

# Universidad de Guadalajara

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias  
División de Biología



**“Variación estacional de la actividad biológica de extractos orgánicos de la esponja *Aplysina gerardogreeni* del Golfo de California”**

**TESIS**

**Que para obtener el Título de:**

**LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

**PRESENTA**

**Cynthia Itzel Montes Plascencia**

**Director de Tesis**

**Dra. Claudia Judith Hernández Guerrero**

Zapopan Jalisco,  
Septiembre de 2010



**Universidad de Guadalajara**  
**Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias**  
*Coordinación de Carrera de la Licenciatura en Biología*

UGORD/ BIO 013/2010.

C. Cynthia Itzel Montes Plascencia  
**PRESENTE**

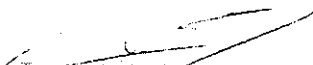
Manifestamos a usted, que con esta fecha, ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de TESIS E INFORMES opción TESIS con el título "Variación estacional de la actividad biológica de extractos orgánicos de la esponja *Aplysina gerardogreemi* del Golfo de California" para obtener la Licenciatura en Biología.


Al mismo tiempo le informamos, que ha sido aceptado como Director de dicho trabajo a la Dra. Claudia Judith Hernández Guerrero y como asesor al M. C. Hedefonso Enciso Padilla.

Sin más por el momento, aprovechamos para enviarle un cordial saludo

**ATENTAMENTE**  
"PIENSA Y TRABAJA"

"2010 Bicentenario de la Independencia y Centenario de la Revolución Mexicana"  
Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal., 01 de Junio del 2010.

  
Dra. Teresa de Jesús Aceves Esquivias  
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

  
M.C. GLORIA PARADA BARRERA  
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

FORMA F

Dra. Teresa de Jesús Aceves Esquivias,  
Presidente del Comité de Titulación  
Licenciatura en Biología  
CUCBA  
Presente

Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad Tesis, opción A con el título: "Variación estacional de la actividad biológica de extractos orgánicos de la esponja *Aplysina gerardooreni* del Golfo de California" que realizó el/la pasante Cynthia Itzel Montes Plascencia con número de código 301332902 consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión

Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

Atentamente  
Lugar y fecha.

Dra. Claudia Judith Hernández Guerrero  
Firma  
Nombre  
Director/a del trabajo.

M.C. Ildelfonso Enciso Padilla  
Firma  
Nombre  
Asesor(es)

Número completo de los Síndicos asignados por el Comité de Titulación

Firma de aprobado

Fecha de aprobación

Dr. Arturo Orozco Barocio

Dr. Alfonso Enrique Islas Rodríguez

Dra. Josefina Casas Solís

Supl. Dr. Ernesto López Uriarte

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 "Bioactividad de metabolitos secundarios derivados de macroalgas y esponjas y su papel ecológico en un arrecife rocoso del Golfo de California". CONACYT 79707, y "Variación temporal de la bioactividad y comunidad microbiana asociada la esponja *Aplysina* spp." SIP20090866 y SIP 20100862.

## **Dedicatoria**

Quisiera dedicar esta tesis a...

A mis padres, porque este trabajo es para ustedes, gracias por haberme soportado y apoyado durante todo este tiempo. Pero principalmente gracias por amarme y confiar en mí como sé que lo hacen, sé que no siempre fue fácil pero a pesar de todo, logramos salir adelante.

A mi hermano Memo, porque siempre me haces reír, me sacas de quicio, me cuidas y aconsejas. Gracias por ser mi amigo también.

A mi unni (hermana mayor) Tita y mi yeodongsaeng (hermana menor) Tete cuyas ocurrencias y apoyo incondicional me levantaron el ánimo y me dieron el valor para continuar.

A mis tías que no las nombro a todas porque son muchas, pero yo sé que ustedes saben que las quiero y están en mis pensamientos. Y a mi demás familia, contando primos, abuelos y sobrinitos.

A mis amigos porque ¿Qué hubiera hecho yo sin ustedes?... gracias por haber soportado mis neuras, por bromear conmigo, por consolarme, darme sus buenos consejos, y bueno, por estar conmigo.

Y a Claudia, gracias por aceptarme como tu tesista, y principalmente por ofrecerme tu apoyo y amistad.

## **Agradecimientos**

Primero y como más importante, quiero agradecer a mi directora de Tesis, la Dra. Claudia Judith Hernández Guerrero, por su orientación, sus conocimientos, su paciencia y su amistad, y con quien me siento en deuda por todo lo recibido desde el inicio de esta tesis.

A mi casa de estudios la Universidad de Guadalajara, más en específico al Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, por haberme brindado la oportunidad de realizar mis estudios de licenciatura. También a mis profesores de la carrera, que de alguna manera forman parte de la persona que soy ahora.

A mi asesor el M.C. Ildelfonso Enciso Padilla, por su enorme paciencia y su asesoramiento.

A la Dra. Bárbara González Acosta por su ayuda en los ensayos de actividad antibacteriana y la M. en C. Ruth Noemi Águila Ramírez, quienes también tuvieron la paciencia y amabilidad de enseñarme tantas cosas durante la parte experimental de esta tesis.

A CICIMAR-IPN, por haberme aceptado para realizar mis prácticas profesionales y poder llevar a cabo la realización de esta tesis.

A la Dra. Claire Hellio y Dra. Janeth Gutierrez Uribe por la ayuda en la realización de las pruebas de actividad antiepiibiotica y citotóxica respectivamente.

*"El agradecimiento es la memoria del corazón."*

Lao-tse

# ÍNDICE

	Pag.
Relación de figuras y tablas.....	I
Resumen.....	II
1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	3
2.1 Estudios químicos realizados en esponjas.....	3
2.2. Estudios químicos realizados en esponjas del género <i>Aplysina</i> .....	3
2.3 Variación estacional de la actividad biológica de productos naturales marinos.....	7
3. Marco teórico.....	10
3.1 Generalidades del grupo Porífera y ubicación taxonómica de <i>Aplysina gerardogreeni</i> .....	10
3.2 Sistema Inmune Innato .....	13
3.3 Metabolismo primario y secundario .....	14
3.4 Productos naturales marinos.....	14
3.5 Bacterias Gram Positivas y Gram Negativas.....	15
3.6 Epibiosis.....	16
4. Planteamiento del problema.....	18
5. Justificación.....	19
6. Hipótesis.....	20
7. Objetivos.....	20
8. Materiales y métodos.....	21
8.1 Recolecta de los ejemplares.....	21
8.2 Obtención de extractos orgánicos.....	21
8.3 Análisis preliminar mediante Cromatografía en Capa Fina (CCF).....	21
8.4 Ensayos de actividad antibacteriana.....	22
8.5 Ensayos de actividad citotóxica.....	23
8.6 Ensayos de asentamientos de organismos incrustantes.....	24
8.6.1 Bioensayo frente a bacterias marinas.....	25

8.6.2 Bioensayo antimicroalgal (microalgas templadas).....	25
9. Resultados.....	27
10. Discusión.....	34
11. Conclusiones.....	39
12. Glosario de términos.....	41
13. Literatura citada.....	45
Apéndice.....	53



## Relación de figuras

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Circulación del agua a través de los canales de una esponja, donde se observa una amplificación de los coanocitos.....	11
<b>Figura 2.</b> Forma en que se colocaron los sensidiscos con el extracto, así como el control positivo y negativo en cada caja de Petri.....	23
<b>Figura 3.</b> Placa de cromatografía en capa fina en la que se muestra el perfil de compuestos de los extractos de las diferentes épocas del año. I= Invierno, P=primavera, V= verano, O= otoño, 1= aerotionina y 2= fistularina-3.....	28
<b>Figura 4.</b> Valores de actividad antibacteriana de los extractos frente a las cepas <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i> en las diferentes épocas del año. Las barras representan el error estándar.....	30
<b>Figura 5.</b> Porcentaje de viabilidad de los extractos de <i>A. Gerardogreeni</i> frente a diferentes líneas de células tumorales.....	31

## Relación de tablas.

	Pág.
<b>Tabla 1.</b> Valores de rendimientos de los diferentes extractos de la Esponja <i>Aplysina Gerardogreeni</i> .....	27
<b>Tabla 2.</b> Valores promedio de los halos de inhibición frente a las cepas <i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i> .....	29
<b>Tabla 3.</b> Actividad inhibitoria in vitro de los extractos de <i>Aplysina</i> frente a diferentes líneas de células tumorales. $IC_{50}$ (mg ml <sup>-1</sup> ).....	32
<b>Tabla 4.</b> Concentración Mínima Inhibitoria (µg ml <sup>-1</sup> ) de los extractos de esponjas frente a cepas de bacterias marinas.....	33
<b>Tabla 5.</b> Concentración Mínima Inhibitoria (µg ml <sup>-1</sup> ) de los extractos de esponjas frente a cepas de microalgas.....	33

## Resumen

Las esponjas del género *Aplysina* producen compuestos bioactivos de importancia farmacológica, que presentan interesantes actividades biológicas, sin embargo, y a pesar de su importancia, es poco lo que se conoce de la variación temporal de su bioactividad, por lo que el objetivo de este trabajo es describir la variación estacional de la actividad antimicrobiana, citotóxica y antiepiibiotica de *Aplysina gerardogreeni* de Punta Arena de la Ventana, Baja California Sur, México, durante un ciclo anual. Las esponjas fueron recolectadas mediante buceo SCUBA en invierno, primavera, verano y otoño de 2008. Se prepararon extractos orgánicos con las esponjas de cada época del año, para las pruebas de actividad antibacteriana se realizaron ensayos frente a cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* utilizando el método de difusión en agar. Para las pruebas de actividad citotóxica se utilizaron diferentes líneas de células tumorales humanas y la actividad antiepiibiotica se realizó frente a cepas de bacterias marinas y de microalgas. Los resultados de las pruebas de actividad antibacteriana muestran que los extractos fueron activos frente a *E. coli* y *S. aureus*, con una evidente variación en su bioactividad dependiendo de la época del año. De manera general los extractos de otoño mostraron la mayor actividad, presentando halos de inhibición de entre 22.4 y 22.6 mm, mientras que la menor actividad frente a las dos cepas se presentó con los extractos de primavera. También se observó actividad citotóxica frente a las líneas de células tumorales de próstata (PC3), hígado (HepG2) y mama (MCF7), inhibiendo en la mayoría de los casos más del 50% de la viabilidad de las células cancerosas y presentando valores de  $IC_{50}$  de entre 0.015 y 0.07  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . En cuanto a la variación estacional de la actividad citotóxica se observó la mayor actividad en los extractos de verano y otoño, sin embargo, los extractos de primavera dan lugar a resultados interesantes ya que inhiben el crecimiento de dos líneas de células tumorales manteniendo una alta viabilidad de la línea de células no transformadas NIH3T3 (67.2%), lo que indica que existe una especificidad hacia las líneas tumorales. Con respecto a la variación estacional de la actividad antiepiibiotica no se observó un patrón general con todas las cepas, así, la mayor actividad frente a *V.*

*aestuarianus* se presentó con los extractos de otoño, frente a *Fragilaria cottonensis* con los extractos de primavera y frente a *Scenedesmus armatus* con los extractos de invierno, con valores MIC de entre 10 a 0.1  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Estos resultados muestran que el estudio químico de estas esponjas tiene gran potencial en la búsqueda de compuestos con actividad farmacológica y antiepibiotica.

**Palabras clave:** esponjas, *Aplysina*, variación estacional, bioactividad.

## 1. INTRODUCCIÓN

La búsqueda de productos naturales de origen marino tiene gran interés debido a la gran biodiversidad que existe en estos ecosistemas y a la capacidad de los organismos marinos para sintetizar metabolitos secundarios bioactivos como mecanismos de defensa química (Pawlik, 1993).

Más de 6000 compuestos bioactivos han sido aislados a partir de recursos marinos, de los cuales una gran proporción han sido obtenidos a partir de las esponjas, por lo que son una de las fuentes más prometedoras de sustancias bioactivas para el desarrollo de nuevos fármacos. La bioactividad de estas sustancias aisladas incluye propiedades antivirales, inmunosupresores, antibacteriales y principalmente citotóxicas (Munro, *et al.*, 1999; Blunt *et al.*, 2006; Sipkema *et al.*, 2005; Nuñez *et al.*, 2008; Azevedo *et al.*, 2008), además de ser un objeto atractivo de estudio para la química de productos naturales, debido a la novedad estructural que muestran y su potencial terapéutico en el tratamiento de enfermedades humanas (Munro *et al.*, 1999; Faulkner, 2002; Müller, 2004; Blunt *et al.*, 2006).

Las esponjas marinas del orden Verongida son un recurso potencial de gran interés biológico y químico, debido a la presencia de metabolitos secundarios derivados de la bromotirosina y clorotirosina (León, 2003).

Dentro de este orden, las esponjas del género *Aplysina* contienen altas concentraciones de metabolitos bromados (hasta el 13% del peso seco) con actividad antimicrobiana, citotóxica frente a líneas celulares humanas y con características antidepredadoras (Sharma y Burkholder, 1967; Kreuter *et al.*, 1990; Weiss *et al.*, 1996; Hentschel *et al.*, 2001 citados en Kazanjian y Fariñas, 2006).

Una de las limitantes en el desarrollo de un producto bioactivo es la cantidad de producto que se obtiene a partir del organismo, que en la mayoría de las ocasiones puede ser del orden de  $10^{-4}$ . Estos metabolitos juegan un papel ecológico en el medio natural ya que son producidos como un mecanismo de defensa, pero por lo mismo representan un costo energético para los organismos, por lo que son sintetizados cuando el organismo está sujeto a condiciones de estrés causado por interacciones con otros organismos o con el medio ambiente,

lo que determina un patrón estacional en la bioactividad (Page *et al.*, 2005; Ferreti *et al.*, 2009; Turon *et al.*, 2009).

La importancia de estudiar la variación estacional de los metabolitos secundarios radica en que la concentración de metabolitos bioactivos de esponjas es variable debido a que las estaciones y sus cambios de temperatura presentan efectos significativos en la concentración de estos metabolitos. Se ha comprobado que compuestos bioactivos muestran una tendencia estacional y una correlación positiva con la temperatura (Koopmans *et al.*, 2009).

Conocer estas variaciones en la naturaleza, ayudaría a resolver el problema de abastecimiento del producto. Diversos metabolitos derivados de la dibromotirosina con interesantes actividades antibacterinas y citotóxicas han sido aislados a partir de *Aplysina gerardogreeni*, sin embargo, es poco lo que se conoce acerca de la variación estacional de su bioactividad, por lo que resulta interesante conocer la actividad antibacteriana que presentan los extractos de *A. gerardogreeni* del arrecife rocoso de Punta Arena y su variación a lo largo de un ciclo anual.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Estudios químicos realizados en esponjas.

El Interés farmacéutico en las esponjas se suscitó a principios del año 1950 por el descubrimiento de dos inusuales nucleósidos de arabinosa, la spongouridina y spongotimidina, a partir de la esponja marina *Cryptotethia Crypta* (Bergmann y Feeney, 1951). Estos nucleósidos fueron la base para la síntesis de Ara-C, el primer agente anti cancerígeno de origen marino, y el fármaco antiviral Ara-A (Proksch *et al.*, 2002). Ara-C se utiliza actualmente en el tratamiento de rutina de los pacientes con leucemia y linfoma.

