

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
ENEP "ZARAGOZA"

7A
2ej



ESTUDIO SOBRE LA ACTIVIDAD TOXICA Y
ANTIMICROBIANA DE ALGUNAS ESPONJAS MARINAS

DONADO POR P. G. B. - B. C.

TESIS PROFESIONAL

ROBERTO KING DIAZ

MEXICO, D. F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1988



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

C O N T E N I D O

	Página
RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
OBJETIVOS	5
ANTECEDENTES	6
MATERIAL Y METODOS	10
1.- Esponjas	10
3.- Extractos crudos de las esponjas	10
4.- Prueba de toxicidad	11
5.- Cromatografía en columna	12
RESULTADOS	13
NOMBRE CIENTIFICO DE LAS ESPONJAS EMPLEADAS	21
DISCUSION	22
CONCLUSIONES	27
APENDICE	
PHYLUM PORIFERA	28
<u>Haliclona viridis</u>	33
MICROORGANISMOS DE PRUEBA	34
AGRADECIMIENTOS	36
LITERATURA CITADA	37

R E S U M E N

En este trabajo se estudió la actividad tóxica y antimicrobiana de algunas esponjas marinas, colectadas en diferentes localidades de las costas mexicanas.

Se probó la actividad tóxica en peces de la especie Lebistes reticulatus y la actividad antimicrobiana en cepas bacterianas patógenas, como una posible alternativa en el descubrimiento de nuevos fármacos con propiedades biomédicas tales como: antibióticos, anticancerígenos, antitumorales, etc.

Se intentó separar la sustancia tóxica de la sustancia antimicrobiana producidas por la esponja Haliciona viridis con el propósito de conocer algunas de sus características químicas y contribuir al conocimiento de la evolución bioquímica de las sustancias activas de estos organismos.

INTRODUCCION

Los océanos y mares del mundo abarcan aproximadamente el 71% de la superficie de la tierra e incluyen una abundancia de organismos que presentan agentes activos con propiedades farmacológicas y médicas (Baslow, 1969).

El estudio de los agentes activos en organismos marinos tanto de animales como de vegetales, ha desarrollado un nuevo campo de investigación dentro de la farmacología: la Farmacología Marina.

Entre los agentes activos producidos por organismos marinos, se conocen las sustancias tóxicas y las sustancias antimicrobianas, éstas últimas son liberadas en el medio marino y producen una reducción de la población microbiana, ya sea matando directamente o por interferencia con algún proceso metabólico (Nigrelli, 1976).

Es en este campo, donde la Farmacología Marina se interesa en estudiar tanto las propiedades tóxicas como las propiedades antimicrobianas, debido a los efectos que causa en el hombre y en el medio marino.

Es de particular interés la entibiosis, debido a la actividad de sustancias producidas por los animales que se alimentan filtrando bacterias y otros organismos del microplancton en el agua. El phylum Porífera es un ejemplo típico de estas formas de vida.

El descubrimiento de los agentes activos antimicrobianos en esponjas ha permitido postular hipótesis sobre la producción de dichas sustancias como un mecanismo ofensivo y defensivo.

Como un mecanismo ofensivo, las sustancias antimicrobianas son usadas posiblemente como inactivadoras de microorganismos en la fagocitosis y digestión (Burkholder, 1973). Los microorganismos son ingeridos por las esponjas marinas y forman parte de su nutrición (Reiswig, 1971, 1975). Al mismo tiempo las esponjas pueden contener grandes poblaciones de microorganismos asociados a sus células.

Como un mecanismo defensivo es posible que las sustancias antimicrobianas de las esponjas sean una importante ayuda en el control de infecciones microbianas.

Bakus en 1969, postuló una hipótesis general sobre la evolución de mecanismos defensivos y hábitos en invertebrados de la cual la siguiente hipótesis ha sido desarrollada.

Se sugiere que la diversidad de especies en peces se incrementa en aguas marinas someras tropicales, la competencia por alimento creó una presión sobre las especies en desarrollo que necesitan alimento, permitiendo en muchos casos hábitos alimenticios más especializados. Esta presión competitiva fué reflejada en una fuerza de la selección natural operando sobre las presas, las cuales desarrollaron propiedades químicas como defensas, retardando y previniendo

do la depredación por neces. De esta manera la toxicidad en esponjas pudo haber evolucionado como un mecanismo defensivo (Green, 1977).

OBJETIVOS

En la actualidad, el uso irracional de productos antimicrobianos tanto en el hombre como en los animales, se ha generalizado de tal forma que los microorganismos causantes de enfermedades se han transformado en multirresistentes a la amplia gama de estos productos.

El fenómeno de resistencia microbiana se ha vuelto un problema de salud pública, por lo tanto en éste estudio se determinó:

- 1.- La actividad antimicrobiana de las esponjas sobre cepas bacterianas patógenas, como una posible alternativa en el descubrimiento de nuevos productos antimicrobianos de origen marino.
- 2.- La actividad tóxica de sustancias producidas por esponjas sobre peces de la especie Lebistes reticulatus para tratar de comprender el papel ecológico y evolutivo de dichas sustancias.
- 3.- Separación por medio de la técnica de cromatografía en columna, los agentes activos de la esponja que presentó mayor actividad (Haliciona viridis) tanto tóxica como antimicrobiana. Esto es importante porque: si son diferentes sustancias, posteriores estudios más concretos permitieran evaluar la sustancia antimicrobiana en el tratamiento de enfermedades producidas por microorganismos. Si tanto la actividad tóxica como la actividad antimicrobiana son producidas por la misma sustancia, su aplicación a los seres humanos y animales es -

restringida, pero se pueden llevar a cabo estudios que permitan utilizarla como plaguicida o repelente de organismos.

ANTECEDENTES

Los antecedentes más importantes, que se pueden citar sobre toxicidad y antibiosis en esponjas son los siguientes: Richet en 1906, precipitó una sustancia extraída de la esponja sílicea Suberites domunculus, la cual fué inyectada en un perro y le produjo vomito, diarrea, dispnea y le causó hemorragia en la mucosa gástrica, intestinal, peritoneo y endocardio.

Arndt en 1928, demostró que extractos de ciertas esponjas de agua dulce producen diarrea, dispnea, postración y muerte, cuando se inyectan en animales homeotermos, estos mismos extractos tienen efecto hemolítico sobre eritrocitos de oveja y cerdo, además bloquean la función cardíaca en preparaciones de corazón aislado de rana.

