



Universidad Veracruzana

UNIVERSIDAD VERACRUZANA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

Campus Tuxpan

Maestría en Manejo de Ecosistemas Marinos y Costeros

“Estudio de células troncales (*Stem cell*) en *Amphimedon viridis* (Duchassaing & Michelotti, 1864)”

TESIS

Que para obtener el título de:

**MAESTRA EN MANEJO DE ECOSISTEMAS MARINOS Y
COSTEROS**

PRESENTA:

Biol. Mar. Yuriria Cortés Rivera

Director:

Dr. Rodrigo Cuervo González

Asesora:

Dra. Rosa Idalia Hernández Herrera

Tuxpan, Veracruz

2018

La presente tesis titulada “**Estudio de células troncales (Stem cell) en *Amphimedon viridis* (Duchassaing & Michelotti, 1864)**” realizada por la C. Bióloga Marina Yuriria Cortés Rivera, bajo la dirección del Dr. Rodrigo Cuervo González y asesorada por la Dr. Rosa Idalia Hernández Herrera ha sido aprobada y aceptada para poder llevar a cabo la solicitud de fecha de examen para obtener el título de:

MAESTRA EN MANEJO DE ECOSISTEMAS MARINOS Y COSTEROS



Dr. Rodrigo Cuervo González

Director



Dra. Rosa Idalia Hernández Herrera

Asesora

Tuxpan de Rodríguez Cano, Veracruz. Febrero de 2018

La presente tesis titulada "Estudio de células troncales (*Stem cell*) en *Amphimedon viridis* (Duchassaing & Michelotti, 1864)" realizada por la C. Bióloga Marina Yuriria Cortés Rivera ha sido aprobada y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRA EN MANEJO DE ECOSISTEMAS MARINOS Y COSTEROS



Dr. Pablo San Martín del Ángel

LECTOR



Dr. Eduardo Alfredo Zarza Meza

LECTOR



Dr. Javier Aguilar Fuentes

LECTOR

Tuxpan de Rodríguez Cano, Veracruz. Febrero de 2018

DEDICATORIA

A mis padres que han sido el pilar en mi vida, quienes me inspiran a superarme día con día. Por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores y por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien.

Enf. Ger. Anelia Rivera Bautista y Dr. Gregorio Cortés Lagunes

A mis hermanos, Thelma Anell, Edio, John, Gregorio, María de los Ángeles, Emilia y Patricio, por los buenos y malos momentos.

A Lic. Daniel Guevara Ortiz por el apoyo y motivación para la culminación de esta tesis.

A mi amiga, Jessica Marisol Avila Varillas por estar presente en cada momento.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia Y Tecnología (CONACYT) por la beca número (CVU/BECARIO) 711474/590296 otorgada para estudiar la Maestría en Manejo de Ecosistemas Marinos y Costeros.

A mi director de tesis

Dr. Rodrigo Cuervo González, mi más amplio agradecimiento por la confianza que depositó mí, por su valiosa dirección y apoyo para seguir este camino de Tesis y llegar a la conclusión del mismo. Cuya experiencia y educación ha sido mi fuente de motivación y de curiosidad durante estos años.

A mi asesora

Dr. Rosa Idalia Hernández Herrera, un especial agradecimiento por haber aceptado trabajar en esta tesis. Por su apoyo y su tiempo en la revisión para mejoramiento de este trabajo.

A mi comisión lectora

Dr. Pablo San Martín del Ángel, Dr. Eduardo Alfredo Zarza Meza y Dr. Javier Aguilar Fuentes por su valiosa disponibilidad para la revisión de este trabajo y por sus observaciones puntuales en cada evento académico.

A mis compañeros de generación

Marisol, Itzayana, Esmeralda, Noemi, Susana, Angélica e Irvin, por todas las experiencias adquiridas en estos años y por conocer a cada uno de ustedes.

“El futuro tiene muchos nombres. Para los débiles es lo inalcanzable. Para los temerosos es lo desconocido. Para los valientes es la oportunidad”

Víctor Hugo

“Estudio de células troncales (*Stem cell*) en *Amphimedon viridis* (Duchassaing & Michelotti, 1864)”

Yuriria Cortés Rivera

RESÚMEN

Las esponjas marinas son los organismos multicelulares más simples, estas están compuestas por células especializadas que cumplen diversas funciones, entre estas células se encuentran los arqueocitos, células pluripotentes capaces de diferenciarse en cualquier otro tipo celular y sea ha demostrado mediante análisis molecular que son las células madre en esponjas marinas y dulceacuícolas. Una manera para estudiar a las esponjas es mediante un sistema de formación de agregados funcionales denominados “primorfos”. El objetivo primordial de este trabajo fue la evaluación de pequeñas moléculas (Ly294002, Froskolín, Histona metiltransferasa, GSK-3, TGF- β , TTNPB, 5-Azacytidina, Wnt Agonist, Wnt Agonist I, Wnt Agonist II, Tranilcipromina, Mek $\frac{1}{2}$ y P38SAPK2) en el medio de cultivo para la generación de células troncales a partir de primorfos de la esponja *Amphimedon viridis*, utilizando el protocolo modificado de Müller *et al.*, 2000. La formación de estos agregados celulares es evidente en el tercer día de cultivo, básicamente se forma una aglomeración de células y posteriormente se forman estructuras esféricas denominadas primorfos, estos se mantienen con cambios de medio de cultivo en un 75 % cada 24 horas por la primera semana y después cada tercer día. La utilización de moléculas en medio de cultivo no arroja resultados positivos, y en algunos casos el efecto es deletéreo. Cada tratamiento nos ayudó a determinar la solubilidad de algunos compuestos al agua de mar. El estudio de las células madre nos permitirá conocer los mecanismos de especialización celulares. Qué mecanismos hacen que un gen sea activo y haga su trabajo y qué mecanismos inhiben la expresión de ese gen. Las esponjas marinas son de los organismos con mayor facilidad de investigación ya que pueden ser sencillamente disociadas en células individuales para después formar primorfos. En las investigaciones actuales se estudian para la obtención de moléculas bioactivas, mismas que tienen un futuro prometedor en la industria farmacéutica para la creación de nuevos medicamentos.

Palabras clave: Proliferación, línea celular, poríferos, gentamicina, *Amphimedon viridis*.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES.....	7
OBJETIVOS.....	17
Objetivo general.....	17
Objetivos específicos	17
MATERIAL Y MÉTODOS	18
RESULTADOS	24
Ensayo de moléculas en el medio de cultivo	32
Uso del medio de cultivo con ESGRO-2i	38
DISCUSIÓN	40
CONCLUSIONES	46
APLICACIÓN PRÁCTICA	48
BIBLIOGRAFÍA	50
ANEXO	62

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Función y efectos en la reprogramación con pequeñas moléculas	15
Cuadro 2. Concentraciones equivalentes utilizadas en los tratamientos.....	22
Cuadro 3. Experimentos con diferentes antibióticos en la formación de primorfos de <i>A. viridis</i>	24

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura modificada de la composición de una esponja (Funayama, 2012).....	2
Figura 2. <i>Amphimedon viridis</i>	7
Figura 3. Modelo actual del sistema de células madre en demospongas (Funayama, 2010).....	14
Figura 4. Esquematización del diseño experimental.	21
Figura 5. Proceso de disociación mecánica (protocolo modificado de Müller <i>et al.</i> , 2000).....	23
Figura 6. Primorfos con penicilina, estreptomicina y glutamina.....	25
Figura 7. Primorfos con penicilina, estreptomicina, glutamina y gentamicina.	26
Figura 8. Primorfos con penicilina, estreptomicina, gentamicina y akamicina.	27
Figura 9. Primorfos de formas irregulares.	28
Figura 10. Células en suspensión de <i>A. viridis</i>	29
Figura 11. Aglomeración de células de <i>A. viridis</i>	29
Figura 12. Formación de agregados celulares después de 24 horas de cultivo...	30

Figura 13. Primorfos después de 72 horas de cultivo.	31
Figura 14. Primorfo de <i>Amphimedon viridis</i>	32
Figura 15. Efecto de alargamiento en tratamiento con 5-Azacitidina.	33
Figura 16. Primorfo con P38/SAPK2 en el medio de cultivo (canales).....	34
Figura 17. Molécula GSK-3 precipitada alrededor del primorfo.....	35
Figura 18. Molécula precipitada en el medio de cultivo (P38/SAPK2).....	35
Figura 19. Efecto deletéreo con la molécula TTNPB en el medio de cultivo.	36
Figura 20. Unión de dos primorfos.	37
Figura 21. Primorfos con cloruro de litio en el medio de cultivo. Se muestra un alargamiento en el fondo del pocillo.....	38
Figura 22. Desintegración de un primorfo. Tratamiento con medio basal ESGRO-2i con LIF, GSK-3 y Mek ½ en agua de mar artificial.....	39

INTRODUCCIÓN

Las esponjas (Filo Porífera) constituyen uno de los grupos de organismos más primitivos del planeta (Funayama *et al.*, 2005), son de los animales multicelulares más simples que se conocen (Wuff, 2006) y representan la clave para entender la evolución de los metazoarios, siendo de los más diversos y abundantes en los ecosistemas acuáticos de todo el mundo (Rützler, Duran y Piantoci, 2007) pero son de los invertebrados menos estudiados (Soest *et al.*, 2012). Son animales sésiles que crecen sobre un sustrato, no poseen tejidos, órganos ni sistemas, pero están formados de células especializadas que cumplen diversas funciones (Fig. 1) (Sogabe, Nakanishi y Degnan, 2016).

Por definición las células troncales tienen la capacidad de dividirse indefinidamente y diferenciarse en otras células especializadas, esto es posible debido a que poseen un alto nivel de proliferación, pero a la vez se mantienen en un estado indiferenciado. De acuerdo con su capacidad de potencial de diferenciación se clasifican en células totipotentes, pluripotentes, multipotentes y unipotentes, las principales características que distinguen a una célula troncal son la auto-renovación, potencial de diferenciación y la reconstrucción funcional *in vitro* de un tejido en particular (Prósper y Verfailliae, 2003; Acevedo y Cortés, 2008). Las células troncales, solo necesitan ser activadas como respuesta tisular. La diferenciación es el proceso mediante el cual una célula no especializada se transforma en otro tipo de células por activación o desactivación de determinados genes y regulada por

distintos mecanismos celulares (microRNA, activación de receptores, factores de crecimiento, etcétera) (Munévar *et al.*, 2005).

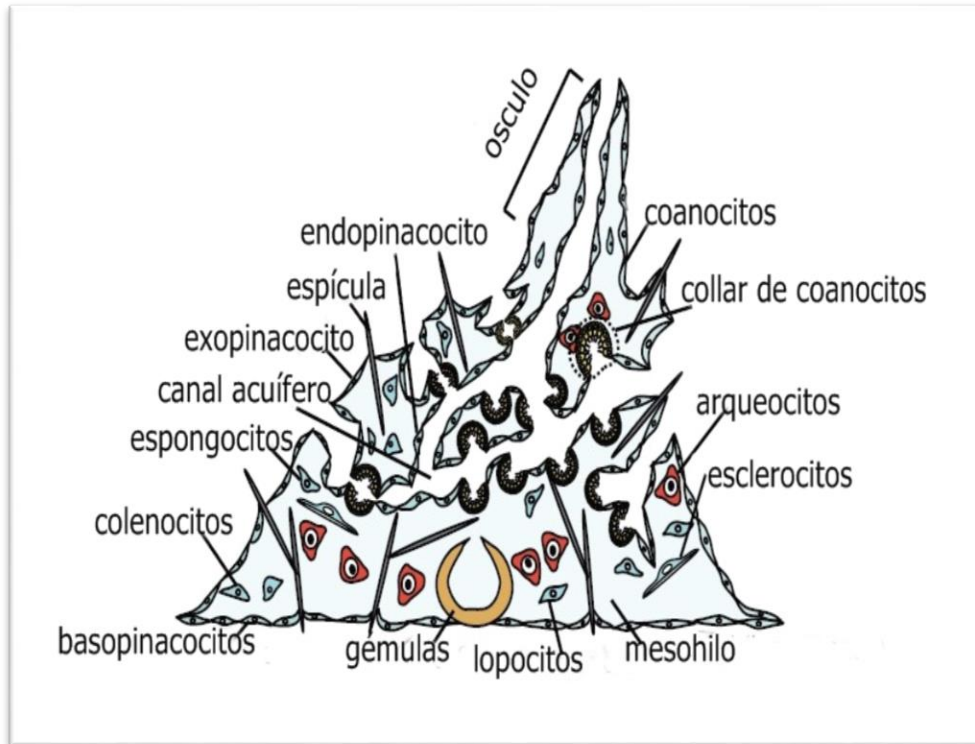


Figura 1. Estructura de la composición de una esponja (Funayama, 2012).

Las células troncales en los poríferos son células pluripotentes indiferenciadas llamadas arqueocitos, aunque diferentes científicos las definen morfológicamente como células amebocitas (De Caralt, Uriz y Wijffels, 2007; Ereskovzky, 2010) con una habilidad única en el reino animal ya que tienen la capacidad de transformarse en cualquier otro tipo de célula que la esponja necesite, además de servir como sistema único de reparación celular (Sköd *et al.*, 2009; Funayama, 2013). Estas células son necesarias para la unión, agregación y diferenciación celular (Simpson,

1984). Los arqueocitos se encuentran distribuidas en todo el tejido de la esponja y se utilizan para reproducción, por ejemplo, en brotes, fragmentación o larvas asexuales (Ereskovsky y Tokina, 2007). Las esponjas no presentan una línea germinal por lo tanto los gametos derivan de los arqueocitos, muchas especies de esponjas de agua dulce usan los arqueocitos para desarrollar gémulas (Müller, 2006; Funayama, 2010), las cuales son pequeñas estructuras esféricas que se utilizan como mecanismos de supervivencia, las gémulas son la solución biológica a condiciones adversas del entorno por consiguiente constituyen fases de resistencia (Sköld *et al.*, 2009). En la reproducción sexual los gametos se originan de los arqueocitos o de los coanocitos dando lugar al desarrollo embrionario (Funayama, 2010).

