

ESPONJAS MARINAS: ¿PRODUCCIÓN BIOTECNOLÓGICA SOSTENIBLE?

MARINE SPONGES: A SUSTAINABLE BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTION?

LINA BLANDÓN ^{a*}, NATALIA ESTRADA ^a, JUAN LÓPEZ ^b, MARÍA MÁRQUEZ ^b

Recibido 25-06-14, aceptado 15-09-14, versión final 18-09-14.

Artículo Revisión

RESUMEN: El cáncer es una enfermedad con amplia incidencia a nivel mundial. La mayoría de los tumores a través del tiempo se vuelven invasivos y metastásicos y los múltiples tratamientos usados de manera intensa, facilitan la generación de células con resistencia a éstos. Por lo anterior, en las últimas décadas, se ha estimulado la búsqueda de nuevas sustancias con potencial bioactivo para el desarrollo de nuevos fármacos antineoplásicos, lo cual, ha revelado que los organismos marinos, principalmente las esponjas, ofrecen una gama amplia de compuestos con diferentes actividades, incluyendo la antiproliferativa, útiles en el desarrollo de drogas antitumorales. En la producción farmacéutica sostenible, es requisito producir gran cantidad de biomasa y evitar la sobreexplotación de las especies utilizadas, por esa razón, se requieren estrategias que permitan la producción *in vitro* de los metabolitos de interés. En esta revisión, se muestran los principales intentos de producción biotecnológica utilizados en el desarrollo de fármacos provenientes de esponjas marinas y se revisan los estudios genéticos, moleculares y de ciclo celular, encontrados en la literatura científica.

PALABRAS CLAVE: Esponjas marinas, medicamentos, metabolitos, producción de biomasa. (*fuentes: CAB*)

ABSTRACT: Cancer is a disease with extensive worldwide incidence. Most tumors become invasive and metastatic over time; and additionally, the development of drug resistance of the cells due to the multiple forms of treatment is used intensively. Therefore, in recent decades, search for new bioactive substances with potential for development of new anticancer drugs has been stimulated. This pursuit has revealed that marine organisms, mainly sponges, offer a wide range of compounds with different activities, including anti-proliferative potential, useful in the development of antitumor drugs. In sustainable pharmaceutical production is required to produce large amount of biomass and avoid overexploitation of the species used. Thereby, strategies for *in vitro* production of interest metabolites are required. In this review, the major attempts of biotechnological production used in drug development from marine sponges and genetic, molecular

^aM.Sc en Biotecnología. Grupo Biotecnología Animal. Línea Bioactividad de Productos Naturales y Sintéticos. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia sede Medellín.

* email: lmblando@unal.edu.co

^bM.Sc en Biología. Grupo Biotecnología Animal. Línea Bioactividad de Productos Naturales y Sintéticos. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia sede Medellín.

and cell cycle found in the scientific literature are shown.

KEYWORDS: Biomass production, marine sponges, medicines, metabolites. (*Source: CAB*)

1. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, las esponjas marinas se han estudiado intensamente porque han mostrado diversas actividades biológicas, útiles en el desarrollo de nuevos medicamentos contra varias enfermedades incluyendo el cáncer. De acuerdo con la BBC el mercado global de drogas de origen marino alcanzó un valor de \$4,8 billones de dólares en el año 2011, de los cuales \$3 billones provienen de drogas con origen en esponjas marinas, además recientemente se han fundado compañías como porifarma con miras a la producción rentable y sostenible de productos provenientes de esponjas.

No obstante, en la comercialización de medicamentos derivados de organismos marinos, se requieren grandes cantidades de biomasa para la obtención del producto requerido, ya que la producción a gran escala genera sobreexplotación del recurso biológico en el medio natural y pone en peligro la subsistencia de las especies.

El objetivo de este artículo es revisar el estado del arte sobre la biología y genética de las esponjas e incluir los principales avances y perspectivas en el cultivo de organismos o células de esponjas, necesarios en la producción biotecnológica en la industria farmacéutica.

2. ORIGEN Y OBTENCIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS EN LAS ESPONJAS MARINAS

El 30 % de los 18.000 productos naturales marinos descubiertos y el 75 % de los productos naturales antitumorales patentados son derivados de las esponjas. De ese 75 % el 42 % posee actividad antitumoral (Anderson *et al.*, 1997; Aoki *et al.*, 1998; Bai *et al.*, 1993; Blackburn *et al.*, 1999; Bubba *et al.*, 1995; Dunbar *et al.*, 2000; Erickson *et al.*, 1997; Fusetani *et al.*, 1989; De Guzman *et al.*, 1999; Ter Haar *et al.*, 1996; Hirata & Uemura, 1986; Hood *et al.*, 2002; Isbrucker *et al.*, 2003; Juagdan *et al.*, 1995; Kashman *et al.*, 1980; Kitagawa *et al.*, 1983; Koiso *et al.*, 1996; Mooberry *et al.*, 1999; Saito *et al.*, 1994; Wakimoto *et al.*, 1999) (Ver figura 7). Estudiar el origen de los compuestos bioactivos es muy complejo debido a posibles efectos sinérgicos entre metabolitos producidos por las células de las esponjas y sus simbiontes por la interacción entre ellos. La cantidad de metabolito puede variar según la estación, temperatura, intensidad lumínica, entre otros factores; además se requiere la identificación de la vía y las condiciones de producción cuando se desea realizar producción *in vitro*.

Algunos autores establecen que los metabolitos secundarios producidos por las esponjas son inducidos por competencia de espacio con otros organismos, (Koopmans *et al.*, 2009). Además, se ha observado correlación entre alta predación y la toxicidad de los compuestos producidos (Proksch, 1994). Diversos estudios muestran que los organismos o sus extractos son disuasivos de predadores como los peces (Becerro *et al.*, 2003; Thoms & Schupp, 2008) y que las concentraciones de los metabolitos bioactivos en las esponjas, dependen de factores ambientales como la variación de temperatura, estación, localización, factores de estrés, transplante, infección o diferentes dietas (Lopez *et al.*, 2005). Además, la defensa química inducida por cicatrización o la lentitud de regeneración en una herida (Sipkema *et al.*, 2005a; Thoms and Schupp, 2008) se han considerado procesos antagónicos con la producción de metabolitos.

Por otro lado, es necesario identificar los genes involucrados en la producción de metabolitos, lo cual puede realizarse por comparación de la expresión de genes e inducción de metabolitos, a través de la metagenómica (Kennedy *et al.*, 2007). Diferentes estudios han mostrado que los compuestos bioactivos están almacenados en diferentes partes de la esponja, tales como la capa externa en *Cascosponia sp.*, (Wijffels, 2008), en la capa inferior de *Ectyoplasia ferox* (Kubanet *et al.*, 2002) o en la capa superior de *Rhoadoloides oridabile* (Thompson *et al.*, 1997). Otros estudios han localizado los componentes bioactivos en diferentes tipos celulares de la esponja y sus simbioses, mediante el clasificador de células (Garson *et al.*, 1998) centrifugación en gradiente de densidad (Uriz *et al.*, 1996); sin embargo, se desconoce en qué tipo de células se producen los metabolitos y sus intermediarios (Koopmans *et al.*, 2009).