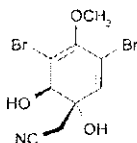
Actualmente diversos compuestos obtenidos de esponjas se encuentran bajo investigación clínica o preclínica avanzada en diferentes áreas terapéuticas (Newman y Cragg, 2004b). A continuación se destacan algunos ejemplos de compuestos con actividad antitumoral y antibacteriana.

A partir de la esponja *Discodermia dissoluta* se aisló una lactona, la discodermolida, la cual presenta una potente actividad inhibitoria *in vitro* de células tumorales. Actualmente se encuentra en fase I de ensayos clínicos en el tratamiento de tumores sólidos (Gunasekera *et al.*, 1990). Otro compuesto es la halichondrina B, un polieter con una potente actividad anticancerígena aislado de la esponja *Halichondria okadai*. Un análogo sintético de este compuesto, el E7389 es un candidato clínico debido a su gran potencia antitumoral (Uemura *et al.*, 1985). En cuanto a compuestos con actividad antibacteriana, a partir de la esponja *Cribochalina* sp. se aisló la cribostatina 3, que presenta una potente actividad en la inhibición del crecimiento de cepas de *Neisseria gonorrhoeae* resistentes a la penicilina (Pettit *et al.*, 2000). Con lo anterior, resulta indudable la importancia que tienen algunos compuestos obtenidos a partir de esponjas que se encuentran en evaluación para completar su desarrollo como nuevos agentes terapéuticos.

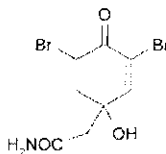
### 2.2 Estudios químicos realizados en esponjas del género *Aplysina*.

En cuanto a las esponjas del género *Aplysina*, estas han sido estudiadas desde el punto de vista químico en la búsqueda de productos naturales con

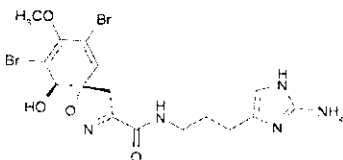
actividad biológica y se han aislado una gran cantidad de compuestos bromados biogenéticamente relacionados con la tirosina. Así, se han obtenido desde monómeros simples como la aeroplysinina-1 (Fattorusso *et al.*, 1970) o la dienona (Ciminiello *et al.*, 1994), con cadenas laterales como la aerophobina-1 (Cimino *et al.*, 1983) o aplysinamisina-1 (Rodríguez y Piña, 1993), hasta compuestos formados por dos restos derivados de la tirosina enlazados a través de una unidad central de naturaleza y extensión variable, como la aerothionina (Fattorusso *et al.*, 1970) la fistularina-3 (Gunasekera y Cross, 1992) y más recientemente la calafianina (Encarnación *et al.*, 2000) y las aplysinonas A-D, de ejemplares de *Aplysina gerardogreani* del Golfo de California (Hernández-Guerrero *et al.*, 2007).



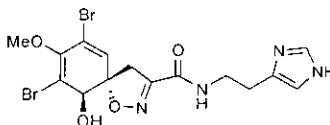
aeroplysinina-1



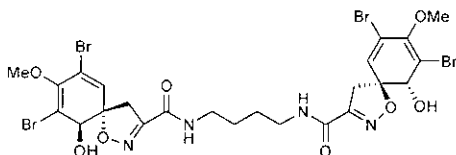
dienona



aplysinamisina-1

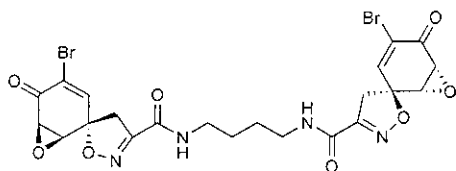
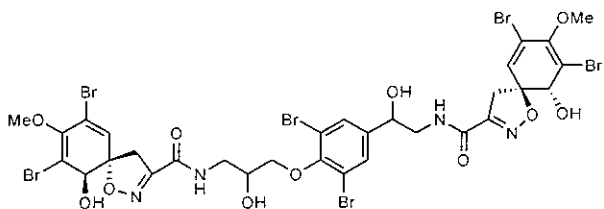


Aerophobina-1



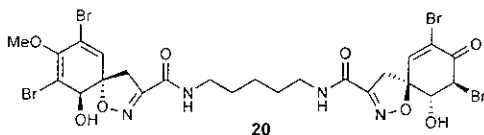
Aerothionina

fistularina-3



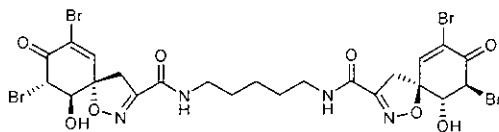
Calafianina

Aplesinona A

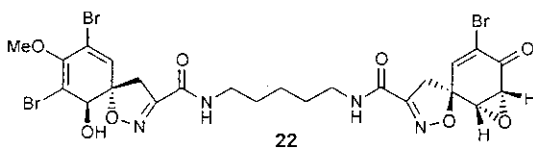


20

Aplesinona B



21

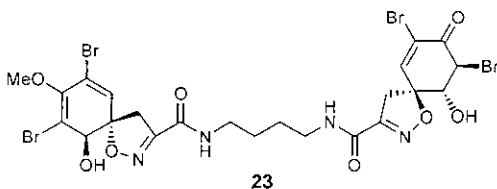


22

Aplesinona C



Aplysinona D



Con respecto a los estudios de actividad biológica, se han realizado trabajos tanto de la actividad de extractos como de productos puros. Extractos de metanol de *A. fulva* inhiben el crecimiento de cepas de bacterias *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa* (Muricy *et al.*, 1993). El extracto de *A. fistularis* fue activo frente a *Sacharomyces cerevisiae* y *Penicillium atroveetu*, algunos de los metabolitos responsables de esta actividad fueron el 2,6-dibromo-, 2-bromo-3-chloro-, 2,6-dichloro- y 4-hidroxi-2,5-ciclohexadienone-4-acetamidas (Goo, 1985), por otra parte el extracto crudo de *A. caissara* de Brasil inhibe el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* con una concentración mínima inhibitoria (MIC) de 400  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , y fue citotóxico frente a la línea cancerígena hepática (HTC) a una concentración de 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  y 2000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Azevedo *et al.*, 2008). También se ha observado actividad antibacteriana en extractos de *Aplysina fistularis* de la isla Espíritu Santo, B.C.S. (Betancourt-Lozano *et al.* 1998). Extractos de *Aplysina* sp. de Brasil (Selegim *et al.*, 2007) y de *Aplysina fistularis insularis* (León, 2003) presentaron actividad frente a diversas líneas de células tumorales. La actividad que presentan estas esponjas en su medio natural la utilizan como una defensa química, así se ha observado que el extracto de metanol de *A. aerophoba* inhibe el crecimiento y fijación de la larva de *Bugula neritina* (Martín y Uriz, 1993), otros estudios más recientes también han observado que los extractos de *A. aerophoba* y *A. cavernicola* presentan actividad disuasoria de alimentación por parte del pez *Blennius sphinx*, al realizar una purificación de dichos extractos se observó que la aerotionina y la aplysinamisina-1 son los responsables de dicha actividad (Thoms *et al.*, 2004).

En cuanto a la actividad biológica de productos puros aislados de esponjas del género *Aplysina*, uno de los primeros trabajos realizados describió la actividad antibacteriana del compuesto aeroplysinina-1 frente a *Staphylococcus albus*, *Bacillus cereus* y *B. Subtilis* (Moody *et al.*, 1972). Otro compuesto con actividad frente a *E. coli*, *S. aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* es la 11-oxoaerotionina con un MIC de 10, 30 y 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente (Compagnone *et al.*, 1999). El compuesto ácido (2-hidroxi--3,5-dibromo-4-metoxifenil) acético fue activo frente a *S. aureus* y *E.coli* (León-Deniz, 2003). También se ha observado actividad antimicobacteriana de la aerotionina frente a la cepa *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv y cuatro de sus variantes resistentes a rifampina, isoniazida, ethambutol y estreptomycin, con un MIC de 12.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  en todos los casos (Encarnación-Dimayuga, 2003), así como de la fistularina-3 y la 11-desoxifistularina-3 que fueron activos frente a la misma cepa de *M. tuberculosis* H37Rv con valores MIC de 7.1 y 7.3  $\mu\text{M}$ , respectivamente (De Oliveira *et al.*, 2006). También se han observado diversos compuestos con actividad antiviral, tal es el caso de la fistularina-3 y 11-cetofistularina-3 que fueron activos frente al virus de la leucemia felina (Gunasekera y Cross, 1992), así como actividad citotóxica de diversos compuestos como la aeroplysinina-1, 11-oxoaerotionina y las aplysinonas A-D frente a diversas líneas de células tumorales (Kondo *et al.*, 1994; Acosta y Rodríguez, 1992; Hernández-Guerrero *et al.*, 2007). El compuesto aeroplysinina-1, además de mostrar actividad citotóxica y antiprotozoaria (Gutiérrez *et al.*, 2005) ha mostrado actividad antiepiibiótica (Kelly *et al.*, 2003), otro compuesto con este tipo de actividad es la psammaplisina A (Ortlepp *et al.*, 2007).

### **2.3 Variación estacional de la actividad biológica de productos naturales marinos.**

En el medio natural los productos naturales o metabolitos secundarios juegan un papel ecológico importante, ya que son producidos como un mecanismo de defensa ante presiones de competencia, depredación o colonización (Pawlik, 1993; Bakus *et al.*, 1986). Sin embargo, la síntesis de estos compuestos representa un gasto energético para el organismo por lo que estos se sintetizan en

mayor medida ante situaciones de estrés, provocadas por interacciones con otros organismos o con el medioambiente (Fagerström *et al.*, 1987) lo que puede permitir el desarrollo de un patrón estacional en la bioactividad (Turon *et al.*, 1996; Page *et al.*, 2005; Ferreti *et al.*, 2009; Turon *et al.*, 2009).

La variabilidad en la producción de metabolitos secundarios en las esponjas se ha documentado a nivel inter e intra específicos (Turon *et al.*, 2009). Factores genéticos, biológicos y ambientales pueden influir en esta variación. Aunque el componente genético en la variación de dicha producción aún no ha sido estudiado en gran medida, sólo los factores ambientales (luz, disponibilidad de nutrientes, contaminantes) y presiones bióticas (competencia por espacio, epibiosis o depredación) a las que están expuestas las esponjas han sido consideradas hasta la fecha.

Así, estudios de ecología química en esponjas indican que los metabolitos bioactivos pueden variar entre las diferentes estaciones del año dependiendo no sólo de las características ambientales sino también de las interacciones con otros organismos (Turon *et al.*, 1996; Page *et al.*, 2005), pero esta relación va a depender de los factores específicos de cada localidad. Así tenemos ejemplos de esponjas del género *Agelas*, *Petrosia*, *Latrunculia*, *sp. nov.* y *Polimastia croceus* que mostraron la mayor actividad citotóxica durante periodos fríos (Ferretti *et al.*, 2009; Duckworth y Batershill, 2001). Por el contrario, otras especies presentan mayor bioactividad en meses más cálidos como *A. fistularis* de la isla Espíritu Santo, que mostró la mayor bioactividad en el mes de mayo (Betancourt-Lozano *et al.*, 1998) y *Crambe crambre* durante finales de verano y otoño (Turon *et al.*, 1996). A pesar de estas variaciones, una cuestión en común, es que la mayor bioactividad se presenta como resultado de un aumento en el número de organismos asociados, ya sean competidores u organismos que utilizan a la esponja para asentarse y fijarse (Turon *et al.*, 2009; Duckworth y Batershill, 2001; Betancourt-Lozano *et al.*, 1998).

Otros estudios realizados en comunidades bentónicas de dos cuevas mediterráneas, en el archipiélago de Cabrera e Isla de Medes, señalan que esponjas de las mismas especies presentan variaciones estacionales muy

marcadas respecto a su toxicidad, siendo las de la cueva de Cabrera más tóxicas en noviembre y las de la Isla Medes en julio. Esto se atribuye a una de las teorías de la variación en la producción de las defensas químicas que postula que en los hábitats más oligotróficos (en éste caso, Cabrera), las especies crecen más lentamente y destinan parte de la energía a producir metabolitos secundarios de defensa contra posibles depredadores y/o competidores (Martí, 2001).

Estudios con la esponja Micronesia *Oceanapia sp.* indicaron que la producción de los metabolitos secundarios está ligada a la necesidad de la esponja a defenderse frente a su depredador, distribuyendo las mayores concentraciones de metabolitos en las partes más visibles (Schupp *et al.* 1999). En contraparte, otros estudios con las esponjas *Xestospongia muta* y *Chondrilla nucula* no encontraron evidencia que determine mayor concentración de compuestos en las partes expuestas de la esponja (Chanas y Pawlik 1995; Swearingen y Pawlik 1998).

Son pocos los estudios en los que se ha tratado de relacionar la profundidad con la actividad biológica, pero muestran que al igual que entre las diferentes épocas del año, se presentan variaciones dependiendo de las características de la zona de estudio. Así en estudios realizados con la esponja *Mycale hentscheli*, se observó que la presencia del compuesto bioactivo peloruside A, mostraba variaciones con respecto a la profundidad, en ejemplares recolectados hasta 4 m de profundidad no se encontró el producto, mientras que el 55% de las esponjas recolectadas entre 8 y 10 m, sí contenían el compuesto, los autores llegan a la conclusión que aún cuando la relación es compleja, la profundidad es un factor importante (Page *et al.*, 2005).

En colonias de la esponja *Xestospongia muta*, los ejemplares que habitan en zonas profundas presentan altos niveles de agentes químicos disuasivos, lo cual tiene relación con diferencias en los niveles de depredación en diferentes profundidades (Chanas y Pawlick, 1995). En contraparte, en *Rhopaloides odorabile* se han detectado mayores concentraciones de diterpenos en ejemplares que habitan zonas someras con mayor iluminación, donde pueden impedir el asentamiento de macroalgas en su superficie (Thompson *et al.*, 1987).

### 3. MARCO TEÓRICO.

Los invertebrados marinos constituyen un grupo de organismos en los que se ha encontrado una fuente importante de sustancias bioactivas, las cuales en muchos casos se producen como un mecanismo de defensa y cuyas propiedades biológicas van desde la antibacteriana, antifúngica, antiviral, antiinflamatoria y anticoagulante, hasta su utilización como pinturas que eviten el establecimiento de organismos marinos sobre estructuras sumergidas (Kazanjian y Fariñas, 2006).