Una de las principales razones por la que se estudian las esponjas es por la producción de metabolitos secundarios bioactivos (Davood *et al.*, 2015; Garate, Blanquer y Uriz, 2015), misma que desempeñan varios papeles ecológicos, por ejemplo, competencia por espacio con otras esponjas, elementos disuasivos contra depredadores y como agentes anti-incrustantes (Turon, Tarjuelo y Uriz, 1998; Becerro *et al.*, 2003). Estos metabolitos tienen sus usos potenciales en nuevos farmacéuticos o cosméticos y podrían tener uso en una variedad de aplicaciones. La dificultad principal para producir nuevos medicamentos a partir de esponjas es la falta de suficientes metabolitos tanto para la investigación como para las necesidades del mercado.

En la actualidad el cultivo de explantes o células bajo condiciones controladas se está investigando con el objeto de comprender los mecanismos subyacentes a la producción de metabolitos de interés y suministrar a la industria farmacéutica los compuestos diana. La recolección de biomasa de la esponja directamente en el mar no es factible en la mayoría de los casos, esto debido a que una extracción masiva de estos organismos afectaría negativamente al medio acuático. Como alternativa se han utilizado métodos de cultivo de esponja teniendo un éxito muy variable. Entre estos encontramos la maricultura, el cultivo de explantes de esponjas bajo condiciones ambientales controladas o semi controladas y los cultivos *in vitro* de explantes y primorfos o células disociadas en condiciones totalmente controladas (Hausmann *et al.*, 2006).

El cultivo *in vitro* de las células de esponjas marinas ha sido propuesto para la producción sostenible de moléculas bioactivas (Zhang *et al.*, 2004). En la industria farmacéutica sostenible es indispensable obtener una gran cantidad de biomasa y evitar así la sobreexplotación de las especies a utilizar, por esa razón, se necesitan técnicas y estrategias que permitan la producción *in vitro* de bioactivos de interés y la conservación de los organismos (Ilan *et al.*, 1996; Puyana *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2016). En cuanto a la concentración de metabolitos en las esponjas cultivadas la producción es muy variable (Page *et al.*, 2005), siendo poca cantidad en la mayoría de las especies.

Los pocos estudios en los requerimientos nutricionales en el medio de cultivo aún no han permitido la selección de líneas celulares en esponjas marinas, esto debido

a que las células no se dividen continuamente y se desconocen qué factores influyen en su crecimiento (Müller *et al.*, 2006), es decir, tienen un crecimiento lento pero una tasa alta de apoptosis. Así, la disociación celular de esponjas a través de estos mecanismos ha adquirido un enfoque más prometedor con respecto a la biomasa de las esponjas en aplicaciones biotecnológicas (Custodio *et al.*, 1998; Müller *et al.*, 2000; Pomponi, 2005). En México no se ha consolidado una línea de investigación basada en la biotecnología de productos naturales procedente de invertebrados marinos, especialmente en esponjas. Parte del problema para mantener una línea de investigación de este tipo radica en la dificultad para obtener suficiente cantidad de producto activo para realizar los estudios farmacéuticos, ya que la recolección de las esponjas es un proceso que debe ser descartado debido a que la mayoría presentan un crecimiento lento (Carballo, Gómez y Cruz-Barraza, 2014).

Hoy en día, los cultivos biotecnológicos de esponjas siguen siendo una tarea difícil, ya que es complejo cultivar esponjas bajo condiciones de crecimiento adecuadas y bien definidas. Como resultado, los metabolitos específicos de la esponja todavía no están disponibles por medios biotecnológicos (Belarbi *et al.*, 2003). Sin embargo, un cultivo biotecnológico totalmente controlado de esponjas promete tasas de crecimiento sustancialmente más altas, en comparación con aquellas en ambientes naturales o acuicultura. Para lograr este objetivo, es un primer paso hacia una producción biotecnológica de metabolitos específicos de la esponja (Page *et al.*, 2005).

Amphimedon viridis se eligió como modelo de este estudio, porque en general las esponjas son sistemas adecuados para reconocimiento celular, ya que pueden ser fácilmente disociadas en células individuales, estas células son capaces de diferenciarse en agregados y posteriormente reconstruir sistemas funcionales, denominados “primorfos” (Águila-Ramírez, Hernández-Guerrero y González-Acosta, 2011), estos primorfos son estructuras intermediarias entre una simple célula y una esponja (Chernogor *et al.*, 2011). El estudio de células troncales en esponjas marinas evitaría la sobreexplotación del recurso en el medio natural.

ANTECEDENTES

Amphimedon viridis (Fig. 1) fue descrita por Duchassaing y Michelotti en 1864, esta pertenece a la Clase Demospongiae, es una esponja que forma colonias incrustantes de color verde olivo y de consistencia suave, se reproduce asexualmente por gemación, aunque *Amphimedon queenslandica* se reproduce por gametos y embriones, mismos que mantiene dentro de cámaras de incubación (Maritz *et al.*, 2010). Es la demosponja tropical más común, se encuentra en las raíces de los mangles, pastos marinos, fondos con arena de grano grueso y en arrecifes poco profundos. Tiene una amplia distribución geográfica incluyendo el Golfo de México, el Atlántico, el Caribe, el Océano Índico y las regiones del Mar Rojo y Micronesia (Deloach, 1994; Huang *et al.*, 2008).



Figura 2. *Amphimedon viridis*.

Las esponjas han sido estudiadas desde los años 50s, siendo objeto atractivo para productos naturales marinos, esto por el gran número de metabolitos secundarios que producen y sus usos potenciales en nuevos productos farmacéuticos y cosméticos (Müller *et al.*, 2004). Además, son la mayor fuente de metabolitos secundarios marinos con potencial biomédico (Blunt *et al.*, 2009). Algunos ejemplos de estas esponjas son: *Cryptothetia cripta*, *Cymbastela* sp, *Hemiasterella minor*, *Schipnonochalina* sp, *Luffariella variabilis*, *Petrosia contignata*, *Dysidea avara*, *Lissodendoryx*, *Halicondria okadai*, *Discodemia disuluta*, *Agelas mauritanus*, *Dysidea arenaria*, *Haliclona* sp y *Mycale hentscheli*, de las cuales se han obtenido compuestos con aplicación antiviral, anti-inflamatoria, anti-cancerígenos, anti-asma y anti-tumoral (Belarbi *et al.*, 2003; Águila-Ramírez, Hernández-Guerrero y González-Acosta, 2011; Saurav *et al.*, 2016).

A nivel celular, la mayoría de los métodos de cultivo en esponjas se han desarrollado en células suspendidas o agregados celulares derivados de suspensiones celulares, estos últimos llamados primorfos. En estos estudios, los cultivos celulares primarios se obtuvieron con éxito, pero las líneas celulares de división continua no lograron prolongar. Diversos trabajos han desarrollado este sistema de cultivo de primorfos mediante la utilización de agua de mar artificial libre de calcio y magnesio, protocolo establecido por Müller *et al.*, 2000. Particularmente en las especies como: *Stylotella agminata* (Zhang *et al.*, 2003), *Stylissa masa* (Spikema *et al.*, 2003), *Pseudosuberites affandrewsi* (Spikema *et al.*, 2003), *Suberites domuncula* (Müller *et al.*, 1999; Spikema *et al.*, 2003; Müller y Müller, 2003; Le Pennec *et al.*, 2003),

Haliclona oculata (Spikema *et al.*, 2003), *Haliclona panicea* (Spikema *et al.*, 2003), *Geodia cydonium* (Müller y Müller, 2003; Spikema *et al.*, 2003) y *Axinella polypoides* (Spikema *et al.*, 2003); *Hymeniacidon perleve* (Zhao *et al.*, 2005). Lo más importante es que han mostrado una alta actividad de telomerasa, mismo que indica una gran capacidad de proliferación (Müller y Müller, 2003; Vilanova *et al.*, 2010). Las esponjas exhiben muchas actividades ecológicas que son de importancia farmacéutica y presentan una alta citotoxicidad (Mahdian *et al.*, 2015), y tiene funciones como antivirales, anticancerígenos, anti-protozoarios, antifúngico y antiinflamatorios (Mehbub *et al.*, 2014; Carreira *et al.*, 2015).

Los principales problemas encontrados fueron la dificultad de mantener los cultivos limpios, la adición de antibióticos y antimicóticos suprime la contaminación por hongos y bacterias, la penicilina, estreptomina y rifamicina, en general son efectivas en el control de contaminación bacteriana (Spikema *et al.*, 2003), otra fuente para el cultivo de células, es el uso de embriones y larvas, esto debido a que se reduce el nivel de contaminación bacteriana en cultivos de células de invertebrados (Rinkevich, 2005), aunque, aún existe la proliferación de bacterias simbióticas por la transmisión de padres a hijos en algunas especies de esponjas (De Caralt, Uriz y Wijffels, 2007; Lee *et al.*, 2009). Por ejemplo, en la esponja *Suberites domuncula* las bacterias se encuentran en racimos que están separados en cápsulas formadas de material desconocido (Müller *et al.*, 2000).

Se acepta generalmente que los arqueocitos son probablemente las células madre pluripotentes en esponjas y que otros tipos de células se diferencian de los

arqueocitos, basados principalmente en estudios histológicos (Müller, 2006 y Funayama, 2008). Esto debido a que la mayoría de los estudios claves del sistema de células madre en esponjas hasta el momento han sido estudios microscópicos, pero en los últimos años se ha proporcionado evidencia molecular de este sistema en esponjas. Un sistema de células madre que utiliza agregados celulares (denominados primorfos) de la demosponja *Suberites domuncula* (Müller, 2006), el primorfo es un agregado celular esférico compacto formado de células disociadas. Se piensa que el primorfo está constituido principalmente de células proliferantes (arqueocitos y coanocitos) y puede mantenerse durante varios meses sin fijarse al sustrato, conduciendo a la morfogénesis para formar esponjas funcionales (Custodio *et al.*, 1998).

Diversos estudios demostraron el efecto positivo sobre la viabilidad celular añadiendo factores de crecimiento. Asimismo, una técnica utilizada fue la incorporación de timidina triada en la esponja *Dysidea avara*, los resultados demostraron que los primorfos después de tres e incluso 10 días en cultivo producen tasas mayores de síntesis de ADN [970 (60 cpm/mg) y 835 (70 cpm/mg) respectivamente] (Müller *et al.*, 2000).

En la esponja *S. domuncula*, se realizaron estudios en células suspendidas, agregados celulares y primorfos sometiéndolos a la presencia de la bromodesoxiuridina (BrdU o 5-bromo-2-desoxiuridina), donde el porcentaje de células positivas a BrdU disminuye con el tiempo hasta en un 22.3 % en tan solo un mes de cultivo. Estos datos documentan que las células se reorganizan en

primorfos, los cuales se someten a síntesis del ADN y es muy probable que posteriormente efectúen la división celular (Müller *et al.*, 2000). Müller *et al.*, 2004 realizaron algunos experimentos en pequeños fragmentos y primorfos de *S. domuncula*. Los primorfos utilizados se cultivaron sobre una matriz de gelatina o poli-L-lisina con el fin de inducir la formación de canales, y así mismo someterlos a regresión, teniendo resultados positivos.

En la esponja *Petrosia ficiformis* se describieron el aislamiento y la caracterización molecular de la silicatina a partir de espículas, así mismo desarrollaron un modelo celular (primorfos) adecuado para estudios *in vitro* para la regularización de genes de silicatina (enzima que regula la obtención de silicatos en las esponjas para la formación de espículas) (Pozzolini *et al.*, 2004). Mientras que Valisano *et al.*, 2012, estudiaron el desarrollo de espículas y biosilificación sobre la formación de primorfos en *P. ficiformis*, mediante la adición de silicato sódico y citrato férrico y demostraron que el enriquecimiento de los medios de cultivo afecta favorablemente la supervivencia del cultivo. Sin embargo, ninguno de estos estudios logro proporcionar un medio específico en el cual las células de la esponja pudieran crecer continuamente

En análisis moleculares de *S. domuncula* se expresaron dos genes, el gen *Noggin* también conocido como *Nog* (Müller *et al.*, 2003) y *MSPC* (Schröder *et al.*, 2004) durante el proceso de diferenciación en arqueocitos a esclerocistos, inducidos por la adicción de Fe⁺ en el medio de cultivo para primorfos. En adultos de esta misma esponja se expresaron dos marcadores para células madre pluripotentes en

ovocitos, embriones (receptor tirosina quinasa RTKvs) (Perovic-Ottstadt *et al.*, 2004, revisado en Funayama, 2010) y en gémulas (desarrollo embrionario de proteínas (EED) (Müller, 2006). Así mismo en la esponja *Amphimedon queenslandica* se expresaron varios genes de señalización celular o factores transcripcionales, tales como Wnt y TGF- β , también el gen *Hedgling* (Adamska *et al.*, 2007) y un gen que pertenece a la familia bHLH (AmqbHLH1) se expresó en embriones y sugirieron que regula la diferenciación de las células y la morfogénesis (Richards *et al.*, 2008). Hasta hace poco no era posible definir los tipos de células en esponjas, sin embargo, ahora los marcadores moleculares permiten distinguir los diferentes niveles de células madre. Las células madre poseen una alta capacidad para el ciclo celular y controles de asimetría/diferenciación, mecanismos de protección celular, reparación del ADN y la apoptosis (Müller, 2006).

Funayama *et al.*, 2010, realizaron un análisis biológico molecular utilizando el proceso de eclosión de gémulas en *E. fuvialis* y confirmaron que los arqueocitos son células madre, demostrando su capacidad para proliferar (utilizando experimentos de incorporación de BrDU) y diferenciarse en al menos tres tipos de células (utilizando análisis de hibridación *in situ*). Además, propusieron que los sistemas de células madre esponjosas están constituidos principalmente de arqueocitos y coanocitos. Así mismo aislaron los genes EfPiwiA y EfPiwiB (Fig. 3) que se expresaron en células arqueocitas de la demosponja. Se ha sugerido que los genes de la familia Piwi tienen un papel en el mantenimiento de líneas

germinales y de las células madre por medio de una pequeña vía medida por el ARN (Funayama *et al.*, 2005; Seto *et al.*, 2007).

