

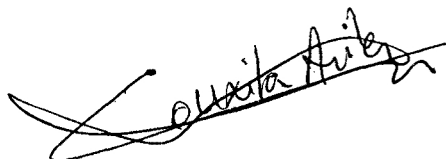
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL
FACULTAD DE BIOLOGIA
UNIVERSIDAD DE BARCELONA

**SUSTANCIAS NATURALES DE MOLUSCOS OPISTHOBANQUIOS:
ESTUDIO DE SU ESTRUCTURA, ORIGEN Y FUNCION
EN ECOSISTEMAS BENTONICOS.**

VºBº de los Directores de la
Memoria:
Dr. Manuel Ballesteros, Profesor
Titular del Departamento de Biología
Animal de la Universidad de Barcelona.



Memoria redactada por Conxita
Avila Escartín, para optar al grado
de Doctor en Ciencias Biológicas
por la Universidad de Barcelona.



Dr. Guido Cimino, Director del I.C.M.I.B.
C.N.R.-Arco Felice, Nápoles, Italia.



Barcelona, Marzo de 1993.

5.10.3.2. Análisis químico.

Productos obtenidos: Estructura.

Ejemplar de Miseno. El ejemplar fue extraído entero con acetona (ya que era muy pequeño). Se realizaron varias placas en benceno-éter etílico 8-2. Entre los esteroides y la mezcla de las posibles luteorosina-macfarlandina-A aparecía una tercera mancha que carbonizaba (con Ehrlich y calor) y que parecía ser doble (2 productos). La cantidad era insuficiente para extraer conclusiones.

Ejemplares de Ischia: Fueron extraídos los 2 ejemplares capturados en San Pancrazio (Ischia). Se disecaron en las siguientes partes: borde amarillo del manto, zona dorsal del manto con las tres líneas amarillo-blanco, resto del manto y pie, y vísceras. Tras extracciones repetidas con acetona, y siguiendo el procedimiento habitual, se realizaron placas en benceno-éter etílico 8-2. Se comparó sobre placa con la muestra del *C. luteorosea* italiano. La mancha fluorescente correspondiente a la mezcla luteorosina-macfarlandina A aparecía exclusivamente en el primer extracto (borde amarillo del manto).

Ejemplares de Asturias: Se disecaron los 2 ejemplares, de unos 7 mm cada uno, en las siguientes partes: borde del manto, resto del manto y pie, glándula digestiva, resto de vísceras. Tras extracción rutinaria con acetona y ultrasonidos, fueron hechas diversas placas calibradas en éter de petróleo-éter etílico 1-1 y en benceno-éter etílico 7-3. Se observaba claramente que la posible mezcla luteorosina-macfarlandina-A y el posible norrisolide estaban mucho más concentrados en el borde del manto. En los otros extractos no se observaba apenas nada. Se realizaron también placas calibradas incluyendo los productos de referencia. Parece ser que esta especie presenta una menor cantidad de la posible mezcla luteorosina-macfarlandina-A y del tercer producto respecto a las otras dos especies del género descritas anteriormente y procedentes del mismo lugar, aunque estos datos son preliminares, y es necesario un mayor número de ejemplares para confirmarlo.

Del estudio de estos ejemplares se deduce que las posibles luteorosina y macfarlandina-A, así como los otros posibles productos, están presentes preferentemente en el borde del manto. Los resultados cualitativos, teniendo en cuenta que los productos se han identificado exclusivamente por comparación en TLC, se resumen en la Tabla 5.49.

| | macfarlandina A luteorosina | chelonaplysina C | norrisolide polyrhaphina C |
|--------|--------------------------------|------------------|-------------------------------|
| Oviedo | + | + | + |
| Miseno | + | - | - |
| Ischia | + | - | - |

Tabla 5.49. Comparación química entre los ejemplares de las distintas localidades.

Origen de los productos.

Aunque no se ha podido averiguar de qué esponja provienen los productos, se asume que son de origen dietético, procedente de alguna esponja relacionada con las mencionadas en el capítulo de *C. luteorosea*.

Se realizaron algunos experimentos de los que se obtuvieron resultados difíciles de interpretar. Por un lado, en el tubo Y se efectuaron 3 intentos con 3 ejemplares distintos, con las esponjas *Dysidea fragilis* y *D. avara*. El resultado fue que en todos los casos tomaron la dirección de *D. avara*, pero solo uno de ellos llegó hasta la esponja, y luego siguió en movimiento.

Por otro lado, al dejar 4 ejemplares en una cápsula de Petri con: *Pteraplysilla spinifera*, *D. fragilis*, *D. avara* y *Cystodites dellechiajei*, se observó que durante 20 minutos 3 de los 4 ejemplares no se movieron de *C. dellechiajei* (donde se habían situado en los primeros 5 minutos). Sólo uno de los ejemplares se desplazó durante los 20 minutos. Estos resultados no nos permiten extraer ninguna conclusión a cerca de la alimentación de *C. krohni*.

Función.

Si los productos son parecidos o iguales a los de *C. luteorosea*, su función será posiblemente similar, aunque esto no ha podido ser comprobado.

5.10.3.3. Resumen conclusivo.

C. krohni presenta probablemente el mismo tipo de productos que *C. luteorosea*, localizados en el borde del manto, siendo similar el patrón de los ejemplares de Asturias en ambas especies, y de los ejemplares italianos en ambas especies respectivamente. Su origen y función se presumen similares a *C. luteorosea*.

5.11. *Chromodoris britoi* Ortea y Pérez, 1983.

5.11.1. Introducción.

5.11.1.1. Referencias bibliográficas generales en el área de estudio. Sinonimias.

Chromodoris britoi.- Ortea y Pérez (1983); Templado *et al.* (1983); Luque (1986), Ballesteros *et al.* (1986b); Avila y Durfort (1992).

5.11.1.2. Breve descripción y características de la especie.

La descripción original y detallada de la especie se puede hallar en Ortea y Pérez (1983). A modo de pequeño resumen se puede decir que el color general del cuerpo es rosa-violáceo, sobre el cual aparece un reticulado de color amarillo-oro (que puede ser blanquecino en los ejemplares de menor talla). El borde del manto es amarillo, flanqueado interiormente de blanco. El reticulado amarillo del manto rodea la branquia y los rinóforos. La complejidad del diseño dorsal aumenta con la talla. La branquia presenta entre 6 y 10 hojas unipinnadas, blancas con el raquis violeta. Los rinóforos presentan el raquis violeta y las láminas blancas, en número de 19. La cola es violeta claro con una línea dorsal amarilla (ausente en los ejemplares de menor tamaño).

5.11.1.3. Referencias comentadas.

Morfológicas o descriptivas.

En el trabajo de García *et al.* (1991), se estudió un sólo ejemplar, siendo descritas MDFs en el borde del manto pero no delante de los rinóforos. Se destacaba su similitud con las MDFs de *C. luteorosea*, aunque las células vacuolares (también esféricas) medían 10-20 μm . No se exponían fotografías ni datos histológicos.

5.11.2. Material estudiado.

Se halla expuesto en la Tabla 5.50.

| LOCALIDAD | FECHA | (1) | (2) | (3) |
|--|---------|-----|-------|-------|
| Blanes | 17-7-91 | 4 | -12 m | quím |
| Blanes | 23-7-91 | 7 | -12 m | m+rád |
| Cadaqués | 25-7-91 | 5 | -20 m | quím |
| Blanes | 14-8-91 | 18 | -10 m | quím |
| Blanes | 13-9-91 | 5 | -12 m | rád |
| Blanes | 14-7-92 | 1 | -10 m | rád |
| TOTAL | | 40 | | |
| (1)= Número de ejemplares. (2)= Profundidad. Utilización del material. (quím= química, rád= rádula, m= microscopía). (3)= | | | | |

Tabla 5.50. Datos de los ejemplares de *C. britoi* capturados.

En todos los casos se encontraron en paredes rocosas esciáfilas. Algunos de ellos fueron capturados sobre la ascidia *Cystodites dellechiajei*.

5.11.3. Resultados y discusión.

5.11.3.1. Datos morfológicos de los ejemplares capturados.

Esquemas anatómicos.

En los esquemas de la Figura 5.19. se pueden ver algunos diseños dorsales de los ejemplares capturados.

