaciones a nivel genético, concluyendo que la producción de las discorhabdinas está más relacionada con diferencias genéticas que con las variaciones ambientales por sí mismas.

Un rasgo característico de las esponjas del género *Aplysina*, es su alta variabilidad fenotípica, mostrando así un gran número de morfologías y coloraciones. Los pocos caracteres que pueden ser empleados para la taxonomía de *Aplysina* están relacionados con el color y la forma de los especímenes, así como con el arreglo de las fibras de espongina, ésta escasez de caracteres genera incertidumbre en su clasificación (Pinheiro y Hajdu, 2001; Schmitt *et al.*, 2005; Pinheiro *et al.*, 2007 en Lamarão *et al.*, 2009). Debido a esta problemática para la identificación adecuada de las especies, se ha dado importancia al análisis químico de sus

metabolitos secundarios, así como a la actividad biológica que presentan, con el fin de entender lo más completamente posible las variaciones en la bioactividad entre los individuos (Ciminiello *et al.*, 1994; 1996; Compagnone *et al.*, 1999; Miller *et al.*, 2001; Lopez-Legentil *et al.*, 2005). Por lo que en este trabajo se pretende evaluar si las diferentes morfologías de la esponja *A. gerardogreeni* del arrecife rocoso de Punta Arena de la Ventana, BCS., presentan variaciones significativas en su actividad biológica debido a una variación genética intra-específica.

JUSTIFICACIÓN

Dentro de las esponjas marinas se ha observado que una misma especie puede presentar diferencias en cuanto a forma, tamaño y coloración. Esta variabilidad a nivel individual y/o poblacional dificulta la identificación taxonómica, teniendo implicaciones en la comprensión ecológica y en la identificación de nuevas sustancias farmacológicamente activas.

Debido a que dentro de la misma especie, dependiendo de la morfología, se puede obtener o no un compuesto de interés, es importante evaluar si las variaciones en la morfología pueden afectar la actividad biológica de la esponja *A. gerardogreeni* y con ayuda de herramientas moleculares determinar si pertenecen a unidades genéticas semejantes o distintas y por ello se presenten variaciones en la actividad biológica.

IDENTIFICACIÓN Y DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA

Las esponjas del género *Aplysina* contienen una gran cantidad de compuestos derivados de la dibromotirosina que han presentado actividades antimicóticas, antibacterianas y antivirales, lo que ha propiciado el interés en la búsqueda de nuevos compuestos a partir de esponjas de este género. Diferentes estudios con la esponja *Aplysina gerardogreeni* del arrecife rocoso de Punta Arena de la Ventana, han mostrado que presenta una interesante actividad antibacteriana y citotóxica, además de que la actividad biológica presenta variaciones a lo largo de

las diferentes épocas del año, sin embargo, también se ha observado en el campo, que la esponja presenta diferentes morfologías, las cuales se han trabajado de manera indistinta en estos estudios químicos y no hay reportes de investigaciones en los que se tome en cuenta si la variación intra-específica puede determinar cambios en la bioactividad. Por ello, en este estudio se pretende separar las diferentes morfologías y evaluar si existen diferencias significativas en la actividad biológica como una respuesta a la variación morfológica que presentan.

HIPÓTESIS

Si las diferentes morfologías de la esponja *A. gerardogreeni* muestran diferencias significativas en su actividad biológica entonces presentaran variabilidad genética intra-específica.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la variación en la actividad antibacteriana y citotóxica de las diferentes morfologías de la esponja *Aplysina gerardogreeni* del arrecife rocoso de Punta Arena de la Ventana, B.C.S.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Separar y describir las características externas de las diferentes morfologías de *A. gerardogreeni*.
2. Evaluar la actividad antibacteriana de los extractos de cada morfología frente a las cepas patógenas de *S. aureus* y *E. coli*.
3. Evaluar la actividad citotóxica de los extractos de las diferentes morfologías frente a diferentes líneas de células tumorales.
4. Establecer las unidades genéticas de las diferentes morfologías con base en el gen mitocondrial CO1.

METODOLOGÍA

Material biológico y recolecta de los ejemplares.

Aplysina gerardogreeni es abundante en zonas rocosas, y se localiza a lo largo de la Costa del Pacífico Mexicano, hasta los 33 metros de profundidad. Es una esponja de tipo leuconoide que se caracteriza por tener una forma masiva y tubular; su coloración natural va desde amarillo ocre hasta púrpura-rojiza, y tornándose púrpura oscuro cuando se conserva en alcohol. Es de consistencia firme y, cuando se seca se endurece. Puede medir de 3 cm a 1 m de ancho y de 1 a 5 cm de alto (comp. pers., Carlos A. Sánchez). Está provista de tubos pequeños en la cima, la superficie es finamente conulosa, siendo estas estructuras menores a 1mm de alto. La dermis mide 60-278 μ m de grosor, y los poros no son aparentes. Presenta una fibroreticulación poligonal irregular. Las fibras de espongina son de color ámbar, estratificadas, sin distinción entre primarias y secundarias (Gómez y Bakus, 1992).

Clasificación taxonómica

Phylum: Porifera

Clase: Demospongiae

Subclase: Ceractinomorpha

Orden: Verongida (Barquist, 1978)

Familia: Aplysinidae (Carter, 1875)

Género: *Aplysina* (Nardo, 1813)

Aplysina gerardogreeni (Gómez y Bakus, 1992)

La recolecta de los ejemplares se realizó en el arrecife rocoso de Punta Arena de la Ventana, entre los 23°59' de latitud norte y 109°49' de longitud oeste (Figura 1). Los organismos fueron recolectados entre los 2 y 6 m de profundidad por medio de buceo SCUBA. Posteriormente se colocaron en bolsas de plástico y fueron transportados en hielo al laboratorio de Microbiología y Biología Molecular del CICIMAR, donde las esponjas fueron limpiadas de materiales extraños y separadas en cuatro morfologías de acuerdo a sus diferentes formas, colores y texturas. Se utilizó la Guía para la descripción morfológica de las especies para la base de datos del código de barras de las esponjas (SBD), la cual se basa en la guía de Hooper (2000), como apoyo para la utilización adecuada de los términos empleados en la descripción externa de las morfologías. Adicionalmente, se obtuvo la proporción de incidencia de cada morfología respecto al peso húmedo total que fue de 572.252 g. El total de ejemplares de cada morfología, se dividió en dos porciones, una para la obtención del extracto orgánico y la otra para la extracción de ADN. Los ejemplares fueron colocados en bolsas de plástico, etiquetados y se mantuvieron a -20°C hasta su estudio. Un ejemplar de las morfologías fue identificado por personal del Laboratorio de Ecología del Bentos del ICMYL de la UNAM.

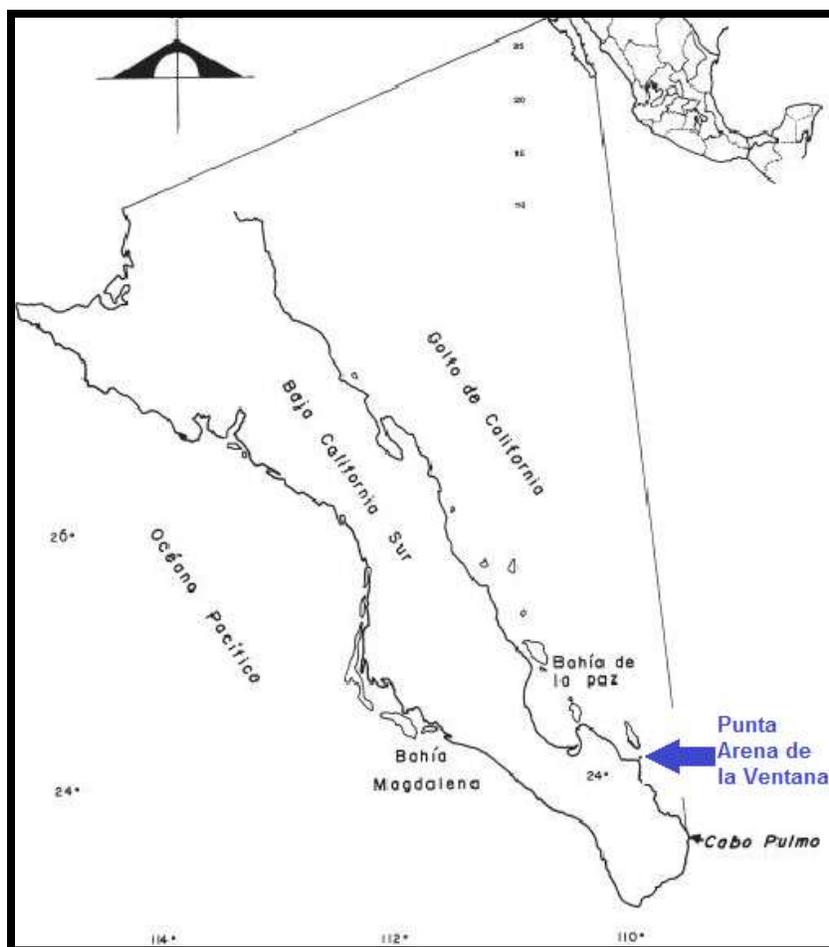


Figura 1. Ubicación del arrecife rocoso Punta Arena de la Ventana, Baja California Sur. Tomado de Mateo-Cid *et al.*, 2000.

Obtención de extractos orgánicos.

La obtención de los diferentes extractos se realizó con una mezcla de metanol-acetona 1:1. Los ejemplares fueron cortados en trozos pequeños con ayuda de un bisturí y macerados en un mortero. Las disoluciones obtenidas se filtraron y colocaron en matraces balón para ser concentradas a presión reducida en un rotavapor. Posteriormente, al residuo obtenido se le agregó metanol, la parte

soluble en este fue nuevamente concentrada a presión reducida, obteniendo el extracto orgánico. El peso fresco de las esponjas y el peso del extracto obtenido fue registrado en todos los casos para calcular posteriormente el rendimiento de extracción bajo la siguiente fórmula:

$$R = PE * 100 / PF$$

Dónde:

R= rendimiento, PF= peso fresco y PE= peso del extracto.

Para comparar el perfil cromatográfico de los diferentes extractos se realizó un análisis en cromatografía en capa fina (CCF), utilizando placas de sílica gel F₂₅₄ (Whatman®), de 0.25 mm de espesor, con indicador fluorescente y una mezcla de cloroformo-metanol 9:1 como eluyente. Las placas se revelaron con ácido sulfúrico al 10% y posterior calentamiento.

Evaluación de la actividad antibacteriana.

La evaluación de la actividad antibacteriana se llevó a cabo frente a las cepas patógenas y resistentes *Staphylococcus aureus* (ATCC BAA-42) y *Escherichia coli* (ATCC BAA-196), utilizando el método de difusión en agar. Las cepas patógenas se mantuvieron en medio inclinado Agar Trypticase Soya (TSA) y en refrigeración (4 °C) con resiembras cada tres meses. Antes de iniciar el bioensayo cada cepa se sembró en agar TSA y se incubaron por 24 h a 35 °C. Posteriormente se preparó una suspensión celular con cada una de las cepas de

y se ajustó a una densidad óptica (DO) de 1, lo cual equivale aproximadamente a 1×10^8 cel mL⁻¹. Con esta suspensión se sembraron masivamente placas con agar Müeller-Hinton para realizar el ensayo de actividad.

