

PRIMEROS PASOS HACIA LA LOCALIZACIÓN CELULAR DEL (+)-DISCODERMÓLIDO, UN POTENTE POLICÉTIDO ANTITUMORAL PRODUCIDO POR LA ESPONJA MARINA DEL CARIBE *DISCODERMIA DISSOLUTA*

Carlos Puentes¹, Javier Gómez-León², Cesar Ruiz³, Sven Zea⁴ y Shirley Pomponi⁵

¹Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá, Colombia. marsupia46@gmail.com

²Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras – INVEMAR, El Rodadero, Santa Marta, Colombia. javier.gomez@invemar.org.co; javiergl2015@gmail.com

³Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie Marine et Continentale (IMBE), UMR CNRS 7263, IRD 237 - Aix Marseille Université - Avignon Université, Station Marine d'Endoume, Rue de la Batterie des Lions, 13007 Marseille, France. cesar.ruiz@imbe.fr

⁴Centro de Estudios en Ciencias del Mar – CECIMAR (Sede Caribe), Universidad Nacional de Colombia, Atte. INVEMAR, Santa Marta, Colombia. sezeas@unal.edu.co

⁵Harbor Branch Oceanographic Institute at Florida Atlantic University, 5600 US 1 North, Fort Pierce, Florida, 34946, EE.UU. spomponi@fau.edu

RESUMEN

Identificar la célula productora de un metabolito bioactivo permite enfocar los esfuerzos de cultivo celular para su producción *in-vitro*, así como elucidar la posible función fisiológica del metabolito. La esponja marina del Caribe *Discodermia dissoluta* produce el policétido (+)-discodermólido, un potente antitumoral que ha llegado a fase clínica de investigación en humanos. En este trabajo se avanzó en la identificación de las células productoras mediante disociación celular, separación en fracciones por centrifugación en gradientes de densidad de Percoll® y detección de la presencia de (+)-discodermólido mediante cromatografía de capa delgada. Las fracciones mostraron células de diferentes características morfológicas, entre las que se encuentran cianobacterias, bacterias filamentosas, coanocitos, arqueocitos, entre otras. Se pudo identificar un patrón irregular pero consistente de producción de (+)-discodermólido en las fracciones que contenían uno o más tipos de células granulares de la esponja, indicando que la producción del metabolito parece estar asociada con la esponja y no con los microorganismos asociados.

PALABRAS CLAVES: *Discodermia dissoluta*, (+)-Discodermólido, Disociación celular, Anticancerígeno.

ABSTRACT

First steps towards cellular localization of (+)-discodermolide, a potent antitumoral poliketide biosynthesized by the Caribbean marine sponge *Discodermia dissoluta*. Identification of bioactive metabolite cell producers allow driving cell culture experiments for *in vitro* production, just as elucidation of the possible physiological function of metabolites. The Caribbean marine sponge *Discodermia*

* Contribución No. 1157 del Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras (Invemar).

* El aporte de S.Z. es contribución 451 del Instituto de Estudios en Ciencias del Mar - CECIMAR, Universidad Nacional de Colombia, Sede Caribe.



dissoluta produces the polyketide (+)-discodermolide, a potent antitumoral that has reached clinic trials in humans. In this research, progress was made in identifying the producing cells by cell dissociation, separation into fractions by centrifugation on Percoll® density gradients, and detection of (+)-discodermolide presence by thin layer chromatography. The fractions recovered showed cells of different morphological characteristics, including cyanobacteria, filamentous bacteria, choanocytes, archaeocytes, among others. It was possible to identify an irregular but consistent pattern of (+)-discodermolide production in the fractions that contained one or more kind of sponge granular cells, indicating that metabolite production seems to be related to the sponge and not with the associated microorganisms.

KEY WORDS: *Discodermia dissoluta*, (+)-Discodermolide, Cell dissociation, Anticancer agent.

INTRODUCCIÓN

La esponja marina *Discodermia dissoluta* es productora de (+)-discodermólido (Gunasekera *et al.*, 1990), un metabolito con un importante efecto terapéutico antitumoral que llegó a la fase de ensayos clínicos en humanos con tumores sólidos (Karté, 1996; Martello *et al.*, 2000; Haefner, 2003; Mita *et al.*, 2004). Sin embargo, no se ha establecido un método de producción masiva que permita cubrir la demanda para nuevos estudios, dada la baja cantidad del metabolito que la esponja produce en el medio natural (Valderrama *et al.*, 2010; Ruiz *et al.*, 2013) y el alto costo que implica su síntesis química (Mickel *et al.*, 2004; Florence *et al.*, 2008).

Esta limitante de producción, que es frecuente no solo en *D. dissoluta* sino en la mayoría de los casos de metabolitos aislados de las esponjas, ha llevado a la formulación de una alternativa basada en la hipótesis de que las células en un cultivo *in-vitro* seguirán produciendo durante su desarrollo metabolitos bioactivos (Pomponi y Willoughby, 1994). Esta aproximación ha tenido éxito en el caso de células de plantas y de microorganismos (Tabata, 2006; Taylor *et al.*, 2007). Sin embargo, con las células de esponja las condiciones aún no están claramente establecidas (Pomponi, 2006; Sipkema *et al.*, 2006); para las esponjas se intenta cultivar agregados de células de varios tipos llamados primorfos (Müller *et al.*, 1999; Schippers *et al.*, 2012). Debido a que en el área de Santa Marta en el Caribe colombiano hay poblaciones someras de la esponja *Discodermia dissoluta* (Ruiz y Zea, 2012), algunos trabajos han venido intentando la producción de discodermólido *in situ* a partir del cultivo de fragmentos (Ruiz *et al.*, 2013). En este trabajo se avanzó en la identificación de las células responsables de su producción, mediante disociación celular y fraccionamiento en gradientes de densidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los solventes usados fueron de grado analítico (Merck). El agua de mar artificial libre de calcio y magnesio (CMFSW) fue preparada según el método de