En 1959, Nigrelli et al., obtuvieron una sustancia anti microbial de la esponja marina Microciona prolifera. Esta sustancia fué llamada Ectionina y se demostró sus propiedades inhibitorias en bacterias Gram (+) y Gram (-) y el hongo Candida albicans.

Ackerman y Pant (1961), aislaron e identificaron un nú-

mero de sustancias de esponjas marinas y de agua dulce que incluyen: ácidos nucleicos, colina, guanina, acetil colina, lisina, fosfocreatina, y otros más.

En 1961, Ruggieri et al., reportó extractos de esponjas que son tóxicos a huevos fertilizados e infertilizados del erizo de mar Arbacia punctulata, produciendo citólisis y aberraciones durante el desarrollo y formación de la larva.

Stempien en 1966, reportó que extractos acuosos y metanólicos de 4 de 5 esponjas del género Agelas mostraban actividad antibiótica contra Escherichia coli.

Sharma y Burkholder en 1967, aislaron dos compuestos bromados de las especies Verongia fistularis y Verongia cauliformis con acción frente a bacterias Gram(+) y Gram(-).

Baslow y Read en 1968, descubrieron que los extractos de las esponjas Haliclona magniculosa, Haliclona viridis y Toxadacia violacea tienen efecto hipotensor en ratas.

Burkholder y Ruetzler en 1969, reportaron sus investigaciones sobre la actividad antimicrobiana de un gran número de esponjas colectadas en el Mar Caribe, Mar Mediterráneo y Océano Pacífico.

Baslow y Turlapaty en 1969, reportaron que extractos acuosos de Haliclona viridis, cuando son inyectados intraperitonealmente en ratas blancas previenen el crecimiento de

células tumorales ascíticas de Erlich, después de un tratamiento iniciado 4 días antes de la inoculación del tumor.

En 1970, Sigel et al., reportó los resultados de su trabajo sobre la actividad anticelular y antitumoral de -- extractos de 104 géneros de invertebrados marinos tropicales, encontraron que los extractos alcohólicos de las esponjas Chondrilla nucula, Haliclona substrangularis e Ircinia fasciculata, dan alguna protección contra la formación de -- tumores en ratas con leucemia P-388.

En 1970, Stempien et al., reportaron los resultados -- de sus investigaciones con extractos de esponjas colectadas en Jamaica y las Islas Virgenes. Extractos de 23 especies -- tienen actividad antibiótica, extractos de dos especies producen anomalías citoplasmáticas en el mismo tipo de carcinoma.

Anderson y Faulkner en 1973, reportaron dos esponjas con actividad antimicrobiana del género Verongia, estos -- compuestos son bromados y pertenecen a Verongia thiona y -- Verongia sp. En 1975, Green y Bakus estudiaron la toxicidad en esponjas y holoturias, relacionada en forma inversa con la latitud.

Green en 1977, estudio la ecología de la toxicidad en esponjas marinas de diferentes latitudes de Norte América, los resultados indican que la toxicidad de las esponjas se incrementa cuando decrece la latitud.

Schmitz et al., en 1978, aislaron una mezcla compleja denominada Halitoxina de las esponjas marinas Haliclona rubens, Haliclona viridis y Haliclona exina, la cual es citotóxica , hemolítica y tóxica en peces y ratones.

Stierle y Faulkner en 1979, reportaron la identificación de diferentes metabolitos en extractos metanólicos y -diclorometanólicos de la esponja Chondrosia collectrix.

MATERIAL Y METODOS

1.- Esponjas

Las esponjas marinas utilizadas fueron colectadas por medio de buceo libre y buceo autónomo en las costas de México. Las esponjas con el índice VI son del arrecife "La Blanquilla", enfrente del Puerto de Veracruz en el Golfo de México, colectadas a una profundidad de 2 a 10 metros.

Las esponjas que presentan la letra A corresponden a la Bahía de Acapulco, Guerrero, colectadas a una profundidad de 10 a 15 metros. Las esponjas que presentan el índice KII colectadas en Puerto Morelos, Quintana Roo, a una profundidad de 10 a 15 metros.

2.- Extractos Crudos de las Esponjas

Se obtuvieron extractos crudos con acetona y metanol de la siguiente manera: se tomaron 10 ml., de la esponja húmeda colocandose con 30 ml., del solvente, se homogeneizó la mezcla en la licuadora y se centrifugó a 2400 r.p.m., durante 15 minutos, utilizandose el sobrenadante para las pruebas de toxicidad y antibiosis.

3.- Prueba de Antibiosis

Las pruebas de antibiosis se hicieron con los microorganismos en medio sólido (Brain Heart Infusión), usando sensibiliscos. Estos se obtuvieron de papel filtro Whatman # 42 con un diámetro de 5.5 mm. Los microorganismos utilizados en la prueba fueron:

Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas fluorescens, Salmonella typhi, Streptococcus sanguis.

Procedimiento:

- a) En los sensidiscos se concentraron 15 gotas del extracto crudo de acetona y metanol por separado, dejándose secar con ayuda de luz infrarroja, evitando el sobrecalentamiento.
- b) A cada uno de los sensidiscos se le agregó 5 gotas de cloroformo para evitar la contaminación de los mismos, dejando evaporar el cloroformo.
- c) En el medio sólido se sembró el microorganismo de prueba en condiciones estériles.
- d) Se colocaron los sensidiscos, separados de tal manera que en caso de haber inhibición, ésta fuera notada claramente y no se presentara sobreposición de halos.
- e) Se utilizó un testigo el cual llevaba solamente 15 gotas del solvente y 5 gotas de cloroformo.
- f) Se colocaron en el refrigerador durante 6 horas, con el fin de que la substancia impregnada en el sensidisco se difundiera ampliamente en el agar.
- g) Posteriormente se metieron las cajas de Petri a la incubadora (37°C) y se observaron los resultados a las 24 horas.

4.- Prueba de Toxicidad

En estas pruebas se utilizaron peces de agua dulce - Lebistes reticulatus y se realizó de la siguiente manera:

- a) En un vaso de precipitado, se colocaron 20 ml., del ex-

tracto a probar dejandose evaporar a sequedad, después se agregaron 200ml., de agua del acuario donde se encontraban los peces y se homogeneizó la mezcla.