3. SOBRE LA BIOLOGÍA DE LAS ESPONJAS

Con el fin de realizar una adecuada bioprospección, es requisito conocer la biología y la química de los organismos de interés. Las esponjas marinas pertenecen al *Phylum Porifera*, son invertebrados sésiles que crecen sobre un sustrato, no poseen tejidos, órganos ni sistemas, pero están conformados por células especializadas que cumplen diversas funciones. En su mayoría, las esponjas son de origen marino, sin embargo, en los ríos se ha reportado una pequeña familia de la clase Demospongiae (Proksch, 1994). Taxonómicamente, las esponjas pertenecen a 4 clases, 21 órdenes, 107 géneros y alrededor de 10.000 especies clasificadas como: Calcáreas o Calcispongiae, Hexactinellida o Hyalpospongiae y Demospongiae (<http://www.marinespecies.org/porifera/>)

Las esponjas poseen un tejido externo o pinacodermo formado por pinacocitos, células epiteliales que secretan sustancias para fijación a un sustrato. Cerca al pinacodermo está el mesohilo, capa de células ameboides secretoras, tales como arqueocitos (fagocitarios), colenocitos (fibras de colágeno), esclerocitos (espículas) y los espongiocitos (esqueletos de espongina). Las esponjas obtienen su alimento de las corrientes de agua generadas por los coanocitos, las cuales transportan alimento, oxígeno y ayudan a diluir los desechos liberados durante la digestión (Miller-Harley, 2001).

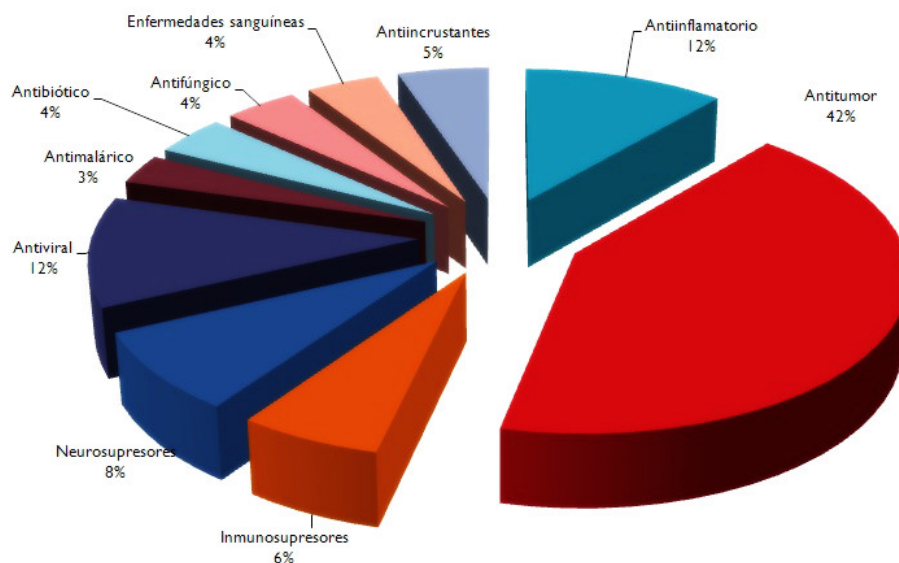


Figura 1: Principales bioactividades de metabolitos provenientes de esponjas marinas.

La mayoría de las esponjas se reproducen sexualmente y son organismos monoicos, pero un número pequeño de especies se reproducen asexualmente o de ambas formas. La reproducción asexual se da principalmente por gemación, gemulación o fragmentación, mientras que en la reproducción sexual, se ha reportado que la espermatogonia se deriva de los coanocitos, en unos casos, y en otros casos de los arqueocitos como la clase Hexactinellida. Otros reportes muestran que la oogonia se deriva de coanocitos en muchas esponjas calcáreas y de arqueocitos en demosponjas y hexactinélidas; y también se ha reportado que los pinacocitos originan la oogonia en la esponja calcárea *Ascandra minchini*. (Maldonado & Riesgo, 2008).

Las esponjas pueden ser ovíparas (desarrollo del embrión externo) o vivíparas, las cuales crían sus embriones en el mesohilo hasta su liberación a través de canales acuíferos. En el invierno, ocurre la formación de gémulas liberadas de la esponja en descomposición y pueden sobrevivir en condiciones extremas. En condiciones favorables de la primavera, las células ameboides emergen de la gémula para generar una nueva esponja (Miller-Harley, 2001).

4. ESTUDIOS GENÉTICOS MOLECULARES Y DE CICLO CELULAR EN ESPONJAS

No hay datos concluyentes sobre el DNA y los cromosomas de las esponjas; aun así, se requiere investigar sobre la genética y el ciclo celular de estos organismos, con el fin de obtener elementos para el desarrollo de una línea celular inmortal.

El primer cariotipo obtenido en arqueocitos de la esponja de agua dulce *Spongilla lacustris* mostró nueve pares de cromosomas subdivididos en cinco clases: cromosomas con tamaños desde 2.1 hasta 0.7 μm ; sin embargo, fue difícil ubicar el centrómero en cada cromosoma. Además se visualizó un gran nucleólo de 2.5 μm y se determinó el índice mitótico de 2.5 % en gémulas germinadas después de 14 días del cultivo de arqueocitos. En 1995, se reportó el tamaño del genoma de las esponjas marinas *Suberites domuncula* y *Geodia cydonium* y el $2n=32$ cromosomas de *S. domuncula* con la técnica citogenética convencional, mientras que los cromosomas de *G. cydonium* no fueron visualizados (Imsiecke *et al.*, 1995). Por otro lado, se ha reportado mosaicismo en el número cromosómico de *Scopalina lophyropoda* en la que se han encontrado 36 diferentes genotipos multilocus en 13 individuos colectados en cuatro puntos distantes de la misma zona. Este es el primer reporte de la variabilidad cariotípica que se muestra en los análisis genéticos realizados (Maldonado, 1998).

De otro lado, no es fácil separar los ácidos nucleicos de la esponja y sus simbiontes lo cual dificulta el estudio de los genomas. La primera secuenciación completa del genoma de la esponja *Amphimedon queenslandica* fue realizado en Australia (De Flora *et al.*, 1995; Juagdan *et al.*, 1995). El análisis de secuencia del RNAr 28S de individuos de esponjas reveló relaciones filogenéticas inesperadas (Lafay *et al.*, 1992) y las ubica en tres grupos e incluye el *Phylum Porifera* en la filogenia de los metazoos (Rodrigo *et al.*, 1994). Por otro lado, la secuenciación de los genes del receptor de lectina (Pfeifer *et al.*, 1993), tirosina quinasa (Schäcke *et al.*, 1994) y un receptor nuclear (Kruse *et al.*, 1994) de *G. cydonium* muestran homología con los genes correspondientes en vertebrados, sugiriendo el origen monofilético de los metazoos (Müller *et al.*, 1995). También, fueron determinados, mediante la técnica de secado al aire, los cariotipos de *Spongilla lacustris* ($2n=18$) y de *S. domuncula* ($2n=32$) (Imsiecke *et al.*, 1993; Imsiecke *et al.*, 1995), sin embargo, no han sido estudiadas sus estructuras cromosómicas. (Ottillie *et al.*, 1992) también reportó la clonación del gen *src* de *Spongilla lacustris* y su gran similitud con este grupo.