Cavanaugh (1956) agregando 27.0 g de NaCl, 8.0 g de KCl, 1.0 g de Na₂SO₄, y 0.18 g de NaHCO₃ a un volumen final de 1000 mL. Esta misma fórmula fue suspendida en un volumen de 100 mL para la preparación de agua de mar libre de calcio y magnesio diez veces concentrada (CMFSW 10X). Para generar los gradientes de densidad se preparó Percoll® 100% partiendo de Percoll® puro y CMFSW 10X en proporciones de 9:1. Como patrón discodermólido en los ensayos de cromatografía en placa delgada (TLC) se usó una muestra facilitada por el Harbor Branch Oceanographic Institute (HBOI); alternativamente, el patrón se obtuvo a partir de muestras de la esponja mediante purificación en cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) con la metodología desarrollada por Valderrama *et al.* (2010).

Recolección de la esponja

Fragmentos de *D. dissoluta* identificadas por el Dr. Sven Zea (experto en taxonomía de esponjas) fueron recolectados en Punta Betín en la Bahía de Santa Marta (11°14'59,7"N 74°13'15,8"O) mediante buceo autónomo a una profundidad de 15-25 m. Estos fueron transportados en bolsas Ziploc® con agua de mar hasta el laboratorio en un lapso inferior a una hora, y puestos en cuarentena y aclimatación por dos horas. Posteriormente, se limpió la superficie de epibiontes y sedimentos; los fragmentos permanecieron en acuarios en un sistema de circulación cerrado y a una temperatura de 25 °C por no más de dos días antes de su empleo en los ensayos.

Disociación celular

Trozos de la esponja (2.5 mL) fueron limpiados y puestos en cajas de Petri con CMFSW para ser finamente picados con un escalpelo, siguiendo la metodología de Custódio *et al.* (1998). Posteriormente, se exprimieron en gasa estéril sobre la misma caja de Petri, y luego el tejido y la suspensión resultante se pasaron a tubos cónicos Falcon de 50 mL agregando CMFSW hasta 25 mL. Los tubos con la muestra fueron agitados en un vibrador a 120 rpm por 30 min a una temperatura de 25 °C para reforzar la disociación celular. La suspensión se filtró en un tamiz de polietileno con un tamaño de poro de 70 µm para eliminar residuos grandes, y luego centrifugar a 600 g durante 20 minutos a 10 °C. Se separó el pellet de células del sobrenadante y se resuspendió en 1 mL de CMFSW para su posterior separación en gradientes de densidad. Este procedimiento se hizo por cuadruplicado en cada ensayo.

Cortes de tejido y de células

Para conocer más a fondo la morfología de las células, se realizó un estudio histológico, cortando con escalpelo secciones de 3-5 mm de grosor de tejido de la esponja; se siguió el protocolo de deshidratación tinción e inclusión en resina plástica Spurr (ERL 4216) de Ruíz (2009). Los bloques se cortaron con sierra

circular diamantada de baja velocidad, se pegaron con resina a portaobjetos, se cortaron nuevamente a un grosor mínimo, y se desbastaron y pulieron con series de lijas diamantadas en una pulidora petrográfica (Rützler, 1974; Willenz y Pomponi, 1996). Se utilizó microscopio de luz para diferenciar entre los distintos tipos de células de la esponja directamente en el tejido. Los cortes fueron teñidos con etanol + fucsina ácida y etanol + cristal violeta.

Adicionalmente, a partir de una muestra de células disociadas se realizaron cortes histológicos de parafina, siguiendo la metodología de Gómez (2007), modificando el tiempo, la deshidratación e inclusión en parafina: alcohol 80% 15 min; alcohol 95% 15 min; alcohol 95% 15 min; alcohol 100% 15 min alcohol 100% 15 min; xileno 100% 15 min; xileno 100% 15 min; xileno 100% 15 min; ½ xileno ½ parafina 5 min; parafina 10 min; parafina 10 min. Los bloques de parafina fueron desbastados y cortados con un micrótopo para un corte de grosor de 3 μ m. Los cortes fueron teñidos con H & E.

Fraccionamiento celular en gradientes de densidad

Gradiente a: partiendo de Percoll® 100% se prepararon diluciones de 60, 45, 30 y 15% con CMFSW (Pomponi *et al.*, 1998). En tubos de centrífuga de 15 mL se adicionó 1 mL de cada una de estas soluciones, en orden descendente de porcentaje de Percoll®. Luego, en la parte superior se adicionó cuidadosamente la suspensión de células, y se centrifugó a 600 g por 20 minutos a 10 °C. Posteriormente las fracciones celulares fueron retiradas cuidadosamente con pipetas Pasteur y colectadas en tubos Eppendorf donde se aforó hasta 2 mL con CMFSW. Luego se sometieron dos veces a centrifugación a 400 g por 10 minutos a 10 °C, en la primera para retirar el Percoll® (sobrenadante), y en la segunda con CMFSW para lavarlo (Figura 1a).

Gradiente b: en un intento por mejorar la separación de los diferentes tipos de células, se combinaron en un tubo de centrífuga de 15 mL las fracciones que se produjeron en el Gradiente *a* entre la superficie de Percoll® del 30% y el fondo de 45%, adicionando CMFSW hasta 10 mL con el fin de diluir el Percoll®. Se centrifugó a 600 g por 10 min a 10 °C y se resuspendió el pellet en 1 mL de CMFSW (Figura 1b).

El Gradiente *b* fue preparado con diluciones de 60, 50, 40 y 30%, partiendo de Percoll® 100%, empleando la misma técnica que en el Gradiente *a*. A este gradiente se le adicionó la resuspensión combinada del Gradiente *a*, y se centrifugó a 600 g por 20 min a 10 °C. Las nuevas capas de células fueron recuperadas en tubos Eppendorf y tratadas de la misma forma que se hizo para el Gradiente *a* para retirar el Percoll®.