La preparación de los sensi-discos se realizó de la siguiente forma: se colocaron aproximadamente 4 mg del extracto de las esponjas en viales previamente pesados para preparar las diluciones correspondientes para obtener concentraciones de 200, 150, 100, 50, 25 y 12.5 µg disco⁻¹, de modo que se tuvieron seis diferentes concentraciones para cada una de las morfologías. En ambiente estéril, se tomaron alícuotas de 25 µl de las diluciones y se impregnaron los sensi-discos de 6 mm de diámetro, se dejaron secar un poco y se colocaron en cajas de Petri estériles. También, se prepararon un control negativo (sensi-disco sin extracto solo con el disolvente empleado) y un positivo (sensi-disco con tetraciclina de 30 µg).

Los bioensayos se realizaron en condiciones de esterilidad y con cuatro réplicas para cada una. Las cajas de Petri fueron colocadas a 4°C para retardar el crecimiento bacteriano mientras se difundían los compuestos activos en el agar. Finalmente, se incubaron las cajas de Petri a una temperatura de 35°C durante 24 horas y al término del periodo de incubación se efectuó la medición de los halos de inhibición (mm) para evaluar la actividad antibacteriana.

Análisis estadístico.

Con los datos obtenidos se realizó una prueba de normalidad y homocedasticidad de acuerdo a la prueba de Kolmogorov y Smirnov. Para comparar las diferencias en la actividad entre las diferentes morfologías se efectuó un análisis de varianza (Sokal y Rohlf, 1981). Los factores utilizados fueron la morfología (fijo) y el diámetro del halo de inhibición (valor).

Evaluación de la actividad citotóxica.

Los ensayos de actividad citotóxica fueron realizados en la unidad de Biotecnología del Instituto Tecnológico de Estudios Superiores (ITESM- Campus Monterrey).

La citotoxicidad de los extractos de las cuatro formas fue evaluada frente a distintas líneas de células cancerígenas como: cáncer de próstata (PC3), cáncer de hígado (HepG2) y cáncer de mama (MCF7), así como frente a una línea de células no transformadas de fibroblasto murino (NIH3T3) obtenida a partir de embriones de ratón de la cepa NIH, para evaluar el grado de selectividad frente a células tumorales.

Se prepararon células en suspensión de acuerdo a un procedimiento estándar y fueron sembradas en placas de 96 pozos utilizando un medio con 10% de Suero Bovino Fetal (SBF), a una concentración de 5×10^4 células mL⁻¹. Se incubaron por 24 horas en una cámara humidificada a 37 °C y con 5% de CO₂.

Para realizar el ensayo, los extractos se disolvieron en DMSO, se preparó una dilución 1:100 con el medio de cultivo para que la concentración final del disolvente en contacto con las células no fuera mayor a 0.5% (v/v). Para los ensayos de viabilidad celular se colocaron 100 μL del extracto a una concentración de 1 mg mL^{-1} en cada pozo. Se agregaron 100 μL del extracto a concentraciones de 0.02, 0.015, 0.01, 0.005 y 0.0025 mg mL^{-1} en los diferentes pozos. Como control positivo se utilizó medio de cultivo con células pero sin extracto y como control negativo, medio de cultivo sin células y sin extracto. Las placas se incubaron por 48 horas a 37 °C en condiciones de humedad controlada con 5% de CO_2 . Después de las 48 horas se agregó a cada uno de los pozos 20 μL de la solución de cell Titer y se leyó la absorbancia a 490 nm, utilizando el lector de microplacas con un protocolo creado para el equipo. A los datos obtenidos se les restó el efecto de los controles de color para la viabilidad celular.

Extracción del ADN.

Para la extracción del ADN se realizó el siguiente protocolo: Se cortaron pequeños trozos de la esponja, colocando aproximadamente, 0.1 g del tejido en tubos eppendorf de 2 ml, con ayuda de un pistilo de vidrio se maceró el tejido y se agregaron 200 μl de buffer isotónico (PBS) con beta-mercaptoetanol al 5% (v/v) para un mejor rendimiento de extracción. La extracción se llevó a cabo con el kit

ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™ (Zymo Research) y se siguió el protocolo establecido por el fabricante.

Para cuantificar la concentración del ADN obtenido, se hizo una dilución 1:100 de las muestras y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a 260nm, dónde una unidad de absorbancia a 260 nm es igual a 50 µg/ml ($1 A_{260} = 50 \mu\text{g/ml}$).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y electroforesis.

Para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se emplearon los “primers universales” descritos por Folmer *et al.*, (1994) para la amplificación de un fragmento de 710 pb del gen mitocondrial citocromo c oxidasa subunidad I (CO1). Se prepararon reacciones para PCR de 50 µl, cada una contenía ADN de la morfología correspondiente, 0.3 µM del primer LCO1490 F, 0.5 µM del primer HC02198 R, 200 µM de dNTPs, buffer 1x PCR, 33.3 µM de MgSO₄, 1 U de la enzima Taq y se aforó con agua para PCR para obtener los 50 µl. Las muestras fueron amplificadas en un termociclador marca BioRad MJ Mini, con las siguientes condiciones: un ciclo de 95°C durante 5 minutos, 35 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 44°C por 90 segundos, 72°C por 90 segundos y un ciclo de 72°C por 10 minutos. Los productos de PCR fueron visualizados en un gel de agarosa al 1% y se realizó una electroforesis a 70 V por 30 minutos aproximadamente (Figura 12).

Secuenciación y determinación de las unidades genéticas.

Los productos de PCR se mandaron purificar y secuenciar a la empresa Macrogen, Inc. (Corea). La secuenciación de las muestras se llevó a cabo utilizando un secuenciador automático 3730XL. Los análisis de alineamiento entre las secuencias obtenidas y aquellas reportadas en el National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) se efectuaron en Blast, adicionalmente se realizaron alineamientos entre todas las secuencias obtenidas utilizando el programa CLUSTAL W. Del alineamiento obtenido se obtuvo el árbol de distancia génica por el método del vecino más cercano (N-J) con Bootstrap de 1000 repeticiones utilizando el programa MEGA4.1 (Tamura *et al.*, 2007). Se generaron dos árboles de distancias N-J, el primero se realizó utilizando las secuencias de las cuatro morfologías y el otro se realizó utilizando todas las secuencias del género de *Aplysina* reportadas en la base de datos de la NCBI; como grupo externo se utilizaron las secuencias de las esponjas *Aiolochoira crassa* (código de acceso A5843885.1), *Verongula gigantea* (código de acceso AM076984.1) y *Hexadella dedritifera* (código de acceso FN667711.1).

RESULTADOS

Tipos de morfologías.

A partir de las características externas, como son la coloración, forma de crecimiento, estructuras superficiales y la textura de los ejemplares del arrecife rocoso de Punta Arena de la Ventana, B.C.S., se identificaron cuatro morfologías (Tipo I, II, III y IV), las cuales se describen en la Tabla II.

Una vez separadas las morfologías, se obtuvo la proporción de cada una de ellas con respecto al peso húmedo. Las morfologías II y III fueron las que se encontraron mejor representadas, mientras que la morfología I presentó el menor porcentaje (Figura 2).

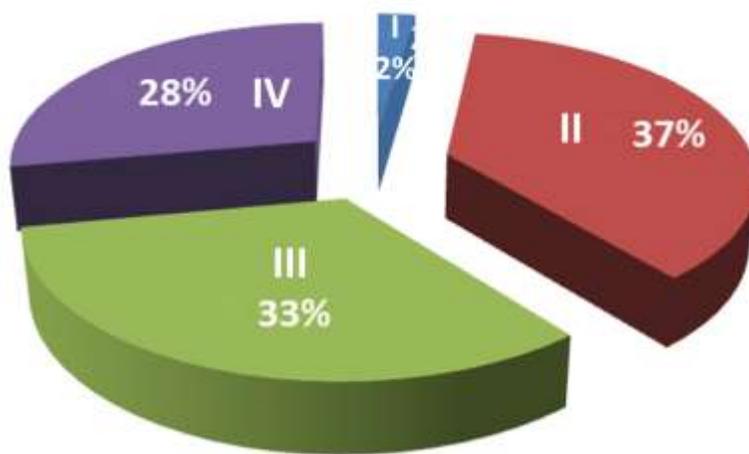


Figura 2. Proporción de cada morfología con base en su peso húmedo.

Tabla II. Descripción de las diferentes morfologías de *Aplysina* spp. de la zona de Punta Arena de la Ventana, B.C.S.

	Morfología	Forma de crecimiento	Estructura superficial y textura	Coloración
	Tipo I	Masiva	Sin estructuras superficiales y de textura lisa	Amarrilla en la parte basal; con café oscuro y zonas marrón-morado oscuro en la parte superior de la esponja.
	Tipo II	Ficiforme	Estructura superficial conulosa y de textura lisa	Amarrilla en la parte basal, la parte superior morada muy oscura.
	Tipo III	Masiva lobulada	Estructura superficial verrugosa y de textura lisa	Toda la esponja de color morado con zonas negras en la parte superior.
	Tipo IV	Ovalada	Sin estructuras superficiales y de textura lisa	La base de color amarillo, y la parte superior muy oscura con partes rojizas.

Obtención de extractos orgánicos.

A partir de 13.2 gramos (peso fresco) de cada morfología se realizó una extracción con acetona-metanol 1:1 y posteriormente MeOH, dando lugar a cuatro extractos de coloración café oscuro y consistencia oleosa. Cada morfología presentó diferentes rendimientos, siendo la morfología I la que presentó el mayor rendimiento de extracción (Tabla III).

Tabla III. Relación del rendimiento de cada morfología respecto a su peso fresco y la cantidad de extracto obtenido.

Morfología	Peso extracto (g)	Rendimiento (%)
I	1.21	9.16
II	0.48	3.63
III	0.38	2.88
IV	0.57	4.32

En la figura 3 se muestra un análisis mediante cromatografía en capa fina de los extractos de las diferentes morfologías de *A. gerardogreeni*. En ella se puede observar la presencia de distintos compuestos fluorescentes a la luz UV y que revelaron de color café con ácido sulfúrico al 10%. De manera cualitativa se puede apreciar que existen diferencias en los compuestos presentes en cada extracto.

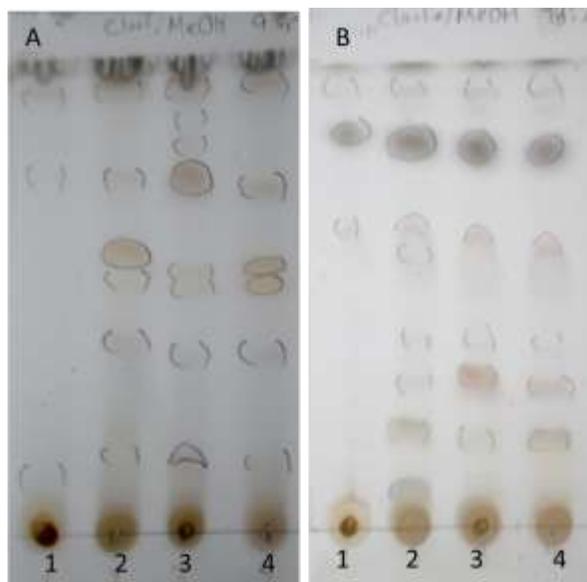


Figura 3. Perfil cromatográfico de las diferentes morfologías.