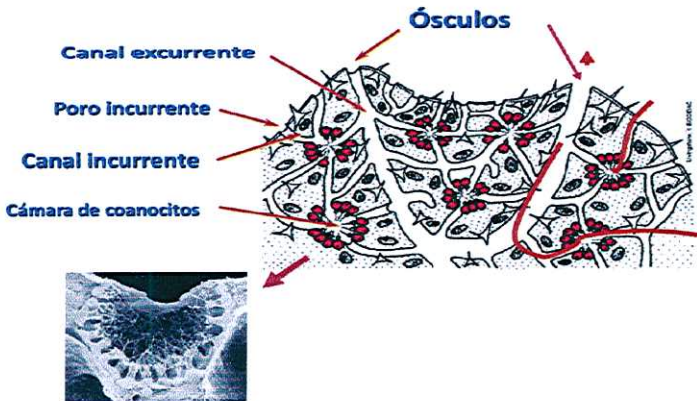
Con el avance de la tecnología, la búsqueda de nuevas drogas y el descubrimiento de nuevas fuentes para el aislamiento de compuestos bioactivos se ha visto significativamente influenciados por la química combinatoria, genómica, programas de selección y la biología entre otros (Andersen y Faulkner, 1972; Encarnación y Keer, 1992; Shu, 1998). Cerca del 60% de las drogas prescritas tienen su origen a partir de productos naturales, incluyendo a los derivados semisintéticos y análogos sintéticos, la gran ventaja de utilizar productos naturales como fuente para el descubrimiento de drogas, es la gran diversidad estructural de estos compuestos cuando son comparados con otras fuentes en uso (Cragg *et al.*, 1997; Newman y Cragg, 2004a).

Las esponjas marinas son los animales sésiles y pluricelulares más primitivos y se encuentran expuestas con frecuencia a depredadores y/o microorganismos que infectan su tejido fino (Newbold *et al.*, 1999, Faulkner *et al.*, 2000, Kazanjian y Fariñas, 2006). Protegidos por un sistema inmune altamente complejo, han existido durante millones de años; periodo de tiempo en el cual, las bacterias asociadas a las esponjas, adquirieron en común un metabolismo complejo, por lo que algunos de los compuestos bioactivos son producidos por enzimas provenientes de la esponja y/o de sus microorganismos asociados (Muller *et al.*, 2004, Kazanjian y Fariñas 2006).

#### 3.1 Generalidades del grupo Porifera y ubicación taxonómica de *Aplysina gerardogreeni*.

Las esponjas son metazoos sencillos, primitivos y sésiles, que se alimentan por filtración. El cuerpo de estos animales está formado por diversas capas de

células epiteliales, no presentan órganos verdaderos, vasos sanguíneos ni sistema nervioso (Meglisch y Schram, 1991). Disponen de una circulación continua de agua a través del cuerpo, que pasa a través de numerosos ostiolos que se encuentran en su superficie, posteriormente el agua incurre en el sistema de canales y pasa a las cámaras de los coanocitos, que al mismo tiempo producen la corriente de agua por movimiento flagelar para posteriormente llegar a la salida del canal, que termina en el ósculo (Fig. 1) (Pfannkuchen *et al.*, 2008). La captación de alimento se realiza por endocitosis siendo filtradores activos que por su capacidad detritica revisten gran importancia dentro del ecosistema marino. La reproducción puede ser tanto sexual como asexual, la primera tiene lugar por medio de diversas formas larvianas y la segunda por gemación.



**Figura 1.** Circulación del agua a través de los canales de una esponja, donde se observa una amplificación de los coanocitos (Tomada de Meglisch y Schram, 1991)

El esqueleto de casi todas las esponjas está integrado por espículas de carbonato de calcio, sílice o fibras de espongina de naturaleza proteica. No obstante, hay casos singulares en los que no existe un esqueleto y el organismo se sostiene debido a la presencia de fibras de colágeno. La forma y disposición de las espículas se utiliza como carácter taxonómico en la clasificación de este grupo, el cual se divide en tres clases (Ruppert y Barnes, 2003):

a) **Clase Calcárea.** Esponjas con un esqueleto compuesto por espículas calcáreas poco diferenciadas que tienen el mismo tamaño general y son monoaxónicas, triaxónicas o tetraxónicas; por lo general están separadas unas de otras. No tienen fibras de espongina, en esta clase se presentan los tres grados de estructura: ascon, sicon y leucon. Exclusivamente marinas, preferentemente de zonas poco profundas.

b) **Clase Demospongiae.** Esta clase contiene el 90% de las esponjas e incluye las formas más conocidas. Su distribución se extiende desde las aguas someras hasta las grandes profundidades. El esqueleto de estas esponjas es variable, puede constar de espículas silíceas o de fibras de espongina o de una combinación de ambas. Las esponjas de esta clase son leuconoides y en su mayoría irregulares, pero exhiben gran variedad de formas de crecimiento.

c) **Clase Hexactinellida.** Esponjas cuyas espículas son triaxónicas con seis puntas, algunas espículas se fusionan entre sí para formar un esqueleto de tipo celosía y constan de largas fibras silíceas. Son las esponjas más simétricas e individualizadas; tienden poco a formar racimos interconectados o grandes masas con muchos ósculos. Parecen superficialmente de estructura siconoide; la mayor parte vive en profundidades que van desde los 200 a los 1000 m.

Las esponjas son importantes miembros del ecosistema marino y en particular las esponjas de la familia *Aplysinidae* son abundantes en aguas tropicales y subtropicales del mar Mediterráneo y en los océanos Pacífico y Atlántico. La clasificación taxonómica de las esponjas del género *Aplysina* se muestra a continuación:

Phyllum: Porifera

Clase: Demospongia

Subclase: Ceranctinomorpha

Orden: Verongida (Bergquist, 1978)

Familia: Aplysinidae (Carter, 1875)

Género: *Aplysina* (Nardo, 1813)

***Aplysina gerardogreeni*** (Gomez y Bakus, 1992)

### 3.2 Sistema Inmune Innato.

Todos los organismos, ya sean unicelulares o pluricelulares, y más o menos complejos, tienen mecanismos para defenderse de posibles ataques de patógenos y de invasiones externas. El primer mecanismo de defensa, y el más efectivo, es el impedir la entrada de los patógenos gracias al desarrollo de barreras físicas y/o químicas. Este tipo de barreras se encuentran en todos los seres vivos, con características peculiares dependiendo de qué organismo se trate.

Junto a estas barreras, los animales, tanto invertebrados como vertebrados, presentan un segundo nivel de complejidad, presentando ya un sistema inmunitario encargado de la defensa. En el caso de los invertebrados, éstos poseen únicamente un *Sistema Inmune Innato*, donde participan componentes celulares (células con capacidad fagocítica), y componentes solubles o humorales (González, 1997).

El sistema innato tiene un origen evolutivo temprano (está presente en los organismos más sencillos como las esponjas marinas), su función es inmediata ante un reto determinado y se basa en el reconocimiento de firmas moleculares (Santana-Calderón y Sánchez-Espinel, 2007).

Este sistema inmunitario es de acción inmediata y con mecanismos de reconocimiento del patógeno *inespecíficos*, llevando a cabo respuestas tales como fagocitosis, activación de la coagulación, formación de nódulos, encapsulación de patógenos, aglutinación y opsonización (González, 1997).



### **3.3 Metabolismo primario y secundario.**

El metabolismo primario compromete todos aquellos procesos químicos que el organismo debe llevar a cabo para lograr sus funciones metabólicas básicas y por lo tanto los metabolitos primarios se caracterizan por ser compuestos esenciales de las rutas metabólicas, como son lípidos, carbohidratos, proteínas, ácidos nucleicos, etc. Estos compuestos se clasifican atendiendo a diferentes criterios, cumplen funciones muy diversas en los seres vivos y tienen diferentes capacidades como materiales de partida (precursores) para los metabolitos secundarios. Por otra parte los metabolitos secundarios también llamados productos naturales, son, en principio, no esenciales para la vida pero contribuyen definitivamente a la adaptación de las especies y su supervivencia, ya que son utilizados como un mecanismo de defensa química. Son característicos para un grupo biológico particular, tal como una familia o un género, y aparentemente, la maquinaria sintética puesta en juego aquí está relacionada con la evolución de las especies. Por lo que el patrón específico de constituyentes en las especies ha sido usado para la determinación sistemática. Este campo de investigación, llamado sistemática bioquímica o quimiotaxonomía, ha tenido un interés creciente durante las últimas décadas. Por otra parte el campo que se dedica a la estructura y propiedades de estos compuestos es la química de productos naturales (Dewick, 2002).

### **3.4 Productos naturales marinos.**

El estudio de los productos naturales marinos inicio en la década de los 70's y desde entonces se cuenta con una gran cantidad de investigaciones en el área (Faulkner, 2000). El interés por el estudio de los productos naturales de origen marino se debe por un lado a la gran biodiversidad que existe en los ecosistemas marinos que cubren aproximadamente el 70% de la superficie del planeta, así como a la gran capacidad de los organismos marinos para sintetizar estos compuestos como un mecanismo de defensa (Pawlik, 1993), dando lugar a nuevas y novedosas estructuras químicas, actividades biológicas más potentes y diferentes mecanismos de acción frente a enfermedades. Estos trabajos han

mostrado el potencial que tienen los organismos marinos y en particular las esponjas, para el descubrimiento de nuevos fármacos. Por lo que en los últimos años se han incrementado los estudios en la búsqueda de compuestos con actividad biológica (Blunt *et al.*, 2006).

### 3.5 Bacterias Gram Positivas y Gram negativas.

Un sistema de clasificación de las bacterias utiliza las diferencias en la composición de su pared celular. El empleo de una técnica llamada tinción de Gram pone de relieve estas diferencias identificando las bacterias como Gram positivas y Gram negativas. Las Bacterias Gram positivas son aquellas que se tiñen de azul oscuro o violeta por la tinción de Gram. Esta característica está ligada a la estructura de la envoltura celular por lo que refleja un tipo natural de organización bacteriana. Entre las características de las bacterias Gram positivas es que presentan una membrana citoplasmática, capa gruesa de peptidoglicano, ácidos teicoicos y lipoteicoicos que sirven como agentes quelantes y en ciertos tipos de adherencia.

Las Bacterias Gram negativas tras la tinción liberan el tinte y se tiñen de color rosado, esta característica al igual que con las Gram positivas está ligada a la estructura de la envoltura celular, reflejando también un tipo natural de organización bacteriana. Entre sus características la envoltura celular está compuesta por una membrana citoplasmática (membrana interna), una pared celular delgada de peptidoglicano, que rodea a la anterior, y una membrana externa que recubre la pared celular de estas bacterias. Entre la membrana citoplasmática interna y la membrana externa se localiza el espacio periplásmico relleno de una sustancia denominada periplasma, la cual contiene enzimas importantes para la nutrición en estas bacterias (Harvey, 2008).

*Escherichia coli*, forma parte de la familia Enterobacteriaceae, se encuentra generalmente en el intestino de animales y humanos así como en aguas negras (Ewing, 1985). La morfología de esta bacteria muestra que es un bacilo corto, no esporulado, se tiñe de color rosado en la Tinción de Gram (Gram negativo). Móvil, se mueve por medio de flagelos peritricos que rodean su cuerpo. Es fermentadora

de lactosa, glucosa y sacarosa y produce vitamina K y B. Puede presentar plásmido o sobrevivir sin él. Es versátil y se adapta muy bien a su ambiente. Es anaerobio facultativo que crece a un pH óptimo (6.0-7.0) y a una temperatura de 37°C. Un requisito de esta bacteria es que crece en medios con glucosa.

*Staphylococcus aureus* forma parte de la familia Micrococcaceae, es biota habitual de nasofaringe, región perineal y piel; puede colonizar diversas superficies epiteliales y mucosas. Es una bacteria inmóvil, Gram positiva, esférica y usualmente agrupada en racimos, anaerobia facultativa, catalasa positiva. El crecimiento de esta bacteria ocurre en un amplio rango de temperatura 6.5 a 50°C, siendo el óptimo 30 - 40°C.

### 3.6 Epibiosis.

La epibiosis es la acumulación de material particulado, microorganismos, plantas y animales sobre superficies sumergidas en un medio acuoso. La epibiosis obedece a la necesidad que tienen muchos organismos de asentarse sobre una superficie como parte de su ciclo de vida, y si bien se da naturalmente, y en muchos casos es deseable, se ha convertido en un problema para la industria naval y petrolera principalmente, ya que las embarcaciones, plataformas y demás estructuras sumergidas se van deteriorando de manera gradual, requiriendo extensos, complejos y costosos procesos de limpieza. Para disminuir el asentamiento de organismos sobre superficies sumergidas se han venido utilizando recubrimientos de variada naturaleza, complementados con la acción de biocidas, tales como el tributilestaño y algunos derivados de cobre, que si bien disminuyen la epibiosis, también generan grandes problemas ambientales debido a su toxicidad y bioacumulación, por lo que su uso está regulado y en algunos casos prohibido (Cuadrado *et al.*, 2009).

En la actualidad se están estudiando nuevas alternativas a los biocidas tradicionales, de los cuales se espera que no generen impactos negativos en el medio ambiente. Un ejemplo de ello es el uso de productos naturales marinos, provenientes de plantas e invertebrados que mantienen de manera natural su superficie limpia de epibiontes. El hecho de mantener su superficie limpia, a pesar

de estar inmersos en el medio marino donde el régimen de epibiosis es intenso, podría indicar que estos organismos poseen mecanismos de control de este proceso, uno de los cuales puede ser la producción de compuestos con actividad antiepibiótica (Cuadrado *et al.*, 2009).

Diferentes estudios de las propiedades químicas de diferentes géneros de esponjas han demostrado tener una probada actividad antiepibiótica. El estudio realizado con tres esponjas del género *Ircinia* (*I. variabilis*, *I. oros* e *I. spinosula*) mostro una actividad antiepibiótica variable frente a diferentes especies de macroalgas (*Enteromorpha intestinalis*, *Ulva lactuca* y *Sargassum muticum*) teniendo resultados de hasta el 60% de inhibición en algunos casos (Tsoukatou *et al.*, 2001). En este estudio también sometió a las esponjas a pruebas de asentamiento de diatomeas (*A. coffeaformis* *P. tricornutum* *C. closterium*), presentando una actividad antiepibiótica menor a la que se tuvo con las macroalgas. Las esponjas *Cribrachalina infundibulum* y *Biemna cribaria* se probaron frente a diferentes epibiontes (ascidias, poliquetos, hidroides, esponjas, clorofíceas y briozoos) presentando un disminución significativa en la cobertura de los epibiontes pero no en su totalidad, la esponja *Biemna cribaria* tuvo un menor rendimiento antiepibiótico frente a inhibición de macroalgas (Arias *et al.* 2006). Esponjas del género *Haliclona* han demostrado tener componentes que presentan una buena inhibición en el crecimiento de algunas algas, principalmente *Ulva conglobata* y en el crecimiento de *Mytilus edulis* (Limna Mol *et al.*, 2009).