Una de las formas para generar células troncales es mediante protocolos de diferenciación empleando pequeñas moléculas en el medio de cultivo (Kunisada *et al.*, 2012). Existen varios trabajos enfocados a la generación de líneas celulares de animales, los cuales han caracterizado varias moléculas para reprogramación celular. Tanto en el ratón, como en las células madre pluripotentes inducidas en humanos, pueden ser generadas células troncales por la expresión ectópica del gen Oct4, más las diferentes combinaciones de moléculas pequeñas en las células somáticas. La eventual utilización clínica de las células pluripotentes inducidas tiene todavía varios problemas, en los cuales se destaca la baja eficiencia en su obtención y principalmente en la manipulación ectópica de los factores de reprogramación. Es por eso por lo que varios investigadores se han centrado en la utilización de compuestos químicos, denominados comúnmente “moléculas pequeñas” esto para remplazar la utilización de virus y aumentar la eficiencia en la generación de células pluripotentes (Chaparro y Beltrán, 2009). Entre estas moléculas deberá haber receptores nucleares, los cuales tienen la capacidad de unirse directamente al ADN y regular la expresión genética (Hou *et al.*, 2003; Nie *et al.*, 2012). Las pequeñas moléculas, proporcionan varias ventajas en el control de las funciones de las proteínas y han traído mucho interés en la reprogramación celular. Las concentraciones en el uso de moléculas, para estudios de proliferación celular,

varían por los distintos autores teniendo un rango entre los 0.1 a 50 μM (Martínez *et al.*, 2002; Li y Ding, 2009; Li *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2011; Hou *et al.*, 2013).

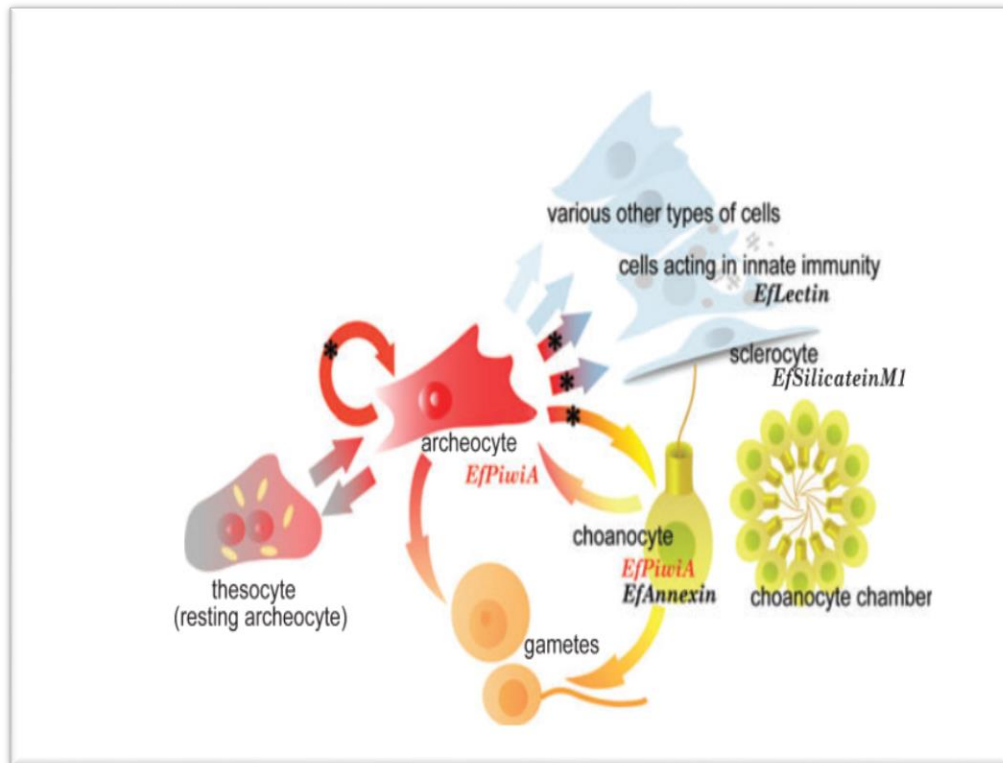


Figura 3. Modelo actual del sistema de células madre en demosponjas (Funayama, 2010).

Dada la noción que las moléculas pequeñas pueden inhibir las vías clave para inducir la diferenciación, se han identificado y utilizado moléculas pequeñas para la reprogramación de células troncales (Cuadro 1) (Li y Ding, 2009; Li *et al.*, 2009).

Cuadro 1. Función y efectos en la reprogramación con pequeñas moléculas

Moléculas pequeñas	Función	Efecto en la reprogramación	Referencia
EPIGENICOS			
5-azactidina	Inhibidor de ADN metiltransferasa DNMT	Incrementa la eficiencia en reprogramación	Mikkelson <i>et al.</i> , 2008; Papp y Plath, 2013
Tranilcipromina	Inhibidor de desmetilización de h4k4	potenciador en reprogramación	Lee <i>et al.</i> , 2006; Li <i>et al.</i> , 2009
Histone Metiltransferasa EZH2, Inhibidor, DZNeP	modulador epigenético	potenciador en reprogramación	Hou <i>et al.</i> , 2013
RECEPTORES NUCLEARES			
TTNPB	Receptor de ácido retinoico	Potenciador en reprogramación	Hou <i>et al.</i> , 2013
VIA P13/AKT			
LY294002	Inhibe la vía p13/akt	Inhibe la supervivencia celular	Berchard y Dalton., 2009
Forskolin (FSK)	Antagonista de adenilil ciclasa e incrementa los niveles de adenosin monofosfato cíclico.	puede reemplazar Oct4 en combinación de 2-me-5ht y D4476 e induce la expresión klf4 y klf2	Hanna <i>et al.</i> , 2010; Hou <i>et al.</i> , 2013

GSK-3 Inhibidor XVL [CHIR99021 (CHIR)]	GSK-3 β inhibidor y activador de la vía de señalización del Wnt	Puede reemplazar sox2	Li <i>et al.</i> , 2009; Zhaou <i>et al.</i> , 2009.
TGF-β R1 Inhibidor Kinasa II	Inhibidor de TGF- β tipo I	Autofosforilación	Gelliebrt <i>et al.</i> , 2004; Ichida <i>et al.</i> , 2009
MEK 1/2 Inhibidor III	Controla la actividad biológica de Mek 1/2	Funciones de fosforilación y desfosforilación	Alesiani <i>et al.</i> , 2009
P38/SAPK2 (SB2002190)	Proteína objetivo p38/sapk2	-Controla la actividad biológica de p38/sapk2 -Fosforiza el factor de transcripción atf2 -Mantenimiento y diferenciación	
Wnt Agonist	Activador selectivo de la señalización Wnt	-Activador celular permanente, potente y selectivo de la señalización Wnt. -No inhibe la actividad de GSK-3 β	Liu <i>et al.</i> , 2005
Wnt Antagonist I WP-1-Endo	Activador de la vía de señalización Wnt	-Inhibidor de la vía Wnt	Chen <i>et al.</i> , 2009; Huang <i>et al.</i> , 2009.
Wnt Antagonist II, IWP-2	Antagonista de la vía Wnt/ β catenina	Inhibe el procesamiento celular Wnt y la secreción de bloques selectivos de MBOAT	Cehn <i>et al.</i> , 2009

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar en *Amphimedon viridis* el efecto de compuestos químicos que inducen el estado de célula troncal en otros sistemas celulares.

Objetivos específicos

Establecer un sistema de cultivo para primorfos de *A. viridis*.

Caracterizar el efecto individual y combinado de compuestos químicos que inducen células troncales en primorfos de *A. viridis*.

Obtener un cultivo homogéneo a partir de células obtenidas con estos tratamientos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los organismos de *A. viridis* se colectaron en el Arrecife Tuxpan con la utilización de equipo básico de buceo a una profundidad de un metro en la zona de la cresta arrecifal. Se transportó el material biológico al laboratorio de Evolución y Embriología de la Universidad Veracruzana y se colocaron en un acuario en condiciones de 35 salinidad, 26°C de temperatura que se mantuvo controlada con un enfriador (Resun CL 600), un eliminador de proteínas (Dymax Ls-10), una bomba de aire, así mismo se realizaron recambios parciales de agua cada semana.

Disociación de células y formación de primorfos. Para la disociación celular se utilizó el protocolo establecido por Müller *et al.*, 2000, en el cual se requiere agua de mar libre de calcio y magnesio (CMFSW) y/o CMFSW con concentraciones de ácido etildiaminotetraacético (EDTA) el cual es un quelante de calcio y magnesio (CMFSW-E). Todas las placas de cultivo celular y tubos se esterilizaron en una autoclave. Las muestras de tejido fueron de 4 a 5 cm³ (colocadas en cajas Petri de vidrio de 60 mm) se colocaron en agua de mar cortadas en cubos de 1 cm³, se observó el tejido a través de un microscopio estereoscópico con el fin de evitarla presencia de organismos simbiotes, el tejido de la esponja se transfirió a tubos cónicos con 40 ml de CMFSW-E (relación de tejido al medio 1:10). Después de una agitación suave durante 20 a 30 min, la solución se desechó y se le añadieron 40 ml de CMFSW-E, estos se mantuvieron en agitación continua durante 40 min, este paso se repitió por 3 tiempos más, después se filtró a través de una red de nylon de

40 micras de malla. Las células se obtuvieron por centrifugación (1600 rpm, 500 g durante 5 min) y se lavaron dos veces en CMFSW. Las células en los sedimentos finales se suspendieron en agua de mar/antibióticos a una densidad de $1.5-2.0 \times 10^5$ células/ml, 30 ml de esta suspensión se añadieron en cajas Petri de 60 mm y 20 ml en tubos cónicos, los cultivos se mantuvieron a 22°C. Dos terceras partes del medio de cultivo se reemplazaron diariamente con agua de mar/antibióticos y se mantuvieron en agitación suave para evitar la adhesión de las células en la placa.

Los agregados primarios de al menos 0.5 mm de diámetro se recogieron tan pronto como se formaron, se lavaron tres veces con agua de mar filtrada, utilizando sólo la gravedad para la separación de los agregados y los desechos. Los primorfos obtenidos se transfirieron a nuevas cajas Petri (volumen total de 30ml). Se repitió el paso anterior, hasta que no se formaron más agregados u otros organismos (principalmente protozoos) en las cajas.

Para determinar el tipo de antibióticos se realizaron pruebas en la formación de primorfos con penicilina, estreptomina, glutamina, gentamicina y akamicina. La adición de los antibióticos fue de manera combinada para potenciar su efecto (Cuadro 1).

Se prepararon stocks para las distintas moléculas (Ly294002, Froskolin, Histona metiltransferasa, GSK-3, TGF- β , TTNPB, 5-Azacytidina, Wnt Agonist, Wnt Agonist I, Wnt Agonist II, Tranilcipromina, Mek $\frac{1}{2}$ y P38SAPK2) en concentraciones milimolar (mM), mismas que se mantuvieron en congelación hasta que se realizaron los

experimentos (Fig. 2). Estas moléculas fueron diluidas en DMSO y utilizadas en concentraciones inferiores a 50 μ M (micromolar) (Martínez *et al.*, 2002; Li y Ding, 2009; Li *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2011; Hou *et al.*, 2013).

Metodología experimental. Para determinar los efectos de las moléculas sobre los primorfos de *A. viridis*, se realizaron pruebas estáticas empleando 13 moléculas de manera individual y en conjunto, en cuatro concentraciones diferentes (50, 25, 12.5 y 6.25 μ M), en el cual cada concentración representó un tratamiento (Cuadro 1 y Fig. 4), una vez establecido los efectos de cada molécula se procedió a realizar los 6 tratamientos con una serie de combinaciones, en todos los casos se incluyó un control y tres repeticiones. Para determinar efectos del cloruro de litio sobre los primorfos se utilizaron 4 concentraciones (100, 50, 25 y 12.5 mM) (Fig. 3B), cada concentración represento un tratamiento, así mismo se incluyó un control y tres repeticiones. Se utilizó medio basal ESGRO-2i con LIF adicionado con GSK-3 y Mek $\frac{1}{2}$ en agua de mar artificial (Fig. 5) para realizar 4 tratamientos más (1:3, 1:4, 1:5, 1:6 y 1:7 con relación al medio de cultivo), cada proporción represento un tratamiento, se incluyeron tres repeticiones y un control. Para determinar si existían diferencias significativas entre los tratamientos se realizaría un análisis de varianza con el programa R.

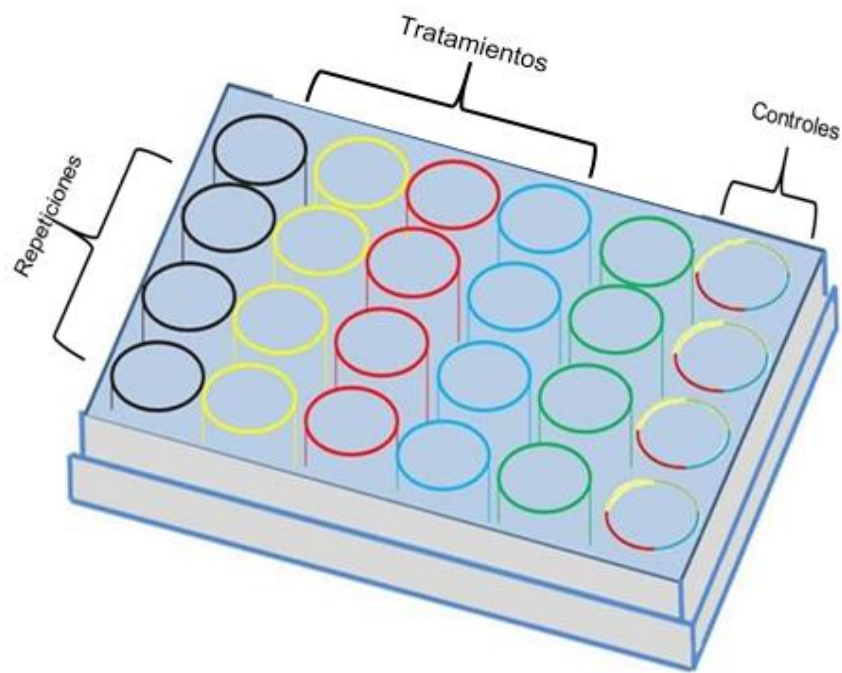


Figura 4. Esquematización del diseño experimental.

Cuadro 2. Concentraciones equivalentes utilizadas en los tratamientos.