A: CCF (Clorformo/MeOH, 9:1); **B:** CCF (Clorformo/MeOH, 98:2); 1: morfología tipo I, 2: tipo II, 3: tipo III y 4: tipo IV.

Evaluación y análisis estadístico de la actividad antibacteriana de los extractos de las diferentes morfologías.

En los ensayos de actividad antibacteriana frente a la cepa *Staphylococcus aureus* se observaron halos bien definidos (Figura 4) en las distintas concentraciones probadas (200, 150, 100, 50, 25 y 12.5 µg disco⁻¹); se observaron variaciones en la actividad entre las diferentes morfologías. En las figuras 5 y 6 se puede observar que ninguna de las cuatro formas presentó actividad a la menor concentración (12.5 µg disco⁻¹); la mayor actividad fue presentada por la morfología III a la mayor concentración (200 µg disco⁻¹) con un halo promedio de 26.63 mm. Mientras que el control positivo (sensi-disco con tetraciclina de 30 µg) dio halos promedio de 35.06 mm.

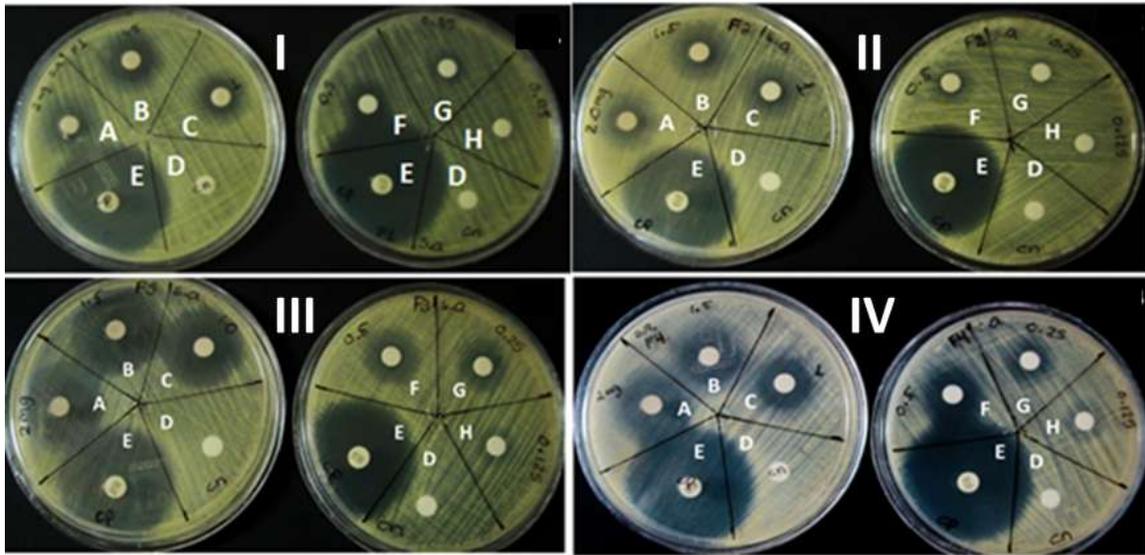


Figura 4. Halos de inhibición de las cuatro morfologías frente a *S. aureus*. A: concentración de $200 \mu\text{g disco}^{-1}$, B: $150 \mu\text{g disco}^{-1}$, C: $100 \mu\text{g disco}^{-1}$, F: $50 \mu\text{g disco}^{-1}$, G: $25 \mu\text{g disco}^{-1}$, H: $12.5 \mu\text{g disco}^{-1}$, D: control negativo, E: control positivo.

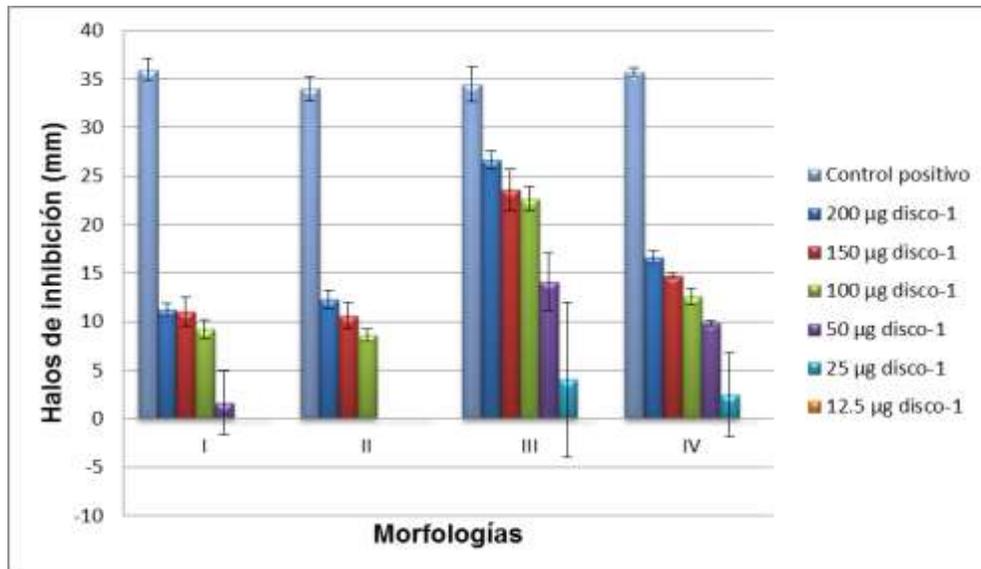


Figura 5. Diferencias en los halos de inhibición (mm) obtenidos para *S. aureus*, entre las concentraciones probadas en las distintas morfologías. Las barras indican el error estándar.

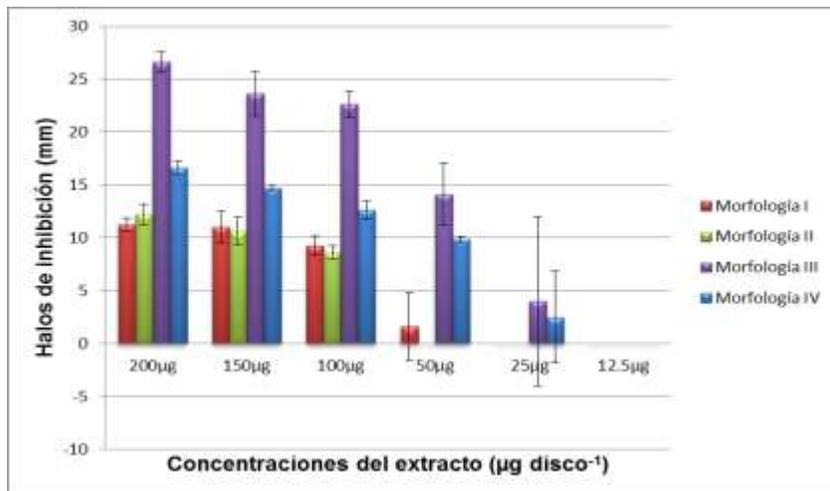


Figura 6. Diferencias en los halos de inhibición (mm) entre las distintas morfologías a diferentes concentraciones frente a la cepa *S.aureus*. Las barras indican el error estándar.

Los resultados del análisis de varianza muestran que existe una diferencia significativa de la actividad antibacteriana dependiendo de la morfología ($F_{0.95; 3,92g.l.} = 9.37, P \leq 0.05$) (Figura 7).

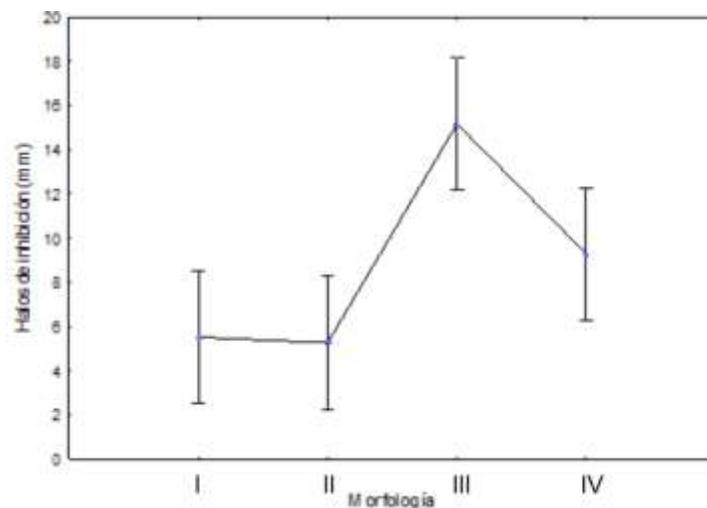


Figura 7. Valores de actividad antibacteriana frente a *S. aureus* en las diferentes morfologías. Las barras representan el error estándar.

En los ensayos de actividad antibacteriana frente a la cepa *Escherichia coli* se observó muy poca actividad a diferencia del control positivo donde se formaron halos bien definidos (Figura 8). Se observa que la morfología I no presentó actividad con ninguna de las concentraciones probadas (200, 150, 100, 50, 25 y 12.5 $\mu\text{g disco}^{-1}$), de igual forma ninguna de las morfologías presentó actividad a las concentraciones de 25 y 12.5 $\mu\text{g disco}^{-1}$; la mayor actividad fue presentada por la morfología III a la mayor concentración (200 $\mu\text{g disco}^{-1}$) con un halo promedio de 14.13 mm (Figuras 9 y 10). Cabe mencionar que solo la morfología IV mostró actividad a una concentración de 50 $\mu\text{g disco}^{-1}$ con un halo de 5.5 mm.

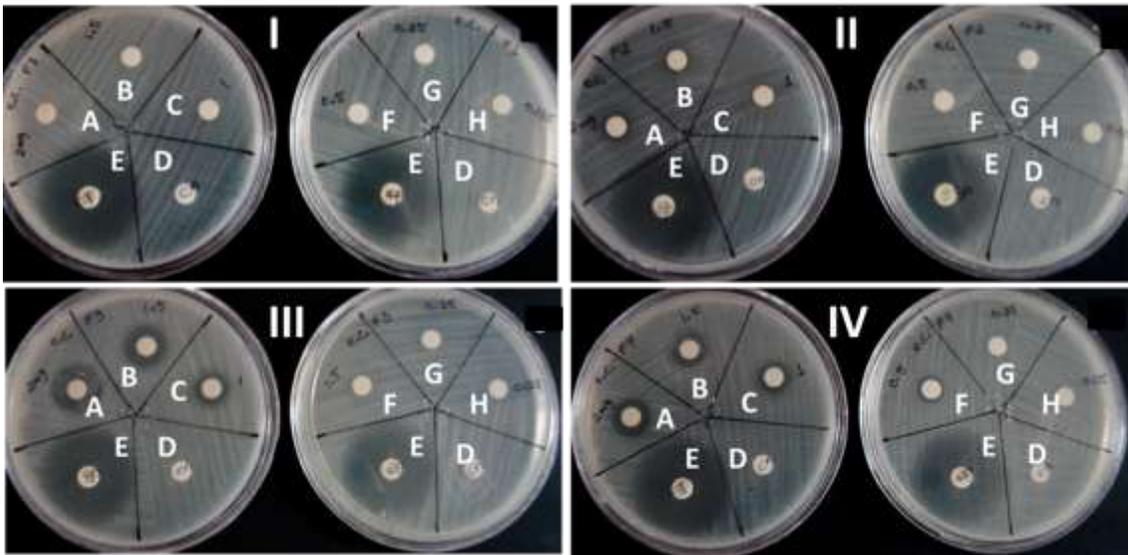


Figura 8. Halos de inhibición de las cuatro morfologías frente a *E. coli*. A: concentración de 200 $\mu\text{g disco}^{-1}$, B: 150 $\mu\text{g disco}^{-1}$, C: 100 $\mu\text{g disco}^{-1}$, D: control negativo, E: control positivo, F: 50 $\mu\text{g disco}^{-1}$, G: 25 $\mu\text{g disco}^{-1}$, H: 12.5 $\mu\text{g disco}^{-1}$.