Para los dos gradientes se realizaron análisis morfológicos de las células con el microscopio de luz en campo claro, y en contraste de fases, tomando pequeñas

alícuotas de las células separadas, con el fin de relacionar la proporción de cada morfotipo de células en las fracciones con la presencia o ausencia de discodermólido, se hizo un conteo de los principales morfotipos en placa Neubauer.

Detección de (+)-discodermólido por cromatografía de capa delgada (TLC)

Luego de separar las alícuotas para los conteos celulares, las cuatro réplicas de las diferentes fracciones celulares se combinaron, liofilizaron, y extrajeron con 500 μ L de metanol durante 24 horas; el sobrenadante de la extracción se filtró y concentró en rotavapor. Los extractos concentrados de las fracciones celulares se aplicaron sobre cromatoplasmas de sílica gel 60 F₂₅₄ Merck®, así como el patrón de discodermólido puro. La TLC se llevó a cabo empleando una fase móvil de diclorometano/metanol 9:1. La detección de (+)-discodermólido se hizo revelando con el reactivo de Lieberman-Burchard (anhídrido acético 5 mL, etanol 5 mL, ácido sulfúrico 0.1 mL) con posterior calentamiento a 100 °C.

Inicialmente se analizaron extractos obtenidos a partir de trozos pequeños de la esponja (2.5 mL), el sobrenadante y el pellet de la primera disociación en CMSW para confirmar si las muestras usadas tenían discodermólido y que este no se había perdido durante estos procesos. Teniendo en cuenta, que la concentración de un determinado compuesto se puede relacionar con su intensidad en el revelado en TLC (Torres, 1994), se asignaron valores de categoría de intensidad (*rank* en inglés) de 1 a 3. Se asignó **3** a aquellas bandas que mostraron una gran intensidad, teniendo como criterio que la mancha era apreciable y no desapareció de la placa luego de unos días; se asignó **2** a aquellas manchas que eran tenuemente visibles y desaparecieron luego de algunos días; y se asignó **1** para manchas muy poco visibles. El ejercicio de disociación de células, fraccionamiento y detección del (+)-discodermólido en TLC para los gradientes *a* y *b* se repitió tres veces con el fin de confirmar los resultados obtenidos.

RESULTADOS

Tipos de células disociadas

Conforme a lo esperado, las células disociadas se estratificaron en Percoll®, permitiendo en el Gradiente *a* una separación gruesa de las células y en el Gradiente *b* una separación más fina (Figura 1a y b). En el conglomerado de células disociadas de *D. dissoluta* se pudieron observar una gran variedad de células entre las que se destacaron aquellas que presentaban una conformación globular con muchas o pocas vesículas en su interior, genéricamente denominadas células “granulosas” que comprenden: arqueocitos, coanocitos, pinacocitos y esclerocitos (Figura 1c-f).

Entre las células granulosas de esponja se pudieron distinguir arqueocitos, con un tamaño entre 4 y 9 μm , núcleo claramente diferenciable (Figura 1c), y nucléolo; el citoplasma era regularmente traslúcido y presentaba pocas inclusiones en su interior. Se identificaron también coanocitos, de tamaño menor (3-5 μm), con gránulos (Figura 1d) y se pudo observar el flagelo por movimiento. Los pinacocitos (Figura 1e) presentaron un diámetro entre 6 y 10 μm y no se distinguió el núcleo bajo el microscopio de luz por la presencia de abundantes vesículas de diverso tamaño y densidad. Otro tipo de célula bastante abundante en las primeras fracciones de los gradientes se muestra en la Figura 1f. Esta no pudo ser claramente identificada por no presentar suficientes caracteres morfológicos; es posible que se trate de esclerocitos en una etapa temprana de su desarrollo. Se observaron células similares que no poseían muchas vesículas y que no tenían una forma regular o alargada, con prolongaciones axiales traslucidas de hasta 10 μm en cada extremo que se asemejaban mucho a una espícula. Esta evidencia hace pensar que podrían ser las mismas células después de secretar lo que será el esqueleto de la esponja. Por las dificultades de distinguir fácilmente entre tipos de células granulosas, en la fase de conteo en placa Neubauer se decidió contarlas todas combinadas en la categoría de granulosas.

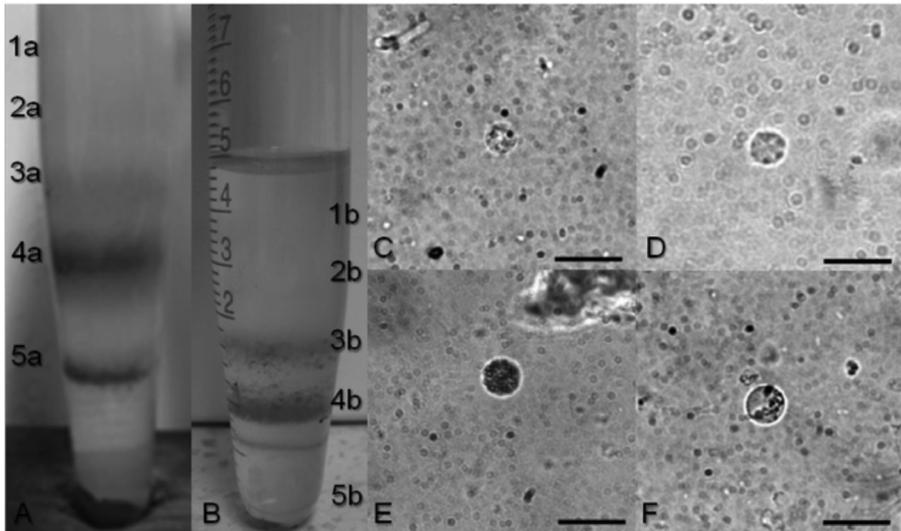


Figura 1. Distribución y tipos de células de esponja observadas luego de la centrifugación en gradientes de Percoll®. a. Gradiente a de Percoll®; b. Gradiente b de Percoll®; c. Arqueocito; d. Coanocito; en la foto no es apreciable el flagelo, pero se identificó por el movimiento perceptible; e. Pinacocito con gran cantidad de vesículas y f. Célula sin identificar, posible esclerocito. Barra 10 μm , 100X.