Tratamientos	Primorfos/ pocillo	Concentraciones μ M			
		50	25	12.5	6.25
Ly294002	1-3	50	25	12.5	6.25
Froskolin, Coleus Froskohlii (F)	1-3	50	25	12.5	6.25
Histona metiltransferasa EZH ₂ (D)	1-3	50	25	12.5	6.25
GSK-3Inhibidor XVI (G)	1-3	50	25	12.5	6.25
TGF- β RI Inhibidor kinasa II (6)	1-3	50	25	12.5	6.25
TTNPB	1-3	50	25	12.5	6.25
-5-Azacytidina	1-3	50	25	12.5	6.25
Wnt Agonist	1-3	50	25	12.5	6.25
Wnt Antagonist I IWR-1-endo	1-3	50	25	12.5	6.25
Wnt Antagonist II, IWP-2	1-3	50	25	12.5	6.25
TranilciprominaHCl (T)	1-3	50	25	12.5	6.25
Mek $\frac{1}{2}$ (M)	1-3	50	25	12.5	6.25
P38SAPK2	1-3	50	25	12.5	6.25
Wnt Agonist - GSK-3	1-3	50	25	12.5	6.25
Wnt Antagonist I – Wnt Agonist II	1-3	50	25	12.5	6.25
G6TF	1-3	50	25	12.5	6.25
G6TFDM	1-3	50	25	12.5	6.25
ESGRO-2i con LIF (G-M)	1-3	50	25	12.5	6.25
Cloruro de litio	1-3	100*	50*	25*	12.5*

Concentración mM (*)

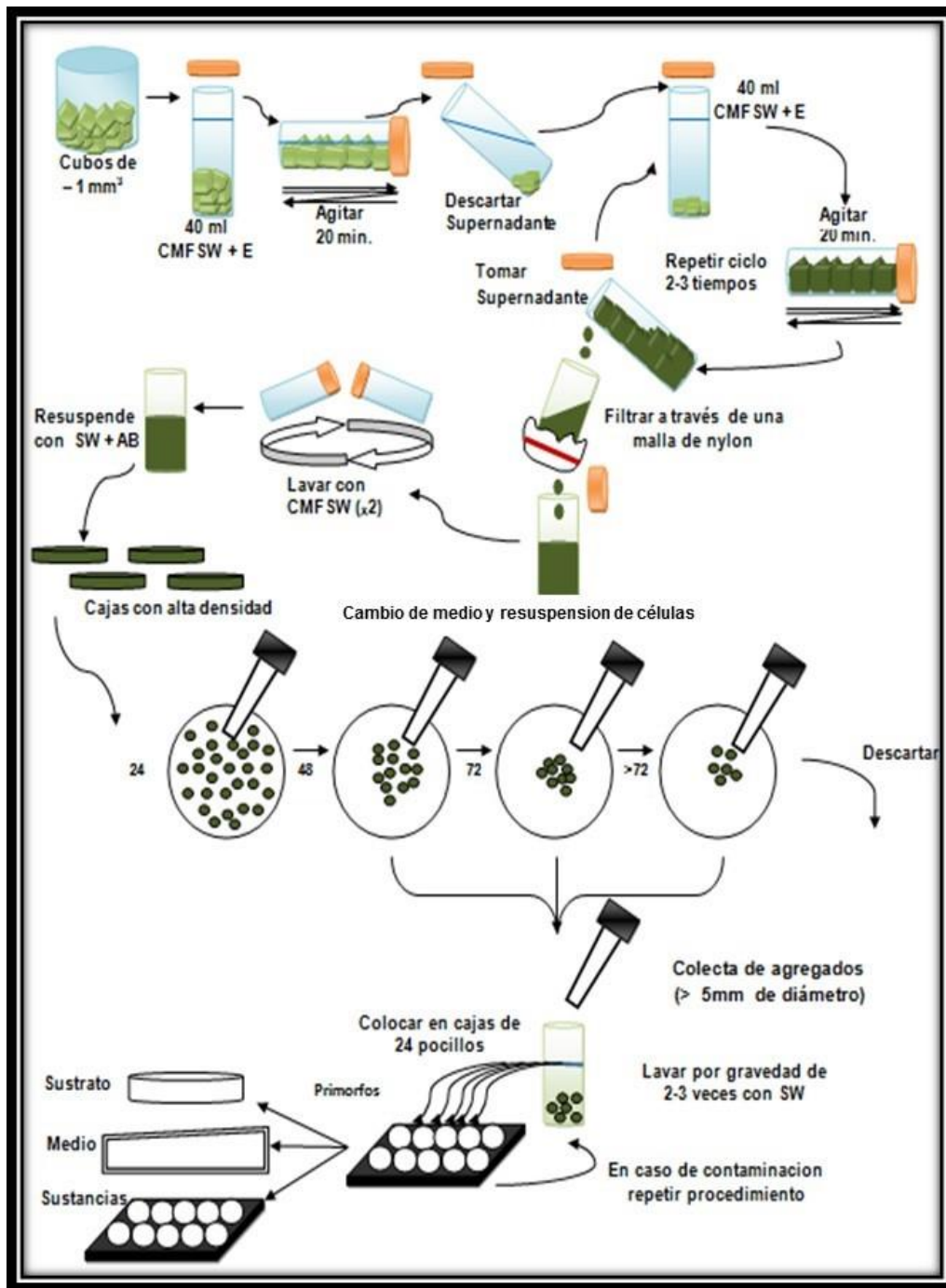


Figura 5. Proceso de disociación mecánica (protocolo modificado de Müller et al., 2000).

RESULTADOS

Se realizaron un total de 76 tratamientos, de los cuales, 52 tratamientos corresponden a las moléculas individuales y 24 tratamientos a combinaciones de moléculas.

Para controlar la contaminación en el medio de cultivo, se le añadió un cóctel de antibióticos entre los que se encuentran la penicilina, estreptomycin, glutamina, gentamicina y akamicina (Cuadro 3) con los cuales comprobamos su efectividad en el control de agentes externos como las bacterias y hongos.

Cuadro 3. Experimentos con diferentes antibióticos en la formación de primorfos de *A. viridis*.

ANTIBIÓTICOS	EFFECTIVIDAD
Penicilina, Estreptomycin y Gentamicina	Presenta poca contaminación.
Penicilina, Estreptomycin, Gentamicina y Glutamina	No presenta contaminación.
Penicilina, Estreptomycin, Gentamicina, Glutamina y Akamicina	Presenta contaminación y la agregación de células disminuye.
Gentamicina y Akamicina	Se forman pocos agregados y existe la presencia de contaminación.
Gentamicina	Se desarrollan pocos agregados celulares.
Akamicina	No se desarrollan agregados.

Los primorfos con penicilina, estreptomycin y glutamina presentaban en primer plano menos formas irregulares en color verde oscuro, característico de la esponja madre, sin embargo, no se logró inhibir la contaminación del cultivo lo que provocó un corto periodo de supervivencia, los primorfos que morían se precipitaban al fondo ocasionando que los demás se añadieran al sustrato y se desintegraran por completo (Fig.6).

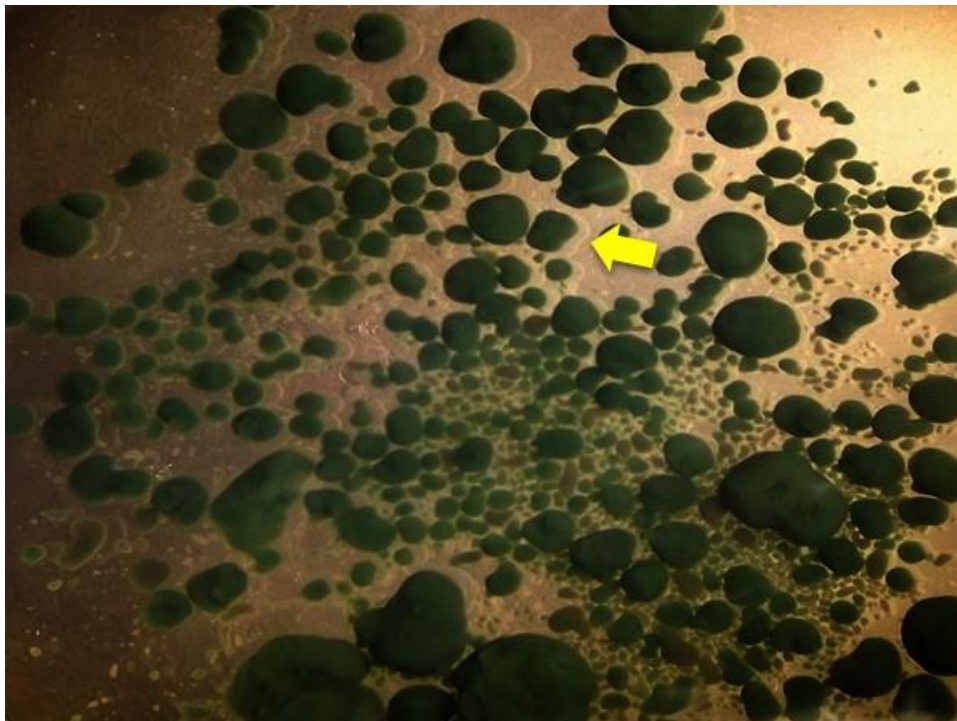


Figura 6. Primorfos con penicilina, estreptomycin y glutamina. Adhesión al sustrato (flecha).

La combinación de penicilina, estreptomicina, glutamina y gentamicina resultó con mayor efectividad, ya que, no hubo presencia de contaminantes, además, se observó un desarrollo adecuado en los primorfos los cuales presentaron una coloración verde clara, así como más formas irregulares e inclusive, el tiempo de supervivencia fue superior que en los otros tratamientos (Fig. 7).



Figura 7. Primorfos con penicilina, estreptomicina, glutamina y gentamicina.

Al utilizar la akamicina en la generación de primorfos de *A. viridis*, resultó perjudicial en el medio de cultivo debido a que los primorfos no logran un desarrollo completo, solo se observaron aglomerados de células indefinidas en colores verdes opacos hasta amarillentos lo cual es un indicio de apoptosis; asimismo, el tiempo de

supervivencia fue menor a 24 horas, la mortalidad fue provocada por las altas tasas de contaminación por hongos y bacterias (Fig. 8).

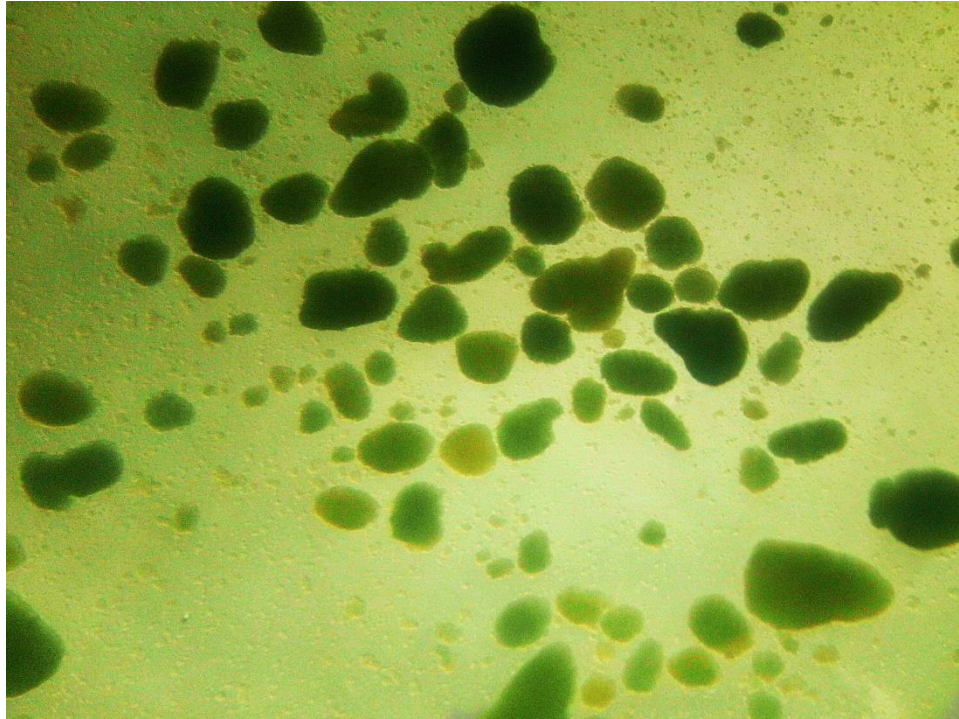


Figura 8. Primorfos con penicilina, estreptomicina, gentamicina y akamicina.

Cuando se logró controlar la contaminación por bacterias o material suspendido en el medio de cultivo, los primorfos sobrevivieron incluso por más de un mes, presentaron alta dinámica al cambiar su morfología y posteriormente volver a su forma esférica, durante este tiempo de cultivo los primorfos seguían conformando aglomeraciones de mayor tamaño sin lograr la formación de una esponja nueva (Fig. 9).

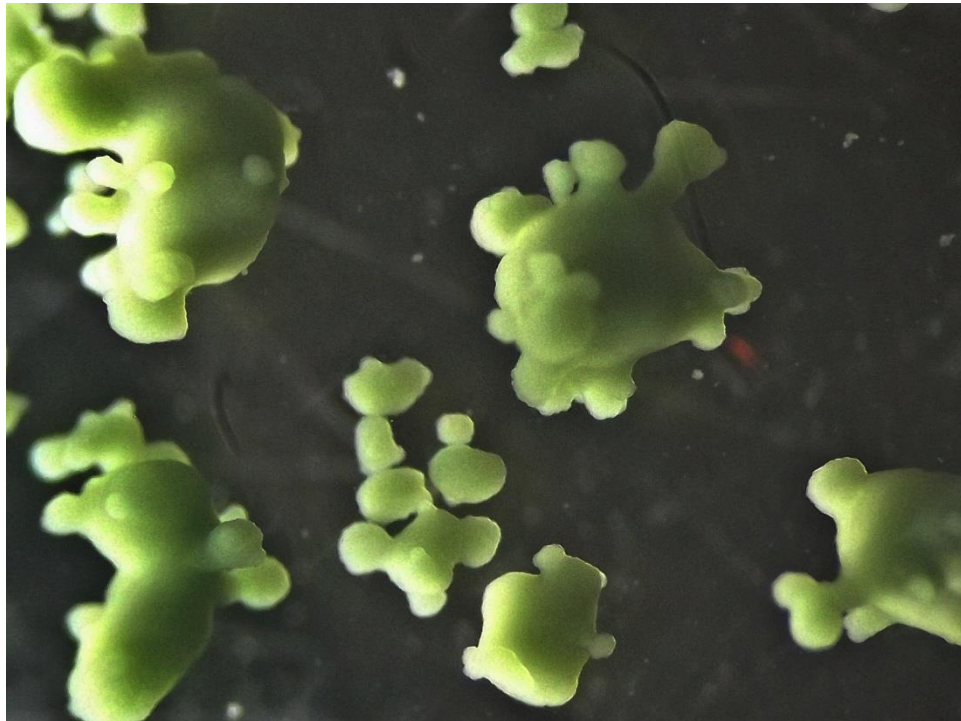


Figura 9. Primorfos de formas irregulares.