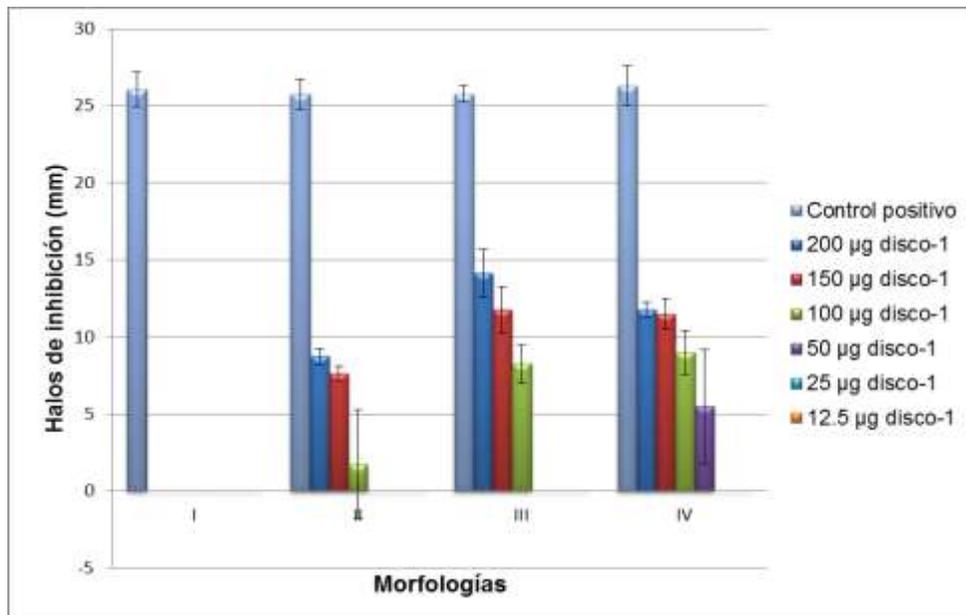


Figura 9. Diferencias en los halos de inhibición (mm) obtenidos frente a *E. coli*, entre las concentraciones probadas.

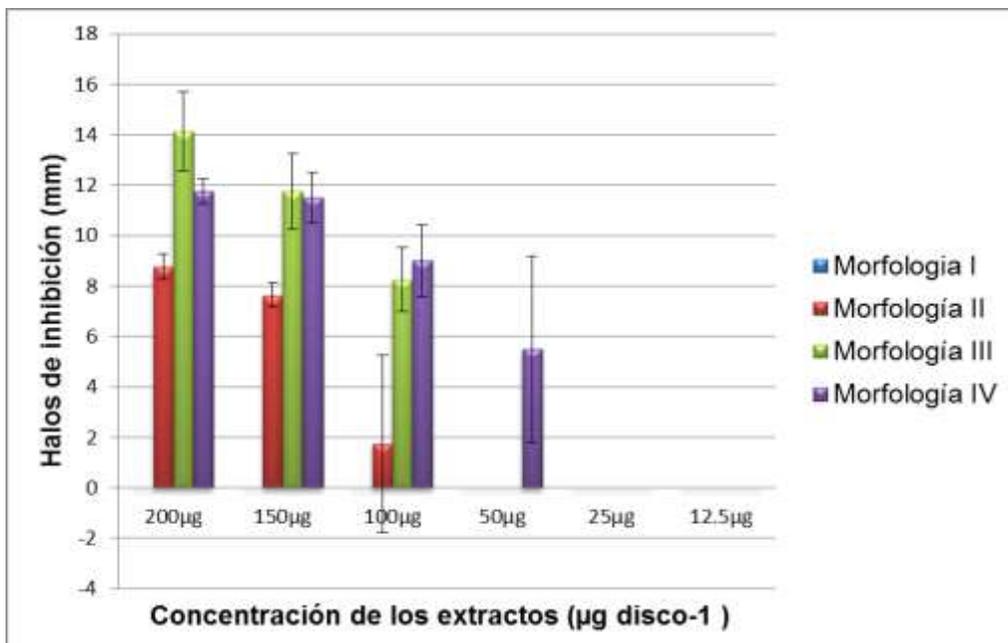


Figura 10. Diferencias en los halos de inhibición (mm) entre las distintas morfologías a diferentes concentraciones frente a la cepa *E. coli*.

Los resultados del análisis de varianza muestran una diferencia significativa en la actividad frente a *E. coli* dependiendo de la morfología ($F_{0.95; 3, 92g.l.} = 9.8, P \leq 0.05$). Contrario a los resultados frente a *S. aureus*, en este caso la diferencia no es tan evidente y se da debido a que la morfología I no fue activa. Entre las morfologías que presentaron actividad no hay diferencias significativas (Figura 11).

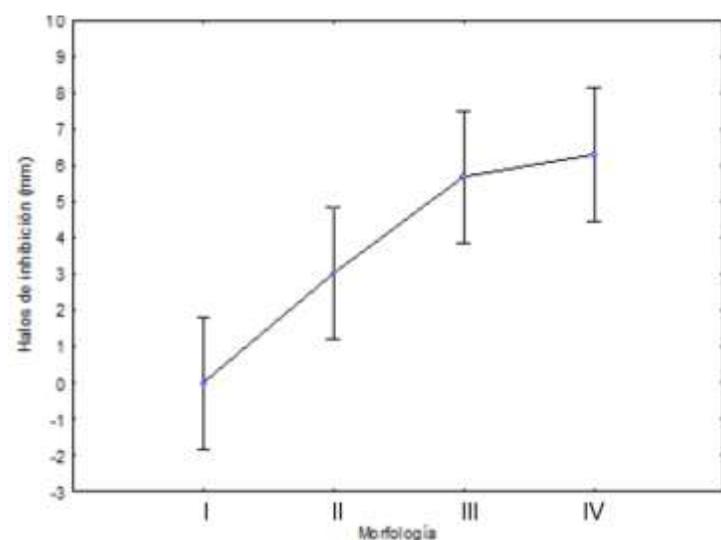


Figura 11. Valores de actividad antibacteriana frente a *E. coli* en las diferentes morfologías. Las barras representan el error estándar.

Actividad citotóxica

En la Tabla IV se muestran los resultados del porcentaje de viabilidad de las líneas de células cancerígenas. Todos los extractos fueron activos ya que inhibieron a las diferentes líneas con valores de viabilidad de entre 0 a 7.9 %. Sin embargo, también inhibieron la viabilidad de la línea de células no transformada NIH3T3, lo que indica que los extractos son muy tóxicos.

Tabla IV. Porcentaje de viabilidad de las líneas celulares frente a los extractos de las cuatro morfologías.

	PC3	MCF7	HepG2	NIH3T3
1	7.85 ± 0.005	6.45 ± 0.064	0	5.39 ± 0.037
2	0.33 ± 0.02	0	0	0
3	0	0	0	0
4	3.06 ± 0.006	0	0	0

Extracción de ADN

La concentración de ADN obtenida de la extracción fue de 1 µg/ml, para todas las morfologías. Para el PCR, se realizaron varios ensayos antes de decidir que concentración de ADN era la óptima para la obtención del amplicón esperado, se concluyó que se utilizaría ADN obtenido directamente de la extracción; para cada morfología se empleó una cantidad de ADN distinta (I = 4 µl; II = 1 µl; III = 3 µl y IV = 2 µl). Para corroborar la presencia de ADN se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%, el tamaño aproximado de la porción amplificada del CO1 fue de 750 pb (Figura 12).

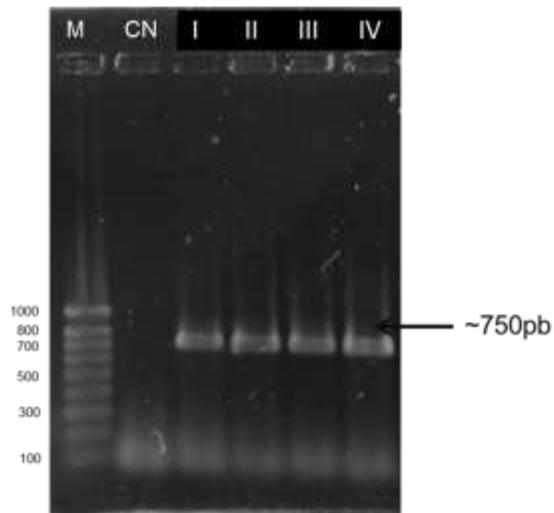


Figura 12. Producto de PCR de las variantes morfológicas.
M: marcador de peso molecular de 1 Kb, CN: control negativo.

Secuenciación.

Las secuencias de ADN mitocondrial del CO1 de las cuatro morfologías, se muestran en el Anexo I. En el alineamiento de las cuatro morfologías se encontraron 50 sitios variables en las bases nitrogenadas en comparación con el fragmento consenso; las variaciones corresponden principalmente a la morfología III (Figura 13).

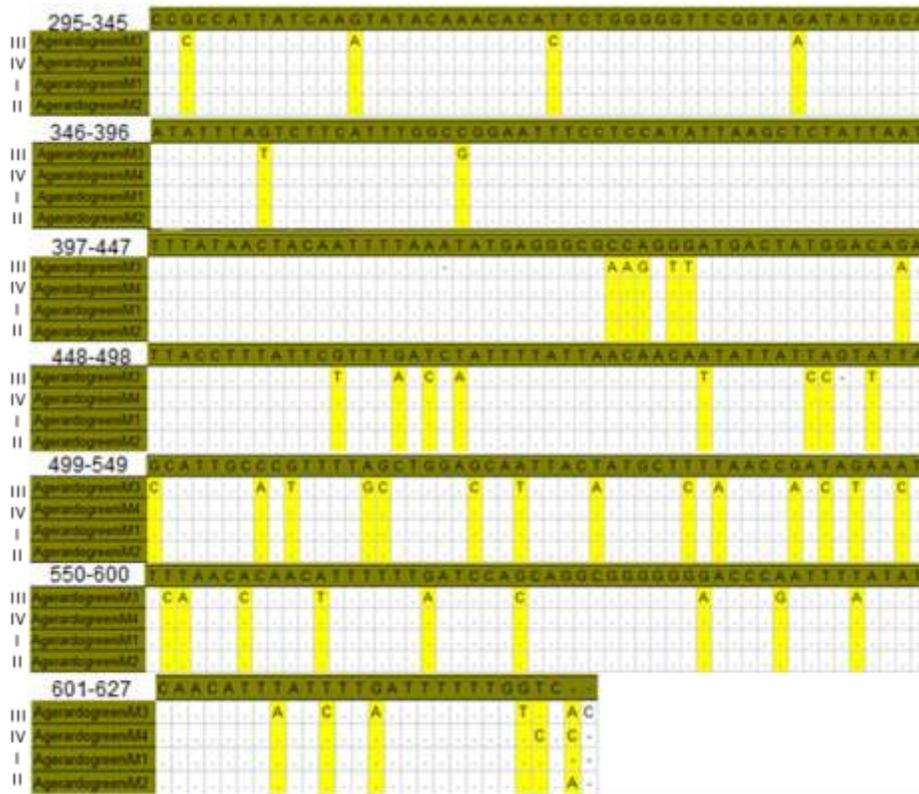


Figura 13. Secuencias alineadas de las cuatro morfologías en donde se muestran los sitios variables encontrados.