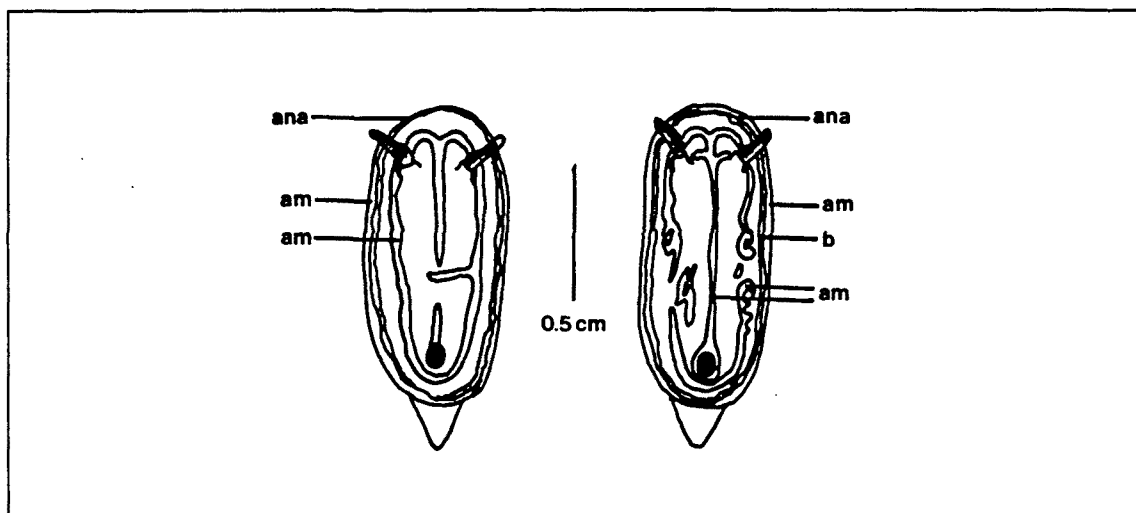


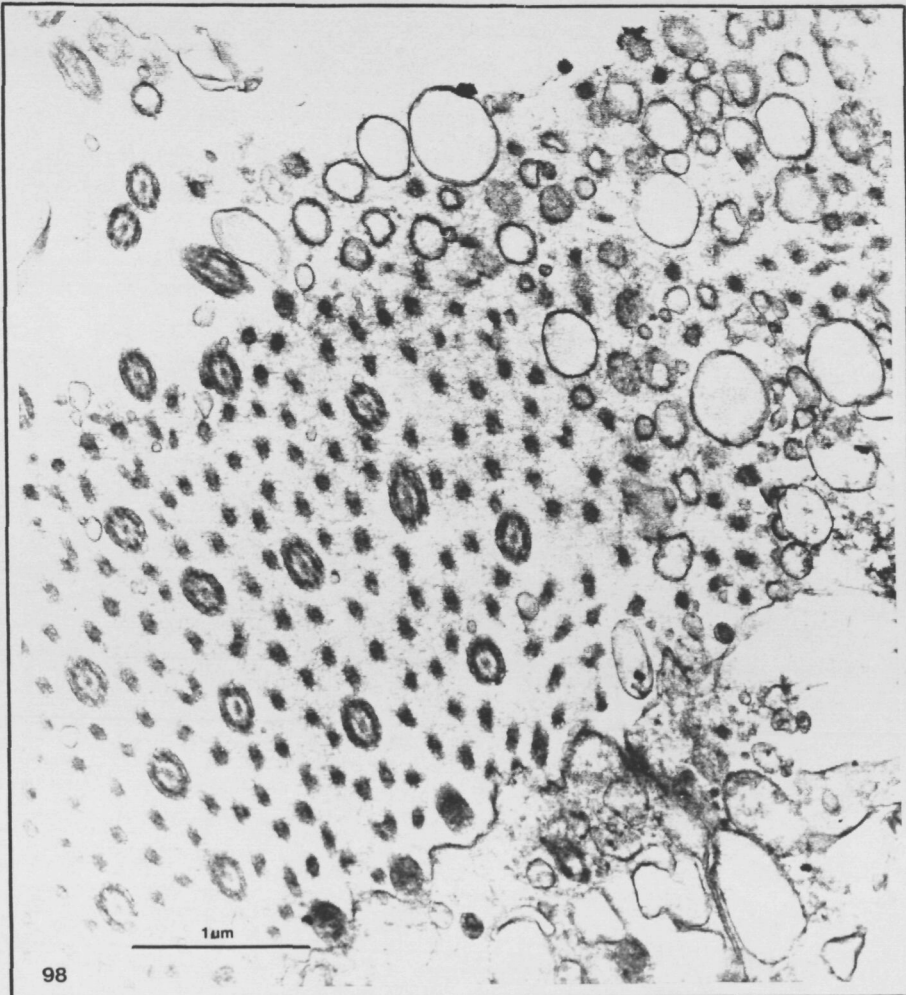
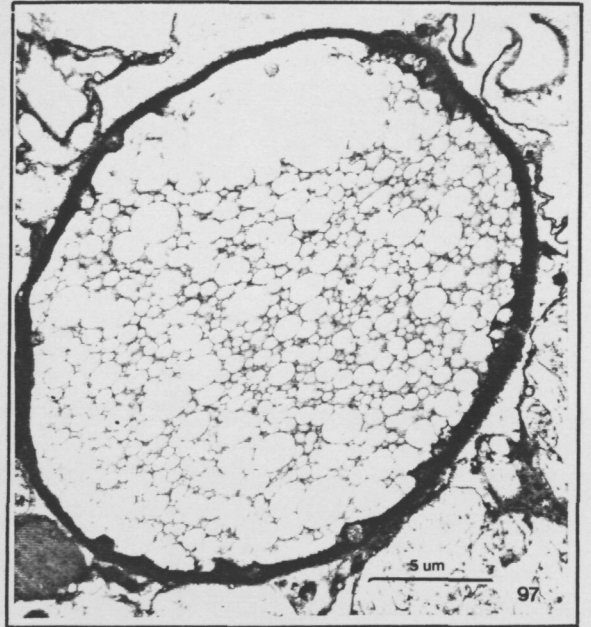
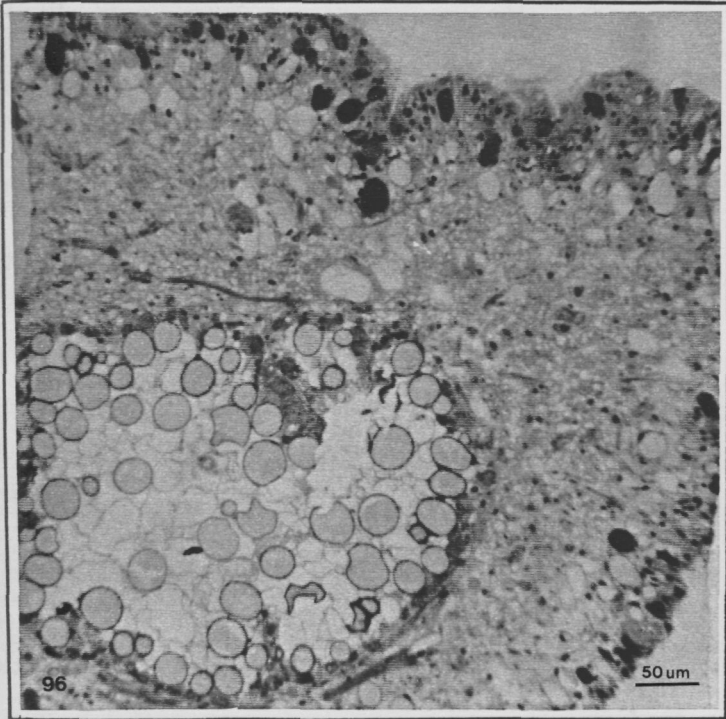
Figura 5.19. Esquemas anatómicos de algunos ejemplares de *C. britoi* (am= amarillo; b= blanco; ana= anaranjado).

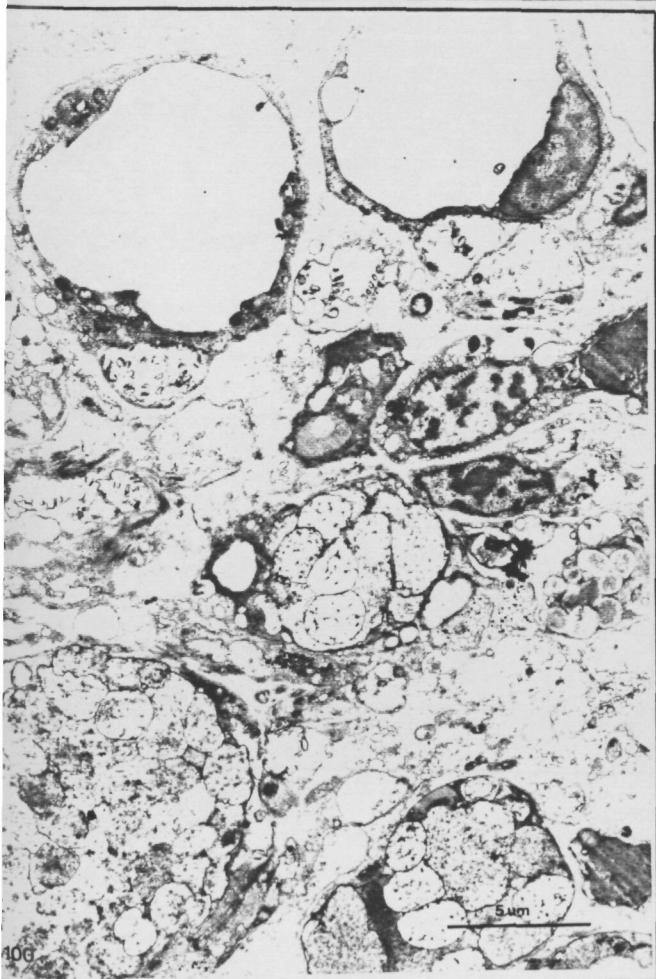
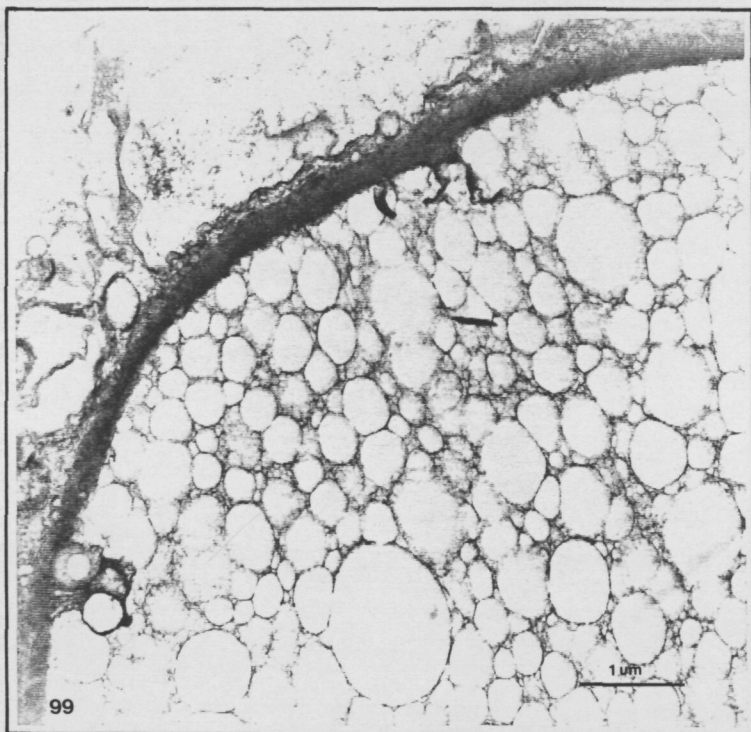
Ventralmente se observa que los palpos son de color púrpura, y el borde del manto es amarillo y blanco igual que dorsalmente. En los ejemplares mayores la línea central puede tener dibujos o dividirse en fragmentos. La parte cefálica del borde del manto se oscurece, adquiriendo una tonalidad, más que amarilla, naranja. La línea dorsal del pie no llega hasta el final del mismo.

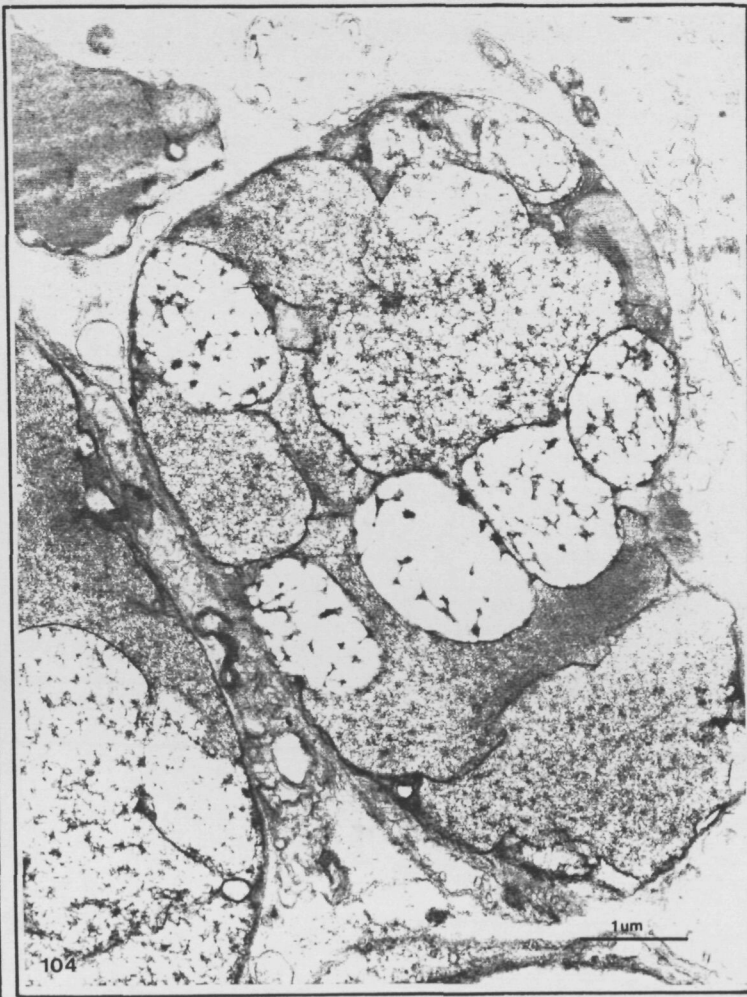
Estas características encajan en la descripción de la especie realizada por Ortea y Pérez (1983), con cierta variabilidad en el patrón de diseño dorsal.

Formaciones dérmicas del manto.

Se localizan en el borde del manto, coincidiendo con la descripción de García *et al.* (1991). Concretamente se sitúan en la línea blanca del borde del manto. Se exponen a continuación los resultados del estudio al microscopio electrónico (fotografías 96 a 104), que nos han permitido, además, describir el epitelio del manto.







El epitelio presenta células ciliadas con las mismas características que se describen para *Dendrodoris limbata* (ver apartado 5. 14.), con algunas diferencias. Los microvilli presentan diferente diámetro y se observa un glicocálix fibrilar mucho más desarrollado en *C. britoi* (fotografías 98 y 102). En la submucosa se observan también numerosas células de secreción mucosa, dentro de las cuales se aprecian gránulos en diversas fases de compactación (como es habitual en este tipo de células, fotografías 100, 101, 103 y 104).

Se hace evidente la presencia de gránulos de diámetro variable formados por dos fracciones: una fracción interna mayoritaria de carácter lipídico, y una zona periférica muy electrodensa, adoptando el conjunto de estos agregados un aspecto muy característico. Estas formaciones corresponderían a las llamadas MDFs (fotografías 96, 97 y 99).

Rádula y armadura labial.

La fórmula radular de uno de nuestros ejemplares (procedente de Blanes) era la siguiente: 46x(30-R-30), siendo el tamaño del ejemplar de 10 mm. Las fórmulas radulares citadas por Ortea y Pérez (1983) son: 42x(31-R-31) hasta 65x(60-R-60).