Desde el 2011 han surgido publicaciones sobre la evaluación de ciclo celular mediante citometría de flujo en cinco especies de esponjas usando como referencia el conocimiento del ciclo celular en mamíferos. Esos estudios reportan fracciones de células en fases G_0/G_1 , G_2/M y fracciones apoptóticas, la duración de los cultivos y el comportamiento celular de esponjas *in vitro*. Actualmente, la investigación se enfoca en la búsqueda de genes involucrados en apoptosis, en vías de señalización

conocidas, buscando información sobre la gran fracción de células apoptóticas presentes en algunas especies de esponjas (Schippers *et al.*, 2011). Esto es particularmente importante porque la mayoría de esponjas viven durante largos períodos, algunas superan los 1500 años (Koiso *et al.*, 1996; Lehnert & Reitner, 1987), lo cual es consistente con que la mayoría de las células de esponjas son positivas para la enzima telomerasa (Koziol *et al.*, 1998) pero no se han reportado neoplasias en éstas (De Flora *et al.*, 1995), sin embargo, cuando las células pierden contacto con sus vecinas, pierden su actividad telomerasa e inician procesos de apoptosis (Imsiecke *et al.*, 1995; Wagner *et al.*, 1998).

Numerosos estudios genéticos en esponjas han mostrado los procesos evolutivos de la estructura del gen y las familias de genes múltiples asociadas con la multicelularidad (Iwabe *et al.*, 1996; Müller *et al.*, 1998; Patthy *et al.*, 2003; Larroux *et al.*, 2007). Reportes iniciales registraron el número meiótico o mitótico de varias especies usando preparación de secciones de tejido (Makino *et al.*, 1951). En Japón, se han reportado los cariotipos de veinticinco esponjas de aguadulce de la familia *Spongillidae* incluyendo varias especies cosmopolitas (Manconi & Pronzato, 2007). La mayoría de esas esponjas producen gémulas e *in vitro* pueden formar un nuevo individuo en pocos días. Este sistema de cultivo favorece la preparación de cromosomas y reduce la contaminación de otros organismos usualmente presentes en los poros de la esponja.

Otro estudio en la familia *Spongillidae* revela los cariotipos, bandeo cromosómico y tinción convencional de Giemsa de diez especies de esponjas de agua dulce. Estas especies muestran similitud en los números diploides y en la morfología cromosómica. Las especies *Ephydatia fluviatilis*, *Ephydatia muelleri*, *Eunaplys fragilis*, *Eunaplys sp.*, *Spongilla lacustris*, *Radiospongilla sendai*, *Trochospongilla pennsylvanica*, *Heterorotula multidentata* exhiben cariotipos similares $2n=46$, mientras que *Spongilla alba* y *Radiospongilla cerebellata* muestran $2n=48$, con un par adicional de microcromosomas, posiblemente como resultado de una duplicación independiente o un evento de fisión en cada linaje (Ishijima *et al.*, 2008). Las técnicas de bandeo R o con fluorocromo no permitieron la identificación de los cromosomas debido a su pequeño tamaño, pero la técnica replicativa de Perry y Wolff (Perry & Wolff, 1974) permitió identificar algunos pares de cromosomas. De otro lado, el análisis de reasociación del DNA nuclear de *G. cydonium* indicó que su genoma es consistente con una sola copia (Bartmann-Lindholm *et al.*, 1997). De otro lado, estudios genómicos de hibridación de DNA-DNA y secuenciamiento de nucleótido al azar de *S. domuncula* (Wiens *et al.*, 2005) no mostraron elementos transponibles SINEs.

Mirsky y Ris (1951) midieron el tamaño del genoma de *Dysidea crawshagi* usando densitometría Feulgen, mientras que Imiescke y sus colaboradores, (1995) registraron variación en el tamaño del genoma de *G. cydonium* y *S. domuncula* a pesar de pertenecer a la misma Clase Desmospongiae. Esas diferencias pueden ser parcialmente explicadas por diferencias metodológicas pero existe gran

divergencia de la Clase.

5. METODOLOGÍAS UTILIZADAS PARA PRODUCIR METABOLITOS DE INTERÉS

El cultivo de la esponja completa es uno de los sistemas más promisorio para la producción en masa de metabolitos bioactivos. Por ejemplo, se han obtenido 3 kg de avarol por peso húmedo de *Dysidea avara* (Juagdan *et al.*, 1995); además, se determinó que el cultivo en el mar es más barato que en tierra (Angerhofer *et al.*, 1992; Koopmans *et al.*, 2010). Algunos estudios han demostrado que el costo de la producción de metabolitos puede ser muy variable (Koiso *et al.*, 1996; Uriz *et al.*, 1996; Kobayashi *et al.*, 1997; Lehnert & Reitner, 1987; Kurelec *et al.*, 1992; Koopmans *et al.*, 2009). A pesar de que el cultivo en el medio marino es el que ha mostrado mayor tasa de crecimiento, no es deseable, porque las esponjas son susceptibles a enfermedades y parásitos; por esa razón los estudios se han enfocado en los requerimientos nutricionales para el cultivo *in vitro* en condiciones de asepsia y esterilidad.

Por otro lado, es necesario tener en cuenta la productividad, es decir qué cantidad de metabolito puede ser obtenido a partir de una cantidad dada de biomasa a la hora de establecer una metodología de producción que tenga como punto de partida la producción de biomasa. Sipkema *et al.* (2005b) encontraron que la producción de avarol a partir de la esponja *Dysidea avara* mediante el acuacultivo o el uso de acuarios es una alternativa viable pues hay una alta productividad, mientras que, ninguna de estas opciones es buena para la producción de la halicondrina B a partir de *Lissodendoryx sp.*, ya que su productividad es baja.

El cultivo *in vitro* de células o tejidos disgregados de las esponjas ofrecen un sistema limpio para generar metabolitos; no obstante la producción de líneas celulares inmortales, a partir de los arqueocitos, células pluripotentes, principales candidatos para obtener estas líneas, no ha sido posible a la fecha. Faltan investigaciones al respecto, aunque se han evaluado las células embrionarias, que también se consideran promisorias para el desarrollo de líneas inmortales (Kurelec *et al.*, 1992). La dificultad principal en la selección de las líneas celulares, es que no se dividen continuamente y no se conocen los factores que influyen en su crecimiento (Hirata & Uemura, 1986; Muller *et al.*, 1985), es decir, pueden tener un crecimiento lento neto a causa de división celular y una alta tasa de apoptosis (Koopmans *et al.*, 2009).

En la figura 2, se resumen los principales intentos de producción en masa de metabolitos de interés producidos por las esponjas marinas.