- b) Se colocaron en dicha solución dos peces y se observó el tiempo de la pérdida de equilibrio y el de muerte.
- c) Cuando el pez no presentó síntomas de pérdida de equilibrio al término de 90 minutos, se cambió a una pecera con agua limpia y se observó durante las siguientes 24 horas.
- d) Se utilizaron testigos los cuales llevaban la misma cantidad de agua del acuario y del solvente evaporado.

5.- Cromatografía en Columna

Una vez obtenida la esponja (Haliclona viridis) con las propiedades tóxica y antimicrobiana más elevada, se montó una columna cromatográfica para separar la sustancia tóxica de la sustancia antimicrobiana. Se utilizó una columna cromatográfica de vidrio, con un diámetro de 1.3 cm., y una longitud de 100 cm.

Para el montaje de la columna, se utilizó un soporte de Sephadex LH-20, utilizandose metanol como eluyente. El Sephadex se colocó en exceso de disolvente 5 o 6 horas antes del montaje a temperatura ambiente, (Abbot y Andrews, 1977). En el fondo de la columna se puso un poco de algodón con el fin de detener el soporte y permitir que el eluyente circule libremente. Antes de introducir el Sephadex se colocó dentro de la columna un poco de eluyente, 10 cm, por arriba de la capa de algodón, después se agregó el Se-

phadex evitando la formación de burbujas y estratos.

Para la colocación de la muestra, se eliminó todo el eluyente por encima de la cama de la columna. Con una pipeta Pasteur se colocó la muestra, dejándola resbalar por las paredes evitando fracturar el Sephadex y la formación de burbujas, se permitió la entrada de la muestra en la columna y por último se adicionó suficiente eluyente en la parte superior y se reguló el flujo.

RESULTADOS

Los resultados se presentan a continuación en las tablas 1, 2, 3, y 4. Primero se muestran los resultados obtenidos en las pruebas preliminares, las cuales se efectuaron con el propósito de elegir a la esponja que presentara mayor actividad tóxica y antimicrobiana.

Finalmente se presentan los resultados de la separación por cromatografía en columna y un listado del nombre científico de las esponjas utilizadas.

TABLA 1

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE ESPONJAS COLECTADAS EN EL ARRECIFE "LA BLANQUILLA" VERACRUZ.

	<u>ANTIBIOSIS</u> ¹									
	EXTRACTO CRUDO EN ACETONA 15 GOTAS/ 6 HORAS ²									
	VI-4	VI-7	VI-14	VI-18	VI-19	VI-21	VI-29	VI-40	VI-41	
<u>K. pneumoniae</u>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<u>P. fluorescens</u>	-----	2	9	4	-----	13	4	-----	-----	-----
<u>S. sanguis</u>	-----	2	-----	-----	-----	3	5	-----	-----	-----
<u>S. typhi</u>	-----	-----	1.5	2.5	-----	-----	-----	-----	-----	-----

EXTRACTO CRUDO EN METANOL 15 GOTAS/ 6 HORAS

	VI-4	VI-7	VI-14	VI-18	VI-19	VI-21	VI-29	VI-40	VI-41	
<u>K. pneumoniae</u>	-----	1	-----	-----	-----	4.5	3	-----	-----	-----
<u>P. fluorescens</u>	-----	3.5	9	2	-----	10	4.5	-----	-----	-----
<u>S. sanguis</u>	-----	4.5	1.5	-----	-----	-----	4.5	-----	-----	-----
<u>S. typhi</u>	-----	2.5	6.5	2.5	-----	4	3	-----	-----	-----

¹ La inhibición se mide en mm., del borde del sensidisco al borde del halo de inhibición² Sensidisco impregnado con 15 gotas del extracto crudo preparado con 10 ml., de la esponja, peso húmedo y 30 ml., de solvente con 6 hr., de difusión en el agar.

TABLA 2

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE ESPONJAS COLECTADAS EN PUERTO MORELOS, QUINTANA ROO (KII)
Y BAHIA DE ACAPULCO, GUERRERO (A).

ANTIBIOSIS

EXTRACTO CRUDO EN ACETONA 15 GOTAS/ 6 HORAS

	KII-4	KII-5	KII-34	A-6	A-7	A-8	A-16
<u>K. pneumoniae</u>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<u>P. fluorescens</u>	4	-----	4	3	-----	-----	-----
<u>S. sanguis</u>	2.5	-----	-----	12	-----	-----	-----
<u>S. typhi</u>	-----	-----	-----	9	-----	-----	-----

EXTRACTO CRUDO EN METANOL 15 GOTAS/ 6 HORAS

	KII-4	KII-5	KII-34	A-6	A-7	A-8	A-16
<u>K. pneumoniae</u>	-----	-----	-----	3.5	-----	-----	-----
<u>P. fluorescens</u>	9	1.5	8	11	3	1	1
<u>S. sanguis</u>	2	-----	-----	9	-----	-----	-----
<u>S. typhi</u>	-----	-----	-----	4	-----	-----	-----

TABLA 3

ACTIVIDAD TOXICA DE ESPONJAS COLECTADAS EN EL ARRECIFE "LA BLANQUILLA" VERACRUZ.

TOXICIDAD³

	VI-4		VI-7		VI-14		VI-18		VI-19		VI-21		VI-29		VI-40		VI-41	
	p.e. ⁴	m ⁵	p.e	m	p.e	m	p.e	m	p.e	m	p.e	m	p.e	m	p.e	m	p.e	m
1	---	---	6'	11'	---	---	---	---	---	---	---	---	2'	6'	---	---	---	---
<u>Lebistes reticulatus</u>																		
2	---	---	16'	23'	---	---	---	---	---	---	---	---	9'	10'	---	---	---	---

TABLA 4

ACTIVIDAD TOXICA DE ESPONJAS COLECTADAS EN PUERTO MORELOS, QUINTANA ROO (K11) y
BAHIA DE ACAPULCO, GUERRERO (A).TOXICIDAD

	K11-4		K11-5		K11-34		A-6		A-77		A-8		A-16	
	p.e	m	p.e	m	p.e	m	p.e	m	p.e	m	p.e	m	p.e	m
1	40'	49'	---	---	40'	45'	22'	27'	---	---	---	---	---	---
<u>Lebistes reticulatus</u>														
2	87'	90'	---	---	50'	60'	42'	47'	---	---	---	---	---	---

³Se realizó con el extracto crudo metanólico, tomándose 20 ml., del sobrenadante y dejándose

evaporar a sequedad, homogeneizándose con 200 ml., de agua del acuario.