Las fotografías 106 a 109 muestran los detalles de los dientes y dentículos en las distintas zonas de la rádula, que coinciden con la descripción original (Ortea y Pérez, 1983). Los dientes marginales presentan dentículos únicamente en su parte más distal (fotografías 106 y 108). En la fotografía 107 se aprecia la morfología del diente raquídeo. La armadura labial presenta uncinos bífidos (fotografía 105).

Características de la puesta.

La puesta es una cinta espiral aplanada, con dos vueltas enteras, de unos 4 mm de diámetro. Los huevos eran de color crema.

Se obtuvieron en acuario 3 puestas, una sobre el alga *Halimeda tuna* y el resto en las paredes de cristal del acuario. Se cultivaron durante varias semanas en acuario pero no dieron resultados positivos.

5.11.3.2. Análisis químico.

Productos obtenidos: Estructura.

De los 27 animales congelados para este fin, se disecaron 3, obteniéndose los pesos que se indican en la Tabla 5. 51.

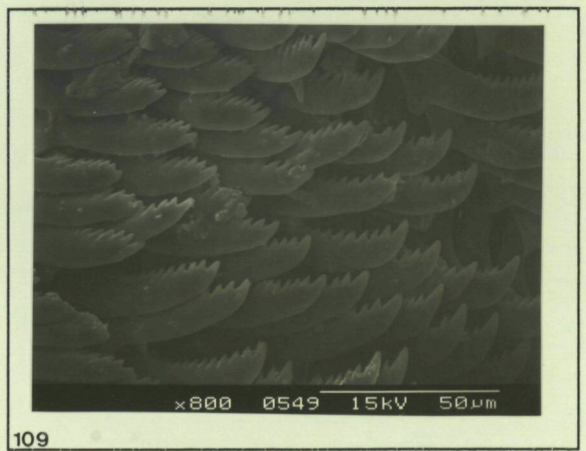
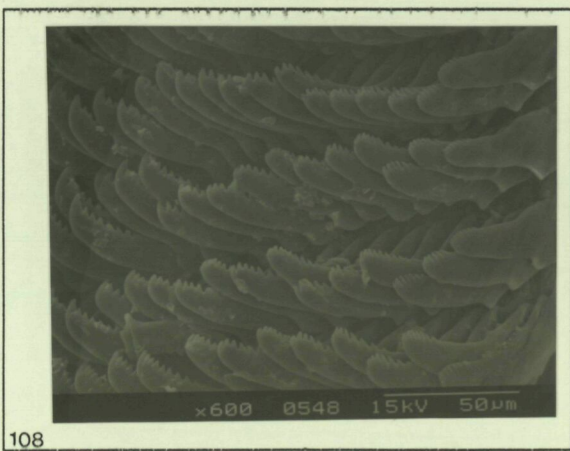
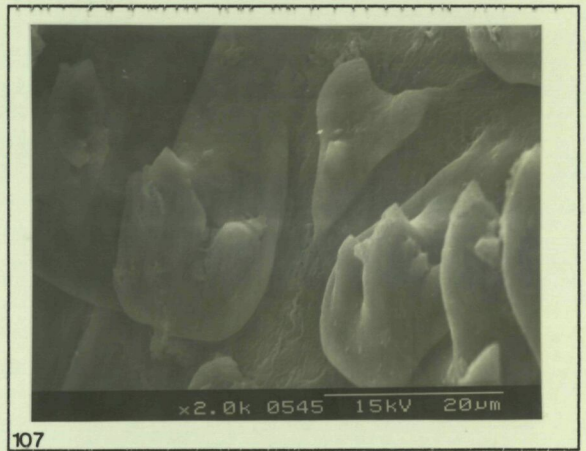
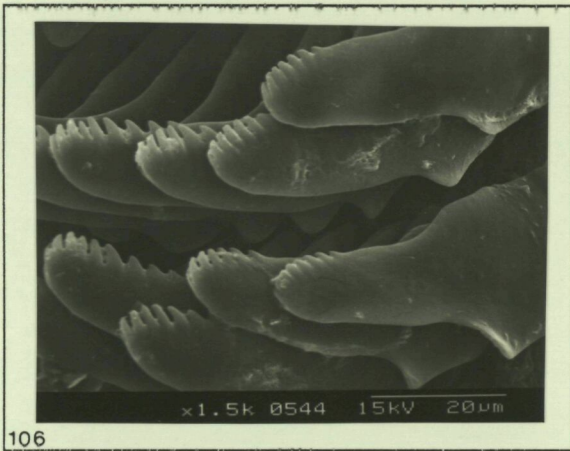
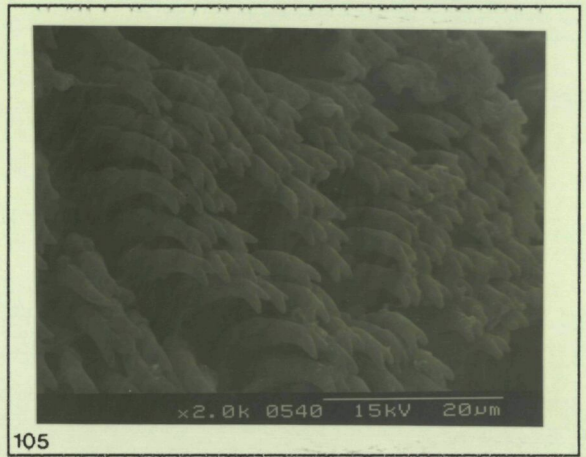
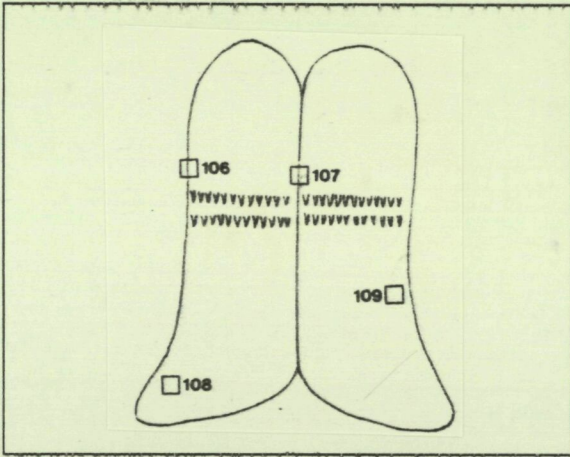
| Secciones | peso seco | extracto acetónico |
|-----------------|-----------|--------------------|
| borde del manto | 0.1 | 4 |
| resto del manto | 4.3 | 4 |
| visceras | 3.7 | 2.5 |

Tabla 5.51. Análisis químico de los ejemplares de *C. britoi* (datos en mg).

Se hicieron las correspondientes placas cromatográficas (incluyendo el extracto de la ascidia sobre la que se recogieron los ejemplares), observándose que el patrón era similar al de *C. luteorosea* de Asturias. Tras realizar placas de comparación con extractos de esta otra especie, se observó que presentaba todos los productos de *C. luteorosea*, más otros dos que podrían ser derivados de la luteorosina (acetato y alcohol). Con otras placas con mezcla y comparación se comprobó que efectivamente el alcohol y el acetato de la luteorosina estaban presentes en *C. britoi*, así como la mezcla luteorosina/macfarlandina-A y los demás productos, hallándose además otros productos distintos.

Los productos mencionados eran más abundantes en el borde del manto que en el resto de extractos.

Chromodoris britoi



Un animal entero (de peso seco 3 mg) fue extraído para comprobar si en un solo animal estaban presentes todas las sustancias citadas. El resultado fue positivo, aunque con diferentes concentraciones. Se conservaron congelados 3 animales (para posteriores comparaciones), y el resto (20 ejemplares) se extrajeron uno por uno, separadamente, para observar si todos presentaban todos los productos o sólo algunos. Podría ser que, al proceder de lugares cercanos pero distintos, comieran distintas esponjas similares. Se comprobó que, debido al patrón de productos observado en las placas, al menos se alimentan de tres esponjas diferentes. El ejemplar número 3 era el único que no presentaba la mezcla luteorosina/macfarlandina-A. El resto presentaban todos los productos, aunque a diferentes concentraciones. La comparación sobre placa demostró que había norrisolide, polyrhaphina y chelonaplysina-C, aunque para demostrarlo con una mayor exactitud habría que hacer el estudio NMR, cosa que no fue posible debido a la escasez de productos.

Se anotaron los pesos secos de los 20 animales y se conservaron los extractos acetónicos sin pesar, para posteriores estudios con más ejemplares.

El pH externo fue medido en 5 ejemplares vivos de Blanes, resultando ser neutro (pH=7).

Origen de los productos.

El estudio cromatográfico del extracto acetónico de *Cystodites dellechajei* nos demostró, como era de esperar, que no es la presa de *C. britoi*, ya que no presentaban nada en común. Es de suponer que se alimenta del mismo tipo de esponjas que las demás especies del género *Chromodoris*, ya que los productos son similares. Además se alimentan, como se ha mencionado anteriormente, de varias esponjas distintas con productos similares. Una de estas esponjas sería igual o similar a la presa de *C. luteorosea* en Taranto, presentando exclusivamente la mezcla luteorosina/macfarlandina-A, y otra de las esponjas sería igual o similar a la presa de *C. luteorosea* (y probablemente otras especies) en Asturias, presentando además norrisolide, polyrhaphina-C y chelonaplysina-C.

Fue realizado un experimento en una cápsula de Petri con 18 ejemplares de *C. britoi*, y con las esponjas *Pleraplysilla spinifera*, *D. fragilis*, *D. avara* y la ascidia *C. dellechiajei*. El resultado fue que a los 5 minutos 2 se hallaban sobre la ascidia y el resto en movimiento. A los 10 minutos uno seguía sobre la ascidia, otro sobre *D. fragilis*, y el resto seguía en movimiento. A los 15 minutos, 4 de ellos se situaron sobre la ascidia, uno sobre *D. fragilis* y el resto seguían en movimiento. Si bien es difícil interpretar estos resultados, creemos que ninguna de las especies utilizadas es la presa de *C. britoi*, aunque no sería extraño que su esponja o esponjas presas estuvieran relacionadas con la presencia de la ascidia *C. dellechiajei* (bien por coincidencia de hábitats o bien por alguna otra similitud), ya que además varios ejemplares se recogieron sobre ella.

Función.

Al presentar los mismos productos descritos para *C. luteorosea*, se asume que estos deben tener la misma función que en la mencionada especie, si bien en este caso no se han realizado tests.

Un único experimento realizado con el pez *Trypterygion tripteronotus* dió como resultado que el ejemplar recién muerto de *C. britoi* fuera escupido tres veces. El cefalaspídeo *Aglaja tricolorata* rechazó en acuario un ejemplar de *C. britoi* vivo, al igual que la anémona *Aiptasia mutabilis*, quien tras tocarlo con los tentáculos se deshizo rápidamente de él, y éste escapó, naturalmente vivo.

5.11.3.3. Resumen conclusivo.

Chromodoris britoi presenta, en base a nuestros estudios preliminares mediante TLC, una estrategia presumiblemente similar a *C. luteorosea*, basada en productos iguales o parecidos de origen dietético. Su dieta consiste

probablemente en varias esponjas que contienen diterpenoides del tipo de los descritos para *C. luteorosea*, posiblemente con igual función.

*. Conclusiones de la Familia Chromodorididae.

Este estudio ha revelado que, con la excepción de *H. orsini*, todas las especies de *Hypselodoris* contienen moléculas furánicas con 15 átomos de Carbono (furanosesquiterpenos), que proceden de la dieta sobre esponjas del género *Dysidea*. Por su parte, todas las especies de *Chromodoris*, que pueden convivir con los anteriores en el mismo hábitat, presentan moléculas con 20 átomos de Carbono (diterpenoides), procedentes de esponjas no identificadas, seguramente relacionadas con *Aplysilla* y *Spongionella*.