En los cortes de resina del tejido de *D. dissoluta* se pudo observar el pinacodermo y el coanodermo en una gran variedad de células tanto simbióticas como propias de la esponja, cámaras de coanocitos de diferentes tamaños y espículas, y su disposición en el tejido de la esponja (Figura 2a). Al realizar la disociación se encontraron en el ectosoma cianobacterias fotosintéticas tipo *Aphanocapsa*, en forma ovoide de 3-5 μm , que se pudieron diferenciar por su autofluorescencia de color naranja bajo luz UV. Se observó también un número muy abundante de bacterias tipo bacilo y otros microorganismos cocoides no identificados. Además, se encontró en abundancia una bacteria filamentosa similar a *Entotheonella* sp. que presenta varios segmentos alargados, con una longitud total de 30-50 μm , dependiendo de la cantidad de segmentos que presente, cada uno con 3-4 μm de ancho (Figura 2b y c).

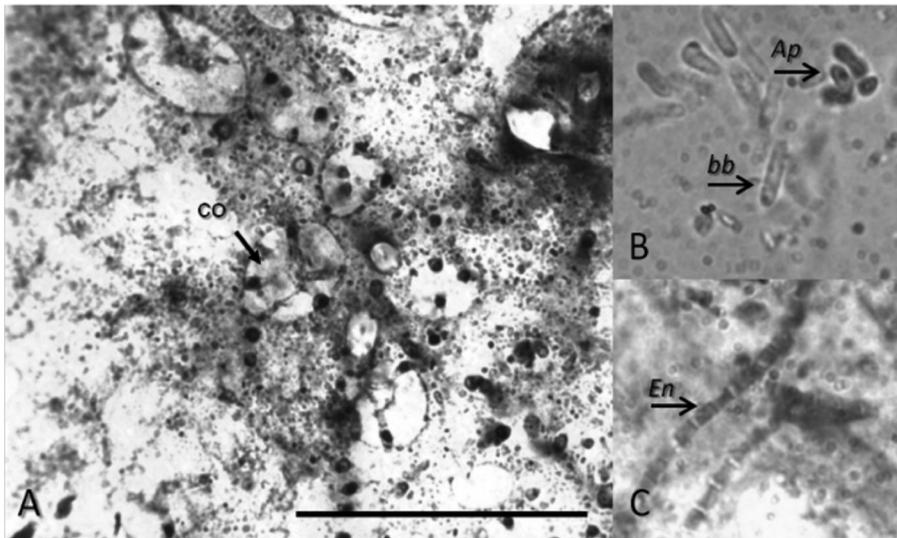


Figura 2. Cortes de resina de una sección del tejido de la esponja *D. dissoluta*: Cámaras de coanocitos (co) Barra 100 μm ; b. Células bacterianas: (Ap) Cianobacteria fotosintética tipo *Aphanocapsa* sp., (bb) Bacterias tipo bacilo no identificadas (transparentes) y c. Bacterias filamentosas tipo *Entotheonella* sp. (En) 100X. Tinción etanol + fucsina ácida & etanol + cristal violeta.

En los cortes de parafina de células disociadas, se observaron de nuevo un gran número de bacterias filamentosas similares a *Entotheonella* sp. y células de morfología granulosas (Figura 3a y b).

Composición celular e intensidad de (+)-discodermólido por fracción

Los dos gradientes de Percoll® generaron diez fracciones (Figura 1a y b, Tabla 1), algunas repetidas, resultando ocho niveles diferentes de densidad de

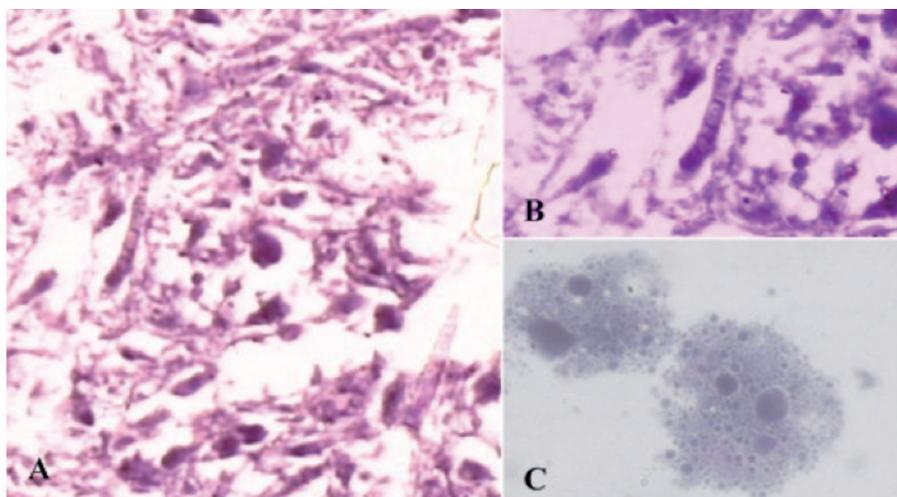


Figura 3. a. Cortes histológicos en parafina de células disociadas de la esponja *D. dissoluta* 40X; b. Bacterias filamentosas tipo *Entotheonella* sp. 100X y c. Morfología de células granulosas, 100X. Tinción H & E.

Tabla 1. Características de células encontradas luego de la disociación celular de *D. dissoluta* según la fracción del gradiente a de Percoll®.