En un cultivo primario procedente de *A. viridis* se obtuvieron células en suspensión mediante el uso de agua de mar artificial libre de calcio y magnesio más EDTA. Entre estas células se encuentran coanocitos, amebocitos, pinacocitos, esclerocistos y esferulosas siendo estas últimas de mayor tamaño y abundancia, de color verde y forma esférica (Fig.10). En la primera hora se formaron aglomeraciones de células pequeñas de color amarillo, debido al movimiento oscilatorio, estas se concentraron en el centro de las cajas Petri y, aunque aún no hubo una forma definida, la unión de esferulosas se observó claramente (Fig. 11).

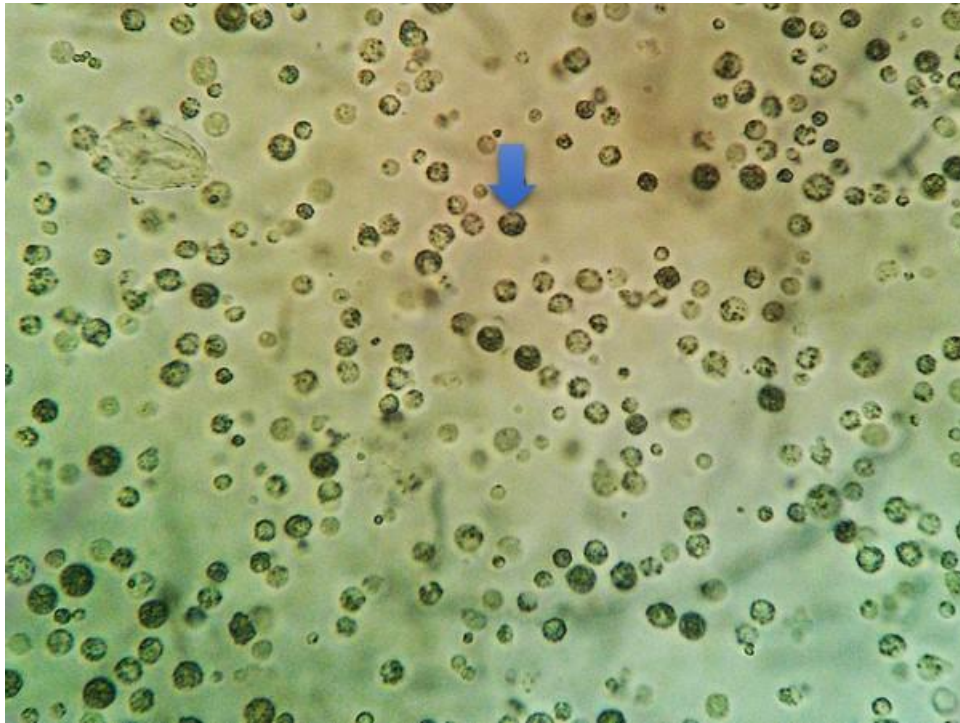


Figura 10. Células en suspensión de *A. viridis*. Esferulosas (flecha).

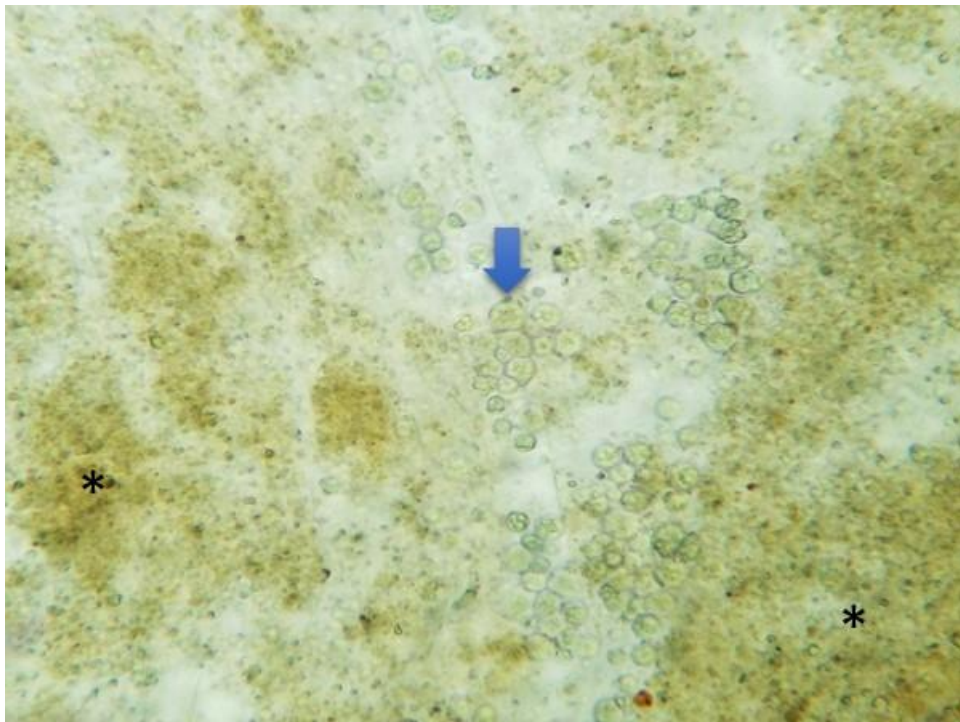


Figura 11. Aglomeración de células de *A. viridis* (asterisco). Unión de esferulosas (flecha).

En el transcurso de las primeras 24 horas después de ser separadas las células se vuelven a reunir y forman cientos de pequeños agregados de forma esférica, con una coloración verde claro y cuyo diámetro no fue mayor a 1mm, debido al movimiento oscilatorio todos se concentraron en el centro de la caja Petri (Fig. 12).

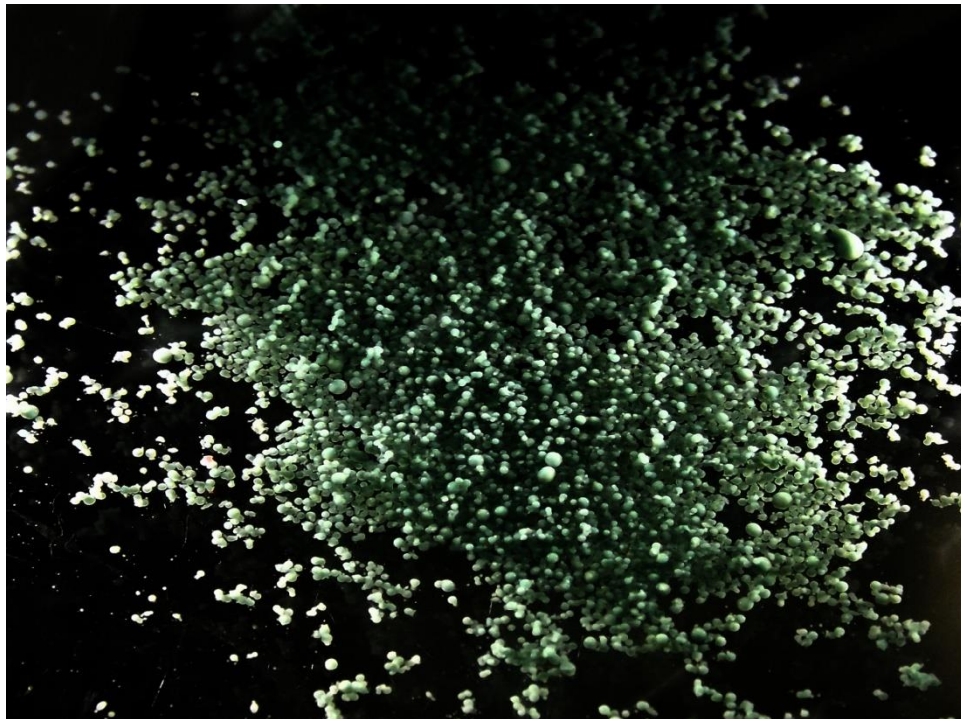


Figura 12. Formación de agregados celulares después de 24 horas de cultivo.

Posteriormente, a las 48 horas los agregados aumentaron de tamaño y el número de estos se redujo en un 30%; si bien tomaron formas irregulares, la mayoría aún presentaba la forma esférica propia de los primorfos, observándose como pequeñas esferas de cristal (Fig. 13) en este tiempo ya se pueden utilizar los primorfos para su experimentación.

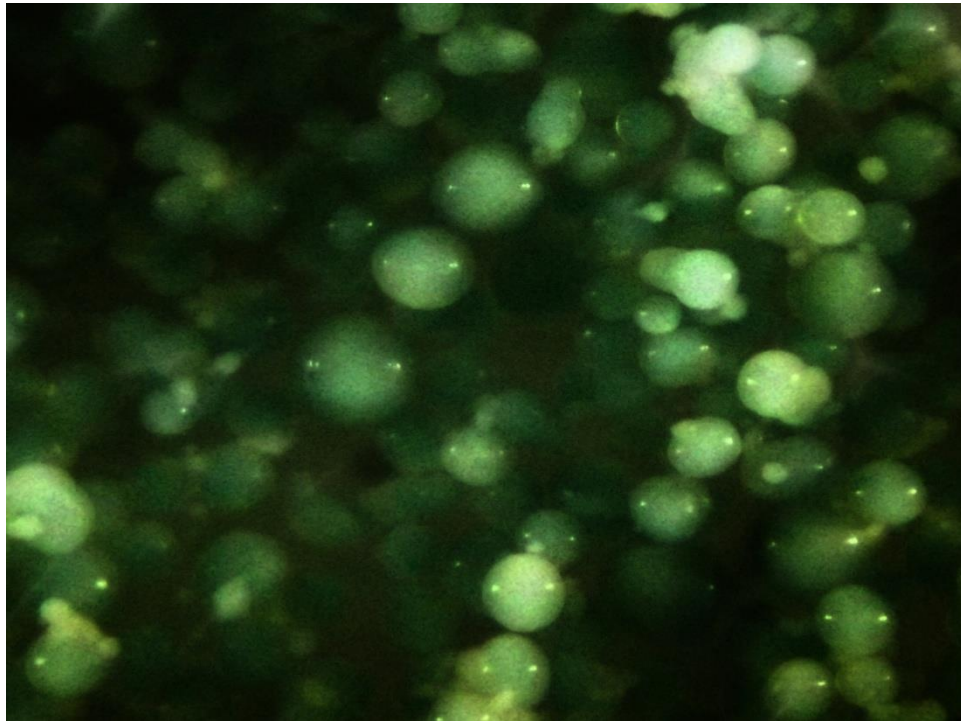


Figura 13. Primorfos después de 72 horas de cultivo.

Después de 96 horas, se formaron los agregados funcionales, cuya característica principal es que son de forma completamente esférica, coloración verde olivo y diámetro de entre 1 a 3 mm (Fig. 14). La cantidad de primorfos se redujo hasta en un 70% en el tiempo de cultivo. Los primorfos se mantuvieron con cambios parciales del medio de cultivo hasta en un 75% cada tercer día si esto era necesario a menos que presentaran algún tipo de contaminación o presencia de agentes externos como el polvo.

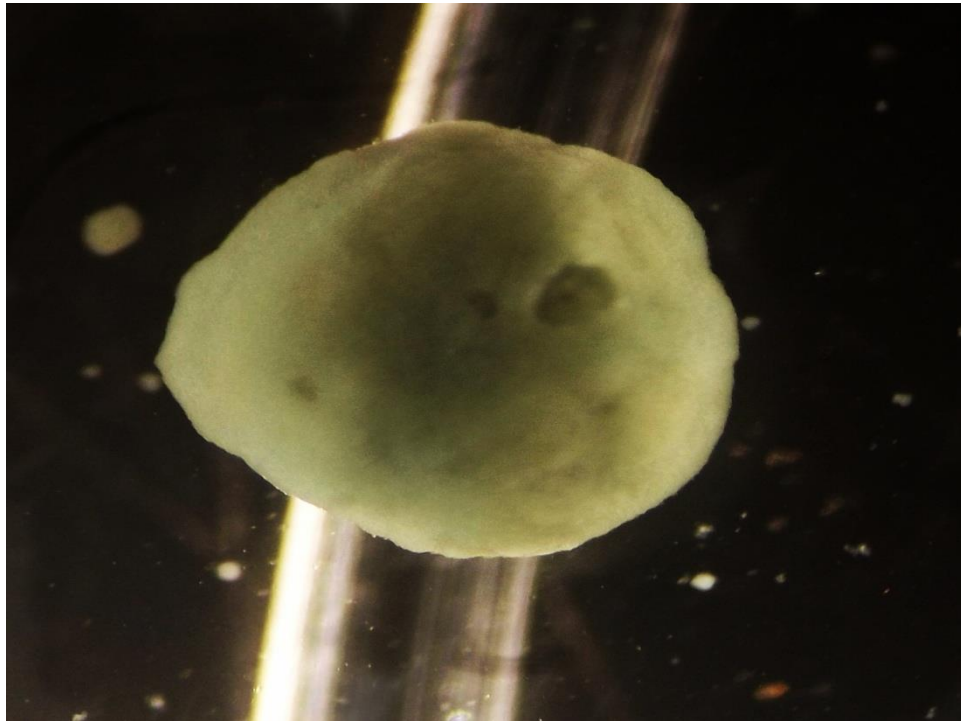


Figura 14. Primorfo de *Amphimedon viridis*.

Ensayo de moléculas en el medio de cultivo

La incorporación de las moléculas ensayadas individualmente en el medio de cultivo, no tuvo efectos significativos en la generación de células troncales a partir de primorfos, las observaciones muestran que algunas moléculas no logran disolverse completamente en el agua de mar, así también existen efectos negativos en la supervivencia de los primorfos.