El método químico ha contribuido notablemente a aclarar la problemática taxonómica y ecológica que estas especies presentan. El complejo caso de *H. orsini*, en el cual se han hallado moléculas con 25 átomos de carbono (sesterterpenos), junto a otros caracteres morfo-anatómicos, sugiere que sería conveniente realizar una revisión taxonómica de la especie.

5.12. *Doris verrucosa* Linné, 1758.

5.12.1. Introducción.

5.12.1.1. Referencias bibliográficas generales en el área de estudio. Sinonimias más frecuentes.

Staurodoris verrucosa.- Oliveira (1895); Vayssière (1896, 1901); Bergh (1878); Cuénot (1906); Nobre (1932).

Archidoris verrucosa .- Fez (1974).

Doris verrucosa.- Linné (1758); Cuvier (1804); Delle Chiaje (1822); Eliot (1910); Pruvot-Fol (1954); Marcus (1955); Sordi y Majidi (1957); Haefelfinger (1960); Vicente (1967); Marcus y Marcus (1967); Schmekel (1968a y b); Franz (1970); Barash y Danin (1971); Nordsiek (1972); Marcus (1972); Clark (1975); Ros (1975, 1985); Ortea (1977); Ros y Altimira (1977); Ballesteros (1978 y 1980); Altimira *et al.* (1981); Fernández-Ovies (1981); García (1982); Ortea *et al.* (1982); Urgorri y Besteiro (1983); Luque (1983 y 1986); Huelín y Ros (1984); Cimino *et al.* (1986b, 1988c); Trigo y Otero (1987); Avila *et al.* (1988, 1990a).

Ortea *et al.* (1982) discuten la nomenclatura de esta especie, que fue ya iniciada en 1906 por Cuénot. Al parecer el nombre de *Doris verrucosa* fue usado por primera vez por Linné en 1758, quien al cabo de 9 años, en su doceava edición, señaló que era una especie que vivía en el Indico. Cuvier (1804) siguió con el mismo nombre para un ejemplar de la Isla Mauricio. Así pues, la especie tipo del género *Doris* tiene el nombre de la especie indopacífica, mientras que la europea (llamada desde los tiempos de Cuvier *D. verrucosa*) debería llamarse *D. derelicta*, nombre creado por Fischer en 1867, (como sinónimo de *D. biscayensis* y *D. seposita*, Fischer, 1872), para los "verrucosa" europeos. Según Ortea *et al.* (*op. cit.*) el cambio de nombre sería aún más complicado que la confusión creada por el error anterior, y por lo tanto, parece pues conveniente seguir usando el nombre de *D. verrucosa*.

5.12.1.2. Breve descripción y características de la especie.

Esta especie se halla descrita con detalle en Schmekel y Portmann (1982) y Ortea *et al.* (1982). A modo de resumen se puede decir que presenta el manto cubierto dorsalmente por tubérculos, que son mayores en el centro que en los bordes. Coloración amarillo-marrón, incluso gris-verdoso, casi siempre con un par de bandas oscuras desde la zona anterior hacia las branquias. El borde anterior del pie es entero. Las vainas rinofóricas y branquial presentan pequeñas verrugas. La rádula presenta dientes lisos en forma de gancho y no presenta armadura labial. El pene es inerme.

5.12.1.3. Referencias comentadas.

Morfológicas o descriptivas.

Una característica a destacar en esta especie es su amplia distribución, ya que ha sido citada además del Mediterráneo en ambos lados del Atlántico Norte y en las costas africanas (Marcus, 1955; Marcus y Marcus, 1967; Franz, 1970). La morfología típica de la especie se mantiene bastante constante en las distintas zonas.

Ecológicas.

Según la bibliografía consultada esta especie se alimenta de las esponjas *Hymeniacidon caruncula* (Fournier, 1969), *Halichondria bowerbanki* (Clark, 1975), *Halichondria sp* (Schmekel y Portmann, 1982; Just y Edmunds, 1985), *Hymeniacidon sanguinea*, *Halichondria panicea* y *Suberites carnosus* (Zavodnik, com. pers.), *Halichondria panicea*, *Hymeniacidon sanguinea* y *Suberites carnosus* (Ortea *et al.*, 1982), y de presas desconocidas en aguas británicas (Thompson y Brown, 1984).

Ros (1978a) citó esta especie en biocenosis de sustratos blandos, fondos de grava organógena y cascajo, biocenosis de praderas de fanerógamas (*Posidonia*) en hojas y rizomas con epibiontes, y en biocenosis de sustratos

duros del coralígeno y en cuevas oscuras. En cuanto a su régimen alimenticio, el mismo autor la citó como zoófago: micrófago (ramoneador, suctor): de esponjas, si bien no citó ninguna especie en particular como presa.

La puesta fue descrita por Ortea *et al.* (1982), dándose un tamaño de los huevos de alrededor de 150 μm . La eclosión de las larvas ocurre, según este autor, a los 16 días a 18°C.

Químicas.

Son de destacar los trabajos de Cimino *et al.* (1986b y 1988c) en los que describieron la presencia de verrucosinas y xylosil-MTA (un análogo de la metiltioadenosina) en ejemplares italianos de esta especie. Posteriormente Porcelli *et al.* (1989) demostraron el origen biosintético de la xylosil-MTA (producto que se origina a partir de la MTA y presenta una baja tasa de renovación), y Gavagnin *et al.* (1990) realizaron el estudio estereoquímico de las verrucosinas.

Jiménez *et al.* (1986) buscaron en *D. verrucosa* endoperóxidos esteroidales, obteniendo resultados negativos.

5.12.2. Material estudiado.

Se detallan los datos en la Tabla 5.52. En Torre Annunziata se recogieron además 2 puestas. Junto a los ejemplares adultos de Cubelles (10-VIII-91) se recogieron también algunas puestas. Posteriormente estos últimos ejemplares hicieron 12 puestas en acuario.

Los ejemplares se hallaron bajo o sobre rocas generalmente sueltas con gran cantidad de incrustaciones de esponjas y algas calcáreas. En Cubelles a menos de 1 m de profundidad, siempre asociados a *Hymeniacidon sanguinea*, y en Torre Annunziata en las proximidades de *Laxosuberites ferrerhernandezii*, a pocos metros de profundidad. Los ejemplares juveniles de

St. Jean de Luz se hallaron cerca de *Verongia aerophoba*, en un intermareal bajo piedras con otras pequeñas esponjas.

| LOCALIDAD | FECHA | (1) | (2) | (3) |
|-----------------|----------|-----|------|------------------|
| Cubelles | Sept-88 | 16 | -1 m | quím + rád + sp |
| | 11-1-89 | 1 | -1 m | sp |
| | 10-8-91 | 20 | -1 m | m + exp |
| Torre Annunz. | Sept.-88 | 20 | -3 m | quím |
| | Oct-88 | 7 | -3 m | quím +m +rád +sp |
| | 12-7-89 | 6 | -3 m | quím + sp |
| Las Llanas | Dic-89 | 4 | IT | quím + rád |
| Angola | 1988 | 2 | - | quím + rád |
| St. Jean de Luz | 14-4-91 | 3 | IT | quím + rád |
| TOTAL | | 79 | | |

(1)= Número de individuos.
(2)= Profundidad. IT= Intermareal rocoso.
(3)= Utilización del material (rád= rádula, quím= química, exp= experimentos, m= microscopía, sp= estudio de las espículas del aparato digestivo).

Tabla 5.52. Datos de los ejemplares capturados.

5.12.3. Resultados y discusión.

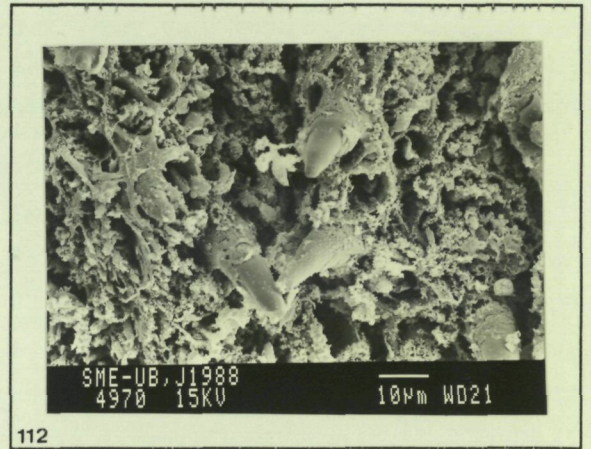
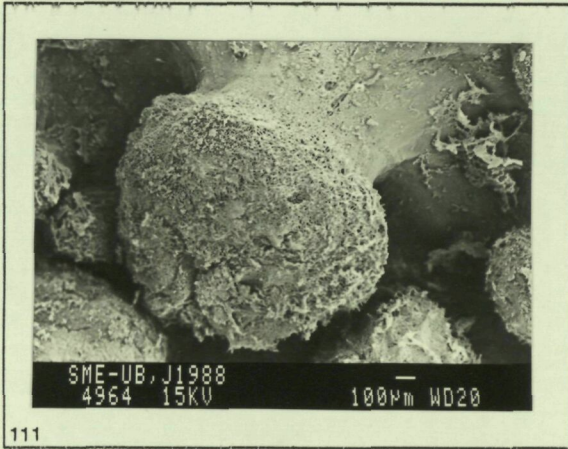
5.12.3.1. Datos morfológicos de los ejemplares capturados.

Esquemas anatómicos.

Los 3 ejemplares juveniles de St. Jean de Luz medían 5 mm, 5 mm y 9 mm, respectivamente. Los ejemplares adultos recogidos en las distintas localidades medían desde 2.5 hasta 5 cm. De algunos de los ejemplares se obtuvieron fotografías en vivo.

En la Figura 5.20. se observan la morfología externa y la anatomía interna de *D. verrucosa*, que coincidía en estos ejemplares con las descripciones anteriormente mencionadas.

Doris verrucosa



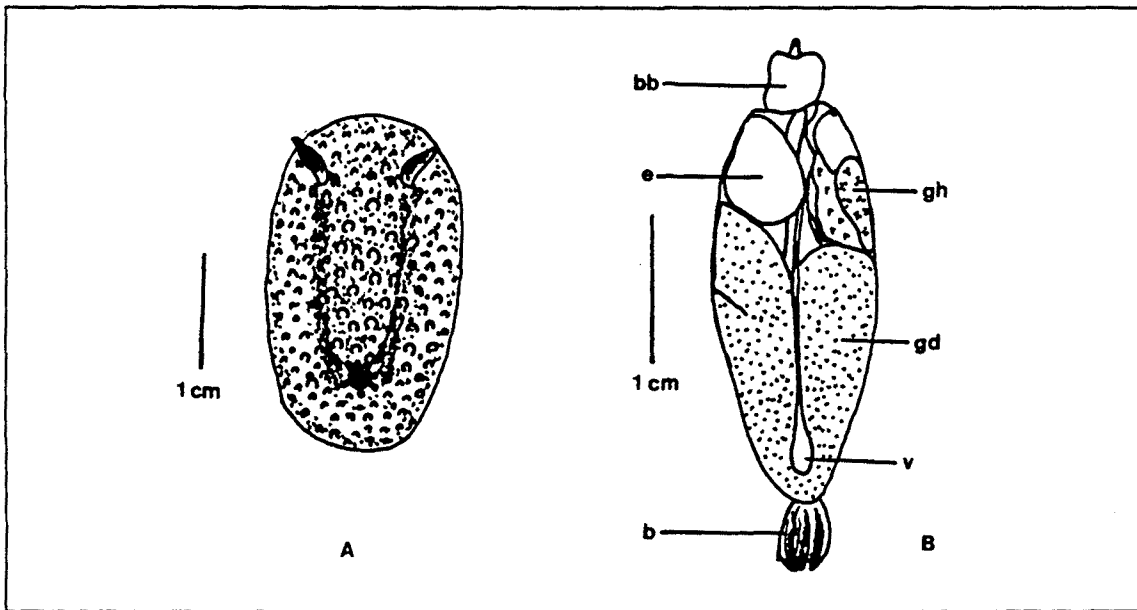


Figura 5.20. Esquemas anatómicos de *Doris verrucosa*. A. Morfología externa. B. Anatomía interna (bb= bulbo bucal; e= estómago; gh= glándula hermafrodita; gd= glándula digestiva; v= ventrículo; b= branquia).