⁴Perdida de equilibrio dada en minutos ⁵Muerte del organismo dada en minutos

Resultados de la Cromatografía en Columna del Extracto Crudo de la Esponja (Haliclona viridis) VI-29.

Características generales de la columna:

Diámetro	.-	1.3 cm
Eluyente	.-	Metanol
Flujo	.-	5 gotas por minuto
Longitud	.-	83 cm
Muestra	.-	6 ml extracto crudo
Soporte	.-	Sephadex LH-20

Se colectaron 7 fracciones de 10 ml., c/u, realizándose la prueba de antibiosis y toxicidad por fracción.

PRUEBA DE ANTIBIOSIS⁶

Fracción	Inhibición de <u>P. fluorescens</u> en mm.	
	25 gotas	50 gotas
1	0.5	0.5
2	trazas	1
3	0.5	1
4	-----	-----
5	-----	-----
6	-----	-----
7	-----	-----

⁶ Está prueba se realizó colocando por separado 25 y 50 gotas de cada fracción en los sensidiscos utilizados, la inhibición se midió en mm.

PRUEBA DE TOXICIDAD⁷

Fracción	Pez	Pérdida de equilibrio en minutos	Muerte del pez en minutos
1	1	3'	8'
	2	4'	11'
2	1	4'	10'
	2	6'	12'
3	1	16'	23'
	2	16'	24'
4	1	6'	16'
	2	11'	26'
5	1	33'	42'
	2	17'	28'
6	1	---	---
	2	---	---
7	1	---	---
	2	---	---

En base a las fracciones que presentaron toxicidad y antibiosis, se corrieron dos columnas iguales a la anterior juntandose las primeras 5 fracciones de cada columna, haciendo un total de 100 ml., el cual se concentró hasta 6 ml., a temperatura ambiente. Con estos 6 ml., se corrió otra columna cromatográfica y se obtuvieron los siguientes resultados:

⁷ La prueba de toxicidad se realizó con 2 ml., de la fracción obtenida en 40 ml., de agua del acuario.

PRUEBA DE ANTIBIOSIS

Fracción	Inhibición de <u>P. fluorescens</u>	
	25 gotas	50 gotas
1	2	3
2	-----	-----
3	-----	-----
4	-----	-----
5	-----	-----

PRUEBA DE TOXICIDAD

Fracción	Pez	Pérdida de equilibrio en minutos	Muerte del pez en minutos
1	1	3'	6'
	2	3'	7'
2	1	---	---
	2	---	---
3	1	---	---
	2	---	---
4	1	---	---
	2	---	---
5	1	---	---
	2	---	---

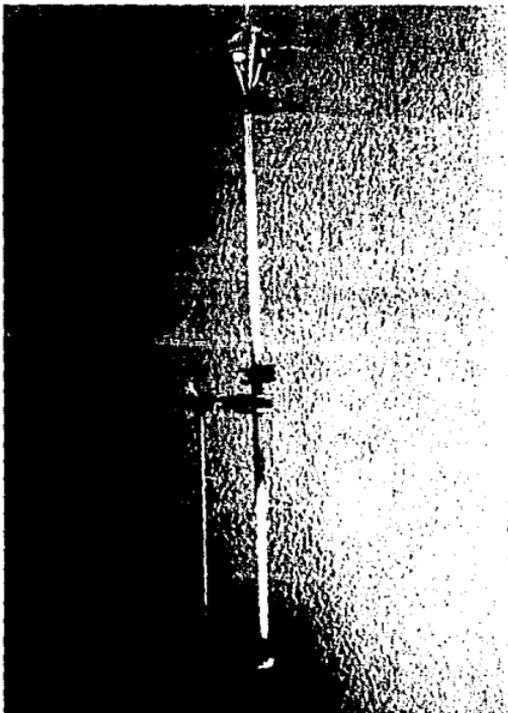
De la fracción 1 que presentó las dos propiedades tanto tóxica como antimicrobiana, se concentró hasta 3 ml., y se corrió una nueva columna cromatográfica con el resultado siguiente:

PRUEBA DE ANTIBIOSIS

Fracción	Inhibición de <u>P. fluorescens</u>	
	25 gotas	50 gotas
1	-----	-----
2	2	4
3	-----	-----
4	-----	-----
5	-----	-----

PRUEBA DE TOXICIDAD

Fracción	Pez	Pérdida de equilibrio en minutos	Muerte del pez en minutos
1	1	---	---
	2	---	---
2	1	8'	14'
	2	11'	18'
3	1	---	---
	2	---	---
4	1	---	---
	2	---	---
5	1	---	---
	2	---	---



Section of the [illegible] [illegible]
[illegible] [illegible] [illegible] [illegible]
[illegible] [illegible] [illegible].

PRUEBA DE IDENTIFICACION DE LAS FRACCIONES DE LA
PRIMERA COLUMNA CROMATOGRAFICA DEL EXTRACTO
DE LA CORMAJA Halictena viridis



TABLA 5

Nombre Científico de las Esponjas Estudiadas en el
Presente Trabajo

Clave	Nombre Científico
VI-4 -----	<u>Spinosella vaginalis</u>
VI-7 -----	<u>Haliclona compressa</u>
VI-14 -----	<u>Verongula rigida</u>
VI-18 -----	<u>Aiolochoxia crassa</u>
VI-19 -----	<u>Niphates erecta</u>
VI-21 -----	<u>Aplysina fistularis insularis</u>
VI-29 -----	<u>Haliclona viridis</u>
VI-40 -----	<u>Holopsama helwigi</u>
VI-41 -----	<u>Desmapsema anchorata</u>
KII-4 -----	No identificada
KII-5 -----	<u>Mycale angulosa</u>
KII-34 -----	<u>Plakortis ziggompha</u>
A-6 -----	<u>Haliclona sp.</u>
A-7 -----	No identificada
A-8 -----	No identificada
A-16 -----	No identificada

DISCUSION

De los resultados preliminares, tabla 1, 2, 3, 4, podemos clasificar tres tipos diferentes de esponjas, de acuerdo a las propiedades tóxicas y antimicrobianas presentadas y en base a su afinidad con los solventes orgánicos utilizados (acetona y metanol).