Con la utilización de 5- Azacytida (Fig. 15) y P38/SAPK2 (Fig. 16), solo se observó un alargamiento del primorfo sin embargo este efecto ocurrió en algunos controles. Los primorfos se añadieron al sustrato para después alargarse formando en el interior un tipo de canales acuíferos muy definidos y separados unos de otros. Este

fenómeno pudiera dar origen a los canales del pinacodermo como lo describe Müller *et al.*, 2004, en estos tratamientos este efecto es efímero regresando a su forma esférica.

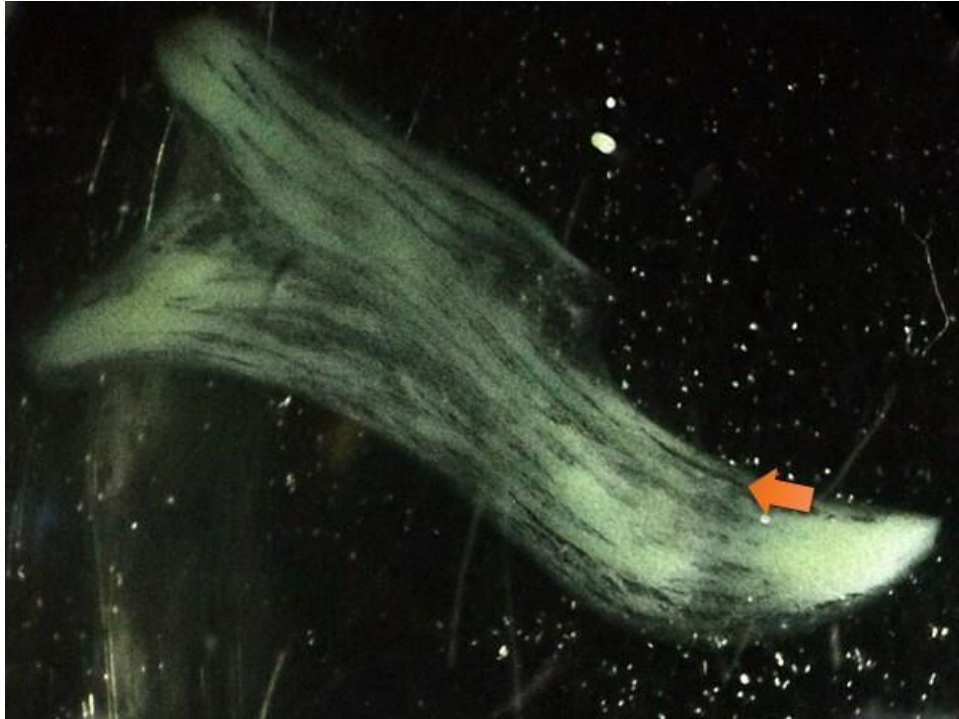


Figura 15. Efecto de alargamiento en tratamiento con 5-Azacitidina. Canal (flecha).



Figura 16. Primorfo con P38/SAPK2 en el medio de cultivo. Formación de canales (flecha).

En cambio, algunas moléculas fueron descartadas para su posterior combinación, debido a que no se lograron disolver en el medio de cultivo, observando precipitación en solo unos minutos e incluso 24 horas después de estar en cultivo. Entre ellas se encuentran GSK-3 (Fig. 17), Histona metiltransferasa, P38/SAPK2 (Fig. 18) y Wnt Agonista I. Estas precipitaciones no afectaron en la supervivencia de los primorfos.

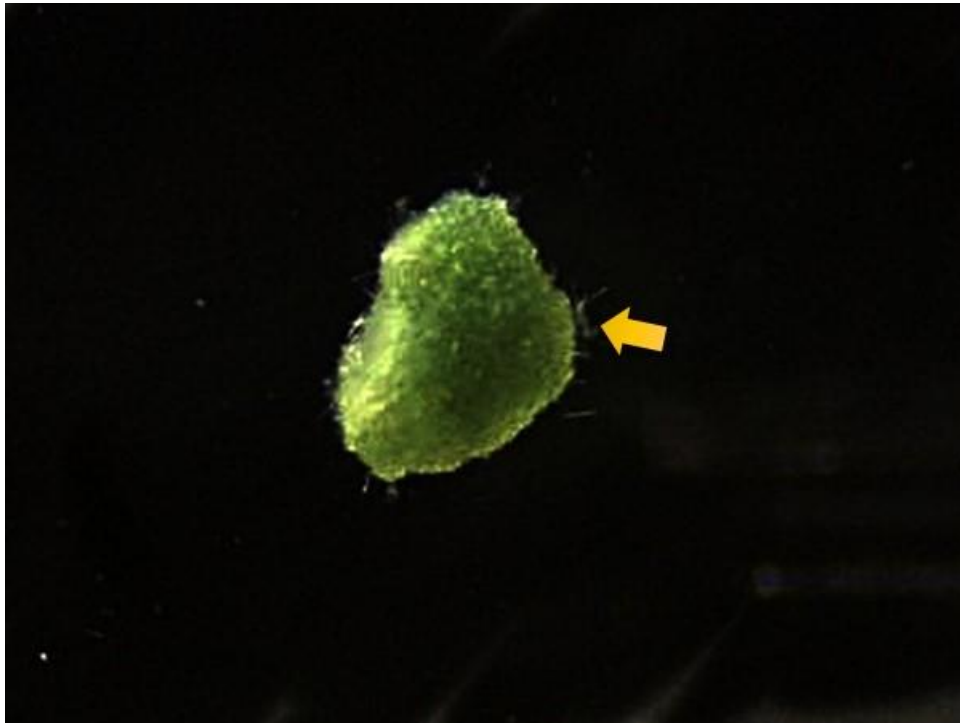


Figura 17. Molécula GSK-3 (flecha) precipitada alrededor del primorfo.



Figura 18. Molécula P38/SAPK2 (flecha) precipitada en el medio de cultivo.

Con la molécula TTNPB, la supervivencia de los primorfos es nula, los primorfos toman una coloración café indicando la muerte de células esferulosas mismas que dan el color verde, también observamos una capa blanca alrededor de la masa celular (Fig. 19), TTNPB se descartó para la formación de una molécula compuesta. Sin embargo, las utilizations de diferentes combinaciones de moléculas no arrojaron resultados positivos en la generación de células arqueocitas. Incluso en los tratamientos en que se utilizaron entre 2 y 3 primorfos estos logran unirse, sin aplicar agitación al medio de cultivo lo que indica una alta actividad de telomerasa entre las células (Fig.20).

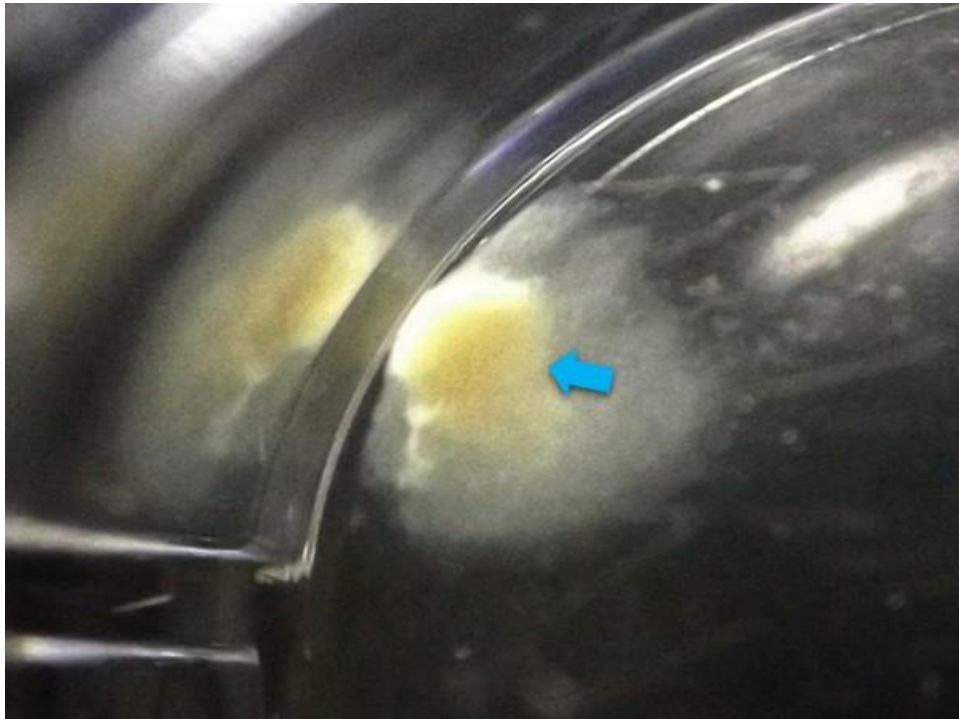


Figura 19. Efecto deletéreo con la molécula TTNPB en el medio de cultivo. Primorfo (flecha).

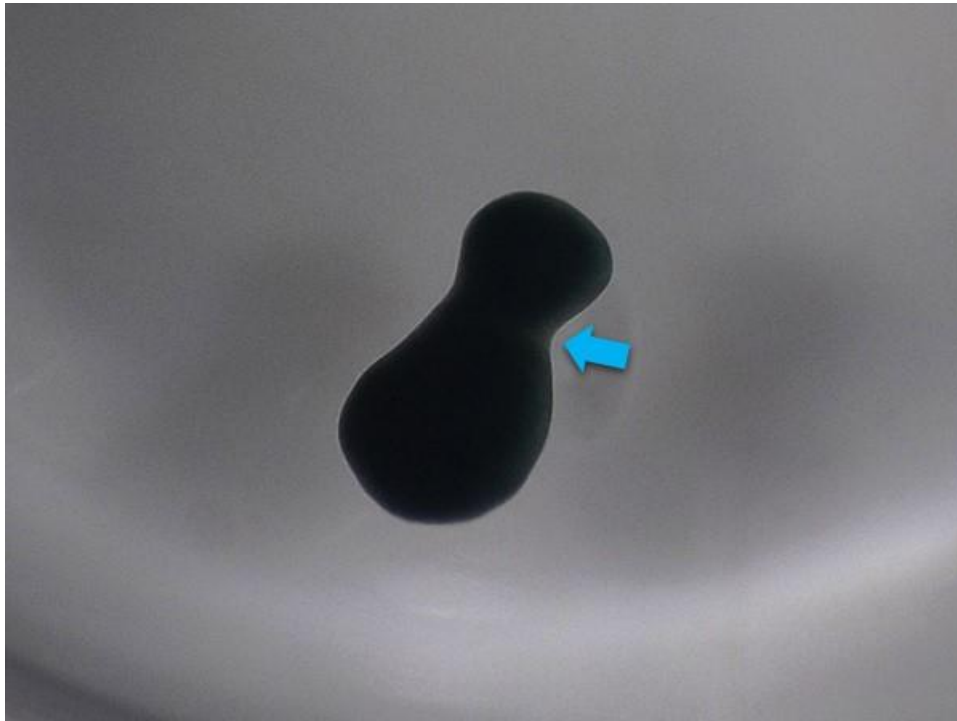


Figura 20. Unión de dos primorfos (flecha).

En los tratamientos con distintas concentraciones de cloruro de litio, se observó un efecto de adición del primorfo en el fondo del pocillo el cual es evidente a las 24 horas (Fig. 21) en el medio de cultivo, esto mismo ocurre en algunos de los controles. No se tiene algún efecto causado por el cloruro de litio.



Figura 21. Primorfos con cloruro de litio en el medio de cultivo. Se muestra un alargamiento en el fondo del pocillo.

Uso del medio de cultivo con ESGRO-2i

Para los primorfos en medio de cultivo con ESGRO-2i con LIS, GSK-3 y Mek $\frac{1}{2}$ en agua de mar artificial, la supervivencia de los primorfos se reduce a una semana, el deterioro es evidente a las 48 horas en el medio de cultivo, el primorfo se disgrega solo poco a poco, lo que se evidencia por una alta muerte celular (Fig. 22). La presencia de otros nutrientes en el medio aumenta la contaminación por bacterias, esta es una de las causas por las que no sobreviva el cultivo y que los antibióticos no pudieron eliminar.



Figura 22. Desintegración de un primorfo. Tratamiento con medio basal ESGRO-2i con LIF, GSK-3 y Mek $\frac{1}{2}$ en agua de mar artificial.

DISCUSIÓN

Los cultivos de células de esponjas requieren requisitos específicos para lograr su periodo de vida, entre estos se encuentra la elección de antibióticos que dependerá de la especie de esponja, esto debido a que reaccionan de distintas maneras a la adicción de antibióticos. Entre los antibióticos que se utilizaron para establecer un sistema de cultivo para primorfos de *A. viridis*, se encuentra la gentamicina misma que ayudo a la eliminación de bacterias y permitió el desarrollo de los primorfos, esto sin tener algún efecto negativo como lo menciona Spikema *et al.*, 2003, donde la adicción de dicho antibiótico reprime la formación de primorfos en distintas especies de esponjas. El uso de antibióticos es indispensable para el control bacteriano, pruebas realizadas demostraron que si no se le adiciona un antibiótico al medio de cultivo la formación de agregados celulares es poco e incluso nula, aumentando la proliferación de microorganismos. La separación de las células esponjosas de los microorganismos antes de establecer el cultivo y el uso de antibióticos durante el cultivo son los métodos más utilizados para prevenir la contaminación del cultivo (Brigth y Bulgheresi, 2010). Para los cultivos de esta esponja funcionaron los antibióticos como la penicilina, glutamina, gentamicina y estreptomycinina (Müller *et al.*, 2000; Richelle-Maurer *et al.*, 2003). No es recomendable la utilización de akamicina para esta esponja debido a que no suprime la proliferación de bacterias y es corto el lapso de vida de los primorfos en el medio de cultivo. Aunque la eliminación de bacterias es imposible debido a que la mayoría de las esponjas están constituidas entre un 40 y 60 % de bacterias y en

muchos casos las bacterias se incorporan al medio como fuente de alimento (De Caralt, Uriz y Wijffels, 2007; Lee *et al.*, 2009). De acuerdo con Pomponi y Willoughby en 1994, existen tres aspectos importantes que se deben de tomar en cuenta para la obtención de células individuales en suspensión y consecuentemente un cultivo primario: la disociación del tejido de las esponjas, un enriquecimiento selectivo utilizando gradientes de centrifugación y la aplicación de antibiótico.