#### 4 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

A partir de las esponjas del género *Aplysina* se han aislado una gran cantidad de metabolitos secundarios con interesantes actividades antibacterianas y citotóxicas, por lo que se han realizado diversos trabajos de aislamiento, identificación y evaluación de la actividad biológica de estos compuestos bromados, pero poco se ha estudiado acerca de las variaciones temporales de esta bioactividad. Se sabe que la bioactividad presenta variaciones dependiendo de la época del año y también de la localidad, y en este sentido *Aplysina gerardogreeni* del arrecife rocoso de Punta Arena no han sido estudiada. Por otra parte, uno de los principales factores que limitan el desarrollo de un compuesto con potencial terapéutico, es el suministro del producto natural, ya que el orden de magnitud en que se obtienen los productos naturales marinos suelen ser del orden de miligramos del peso húmedo del organismo y en muchos casos no se cuenta con cantidad suficiente para hacer los estudios de ensayos de actividad biológica. Por lo que resulta interesante conocer la actividad biológica que presentan los extractos de *Aplysina gerardogreeni* del arrecife rocoso de Punta Arena y su variación a lo largo de un ciclo anual.

Lo que dio lugar a varias preguntas: ¿los extractos de *Aplysina gerardogreeni* de Punta Arena son bioactivos frente a bacterias patógenas, líneas de células tumorales y organismos epibiontes?, ¿éstas sustancias activas se producen durante todo el año?, ¿existen épocas del año donde la actividad biológica es mayor?

## 5 JUSTIFICACIÓN.

En México, las enfermedades de tipo cancerígeno provocan un 12.7% de mortalidad general en la población (Covarrubias-Gómez, 2008). A nivel mundial se ha observado un aumento de pacientes con esta enfermedad, así en el año 2000 se registraron 10 millones de nuevos casos (Parkin, 2001). Las enfermedades de tipo bacteriano también presentan un problema de salud pública en México, debido al fenómeno de resistencia por parte de todos los patógenos bacterianos (McMichael, 2000), lo que ha ocasionado un alto índice de venta de medicamentos antibacterianos que representan un mercado anual de 960 millones de dólares (Dreser *et al.*, 2008).

Por otra parte en la industria naviera, los epibiontes que se pegan sobre embarcaciones causan serios problemas económicos, por lo que la búsqueda de productos naturales con actividad antiepibiótica tiene un notable interés como una alternativa limpia a los métodos tradicionales (cobre, tributilestaño) que generan severas consecuencias de contaminación, afectando el entorno marino y en algunas ocasiones causando enfermedades en humanos (Arias *et al.* 2006).

Por lo que en la actualidad existe una evidente necesidad de encontrar nuevos compuestos que puedan ser utilizados con fines farmacológicos o industriales, y en este sentido los productos naturales de origen marino son una fuente de nuevas moléculas con interesantes actividades biológicas.

Las esponjas del género *Aplysina* son elementos importantes en las comunidades bentónicas de ambientes arrecifales y a partir de ellas se han obtenido metabolitos secundarios con diversas actividades, como son la antibacteriana, citotóxica y antiepibiótica. Por lo que el estudio de ejemplares de *A. gerardogreeni* del área de Punta Arena de la Ventana para evaluar su bioactividad resulta interesante, con la finalidad de identificar si son susceptibles de un estudio químico más detallado, para la búsqueda de compuestos que puedan ser utilizados como agentes farmacológicos. Por otro lado, también es importante conocer como varía de manera estacional la bioactividad en el medio natural, con la finalidad de aprovechar el recurso de una manera sostenible.

## 6. HIPÓTESIS.

Los extractos orgánicos de las esponjas *Aplysina gerardogreeni* de Punta Arena de la Ventana presentan una evidente actividad biológica y esta actividad será modificada dependiendo de la época del año.

## 7. OBJETIVOS.

### General.

Determinar la variación estacional de la actividad biológica de extractos orgánicos de la esponja *Aplysina gerardogreeni* de un arrecife rocoso del Golfo de California.

### Particulares.

1. Evaluar la actividad antibacteriana de los extractos orgánicos de *A. gerardogreeni* frente a cepas de bacterias patógenas para el hombre.
2. Evaluar la actividad citotóxica de los extractos frente a diferentes líneas de células tumorales.
3. Evaluar la actividad antiepibiótica de los extractos frente a cepas de bacterias marinas y microalgas.
4. Analizar la variación de la actividad en las diferentes épocas del año.

## **8. MATERIALES Y MÉTODOS.**

### **8.1 Recolecta de los ejemplares**

Las esponjas fueron recolectadas a mano mediante buceo SCUBA en el arrecife rocoso de Punta Arena de la Ventana, Baja California Sur, México (24° 02' LN y 109° 49' LW) a tres profundidades, 2, 4 y 6 m, en invierno (enero), primavera (marzo), verano (finales de junio) y otoño (noviembre) de 2008. Adicionalmente se registraron datos de temperatura *in situ* con un HOBO en verano y otoño. Para invierno y primavera los datos de temperatura se obtuvieron de la base de la NOAA (<http://www.pfeg.noaa.gov/>). Los ejemplares recolectados se colocaron en bolsas plásticas de cierre hermético, se marcaron con fecha, localidad y profundidad de recolecta. Una porción de la muestra se preservó para su posterior identificación taxonómica por parte del personal del laboratorio de Ecología del Bentos del ICMYL a cargo del Dr. José Luis Carballo, para lo cual el material se fijó en formol al 4% durante 48 hrs y posteriormente se preservó en alcohol al 70%. El resto del material se congeló para su posterior extracción.

### **8.2 Obtención de extractos orgánicos.**

Los organismos frescos se pesaron y cortaron en pequeños trozos. La extracción se realizó con una mezcla de Acetona/Metanol 1:1 a temperatura ambiente, la cantidad de disolvente utilizado dependió del peso húmedo de la esponja, para lo cual el tejido se maceró y trituró con ayuda de un mortero, la disolución resultante se filtró y el disolvente se evaporó a presión reducida en un Rotoevaporador. Una vez obtenido cada uno de los extractos para las diferentes épocas del año, se pesaron y anotaron sus características como color y aspecto.

### **8.3 Análisis preliminar mediante cromatografía en capa fina (CCF).**

Los diferentes extractos fueron sometidos a un análisis de CCF, colocándose pequeñas muestras de los extractos con ayuda de un capilar en placas de aluminio recubiertas con sílica gel que son recortadas en láminas de 7 x 4 cm. En cada lámina se colocan los extractos correspondientes a las épocas del año.



Posteriormente las placas fueron eluidas con una mezcla de Cloroformo/Metanol de diferente polaridad 9:1, 8:2 y 7:3. La placa fue revelada con ninhidrina o ácido sulfúrico, finalmente se sometieron a calor con ayuda de un secador para visualizar la mancha del producto y posteriormente obtener el factor de retención de los diferentes compuestos presentes en el extracto.

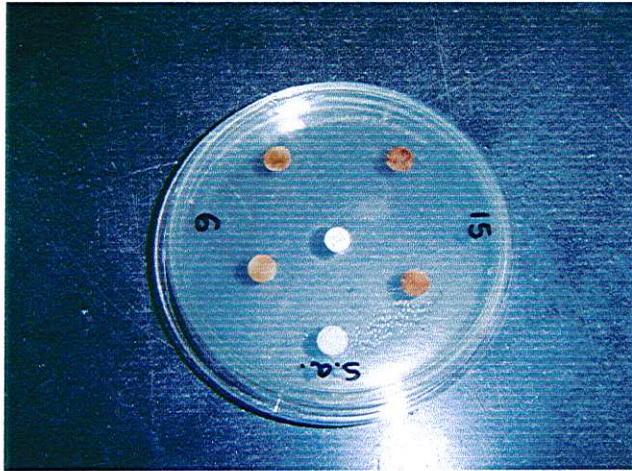
También se realizó un análisis comparativo de CCF de cada uno de los extractos con dos compuestos conocidos de la esponja *Aplysina gerardogreeni*, aerothionina y fistularina 3 aislados en trabajos previos, para determinar la presencia de estos compuestos en los extractos.

#### **8.4 Ensayos de actividad antibacteriana.**

Se utilizaron cepas de bacterias patógenas para el hombre (*Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*). Las cepas se mantuvieron en medio inclinado Agar Soya Trypticasa (TSA) y en refrigeración (4°C), con resiembras cada tres meses. Al inicio de la serie de los bioensayos, se preparó un pre-inoculo en un medio solido de TSA sin sal de cada cepa y se incubó por 24 h a 35°C. Por otro lado se prepararon tubos de ensayo con 10 ml de agar Müller Hinton y se esterilizaron 15 minutos a 15 lb (121°C). Posteriormente se vaciaron en cajas de petri de 10 cm de diámetro. Se preparó una suspensión celular con cada una de las cepas y se ajustaron a una dilución de  $1 \times 10^8$  cel mL<sup>-1</sup>, se inocularon las cajas de petri con 0.1 mL de la suspensión y se procedió a esparcir con un hisopo estéril. Para la preparación de los sensidiscos, 25 µL de los extractos de las esponjas previamente disueltos a una concentración de 80 mg mL<sup>-1</sup> se colocaron sobre los discos de papel (6 mm de diámetro) en condiciones estériles. También se prepararon discos con 25 µL de disolvente, como control negativo y como control positivo se utilizaron discos de tetraciclina a una concentración de 30 µg. Las cajas de Petri con los sensidiscos (Fig. 2) se colocaron en el refrigerador durante 40 min, con el fin de retardar el crecimiento microbiano mientras la sustancia antibiótica se difunde sobre el medio.

Posteriormente, las cajas de Petri se incubaron a una temperatura de 35°C y se registraron los resultados encontrados a las 24 h. Se midieron los diámetros de

los halos de inhibición (en mm). Los ensayos se realizaron con cuatro replicas cada uno. En los casos en que se presentaron halos con formas elípticas, se registraron dos medidas para cada uno, diámetro mayor y diámetro menor, y se calculó la media.



**Figura 2.** Forma en que se colocaron los sensibilizados con el extracto, así como el control positivo y negativo en cada caja de Petri.

### **Análisis de la variación estacional de la bioactividad.**

Los datos obtenidos presentaron una distribución normal de acuerdo a la prueba de Kolmogorov y Smirnov ( $p=0.020$ ). Por lo que para comparar las diferencias en la actividad entre épocas del año y profundidad se realizó un análisis de varianza (Sokal y Rohlf, 1981). Los factores a utilizar fueron el tiempo (fijo) y el tamaño del halo de inhibición (valor).

### **8.5 Ensayos de actividad citotóxica.**

Los ensayos de actividad citotóxica se realizaron en la unidad de Biotecnología del Instituto Tecnológico de Estudios Superiores (ITESM- Campus Monterrey), a cargo de la Dra. Janet Gutiérrez Uribe.

La evaluación de la citotoxicidad de los extractos se realizó frente a las líneas celulares de cáncer de próstata (PC3), cáncer de hígado (HepG2) y cáncer de mama (MCF7). Así como frente a una línea de células no transformadas (NIH3T3) obtenida a partir de embriones de ratón de la cepa NIH, para evaluar el grado de selectividad frente a células tumorales.

Las células se prepararon en suspensión de acuerdo a un procedimiento estándar. Se siembran en placas de 96 pozos utilizando medio con 10% de Suero Bovino Fetal (SBF), a una concentración de  $5 \times 10^4$  células  $\text{mL}^{-1}$ . Se incuban por 24 horas en una cámara humidificada a  $37^\circ\text{C}$  y con 5% de  $\text{CO}_2$ .

Para realizar el ensayo, los extractos fueron disueltos 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 sea mayor a 0.5% (v/v). Para los ensayos de viabilidad celular se colocaron 100  $\mu\text{L}$  del extracto a una concentración de  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  en cada pozo. En los ensayos para determinar el valor de  $\text{IC}_{50}$  se agregaron 100  $\mu\text{L}$  del extracto a concentraciones de 0.02, 0.015, 0.01, 0.005 y 0.0025  $\text{mg mL}^{-1}$  en los diferentes pozos. Se utilizaron como control positivo: 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 en condiciones de humedad controlada con 5% de  $\text{CO}_2$  y  $37^\circ\text{C}$ . Posterior a las 48 horas se les agregaron 20  $\mu\text{L}$  de una solución de cell Titer a cada uno de los 96 pozos y se registraron lecturas de absorbancia a 490 nm, utilizando un lector de microplacas con un protocolo creado para el equipo. A los datos obtenidos se les restó el efecto de los controles de color y para obtener el  $\text{IC}_{50}$  se realizó una ecuación de regresión con los datos.

### **8.6 Ensayos de asentamiento de organismos incrustantes.**

Los ensayos se realizaron en el laboratorio de Biología experimental de la Universidad de Portsmouth, Reino Unido, a cargo de la Dra. Claire Hellio. Para el procesamiento de estas muestras se realizaron dos bioensayos.

### 8.6.1 Bioensayo frente a bacterias marinas.

Estas pruebas de actividad inhibitoria se realizaron frente a tres cepas de bacterias marinas obtenidas de la colección de la Universidad de Portsmouth:

*Polaribacter irgensii* (ATCC 700398) bacteria marina Gram negativa, pertenece a la familia Flavobacteriaceae. Es una bacteria fuertemente implicada en la formación de biofilms, por lo que se le utiliza como un modelo en los estudios de propiedades antiepibióticas.

*Pseudoalteromonas elyakovii* (ATCC 700519) bacteria marina Gram negativa, fuertemente implicada en la formación de biofilms.

*Vibrio aestuarianus* (ATCC 35048) bacteria Gram negativa, las bacterias del género vibrio son dominantes en los ecosistemas marinos y un gran número de ellas están implicadas en la infección de animales marinos.

Se efectuaron seis réplicas de cada tratamiento y del control (agua marina). Los extractos (a concentraciones de 0.1, 1, 10 y 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) se incubaron con las bacterias ( $2 \times 10^8$  cel  $\text{mL}^{-1}$ ) en placas de 96 pozos (VWR) en medio LB (Luria Hinton Broth), complementado con NaCl (35 g  $\text{L}^{-1}$ ), a 30°C por 72 horas.

Las cepas bacterianas se mantuvieron en placas con agar LB con NaCl (35 g  $\text{L}^{-1}$ ). Se determinaron las concentraciones mínimas inhibitorias comparando las de las placas control y las que contenían el extracto de algas por el método de dilución de caldo por microtitulación (Amsterdam, 1996).

### 8.6.2 Bioensayo antimicroalgal (microalgas templadas)

También se evaluó la actividad de los extractos frente a las siguientes cepas de microalgas de la colección de la Universidad de Portsmouth:

***Fragilaria crotonensis* 029/20.** Componente importante de los florecimientos algales de primavera.

***Cosmarium* sp. Ac153.** Pertenece a la familia de las Desmidiáceas, forman parte del plancton, tienen forma variable y translúcida con cloroplastos bien definidos. Implicadas en el fenómeno de biofouling.

***Scenedesmus armatus.*** Perteneciente a La familia Scenedesmaceae. Esta microalga está implicada en el fenómeno de bioluminiscencia y biofouling.