En tabla V se muestran los resultados de los análisis de alineamiento con la base de datos del National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) para las secuencias de cada morfología, se muestra la especie con la que se tuvo mayor similitud en cada caso, así como los códigos de acceso para cada una.

Tabla V. Relación de las especies más similares encontradas en la NCBI para las secuencias de las cuatro morfologías de *Aplysina*.

Morfología	Especie	No. de acceso (NCBI)	Similitud
Tipo I	<i>Aplysina lacunosa</i>	AM076985.1	100 % (623/623)
Tipo II	<i>A. lacunosa</i>	AM076985.1	99 % (624/625)
	<i>A. fistularis</i>	AY561987.1	99 % (624/625)
Tipo III	<i>A. lacunosa</i>	AM076985.1	92 % (575/626)
	<i>A. fistularis</i>	AY561987.1	92 % (575/626)
Tipo IV	<i>A. lacunosa</i>	AM076985.1	100 % (622/622)

Determinación de unidades génicas.

Se obtuvieron dos árboles de distancia N-J utilizando el programa Mega 4.1. El árbol obtenido utilizando únicamente las secuencias de las cuatro morfologías (Figura 14), muestra que se forman dos clados, uno conformado por las morfologías I, II y IV, y un segundo clado formado únicamente por la morfología III.

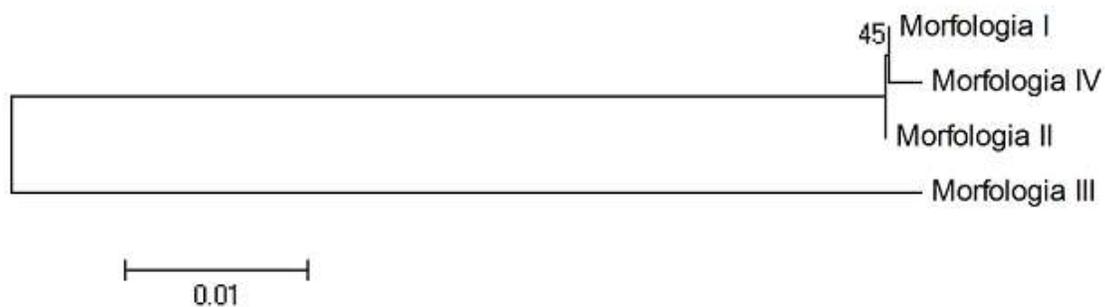


Figura 14. Árbol de distancias N-J (bootstrap 1000 repeticiones) de las cuatro morfologías encontradas en Punta Arena de la Ventana, B.C.S.

El segundo árbol de distancias N-J se construyó utilizando algunas secuencias del género *Aplysina* reportadas en la NCBI (Figura 15), se puede observar que las cuatro morfologías se agrupan dentro de las especies de la familia Aplisinidae, sin embargo, se observa que la morfología III, al igual que en el árbol anterior (Figura 14) se comporta como una especie distinta; mientras que las morfologías I, II y IV se relacionan de manera estrecha con las otras especies de *Aplysina*. En la base del árbol se observan los grupos externos.

DISCUSIÓN

Tipos de morfologías de *Aplysina gerardogreeni*.

Las esponjas del género *Aplysina* se caracterizan por presentar un alto grado de variabilidad fenotípica (Klöppel *et al.*, 2009). Gómez y Bakus (1992) describieron a *A. gerardogreeni* como una esponja de tipo leuconoide, de forma masiva y lobulada, que presenta una superficie finamente conulosa, siendo estas estructuras menores a 1 mm de alto; y con una coloración natural, amarilla ocre en la base y rojiza en la parte superior. En este trabajo, los ejemplares de *A. gerardogreeni* recolectados en el arrecife rocoso de Punta Arena de la Ventana, B.C.S., se separaron en cuatro tipos de acuerdo a su morfología externa (Tabla II). Al compararlas con lo descrito por Gómez y Bakus (1992), las morfologías II y IV no presentaron la forma de crecimiento masiva y lobulada que describe a la especie y en lo referente a la estructura superficial sólo la morfología II presentó conulos. La alta variabilidad de caracteres causa mucha confusión para distinguir entre especies o formas inducidas por el medio ambiente (ecofenotipos) (Palumbi, 1986; Díaz *et al.*, 2005). Esta variabilidad intraespecífica en esponjas ha sido desde hace mucho tiempo fuente de dificultad taxonómica y tiene importantes consecuencias en los campos asociados, incluida la investigación ecológica, gestión de la biodiversidad y la identificación de nuevas sustancias farmacológicamente activas (Holland, 2000; Miller *et al.*, 2001).

Algunos factores ambientales que pueden determinar la variación en la morfología de las esponjas son la presión, las corrientes, el oleaje, la luz y la temperatura

(http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen1/ciencia2/24/htm/sec_10.html, consultado el 07/10/2011). En este caso, debido a que la zona de recolecta de los organismos fue la misma, resulta difícil atribuir los cambios en la morfología a factores ambientales. Sin embargo, en algunas especies del género *Aplysina* la forma en general, la distribución de conulos y digitaciones que las distinguen son capaces de cambiar como respuesta ante diferentes condiciones ecológicas más que ambientales (Klöppel *et al.*, 2009).

Análisis del rendimiento de los extractos orgánicos y análisis preliminar mediante CCF.

Para esta especie se ha observado una variación en el rendimiento de extracción entre las diferentes épocas del año (Montes-Plascencia, 2010). En este estudio también se observan diferencias en el porcentaje de rendimiento entre morfologías. La morfología I, presentó el mayor rendimiento de extracción (9.16%), muy superior a lo reportado en otros trabajos realizados con la misma especie, en los que se obtuvieron valores de rendimientos de alrededor de 6.2 % (Montes-Plascencia, 2010; Valencia-Agamí, 2010). Sin embargo, este alto rendimiento no coincide con un mayor perfil de compuestos, como se puede observar en el análisis preliminar del extracto mediante CCF (Figura 3).

Análisis de la actividad antibacteriana de los extractos de las diferentes morfologías.

En trabajos anteriores se ha reportado que *A. gerardogreeni* presenta una evidente actividad antibacteriana frente a diversas cepas patógenas tanto Gram-positivas como Gram-negativas, tales como *Staphylococcus aureus*, *S. aureus* resistente a meticilina, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *M. kansasii*, *M. scrofulaceum*, *M. avium*, *Streptococcus faecalis*, *Xanthomonas campestris* (Encarnación-Dimayuga *et al.*, 2000; 2003; Ogamino *et al.*, 2006; León-Deniz, 2000; 2003; Navarro, 2005; Montes-Plascencia, 2010; Valencia-Agami, 2010) entre otras, así como actividad antiepibiótica (Montes-Plascencia *et al.*, 2010; Valencia-Agami *et al.*, 2010) y citotóxica frente a diferentes líneas de células tumorales (Hernández *et al.*, 2007; Montes-Plascencia, 2010; Valencia-Agami *et al.*, 2010).

En este estudio, los extractos MeOH de las cuatro morfologías de *A. gerardogreeni* de Punta Arena de la Ventana, mostraron ser activos frente a las cepas de *S. aureus* y *E. coli*. En ambos casos, la morfología tipo III presentó la mayor actividad a la concentración de 200 µg disco⁻¹ con halos de inhibición de 26.63 y 14.13 mm, respectivamente (Figuras 4-10). Estos resultados fueron similares a los presentados por Montes-Plascencia (2010) que registró halos de inhibición de 22.7 mm frente a *S. aureus* y de 18.9 mm frente a *E. coli* a una concentración de 2 mg disco⁻¹. En otro estudio realizado con organismos de la

misma zona durante verano, se obtuvieron halos de 36.8 y 21.5 mm para *S. aureus* y *E. coli* respectivamente, a una concentración de 2 mg disco⁻¹ (Valencia-Agami, 2010).

Los resultados de este trabajo son interesantes, debido a que aun a concentraciones de 200 µg disco⁻¹ se presenta una significativa actividad antibacteriana.

Es notorio que en todos los trabajos mencionados incluyendo este, los extractos de *A. gerardogreeni* mostraron tener una mayor actividad frente a la cepa *S. aureus* que frente a *E. coli*, esto posiblemente, se debe a las diferencias en su envoltura celular. Por un lado, las bacterias Gram-positivas (*S. aureus*), presentan una capa gruesa y homogénea de peptidoglicano (denominada pared celular) que rodea a la membrana plasmática; mientras que las bacterias Gram-negativas (*E. coli*), poseen una membrana interna, una pared de peptidoglicano más delgada que las Gram-positivas y una membrana externa que presenta una proteína denominada porina la cual forma canales hidrofóbicos que limitan el paso de moléculas hidrofílicas muy grandes. En *E. coli*, es esta membrana externa la que le confiere una mayor protección ante colorantes, detergentes y algunos antibióticos que normalmente dañarían la membrana interna o la pared celular de peptidoglicano (Baron, 1996; Madigan *et al.*, 2003), es probable que ésta sea la razón de la menor actividad antibacteriana frente a esta cepa en comparación con *S. aureus*.

E.coli es responsable de causar infecciones intestinales y extra intestinales generalmente graves, tales como infecciones del aparato excretor, cistitis, meningitis, peritonitis, mastitis, septicemia y neumonía; el uso de antibióticos es poco eficaz, como ya se mencionó, debido a la membrana externa que le proporciona a estas bacterias resistencia a la lisozima y a la penicilina (Baron, 1996; Madigan *et al.*, 2003). En la actualidad *S. aureus* se erige como el principal causante de las infecciones de origen comunitario y nosocomial, aunado a esto es uno de los principales patógenos que desarrollan en poco tiempo resistencia a los antibióticos; hoy en día, se han encontrado distintas cepas de *S. aureus* que son resistentes a la penicilina, meticilina, tetraciclina y eritromicina. Con el tiempo de exposición suficiente, la resistencia se desarrollará frente a todos los antimicrobianos conocidos (Gil, 2000; Madigan *et al.*, 2003; Walsh y Wright, 2005) por ello, el hecho de que los extractos se mostraran activos frente a estas dos cepas resulta interesante en la búsqueda de compuestos con actividad frente a cepas Gram-positivas y Gram-negativas resistentes.

En los análisis estadísticos, se puede observar que existen variaciones significativas en la actividad entre las distintas morfologías frente a *S. aureus* (Figura 7), siendo la morfología III la más activa, mientras que la morfología I presentó la menor actividad. En el caso de *E. coli*, también se observaron variaciones significativas en la actividad entre las distintas formas, encontrando que las morfologías III y IV presentaron la mayor actividad, mientras que la morfología I no fue activa frente a esta cepa (Figura 11).