La formación de primorfos en la esponja *A. viridis* sucede alrededor de los tres días de cultivo, mismo que esto corresponde a lo documentado para otras especies de esponjas marinas y dulceacuícolas, donde la formación ocurre incluso en las primeras horas (Spikema, 2003). Una pieza clave para la formación de agregados celulares es la agitación constante ya que este movimiento impide que las células se adhieran al recipiente, la agitación puede ser de manera oscilatoria y lineal alternativo con movimientos uniformes y constantes (Müller *et al.*, 2000).

El análisis de distintas moléculas en el medio de cultivo para inducir células troncales a partir de primorfos, no arrojaron resultados positivos, ya que los primorfos de *A. viridis* no reaccionan a dichos tratamientos. Una de las hipótesis sugiere que los primorfos con poca fracción de arqueocitos no logra la formación de cuerpos funcionales, como fue el caso para los primorfos obtenidos de *A. viridis* donde no se adhirieron al sustrato o en algunos este efecto fue efímero y eventualmente provocó citólisis. Aunque se piensa que el primorfo está constituido principalmente de células arqueocitas y pueden mantenerse varios meses sin fijación en el sustrato, lo que conduce a la morfogénesis para formar esponjas

funcionales (Müller, 2006). Esto revela la función de los arqueocitos y que las esponjas poseen un sistema bien desarrollado para regular la diferenciación de células madre y probablemente también la renovación (Funayama, 2010).

Los tratamientos utilizados en este estudio variaron de concentraciones desde los 50 a 6.25 μM , lo que permite resaltar que probablemente de manera individual el efecto de las moléculas no sea suficiente (Hou *et al.*, 2003; Valisano *et al.*, 2012). Otra posible razón que explicaría la falta de respuesta es que las células presentes en estas estructuras están muy bien diferenciadas, lo que impide la dediferenciación celular. La transdiferenciación celular es un fenómeno poco conocido y se sabe que la diferenciación celular generalmente es difícil de revertir. En este caso las células esferulosas que constituyen la mayor parte del agregado pudieran ser refractarias a la transdiferenciación debido a su alto grado de especialización. Las condiciones del medio de cultivo son aceptables, no se necesitan suplementos para mantenerlos, pero la presencia de otros factores para el enriquecimiento del medio de cultivo provoca la proliferación de bacterias y el deterioro de primorfos en el tiempo de cultivo. Los tratamientos con sales de litio tiene efecto en la expresión de genes de la pluripotencia (Mora-Castillas, 2010), así mismo interrumpen el desarrollo embrionario en varios organismos como anfibios, ratones, erizos de mar e hidras (Gurvich y Klein, 2002). Aunque los tratamientos con cloruro de litio no arrojan resultados positivos para este tipo de formación en esponjas, estos tratamientos pueden modificarse y explorarse a mayor detalle en

trabajos futuros, con la ventaja de que el cloruro de litio ya ha sido probado en agua de mar en esponjas en desarrollo.

Uno de los fenómenos que se observó es la presencia de canales en los primorfos tanto en los tratamientos como en los controles, lo que demuestra que no es un fenómeno aislado y si las condiciones fueran adecuadas se daría origen a los canales del pinacodermo. Otra explicación es que en esta esponja es un proceso de adaptación al medio y al no encontrar las condiciones adecuadas se revierte el efecto, esto indica que dichas formaciones esféricas son sistemas de protección para esta esponja, al contrario con lo demostrado por Müller *et al.*, 2004, donde la utilización de una matriz de gelatina o poli-L-lisina tiene como efecto el desarrollo de estos canales, por lo tanto creemos que no se necesitan algún factor extra en el medio de cultivo para inducir dichos canales en *A. viridis*.

Las moléculas ensayadas hasta el momento se usan de forma combinada en otros sistemas (Nie *et al.*, 2012; Hou *et al.*, 2013). Esos ensayos que hemos realizado nos han permitido determinar la solubilidad de los compuestos en agua de mar y algún efecto deletéreo o nocivo como ocurrió con el TTNPB. Los experimentos clásicos han demostrado que los arqueocitos tienen un papel importante en la capacidad de algunas esponjas de reorganizarse en esponjas individuales y funcionales a partir de suspensiones de células disociadas. Dicha reorganización es posible solo si la suspensión contiene una proporción fija de arqueocitos o está formada por puros arqueocitos (Vacelet y Gallisian, 1978; De Rosa *et al.*, 2003). Para generar células somáticas, los arqueocitos desempeñan un papel importante diferenciando todos

los tipos de células incluyendo a los coanocitos mismos que funcionan como un sistema de almacenamiento de células troncales. Ambos tipos de células tienen la capacidad de diferenciarse en células somáticas y células germinales, aunque esto depende de las especies (Funayama, 2013).

El uso de células madre esponjosas que se cultivan en un medio óptimo aumentaría las posibilidades de establecer una línea celular proliferante continua. Sin embargo, se debe implementar un método para asegurar la división continua y el control de la diferenciación celular. Las líneas celulares estables de insectos y mamíferos suelen ser células transformadas con una capacidad proliferativa ilimitada (células inmortales). En mamíferos, las células transformadas pueden ser adquiridas a partir de tejidos de tumores o inducidas artificialmente, ya sea por hibridación de células normales con células tumorales (por ejemplo, hibridomas), sometimiento a las células a agentes mutagénicos (por ejemplo, compuestos carcinógenos, virus o radiactividad) o transferencia de genes (por ejemplo, gen E1 o PER.C61). Ocasionalmente, las células inmortales evolucionan espontáneamente por la mutación de células normales que crecen en medios ricos. Análogamente a los cultivos celulares de animales, en esponjas, se han utilizado con frecuencia factores de crecimiento para estimular la división celular. No obstante, nunca se ha informado de una inmortalización exitosa de células esponjosas (De Caralt, Uriz y Wijffels, 2007).

La investigación de cultivos de células esponjosas no sólo debe centrarse en la estimulación de la división celular, que ha sido el objetivo principal de dicha

investigación, sino también en la prevención de la apoptosis (Wiens *et al.*, 2003). Varias observaciones sugieren que las células esponjosas se dividen y mueren a tasas altas. En condiciones naturales, las esponjas cambian continuamente de forma y experimentan eventos de fisión o fusión (Turon, Tarjuelo y Uriz, 1998; Garrabou y Zabala, 2001). El mismo individuo es capaz de crecer simultáneamente en un lado y disminuir en tamaño en el otro lado. Este alto dinamismo y plasticidad no necesariamente resulta en crecimiento absoluto, ya que las esponjas crecen lentamente, pero da lugar a un reordenamiento y regeneración de la biomasa, lo que puede requerir una alta tasa de mitosis y apoptosis en la misma esponja individual (De Caralt, Uriz y Wijffels, 2007).

CONCLUSIONES

1.- Se obtuvo un cultivo primario procedente de la esponja *A. viridis* mediante procesos químicos y mecánicos.

2.- Los antibióticos que se recomiendan utilizar para el cultivo primario de *A. viridis* son: la gentamicina, estreptomina, penicilina y glutamina. La adición de akamicina para la formación de agregados celulares debe ser descartada ya que tiene un efecto nocivo en el cultivo.

3.- La utilización de moléculas (Ly294002, Froskolin, Histona metiltransferasa, GSK-3, TGF- β , TTNPB, 5-Azacytidina, Wnt Agonist, Wnt Agonist I, Wnt Agonist II, Tranilcipromina, Mek $\frac{1}{2}$ y P38SAPK2) en el medio de cultivo no arroja resultados positivos en la generación de células troncales a partir de agregados celulares (primorfos).

4.- Para el desarrollo de una línea celular inmortal, no solo debemos utilizar la marcada capacidad de las células de las esponjas para dividirse continuamente sino también en la reducción de la alta actividad de apoptosis en estas mismas células.

5.- Recomendamos la utilización de otra especie de esponja, esto porque se ha demostrado que los embriones y larvas de esponjas presentan mayor cantidad de células madre y la tasa de contaminación disminuye (Rinkevich, 2005). En *Amphimedon viridis* no encontramos embriones presentes en el tejido, por lo que trabajamos con células procedentes de tejidos adultos en donde las células se encontraban ya diferenciadas.

6.- Los agregados que se forman con esta especie están constituidos en su mayor parte por células esferulosas, células muy especializadas y refractarias a la dediferenciación o transdiferenciación.

7.- Los primorfos de esta esponja marina son más recomendables en el estudio de células pluripotentes que aglomerados o células individuales en suspensión. Esto indica que los primorfos son una buena opción para producción *in vitro* de esponjas marinas.

APLICACIÓN PRÁCTICA

El potencial de los organismos marinos como fuente de nuevos productos naturales es muy prometedor (Águila-Ramírez, Hernández-Guerrero y Gonzales-Acosta, 2011). Las esponjas han creado el mayor número de productos naturales, muchos de estos compuestos son de interés para la industria farmacéutica (Müller *et al.*, 2000; Rinkevich, 2011). Sin embargo, el desarrollo de fármacos a partir de productos naturales marinos en general y particularmente de las esponjas, se evita frecuentemente por limitaciones de suministro, ya que la colecta de organismos en su medio natural es un proceso que debe ser descartado, debido a que la mayoría de las esponjas tienen una tasa de crecimiento lento, son raras y su cultivo en masa aún no se ha logrado (Fusetani, 2000; Faulkner, 2000; Thakur y Müller, 2004). Este problema es a menudo ignorado por la investigación de productos naturales marinos, ya que el énfasis se encuentra principalmente en el descubrimiento de nuevos productos naturales bioactivos (Fusetani, 2000; Faulkner, 2000; Thakur y Müller, 2004).

El estudio de las células madre nos permitirá conocer los mecanismos de especialización celular, cuáles son los mecanismos que hacen activar un gen y que este haga su trabajo y así también que mecanismos inhiben la expresión de ese gen. Tal conocimiento puede dirigir las tentativas futuras en el cultivo de células y la acuicultura (Richelle- Maurer *et al.*, 2003). Las células madre pueden servir para probar nuevos medicamentos en todo tipo de tejidos antes de hacer las pruebas

reales en animales o en humanos. Muchas enfermedades son consecuencia de malas funciones celulares o destrucción de tejidos. Las células madre pluripotentes estimuladas a desarrollarse como células especializadas ofrecen frecuentemente la posibilidad de reemplazar células y tejidos dañados (De Caralt, Uriz y Wijffels, 2007).

BIBLIOGRAFÍA

- Acevedo, P y Cortés, M. 2008. Células madre: generalidades, eventos biológicos y moleculares. *IATREIA*. **21(3)**: 292-306.
- Adamska, M., Matus, D. Q., Adamski, M., Green, K., Rokhsar, D. S., Martindale, M. Q. & Degnan, B. M. 2007. The evolutionary origin of hedgehog proteins. *Current Biology*. **17**: 836-837.
- Águila-Ramírez, R., Hernández-Guerrero, C. y González-Acosta, B. 2011. Potencial biotecnológico de las esponjas en la producción sostenible de nuevos fármacos: perspectivas y limitaciones. *CICIMAR Oceánicas*. **26(2)**: 31-46.
- Alesiani, D., Cicconi, R., Matei, M., Bei, R. y Canini, A. 2009. Inhibition of Mek $\frac{1}{2}$ Kinase Activity and Stimulation of Melanogenesis by 5, 7-dimethoxycoumarin Treatment of Melanoma Cells. *International Journal of Oncology*. **34(6)**: 1727-1735.
- Becerro, M.A., Thacker, R.W., Turon, X., Uriz, M.J. y V. J. Paul. 2003. Biogeography of sponge chemical ecology: comparisons of tropical and temperate defenses. *Oecología*. **135**: 91-101.
- Belarbi, E.H., Contreras, G.A., Chsiti, Y., García, C.F y Molina, E.M. 2004. Producing Drugs From Marine Sponges. *Biotechnology Advances*. **21**: 585-598.

- Blandón, L., Estrada, N., López, J. y Márquez, M. 2014. Esponjas marinas ¿Producción biotecnológica sostenible? Revista Facultad de Ciencias Universidad de Colombia, sede Medellín. **3(2)**: 11-29.
- Carballo, J., Gómez, P. y Cruz-Barraza, J. 2014. Biodiversidad de Prolifera en México. 2012. Revista Mexicana de Biodiversidad. **85**: 143-153.
- Carreira, de P. J., Desoti, V. C., Gibin, S. E., Cardoso, S. M., Ueda-Nakamura, T., Meneses, R. S., Miguel, B.E., De Olivera, S. S., Gomes, de O. G. y Vataru, N. C. 2015. Trypanocidal activity organic extracts from the Brazilian and Spanish marine sponges. Revista Brasileira de Farmacognosia. **25**: 651-656.
- Chen, B., Dosge., M.E., Tang, W., Lu, J., Ma, Z., Fan, C.W., Wei, S., Hao, W., Kilgore, J., Williams, N.S., Roth, M.G., Amatruda, J.F, Chen, C. y Lum, L. 2009. Small molecule-mediated disruption of Wnt-depent signaling in tissue regeneration ad cáncer. Nature Chemical Biology. **5(2)**: 100-107.
- Chernogor, L. Denikina, N., Belikov, S.I. y Ereskovsky, A. 2011. Long-term Cultivation of Primmorphs from Freshwater Baikal Sponges *Lubomirskia baikalensis*. Marine Biotechnology. **13**: 782-792.
- Custodio, M., Prokic, I., Steffen, R., Koziol, C., Borojevic, R., Brummer, F., Nickel, M. y Müller, W. 1998. Primmorphs Generated from Dissociated Cells of the Sponge *Suberites domuncula*: A Model System for Studies of Cell

Proliferation and Cell Death. Mechanisms of Ageing and Development. **105**
(1-2): 45-59.

Davood, M., Iranshahy, M., Shakeri, A., Hoscini, A., Yavari, H., Nazcmi, M. y
Iranshahi, M. 2015. Cytotoxicity Evaluation of Extracts and Fractions of Five
Marine Sponges from the Persian Gulf and HPLC Fingerprint Analysis of
Cytotoxic Extracts. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. **5(11)**: 896-
901.

De Caralt, S., Uriz, M. y Wijffels, R. 2007. Cell Culture from Sponges: Pluripotency
and Immortality. TRENDS in Biotechnology. **25(10)**: 467-471.

De Rosa, S., De Caro, S., Iodice, C., Tommonaro, G., Stefanov, K. y Popov, S.
2003. Development in Primary Cell culture of Demosponges. Journal of
Biotechnonology. **100**: 119-125.

Ereskovsky, A. y Tokina, D. 2007. Asexual Reproduction in Homoscleromorph
Sponges (Porifera: Homoscleromorpha). Marine Biology **151**: 425-434.