Gradiente	Fracción	Análisis microscópico
a	<15%	Baja densidad celular, células granulosas muy pequeñas (1-5 μm), algunas bacterias cocoides y partículas no identificables.
a	15%	Elevación de la densidad celular apreciable, células granulosas pequeñas (3-9 μm) en gran cantidad, algunas <i>Aphanocapsa</i> y <i>Entotheonella</i> .
b	<30%	Baja densidad celular, células granulosas pequeñas (3-6 μm), partículas no identificables.
a	30%	Alta densidad celular, células granulosas más grandes (5-12 μm), <i>Aphanocapsa</i> y <i>Entotheonella</i> en abundancia.
b	30%	Alta densidad celular, células granulosas pequeñas (3-10 μm), partículas inidentificables.
b	40%	Alta densidad celular, algunas células granulosas más grandes (5-12 μm), <i>Aphanocapsa</i> y <i>Entotheonella</i> .
a	45%	Células granulosas más grandes (5-12 μm) en baja proporción, gran abundancia de <i>Aphanocapsa</i> y <i>Entotheonella</i> , ambas en proporciones similares.
b	50%	Se nota una importante reducción de células granulosas, dominan <i>Aphanocapsa</i> y <i>Entotheonella</i> .
a	60%	Muy pocas células, predominando siempre <i>Aphanocapsa</i> y <i>Entotheonella</i> .
b	60%	Muy pocas o ninguna célula, <i>Aphanocapsa</i> y <i>Entotheonella</i> .

Percoll® que se denominaron como <15%, 15%, <30%, 30%, 40%, 45%, 50% y 60% en razón a su composición de Percoll®, siendo el más concentrado el de mayor densidad. Dado que las muestras de esponja fueron obtenidas en fresco del medio ambiente y de diferentes individuos, la concentración celular fue muy variable, en consecuencia no fue posible comparar cuantitativamente cada repetición en cuanto a su contenido de células, por esta razón en la Figura 4 a y b se presenta el resultado del conteo de células de cada una de las fracciones para los gradientes *a* y *b* junto con la abundancia relativa del discodermólido, para una sola de las tres replicas, la cual fue análoga a las demás. En la Tabla 1 se registra la composición y abundancia de las fracciones en relación a los tres tipos básicos de células que se pudieron contar de manera consistente: (1) células granulosas, que incluye posiblemente arqueocitos, coanocitos, pinacocitos y otros tipos; (2) cianobacterias fotosintéticas

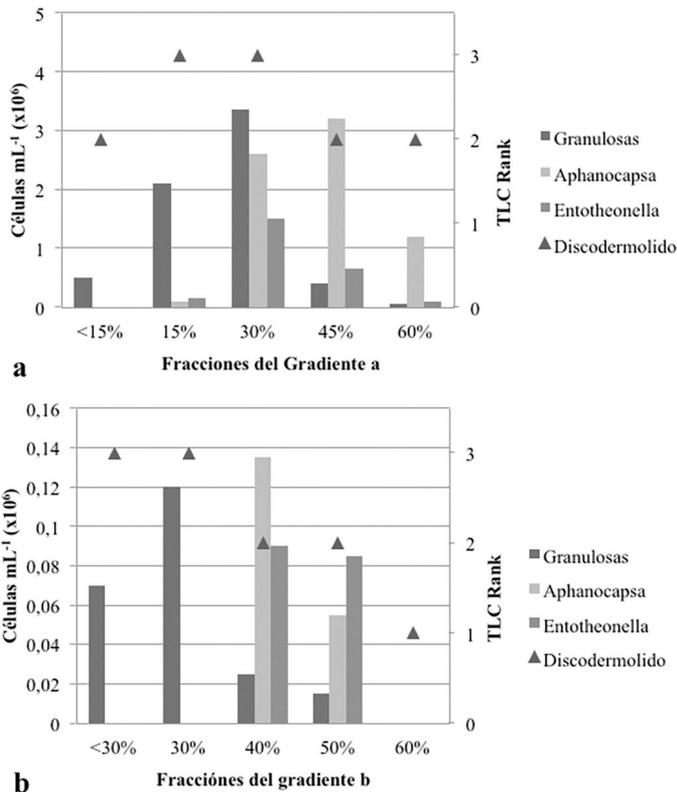


Figura 4 a y b. Abundancia de células en las diferentes fracciones del gradiente a y b de Percoll® e intensidad de (+)-discodermólido en TLC. Dada la variabilidad en la abundancia de células disociadas, se presentan los resultados de una sola de las tres réplicas de cada gradiente.

tipo *Aphanocapsa* y (3) bacterias filamentosas tipo *Entotheonella sp.* En general, se observa una tendencia en la dominancia de ciertos tipos de células según la fracción, las células granuladas tienden a dominar en valores entre 15-30% de Percoll®, mientras que las cianobacterias fotosintéticas y bacterias filamentosas se concentran hacia mayores densidades coincidentes con mayores porcentajes de Percoll® (40-60%) (Tabla 1, Figuras 4a y b).

El análisis de la presencia del (+)-discodermólido mediante TLC se llevó a cabo teniendo en cuenta la presencia de una banda marrón con un Rf de 0.13 que se evidenció como característica en el patrón de discodermólido puro. La identificación de esta misma banda patrón constituyó el análisis positivo para cada una de las muestras evaluadas. El análisis para la presencia del metabolito se realizó en la muestra inicial sin disociar, así como el sobrenadante y el pellet conseguidos luego de la disociación, obteniendo resultados positivos para la presencia del metabolito únicamente en la muestra inicial y el pellet. Lo anterior, fue un claro indicador de que el (+)-discodermólido se localiza y se mantiene en las células durante el proceso de disociación. Por otro lado, todas las fracciones celulares mostraron señal de presencia de (+)-discodermólido en mayor o menor medida. Sin embargo, se evidenció una mayor presencia en las fracciones ubicadas entre 15% y 30% de Percoll®, encontrando una intensidad de (+)-discodermólido de 3, mientras que en el resto de fracciones esta fue de 2, en cambio estuvo prácticamente ausente en la fracción de 60% del gradiente *b* (Tabla 1, Figuras 4a y b). Interesantemente, las bandas de (+)-discodermólido más intensas estuvieron relacionadas con la abundancia de células granuladas presentes en cada fracción (Figuras 1a y b). Adicionalmente, en las fracciones con predominio de las bacterias se observó una menor producción del metabolito. Lo anterior, constituye un primer indicio de que las células responsables de la producción de (+)-discodermólido son algunas, de las de tipo granuloso, identificadas en este estudio.