- a) Tóxicas y antimicrobianas (VI-7, VI-29, KII-4, KII-34, -A-6).
- b) Únicamente antimicrobianas (VI-14, VI-18, VI-21, KII-5, -A-7, A-8, A-16).
- c) Sin propiedades tóxicas y antimicrobianas (VI-4, VI-19, -VI-40, VI-41).

Tanto las sustancias tóxicas como las sustancias antimicrobianas son parcialmente extraídas en los solventes usados. Los extractos crudos metanólicos presentan un mayor halo de inhibición en los microorganismos de prueba, en relación con los extractos crudos acetonicos. Esto demuestra que tanto los compuestos tóxicos como los compuestos antimicrobianos presentan mayor afinidad por los solventes más polares.

También se han extraído compuestos variados (Baslow y Read, 1968., Schmitz et al., 1978) de los extractos crudos de algunas de las especies de esponjas aquí estudiadas, ta les compuestos fueron obtenidos con solventes polares y no polares, y tienen propiedades antitumorales, anticancerígenas y citotóxicas.

La evolución de la toxicidad en las esponjas es el resultado de la selección natural en las interacciones biológicas. Se supone que la toxicidad está evolucionando como un mecanismo defensivo, presentándose diferentes etapas en este proceso, que van desde esponjas sin actividad tóxica - pasando por aquellas que son ligeramente tóxicas, hasta llegar a las muy tóxicas.

Las esponjas son organismos de cuerpo blando y hábitos sésiles que las hacen vulnerables a depredadores en donde se desarrollan. No hay que olvidar que la toxicidad no es el único mecanismo defensivo en estas, presentan además defensas de origen biológico, como es la abundancia de mucosidad, olor y "sabor" desagradables, así como escleritos mineralizados (espículas), componentes fibrosos duros (espongina), o ambos que pueden funcionar como defensas en estos organismos (Green, 1977).

No se ha confirmado plenamente si son las esponjas o bien algún microorganismo asociado a ellas, los productores de las sustancias tóxicas y de las sustancias antimicrobianas. La presencia de organismos que habitan dentro de las células de la esponja, indica que estas sustancias no son dirigidas contra estos organismos, más bien contra aquellos que no son comensales o simbioses de la esponja.

Es por esto, que se piensa que no es la esponja en sí la productora de estas sustancias, sino algún organismo asociado a ella, preferentemente los microorganismos que se localizan en la mesoglea de la esponja.

Ahora bien, las esponjas se desarrollan en un medio muy polar como es el agua, tomando en cuenta que tanto las sustancias tóxicas como las sustancias antimicrobianas - tienen cierta afinidad por los solventes polares puede suceder que la metodología empleada en la obtención de los extractos no sea la más adecuada para la generalidad de las esponjas, en vista de que se reportan esponjas que no presentan alguna propiedad.

En base a los resultados de las tablas 1. 2. 3. y 4, se utilizó la esponja VI-29 (Haliclona viridis), ya que -- presentó ampliamente las dos propiedades requeridas. Para realizar la prueba de antibiosis con las fracciones colectadas de la cromatografía en columna, se empleó la bacteria - Pseudomonas fluorescens, por ser la más sensible de las probadas con los extractos crudos.

Baslow y Read (1968), reportaron que extractos crudos de Haliclona viridis tienen acción bacteriostática y bactericida contra Aerobacter aerogenes.

Baslow y Turlapaty (1969), reportaron una fracción tóxica de Haliclona viridis denominada Halitoxina, la cual contiene factores tóxicos y antimetabólicos.

Schmitz et al., (1978), identificaron el compuesto tóxico de la halitoxina, el cual es una mezcla compleja de sales piridínicas de alto peso molecular, con una estructura oligomérica o polimérica conteniendo moléculas de diferentes tamaños y con variación al azar en longitud y estruc

tura de las cadenas alquilo, uniendo los anillos piridínicos (figura 1).

Orduña (1980), trabajando con una esponja del género Haliclona sp. (Z-29) colectada en Zihuatanejo, Guerrero, - logró separar la sustancia tóxica de la sustancia antimicrobiana, además demostró que la sustancia antimicrobiana pierde actividad al ser sometida a una temperatura de 121°C durante 15 minutos.

Poco trabajo se ha realizado para separar la parte - tóxica de la parte antimicrobiana, aún cuando la parte tóxi ca ya ha sido conocida. Los resultados obtenidos en la -- columna cromatográfica indican dos posibilidades:

- 1) Son compuestos de estructura química muy cercana.
- 2) La actividad tóxica y la actividad antimicrobiana está determinada por un mismo compuesto.

Para el caso 1, si son compuestos de estructura química muy cercana, es importante porque desde el punto de vista Biomédico se pueden seguir estudios de evaluación de la sustancia antimicrobiana para conocer la estructura química del compuesto, nivel de actividad, mecanismos de acción, producción, etc., además desde el punto de vista evolutivo, si la sustancia tóxica y antimicrobiana presentan una -- estructura química cercana, puede indicar que proceden de - una sola vía metabólica y no causa un gasto mayor de ener-- gía, lo cual es importante si se observa el nivel celular - de construcción que presentan las esponjas.

Para el caso 2, si la actividad tóxica tanto como la actividad antimicrobiana son producidos por un mismo compuesto, posiblemente su estructura química es la que determinó Schmitz y colaboradores en 1978.

Las esponjas del género Haliclona sp., son muy tóxicas y frecuentemente antimicrobianas.