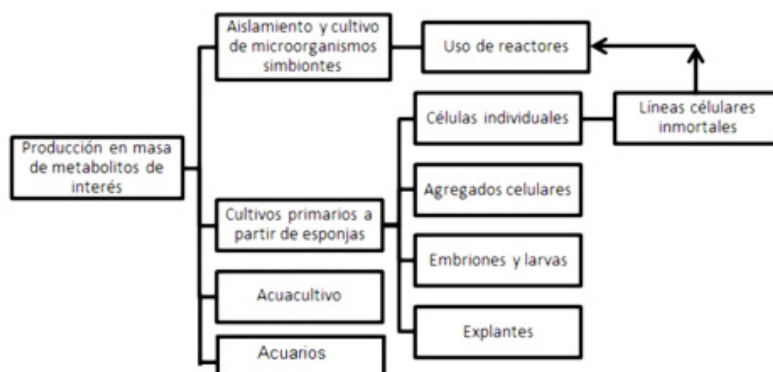


Figura 2: Intentos de producción en masa de metabolitos de interés producidos por esponjas marinas.

5.1. Acuacultivo

Una de las alternativas para la producción en masa de metabolitos de interés a partir de esponjas marinas es el desarrollo de tecnologías agrícolas basadas en el sistema de acuacultivo, en este sistema las esponjas son cortadas en fragmentos pequeños (explantes) colgadas en cuerdas y suspendidas en el océano, a partir de los cuales se formará un organismo adulto (Ichiba *et al.*, 1991). Duckworth *et al.* (2003) desarrollaron dos metodologías para la producción a gran escala de metabolitos de interés mediante el acuacultivo de las esponjas *Latrunculia sp. Nov*, *Polymastia croceus* y *Raspailia agminata*, provenientes de Nueva Zelanda una de las metodologías consistió en el cultivo de explantes enroscados en cuerdas de polivinil alcohol y la otra en el cultivo de los mismos en bolsas individuales compuestas de mallas de diferentes tamaños; sin embargo, el sistema de acuacultivo no ha sido totalmente exitoso ya que las condiciones no pueden ser controladas y se genera un alto impacto ambiental; aun así, ha sido el primer intento para obtener un cultivo celular de esponjas y adaptarlo a sistemas *in vitro* como acuarios o biorreactores (Osinga, 2003).

5.2. Acuarios

El uso de acuarios (*Cultivo ex situ*) proporciona un mejor control de las condiciones de cultivo, aun así es necesario tener conocimiento de las condiciones ambientales y ecológicas óptimas necesarias para el crecimiento de las esponjas en un sistema no natural (Belarbi *et al.*, 2003).

Pérez-López *et al.* (2014) desarrollaron un proceso *in vivo* para la producción de crambescina y crambescidina sustancias consideradas como potenciales drogas anticáncer debido a su actividad citotóxica y antiviral a partir de la esponja marina del mediterráneo *Crambe crambe*; el proceso consistió en el cultivo de la esponja en un sistema *ex situ* (Acuario), seguido de la extracción periódica de estos biocompuestos manteniendo el organismo vivo, seguidamente se evaluó el impacto

ambiental de acuerdo con la metodología de la evaluación del ciclo de vida (LCA por sus siglas en inglés, Normas ISO, 14040 2006), encontrando como principales problemas el uso de grandes cantidades de metanol durante el proceso de purificación y las altas necesidades de electricidad debido a la continua iluminación del acuario, para ello se plantearon algunas alternativas como la reducción del uso de la electricidad mediante el uso de diodos emisores de luz y de energías renovables y la reutilización del metanol.

5.3. Aislamiento y cultivo de microorganismos simbiotes

Si los metabolitos de interés son producidos por los simbiotes de una esponja, ¿Es útil el aislamiento de dichos microorganismos?. El grupo de Hill *et al.* (2005) aisló *Micromonospora sp.* a partir de la esponja *Acanthostrongylophora sp.* del cual obtuvieron, en ausencia de la esponja, el compuesto bioactivo manzamina con propiedades antimaláricas. La gran mayoría de bacterias asociadas a las esponjas no son fáciles de cultivar, por eso se ha utilizado la identificación de la fuente biosintética de los metabolitos secundarios de interés mediante la metagenómica a partir de la extracción directa de DNA y su posterior clonación en otros microorganismos. Por otro lado, se han modificado cepas de *Escherichia coli* para producir precursores de policétidos y se han realizado clonaciones con *Pseudomonas putida* (Kennedy *et al.*, 2007).

5.4. Cultivos primarios a partir de explantes

Las esponjas tienen capacidad regenerativa la cual es aprovechada en estos cultivos, pero se ha reportado que los explantes muestran tasas de crecimiento muy lentas y variables lo cual puede estar relacionado con las diferentes edades de las esponjas de donde fueron extraídos (Hill *et al.*, 2005). Sin embargo, la falta de conocimiento de la biología celular, no permite tener un protocolo único de manejo *in vitro* de las diferentes especies. Esta es una gran limitante, ya que los protocolos conocidos y aplicados a células vegetales y células de mamífero han requerido la acumulación de una gran experiencia de muchas décadas que han hecho posible los resultados exitosos que hoy conocemos en ambos sistemas celulares.

5.5. Cultivos de células de esponjas a partir de células individuales

Para desarrollar cultivos de células de esponjas se han utilizado los avances obtenidos en los cultivos *in vitro* de células de mamíferos en medios definidos, sin embargo hasta el momento, sólo se han logrado cultivos primarios con baja densidad celular por corto tiempo. Varios autores, en un intento por mejorar las condiciones de cultivo, han evaluado variables como el pH, la temperatura, la luz y el suplemento del medio de cultivo con componentes como ácidos grasos, retinol, colesterol, entre otros, no obstante, todavía no se han definido las condiciones mínimas adecuadas para el cultivo de estas células. Algunos autores, reportan intentos de cultivos celulares a partir de

arqueocitos, considerados similares a las células madre, pero con muerte temprana (Hill *et al.*, 2005).

En el establecimiento de cultivos celulares a partir de células de esponjas, el principal problema es la contaminación por microorganismos o una variedad de protozoos que comparten el ecosistema marino con las esponjas (Osinga, 2003). Por otro lado, sigue el interrogante, ¿Dónde se producen los compuestos bioactivos, en las esponjas?, ¿En los microorganismos simbiotes? o ¿De la simbiosis entre ellos? (Wijffels, 2008). Estas tres posibilidades parecen viables en los distintos grupos ya que depende más de la historia evolutiva de cada taxa y de las interrelaciones que haya establecido a través de su existencia como especie.

Por otro lado, se utilizó fitohemaglutinina en un cultivo *in vitro* de células de la esponja *Hymeniacidon heliophila*, estimulador de la división en linfocitos humanos de sangre periférica y otros vertebrados que se encuentran en G_0 , con el fin de incrementar el crecimiento de las células de la esponja (Caralt *et al.*, 2007a); aun así los resultados no son muy promisorios.

Estos estudios muestran los intentos que se han realizado usando el conocimiento disponible de otras especies en las cuales se han estandarizado estos protocolos, obteniendo resultados que todavía deben ser comprendidos.