Los cultivos de las microalgas y los bioensayos se realizaron bajo condiciones controladas en un cuarto con temperatura constante 18°C. La iluminación fue de 15:9 luz:oscuridad (54 mmol fotones m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> luz blanca fluorescente). Las cepas se mantuvieron en placas con agar (F2, agar 12.5%). El mismo medio F2 fue usado también durante el cultivo. Todos los experimentos se realizaron con 6 réplicas. Para ello, se introdujeron 100 µL del cultivo que contenía 0.4 mg mL<sup>-1</sup> de clorofila en placas de 96 pocillos con los extractos (a concentraciones de 0.1, 1, 10 y 100 mg mL<sup>-1</sup>). Después de 48 h, se determinó la densidad óptica relativa de la suspensión de la muestra a 600 nm. Se compararon las concentraciones mínimas inhibitorias con el control de agua de mar mediante el método de Tsoukatou *et al.* (2002).

## 9 Resultados.

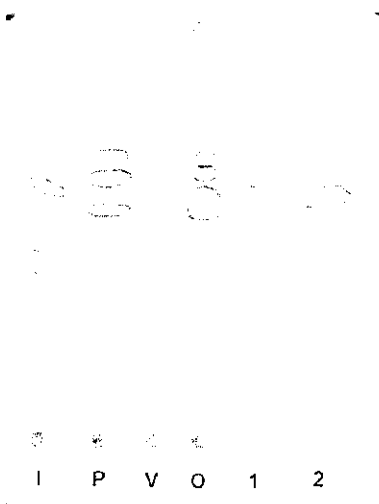
### ***Rendimiento y análisis preliminar de los extractos mediante cromatografía en capa fina (CCF).***

A partir de los ejemplares de *Aplysina gerardogreeni* recolectados durante las diferentes épocas del año, se obtuvieron una serie de extractos de color marrón oscuro y aspecto oleoso. El rendimiento de cada extracción con acetona-metanol 1:1 se muestra en la tabla 1, donde se observa que los rendimientos más bajos se obtuvieron durante invierno y los más altos en verano con valores promedio de 6.2%.

**Tabla 1.** Valores de rendimientos de los diferentes extractos de la esponja *Aplysina gerardogreeni*.

		Esponja (peso fresco, g)	Extracto (peso seco, g)	Rendimiento (%)
Invierno 2008	Muestra 1	22.4	0.38	1.7
	Muestra 2	22	0.47	2.1
	Muestra 3	19	0.46	2.4
				<b>X= 2.1</b>
Primavera 2008	Muestra 1	20	0.80	4.0
	Muestra 2	21.6	0.72	3.3
	Muestra 3	20	0.79	3.9
				<b>X= 3.7</b>
Verano 2008	Muestra 1	19	1.4	7.3
	Muestra 2	20	1.3	6.5
	Muestra 3	20.6	0.96	4.7
				<b>X= 6.2</b>
Otoño 2008	Muestra 1	20	0.8	4.0
	Muestra 2	22	0.96	4.4
	Muestra 3	21.5	1.02	4.7
				<b>X= 4.4</b>

Un análisis preliminar de los extractos mediante cromatografía en capa fina (CCF) permitió observar la presencia de una serie de compuestos fluorescentes a la luz UV y que revelaban de color café con ácido sulfúrico al 10%. La placa de CCF también indica de manera cualitativa que estos compuestos presentan variaciones dependiendo de la época del año (Fig. 3).



**Figura 3.** Placa de cromatografía en capa fina en la que se muestra el perfil de compuestos de los extractos de las diferentes épocas del año. I= Invierno, P=primavera, V= verano, O= otoño, 1= aerothionina y 2= fistularina-3.


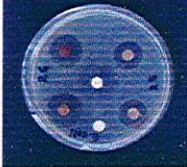
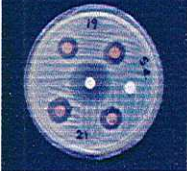
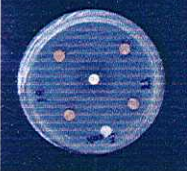
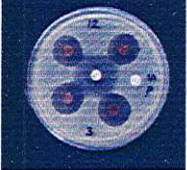



***Actividad antibacteriana de los extractos orgánicos de Aplysina gerardogreeni y su variación estacional en las diferentes épocas del año.***

Los ensayos de actividad antibacteriana frente a la cepa *S. aureus* mostraron que todos los extractos inhibieron el crecimiento de la bacteria, con variaciones en el grado de actividad dependiendo de la época del año. En la tabla 2 se observan los valores promedio del diámetro del halo de inhibición obtenido.

En primavera los halos presentaron un diámetro promedio de 16.3 mm mientras que en otoño e invierno los halos fueron de 22.6 y 22.7 mm respectivamente.

En los ensayos frente a *E. coli* también se observó inhibición del crecimiento, aunque ligeramente menos marcada que el caso de *S. aureus*. con halos de inhibición de 12.2 mm en primavera y 22.4 en otoño.

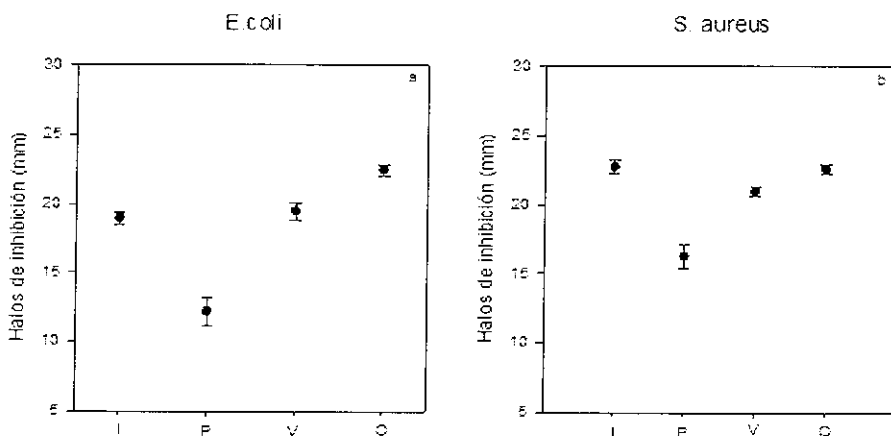
**Tabla 2.** Valores promedio de los halos de inhibición frente a las cepas *S. aureus* y *E. coli*.

		<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>	
Invierno	Muestra 1	25.1		21.4	
	Muestra 2	23.2		18.9	
	Muestra 3	19.9		16.5	
	<b>Promedio</b>	<b>22.7</b>		<b>18.9</b>	
Primavera	Muestra 1	21.8		18.5	
	Muestra 2	12.6		7.7	
	Muestra 3	14.6		10.3	
	<b>Promedio</b>	<b>16.3</b>		<b>12.2</b>	
Verano	Muestra 1	19.1		17.2	
	Muestra 2	21.5		18.0	
	Muestra 3	22.4		23.2	
	<b>Promedio</b>	<b>21.0</b>		<b>19.5</b>	
Otoño	Muestra 1	21.3		21.8	
	Muestra 2	22.7		22.2	
	Muestra 3	23.8		23.3	
	<b>Promedio</b>	<b>22.6</b>		<b>22.4</b>	



Los resultados del análisis de varianza muestran que los extractos fueron activos frente a las dos cepas durante todo el año, con una significativa variación estacional de la actividad ( $F_{0.95,3 \text{ g.l.}}=41.3$ ,  $P\leq 0.05$  para *E. coli* y  $F_{0.95,3 \text{ g.l.}}=28.6$ ,  $P\leq 0.05$  para *S. aureus*).

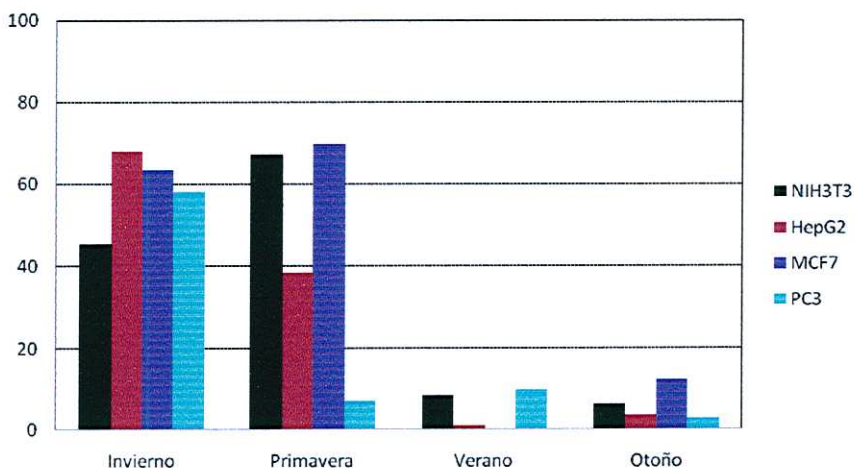
Frente a *E. coli*, los extractos de otoño mostraron la mayor actividad (Fig. 4) presentando halos de inhibición promedio de 22.4 mm, lo que coincide con el registro de temperatura más alto en la zona (26.6°C), mientras que en primavera se presentó la menor actividad. En el caso de los ensayos frente a *S. aureus*, los extractos de invierno y otoño fueron los más activos (Fig. 4) y al igual que con *E. coli* los valores más bajos de actividad se registraron en primavera cuando la temperatura registró los valores más bajos (19.5°C).



**Figura 4.** Valores de actividad antibacteriana de los extractos frente a las cepas *E. coli* y *S. aureus* en las diferentes épocas del año. Las barras representan el error estándar.

### **Actividad citotóxica de los extractos frente a diferentes líneas de células tumorales y su variación estacional en las diferentes épocas del año.**

Con los ensayos de actividad citotóxica frente a líneas de células tumorales humanas se busca encontrar compuestos que inhiban al menos el 50% de la viabilidad de las células cancerosas y preferentemente que no inhiban la viabilidad de la línea NIH3T3 de células no transformadas. En este estudio se observó de manera general, que los extractos de *A. gerardogreeni* presentaron variaciones en cuanto a su actividad citotóxica dependiendo de la época del año (Fig. 5).



**Figura 5.** Porcentaje de viabilidad de los extractos de *A. gerardogreeni* frente a diferentes líneas de células tumorales.

Los extractos de verano y otoño fueron los más activos, ya que inhibieron la viabilidad de las células cancerígenas, dando porcentajes bajos de viabilidad de entre 0 a 12.2 frente a las líneas HEPG2, MCF7 y PC3. Sin embargo, también redujeron el porcentaje de viabilidad de la línea NIH3T3 de células no

transformadas. En primavera, los extractos fueron activos frente a las líneas HEPG2 (viabilidad 39%) y PC3 (viabilidad del 7%) y frente a la línea NIH3T3 de células no transformadas se observó que no inhiben su crecimiento, dando lugar a porcentajes de viabilidad del 67.2%. Los extractos de invierno no fueron activos ya que los porcentajes de viabilidad sobrepasaron el 50%.

Las muestras que redujeron la viabilidad por abajo del 50% fueron probadas nuevamente para evaluar el IC<sub>50</sub> (concentración de la muestra que inhibe el 50% de las células). Los extractos de primavera muestran valores de IC<sub>50</sub> entre 0.05 y 0.06 mg mL<sup>-1</sup> frente a las líneas probadas. En el caso de los extractos de verano y otoño presentaron valores de 0.02 mg mL<sup>-1</sup> frente a la línea HEPG2 y 0.015 mg mL<sup>-1</sup> frente a la línea PC3 (Tabla 3).

**Tabla 3.** Actividad inhibitoria in vitro de los extractos de *Aplysina* frente a diferentes líneas de células tumorales. IC<sub>50</sub> (mg mL<sup>-1</sup>)

	NIH3T3	HEPG2	MCF7	PC3
Primavera	0.06	0.06	0.05	0.05
Verano	0.03	<b>0.02</b>	0.03	0.07
Otoño	0.03	0.04	0.03	<b>0.015</b>

***Actividad antiépibiótica de los extractos frente a cepas de bacterias marinas y microalgas y su variación estacional en las diferentes épocas del año.***

Los extractos de la esponja *Aplysina gerardogreeni* se probaron frente a tres cepas de bacterias marinas (*Polaribacter irgensii*, *Pseudoalteromonas elyakovii* y *Vibrio aestuarianus*) y tres cepas de microalgas (*Fragilaria cottonensis*, *Cosmarium* sp. y *Scenedesmus armatus*). Los resultados se muestran en las tablas 4 y 5.

Los extractos correspondientes a invierno inhibieron el crecimiento de las bacterias pero no alcanzaron el 50% de inhibición dentro de las concentraciones probadas, un caso similar presentaron los extractos de primavera, verano y otoño frente a las bacterias *P. irgensii* y *P. elyakovii*, mientras que frente a *V. aestuarianus* tuvieron una marcada actividad inhibitoria, teniendo los extractos de primavera y verano una concentración de 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  y en el caso de otoño fue más activa con una MIC de 0.1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Tabla 4).

**Tabla 4.** Concentración Mínima Inhibitoria ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) de los extractos de esponjas frente a cepas de bacterias marinas.

	<i>P. irgensii</i>	<i>P. elyakovii</i>	<i>V. aestuarianus</i>
<b>Invierno</b>	>50	>50	>50
<b>Primavera</b>	>50	>50	<b>10</b>
<b>Verano</b>	>50	>50	<b>10</b>
<b>Otoño</b>	>50	>50	<b>0.1</b>

Frente a las tres cepas de microalgas, sólo los extractos de invierno y primavera fueron activos, el primero frente a *Scenedesmus armatus* con una concentración de 0.1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  y el segundo frente a la cepa *Fragilaria cottonensis* con una concentración de 0.1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Tabla 5).

**Tabla 5.** Concentración Mínima Inhibitoria ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) de los extractos de esponjas frente a cepas de microalgas.

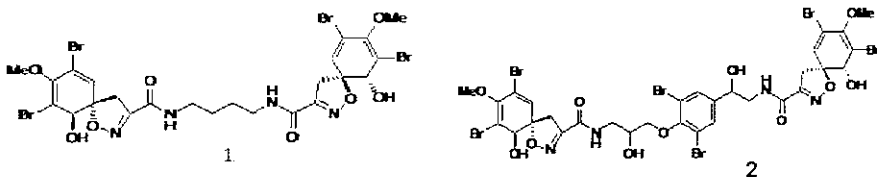
	<i>Fragilaria cottonensis</i>	<i>Cosmarium</i> sp.	<i>Scenedesmus armatus</i>
<b>Invierno</b>	>50	>50	<b>0.1</b>
<b>Primavera</b>	<b>0.1</b>	>50	>50
<b>Verano</b>	>50	>50	>50
<b>Otoño</b>	>50	>50	>50

## 10 DISCUSIÓN

Las esponjas del género *Aplysina*, son un grupo que ha despertado gran interés en la búsqueda de compuestos bioactivos debido a la actividad antibacteriana (Acosta y Rodríguez, 1992), antiviral (Gunasekera *et al.*, 1992), antihistamínica (Ciminiello *et al.*, 2001), antiparasitaria (Gutierrez *et al.*, 2005) y citotóxica (Gopichand *et al.*, 1979; Acosta y Rodríguez, 1992; Rodríguez y Piña, 1993) que presentan los compuestos que se han aislado a partir de ellas. Estudios realizados anteriormente con extractos y compuestos puros de *Aplysina gerardogreeni* del Golfo de California han mostrado actividad antibacteriana, antimicobacteriana y citotóxica (Betancourt-Lozano, 1998; Encarnación *et al.*, 2000; Encarnación-Dimayuga *et al.*, 2003; Hernández-Guerrero *et al.*, 2007). Por lo que en este trabajo se evaluó la variación estacional de la actividad antibacteriana, citotóxica y antiepiibiótica de extractos orgánicos de *Aplysina gerardogreeni* del área de Punta Arena de la Ventana.