DISCUSIÓN

Aunque la señal de (+)-discodermólido en TLC es cualitativa, el fraccionamiento celular en gradientes de densidad en dos pasos y los conteos celulares han permitido vislumbrar el posible candidato productor de (+)-discodermólido en *D. dissoluta* en alguno de los tipos de células granuladas que se separan en densidades de Percoll® menores o iguales a 30%. Sin embargo, no fue posible obtener una fracción homogénea de células con un solo morfotipo general (granuladas de esponja vs. bacterias simbiotes, cocoides o filamentosas), seguramente por la disparidad en tamaño y densidad dentro del mismo tipo de células y entre tipos diferentes (Flowers

et al., 1998; Garson *et al.*, 1998; Sun *et al.*, 2007). Así por ejemplo, los arqueocitos se encontraron en varias fracciones por su amplio intervalo de tallas. Sin embargo, si bien el uso de los dos gradientes consecutivos de Percoll® no permitió obtener una fracción exclusiva de bacterias asociadas a la esponja y otra de células granulosas, la calidad de la separación fue mucho mejor que usando un solo gradiente. Es posible plantear el uso de gradientes sucesivos para conseguir un mayor grado de purificación; no obstante, es importante recalcar que esto va en detrimento del número de células colectadas en cada paso, lo que dificulta los análisis posteriores debido a la baja cantidad de metabolito que se pueda extraer. Otra alternativa para mejorar esta separación es la utilización de gradientes continuos de Ficol-Vrografin, que han sido usados exitosamente para la purificación de células de esponja (Sun *et al.*, 2007). Es de notar, que si bien el Ficol se ha usado solo para procedimientos de separación, Sun *et al.* (2007) mencionan que existe una desventaja debida a procesos de agregación no específica entre células de esponja; esto mismo se ha descrito para el uso del Percoll® (Salomon *et al.*, 2001) que fue usado en este trabajo. Lo anterior, muestra la dificultad que existe para obtener una mayor resolución en la separación de los tipos celulares con el fin de establecer el productor específico del metabolito. Un aspecto llamativo en la separación observada en esta investigación, fue que la mayor cantidad de células de esponja se colectó en fracciones de menor densidad con respecto a las bacterias asociadas, lo cual es diferente a lo esperado (Yentsch y Pomponi, 1994; Salomon *et al.*, 2001).

Es interesante destacar que el perfil de abundancia del (+)-discodermólido se pudo asociar con el perfil de presencia de las células granulosas de la esponja, esta correlación permite hipotetizar que son las células de la esponja y no las células bacterianas libres las que serían responsables de la producción del (+)-discodermólido, lo cual tiene sentido con el hecho de que hasta ahora no se haya obtenido este compuesto en aislados bacterianos de la esponja productora (Schippers *et al.*, 2012). Adicionalmente, es interesante observar que la producción del (+)-discodermólido se presenta incluso cuando la presencia de bacterias no es perceptible, lo cual permitiría suponer que la relación simbiótica no sería un requisito para que las células de la esponja produjeran este compuesto. Sin embargo, se hacen necesarios estudios posteriores orientados al cultivo de las células individuales de la esponja sin presencia alguna de las bacterias acompañantes para confirmar esta hipótesis.

En este estudio se confirmó la presencia de la bacteria *Entotheonella* sp. como uno de los simbioses más conspicuos (Brück *et al.*, 2008) en muestras de *D. dissoluta* obtenida en aguas colombianas. Interesantemente, aunque en la esponja *Theonella swinhoei* se pudo determinar a *Entotheonella palauensis* como

responsable de la síntesis del péptido bioactivo theopalauamide (Schmidt *et al.*, 2000), su congénere filamentoso en *D. dissoluta* parece no tener el mismo papel de producir discodermólido. De hecho, Schirmer *et al.* (2005) analizaron los moduladores sintéticos de policétidos en la comunidad bacteriana de *D. dissoluta* y no encontraron evidencia contundente que permitiera afirmar que la biogénesis de discodermólido es llevado a cabo por bacterias asociadas a su tejido.

La morfología de las células de la esponja *D. dissoluta* no está descrita en ningún trabajo anterior. Nuestro trabajo permitió hacer una distinción de los morfotipos de las células presentes en el tejido de la esponja prestando especial atención en detalles como la presencia de vesículas, cilios, flagelos, núcleo y nucléolo que son los rasgos más comúnmente usados para su distinción (Simpson, 1984; Dini *et al.*, 2007). Se identificaron cuatro grupos principales de células. Los pinacitos se distinguieron principalmente por la abundante inclusión de partículas en su citoplasma, que se han descrito genéricamente como fagosomas (Uriz *et al.*, 1996); en estas células resulta prácticamente imposible distinguir un núcleo u otro organelo con microscopía óptica de campo claro. Sin embargo, esta distinción es válida dada la gran diferencia que muestran estas células en su apariencia con células como los arqueocitos que son mucho más traslucidos y el rasgo más distintivo es su núcleo y nucléolo (Custódio *et al.*, 2004). La presencia de pseudopodios ha sido muy poco registrada para los arqueocitos; en la esponja dendroceratida *Dysidea avara* se han encontrado arqueocitos y son descritos, junto con los esclerocitos, como células ameboides con pseudópodos (Uriz *et al.*, 1996); este rasgo distintivo también se pudo apreciar con microscopía de contraste de fases sobre las células que se obtuvieron de las primeras fracciones de los Gradientes **a** y **b** de *D. dissoluta*, permitiendo una clara distinción entre arqueocitos y demás células. Sin embargo, los esclerocitos no fueron completamente distinguibles, pues la estructura interna es muy poco visible, excepto cuando se encuentra secretando el esqueleto silíceo de la esponja. Distinguir los coanocitos resultó fácil ya que estos presentan una apariencia menos traslúcida y regularmente se pudo apreciar el movimiento del flagelo.