5.6. Cultivos de células de esponjas a partir de agregados celulares

Desde 1907 se descubrió la habilidad de las células de esponjas marinas disociadas mecánicamente para formar agregados funcionales denominados “primorfos” (Osinga, 2003). Estos agregados esféricos envueltos con una capa continua de células del pinacodermo, alcanzan un diámetro entre 1-2 mm, se conservan por más de cinco meses en agua de mar artificial, permiten diferenciar las células de las esponjas de posibles protozoarios y adicionalmente conservan su actividad telomerasa, lo cual no se observa en células individuales. En la producción de agregados, es crucial el tipo de antibiótico usado en los cultivos; por ejemplo, la presencia de anfotericina ó un coctel de kanamicina, gentamicina, tilosina y tetraciclina inhibe la formación de agregados, mientras que la presencia de gentamicina ó una mezcla de penicilina y estreptomycinina permite su formación, pero no controla la contaminación por hongos, aun así, en estas condiciones, se ha reportado la formación de agregados a partir de una suspensión celular de la esponja *Stylissa massa* (Osinga, 2003).

5.7. Cultivos celulares a partir de embriones y larvas

En la preparación de una línea celular continua proveniente de células de esponjas marinas, las principales dificultades reportadas son la supervivencia, la contaminación y las tasas de crecimiento variables. Por otro lado, para optimizar las condiciones de cultivo sería deseable que los explantes

tuvieran la misma edad, a pesar de que no es directamente relacionada con el tamaño de una esponja adulta. Por esta razón, investigaciones recientes se han enfocado en obtener cultivos celulares a partir de embriones y las larvas, metodología promisorio para el cultivo celular porque puede realizarse durante el periodo máximo de crecimiento, permitiendo la optimización de las condiciones de cultivo (Hill *et al.*, 2005). Además, los embriones proveen células madre, más resistentes a infecciones que las células adultas.

5.8. Uso de reactores

Una metodología muy prometedora para el cultivo de esponjas es el uso de reactores en sistema continuo en el cual las esponjas se cultivan empleando algas como alimento. El cuerpo de la esponja crece alrededor de un sistema de canales y cámaras a través de los cuales se bombean grandes volúmenes de agua que llevan el alimento (Ichiba *et al.*, 1991). En la mayoría de los cultivos celulares realizados en biorreactor, se requiere conocer la concentración de carbono y oxígeno empleada en el crecimiento del organismo, aun así, en un estudio realizado en la esponja *Haliclona oculata* se demostró que la ausencia de oxígeno y carbono no son limitantes del crecimiento de esta esponja (Koopmans *et al.*, 2010). A pesar de estos reportes, se requiere gran conocimiento de la especie de interés antes de considerar la producción de biomasa a gran escala, ya que estos procedimientos resultan de por sí muy costosos y realizar ensayos al azar encarece aún más la producción.

El uso de reactores sería muy útil una vez se hayan determinado los requerimientos mínimos de los medios de cultivo para crecimiento *in vitro*, establecido las líneas celulares inmortales o se hayan modificado dichas líneas incorporando genes de interés para producción de compuestos específicos.

5.9. Modificación genética de líneas celulares inmortales en la producción de metabolitos

La tecnología del DNA recombinante podría mejorar la supervivencia celular en líneas celulares de esponjas una vez se resuelvan los interrogantes que se han planteado con respecto a los requerimientos mínimos de cultivo y se tenga más información sobre la biología celular y la genética de las esponjas. Las líneas celulares de mamíferos e insectos pueden ser obtenidas directamente de un tumor y usualmente son immortalizadas por inducción artificial de hibridación de células normales con tumorales (hibridomas) o por exposición a agentes mutagénicos o transfección con oncogenes (Hill *et al.*, 2005). En ese sentido, se han realizado intentos de identificar la familia de genes *ras* encargados del control de crecimiento, diferenciación y supervivencia, con el fin de realizar mutagénesis dirigida o sobreexpresión de los genes *ras* e inducir transformación celular para el logro de las líneas celulares inmortales (Pomponi & Willoughby, 1994). Los genes similares a *ras* se han encontrado en algunas especies de esponjas marinas que incluyen *S. domuncula* (Grasela *et al.*, 2012), *G. cydonium* (Konig & Wright, 1996) pero en otras especies, los resultados no han

sido exitosos (Pomponi & Willoughby, 1994). Por otro lado, estrategias como la metagenómica permite identificar los fragmentos de genes claves en la producción de los compuestos bioactivos producidos por las esponjas y sus simbiontes y la potencial transferencia a un huésped adecuado para su producción.

6. PERSPECTIVAS DE LA PRODUCCIÓN SOSTENIBLE DE METABOLITOS

Como se ha mencionado antes, debe continuar la investigación de la biología celular básica de las esponjas antes de emprender protocolos estándares para la producción de metabolitos de interés a gran escala. La amplia variedad de especies de esponjas, los distintos hábitats, las diferentes interrelaciones con microorganismos, algas y protozoos, hacen de este grupo de metazoos un inmenso mundo de investigación y más si se quieren establecer líneas celulares inmortales que cumplan con los parámetros de producción de metabolitos útiles en distintas aplicaciones biomédicas, especialmente en la producción de fármacos comercializables contra el cáncer.

La alta capacidad de proliferación de las células de esponjas sugiere su facilidad para establecer líneas celulares *in vitro*; sin embargo, las suspensiones celulares no han mostrado un comportamiento de proliferación rápido (Cetkovic *et al.*, 1998); adicionalmente, los distintos intentos experimentales reportados no clasifican como cultivos primarios de acuerdo al conocimiento que se tiene en las células de mamífero (Custodio *et al.*, 1998). Algunas razones sobre el fracaso en estos ensayos de cultivo *in vitro*, podrían ser la técnica empleada en el establecimiento del cultivo y las condiciones de cultivo empleadas. El uso de fitohemaglutinina para estimular la proliferación celular en las esponjas marinas, no ha sido apropiado posiblemente porque los receptores en la superficie celular no son activados por ligandos presentes en él (Freshney, 2005). La preparación de medios de cultivo variando las concentraciones y composición de los suplementos de vitaminas, aminoácidos, sales, glucosa, suplementos inorgánicos, hormonas, antibióticos, entre otros, no han permitido el diseño apropiado de un medio estándar en el que las células de las esponjas puedan crecer continuamente (De Caralt *et al.*, 2007b).

En la medida en la que se comiencen a desarrollar las líneas celulares inmortales derivadas de esponjas, se requiere implementar técnicas de cultivo en reactores, esto con el fin de tener cantidad suficiente de biomasa y asegurar la homogeneidad del cultivo. Por último, se requieren además, la caracterización de los genes involucrados en el metaboloma de interés y las técnicas de purificación y caracterización del metabolito de interés. Estas perspectivas requieren un equipo humano con fortalezas científicas y técnicas en las distintas áreas de biología celular y molecular, química, bioquímica e ingeniería de bioprocesos.