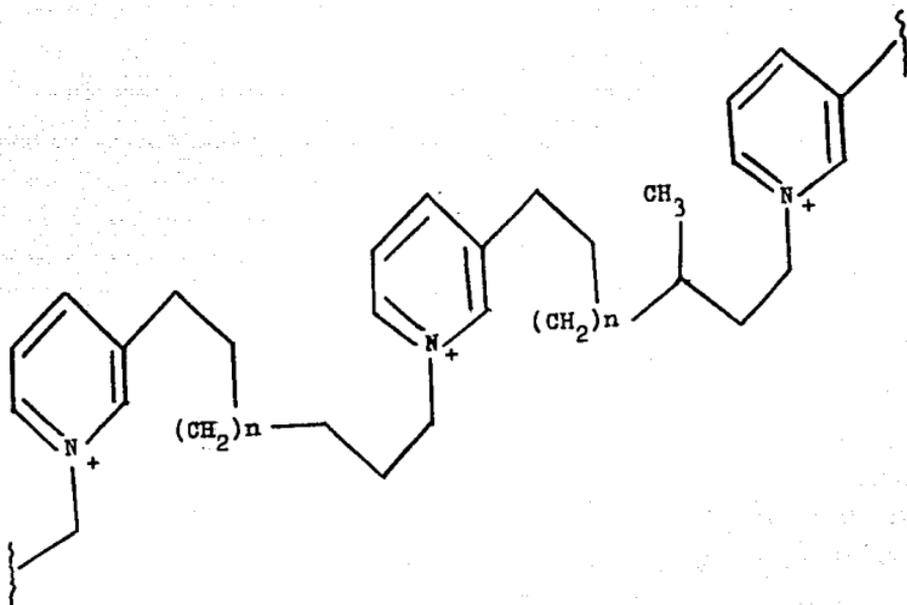
Las propiedades de separación del Sephadex como soporte en la cromatografía y los resultados obtenidos, nos indica que la fracción obtenida con las dos actividades corresponde a compuestos de alto peso molecular.

La realización de futuros estudios dentro de este campo de la Farmacología Marina, plantea la necesidad de efectuar lo siguiente:

- 1.- Estudios taxónomicos del phylum Porifera en las costas mexicanas como contribución a la lista faunística marina y conocimiento de la diversidad existente en el phylum.
- 2.- Estudios bioquímicos y citológicos con el fin de conocer donde se producen los agentes activos y cual es la vía de producción de estos.
- 3.- Estudios farmacológicos para evaluar el uso potencial de estos en animales y el hombre.
- 4.- Estudios ecológicos para comprender el papel que juegan tanto las sustancias tóxicas como las sustancias antimicrobianas en el medio marino y su efecto en los organismos asociados a éstas.

FIGURA I

Halitoxina



CONCLUSIONES

En base a lo anteriormente discutido y a la literatura consultada, podemos concluir lo siguiente:

- 1.- La naturaleza de las sustancias tóxicas y de las sustancias antimicrobianas es polar.
- 2.- La toxicidad es uno más de los variados mecanismos de defensa que presentan las esponjas contra la depredación.
- 3.- En el caso de Haliclona viridis y en función al método de separación empleado, los resultados no son definitivos para concluir que la actividad tóxica y antimicrobiana son determinados por compuestos diferentes.
- 4.- De acuerdo a las propiedades de separación del Sephadex se trata de sustancia o sustancias de elevado peso molecular.
- 5.- Las esponjas que pertenecen a la familia Haliclonidae son altamente tóxicas.

A P P E N D I C E

PHYLUM PORIFERA

Las esponjas son animales inferiores pluricelulares in capaces de moverse, que pueden tener externamente semejanza con las plantas.

El nombre del phylum se refiere a que el cuerpo de las esponjas se halla perforado por pequeños poros a través de los cuales entra agua, la cual es expulsada por unas aberturas de mayor tamaño llamadas osculos.

Las esponjas tienen semejanza con algunos protozoos - flagelados (Proterospongia), por poseer células flageladas de collar y digestión intracelular, pero difieren de ellos porque poseen algunas células dispuestas en forma de tejidos, una cierta división del trabajo, y cuerpo provisto de numerosos poros. Puesto que las esponjas son pluricelulares, son comparables a los Metazoos, pero difieren de ellos por poseer digestión intracelular y algunas particularidades en el desarrollo embrionario.

Se les considera una rama aberrante que no se halla en la línea directa de la evolución por lo que a menudo se les denomina Parazoos (fingerman, 1972).

Los adultos son sésiles, carecen de boca y cavidad digestiva. Aunque las esponjas primitivas son radialmente si métricas, la mayoría de las mismas son asimétricas.

Caracteres externos:

Las esponjas pertenecen al grado celular de construcción, esto es, sus células poseen considerable grado de independencia en lugar de hallarse estrictamente organizados en tejidos y órganos. Su tamaño varía desde unos pocos milímetros hasta dos o más metros de diámetro; algunas especies forman costras delgadas, otras tiene forma de copa o son ramificadas, globosas y de muy distintas formas, muchas son grises o parduscas, otras tienen un brillante color rojo, anaranjado, amarillo, azul, violeta, o negro.

La mayoría de las esponjas son marinas y viven desde la línea de la marea baja hasta profundidades de 6000 mt. existe una familia (Spongillidae) dulceacuícola.

Estructura.

La mayoría de las esponjas tienen una estructura complicada con sistemas de conductos de diferentes clases. El cuerpo de las esponjas más sencillas o Asconoide, presenta un delgado saco que encierra una cavidad o esongocele, con una ancha abertura en la parte superior llamada ósculo. La pared está formada por una epidermis externa de células delgadas y planas de forma poligonal, un revestimiento interno continuo de células de collar flageladas o coanocitos en de bil contacto unas con otras, y entre estas dos capas se localiza una mesoglea gelatinosa que contiene células libres o amebocitos de varias clases y numerosas espículas de aspecto cristalino que sostienen la blanda pared.

El caracter importante de la estructura asconoide es la pared simple y un forro continuo de coanocitos del epitelio, interrumpido por el extremo interno de los porocitos; la mayoría de las esponjas muestra una construcción complicada, - la cual puede ser derivada teóricamente de la condición asconoide.

El tipo Siconoide, formado por digitaciones de la pared a intervalos regulares llamados conductos radiales; el interior es hueco como un asconoide y forma un gran espongocele, el cual es forrado por un epitelio aplanado derivado de la - epidermis.

El tipo Leuconoide, resulta cuando la capa de coanocitos de el conducto radial de la etapa siconoide se invagina en muchas cámaras pequeñas y estas pueden repetir el proceso hasta que racimos de cámaras flageladas redondeadas, reemplazan las cámaras alargadas de la etapa siconoide.

El tipo Rhagon, surge por una reorganización directa - de la masa celular interna de la larva, el tipo Rhagon es - conica, afilado de una base amplia a la cresta situada en - el ósculo (Hyman, 1940).

Fisiología.

La fisiología de una esponja depende en gran medida de la corriente de agua que fluye a través de su cuerpo, el agua transporta oxígeno y alimentos, elimina los desechos e, incluso los óvulos y espermatozoides son desplazados hacia-dentro y fuera del organismo.