Protuberancias dorsales del manto.

Las verrugas o protuberancias dorsales del manto, de entre 500 μm y 1.5 mm, son redondeadas, mayores en la parte central del dorso que en los bordes, y no contactan unas con otras. En su parte proximal son estrechas y luego se ensanchan formando una bola más o menos esférica (como se puede observar en las fotografías 110 y 111). Just y Edmunds (1985) mencionaban que las espículas no sobresalen en los tubérculos, hecho que no coincide con nuestras fotografías de microscopía electrónica de barrido (en ejemplares fijados). Se puede ver que las espículas se disponen de manera irregular, con la parte distal sobresaliendo de la verruga, y estando en algunos casos rotas. La estructura y composición de las espículas fue descrita por Schmidt en 1944. Las fotografías 116 a 114 muestran las verrugas y las espículas del manto al M.E.B. En la fotografía 114 se observa una espícula rota transversalmente, de modo que se ven sus capas concéntricas, siendo similar a las espículas descritas por Foale y Willan (1987) en *Rostanga arbutus*. La estructura cristalina observada en las espículas de *D. verrucosa* seguramente

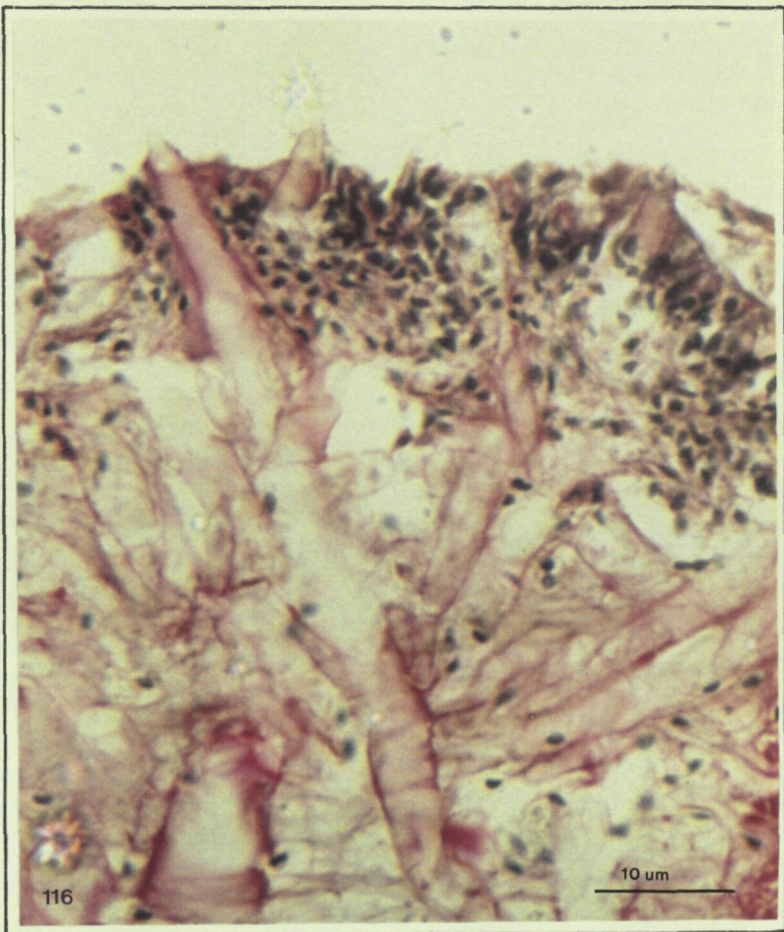
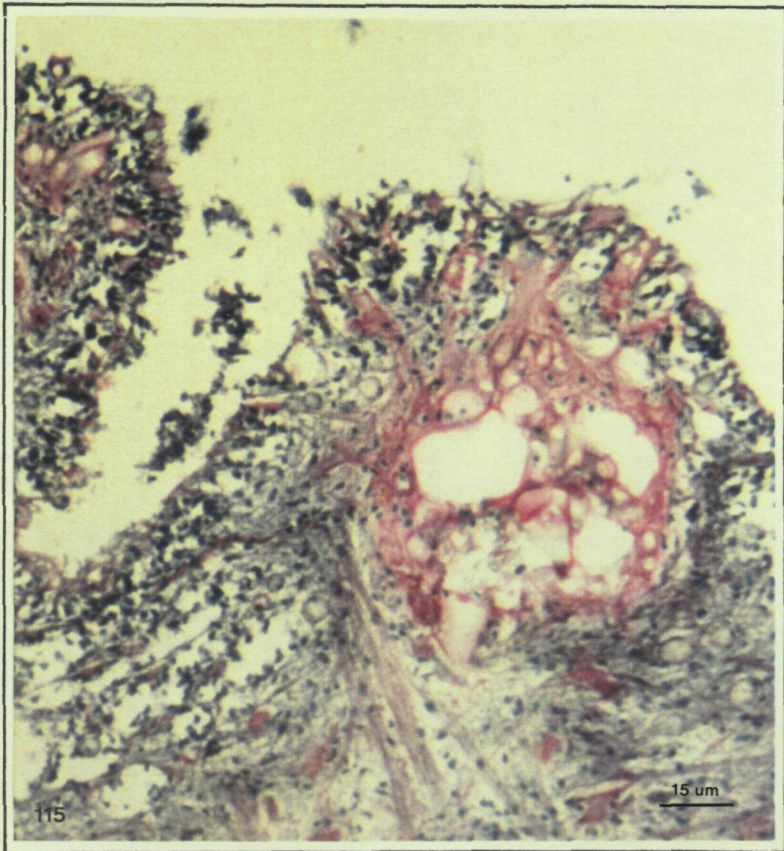
procede de la transformación del carbonato de calcio amorfo debido al alcohol, por analogía con Odum (1951) y Foale y Willan (1987)

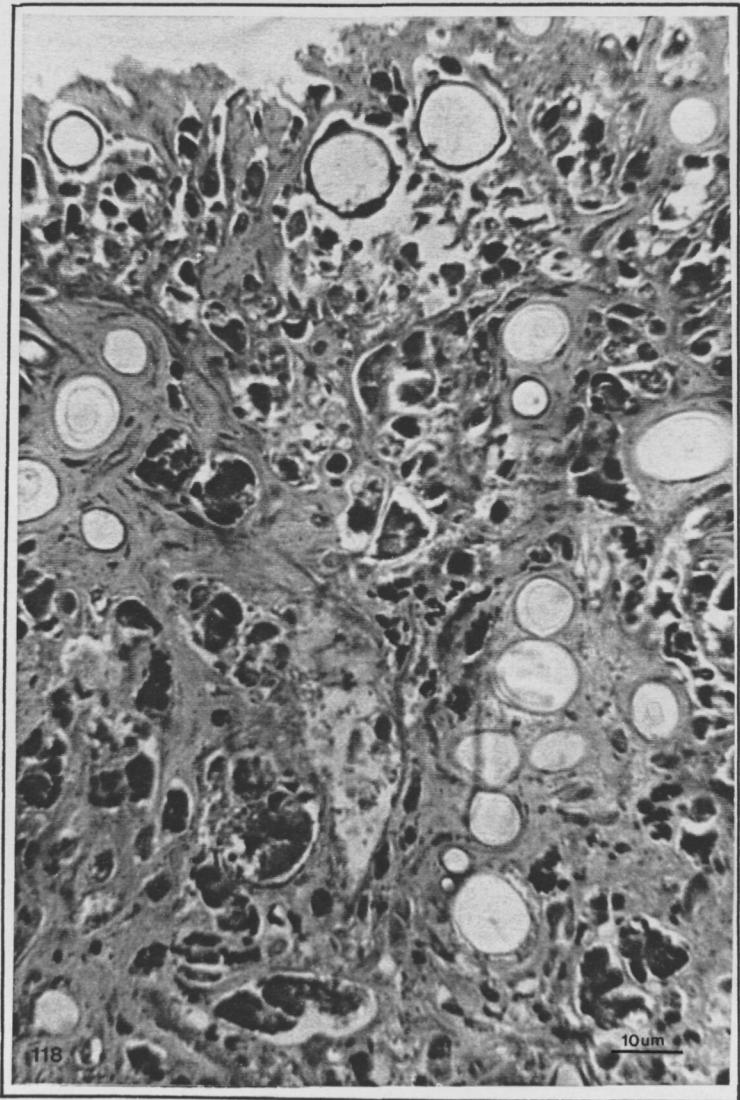
Se observa que en las verrugas más pequeñas hay numerosas espículas, las cuales presentan su extremo distal redondeado. En contraste, las verrugas de mayor tamaño presentan menos espículas, con su extremo más puntiagudo.

Las protuberancias del manto se estudiaron también al microscopio óptico, para lo cual se tiñeron los cortes, tal y como se ha descrito en el apartado de metodología. Las tinciones empleadas fueron : Mallory, tetracrómico de Herlant, reactivo de Schiff (con azul de metileno) y reactivo de Schiff (con azul de toluidina), obteniéndose los mejores resultados con el reactivo de Schiff (ver fotografías 115 y 116). En las verrugas se observa una zona central más laxa y una zona externa en la que las espículas se orientan hacia el exterior de forma más o menos radial pero irregular. En la base se observan haces musculares de soporte. El epitelio, muy fino, no se aprecia excesivamente bien debido a la presencia de las espículas que a menudo producen roturas al cortar la muestra.

El estudio al microscopio electrónico de transmisión presentó un problema: las espículas ocasionaban la rotura de los cortes ultrafinos con la cuchilla de vidrio. A pesar de ello pudimos obtener algunos cortes semifinos (fotografías 117 y 118) que confirmaron las descripciones anteriores. Al MET se observaban los cortes ultrafinos rotos, no pudiéndose describir la ultraestructura del epitelio.

Se realizó simultáneamente un estudio de crioultramicrotomía que no dió resultados positivos ya que los cortes también se rompían. Con este estudio se pretendían localizar las verrucosinas *in situ*, e incluso se tiñeron *a posteriori* algunas muestras con tetraóxido de osmio (con varios tiempos de tinción). Ninguna de las muestras pudo ser interpretada con claridad, si bien es posible que el tiempo de post-tinción deba ser superior a los 15 minutos para obtener resultados. Como resultado preliminar diremos que se observaban en el subepitelio posibles vesículas llenas de sustancias electrodensas (que podrían ser lipídicas).





Edmunds (1968a) describió glándulas claras en el subepitelio, que según él probablemente segregaban ácido, escasas glándulas granulares dispersas, y pocas glándulas mucosas. Si bien los resultados aquí expuestos no nos permiten grandes discusiones, se puede decir que en las observaciones de microscopía óptica se han visto las "glándulas claras" de Edmunds, y, en cambio, no se han observado los otros dos tipos de células (menos abundantes). Como se discute más adelante, no se ha detectado secreción ácida en esta especie, por lo que no parece probable que estas células secreten ácido. La opción que parece más probable es que estas células sean las que contienen las verrucosinas, y que debido al tratamiento y procesado de las muestras se elimine el contenido y queden aparentemente vacías (de ahí el nombre de "glándulas claras" y el esquema de Edmunds, *op. cit.* pág. 126). Esto podría relacionarse con la observación de crioultramicrotomía.

Coincidimos con Edmunds (1968a) en que la epidermis es muy fina, pero estamos en desacuerdo con la idea que se desprende de su esquema y que posteriormente expone (Just y Edmunds, 1985), de que las espículas no sobresalen de los tubérculos, como hemos comentado ya en el estudio de M.E.B. Las fotografías de microscopía óptica y de MET corroboran lo dicho al respecto anteriormente. No se ha podido comprobar si en los animales vivos las espículas sobresalen de igual modo o si esto sólo se observa en ejemplares fijados (como consecuencia del tratamiento de las muestras). Tal vez esto último explicaría la discrepancia con Just y Edmunds (*op. cit.*)

En cuanto al tipo de protuberancias, estas corresponderían al tipo "3" de los mencionados en el trabajo de Kress (1981) junto a las de *Archidoris pseudoargus*, *Acanthodoris pilosa*, *Onchidoris muricata* y *O. bilamellata*, siendo además sus espículas morfológicamente similares a las de *O. muricata*. *D. verrucosa* fue incluida por sus tubérculos en el grupo "a" de los descritos por Labbé (1930) junto a *Archidoris tuberculata*.