Referencias

- Anderson, H. J.; Coleman, J. E.; Andersen, R. J. & Roberge, M. (1997), Cytotoxic peptides hemiasterlin, hemiasterlin A and hemiasterlin B induce mitotic arrest and abnormal spindle formation. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 39, 223–226.
- Angerhofer, C. K.; Pezzuto, J. M.; König, G. M.; Wright, A. D. & Sticher, O. (1992), Antimalarial activity of sesquiterpenes from the marine sponge *Acanthella kletthra*. *Journal of Natural Products*, 55 (12), 1787–1789.
- Aoki, S.; Yoshioka, Y.; Miyamoto, Y.; Higuchi, K.; Setiawan, A.; Murakami, N.; Chen, Z. S.; Sumizawa, T.; Akiyama, S. & Kobayashi, M. (1998), Agosterol A, a novel Polyhydroxylated sterol acetate reversing multidrug resistance from a marine sponge of *Spongia* sp. *Tetrahedron Lett.*, 39, 6303–6306.
- Bai, R.; Cichacz, Z. A.; Herald, C. L.; Pettit, G. R., & Hamel, E. (1993), Spongistatin 1, a highly cytotoxic, sponge-derived, marine natural product that inhibits mitosis, microtubule assembly, and the binding of vinblastine to tubulin. *Mol. Pharmacol.* 44, 757–766.
- Bartmann-Lindholm, C.; Geisert, M.; Güngerich, U.; Müller, W. E. G. & Weinblum, D. (1997), Nuclear DNA fractions with grossly different base ratios in the genome of the marine sponge *Geodia cydonium*. *J. Colloid. Polymer Sci.* 107, 122–126.
- BBC Research: <http://www.bccresearch.com/market-research/pharmaceuticals/marine-derived-pharma-markets-phm101a.html>
- Becerro, M. A.; Thacker, R. W.; Turon, X.; Uriz, M. J. & Paul, V. J. (2003), Biogeography of sponge chemical ecology: comparisons of tropical and temperate defenses. *Oecologia*, 135, 91–101.
- Belarbi, E. H.; Contreras Gómez, A.; Chisti, Y.; García Camacho, F. & Molina Grima, E. (2003), Producing drugs from marine sponges. *Biotechnol. Adv.* 21, 585–598.
- Blackburn, C. L.; Hopmann, C.; Sakowicz, R.; Berdelis, M. S.; Goldstein, L. S. B. & Faulkner, D. J. (1999), Adociasulfates 1-6, inhibitors of kinesin motor proteins from the sponge *Haliclona* (aka *Adocia*) sp. *J. Org. Chem.* 64, 5565–5570.
- Bubb, M. R.; Spector, I.; Bershadsky, A. D. & Korn, E. D. (1995), Swinholid A is a microfilament disrupting marine toxin that stabilizes actin dimers and severs actin filaments. *J. Biol. Chem.* 270, 3463–3466.
- Cetkovic, H.; Müller, I. M.; Müller, W. E. G. & Gamulin, V. (1998), Characterization and phylogenetic analysis of a cDNA encoding the Fes/FER related non-receptor protein-tyrosine kinase in the marine sponge *Sycon raphanus*. *Gene*, 216, 77–84.

- Custodio, M. R.; Prokic, I.; Steffen, R.; Koziol, C.; Borojevic, R.; Brümmer, F.; Nickel, M. & Müller, W. E. G. (1998), Primmorphs generated from dissociated cells of the sponge *Suberites domuncula*: a model system for studies of cell proliferation and cell death. *Mech Ageing Dev.* 105, 45–59.
- De Caralt, S.; Uriz, M. J. & Wijffels, R. H. (2007a), Cell culture from sponges: pluripotency and immortality. *Trends Biotechnol.* 25, 467–471.
- De Caralt, S.; Otjens, H.; Uriz, M. J. & Wijffels, R. H. (2007b), Cultivation of sponge larvae: settlement, survival, and growth of juveniles. *Mar. Biotechnol.* 9, 592–605.
- De Flora, S.; Bagnasco, M.; Bennicelli, C.; Camoirano, A.; Bojnemirski, A. & Kurelec, B. (1995), Biotransformation of genotoxic agents in marine sponges. Mechanisms and modulation. *Mutagenesis*, 10, 357–364.
- De Guzman, F. S.; Carte, B.; Troupe, N.; Faulkner, D. J.; Harper, M. K.; Concepcion, G. P.; Mangalindan, G. C.; Matsumoto, S. S.; Barrows, L. R. & Ireland, C. M. (1999), Neoamphimedine: A new Pyridoacridine Topoisomerase II inhibitor which catenates DNA. *ChemInform*, 64(4), 1400–1402.
- Duckworth, A. & Battershill, C. (2003), Sponge aquaculture for the production of biologically active metabolites: the influence of farming protocols and environment. *Aquaculture*, 221, 311–329.
- Dunbar, D. C.; Rimoldi, J. M.; Clark, A. M.; Kelly, M. & Hamann, M. T. (2000), Anti-Cryptococcal and nitric oxide synthase inhibitory Imidazole alkaloids from the calcareous sponge *Leucetta cf chagosensis*. *Tetrahedron*, 56, 8795–8798.
- Erickson, K. L.; Beutler, J. A.; Cardellina II, J. H. & Boyd, M. R. (1997), Salicylhalamides A and B, novel Cytotoxic Macrolides from the marine sponge *Haliclona* sp. *J. Org. Chem.* 62, 8188–8192.
- Freshney, R. I. (2005), *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. 5th ed. John Wiley & Sons.
- Fusetani, N.; Yasumuro, K.; Matsunaga, S. & Hashimoto, K. (1989), Mycalolides A – C, hybrid macrolides of ulapualides and halichondramide, from a sponge of the genus *Mycale*. *Tetrahedron Lett.* 30, 2809–2812.
- Garson, M. J.; Flowers, A. E.; Webb, R. I.; Charan, R. D. & McCaffrey, E. J. (1998), A sponge/dinoflagellate association in the haplosclerid sponge *Haliclona* sp.: Cellular origin of cytotoxic alkaloids by Percoll density gradient fractionation. *Cell Tissue Res.* 293, 365–373.
- Grasela, J. J.; Pomponi, S. A.; Rinkevich, B. & Grima, J. (2012), Efforts to develop a cultured sponge cell line: revisiting an intractable problem. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 48(1), 12–20.