Funayama, N., Nakatsukasa, M., Karaku, S., Takechi, K., Doji, M., Iwabe, N.,
Miyata, T y Agata, K. 2005. Isolation of Ef Silicatein and Ef Lectin as
Molecular Markers for Sclerocytes and Cells Involved in Ante Immunity in the
Freshwater Sponge *Ephydatia fluviatilis*. Zoological Science. **22**: 1113-1122

- Funayama, N. 2010. The Stem Cell System in Demosponges: Insights into the Origin of Somatic Stem Cells. *Development, Growth and Differentiation*. **52**: 1-14.
- Funayama, N. 2013. The Stem Cell System in Demosponges: Suggested Involvement of Two Types of Cells: Archeocytes (Active Stem Cells) and choanocytes (Food-Entrapping Flagellated Cells). *Development, Growth and Differentiation*. **223**: 23-38.
- Garate, L., Blanquer, A. y Uriz, M. 2015. Calcareous Spherules Produced by Intracellular Symbiotic Bacteria Protect the Sponge *Hemimycale columella* from Predation Better than secondary metabolites. *Marine Ecology Progress Series*. **523**: 81-92.
- Garrabou, J. y Zabala, M. 2001. Growth Dynamics in Four Mediterranean Demisponges. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. **52(3)**: 293-303.
- Hanna, J., Markoulaki, S., Mitalipova, M., Cheng, A. W., Cassady, J. P., Staerk, J., Carey, B. W., Lengner, C. J., Foreman, R. y Love, J. 2009. Metastable pluripotent states in NOD-mouse-derived ESCs. *Cell Stem Cell*. **4**: 513-524
- Hou, P., Li, Y., Zhang, X., Liu, C., Guan, J., Li, H., Zhao, T., Ye, J., Yang, W., Liu, K., Ge, J., Xu, J., Zhang, Q., Zhao, Y. y Deng, H. 2013. Pluripotent Stem Cell Induced from Mouse Somatic Cells by Small-Molecule Compounds. *Science*. **341**: 651-654.

- Huang, J., McClintock, J., Amsler, C. y Hunag, Y. 2008. Mesofauna Associated with the Marine Sponge *Amphimedon viridis*. Do its Physical or Chemical Attributes Provide a Prospective Refuge from Fish Predation. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. **362**: 95-100.
- Ilan, M., Contini, H., Carmeli, S. y Rinkevich, B. 1996. Progress Towards Cell Cultures from a Marine Sponge that Produces Bioactive Compounds. *Journal of Marine Biotechnology*. **4**: 145-149.
- Li, W. y Ding, S. 2009. Small Molecules that Modulated Embryonic Stem Cell Fate and Somatic Cell Reprogramming. *Trends in Pharmacological Sciences*. **31(1)**: 36- 45.
- Li, W., Wei, W., Zhu, S., Zhou, J., Shi, T., Lin, T., Hao, E., Hayek, A., Deng, H. y Ding, S. 2009. Generation of Rat and Human Induced Pluripotent Stem Cells by Combining Genetic Reprogramming and Chemical Inhibitors. *Cell Stem Cell*. **4**:16-19.
- Liu, J., Wu, X., Mitchell, B., Kintner, C., Ding, S. y Schultz, P.G. 2005. A Small-Molecule Agonist of the Wnt Signaling Pathway. *Angewandte Chemie International Edition*. **117(13)**: 2013-2016.
- Lee, M. G., C. Wynder, D. M., Schmidt, D., McCafferty, G. y Shiekhattar, R. 2006. Histone H3 lysine 4 demethylations is a target of nonselective antidepressive medications. *Chemical Biology*. **13(6)**: 563-567

- Le Pennec, G., Perovic, S., Shorkry, M., Grebenjuk, V., Steffen, R., Brümer, F. y Müller, W. 2003. Cultivation of Primmorphs from the Marine Sponge *Suberites domuncula*: Morphogenetic Potential of Silicon and Iron. Journal of Biotechnology. **100**: 93-108.
- Maritz, K., Calcino, A., Fahey, B., Degnan, B. y Degnan, M. 2010. Remarkable Consistency of Larval Release in the Sperm Cast-Mating Demosponge *Amphimedon queenslandica* (Hooper and van Soest). The Open Marine Biology Journal. **4**: 57-64.
- Martínez, A., Castro, A., Dorronsoro, I. y Alonso, M. 2002. Glycogen Synthase kinase 3 (GSK-3) Inhibitor as New Promising Drugs for Diabetes, Neurodegeneration, Cancer, and Inflammation. Medical Research Reviews. **22(4)**: 373-384.
- Mikkelsen, T. S., J. Hanna, X. Zhang, M. Ku, M. Wernig, P. Schorderet, B. E. Bernstein, R. Jaenisch, E. S. Lander and A. Meissner. 2008. "Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. Nature. **454(7200)**: 49-55.
- Müller, W., Böhm, M., Batel, R., De Rosa, S., Tommonaro, G., Müller, I. y Schöder, H. 2000. Application of Cell Culture for the Production of Bioactive Compounds from Sponges: Synthesis of Avarol by Primmorphs from *Dysidea avara*. Journal of Natural Products. **63**: 1077-1081.

- Müller, W. E., Korzhev, M., Le Pennec, G., Müller, I. M. & Schröder, H. C. 2003. Origin of metazoan stem cell system in sponges: first approach to establish the model (*Suberites domuncula*). *Biomolecular Engineering*. **20**: 369-379
- Müller, W.E. Wiens, M., Müller, I. y Brümmer, F. 2004a. From Cells to Primmorphs and Adult Sponges: An Approach to Understand the Bauplan of Demospongiae. *Bollettino dei Musei e Degil Istituti Biologici dell'Università di Genova*. **6**: 39-54.
- Müller, W.E., Thakur, N.L., Ushijima, H., Thakur, A. N., Krasko, A., Le Pennec, G., Indap, M.M., Perovic-Ottstadt, S., Schöder, H.C., Lang, G. y G. Bringmann. 2004b. Matrix-mediated canal formation in primmorphs from sponge *Suberites domuncula* involves the expression of a CD36 receptor-ligand system. *Journal of Cell Science*. **117**: 2579-2590.
- Müller, W. 2006. The Stem Cell Concept in Sponges (Porifera) Metazoan Traits. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. **17**: 481-491.
- Müller, W. y Müller, I. 2003. The Hypothetical Ancestral Animal. The Urmetazoa: Telomerase Activity in Sponges (Porifera). *Journal of the Serbian Chemical Society*. **68(4-5)**: 257-268.
- Müller, W., Wiens, M., Batel, R., Steffen, R., Schröder, H., Borojevic, R. y Custodio, M. 1999. Establishment of a Primary Cell Culture from a Sponge: Primmorphs from *Suberites domuncula*. *Marine Ecology Progress Series*. **178**: 205-219.

- Nie, B., Wang, H., Laurent, T. y Ding, S. 2012. Cellular Reprogramming: A Small Molecular Perspective. *Current Opinions and Cell Biology*. **24**: 1-9.
- Page, J., Northcote, P., Webb, V., Mackey, S. y Handley, S. 2005. Aquaculture Trails for the Production of Biologically Active Metabolites in the New Zealand Sponge *Mycale hentscheli* (Demospongiae: Poecilosclerida). *Aquaculture*. **250**: 256-269.
- Papp, B. y Plath, K. 2013. Epigenetics of reprogramming to induced pluripotency. *Cell*. **152(6)**: 1324-1343.
- Perovic, S., Schroder, H. C., Sudek, S., Grebenjuk, V. A., Batel, R., Stifanic, M., Muller, I. M. & Muller, W. E. 2003. Expression of one sponge Iroquois homeobox gene in primmorphs from *Suberites domuncula* during canal formation. *Evolution and Development*. **5**: 240-250.
- Pomponi, S.A. 2006. Biology of the Porifera: Cell Culture. *Canadian Journal of Zoology*. **84**: 167-174.
- Pozzolini, M., Sturla, L., Cerrano, C, Bavestrello, G., Camardella, L., Parodi, A.M., RAheli, U., Müller, W.E.G. y Giovine, M. 2004. Molecular Cloning of Silicatein Gene from Marine Sponge *Petrosia ficiformis* (Porifera, Demospongiae) and Development of Primmorphs as a Model for Biosilicification Studies. *Marine Biotechnology*. **6**: 594-603.

- Puyana, M., Pawilk, J., Blum, J. y Fenical, W. 2015. Metabolite Variability in Caribbean Sponges of the Genus *Aplysina*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. **25**: 592-599.
- Rinkevich, B. 2011. Cell Cultures from Marine Invertebrates: New Insights for Capturing Endless Stemness. *Marine Biotechnology*. **13**: 345-354.
- Rützler, K., Duran, S. y Piantoci, C. 2007. Adaptation of Reef and Mangrove Sponges Stress: Evidence for Ecological Speciation Exemplified by *Chondrilla caribensis* (Demospongiae, Chondrosida). *Marine Ecology*. **28**: 95-111.
- Turon, X., Tarjuelo, I. y Uriz, M.J. 1998. Growth Dynamics and Mortality of the Encrusting Sponge *Crambe* (Poecilosclerida) in Contrasting Habitats: Correlation with Population Structure and Investment in Defence. *British Ecological Society, Functional Ecology*. **12**: 631-639.
- Thakur, N. L. y Müller, W. E. G. 2004. Biotechnological Potential of Marine Sponges. *Current Science*. **86(11)**:1506-1512.
- Saurav, K., Bar-Shalom, R., Haber, M., Burgsdorf, I., Oliviero, G., Costantino, V., Morgenstern, D. y Steindler, L. 2016. In Search of Alternative Antibiotic Drugs: Quorum-Quenching Activity in Sponges and Their Bacterial Isolates. *Microbial*. **7(416)**: 1-9.

- Silva, L., Veronesi, P.M.P., Silva, D., Santos-Gandelman, J., Muricy, G., Giambiagi deMarval, M. y George, I. 2016. Antibiotic Resistance Genes Detected in the Marine Sponge *Petromica citrina* from Brazzilian Coast. Brazilian Journal of Microbiology. **93**: 1-4.
- Sköd, H., Obst, M., Sköld, M. y Akesso, B. 2009. Stem Cell in Asexual Reproduction of Marine Invertebrates. pp. 105-138. *En: Stem Cells in Marine Organisms*. B. Rinkevich y V. Mantraga (eds). Editorial Springer Science + Business Media B.V.
- Sogabe, S., Nakanishi, N. y Degnan, B. 2016. The Ontogeny of Choanocyte Chambers during Metamorphosis in the Demosponge *Amphimedon queenslandica*. *Evolution and Development*. **7(6)**: 1-13.
- Spikeman, D., Wielink, R., Lammeren, A.M., Tramperos, J., Osinga, R. y Wijffels, R. 2002. Primmorphs from Seven Marine Sponges: Formation and Structure. *Journal of Biotechnology*. **100**: 127-139.
- Spikema, D., Osinga, R., Schatton, W., Mendola, D., Tramper, J. y Wijffels, R. 2004. Large-Scale Production of Pharmaceuticals by Marine Sponge: Sea, Cell, or Synthesis. *Biotechnology and Bioengineering*. **90(2)**: 204-222.
- Uriz, M., Turon, X. y Alcovero, T. 2006. Dispersal Strategies in Sponge Larvae: Integrating the Life. *Oecología*. **149**:174–184.

- Vacelet, J. y Gallissian, M. 1978. Virus-Like Particles in Cells of the Sponge *Verongia cavernicola* (Demospongiae, Dictyoceratida) and Accompanying Tissues Changes. *Journal of Invertebrate Pathology*. **31**: 246-254.
- Valisano, L., Bavestrello, G., Giovine, M., Arillo, A. y Cerrando, C. 2006. Seasonal Production of Primmorphs from the Marine Sponge *Petrosia ficiformis* (Poiret, 1782) and New Culturing Approaches. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. **337**: 171-177.
- Vilanova, E., Cautinho, C., Maia, G., Muraio, A.S. 2010. Sulfated polysaccharides from marine sponges: conspicuous distribution among different cell types and involvement on formation of in vitro cell aggregates. *Cell Tissue Res*. 1-9
- Wiens, M., Krasko, A., Perovic, S., Müller, W.E.G. 2003. Caspase-Mediated Apoptosis in Sponges: Cloning and Function Phylogenetic Oldest Apoptotic Proteases from Metazoa. *Biochimica Biophysica Acta*. **1593(2-3)**:179-89.
- Zhao, Q., Zhang, W., Jin, M., Yu, X. y Maicun, D. 2005. Formulation of a Basal Medium for Primary Cell Culture of the Marine Sponge *Hymeniacidon perleve*. *Biotechnol. Prog.* **21**: 1008-1012.
- Zhang, W., Zhang, X., Cao, X., Xu, J., Zhao, Q., Yu, X., Jin, M. y Deng, M. 2003. Optimizing the Formation of in Vitro Sponge Primmorphs from the Chinese Sponge *Stylotella agminata* (Ridley). *Journal of Biotechnology*. **100**: 161-168.

Zhou, J., Bi, C., Cheong, L., Mahara, S., Liu, S., Tay, K., Koh, T., Yu, Q. y Ching, W. 2011. The Histone Methyltransferasa Inhibitor, DZNep, Up-Regulates TXNIP, Increases ROS Production, and Targets Leukemia Cell in AML. BLOOD. **118(10)**: 2830-2039.

ANEXO

Agua de mar artificial libre de calcio y magnesio.

Reactivo	Cantidad	Concentración final
NaCl	26.24 gr.	449 mM
KCl	0.671 gr.	9 mM
Na ₂ SO ₄	4.687gr.	33 mM
NaHCO ₃	4.3 ml.	2.15 mM
Tris-Cl	10 ml.	10 mM
EGTA	10 ml.	2.5 mM
Agua destilada	975.7 ml.	

Preparación del ácido etildiaminotetraacético (EDTA)

$$372.24 \text{ gr}/1 \text{ ml} = 1 \text{ M}$$

$$0.37 \text{ gr}/1 \text{ ml} = 1 \text{ M}$$

$$1/50 = 0.02 \text{ M}$$

$$372.24/50 = 7.44 \text{ gr (0.02M)}$$

0.744 gr [0.02M (20 mM)]

7.44 gr = 10 000 ml = 1 Litro