### ***Rendimiento y análisis preliminar de los extractos mediante cromatografía en capa fina (CCF).***

Los rendimientos de extracción presentaron variaciones entre las diferentes épocas del año a pesar de que se trata de la misma especie. Lo cual puede ser debido a que en invierno cuando se presentan los menores rendimientos, la cantidad de componentes dentro del extracto sea menor. Así al comparar mediante CCF los compuestos presentes en los extractos con dos productos mayoritarios aislados en un trabajo anterior de la esponja *A. gerardogreeni*, como son aerothionina (1) y fistularina-3 (2) (Hernández-Guerrero *et al.*, 2007) se observa que compuestos similares están presentes en los extractos de primavera, verano y otoño, sin embargo, en los extractos de invierno no son tan evidentes.



### ***Actividad antibacteriana de los extractos orgánicos de Aplysina gerardogreeni y su variación estacional en las diferentes épocas del año.***

El ensayo de actividad antibacteriana de los extractos de *Aplysina gerardogreeni* mostro que esta esponja tiene una significativa actividad antibacteriana que inhibe tanto a bacterias Gram-positivas como a Gram-negativas. Por lo que los compuestos presentes en el extracto deben presentar un mecanismo de acción que inhibe tanto a bacterias sensibles como son las cepas de *S. aureus* (Gram positivas) que poseen gran facilidad para mutar e incorporar genes de resistencia frente a los antibióticos comerciales, así como a bacterias Gram negativas (*E. coli*) que presentan una membrana externa de lipopolisacáridos y lipoproteínas que las protege de varios antibióticos (Walker, 2000). De acuerdo a la placa de CCF (Fig. 3), los compuestos presentes en el extracto son alcaloides similares a la aerothionina (1) y fistularina-3 (2) y se ha observado que el efecto antimicrobiano de los alcaloides puede estar relacionado con la capacidad que presentan para inhibir la biosíntesis de ácidos nucleicos (McCarthy *et al.*, 1992).

Estudios realizados con ejemplares de la misma especie pero de diferente localidad han mostrado un comportamiento similar, presentando actividad frente a Bacterias Gram positivas y negativas (León-Deniz, 2003), al igual que esponjas del mismo género, como *A. aerophoba* y *A. cavernicola* (Hentschel *et al.*, 2001) que mostraron actividad frente a *S. aureus* y *E. coli*, con una actividad inhibitoria menor a la que presentaron los extractos de este estudio, presentando halos de inhibición frente a *S. aureus* de 13 mm y frente a *E. coli* de 16 mm. Por otra parte, el extracto acuoso de la esponja *Aplysina lacunosa* (Kazanjan y Fariñas, 2006) sólo fue activo frente a *E. coli*, teniendo como resultados un halo de inhibición promedio de 24 mm, mientras que frente *S. aureus* no presentó actividad.

En varios trabajos donde se prueba la actividad antibiótica de extractos de organismos marinos, se discute que los halos del antibiótico comercial utilizado como control positivo son muy superiores a los obtenidos con los extractos probados (De Lara-Isassi, 1991; Castro-Reyes, 1997). En nuestro caso los

extractos de otoño presentaron halos de inhibición comparables a los del antibiótico comercial (tetraciclina 30 µg), lo cual puede considerarse como un indicativo de que existe una alta concentración de los compuestos en el extracto, sin embargo, es importante mencionar que la concentración del extracto en el disco (2 mg) fue mucho mayor que la del antibiótico comercial.

En cuanto a la variación estacional de la actividad antibacteriana, el análisis de varianza mostró que existe una variación estadísticamente significativa, de manera general los valores de actividad fueron más altos en los extractos de otoño mientras que en primavera se presentó la menor actividad. Un comportamiento similar se observó en los extractos de *Aplysina fistularis* de la isla Espiritu Santo, B.C.S., la cual presentó mayor actividad antibacteriana durante meses cálidos (Betancourt-Lozano *et al.* 1998). Sin embargo, no todas las esponjas se comportan de manera similar, estudios realizados con esponjas del género *Agelas* y *Petrosia* del Mar Mediterráneo y *Latrunculia*, sp. nov. de Nueva Zelanda mostraron mayor actividad citotóxica durante épocas frías (Ferratti *et al.*, 2009; Duckworth y Battershill, 2001). Un factor en común en estos estudios es que la mayor bioactividad se presenta como resultado de un aumento en el número de organismos asociados, ya sean competidores u organismos que utilizan a la esponja para asentarse y fijarse (Turon *et al.*, 2009; Duckworth y Battershill 2001; Betancourt-Lozano *et al.*, 1998).

### ***Actividad citotóxica de los extractos frente a diferentes líneas de células tumorales.***

Existen muchos estudios encaminados a buscar actividad citotóxica en esponjas, debido a que han mostrado interesantes actividades y de hecho de las patentes registradas en los últimos años, el 75% son de productos naturales aislados de esponjas (Koopmans *et al.*, 2009). Estudios de actividad citotóxica realizados con extractos crudos del género *Aplysina*, han mostrado resultados interesantes, muestras de Brasil fueron activas frente a las líneas de células tumorales humanas de mama (MCF-7), melanoma de murino (B16) con una

inhibición del crecimiento del 50% y frente a una línea celular de colon (HCT-8) con una inhibición del crecimiento de entre el 50 y 75% (Selegim *et al.*, 2007). También se ha observado que el extracto de *Aplysina fistularis insularis* presentó una actividad citotóxica frente a la línea de carcinoma de mama humano (MCF-7) con un  $LD_{50} = 17 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Compagnone *et al.*, 1999).

Nuestros resultados confirman que los extractos de este género muestran interesantes actividades citotóxicas, ya que de manera general presentaron una significativa inhibición del crecimiento celular y al igual que con la actividad antibacteriana se observó una evidente variación de la actividad citotóxica dependiendo de la época del año. En este sentido, los extractos de primavera, aún cuando no fueron los más activos, presentan resultados interesantes frente a las líneas HEPG2 y PC3, ya que inhiben el crecimiento entre el 60 y 90% respectivamente, pero no inhiben el crecimiento de células no transformadas, mostrando valores de  $IC_{50}$  a una concentración de 0.05 y 0.06  $\text{mg mL}^{-1}$  respectivamente.

Diversas moléculas que se han aislado a partir del género *Aplysina* presentan actividades citotóxicas, algunos ejemplos son la 11-oxoaerothionina que mostro actividad frente a la líneas cancerigenas de colon (HTC 116) con un  $IC_{50}$  de 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , mama (MCF-7) con un  $IC_{50}$  de 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , melanoma (SK5-MEL) con un  $IC_{50}$  de 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  y células T de leucemia (CCRF-CEM) con un  $IC_{50}$  de 3.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Acosta y Rodríguez, 1992). Las aplysinonas A-D aisladas de *A. Gerardogreeni* del Golfo de California que mostraron actividad citotóxica frente a las líneas de carcinoma de mama (MDA-MB-231), carcinoma de pulmón (A-549) y adenocarcinoma de colon (HT-29) con valores de  $GI_{50}$  de entre 1.5 y 5.7  $\mu\text{M}$  (Hernández-Guerrero *et al.*, 2007). La aeroplysinina-1 también ha mostrado actividad frente a la línea tumoral (EAT) con un  $IC_{50}$  de 8.2  $\mu\text{M}$  (Koulman *et al.*, 1996) y la isoplysinina A frente al carcinoma epidérmico (KB) (Kondo *et al.*, 1994).



### **Actividad antiepibiótica de los extractos frente a cepas de bacterias marinas y microalgas.**

Existen diferentes trabajos donde se ha evaluado la actividad antiepibiótica de diferentes géneros de esponjas, sin embargo, poco se ha estudiado acerca de la actividad de extractos del género *Aplysina*. Los resultados obtenidos en este estudio muestran que los extractos sólo fueron activos frente a cepas de *V. aestuarianus* con valores MIC de entre 10 a 0.1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Contrario a esto, en un estudio realizado con *A. fulva* frente a *V. harveyi* no se observó inhibición del crecimiento de esta bacteria, sin embargo, algunos ensayos con compuestos puros obtenidos de *Aplysina* como aeroplysinina-1 han mostrado actividad tanto en la inhibición de asentamiento de cepas bacterianas como un efecto disuasivo ante depredadores (Kelly *et al.*, 2003). También el compuesto psammaplisina A, ha mostrado que inhibe el asentamiento del balano *Barnacle improvisus* a una dosis de 10  $\mu\text{M}$  (Ortlepp *et al.*, 2007). En cuanto a la variación de la actividad antiepibiótica poco se conoce, pero nuestros resultados ponen de manifiesto nuevamente que existe una variación en cuanto a la producción de los metabolitos responsables de la actividad.

Resulta evidente que la producción de metabolitos secundarios y la bioactividad que estos presentan, varía como respuesta a las interacciones con otros organismos y las condiciones ambientales específicas de cada localidad, y las esponjas del género *Aplysina* del arrecife de Punta Arena no son la excepción, sin embargo, hacen falta más estudios para conocer como varían estacionalmente los diferentes metabolitos secundarios responsables de la bioactividad y el papel ecológico que juegan estos metabolitos.

## 11 CONCLUSIONES.

- Los extractos de *Aplysina gerardogreeni* del arrecife rocoso de Punta Arena presentaron actividad antibacteriana frente a bacterias Gram positivas (*S. aureus*) y Gram negativas (*E. coli*), con halos de inhibición de entre 12.2 y 22.7 mm.
- Los extractos fueron activos frente a las dos cepas de bacterias durante todo el año, con una significativa variación estacional de la actividad, siendo los extractos de otoño los que presentaron los valores más altos, mientras que los de primavera presentaron la menor actividad.
- Los extractos también presentaron actividad citotóxica frente a las líneas de células tumorales de próstata (PC3), hígado (HepG2) y mama (MCF7), inhibiendo en la mayoría de los casos más del 50% de la viabilidad de las células cancerosas y presentando valores de IC<sub>50</sub> de entre 0.015 y 0.07 µg mL<sup>-1</sup>.
- Los extractos de verano y otoño fueron los que presentaron la mayor actividad citotóxica mientras que los extractos de invierno no fueron activos.
- Los extractos de primavera dan lugar a resultados interesantes ya que inhiben el crecimiento de las líneas HepG2 y PC3 pero mantienen una alta viabilidad de la línea de células no transformadas NIH3T3 (67.2%), lo que indica que existe una especificidad hacia las líneas tumorales.
- Los ensayos de actividad antiepibiótica mostraron que los extractos no fueron activos frente a todas las cepas probadas y sólo se observó actividad frente a *V. aestuarianus* con valores MIC de entre 10 a 0.1 µg mL<sup>-1</sup> y frente a las cepas de microalgas *Fragilaria cottonensis* y *Scenedesmus armatus* con valores MIC de 0.1 µg mL<sup>-1</sup>.

- En cuanto a la variación estacional de la actividad antiepibiótica no se observó un patrón general con todas las cepas, así, la mayor actividad frente a *V. aestuarianus* se presentó con los extractos de otoño, los extractos de primavera fueron activos frente a *Fragilaria cottonensis* y los extractos de invierno frente a *Scenedesmus armatus*.
- Los extractos orgánicos de las esponjas *Aplysina gerardogreeni* de Punta Arena de la Ventana presentan una significativa actividad antibacteriana, citotóxica y antiepibiótica, la cual varía dependiendo de la época del año.

## **Glosario de términos**

**Ácido teicoico:** Polímero de ribosa o glicerol unido mediante enlaces fosfodiéster. Se encuentran en la pared celular de las bacterias Gram-positivas.

**Ácido lipoteicoico:** Polímero de ribosa o glicerol modificado químicamente y unido por grupos fosfato. Posee un ácido graso que está unido a la membrana.

**Adherente:** Que es capaz de adherirse o pegarse a otra cosa.

**Agente terapéutico:** Cualquier sustancia no alimenticia usada para prevención, diagnóstico, alivio, tratamiento o curación de enfermedades en el hombre y los animales.

**Alcalino:** Que tiene la reacción o propiedades de un álcali; contrarrestar a los ácidos.

**Análogo sintético:** Que puede adoptar aspecto semejante a otro por cumplir determinada función, pero que no es homólogo a él.

**Antibacteriano:** Dicho de un medicamento, de una sustancia o un procedimiento que se utilizan para combatir las bacterias.

**Antibiótico:** Cualquier compuesto químico utilizado para eliminar o inhibir el crecimiento de organismos infecciosos. Una propiedad común a todos los antibióticos es la toxicidad selectiva: la toxicidad es superior para los organismos invasores que para los animales o los seres humanos que los hospedan.

**Bentónico:** Relativo al bentos de un ecosistema acuático. Se aplica a todos los organismos que habitan el fondo o bentos de un ecosistema acuático. Incluye todos los seres que viven fijos en el fondo y los que se desplazan poco.

**Bioactivo:** Relativo o perteneciente a una sustancia que tiene un efecto en el tejido vivo o causa una reacción en él.

**Biota:** Conjunto de animales y plantas que ocupan un lugar determinado. La biota de un lugar conforma una comunidad, aunque el concepto no implica más relación entre los organismos que la relativa a la presencia común en dicho lugar.

**Cepa:** Conjunto de microorganismos derivados de las múltiples divisiones de una célula inicial.

**CCF:** Cromatografía en capa fina.

**Citotóxico:** Agente o proceso que es tóxico a las células lo cual significa que suprime las funciones de la célula o le provoca la muerte. Se refiere especialmente a células cancerosas o infectadas.

**Coanocito:** Son un tipo de células exclusivas del filo Porífera, en su conjunto forman el coanodermo, la capa interna celular de las esponjas.

**Difusión:** Flujo de energía o materia desde una zona de mayor concentración a otra de menor concentración, tendiente a producir una distribución homogénea.

**DMSO:** Dimetilsulfoxido.

**Ecología química:** Es el estudio de las interacciones químicas entre organismos y su medio ambiente

**Endocitosis:** Es el proceso por el cual la célula introduce en su interior moléculas grandes o partículas a través de su membrana.

**Espongina:** Es una red de hebras proteicas elásticas anastomosadas (entrelazadas y fusionadas entre si) es secretada por el espongiocito.

**Fármaco:** Producto químico que se emplea en el tratamiento, diagnóstico o prevención de enfermedades.

**Gemación:** División celular en la que el citoplasma se escinde en dos partes de tamaño muy desigual, la menor de las cuales se conoce con el nombre de yema.