- Hill, R. T. Manzamine-producing actinomycetes. United States Patent Application 20050244938
- Hirata, Y. & Uemura, D. (1986), Halichondrins - antitumor polyether macrolides from a marine sponge. *Pure Appl. Chem.* 58, 701–710.
- Hood, K. A.; West, L. M.; Rouwé, B.; Northcote, P. T.; Berridge, M. V.; Wakefield, S. J. & Miller, J. H. (2002), Peloruside A, a novel antimitotic agent with paclitaxel-like microtubule- stabilizing activity. *Cancer Res.* 62, 3356–3360.
- Ichiba Yoshida, W. Y.; Scheuer, P. J.; Higa, T. & Gravalos, D. G. (1991), Hennoxazoles: Bioactive bisoxazoles from a marine sponge. *Journal of the American Chemical Society*, 113(8), 3173–3174.
- Insiecke, G.; Pascheberg, U. & Müller, W. E. G. (1993), Preparation and karyotype analysis of mitotic chromosomes of the freshwater sponge *Spongilla lacustris*. *Chromosoma*, 102, 724–727.
- Insiecke, G.; Custodio, M.; Borojevic, R.; Steffen, R.; Moustafa, M. A. & Muller, W. E. (1995), Genome size and chromosomes in marine sponges [*Suberites Domuncula*, *Geodia Cydonium*]. *Cell Biol Int.* 19, 995–1000.
- Isbrucker, R. A.; Cummins, J.; Pomponi, S. A.; Longley, R. E. & Wright, A. E. (2003), Tubulin polymerizing activity of dictyostatin-1, a polyketide of marine sponge origin. *Biochem. Pharmacol.* 66, 75–82.
- Ishijima J.; Iwabe N.; Masuda Y.; Watanabe Y. & Matsuda, Y. (2008), Sponge Cytogenetics-Mitotic chromosomes of ten species of freshwater sponge. *Zoological Science*, 25(5), 480–486.
- Iwabe, N.; Kuma, K. & Miyata, T. (1996), Evolution of gene families and relationship with organismal evolution: rapid divergence of tissue-specific genes in the early evolution of chordates. *Mol Biol Evol.* 13, 483–493.
- Juagdan, E. G.; Kalidindi, R. S.; Scheuer, P. J. & Kelly-Borges, M. (1995), Elenic acid, an inhibitor of topoisomerase 2, from a sponge, *Plakinastrella* sp. *Tetrahedron Lett.* 1, 2905–2908.
- Kashman, Y.; Groweiss, A. & Shmueli, U. (1980), Latrunculin, a new 2-thiazolidinone macrolide from the marine sponge *latrunculia magnifica*. *Tetrahedron Lett.* 21, 3629–3632.
- Kennedy, J.; Marchesi, J. R. & Dobson, A. D. (2007), Metagenomic approaches to exploit the biotechnological potential of the microbial consortia of marine sponges. *Appl Microbiol Biotechnol.* 75, 11–20.
- Kitagawa, I.; Kobayashi, M.; Kitanaka, K.; Kido, M. & Kyogoku, Y. (1983), Marine Natural Products. XII. On the Chemical Constituents of the Okinawan Marine Sponge *Hymeniacidon aldis*. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, 31, 2321–2328.

- Kobayashi, M.; Higuchi, K.; Murakami, N.; Tajima, H.; Aoki, S. & Callystatin, A. (1997), A potent cytotoxic polyketide from the marine sponge, *Callyspongia truncata*. *Tetrahedron Lett.* 38(16), 2859–62.
- Koiso, Y.; Morita, K.; Kobayashi, M.; Wang, W.; Ohyabu, N. & Iwasaki, S. (1996), Effects of arenastatin A and its synthetic analogs on microtubule assembly. *Chem. Biol. Interact.* 102, 183–191.
- König, G. M. & Wright, A. D. (1996), Marine natural products research: current directions and future potential. *Planta Med.* 62, 193–211.
- Koopmans, M.; Martens, D. & Wijffels, R. H. (2009), Towards commercial production of sponge medicines. *Mar. Drugs.* 7, 787–802.
- Koopmans, M.; Martens, D. & Wijffels, R. H. (2010), Growth efficiency and carbon balance for the sponge *Haliclona oculata*. *Mar. Biotechnol. (NY)*. 12(3), 340–349.
- Koziol, C.; Borojevic, R.; Steffen, R.; Müller, W. E. G. & Sponges Müller, W. E. G. (1998), Sponges (Porifera) model systems to study the shift from immortal to senescent somatic cells: the telomerase activity in somatic cells. *Mech. Ageing. Develop.* 100, 107–120.
- Kruse, M.; Mikoc, A.; Cetkovic, H.; Gamulin, V.; Rinkevich, B.; Müller, I. M. & Müller, W. E. G. (1994), Molecular evidence for the presence of a developmental gene in the lowest animals: identification of a homeobox-like gene in the marine sponge *Geodia cydonium*. *Mech. Ageing. Develop.* 77, 43–54. <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.unal.edu.co/science/article/pii/0047637494900450>
- Kubanek, J.; Whalen, K. E.; Engel, S.; Kelly, S. R.; Henkel, T. P.; Fenical, W. & Pawlik, J. R. (2002), Multiple defensive roles for triterpene glycosides from two Caribbean sponges. *Oecologia*, 131, 125–136.
- Kurelec, B.; Krca, S.; Pivcevic, B.; Ugarkovic, D.; Bachmann, M.; Imsiecke, G. & Müller, W. E. (1992), Expression of P-glycoprotein gene in marine sponges. Identification and characterization of the 125 kDa drug-binding glycoprotein. *Carcinogenesis*, 13, 69–76.
- Lafay, B.; Boury-Esnault, N.; Vacelet, J. & Christen, R. (1992), An analysis of partial 28S ribosomal RNA sequences suggests early radiation of sponges. *BioSystems*, 28(1-3), 139–151.
- Larroux, C.; Fahey, B.; Degnan, S. M.; Adamski, M.; Rokhsar, D. S. & Degnan, B. M. (2007), The NK homeo-box gene cluster predates the origin of box genes. *Curr Biol.* 17, 1–5.
- Lehnert, H. & Reitner, J. (1997), Lebensdauer und Regeneration bei *Ceratoporella nicholsoni* (Hickson, 1911) und *Spirastrella (Acanthochaetetes) wellsi* (Hartman & Goreau, 1975) *Geol. Bl NO-Bayern.* 47, 265–272. <https://e-docs.geo-leo.de/handle/11858/00-1735-0000-0001-339D-1>

- Lopez, S.; Fernandez-Trillo, F.; Midon, P.; Castedo, L. & Saa, C. (2005), First stereoselective syntheses of (-)-siphonodiol and (-)-tetrahydrosiphonodiol, bioactive polyacetylenes from marine sponges. *J Org Chem.* 70, 6346–6352.
- Makino, S. (1951), An atlas of the chromosome numbers in animals, 2d ed. (1st American ed.) rev. and enl. from the original Tokyo ed. Zoology Publisher: Ames, Iowa State College Press. 290p <http://www.cabdirect.org/abstracts/19520100513.html;jsessionid=A7A3ED04D91B3A89D64AB8E046ABFC9C>
- Maldonado, M. (1998), Do chimeric sponges have improved chances of survival? *Mar Ecol Prog Ser.* 164, 301–306.
- Maldonado, M. & Riesgo, A. (2008), Reproductive output in a Mediterranean population of the homosclerophorid corticium candelabrum (Porifera, Demospongiae) with notes on the ultrastructure and behavior of the larva. *Marine Ecology*, 29, 298–316.
- Manconi, R. & Pronzato, R. (2007), Gemmules as a key structure for the adaptive radiation of freshwater sponges: a morphofunctional and biogeographical study. *Porifera Research: Biodiversity, Innovation and Sustainability*, 61–77.
- Miller–Harley (2001), Zoology, Fifth Edition. II. Animal–Like Protists and Animalia. 18. The Fishes: Vertebrate Success in Water. The McGraw–Hill Companies. 401–422.
- Mirsky, A. E. & Ris, H. (1951), The deoxyribonucleic acid content of animal cells and its evolutionary significance. *J. Gen. Physiol.* 34, 451–462.
- Mooberry, S. L.; Tien, G.; Hernandez, A. H.; Plubrukarn, A. & Davidson, B. S. (1999), Laulimalide and isolaulimalide, new paclitaxel-like microtubule-stabilizing agents. *Cancer Res.* 59, 653–660.
- Müller, W. E.; Dorn, A. & Uhlenbruck, G. (1985), The molecular mechanisms of the distinct calcium-dependent aggregation systems in marine sponges and corals. *Acta Histochem Suppl.* 31, 37–46.
- Müller, W. E. G.; Kruse, M.; Koziol, C. & Leys, S. P.(1998), Evolution of early Metazoa: Phylogenetic status of the Hexactinellida within the phylum of Porifera [sponges]. *Progr. Mol. Subcell. Biol.* 21, 141–156.
- Müller, W. E.; Dorn, A. & Uhlenbruck, G. (1985), The molecular mechanisms of the distinct calcium-dependent aggregation systems in marine sponges and corals. *Acta Histochem Suppl.* 31, 37–46.
- Müller, W. E. G.; Müller, I. M.; Rinkevich, B. & Gamulin, V. (1995), Molecular evolution: Evidence for the monophyletic origin of multicellular animals. *Naturwiss*, 82, 36–38.