Respecto a la morfología tipo I, es posible que su baja actividad frente a *S. aureus* (Figura 5 y 6) y la nula actividad frente a *E. coli* (Figura 9 y 10) se deba a la poca cantidad de compuestos. Así al comparar los compuestos presentes en la placa de CCF de las diferentes morfologías (Figura 3), se observa que la morfología I no presenta compuestos tan evidentes.

La variación de la actividad entre diferentes morfologías de una especie ha sido observada en otros trabajos, en los que se tiene evidencia de que las variantes morfológicas pueden dar lugar a diferencias en la actividad biológica, Uriz *et al.* (1992), reportaron que existe cierta correlación entre las estrategias de crecimiento de las esponjas y el tipo de actividad biológica que presentan, encontrando que las formas erectas y globulares son las que presentan mayor actividad antibacteriana y antifúngica, mientras que las formas incrustantes y perforadoras presentan en mayor medida actividad citotóxica y antimetabólica.

En estudios realizados con ascidias (Lopez-Legentil *et al.*, 2005) y otros en esponjas, se ha reportado que la producción de diferentes compuestos se presenta en una determinada morfología en función de su coloración; así a partir de la esponja *Haliclona* sp. de Australia que presenta dos coloraciones, verde y café, el compuesto salicylialamida A, solamente es producido por la morfología verde (Abdo, 2007).

La variabilidad en la bioactividad y en la producción de metabolitos secundarios en las esponjas ha sido documentada a niveles inter e intra-específicos (Turon *et*

al., 1996; Betancourt-Lozano *et al.*, 1998). Dentro de los factores que pueden provocar esta variación, se pueden mencionar los genéticos y ambientales (bióticos y abióticos) (Uriz *et al.*, 1995; Becerro *et al.*, 1997; Agell *et al.*, 2001). En este estudio resulta difícil poder relacionar la variación en la bioactividad con los factores ambientales (luz, profundidad, disponibilidad de nutrientes, variación estacional, etc.), ya que como se mencionó anteriormente la zona de muestreo fue la misma, en una sola época del año y no hay variaciones significativas en la profundidad (2 a 6 m).

Análisis de la actividad citotóxica de los extractos de las diferentes morfologías de *A. gerardogreeni*.

Los bioensayos de citotoxicidad de los extractos de las diferentes morfologías mostraron actividad frente a todas las líneas de células tumorales, inhibiendo el crecimiento por arriba del 90% (Tabla IV). Sin embargo, también inhibieron por completo el crecimiento de la línea de células no transformadas (NIH3T3), en donde se espera que los porcentajes de viabilidad celular sean elevados. Lo que indica que los extractos fueron demasiado tóxicos para las diferentes líneas de células tumorales. Por lo que sería recomendable realizar estos ensayos a una menor concentración. A partir de extractos del género *Aplysina* de Brasil, se observó que pueden inhibir el crecimiento de la línea celular de colon (HCT-8) hasta en un 75% (Selegim *et al.*, 2007). En ensayos realizados con extractos de

A. gerardogreeni de la misma zona de recolecta se observó que los extractos obtenidos en verano y otoño pueden inhibir las líneas celulares HEPG2, PC3 y NIH3T3 hasta en un 90% (Montes-Plascencia, 2010).

Alineamiento de las secuencias del CO1.

Al observar los alineamientos de las secuencias de las cuatro morfologías recolectadas en Punta Arena de la Ventana, se encontraron 50/629 sitios variables en las bases nitrogenadas, todos correspondientes a la morfología III, y con ligeras variaciones en las últimas bases de las secuencias de las morfologías II y IV. La morfología I no presentó diferencias respecto a la región consenso (Figura 13).

Las cuatro morfologías encontradas fueron identificadas taxonómicamente *a priori* como *A. gerardogreeni*, sin embargo, al realizar los alineamientos con la base de datos NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), la mayor similitud de las secuencias fue con *A. lacunosa* (código de acceso AM076985.1, de las Bahamas), siendo del 100% para las morfologías I y IV, del 99% para la morfología II y del 92% para la III. También se encontró una similitud del 99% entre *A. fistularis* (código de acceso AY561987.1) y la morfología II y del 92% con la tipo III (Tabla V). El hecho de que las morfologías I y IV tengan una mayor correspondencia con *A. lacunosa* no precisamente implica que se trate de la misma especie, debido a que los registros de distribución geográfica para *A. lacunosa* se limitan al Caribe, Islas Vírgenes, Florida, Golfo de México y el noroeste del Atlántico tropical

(<http://www.spongebarcoding.org/>, consultado el 10 de octubre de 2011), sin embargo, para descartar esta posibilidad hacen falta revisiones taxonómicas, moleculares y ecológicas más completas. La alta similitud en el alineamiento de las morfologías I, II y IV con *A. fistularis* y las características morfológicas que corresponden en mayor medida a esta especie (comp. pers., Carlos Sánchez) indican que es probable que se trate de ella.

Determinación de unidades genéticas, variación en la bioactividad y variación genética.

La diversidad morfológica y la variación en la bioactividad a nivel intra-específica, puede explicarse mediante diferencias en las condiciones ambientales locales, la divergencia genética también puede ayudar a explicar esta variabilidad. Por lo que el uso de las técnicas moleculares ha sido de gran utilidad para comprobar estos planteamientos (López-Legentil *et al.*, 2010).

En este estudio, las morfologías encontradas en el arrecife rocoso de Punta Arena de la Ventana se identificaron taxonómicamente *a priori* como *A. gerardogreeni*, por lo que se planteó la hipótesis de que las diferencias en la morfología y bioactividad son resultado de una variación intra-específica, sin embargo, al construir el árbol de distancias N-J a partir de las secuencias del gen mitocondrial CO1 de las cuatro morfologías (Figura 14) y el árbol de secuencias del género *Aplysina* extraídas de la base de datos GeneBank (Figura 15), se observa que la morfología tipo III corresponde a un clado distinto al de las morfologías I, II y IV y a

las demás especies del género, por lo que se puede inferir que se trata de una especie diferente; que de acuerdo a sus características morfológicas es probable que se trate de *A. gerardogreeni* (comp. pers., Carlos Sánchez). Por lo que la hipótesis planteada se rechaza ya que las diferencias en la bioactividad se deben a variaciones inter-específicas.

Se ha observado que la variabilidad en la bioactividad y en la producción de metabolitos secundarios en las esponjas está dada por el componente genético (Uriz *et al.*, 1995; Becerro *et al.*, 1997; Agell *et al.*, 2001). En este sentido son pocos los trabajos, que combinan morfología, bioactividad, química y genética de las especies en cuestión, para entender la producción de los metabolitos y los factores que los afectan (eg. Miller *et al.*, 2001); este planteamiento aunado a los resultados de este trabajo hacen evidente, que se requiere de una caracterización taxonómica, molecular, ecológica y química más detallada para el género *Aplysina*.

CONCLUSIONES

- Con base en las características externas de la esponja identificada *a priori* como *A. gerardogreeni* de Punta Arena de la Ventana, B.C.S., se separaron en cuatro morfologías.
- Los extractos MeOH de las diferentes morfologías, presentaron una evidente actividad antibacteriana frente a las cepas patógenas de *S. aureus* y *E. coli*, encontrándose diferencias significativas en la actividad entre las diferentes morfologías, siendo la morfología III la que presentó mayor actividad con un halo de inhibición promedio de 26.63 mm frente a *S. aureus* y 14.13 mm frente a *E. coli* a una concentración de 200 $\mu\text{g disco}^{-1}$.
- En los ensayos de actividad citotóxica se encontró que todos los extractos presentaron porcentajes de viabilidad celular menores al 90% frente a las líneas celulares de PC3, MCF7, HepG2, y NIH3T3, lo que indica una alta toxicidad del extracto, por lo que se sugiere realizar bioensayos a una menor concentración.
- Mediante PCR fue posible la amplificación de un fragmento de 750 pb del gen mitocondrial CO1. Al comparar las secuencias de cada forma de *A. gerardogreeni* se encontraron 50 sitios variables en las bases nitrogenadas, todos correspondientes a la morfología III. Por otro lado, los árboles de

distancias N-J confirmaron que la morfología III corresponde a una especie distinta.

- La variación de la bioactividad entre las morfologías, es resultado de una variación inter-específica.

ANEXO I

Morfología Tipo I

Secuencia:

GCATTTAGTATGTTAATTAGACTGGAGTTATCTGCACCAGGCTCAATGTTAGGAGACG
ATCATTTATATAATGTTATAGTAACGGCACATGCTTTTGTATGATATTCTTTTTAGTAA
TGCCTGTTATGATAGGGGGTTTTGGTAATTGATTAGTTCCATTATATATTGGAGCACCA
GATATGGCTTTCCCTCGGTTAAATAATATTAGTTTTTGTATTATTACCCCAGCACTAAT
TTTATTATTGGGGTCTGCTTTTATAGAACAAGGGGCCGGTACGGGTGAACCGTCTAT
CCGCCATTATCAAGTATACAAACACATTCTGGGGGTTCCGGTAGATATGGCAATATTTA
GTCTTCATTTGGCCGGAATTTCTCCATATTAAGCTCTATTAATTTTATAACTACAATTT
TAAATATGAGGGCGCCAGGGATGACTATGGACAGATTACCTTTATTCGTTTTGATCTAT
TTTATTAACAACAATATTATTAGTATTAGCATTGCCCGTTTTAGCTGGAGCAATTA
GCTTTTAACCGATAGAAATTTAACACAACATTTTTTGATCCAGCAGGCCGGGGGGGAC
CCAATTTTATATCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTC

Morfología Tipo II

Secuencia:

CATTTAGTATGTTAATTAGACTGGAGTTATCTGCACCAGGCTCAATGTTAGGAGACGA
TCATTTATATAATGTTATAGTAACGGCACATGCTTTTGTATGATATTCTTTTTAGTAAT
GCCTGTTATGATAGGGGGTTTTGGTAATTGATTAGTTCCATTATATATTGGAGCACCA
GATATGGCTTTCCCTCGGTTAAATAATATTAGTTTTTGTATTATTACCCCAGCACTAAT
TTTATTATTGGGGTCTGCTTTTATAGAACAAGGGGCCGGTACGGGTGAACCGTCTAT
CCGCCATTATCAAGTATACAAACACATTCTGGGGGTTCCGGTAGATATGGCAATATTTA
GTCTTCATTTGGCCGGAATTTCTCCATATTAAGCTCTATTAATTTTATAACTACAATTT
TAAATATGAGGGCGCCAGGGATGACTATGGACAGATTACCTTTATTCGTTTTGATCTAT
TTTATTAACAACAATATTATTAGTATTAGCATTGCCCGTTTTAGCTGGAGCAATTA
GCTTTTAACCGATAGAAATTTAACACAACATTTTTTGATCCAGCAGGCCGGGGGGGAC
CCAATTTTATATCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCA

Morfología Tipo III

Secuencia:

ATTTAATATGTTAATTAGACTGGAGTTATCTGCACCAGGCTCAATGTTAGGAGACGAT
CATTTATATAATGTTATAGTAACGGCACATGCTTTTGTATGATATTCTTTTTAGTAATG
CCTGTTATGATAGGGGGTTTTGGTAATTGATTAGTTCCATTATATATTGGAGCACCAGA
TATGGCTTTCCCTCGGTTAAATAATATTAGTTTTTGATTATTACCCCAGCACTAATTTT
ATTATTGGGGTCTGCTTTTATAGAACAAGGGGCCGGTACGGGTTGAACCGTCTATCC
CCCATTATCAAATATACAAACACACTCTGGGGGTTCCGGTAAATATGGCAATATTTATTC
TTCATTTGGCGGAATTTCTCCATATTAAGCTCTATTAATTTTATAACTACAATTTTAA
TATGAGGGCGAAGGTTATGACTATGGACAAATTACCTTTATTCTTTTAACCAATTTTAT
TAACAACATTATTATCCTTTTACCATTGCACTTTTTGCCTGGACCATTTACAATGCTCTA
AACCAACATAACTTCAAACCCAACCTTTTTTAAATCCACCAGGCGGGGGGAACCCGATT
TAATATCAACATTAATCTTAATTTTTTTGTTACCT

Morfología Tipo IV

Secuencia:

CATTTAGTATGTTAATTAGACTGGAGTTATCTGCACCAGGCTCAATGTTAGGAGACGA
TCATTTATATAATGTTATAGTAACGGCACATGCTTTTGTATGATATTCTTTTTAGTAAT
GCCTGTTATGATAGGGGGTTTTGGTAATTGATTAGTTCCATTATATATTGGAGCACCA
GATATGGCTTTCCCTCGGTTAAATAATATTAGTTTTTGATTATTACCCCAGCACTAAT
TTTATTATTGGGGTCTGCTTTTATAGAACAAGGGGCCGGTACGGGTTGAACCGTCTAT
CCGCCATTATCAAGTATACAAACACATTCTGGGGGTTCCGGTAGATATGGCAATATTTA
GTCTTCATTTGGCCGAATTTCTCCATATTAAGCTCTATTAATTTTATAACTACAATTT
TAAATATGAGGGCGCCAGGGATGACTATGGACAGATTACCTTTATTCGTTTGATCTAT
TTTATTAACAACAATATTATTAGTATTAGCATTGCCCGTTTTAGCTGGAGCAATTA
GCTTTTAACCGATAGAAATTTAACACAACATTTTTTGATCCAGCAGGCGGGGGGAC
CCAATTTTATATCAACATTTATTTTGATTTTTTGGCCC

BIBLIOGRAFÍA

- Abdo, D. A., C. A. Motti, C. N. Battershill & E. S. Harvey. 2007. Temperature and Spatiotemporal Variability of Salicylhalamide A in the Sponge *Haliclona* sp. *Journal of Chemistry Ecology*, 33: 1635–1645.
- Acosta, A. L. & A. Rodríguez. 1992. 11-Oxo-aerolithin: a cytotoxic antitumor bromotyrosine-derived alkaloid from the Caribbean marine sponge *Aplysina lacunosa*. *Journal of Natural Products*, 55(7): 1007-1012.
- Agell, G., M. J. Uriz, E. Cebrian & R. Martí. 2001. Does stress protein induction by copper modify natural toxicity in sponges? *Environmental Toxicology & Chemistry*, 20: 2588-2593.
- Azevedo, L. G., A. L. Muccillo-Baisch, D. Filgueira, R. Boyle, D. Ramos, A. Soares, C. Lerner, P. Silva & G. Trindade. 2008. Comparative cytotoxic and anti-tuberculosis activity of *Aplysina caissara* marine sponge crude extracts. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C. Toxicology & Pharmacology*, 147: 36-42.
- Baron, S. (Ed.). 1996. *Medical Microbiology*. Cuarta edición. University of Texas Medical Branch at Galveston. E.U.A.
- Bavestrello, G., B. Calcinai & C. Cerrano. 2003. Adattamenti negli invertebrati marini alla vita nelle grotte. In: Cicogna F., Bianchi C.N., Ferrari G., Forti P. (Eds), *Grotte Marine. Cinquant'anni di Ricerca in Italia*. Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio, Roma. 241–246.
- Bhakuni, D. S. & D. S. Rawat. 2005. *Bioactive Marine Natural Products*. Anamaya Publishers. India. 396 pp.
- Becerro, M. A., M. J. Uriz & X. Turon. 1997. Chemically-mediated interactions in benthic organisms: the chemical ecology of *Crambe crambe* (Porifera, Poesilosclerida). *Hydrobiologia*, 356: 77-89.
- Bergmann, W. & R. J. Feeney. 1950. The isolation of a new thymine pentoside from sponges. *Journal of the American Chemical Society*, 72: 2809-2810.
- Bergmann, W. & R. J. Feeney. 1951. Contributions to the study of marine products. XXXII. The nucleosides of sponges. *Journal of Organic Chemistry*, 16: 981-987.

- Bergmann, W. & D. C. Burke. 1955. The nucleosides of sponges. 3. Spongothymidine and spongouridine (from *Cryptotethia crypta*). *Journal of Organic Chemistry*, 20: 1501-1507.
- Betancourt-Lozano, M., F. González-Farías, B. González-Acosta, A. García-Gasca & J. Bastida-Zavala. 1998. Variation of antimicrobial activity of the sponge *Aplysina fistularis* (Pallas, 1766) and its relation to associated fauna. *Journal Experimental Marine Biology Ecology*, 223: 1-18.
- Blunt, J. W., B. R. Copp, W. P. Hu, M. H. Munro, P. T. Northcote & M. R. Prinsep. 2009. Marine natural products. *Natural Products Report*, 26(2): 170-244.
- Bonay, M. P. & M. Fresno. 2000. Lectins from Tropical Sponges. Purification and characterization of lectins from genus *Aplysina*. *Journal of Biological Chemistry*, 275(38): 29283-29289.
- Brusca, R. C. & G. J. Brusca. 2005. *Invertebrados*. McGraw-Hill Interamericana, España. 1005pp.
- Ciminiello, P., V. Costantino, E. Fattorusso, S. Mangonis & M. Pansini. 1994. Chemistry of Verongida sponges, II. Constituents of the Caribbean sponge. *Aplysina fistularis* forma *fulva*. *Journal Natural Products*, 57(6): 705-712.
- Ciminiello, P., E. Fattorusso & S. Magno. 1994. Chemistry of Verongida sponges III. Constituents of a Caribbean *Verongula* sp. *Journal of Natural Products*, 57: 1564–1569.
- Ciminiello, P., C. Dell'Aversano, E. Fattorusso, S. Magno, L. Carrano & M. Pansini. 1996. Chemistry of Verongida Sponges. VII Bromocompounds from the Caribbean Sponge *Aplysina archeri*. *Tetrahedron*, 52(29): 9863-9868.
- Compagnone, R. S., R. Avila, A. I. Suárez, O. V. Abrams, H. R. Ragel, F. Arvelo, I. C. Piña & E. Merentes. 1999. 11-Deoxyfistularin-3, a new cytotoxic metabolite from the Caribbean sponge *Aplysina fistularis insularis*. *Journal of Natural products*, 62(10): 1443-1444.
- Cruz, F., L. Quijano, F. Gómez-Garibay & T. Ríos. 1990. Brominated metabolites from the sponge *Aplysina* (verongia) *thiona*. *Journal of Natural Products*, 53(3): 543-548.

- D'Ambrosio, M., C. Mealli, A. Guerriero & F. Pietra. 1985. 7-Bromocavernicolenone, a new alpha-bromoone from the Mediterranean sponge *Aplysina* (= *Verongia*) *cavernicola*. Implied, unprecedented involvement of halogenated dapo in the biogenesis of natural products. *Helvetica Chimica Acta*, 68 (5): 1453 – 1460.
- De Oliveira, M. F., J. H. H. L. de Oliveira, F. C. S. Galetti, A. O. de Souza, C. Lopes Silva, E. Hajdu, S. Peixinho, & R. G. S. Berlinck. 2006. Antimycobacterial brominated metabolites from two species of marine sponges. *Planta Med.*, 72: 437-441.
- Díaz, M. C., R. W. M. Van Soest, K. Rützler & H. M. Guzmán. 2005. *Aplysina chiriquiensis*, a new pedunculate sponge from the Gulf of Chiriquí, Panamá, Eastern Pacific (Aplysinidae, Verongida). *Zootaxa*, 1012: 1–12.
- Donia, M. & M. T. Hamann. 2003. Marine natural products and their potential applications as anti-infective agents. *Lancet Infectious Diseases*, 3(6): 338-348.
- Encarnación-Dimayuga, R., E. Sandoval, J. Malmstrøm & C. Christophersen. 2000. Calafianin, a Bromotyrosine Derivative from the Marine Sponge *Aplysina gerardogreeni*. *Journal of Natural Products*, 63:874-875.
- Encarnación-Dimayuga, R., M. R. Ramírez & J. Luna-Herrera. 2003. Aerothionin, a Bromotyrosine Derivative with Antimycobacterial Activity from the Marine Sponge *Aplysina gerardogreeni* (Demospongiae). *Pharmaceutical Biology*, 41(5): 384-387.
- Fattorusso, E., L. Minale & G. Sodano. 1972. Aeroplysinin-1, an antibacterial bromo-compound from the sponge *Verongia aerophoba*. *Journal Chemistry Society Perkin*, 16-18.
- Ferreti, C., S. Vacca, C. de Ciucis, B. Marengo, A.R. Duckworth, R. Manconi, R. Pronzato & C. Domenicotti. 2009. Growth dynamics and bioactivity variation of the Mediterranean demosponges *Agelas oroides* (Agelasida, Agelasidae) and *Petrocia ficiformis* (Haplosclerida, Petrodidae). *Marine Ecology*, 30: 327-336.

- Folmer, O., M. Black, W. Hoeh, R. Lutz & R. Vrijenhoek. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome C oxidases subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3: 294–297.
- Gil, M. 2000. *Staphylococcus aureus*: Microbiología y aspectos moleculares de la Resistencia a meticilina. *Revista Chilena Infectología*, 17(2): 145-152.
- Gómez, P. & G. J. Bakus. 1992. *Aplysina gerardogreeni* y *Aplysina aztecus* (Porifera; Demospongiae), nuevas especies del Pacífico Mexicano. *Anales del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología*, Universidad Autónoma de México. 19 (2): 175-180.
- Guanasekera, S. P. & S. S. Cross. 1992. Fistularin 3 y 11-ketofistularin 3. Feline leukemia virus active bromotyrosine metabolites from the marine sponge *Aplysina archeri*. *Journal of Natural Products*, 55(4): 509-512.
- Gulavita, N., S. Pomponi & A. Wright. 1995. Aplysillin A, a thrombin receptor antagonist from the marine sponge *Aplysina fistularis fulva*. *Journal of Natural Products*, 58: 954-957.
- Gutiérrez, M., T. Capson, H. M. Guzmán, J. González, E. Ortega-Barría, E. Quiñoá & R. Riguera. 2005. Antiprotozoal activity against *Plasmodium falciparum* and *Trypanosoma cruzi* of Aeroplysinin-1 isolated from the new sponge *Aplysina chiriquensis*. *Pharmaceutical Biology*, 43(9): 762–765.
- Haefner, B. 2003. Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. *Drug Discovery Today*, 8(12): 536-544.
- Hernández-Guerrero, C. J., E. Zubía, M. J. Ortega & J. L. Carballo. 2007. Cytotoxic dibromotyrosine-derived metabolites from the sponge *Aplysina gerardogreeni*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15(15): 5275-82.
- Holland, B.S. 2000. Genetics of marine bioinvasions. *Hydrobiologia*, 420: 63-71.
- Hooper, J. N. A. 2000. *Sponge Guide: Guide to Sponge Collection and Identification*. Brisbane: Queensland Museum. 141pp.
- Kazanjian, A. & M. Fariñas. 2006. Actividades biológicas del extracto acuoso de la esponja *Aplysina lacunosa* (Porifera: Aplysinidae). *Revista Biología Tropical*, 54(3): 189-200.