**IC<sub>50</sub>:** Es una medida de la eficacia de un compuesto en inhibir la función biológica o bioquímica. Esta medida cuantitativa indica cuánto de la droga particular o de la otra sustancia (inhibidor) es requerida para inhibir un proceso biológico dado al 50%.

**Inhibición:** Suspensión transitoria de una función o actividad de un organismo mediante la acción de un estímulo adecuado.

**Lipopolisacárido:** Son polímeros complejos con restos de ácidos grasos como parte lipófila y cadenas características de oligosacáridos y polisacáridos, que forman la parte mayoritaria de la capa externa de la membrana externa de bacterias Gram negativas.

**Lipoproteína:** Son moléculas hechas de proteínas y grasa, las cuales transportan el colesterol y sustancias similares a través de la sangre.

**Nucleósido:** Son las moléculas resultantes de la unión de una base nitrogenada y una pentosa.

**Ósculo:** Abertura principal de una esponja por donde sale la corriente de agua después de pasar por el espongiocelo.

**Patógeno:** Es cualquier microorganismo capaz de producir una enfermedad infecciosa. Incluye a los virus, bacterias, hongos y protozoos.

**Producto natural:** Los productos físicos, químicos y biológicos que se presentan en un tiempo y espacio determinado, sin la inducción del hombre.

**Peptidoglicano:** Es el constituyente básico de la pared celular en bacterias. Es el responsable de la rigidez de la pared y proporciona resistencia frente a la lisis osmótica.

**Quelante:** Compuesto químico que se une con firmeza a los iones metálicos. En el campo de la medicina, los quelantes se usan para extraer metales tóxicos del cuerpo.

**Resistencia bacteriana:** Es la capacidad que tienen las bacterias de soportar los efectos de los antibióticos o biocidas destinados a eliminarlas o controlarlas.

**TSA:** Agar Soya Trypticasa.

## 12 LITERATURA CITADA

- Azevedo, L.G., A.L. Mucillo-Baisch, D. Filgueira, R.T. Boyle, D.F. Ramos, A.D. Soares, C. Lerner, P.A. Silva & G.S. Trinidad. 2008. Comparative cytotoxic and anti-tuberculosis activity of *Aplysina caissara* marine sponge crude extracts. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C.*, 147:36-42.
- Acosta, A.L. & A.D. Rodríguez. 1992. 11-oxoaerotionin: a cytotoxic antitumor bromotyrosine derived alkaloid from the caribbean marine sponge *Aplysina lacunosa*. *J. Nat. Prod.*, 55: 1007-1012.
- Amsterdam, D. 1996. Susceptibility testing of antimicrobials in liquid media. In: Loman, V. (Ed.), *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 4th ed. Williams and Wilkins, Baltimore, MD. 52– 111 pp.
- Andersen, R.J. & D.J. Faulkner. 1973. A novel antibiotic from a sponge of the genus *Verongia*. *Tetrahedron Lett.*, 1175-1178.
- Arias, J., S. Zea, F. Newmark, & M. Santos-Acevedo. 2006. Determinación de la capacidad antiepibiótica de los extractos orgánicos crudos de las esponjas marinas *Cribrochalina infundibulum* y *Biemna cribaria*. *Bol. Invemar*. Vol. 35 no.1.
- Bakus, G.J., N.M. Targett & B. Schulte. 1986. Chemical ecology of marine organisms: An overview. *J. Chem. Ecol.*, 12(5):951-987.
- Betancourt-Lozano, M., F. González-Farías, B. González-Acosta, A. García-Gasca & J.R. Bastida-Zavala. 1998. Variation of antimicrobial activity of the sponge *Aplysina fistularis* (Pallas 1776) and its relation to associated fauna. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 223:1-18.
- Bergmann, W. & R.J. Feeney. 1951. Marine products. XXXII. The nucleosides of sponges I. *J. Org. Chem.*, 16: 981-987.
- Blunt, J.W., B.R. Copp, M.H.G. Munro, P.T. Northcote & M.R. Prinsep. 2006. Marine Natural products. *Nat. Prod. Rep.*, 23: 26-78.
- Castro-Reyes, M.A. 1997. Actividad antibacteriana de *Sargassum sinicola* (SARGASSACEAE, PHAEOPHYTA) y *Laurencia johnstonii* (RHODOPHYTA) de la Bahía de La Paz, BCS, México. Tesis de Maestría. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas. La Paz, BCS. 64 p.
- Chanas, B. & J.R. Pawlik. 1995. Defenses of Caribbean sponges against predatory reef fish. II. Spicules, tissue toughness, and nutritional quality. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 127: 195-211.



- Ciminiello, P., V. Costantino, E. Fattorusso, S. Magno, A. Mangoni & M. Pansini. 1994. Chemistry of Verongida sponges, II. Constituents of the Caribbean sponge *Aplysina fistularis* forma *fulva*. *J. Nat. Prod.*, 57: 705-712.
- Cimino, G., S. De Rosa, S. De Stefano, R. Self, R. & G. Sodano. 1983. The bromo-compounds of the true sponge *Verongia aerophoba*. *Tetrahedron Lett.*, 24: 3029-3032.
- Covarrubias-Gómez, A. 2008. Las clínicas del dolor en México. *Revista Mexicana de Anestesiología*, 31(1):66-70.
- Compagnone, R.S., R. Avila, A.I. Suárez, O.V. Abrams, H.R. Rangel, F. Arvelo, I.C. Piña & E. Merentes. 1999. 11-deoxyfistularin-3, a new cytotoxic metabolite from the Caribbean sponge *Aplysina fistularis insularis*. *J. Nat. Prod.*, 62: 1443-1444.
- Cragg, G.M., D.J. Newman & K.M. Snader. 1997. Natural products in drug discovery and development. *J. Nat. Prod.*, 60:52-60.
- Cuadrado, C.; L. Castellanos, O. Osorno, F. Ramos & C. Duque. 2009. Estudio químico y evaluación de la actividad antifouling del octocoral caribeño *Eunicea lacinata*. *Quim. Nova.*, 33(3):656-661.
- De Lara, I.G. 1991. Propiedades antibióticas de algunas especies de algas marinas bentónicas. *Hidrobiología*, 1(2): 21 - 28.
- 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.
- Dewick, P.M. 2002. Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach. *John Wiley & Sons*. 2a. ed. New York. 507 pp.
- Dreser, A., V.J. Wirtz, K. K. Corbett, G. Echániz. 2008. Uso de antibióticos en México: revisión de problemas y políticas. *Salud Pública Mex.*, 50(4):S480-S487.
- Duckworth, A.R. & C.N. Battershill. 2001. Population dynamics and chemical ecology of New Zealand Demospongiae *Latrunculia* sp. nov. and *Polymastix croceus* (Poecilosclerida: Latrunculiidae: Polymastidae). *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 35:935-949.
- Encarnación, D.R., S.G. Franzblau, C.A. Tapia & R. Cedillo-Rivera. 2000. Screening of marine organisms for antimicrobial and antiprotozoal activity. *Pharmaceutical Biology*, 38(5): 379-384.

- Encarnación, R.D. & S. Keer-García. 1992. Compuestos con actividad antimicrobiana de organismos marinos. *Rev. Mex. Cienc. Farmac.*, 22: 33-41.
- Encarnación-Dimayuga, R., M.R. Ramírez; J. Luna-Herrera. 2003. Aerothionin, a bromotyrosine derivative with antimycobacterial activity from the marine sponge *Aplysina Gerardogreeni* (Demospongia). *Pharmaceutical Biology*, 41(5): 384-387.
- Ewing, W.H. 1985. Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae. 4<sup>a</sup> ed. Nueva York. *Elsevier Science Publishing Co.*
- Fagerström, T., S. Larsson & O. Tenow. 1987. On optimal defense in plants. *Funct. Ecol.*, 1:73-81.
- Fattorusso, E., L. Minale & G. Sodano. 1970. Aeroplysinin-I, a new bromo-compound from *Aplysina aerophoba*. *Chem Comm.*, 751-752.
- Faulkner, D.J. 2000. Highlights of marine natural products chemistry (1972-1999). *Nat. Prod. Rep.*, 17: 1-6.
- Faulkner, D.J. 2002. Marine Natural products. *Nat. Prod. Rep.*, 19:1-48.
- 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). *Mar. Ecol.*, 30:327-336.
- González, A. 1997. Filogenia del sistema inmune. *Inmunología en línea*. Universidad de Córdoba, España.
- Goo, Y.M. 1985. Antimicrobial and antineoplastic tyrosine metabolites from a marine sponge, *Aplysina fistularis*. *Arch. Pharm. Res.* 8(1):21-30.
- Gopichand, Y. & F.J. Schmitz. 1979. Marine natural products: Fistularin-1, -2, and -3 from the sponge *Aplysina fistularis* forma *fulva*. *Tetrahedron Lett.*, 3921-3924.
- Gunasekera, S.P. & S.S. Cross. 1992. Fistularin 3 and 11-ketofistularin 3. Feline leukemia virus active bromotyrosine metabolites from the marine sponge *Aplysina archeri*. *J. Nat. Prod.*, 55: 509-512.
- Gunasekera, S.P., M. Gunasekera, R.E. Longley & G.K. Schulte. 1990. Discodermolide: a new bioactive polyhydroxylated lactone from the marine sponge *Discodermia dissoluta*. *J. Org. Chem.*, 55: 4912-4915.
- Gutiérrez, M.; T.L. Capson, H.M. Guzmán, J. González, E. Ortega-Barría, E. Quiñoá & R. Riguera. 2005. Antiprotozoal activity against *Plasmodium*

- falciparum* and *Tripanosoma cruzi* of aeroplysinin-1 isolated from the new sponge *Aplysina chinquensis*. *Pharm. Biol.*, 43: 762-765.
- Harvey, R. A. 2008. *Microbiología*. España. *Lippincott Williams and Wilkins*. 438 pp.
- Hentschel, U.; M. Schmid, M. Wagner, L. Fieseler, C. Gernert & J. Hacker. 2001. Isolation and phylogenetic analysis of bacteria with antimicrobial activities from the Mediterranean sponges *Aplysina aerophoba* and *Aplysina cavernicola*. *FEMS Microbiology Ecology*, 35: 305-312.
- Hernández-Guerrero, C.J., E. Zubia, M.J. Ortega & J.L. Carballo. 2007. Cytotoxic dibromotyrosine-derived metabolites from the sponge *Aplysina gerardogreeni*. *Bioorganic & Medical Chemistry*, 15(15): 5275-5282.
- Kazanjian, A. & M. Fariñas. 2006. Actividades biológicas del extracto acuoso de la esponja *Aplysina lacunosa* (Porifera: Aplysinidae). *Rev. Biol. Trop.*, 54 (Suppl. 3): 189-200.
- Kelly, S.R., P.R. Jensen, T.P. Henkel, W. Fenical & J.R. Pawlik. 2003. Effects of Caribbean sponge extracts on bacterial attachment. *Aquatic Microbial Ecology*, 31(2):175-182.
- Kondo, K., J. Nishi, M. Ishibashi & J. Kobayashi. 1994. Two New Tryptophan-Derived Alkaloids from the Okinawan Marine Sponge *Aplysina* Sp. *J. Nat. Prod.*, 57(7): 1008-1011
- Koopmans, M., D. Martens & H. Rene. 2009. Wiffels Towards Commercial Production of Sponge Medicines *Mar. Drugs.*, 7:787-802.
- Koulman A., P. Porsch, R. Ebel, A.C. Beekman, W. van Uden, A.W.T. Konings, J.A. Pedersen, N. Pras & H.J. Woerdenbag. 1996. Cytotoxicity and mode of action of aeroplysin-1 and a related dienone from the sponge *Aplysina aerophoba*. *J. Nat. Prod.*, 59(6):591-594.
- León-Deniz, V.L. 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. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas-IPN. La Paz, BCS. 65 p. [En línea]. Disponible:<http://itzamna.bnct.ipn.mx:8080/dspace/bitstream/123456789/3380/1/63.pdf>
- Limna Mol, V.P., T.V. Raveendran & P.S. Parameswaran. 2009. Antifouling activity exhibited by secondary metabolites of the marine sponge *Haliclona exigua* (Kirkpatrick). *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 63(1): 67-72.

- Martin, D. & M.J. Uriz. 1993. Chemical bioactivity of Mediterranean benthic organisms against embryos and larvae of marine invertebrates. *J. exp. Mar. Biol.Ecol.*, 173: 11-27.
- Martí, R. 2001. Variación espacial y temporal de la toxicidad natural en comunidades bentónicas en cuevas mediterráneas. (Tesis Doctoral Universidad de Barcelona).
- McCarthy, P. J., T. P Pitts, G. P. Gunawardana, M. K. Borges & S. A.Pomponi. 1992. Antifungal activity of Meridine, a natural product from the marine sponge *Corticium* sp. *J. Nat. Prod.*, 55: 1664-1668.
- McMichael, A.J. 2000. La salud y el entorno urbano en un mundo cada vez más globalizado: problemas para los países en desarrollo. *Bull World Health Organ.* 78 (9):1117-1126. doi: 10.1590/S0042-96862000000900007.
- Meglich, P.A. & F.R. Schram. 1991. *Invertebrate Zoology*. Oxford University Press, U.S.A. p. 54-67.
- Moody, K., R.H. Thomson, E. Fattorusso, L. Minale & G. Sodano. 1972. Aerothionin and homoaerothionin: Two tetrabromo spirocyclohexadienylisoxazoles from *Verongia* sponges. *J. Chem. Soc. Perkin*, 1: 18-24.
- Müller, W.E.G., V.A. Grebenjuk, G. LePennec, H.C. Schröder, F. Brümmer, U. Hentschel, I.M. Müller, I.M.; H.J. Breter. 2004. Sustainable production of bioactive compounds by sponges-cell culture and gene cluster approach: A review. *Mar. Biotechnol.*, 6: 105-117.
- Munro, M.H.G., J.W. Blunt, E.J Dumdei, S.J.H. Hickford, R.E. Lill, S. Li, C.N. Battershill & A.R. Duckworth. 1999. The discovery and development of marine compounds with pharmaceutical potential. *J. Biotechnol.*, 70:15-25.
- Muricy, G., E. Hadju, F. Araujo & A. Hagler. 1993. Antimicrobial of southwestern atlantic shallow-water marine sponge (Porifera). *Scientia Marina*, 57(4): 427-432.
- Newbold, R.W., P.R. Jensen, W. Fenical & J. R. Pawlik. 1999. Antimicrobial activity of Caribbean sponge extracts. *Aquat. Microb. Ecol.*, 19: 279-284.
- Newman, D.J. & G.M. Cragg. 2004a. Marine natural products and related compounds in clinical and advanced preclinical trials. *J. Nat. Prod.*, 67: 1216-1238.
- Newman, D.J. & G.M. Cragg. 2004b. Advanced preclinical and clinical trials of natural products and related compounds from marine sources. *Curr. Med. Chem.*, 11: 1693-1713.