- Osinga, R. (2003). Biotechnological aspects of marine sponges. *J. Biotechnol.* 100, 91–92.
- Osinga, R.; Tramper, J. & Wijffels, R. H. (1999), Cultivation of marine sponges. *Mar Biotechnol.* 1, 509–532.
- Ottillie, S.; Raulf, F.; Barnekow, A.; Hannig, G. & Scharl, M. (1992), Multiple src-related genes, srk1–4, in the fresh water sponge *Spon gilla lacustris*. *Oncogene*, 7, 1625–1630.
- Patthy, L. (2003), Modular assembly of genes and the evolution of new functions. *Genetica*, 118, 217–231.
- Pérez-López, P.; Ternon, E.; González-García, S.; Genta-Jouve, G.; Feijoo, G.; Thomas, O. P. & Moreira, M. T. (2014), Environmental solutions for the sustainable production of bioactive natural products from the marine sponge *Crambe crambe*. *Sci. Total Environ.* 475, 71–82.
- Perry, P. & Wolff, S. (1974), New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature*, 251, 156–8.
- Pfeifer, K.; Haasemann, M.; Gamulin, V.; Bretting, H.; Fahrenholz, F. & Müller, W. E. G. (1993), Stype lectins occur also in invertebrates: high conservation of the carbohydrate recognition domain in the lectin genes from the marine sponge *Geodia cydonium*. *Glycobiol.* 3, 179–184.
- Pomponi, S. A. & Willoughby, R. (1994), Sponge cell culture for the production of bioactive metabolites; van Soest, R., van Kempen, T.M.G., Braekman, J.C., Eds.; Balkema: Rotterdam, The Netherlands. 395–400.
- Porifarma: The marine Biotech company. <http://porifarma.com/>
- Proksch, P. (1994), Defensive roles for secondary metabolites from marine sponges and sponge-feeding nudibranchs. *Toxicon.* 32, 639–655.
- Rodrigo, A. G; Bergquist, P. R.; Bergquist, P. L. & Reeves, R. A. (1994), Are sponges animals? An investigation into the vagaries of phylogenetic interference. In: Sponges in Time and Space, R.W.M. v. Soest, T.M.G. v.
- Saito, S., Watabe, S., Ozaki, H., Fusetani, N., and Karaki, H. (1994), Mycalolide B, a novel actin depolymerizing agent. *J. Biol. Chem.* 269, 29710–29714.
- Schäcke, H.; Schröder, H. C.; Gamulin, V.; Rinkevich, B.; Müller, I. M. & Müller, W. E. G. (1994), Molecular cloning of a tyrosine kinase gene from the marine sponge *Geodia cydonium*: a new member belonging to the receptor tyrosine kinase class II family. *Mol.Memb. Biol.* 11, 101–107.
- Schippers, K. J.; Martens, D. E.; Pomponi, S. A. & Wijffels, R. H. (2011), Cell cycle analysis of primary sponge cell cultures. *Vitro Cell. Dev. Biol. - Anim.* 47, 302–311.

- Sipkema, D.; van Wielink, R.; van Lammeren, A. A. M.; Tramper, J.; Osinga, R. & Wijffels, R. H. (2003), Primmorphs from seven marine sponges: formation and structure. *J Biotechnol.* 100, 127–139.
- Sipkema, D.; Franssen, M. C.; Osinga, R.; Tramper, J. & Wijffels, R. H. (2005a), Marine sponges as pharmacy. *Mar Biotechnol NY.* 7, 142–162.
- Sipkema, D.; Osinga, R.; Schatton, W.; Mendola, D.; Tramper, J. & Wijffels, R. H. (2005b), Large-scale production of pharmaceuticals by marine sponges: sea, cell, or synthesis? *Biotechnol Bioeng.* 90, 201–222.
- Ter Haar, E.; Kowalski, R. J.; Hamel, E.; Lin, C. M.; Longley, R. E.; Gunasekera, S. P.; Rosenkranz, H. S. & Day, B. W. (1996), Discodermolide, A cytotoxic marine agent that stabilizes microtubules more potently than taxol. *Biochemistry (Mosc.)* 35, 243–250.
- Thompson, J. D.; Gibson, T. J.; Plewniak, F.; Jeanmougin, F. & Higgins, D. G. (1997), The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25, 4876–4882.
- Thoms, C. & Schupp, P. J. (2008), Activated chemical defense in marine sponges--a case study on *Aplysinella rhax*. *J. Chem Ecol.* 34, 1242–1252.
- Uriz, M. J.; Turon, X.; Galera, J.; Tur, J. M. (1996), New light on the cell location of avarol within the sponge *Dysidea avara* (Dendroceratida). *Cell Tissue Res.* 285, 519–527.
- Wagner, C.; Stefen, R.; Koziol, C.; Batel, R.; Lacorn, M.; Steinhart, H.; Simat, T. & Müller, W. E. G. (1998), Apoptosis in marine sponges: a biomarker for environmental stress (cadmium and bacteria). *Marine Biology*, 131, 411–421.
- Wakimoto, T.; Maruyama, A.; Matsunaga, S. & Fusetani Katsumi, N. (1999), Octa-and nonaprenylhydroquinone sulfates, inhibitors of [alpha] 1, 3-fucosyltransferase VII, from an Australian marine sponge *Sarcotragus* sp. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9, 727–730.
- Wiens, M.; Korzhev, M.; Krasko, A.; Thakur, N. L.; Perović-Ottstadt, S.; Breter, H. J.; Ushijima, H.; Diehl-Seifert, B.; Müller, I. M. & Müller, W. E. G. (2005), Innate immune defense of the sponge *Suberites domuncula* against bacteria involves a MyD88-dependent signaling pathway induction of a perforin-like molecule. *J. Biol. Chem.* 280, 27949–27959.
- Wijffels, R. H. (2008), Potential of sponges and microalgae for marine biotechnology. *Trends Biotechnol.* 26, 26–31.

World Porifera Data Base. <http://www.marinespecies.org/porifera/>