- Klöppel, A., A. Putz, M. Pfannkuchen, G. Fritz, A. Jaklin, P. Proksch & F. Brümmer. 2009. Depth profile of *Aplysina* ssp.: morphological, histological and biochemical aspects and their role in species distinction. *Marine Biodiversity*, 39: 121–129.
- Kobayashi, M. 2000. Search for biological active substances from marine sponges, 46–58, En: Fusetani N. (Ed.), *Drugs from the Sea*. Basel, Krager. 158 pp.
- Koopmans, M., D. Martens & R.H. Wijffels. 2009. Towards commercial production of sponge medicines. *Marine Drugs*, 7(4): 787-802.
- Kreutera, M. H., A. Robitzkia, S. Changa, R. Steffena, M. Michaelisa, Z. Kljajić, M. Bachmanna, H. C. Schrödera & W. Müllera. 1992. Production of the cytostatic agent aeroplysinin by the sponge *Verongia aerophoba* in in vitro culture. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C. Comparative Pharmacology*, 101: 183-187.
- Lamarão, F. R. M., E. Reis, T. Simão, R. Albano & G. Lôbo-Hajdu. 2009. *Aplysina* (Porifera: Demospongiae) species identification through SSCP-ITS patterns. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 1-6.
- Lanza, V., O. Crescente & W. Henríquez. 2006. Aislamiento y actividad antibacteriana de un terpeno de la esponja marina *Aplysina fistularis*. *Boletín Instituto Oceanográfico*, 45(2): 93-99.
- León-Deniz, L. V. 2000. *Búsqueda de compuestos con actividad biológica en Aplysina gerardogreeni, Gómez y Bakus, 1992 (Porifera; Demospongia, Verongida)*. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California Sur, La Paz. 37pp.
- León-Deniz, L. V. 2003. *Aislamiento, purificación, identificación y evaluación de la actividad antimicrobiana de un compuesto de Aplysina gerardogreeni, Gómez y Bakus, 1992 (Porifera: Demospongia)*. Tesis de Maestría. CICIMAR-IPN, La Paz, B.C.S. 94pp.
- Lopez-Legentil, S., R. Dieckmann, N. Bontemps-Subielos, X. Turon & B. Banaigs. 2005. Qualitative variation of alkaloids in color morphs of *Cystodytes* (Ascidiacea). *Biochemical Systematics and Ecology*, 33(11): 1107-1119.

- López-Legentil, S., T. P. Henkel, P. M. Erwin, T. L. Loh, & J. R. Pawlik. 2010. Phenotypic plasticity in the Caribbean sponge *Callyspongia vaginalis* (Porifera: Haplosclerida). *Scientia Marina*, 74: 445-453.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko & J. Parker. 2003. *Brock. Biología de los microorganismos*. PEARSON. Prentice Hall. 10ª edición. Southern Illinois University Carbondale. 1011pp.
- Mateo-Cid, L. E., C. A. Mendoza, C. Galicia & L. Huerta. 2000. Contribución al estudio de las algas marinas bentónicas de Punta Arena y Cabo Pulmo, Baja California Sur, México. *Acta Botánica Mexicana*, 52: 55-73.
- Miller, K., B. Álvarez, C. Battershill, P. Northcote & H. Parthasarathy. 2001. Genetic, morphological, and chemical divergence in the sponge genus *Latrunculia* (Porifera: Demospongiae) from New Zealand. *Marine Biology*, 139: 235-250.
- Montes-Plascencia, C. I. 2010. *Variación estacional de la actividad biológica de los extractos orgánicos de la esponja Aplysina gerardogreeni del Golfo de California*. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California Sur, La Paz, B.C.S. 52 pp.
- Montes-Plascencia, C. I., C.J. Hernández-Guerrero, B. González-Acosta & R.N. Aguilar Ramírez. 2010. Seasonal variation of anti-bacterial activity of *Aplysina gerardogreeni* from the Gulf of California. *CICIMAR-Oceánides*, 25: 79-81.
- Morales, T., J. Cubero, Z. Lanz, Y. Gómez & M. Segnini. 2000. Antimicrobial activity of organic extracts isolated from *Aplysina fistularis* (Demospongiae: Aplysinidae). *Revista Biología Tropical*, 48: 199-206.
- Munro, M. H. G. & J. W. Blunt. 2009. *Marine Literature DataBase (MarinLit)*. University de Canterbury, New Zealand.
- Navarro, M. J. 2005. *Evaluación antimicrobiana del extracto hexánico de Aplysina gerardogreeni Gómez y Bakus, 1992 (Porifera; Demospongia, Verongida)*. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California Sur, La Paz, B.C.S. 54pp.

- Ogamino, T., R. Obata, H. Tomoda & S. Nishiyama. 2006. Total Synthesis, Structural Revision, and Biological Evaluation of Calafianin, a Marine Spiroisoxazoline from the Sponge, *Aplysina gerardogreeni*. *Bulletin Chemical Society Japan*, 79: 134–139.
- Page, M., L. West, P. Nothcote, C. Battershill & M. Kelly. 2005. Spatial and temporal variability of cytotoxic metabolites in populations of the New Zealand sponge *Mycale hentscheli*. *Journal Of Chemistry Ecology*, 31(5): 1161-1174.
- Palumbi, S.R. 1986. How body plans limit acclimation responses of a demosponge to wave force. *Ecology*, 67: 208-214.
- Pinheiro, U. S. & E. Hajdu. 2001. Shallow water *Aplysina* Nardo (Aplysinidae, Verongida, Demospongiae) from the Sao Sebastiao Channel and its environs (Tropical southwestern Atlantic), with the description of a new species and a literature review of other Brazilian records of the genus. *Revista Brasileira de Zoologia*, 18: 143–160.
- Proksch, P., R. A. Edrada & R. Ebel. 2002. Drugs from the seas: current status and microbiological implications. *Applied Microbiology Biotechnology*, 59: 125.
- Regalado, E. L., A. Laguna & J. R. Martínez. 2010. Las esponjas marinas como fuente de nuevas sustancias bioactivas. *Revista electrónica de la Agencia de Medio Ambiente*, 1-11 pp.
- Rodríguez, A. & I. Piña. 1993. The structures of aplysinamisines I, II, and III: new bromotyrosine-derived alkaloids from the Caribbean sponge *Aplysina cauliformis*. *Journal of Natural Products*, 56(6): 907-914.
- Rodríguez, J. 2003. Mirando a nuestro entorno: productos naturales de origen marino. *Anales de la Real Sociedad Española de Química*, 5-13.
- Rogers, E. W., M. F. de Oliveira, R. G. S. Berlinck, G. M. König & T. F. Molinski. 2005. Stereochemical heterogeneity in Verongid sponge metabolites. Absolute stereochemistry of (+)-fistularin-3 and (+)-*epi*-fistularin-3 by microscale LCMS-Marfey's analysis. *Journal of Natural Products*, 68: 891-896.

- Schmitt, S., U. Hentschel, S. Zea, T. Dandekar & M. Wolf. 2005. ITS-2 and 18S rRNA gene phylogeny of Aplysinidae (Verongida, Demospongiae). *Journal of Molecular Evolution*, 60: 327–336.
- Selegim, M., S. Lira, M.H. Kossuga, T. Batista, R.G.S. Berlinck, E. Hajdu, G. Muricy, R. M. da Rocha, G. G. F. do Nascimento, M. Silva, E. F. Pimenta, O. H. Thiemann, G. Oliva, B.C. Cavalcanti, C. P., M. O. de Moraes, F.C.S. Galetti, C.L. Silva, A.O. de Souza & S. Peixinho. 2007 Antibiotic, cytotoxic and enzyme inhibitory activity of crude extracts from Brazilian marine invertebrates. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 17(3): 287-318.
- Sokal, R. R. & F. J. Rohlf. 1981. *Biometry*. W.H. Freeman and Company. New York, 859 pp.
- Tamura, K., M. Nei & S. Kumar. 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the Neighbor-Joining method. *Proceedings of National Academy Sciences USA.*, 101: 11030–11035.
- Tamura, K., J. Dudley, M. Nei & S. Kumar. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24: 1596-1599.
- Thakur, N. L. & W. E. G. Müller. 2004. Biotechnological potential of marine sponges. *Current Science*, 86(11): 1506-1512.
- Thakur, N. L. & A. N. Thakur. 2006. Marine biotechnology: an overview. *Indian Journal of Biotechnology*, 5: 263-268.
- Teeyapant, R., H. J. Woerdenbag, P. Kreis, J. Hacker, V. Wray, L. Witte & P. Proksch. 1993. Antibiotic and cytotoxic activity of brominated compounds from the marine sponge *Verongia aerophoba*. *Zeitschrift Naturforsch*, 48(11-12): 939-45.
- Thoms, C., M. Wolff, K. Padmakumar, R. Ebel & P. Proksch. 2004. Chemical defense of Mediterranean sponges *Aplysina cavernicola* and *Aplysina aerophoba*. *Zeitschrift Naturforsch*, 59: 113-122.
- Turon, X., M. A. Becerro & M. J. Uríz. 1996. Seasonal patterns of toxicity in benthic invertebrates : the encrusting sponge *Crambe crambe* (Poecilosclerida). *Oikos*, 75: 33-40.

- Tymiak, A. A. & K. L. Rinehart. 1981. Biosynthesis of dibromotyrosine-derived antimicrobial compounds by the marine sponge *Aplysina fistularis* (*Verongia aurea*). *Journal American Chemistry Society*, 103: 6763-6765.
- Uriz, M. J., D. Martin & D. Rosell. 1992. Relationships of biological and taxonomic characteristics to chemically mediated bioactivity in Mediterranean litoral sponges. *Marine Biology*, 113: 287-297.
- Uriz, M. J., X. Turon, M. A. Becerro, J. Galera & J. Lozano. 1995. Patterns of resource allocation to somatic, defensive, and reproductive functions in the Mediterranean encrusting sponge *Crambe crambe* (Demospongiae, Poecilosclerida). *Marine Ecology Progress Series*, 124:159-170.
- Valencia-Agami, S. S. (2010). *Actividad antibacteriana del extracto y fracciones semi-purificadas de la esponja Aplysina gerardogreeni*. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California Sur, La Paz, B.C.S. 44pp.
- Valle, H. A., P. Santafé & G. Gilmar. 2009. Free sterols from the marine sponge *Mycale laevis*. *Vitae*, 16: 103-109.
- Walker, R. P., J. E. Thompson & D. J. Faulkner. 1985. Exudation of biologically-active metabolites in the sponge *Aplysina fistularis* II. Chemical evidence. *Marine Biology*, 88: 27-32
- Walsh, C., & G. Wright. 2005. Introduction: Antibiotic Resistance. *Chemical Review*, 105(2): 391.
- Weiss, B., R. Ebel, M. Elbrächter, M. Kirchner & P. Proksch. 1996. Defense metabolites from the marine sponge *Verongia aerophoba*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 24:1-7.
- Wijffels, R. H. 2007. Potential of sponges and microalgae for marine biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 26: 26-31.