Rádula.

Las fórmulas radulares de los ejemplares estudiados se exponen en la Tabla 5.53.

Esta especie presenta armadura labial lisa y cuticular, sin uncinos. La rádula de varios ejemplares ha sido estudiada el microscopio de barrido, concretamente de un ejemplar de Asturias, dos de Angola, uno de St. Jean de Luz, uno de Cubelles y uno de Torre Annunziata. No se ha observado gran variabilidad en la morfología de los dientes, que son en todos los casos lisos y curvados, aunque si se han visto importantes diferencias de tamaño en los dientes, obviamente debidas a las diferencias en el tamaño de los animales.

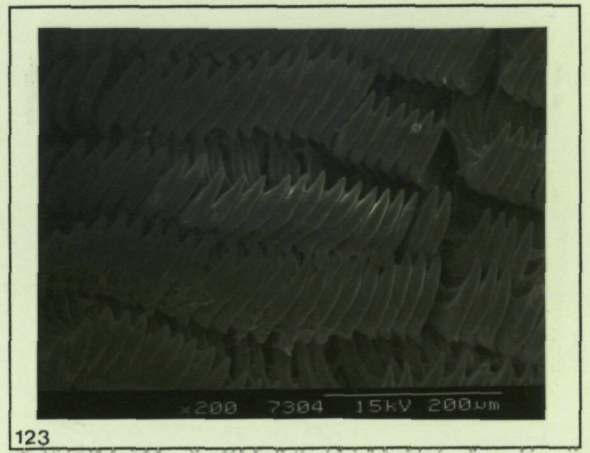
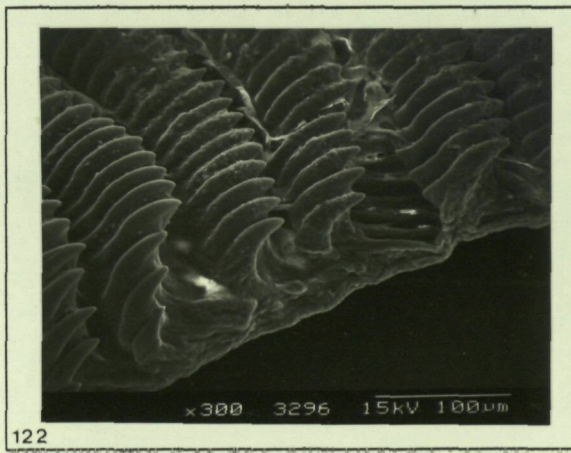
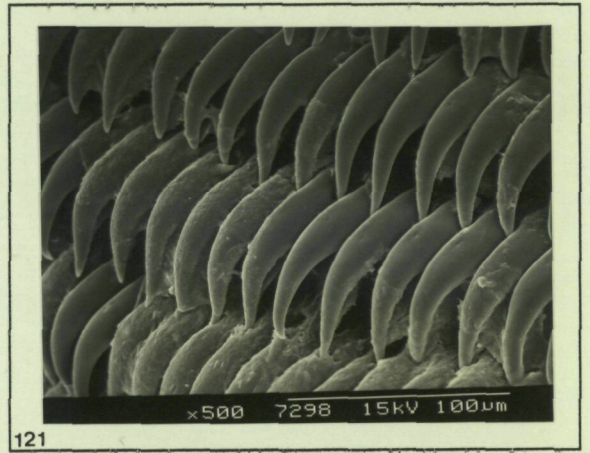
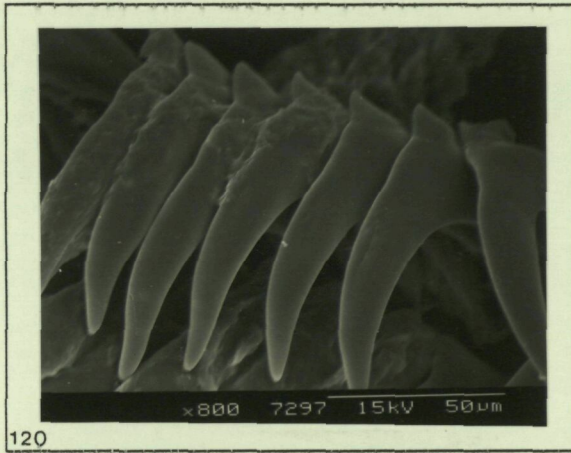
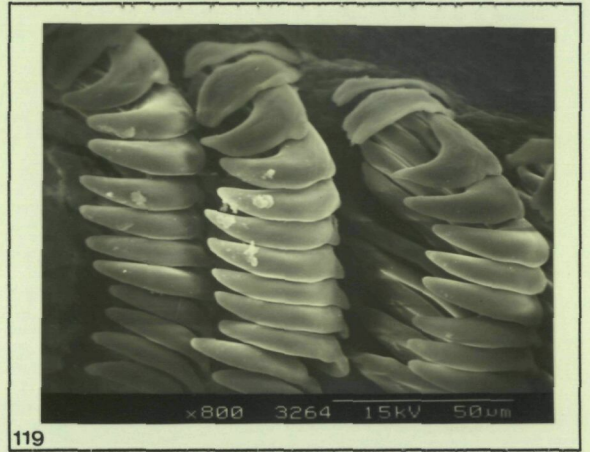
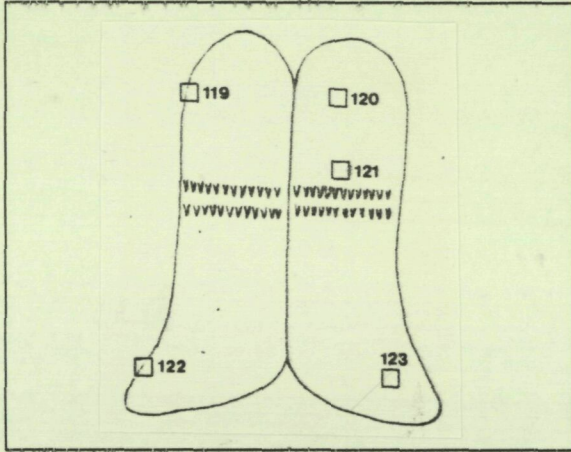
| LOCALIDAD | (1) | (2) | REFERENCIA |
|--------------------|-------|-----------------|------------------|
| St. Jean de Luz | 22 | 26-0-26 | esta |
| Cubelles | 62 | 82-0-82 | esta |
| Las Llanas | 46 | 36-0-36 | esta |
| Angola | 49 | 50-0-50 | esta |
| | 72 | 55-0-55 | esta |
| Torre Annunziata | 44 | 53-0-53 | esta |
| Atlántico Noroeste | 24-42 | 25(47)-0-25(47) | Franz (1970) |
| Nápoles | 21-40 | 20(38)-0-20(38) | Schmekel (1968a) |

(1)= Número de filas.
(2)= Número de dientes por fila.

Tabla 5.53. Fórmulas radulares de algunos ejemplares de *D. verrucosa*.

Como resumen se expone un montaje fotográfico (119 a 123) en el que se observan los dientes en cada zona de la rádula. No se observaron variaciones respecto a las características de los dientes, descritas por Schmekel (1968a) y Franz (1970).

Doris verrucosa



Desarrollo larvario y juvenil.

La puesta consiste en una cinta festoneada de color crema, de más de una vuelta y media, como fue descrito por Ortea *et al.* (1982), con los huevos más claros. En la localidad de Cubelles se han observado puestas durante los meses de agosto y septiembre de 1988 y agosto de 1991.

Se cultivaron un total de 23 puestas. Al iniciarse el cultivo se pesaron 21 de ellas, siendo el peso medio de 0.691 g, con un peso máximo de 1.891 g y un mínimo de 0.126 g. Las larvas eclosionaron a las 3 semanas y media aproximadamente (a una temperatura entre 15 y 18°C). Probablemente la diferencia respecto a los datos de Ortea *et al.* (1982), ya comentados, sea debida a la diferente temperatura. En 7 de los cultivos se obtuvieron larvas que no prosperaron, a pesar de tener a su disposición microalgas (*Isochrysis galbana*) e incluso pequeños fragmentos de la esponja *Hymeniacidon sanguinea*. Se recogieron muestras de los huevos y las larvas en distintos momentos de su desarrollo, que fueron fijadas en alcohol para su posterior estudio y mediciones.

Algunas de las larvas fueron observadas mediante microscopía de barrido. Se observaron un par de larvas que medían 233 y 160 μm respectivamente. En la larva de mayor tamaño el velo medía transversalmente 110.4 μm .

5.12.3.2. Análisis químico.

Productos obtenidos: Estructura.

Ejemplares procedentes de Cubelles. Un primer ejemplar, (conservado en acetona), se analizó junto a uno de Nápoles (previamente congelado) para compararlos. Se separaron en ambos la parte externa (manto y pie) y las vísceras. Se extrajeron con etanol y después se evaporó el disolvente. Se hicieron placas cromatográficas en éter de petróleo-éter etílico 1-1, y en cloroformo-metanol 95-5. Se revelaron como de costumbre con Ehrlich y Sulfato de Cerio. En las placas se observaba claramente la xylosil-MTA en

ambos (Cubelles y Nápoles), pero la mancha correspondiente a las verrucosinas solo se veía clara en el de Nápoles.

Con el objeto de comprobar la supuesta presencia de las verrucosinas se extrajeron con acetona 11 ejemplares de Cubelles separando las vísceras de la parte externa. Los extractos obtenidos se resumen en la Tabla 5.54.

| | peso seco | extractos |
|-------------|-----------|------------------------|
| vísceras | 293 mg | 66 mg extr. acetónico |
| manto y pie | 1.295 mg | 57 mg extr. etéreo |
| | | 30 mg extr. butanólico |

Tabla 5.54. Extractos obtenidos de 11 ejemplares de Cubelles.

Se realizaron placas cromatográficas con el extracto etéreo del manto con hexano-acetato de etilo 8-2. Se hizo mezcla y comparación con verrucosina auténtica, confirmándose su presencia. Se purificó en cromatografía en columna de gel de sílice (en una pipeta Pasteur) con éter de petróleo-éter etílico 9-1. Se separaron las fracciones de 10-15 gotas cada una. El disolvente utilizado para las placas fue éter de petróleo-éter etílico 1-1. El disolvente usado para la columna fue éter de petróleo-éter etílico, aumentando este último al ir obteniéndose los productos (fr. 1 a 80: 9-1; fr. 81-160: 8-2). Se obtuvieron las siguientes fracciones:

- fr. 6-34: ácidos grasos. (10 mg).
- fr. 49-64: ácidos grasos (2 mg).
- fr. 65-94: esteroides y ácidos grasos (10 mg).
- fr. 95-105: esteroides (5 mg).
- fr. 106-150: verrucosina y esteroides (3.5 mg).
- fr. 156-160: xylosil-MTA (2 mg).

El gráfico de HPLC de las verrucosinas demostró que es exactamente igual en los ejemplares de Cubelles y de Nápoles, observándose la misma relación entre las dos verrucosinas (A y B) en ambas poblaciones. Se vió más claro después de limpiarla de esteroides (columna en pipeta Pasteur, en éter de petróleo-éter etílico 95-5). En la gráfica de la Figura 5.21. puede verse que

el patrón de las verrucosinas es el mismo. Y la cantidad por animal también era similar en los ejemplares de ambas poblaciones (ver Tabla 5.55), teniendo en cuenta que los ejemplares de Cubelles eran de menor tamaño.