La corriente de agua es producida por el batimiento - de los flagelos de los coanocitos, transportando partículas de detritus y pequeños organismos que servirán de alimento.

Reproducción

Las esponjas se re reproducen sexual y asexualmente.

Asexualmente se reproducen por gemación y otros procesos que implican la producción y liberación de estructuras capaces de convertirse en una nueva esponja.

En la reproducción sexual no presenta órganos sexuales permanentes, los huevos y espermatozoides se desarrollan a partir de amebocitos y coanocitos. Casi todas las especies son hermafroditas, formandose el óvulo y el espermatozoide en el mismo individuo.

Clasificación

De acuerdo a la naturaleza de su esqueleto, las esponjas se dividen en cuatro clases (Bergquist, 1978).

- a) Clase Calcárea o Calcispongiae.- Se caracterizan por poseer espículas de carbonato de calcio.
- b) Clase Hexactinellidae o Hyalospongiae.- Son conocidas como esponjas vítreas, debido a que poseen espículas síliceas triaxónicas que a menudo se fusionan para formar un esqueleto que parece una rejilla.
- c) Clase Demospongiae.- El esqueleto de esta clase es variable, puede constar de espículas síliceas o de fibras de esponjina combinadas con espículas síliceas. Esta clase se diferencia de la Hexactinellidae en que -

: sus espículas nunca son triaxónicas sino monoaxónicas o tetraxónicas.

d) Clase Sclerospongiae (esponjas coralinas).- Estas poseen un esqueleto interno de espículas síliceas y fibras de - espongina así como una cubierta de carbonato de calcio.

Haliclona viridis

Phylum	Porífera
Clase	Demospongiae
Orden	Haplosclerida
Familia	Halicionidae
Género	<u>Haliclona</u>
Especie	<u>viridis</u>

Forma.- Incrustante, con pequeñas elevaciones en forma de conos volcánicos, se le encuentra sobre sustrato rocoso - cubriendo pequeñas áreas de 5 a 10 cm.

Color.- En vida la esponja es verde claro, preservada en congelación el color se oscurece en algunas zonas y en - otras se va diluyendo quedando amarillo pardo.

Consistencia.- Comprimible, suave y fácilmente desmoro nable.

Superficie.- Muy porosa y en algunas zonas puntiforme, los ósculos se localizan sobre pequeñas elevaciones y en -- ellos terminan 2 o 3 canales exhalantes, tienen diámetros de 1 a 4 mm.

Ectosoma.- La reticulación es uniforme, algunos grupos de espículas se proyectan hacia el exterior a manera de espí nas, esto provoca que el ectosoma se vea puntiforme en algu nas zonas.

Endosoma.- Carnoso, con poca cantidad de espongina y - principalmente espicular, la arquitectura es halichondroide, la reticulación en algunas zonas es casi isodictyal.

Espículas.- Presenta espículas oxeas fusiformes y espí culas oxeas hastadas (De Laubenfels, 1936., Wiedenmayer, -- 1977., Fuentes, 1981).

MICROORGANISMOS DE PRUEBA

Klebsiella pneumoniae .- Es un cocobacilo de 0.5 a 1.5 μ de diámetro por 1 a 2 μ de largo, posee una cápsula que es 2 ó 3 veces más el tamaño del bacilo mismo, el organismo frecuentemente aparece en pares y el diplobacilo puede ser confundido fácilmente con las formas de diplococo de Pneumococcus (Carpenter, 1979).

El organismo Gram (-), inmóvil, no esporulado, es el patógeno humano más importante del género de las Klebsiella, ocasiona lesiones en cualquier parte del cuerpo, se han registrado sinusitis, faringitis, meningitis, endocarditis, septicemias, peritonitis, absesos hepáticos. Ocasionalmente una forma severa de enteritis ocurre en los niños, él cual se asemeja a la disenteria bacilar. Infecciones pulmonares parecidas a la neumonía bronquial o neumonía lobular fácilmente se convierten en crónicas, presentando el cuadro clínico de absceso pulmonar, bronquioectasis o tuberculosis pulmonaria.

Pseudomonas fluorescens .- La familia Pseudomonadacea está comprendida de un gran número de bacilos Gram (+) que tienden a elongarse. La mayoría de las especies son móviles con un flagelo polar el cual puede ser monotrico o lofotrico. Algunos producen pigmentos solubles en agua que se difunden en los medios de cultivo.

Su distribución es amplia, varias especies son de vida libre encontrados en suelo y agua. La mayoría son patógenos a las plantas, algunos son patógenos a los animales incluyendo el hombre, en el cual las septicemias producidas son mor

tales en un 80%.

Pseudomonas fluorescens es un patógeno ocasional del grupo de las Pseudomonas (Jawetz, et al., 1973).

Salmonella typhi .- Es un bacilo corto de 0.5 a 0.8 μ de diámetro y de 1 a 3.5 μ de largo, es un organismo Gram - (-), activamente móvil, no esporulado y sin cápsula. Crece rápidamente sobre los medios de cultivo usuales de laboratorio.

Es el bacilo prototipo de las fiebres entericas, adquirido por la ingestión de agua o alimentos contaminados. La fiebre tifoidea es una infección septicémica generalizada, donde las complicaciones más serias y frecuentes son: hemorragia de vasos sanguíneos en la úlcera intestinal o peritonitis seguida de la ruptura de la úlcera. Complicaciones menos frecuentes son la ostiomelosis, abscesos metastáticos en el cerebro y otros órganos o tejidos, meningitis, - pneumonía y endocarditis.

Streptococcus sanguis .- El estreptococo individual es un microorganismo Gram (+), de forma esférica que mide de 0.5 a 1 μ , crece en forma de cadenas, no presenta movilidad, no esporulado. Los estreptococos tienen una amplia distribución en la naturaleza, pueden ser encontrados en la leche, alimentos, agua, polvo, en la boca e intestinos del hombre y animales inferiores.

S. sanguis se localiza principalmente sobre los dientes, cuando se acumulan suficientes sobre la boca o placa dental, pueden iniciar enfermedades sobre los dientes o estructuras que los soportan. Los dientes infectados pueden ser un origen de endocarditis bacteriana aguda.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dirección del hoy Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM, por el apoyo recibido durante la elaboración del presente trabajo, en el Laboratorio de Farmacología Marina.