El papel que juega para *D. dissoluta* la producción de (+)-discodermólido no está establecido, aunque Ruiz *et al.* (2013) hipotetizaron un posible uso como antiépibiótico. De acuerdo a los tipos de células identificados como granulosa y que resultan relacionados con la producción del (+)-discodermólido en este estudio, esta hipótesis sigue siendo válida, dado que hay una mezcla de células localizadas en la parte interna y externa de la esponja. Si bien en este trabajo se ha podido avanzar en la identificación de la célula productora del discodermólido, la conclusión final no se podrá lograr antes de establecer un sistema de separación que permita obtener células de un solo morfotipo para el análisis de su función en la producción del metabolito.

CONCLUSIONES

Se avanzó en la descripción e identificación de las posibles células productoras del (+)-discodermólido, las cuales se asocian a la fracción de mayor presencia de células de la esponja. Sin embargo, no fue posible separarlas para identificar un solo tipo de célula responsable de la producción del metabolito. En ese sentido es importante avanzar en el refinamiento de protocolos que permitan una mejor separación y diferenciación entre los tipos celulares, una posible alternativa es también el trabajo de distintas técnicas de cultivo que permitan aumentar la concentración de tipos particulares de células. La identificación de la célula productora del discodermólido también ayudaría a elucidar la función fisiológica que este compuesto lleva a cabo en el organismo productor.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo financiero por parte del Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación – Colciencias mediante contrato RC No. 327-2011. Al Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras “José Benito Vives De Andrés” – Invemar. A la Universidad Nacional de Colombia Sede Caribe. También a la Línea de Bioprospección Marina del Programa de Valoración y Aprovechamiento de los Recursos Marinos donde se llevó a cabo el proyecto.

BIBLIOGRAFÍA

- Brück, W.M., S.H. Sennett, S.A. Pomponi, P. Willenz y P.J. McCarthy. 2008. Identification of the bacterial symbiont *Entotheonella* sp. in the mesohyl of the marine sponge *Discodermia* sp., ISME J., 2: 335-339.
- Custódio, M.R., I. Prokic, R. Steffen, K. Koziol, R. Borojevic, F. Brümmer, M. Nickel y W.E.G. Müller. 1998. Primmorphs 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.
- Custódio, M.R., E. Hajdu y G. Muricy. 2004. Cellular dynamics of in vitro allogeneic reactions of *Hymeniacidon heliophila* (Demospongiae: Halichondrida) Mar. Biol., 144: 999-1010.
- Cavanaugh, G.M. 1956. Formula and methods VI of the marine biological laboratory chemical room, Woods Hole, Massachusetts. 84 p.
- Dini, L., P. Pagliara, P. Tarantino y B. Tenuzzo. 2007. Morphology and cytochemistry of dissociated cells of *Petrocia ficiformis* (Porifera). Ital. J. Zool., 74(4): 333-339.
- Florence, G.J., M.N. Gardner y I. Paterson. 2008. Development of practical Syntheses of the marine anticancer agents discodermolide and dictyostatin. Nat. Prod. Rep., 25: 342-375.
- Flowers, A.E., M.J. Garson, R.I. Webb, E.J. Dumdei y E.J. Charan. 1998. Cellular origin of chlorinated diketopiperazines in the dictyoceratid sponge *Dysidea herbacea* (Keller). Cell Tissue Res., 292: 597-607.