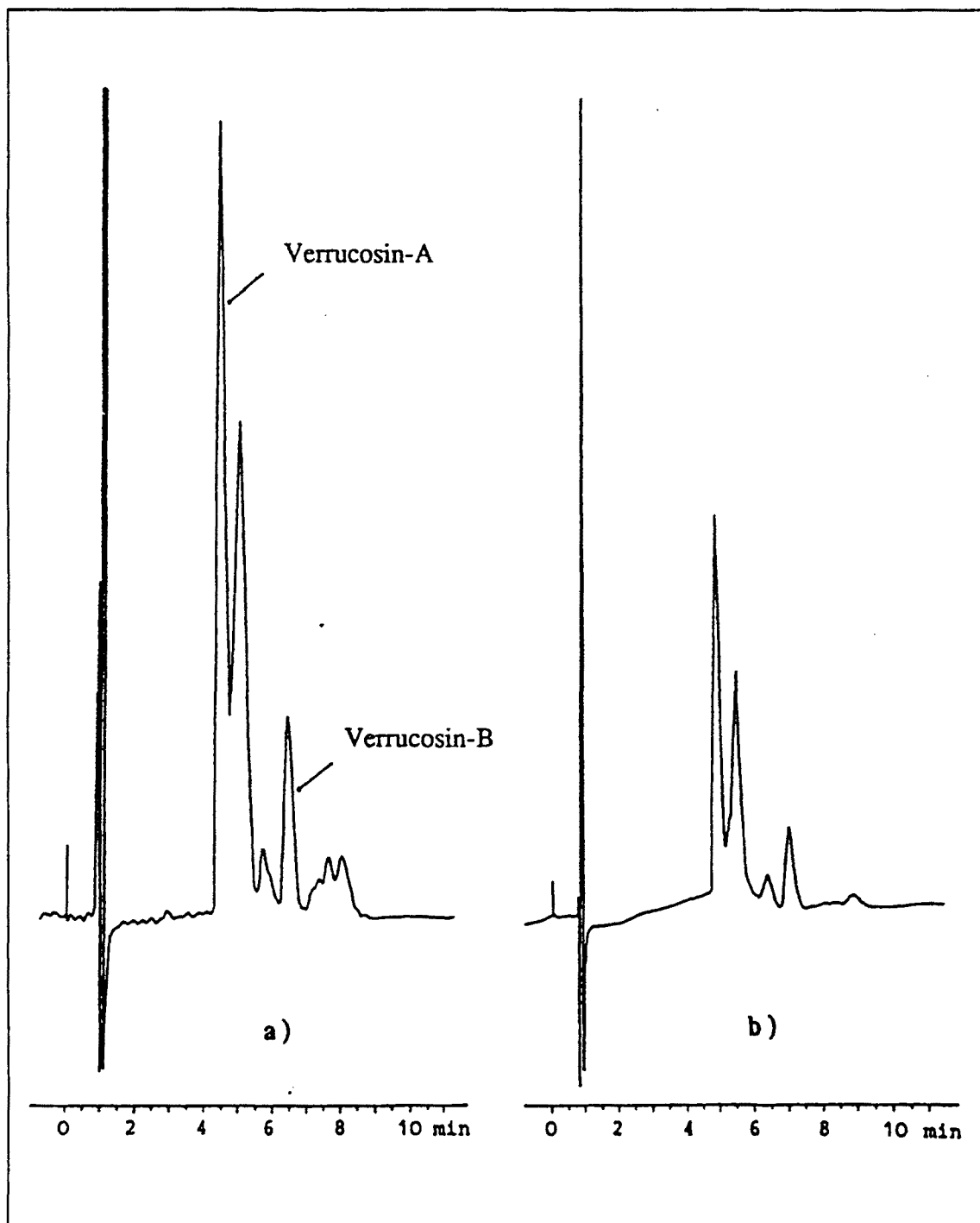


Figura 5.21. Gráficas de HPLC de *D. verrucosa* a) de Cubelles y b) de Nápoles.

| Localidad | Verrucosinas |
|------------------|----------------|
| Cubelles | 0.27 mg/animal |
| Torre Annunziata | 0.75 mg/animal |

Tabla 5.55. Cantidad de verrucosinas en ejemplares italianos y de Cubelles.

Las fórmulas de estos compuestos se pueden observar en la Figura 5.22.

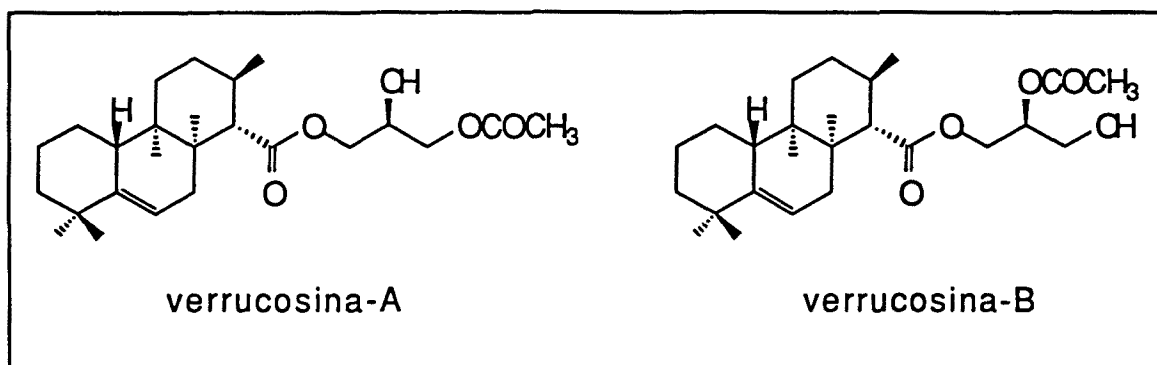


Figura 5.22. Fórmulas de las verrucosinas: Verrucosina-A y Verrucosina-B.

Para extraer la xylosil-MTA del extracto butanólico del manto (30 mg) se realizaron placas en cloroformo-metanol 8-2, revelando con diversos productos (de entre los citados en el apartado de metodología). Se observó la zona UV positiva de la xylosil-MTA. Se realizaron 3 placas semipreparativas en cloroformo-metanol 85-15. Marcamos y a continuación rascamos la zona fluorescente. Se puso la sílice en un embudo acabado en un filtro poroso. Se hizo pasar cloroformo-metanol 8-2. Se evaporó y se obtuvo un peso de 2 mg de xylosil-MTA muy limpia (se observó en la placa de comprobación). El espectro NMR con $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$ de ésta coincidió exactamente con la de los animales napolitanos (ver Figura 5.23.).

La cantidad por animal resultó ser prácticamente idéntica, tal y como se indica en la Tabla 5.56.

| Localidad | xylosil-MTA |
|------------------|----------------|
| Cubelles | 0.18 mg/animal |
| Torre Annunziata | 0.21 mg/animal |

Tabla 5.56. Cantidad de xylosil-MTA en ejemplares de las dos localidades comparadas.

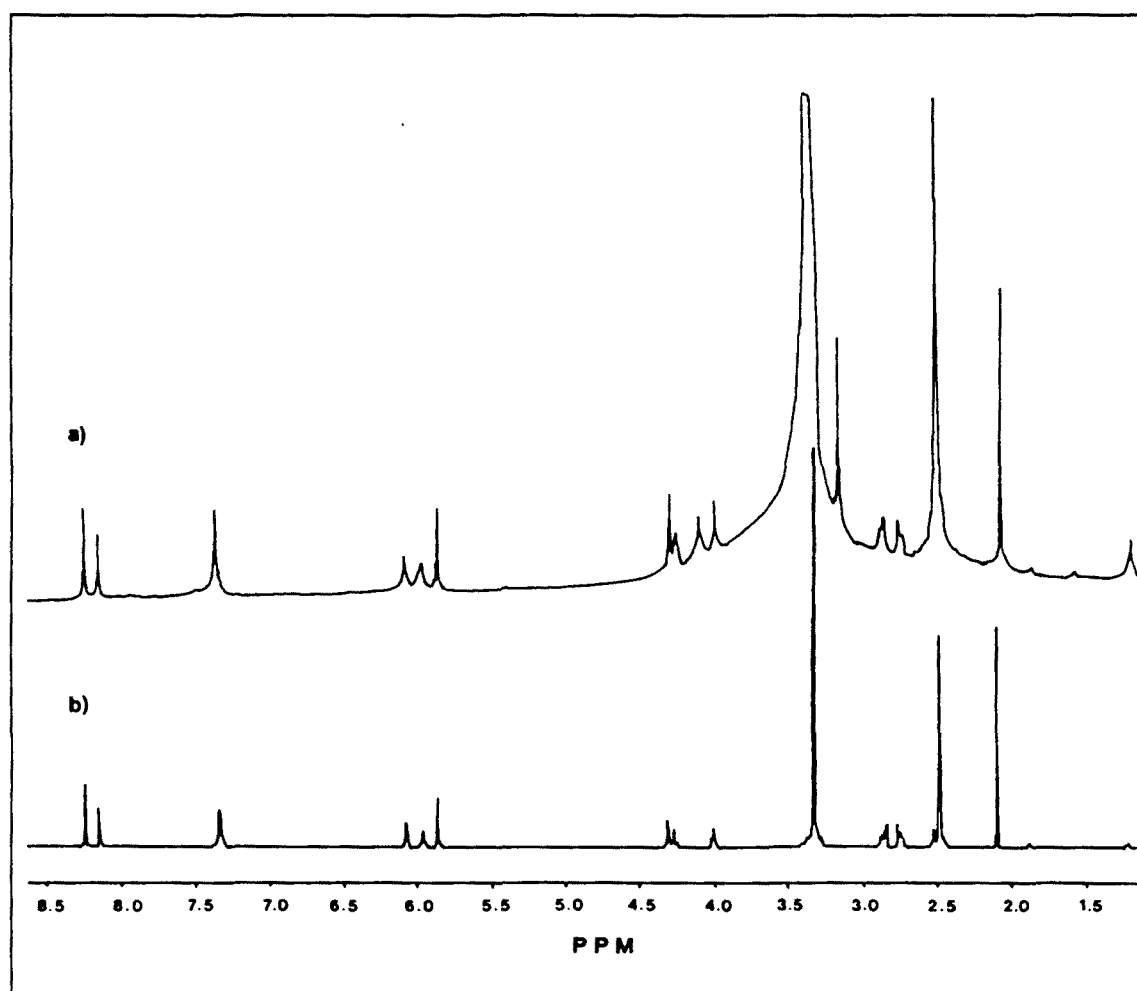


Figura 5.23. Espectros ¹H-NMR de la xylosil-MTA de ejemplares a) de Cubelles, b) de Nápoles.

La fórmula de este compuesto, y para su comparación, la de la MTA, se detallan en la Figura 5.24.

Las preguntas que surgieron seguidamente fueron las siguientes: ¿por qué se acumulan estas cantidades de tiopurina? (xylosil-MTA: 330-380 nmoles/g peso húmedo respecto a MTA: 1.7-2.3 nmoles/g peso húmedo, Cimino *et al.*, 1986b), y ya que dicha sustancia no es ictiotóxica (Porcelli *et al.*, 1989) ¿para qué sirve?. Los análisis posteriores de los animales disecados dieron algunas respuestas.

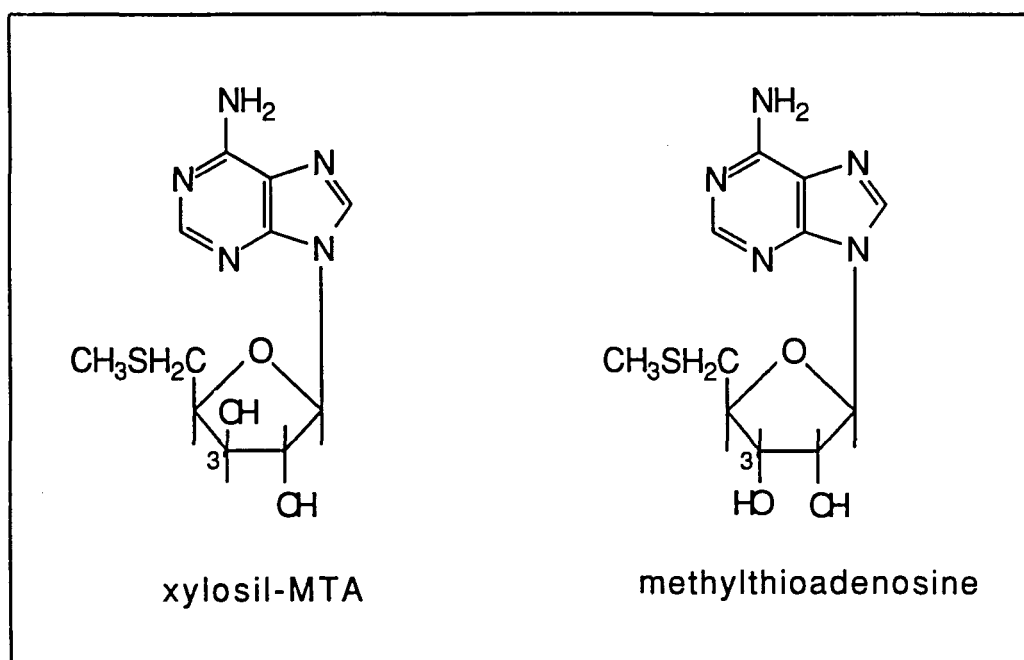


Figura 5.24. Fórmulas de la xylosil-MTA y de la MTA.