- Núñez, C.V., E.V.R. Almeida, A.C. Granato, S.O. Marques, K.O. Santos, F.R. Pereira, M. L. Macedo, A. G. Ferreira, E. Hajdu, U.S. Pinheiro, G. Muricy, S. Peixinho, C.J. Freeman, D.F. Gleason & R. G. S. Berlinck. 2008. Chemical variability within the marine sponge *Aplysina fulva*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 36: 283-296.
- Ortlepp, S., M. Sjögren, M. Dahlström, H. Weber, R. Ebel, R. Edrada, C. Thoms, P. Schupp, L. Bohlin & P. Proksch. 2007. Antifouling Activity of Bromotyrosine-Derived Sponge Metabolites and Synthetic Analogues. *Mar. Biotech.*, 9(6): 776-785.
- 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*. *J. Chem. Ecol.*, 31(5):1161-1174.
- Parkin, D.M. 2001. Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol.*, 2:533-543.
- Pawlik, J.R. 1993. Marine invertebrate chemical defenses. *Chem. Rev.*, 93: 1911-1922.
- Pettit, G.R., J.C. Knight, Collins, J.C., Herald, D.L., Pettit, R.K., Boyd, M.R. & V. G. Young. 2000. Antineoplastic agents 430. Isolation and structure of cribrostatins 3, 4, and 5 from the Republic of Maldives *Cribrochalina* species. *J. Nat. Prod.*, 63: 793-798.
- Pfannkuchen, M., G. Fritz, S. Schlesinger, K. Bayer & F. Brümmer. 2008. *In situ* pumping activity of the sponge *Aplysina aerophoba*, Nardo 1886. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 369: 65-71.
- Proksch, P., R.A. Edrada & R. Ebel. 2002. Drugs from the seas-current status and microbiological implications. *Appl. Microbiol Biotechnol.*, 59: 125-134.
- Rodríguez, A.D. & I. C. Piña. 1993. The structures of aplysinamisines I, II and III: New bromotyrosine-derived alkaloids from the Caribbean sponge *Aplysina cauliformis*. *J. Nat. Prod.*, 56: 907-914.
- Ruppert, E. & R. Barnes. 2003. Zoología de los invertebrados, España, *McGraw-Hill*, 1114 pp.
- Santana-Calderón, M.A. & C. Sánchez-Espinel. 2007. El sistema inmune contra los parásitos indeseables. *Hypatia, Revista de Divulgación Científico*, 24. Disponible:[http://hypatia.morelos.gob.mx/index.php?option=com\\_content&task=view&id=279&Itemid=160](http://hypatia.morelos.gob.mx/index.php?option=com_content&task=view&id=279&Itemid=160).

- Schupp, P., C. Eder, V. Paul & P. Proksch. 1999. Distribution of secondary metabolites in the sponge *Oceanapia* sp. and its ecological implications. *Marine Biology*, 135(4): 573-580.
- 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.
- Shu, Y.Z. 1998. Recent Natural Products Based Drug Development: A pharmaceutical Industry Perspective *J. Nat. Prod.*, 61(8): 1053–1071.
- Sipkema, D.; Franssen, M. C. R.; Osing, R.; Tramper, J. & R.H. Wijffels. 2005. Marine sponges as pharmacy. *Marine Biotechnology*, 7: 142-162.
- Sokal, R.R. & Rohlf F.J. 1981. Biometry. *W.H. Freeman and Company*. New York, 859 pp.
- Swearingen III, D.C. & J.R. Pawlik. 1998 Variability in the chemical defense of the sponge *Chondrilla nucula* against predatory reef fishes. *Marine Biology*, 131:619-627.
- Thompson, J.E., P.T. Murphy, P.R. Bergquist & E.A. Evans. 1987. Environmentally induced variation in diterpene composition of the marine sponge *Rhopaloides odorabile*. *Biochem Syst Ecol.*, 15:595-606.
- Thoms, C., M. Wolff, K. Padmakumar, R. Ebel & P. Proksch. 2004. Chemical defenses of Mediterranean sponge *Aplysina cavernicola* and *Aplysina aerophoba*. *Z. Naturforsch.*, 59 C: 113-122.
- Tsoukatou, M., C. Hellio, C. Vagias, C. Harvala & V. Roussis. 2001. Chemical defense and antifouling activity of three Mediterranean sponges of the genus *Ircinia*. *Z. Naturforsch.*, 57 C: 161-171.
- Turon, X., M.A. Becerro & M.J. Uriz. 1996. Seasonal patterns of toxicity in benthic invertebrates : the encrusting sponge *Crambe crambe* (Poecilosclerida). *Oikos*, 75:33-40.
- Turon, X., R. Marti & M.J. Uriz. 2009. Chemical bioactivity of sponges along an environmental gradient in a Mediterranean cave. *Scientia Marina*, 73(2):387-397.

Uemura, D., K. Takahashi, T. Yamamoto, C. Katayama, J. Tanaka, Y. Okumura & Y. Hirata. 1985. Norhalichondrin A: an antitumor polyether macrolide from a marine sponge. *J. Am. Chem. Soc.*, 107: 4796-4798.

Walker T. 2000. Microbiología. México: *McGraw Hill Interamericana*.

## SEASONAL VARIATION OF THE ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF *Aplysina gerardogreeni* FROM THE GULF OF CALIFORNIA

Variación estacional de la actividad antibacteriana de *Aplysina gerardogreeni* del Golfo de California

**RESUMEN.** Las esponjas del género *Aplysina* producen compuestos bioactivos de importancia farmacológica que presentan actividades antibacterianas y anticancerígenas. A pesar de su importancia se conoce poco en cuanto a la variación temporal de su bioactividad, por lo que el objetivo de este trabajo es describir la variación estacional de la actividad antimicrobiana de *Aplysina gerardogreeni*. Estas se recolectaron estacionalmente en Punta Arena de la Ventana, Baja California Sur, México, durante un ciclo anual (2008) mediante buceo SCUBA. Con los ejemplares, se prepararon extractos orgánicos de cada época del año y se probaron frente a cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* utilizando el método de difusión en agar. Los extractos fueron activos frente a *E. coli* y *S. aureus* con una evidente variación en su bioactividad, dependiendo de la época del año. De manera general, los extractos de otoño mostraron la mayor actividad, presentando halos de inhibición entre 22.4 y 22.6 mm, mientras que la menor actividad frente a las dos cepas se presentó con los extractos de primavera. Estos resultados muestran que el estudio químico de estas esponjas tiene gran potencial en la búsqueda de compuestos con actividad farmacológica.

Montes-Plascencia, C.I., C.J. Hernández-Guerrero<sup>1,2</sup>, B. González-Acosta & R.N. Águila Ramírez<sup>1,2</sup>. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas - Instituto Politécnico Nacional, Av. IPN S/N, Col. Playa Palo de Santa Rita, Apartado Postal 542, La Paz, B.C.S. C.P. 23000, México. <sup>1</sup>Becario COFAA, <sup>2</sup>Becario EDI-IPN. email: cguerrerr@ipn.mx

Montes-Plascencia, C.I., C.J. Hernández-Guerrero, B. González-Acosta & R.N. Águila Ramírez. 2010. Seasonal variation of antibacterial activity of *Aplysina gerardogreeni* from the Gulf of California. *CICIMAR-Oceánides*, 25(1): 79-81.

In the search for bioactive compounds with pharmaceutical potential, sponges play a very important role because most of the marine bioactive compounds are isolated from

them (Munro *et al.*, 1999). These metabolites play an important ecological role for sponges in their natural environment because they are produced as a defense mechanism against competition, predation, or colonization pressure (Pawlik, 1993). In spite of their importance, these compounds represent an energetic cost to the organism because they are synthesized under stress conditions caused by interactions with other organisms or by the abiotic environment, which determine a seasonal pattern in their bioactivity (Page *et al.*, 2005; Ferreti *et al.*, 2009; Turon *et al.*, 2009). Knowing these variations in the wild is significant to solve one of the main restrictions for the production of these compounds, *i.e.*, the supply of the bioactive compounds. Diverse bromide metabolites bioenergetically related with tyrosine have been obtained from *Aplysina gerardogreeni*, and they have shown interesting antibacterial and antitumoral activity. However, little is known about the seasonal bioactivity variation of these compounds. For this reason, the objective of this work is to assess the antibacterial activity of extracts from *Aplysina gerardogreeni* and their seasonal variation during an annual cycle.

Sponges were collected by hand using SCUBA diving in the rocky reef of Punta Arena, Baja California Sur, México (24° 02' N and 109° 49' W) during winter (January), spring (March), summer (end of July) and autumn (November) of 2008. Three specimens were collected in three different zones according to their depth (2, 4, and 6 m). Samples were placed on ice for their immediate transfer to the laboratory where they were frozen at - 20 °C. Prior to the assay they were thawed, weighted and cutted.

Approximately 20 g of each tissue sample were extracted with 150 mL of acetone/methanol mixture (1:1) at room temperature. The extracted solution was filtered and evaporated under reduced pressure in a rotary evaporator. Methanol (150 mL) was added, and the methanol-soluble extract was again evaporated under reduced pressure until a dark brownish and oily extract was obtained.



The antibacterial activity of the extracts was evaluated against Gram-negative bacteria *Escherichia coli* (ATCC BAA-196) and Gram-positive *Staphylococcus aureus* (ATCC BAA-42) using the agar diffusion test. Each strain was inoculated in plates with Müller-Hinton medium at  $10^8$  cells mL<sup>-1</sup>. Afterwards, 25 µL of a solution of each extract (80 mg mL<sup>-1</sup>) were added to filter paper discs (6 mm diameter). Four discs were placed in each plate; two with the extracts, one as a positive control (30 mg Tetracycline), and one as a negative control (solvent MeOH). Every assay was quadruplicated. The plates were incubated at 35 °C for 24 h, after which the inhibition halos (mm) were measured. The data obtained showed a normal-like distribution according to the Kolmogorov-Smirnov test ( $p = 0.020$ ).

We compared the bioactivities between seasons using one-way ANOVA. A HOBO data recorder was used to obtain temperature data *in situ* records (summer and autumn), and sea surface temperature (winter and spring) data were obtained from the NOAA (<http://www.pfeg.noaa.gov/>).

The results showed that the extracts were active against the two strains tested throughout the whole year with a significant seasonal variation in activity ( $F_{0.95,3,9,1} = 41.3$ ,  $P = 0.05$  for *E. coli* and  $F_{0.95,3,9,1} = 28.6$ ,  $P = 0.05$  for *S. au-*

*reus*). The extracts during autumn showed a high activity against *E. coli*, exhibiting average inhibition halos of 22.4 mm, in accord with the highest temperature record for the area (26.6 °C); while the lowest activity was observed during spring. The extracts were more active against *S. aureus* during summer and autumn (average inhibition halos of 22.6 mm, Fig. 1b) and the lowest activity values were obtained in spring (16.2 mm) when the temperature was recorded at its lowest (19.5 °C).

A similar pattern was observed in *Aplysina fistularis* at Isla Espiritu Santo, B.C.S., which showed a higher antibacterial activity during the warm months (Betancourt-Lozano *et al.*, 1998). Nevertheless, this pattern is not observed in all sponges, e.g. *Agelas* and *Petrosia* from the Mediterranean and *Latrunculia* sp. nov. from New Zealand showed a higher cytotoxic activity during the cold season (Ferretti *et al.*, 2009; Duckworth & Batershill, 2001). A common factor in these studies is that higher bioactivity is shown as a result of a rise on the number of associated organisms, such as competitors or organisms that use the sponge as a settling or fixing substratum (Betancourt-Lozano *et al.*, 1998; Turon *et al.*, 2009; Duckworth & Batershill 2001). This sponge has a significant antibacterial activity that inhibits both Gram-positive and Gram-Negative bacteria. Similar results were observed

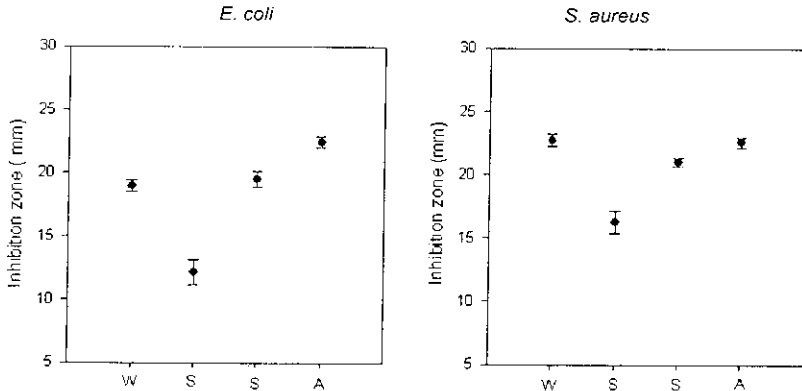


Figure 1. Values of antibacterial activity of *Aplysina gerardogreeni* extracts against strains of *E. coli* and *S. aureus* in different seasons. Bars represent standard error.

with extracts of *Aplysina aerophoba* and *A. lacunosa* (Sepčić *et al.*, 1997; Kazanjian & Fariñas 2006). The above shows that the chemical study of *Aplysina gerardogreeni* has a great potential in the search of pharmacologically active compounds.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

We acknowledge IPN and SEP-CONACYT for the support granted through projects SIP-20090866 and 79707, respectively. English translation by *CICIMAR-Oceánidos*.

#### REFERENCES

- Betancourt-Lozano, M., F. González-Fariñas, B. González-Acosta, A. García-Gasca & J.R. Bastida-Zavala. 1998. Variation of antimicrobial activity of the sponge *Aplysina fistularis* (Pallas 1776) and its relation to associated fauna. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 223: 1-18.
- Duckworth, A.R. & C.N. Battershill. 2001. Population dynamics and chemical ecology of New Zealand Demospongiae *Latrunculia* sp. nov. and *Polymastia croceus* (Poecilosclerida: Latrunculiidae: Polymastiidae). *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 35: 935-949.
- Ferretti, C., S. Vacca, C. De Ciucis, B. Marenco, 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, Petrodiidae). *Mar. Ecol.*, 30: 327-336.
- Kazanjian, A. & M. Fariñas. 2006. Actividades biológicas del extracto acuoso de la esponja *Aplysina lacunosa* (Porifera: Aplysinidae). *Rev. Biol. Trop.*, 54(3): 189-200.
- Munro, M.H.G., J.W. Blunt, E.J. Dumdei, S.J.H. Hickford, R.E. Lill, S. Li, C.N. Battershill & A.R. Duckworth. 1999. The discovery and development of marine compounds with pharmaceutical potential. *J. Biotechnol.*, 70: 15-25.
- 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*. *J. Chem. Ecol.*, 31(5): 1161-1174.
- Pawlik, J.R. 1993. Marine invertebrate chemical defenses. *Chem. Rev.*, 93: 1911-1922.
- Sepčić, K., U. Batista, J. Vacelet, P. Macek & T. Turk. 1997. Biological activities of aqueous extracts from marine sponges and cytotoxic effects of 3-Alkylpyridinium polymers from *Reniera sarai*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 117C: 47-53.
- Turon, X., R. Marti & M.J. Uriz. 2009. Chemical bioactivity of sponges along an environmental gradient in a Mediterranean cave. *Scientia Marina*, 73(2):387-397.

BIBLIOTECA CUCBA