Quiero hacer patente mi sincero agradecimiento al Dr. Gerardo Green M. quien acepto amablemente la dirección de este trabajo e hizo posible su realización con su orientación y animo; así como a la Bióloga Patricia Gomez y Bióloga Laura Fuentes por su colaboración y apoyo.

Igualmente a los compañeros del Laboratorio de Farmacología Marina: Francisco, Jose Alejandro, Olivia y Sergio.

- ABBOT, D. y R.S. ANDREWS, 1974. Introducción a la Cromatografía. Ed. Alhambra. Madrid, España, 57 p.
- ACKERMAN, D. y R. PANT, 1961. Inhaltsstoffe des schwammes Calix nicacensis. Z. Physiol. Chem., 326: 197-199
- ANDERSON, J.R. y D.J. FAULKNER, 1973. A novel antibiotic from a sponge of the genus Verongia. Tetrahedron letters, (14); 1175-1178.
- ARDNT, W., 1928. Die spongien als kryptotoxische tiere. Zool. Jb. abt. 3 Allg. Zool Physiol., 45: 343-360.
- BAKUS, G.J., 1969. Energetics and feeding in shallow marine waters. Int. Rev. Gen. Exp. Zool., 4: 275-369.
- BASLOW, M.H., 1969. Marine Pharmacology. The Williams and Wilkins Co., Baltimore. 86-100 p.
- BASLOW, M.H. y G.W. READ, 1968. Hypotensive and other pharmacological actions of agents from the sponges Toxadacia violacea, Haliclona viridis and Haliclona magniculosa. Proc. West. Pharm. Soc., 11: 117-120
- BASLOW, M.H. y P. TURLAPATY, 1969. In vivo antitumor activity and other pharmacological properties of halitoxin obtained from the sponge Haliclona viridis. Proc. West. Pharm. Soc., 12: 6-7.

BERGQUIST, R.P., 1978. Soonges. Hutchinson and Co. Ltd. 136-192 p.

BURKHOLDER, R.P. y K. RUETZLER, 1969. Antimicrobial activity of some marine soonges. Nature. Lond. 222: 983-984.

BURKHOLDER, R.P., 1973. Ecology of marine antibiotics and coral reefs. In Biology and Geology of Coral Reefs., 2: 117-182 p.

De LAUBENFELS, M.W., 1936. A discussion of the sponge fauna of the Dry Tortugas in particular, and West Indies in general, with material for a revision of the families and orders of the Porifera. Carnegie Inst. Washington Publ., 467 (30): 1-125 p.

FINGERMAN, M., 1972. Evolución y Diversidad Zoológicas. Ed. Interamericana. México. 36-43 p.

FUENTES, V.L., 1981. Estudio Taxónomico de las Esponjas Marinas del Area de Veracruz, Ver. México. Fac. Ciencias, Tesis Profesional. UNAM. 140 p.

GREEN, G. y G.J. BAKUS, 1975. Toxicidad en esponjas y holoturias. An. Centro Cienc. del Mar y Limnol., Univ. Nal. Autón. México 2 (1): 61-66.

GREEN, G., 1977. Ecology of toxicity in marine soonges. Mar. Biol., 40: 207-215.

HYMAN, H.L., 1940. The Invertebrates: Protozoa Through Ctenophora. Mc. Graw-Hill Co. Nueva York. 284-286.

JAWETZ, E., MELNICK, J.L. y E.A. ADRLBERG, 1977. Manual de Microbiología Médica. El Manual Moderno, S.A. México. 254-291 p.

NIGRELLI, F.R., S. JAKOWSKA? y I. CALVENTI, 1959. Ectyonin an antimicrobial agent from the sponge Microciona prolifera Verril. Zool. Soc., 44: 173-176.

NIGRELLI, F.R., 1976. Metabolitos del Mar. C.E.C.S.A. México. 36-42 p.

ORDUÑA, C.O., 1980. Separación de las Sustancias Tóxicas, de las Sustancias con Actividad Antibiótica en Dos Esponjas Marinas. Tesis Profesional. Universidad Femenina de México. 51 p.

REDISWIG, H., 1971. Particle feeding in natural populations of three marine demospongiae. Biol. Bull. Mar. Biol. Lab., Woods Hole 141: 568-591.

_____ 1975. Bacteria as food for temperate-water marine sponges. Can. J. Zool., 53: 582-589.

RICHET, C., 1906. De l'action toxique de la subérítine (extrait aqueux de Suberites domuncula) C.R. Soc. Biol., 61: 598-600.

RUGGIERI, G. H., 1961. Developmental aberrations in sea-urchin eggs induced by sponges extracts. Am.Zool., 1: 384-385.

SCHMITZ, J.F., K.H. HOLLENBEAK, y D.C. CAMPBELL, 1978.

Marine natural products: Halitoxin, toxic complex of several marine sponges of the genus Haliclona.

J. Org. Chem., 43 (200): 3916-3922.

SHARMA, G.M. y P.R. BURKHOLDER, 1967. Studies on antimicrobial substances of sponges I. Isolation, purification and properties of a new bromine containing antibacterial substances. Lamont Geological Observatory of Columbia University. N.Y. U.S.A. Contribución 1086.

SIGEL, M.M., L.L. WELHAM, W. LICHTER, L.E. DUDECK, J.L. GARGUS y A.H. LUCAS, 1970. Anticellular and antitumor activity of extracts from tropical marine invertebrates. In Food-Drugs from the sea. Proceeding 1969, edited by H.W. Youngken. Washington D.C., Marine Technology Society. 307-310.

STEMPIEN, M.F., 1966. An antibiotic substance isolated from a sponge of the genus Angelas. Amer. Zool., 6: 363.

STEMPIEN, M.F., G.D. RUGGIERI, R.F. NIGRELLI y J.T. CECIL, 1970. Physiologically active substances from extracts from tropical marine invertebrates. In Food-drugs of the sea. Proceeding 1969. edited by H.W. Youngken. Washington D.C., Marine Technology Society. 295-305.

STIERLE, B.D. y D.J. FAULKNER, 1979. Metabolites of the marine sponge Chondrosia collectrix. J. Org. Chem., 44 (6): 964-968.

WIEDENMAYER, F., 1977. Shallow Water Sponges of the Western Bahamas. Basel and Stuttgart: Birkhäuser Verlag. 287 p.