- Garson, M. J., A.E. Flowers, R.I. Webb, R.D. Charan y E.J. McCaffrey. 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.
- Gunasekera, S., M. Gunasekera y R. Longley. 1990. Discodermolide: a new bioactive polyhydroxylated lactone from the marine sponge *Discodermia dissoluta*. *J. Org. Chem.*, 55: 4912-4915.
- Gómez-León, J. 2007. Estudio epizoótico de agentes patógenos en almeja fina (*Ruditapes decussatus*) cultivada en Galicia. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas. Universidad de Santiago de Compostela, España. 220 p.
- Haefner, B. 2003. Drugs from the deep: marine natural products as candidates. *Drug Disc. Today*, 8: 536-544.
- Karté, B. K. 1996. Biomedical potential of marine natural products. *BioScience*, 46: 271-286.
- Martello, L.A., H.M. McDaid, D.L. Regl, C.H. Yang, D. Meng, T.R.R. Pettus, M.D. Kaufman, H. Arimoto, S.J. Danishefsky, A.B. Smith III y S.B. Horwitz. 2000. Taxol and discodermolide represent synergistic drug combination in human carcinoma cell lines. *Clin. Cancer Res.*, 6: 1978-1987.
- Mickel, S., D. Niederer, R. Daefler, A. Osmani, E. Kuesters, E. Schmid, K. Schaer y R. Gamboni. 2004. Large-Scale synthesis of the anti-cWancer marine natural product (+)-Discodermolide. Part 5: Linkage of fragments C1-6 and C7-24 Finale. *Org. Proc. Res. & Dev.* 8: 122-130.
- Mita, A., C. Lockhart, T.L. Chen, K. Bochinski, J. Curtright, W. Cooper, L. Hammond, M. Rothenberg, E. Rowinsky y S. Sharma. 2004. A phase I pharmacokinetic (PK) trial of XAA296A (Discodermolide) administered every 3 wks to adult patients with advanced solid malignancies. *J. Clin. Oncol. ASCO Annual Meeting Proceedings (Post-Meeting Edition)*, 22(14S), 2025 (resumen y diapositivas).
- Müller, W.E G., M. Wiens, R. Batel, R. Steffen, H.C. Schröder, R. Borojevic y M.R. Custodio. 1999. Establishment of a primary cell culture from a sponge: primmorphs from *Suberites domuncula*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 178: 205-219.
- Pomponi, S.A. 2006. Biology of the porifera: cell culture. *Can. J. Zool.*, 84(2): 167-174.
- Pomponi, S.A. y R. Willoughby. 1994. Sponge cell culture for the production of bioactive metabolites: 395-400. En: van Soest, R.W.M., Th.M.G. van Kempen, J.C. Braekman (Eds). *Sponges in time and space*. A.A. Balkema, Rotterdam. 544 p.
- Pomponi, S.A., R. Willoughby, A.E. Wright, C. Pecorella, S.H. Sennett, J. López y G. Samples. 1998. In vitro production of marine-derived antitumor compounds: 73-76. In: Le Gal, Y. y H.O. Halvorson (Eds). *New developments in marine biotechnology*. Plenum, Nueva York. 343 p.
- Ruíz, C.A. 2009. Aspectos ecológicos de la población de la esponja *Discodermia dissoluta* (Porifera: Demospongiae: Lithistida) en el Caribe colombiano. Trabajo de grado Biología Marina, Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano, Santa Marta. 50 p.
- Ruiz, C.A. y S. Zea. 2012. Historia natural de la esponja *Discodermia dissoluta* (Porifera: Demospongiae: Lithistida) en Santa Marta, Caribe colombiano. *Bol. Inv. Mar. Cost.*, 41(1): 85-102.
- Ruiz, C., K. Valderrama, S. Zea y L. Castellanos. 2013. Mariculture and natural production of the antitumoural (+)-Discodermolide by the Caribbean marine sponge *Discodermia dissoluta*. *Mar. Biotechnol.*, 15: 571-583.
- Rützler, K., 1974. The burrowing sponges of Bermuda. *Smithsonian Contr. Zool.*, 165: 1-32.

- Salomon C.E., T. Deerinck, M.H. Ellisman y D.J. Faulkner. 2001. The cellular localization of dercitamide in the Palauan sponge *Oceanapia sagittaria*. *Mar. Biol.*, 139: 313-319.
- Schirmer, A., R. Gadkari, C.D. Reeves, F. Ibrahim, E.F. DeLong y C.R. Hutchinson. 2005. Metagenomic analysis reveals diverse polyketide synthase gene clusters in microorganisms associated with the marine sponge *Discodermia dissoluta*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71: 4840-4849.
- Schmidt, E.W., A.Y. Obratsova, S.K. Davidson, D.J. Faulkner y M.G. Haygood. 2000. Identification of the antifungal peptide-containing symbiont of the marine sponge *Theonella swinhoei* as a novel δ -proteobacterium, "*Candidatus Entotheonella palauensis*". *Mar. Biol.* 136: 969-977.
- Schippers, K. J., D. Sipkema, R. Osinga, H. Smidt, S.A. Pomponi, D.E. Martens y R.H. Wijffels. 2012. Cultivation of sponges, sponge cells and symbionts: Achievements and future prospects. *Adv. Mar. Biotechnol.*, 62: 273-337.
- Simpson, T. L. 1984. The cell biology of sponges. Springer, Heidelberg, Berlín y Nueva York. 662 p.
- Sipkema, D., H. W. Blanch y R.H. Wijffels. 2006. Large-scale production of pharmaceuticals by marine sponges: sea, cells or synthesis? Abstracts, 7th Int. Sponge Symp., Río de Janeiro, 7-13 mayo 2006.
- Sun, L., Y. Song, Y. Qu, Q. Yu y W. Zhang. 2007. Purification and in vitro cultivation of archaeocytes (stem cells) of the marine sponge *Hymeniacidon perleve* (Demospongiae) *Cell Tis. Res.*, 328: 223-237.
- Tabata, H. 2006. Production of paclitaxel and the related taxanes by cell suspension cultures of *Taxus* species. *Curr. Drug Targets*, 7(4): 453-461.
- Taylor, M.W., R. Radax, D. Steger y M. Wagner. 2007. Sponge-associated microorganisms: Evolution, ecology, and biotechnological potential. *Microbiol. Mol. Biol. R.*, 71(2): 295-347.
- Torres, S. 1994. Introducción a la cromatografía. Editorial Universidad Nacional, Bogotá. 134 p.
- Uriz, M.J., X. Turon, J. Galera y J.M. Tur. 1996. New light on the cell location of avarol within the sponge *Dysidea avara* (Dendroceratida). *Cell Tis. Res.*, 285: 519-527.
- Valderrama, K., L. Castellanos y S. Zea. 2010. Validation and evaluation of an HPLC methodology for the quantification of the potent antimetabolic compound (+)-discodermolide in the Caribbean marine sponge *Discodermia dissoluta*. *J. Sep. Sci.*, 33: 2316-2321.
- Willenz, P. y S. Pomponi. 1996. A new deep sea coralline sponge from Turks y Caicos Islands: *Willardia caicosensis* gen. et sp. nov. (Demospongiae: Hadromerida). *Bull. Inst. Royal Sci. Nat. Belg. Biol.*, 66: 205-218.
- Yentsch C.M. y S. Pomponi. 1994 Strategies for flow cytometric analysis of marine microalgae and sponge cells. 523-538. En: Darzynkiewicz, Z., J.P. Robinson y H.A. Crissman (Eds). *Methods in Cell Biology*. 697 p.

RECIBIDO: 28/12/2015

ACEPTADO: 10/09/2016