El patrón de esteroides del manto de los ejemplares de ambas poblaciones era también muy similar como se puede ver en la gráfica de GC de la Figura 5.25. Hay un par de picos distintos que podrían ser debidos a la diferente composición de la dieta.

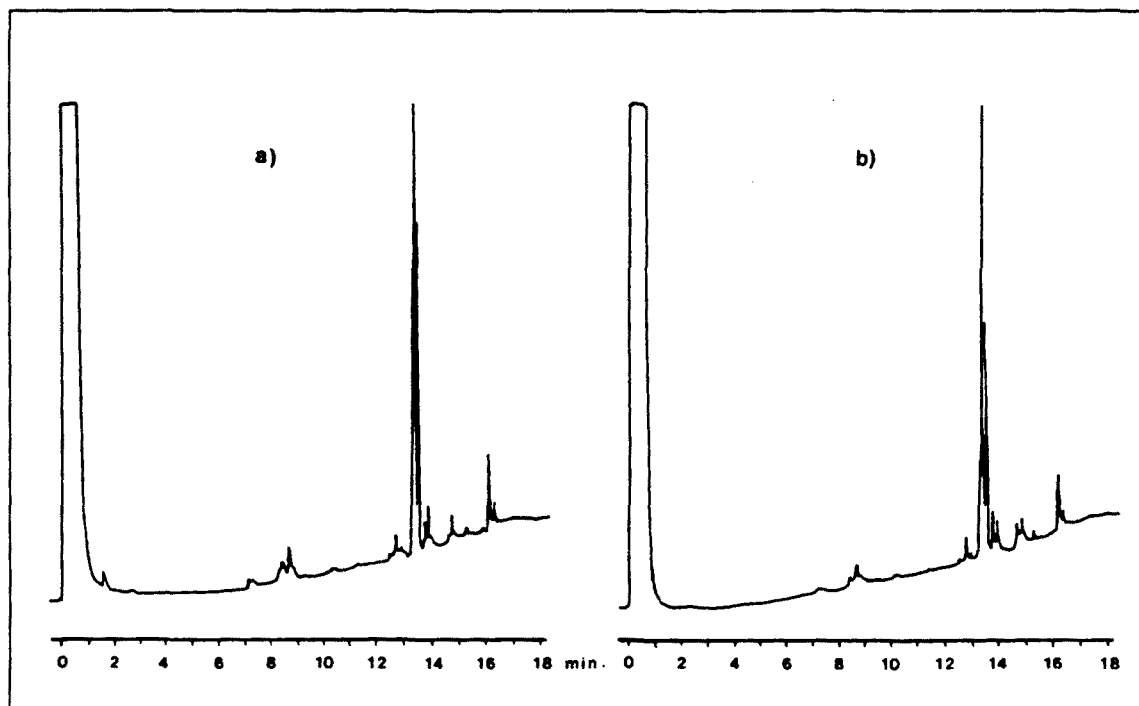


Figura 5.25. Análisis GC (cromatografía de gas) de los esteroides de ejemplares a) de Cubelles y b) de Nápoles.

Para obtener los esteroides del ejemplar napolitano, se extrajo con acetona un animal (mediante la metodología habitual), obteniéndose 526 mg de extracto etéreo.

El extracto acetónico de las vísceras de los 11 ejemplares de Cubelles se trató en el modo habitual. Las placas en éter de petróleo-éter etílico 1-1 demostraron que no había verrucosinas, pero si abundante xylosil-MTA (placa en cloroformo-metanol 9-1), en mayor cantidad que en el manto, si bien no fue cuantificada.

Estudio químico de las puestas. Se extrajo con acetona una puesta hecha en el acuario por los animales de Torre Annunziata (27-X-88), con la ayuda de un baño de ultrasonidos, repetidas veces, y se filtró el extracto, evaporándose el disolvente a continuación. Se añadieron 2 ml de éter etílico y se hizo una placa a diferentes concentraciones en éter de petróleo-éter etílico 1-1 y en cloroformo-metanol 9-1, y en ninguna de ellas se detectó la presencia de las verrucosinas.

Posteriormente fue extraída con acetona otra puesta hecha en acuario por los mismos animales. La puesta húmeda pesaba 1.6 g. Mediante una placa en cloroformo-metanol 9-1 se controló la presencia de xylosil-MTA. Las placas con mezcla y comparación con el producto de referencia demostraron que había xylosil-MTA. Con un *rf* al frente (en éter de petróleo-éter etílico 1-1) se observó una gran cantidad de ésteres de ácidos grasos. Recogiendo la muestra con éter etílico y repitiendo la placa en mezcla y comparación con verrucosina auténtica, quedó claro que no había verrucosinas en las puestas estudiadas. Para demostrar que la xylosil-MTA era realmente xylosil-MTA era necesario realizar el espectro NMR. Para ello se hicieron 3 placas semipreparativas, (disolvente: cloroformo-metanol 85-15). Se rascó el producto en las tres placas, y se filtró el extracto varias veces (filtro vitroporoso L17) con cloroformo-metanol 8-2, extrayendo el producto de la sílice y removiendo. Se puso el filtrado en un recipiente y se evaporó con el rotavapor, obteniéndose un peso de 6 mg de xylosil-MTA, que fue analizada mediante NMR en CDCl_3 . El espectro NMR demostró que efectivamente era xylosil-MTA (espectro idéntico a los expuestos en la Figura 5.26.).

Análisis de las distintas secciones anatómicas. Se realizó la separación de las verrugas del resto del manto, aparato digestivo y glándula digestiva de varios ejemplares de Cubelles y Torre Annunziata. Se extrajeron con acetona del modo habitual y se hicieron placas en butanol-ácido acético-agua (60-15-25), revelando con diazo-NaOH, y en éter de petróleo-éter etílico 1-1, revelando con Ehrlich-sulfato de cerio. En las primeras (butanol-ácido acético-agua) se detectó un producto en glándula digestiva y aparato digestivo de ambos animales. Se hizo mezcla y comparación con el extracto acetónico obtenido de un fragmento de esponja de Cubelles, demostrando mediante TLC que dicho producto (descrito en 1975 por Cimino *et al.*, ver apartado sobre el origen de los productos) era en el nudibranquio de origen dietético. Además se observó otro producto de la esponja presente en el tubo digestivo de los animales de ambas poblaciones que no aparecía en la glándula digestiva (posiblemente se degrada o se transforma en el aparato digestivo). Dicho producto no fue analizado debido a su escasez. En las placas con éter de petróleo-éter etílico 1-1 se vió que presentaban verrucosina por igual las verrugas aisladas y el resto del manto.

Se disecaron 2 animales de Cubelles para localizar la xylosil-MTA, en las siguientes partes: glándula digestiva, aparato reproductor, resto de vísceras, manto y pie. La extracción habitual con acetona y las placas en cloroformo-metanol 9-1 y 85-15 no fueron nada aclaratorias debido a su mal estado. Fue necesario repetir el análisis con animales frescos y bien conservados. Para ello, se emplearon 4 animales de Torre Annunziata, que fueron narcotizados previamente a su disección. Se extrajeron con acetona las distintas secciones: manto y pie, aparato digestivo y resto, parte del aparato reproductor, glándula hermafrodita y glándula digestiva, (ver Figura 5.23.).

Las placas en cloroformo-metanol 9-1 demostraron claramente que la xylosil-MTA se concentraba en la glándula hermafrodita, y no aparecía en ningún otro extracto (excepto un poco en la parte externa, posiblemente debido a contaminación). En el mismo disolvente a 85-15 se veía aún más claro. La xylosil-MTA se degrada a sulfóxido (que presenta un rf inferior en el mismo disolvente mencionado).

En la Tabla 5.57. podemos ver la distribución de las verrucosinas y xylosyl-MTA en *Doris verrucosa*.

| | verrucosinas | xylosyl-MTA |
|-----------------------|--------------|-------------|
| manto + pie | +++ | + |
| glandula digestiva | - | - |
| tracto digestivo | - | - |
| aparato reproductor | - | - |
| glandula hermafrodita | - | +++ |
| puesta | - | +++ |

Tabla 5.57. Distribución de verrucosinas y xylosil-MTA en las distintas secciones realizadas. (+++= abundante; += trazas; -= ausente).

Estudio de los ejemplares procedentes de Asturias y Angola. Se extrajeron con acetona un animal de Asturias (2 cm) y 2 animales de Angola (3 y 4 cm). Se disecaron y se obtuvieron los resultados que se exponen en la Tabla 5.58.

| Secciones: | extracto acetónico | peso seco |
|------------------------------|--------------------|-----------|
| Animal de Las Llanas: | | |
| manto y pie | 8 mg | 44 mg |
| glándula digestiva | 2 mg | 12 mg |
| resto de vísceras | 2 mg | 17 mg |
| Animales de Angola: | | |
| manto | 13 mg | 620 mg |
| glándula digestiva | 12 mg | 264 mg |
| resto de vísceras | 8 mg | 190 mg |
| branquias (de un ejemplar) | 2 mg | 33 mg |
| alcohol que los contenía | 8 mg | - |

Tabla 5.58. Análisis de un ejemplar de Las Llanas y dos ejemplares de Angola.

Las placas se realizaron en éter de petróleo-éter etílico 1-1 para comprobar la presencia de verrucosinas, y en cloroformo-metanol 85-15 para detectar la presencia de xylosil-MTA. Las verrucosinas aparecían de forma clara en el extracto del manto del ejemplar asturiano. Se probaron distintos disolventes (4-6, por ejemplo) y reveladores para mejorar las placas. La xylosil-MTA parecía presente en todos los extractos. En los animales de Angola era difícil obtener resultados claros ya que los animales estaban en alcohol y en un bote de plástico.

Se extrajo con acetona un segundo animal asturiano disecado sólo en dos partes, obteniéndose los resultados expuestos en la Tabla 5.59.

| | peso seco | extracto acetónico |
|-------------|-----------|--------------------|
| Vísceras | 42 mg | 4 mg |
| manto y pie | 63 mg | 7 mg |

Tabla 5.59. Análisis del segundo ejemplar asturiano.

Las placas en los disolventes ya mencionados mostraban la presencia de xylosil-MTA en ambos extractos, así como por comparación en otra placa (9-1), en todos los extractos anteriores. Las probables verrucosinas aparecieron en el extracto del manto, pero no eran cuantificables. Podría deberse esta escasa cantidad hallada a que el ejemplar no estuviera bien congelado. Se repitió con productos auténticos de referencia y se observó de nuevo que la xylosil-MTA estaba en todos los extractos, así como el sulfóxido (resultado de su degradación). Las verrucosinas aparecían en los extractos del manto de los ejemplares de Asturias y aparentemente también en los de Angola pero no se puede afirmar, ya que es sólo una observación mediante TLC con una muestra en no muy buen estado.

Para intentar obtener cantidad suficiente como para realizar un análisis mediante HPLC, se extrajeron otros 2 animales de Asturias que medían 1 y 1.5 cm respectivamente. Se extrajeron con acetona y ultrasonidos. Se obtuvieron los resultados que se exponen en la Tabla 5.60.

| Secciones | peso seco | extracto acetónico |
|-------------|-----------|--------------------|
| vísceras | 64 mg | 4 mg |
| manto y pie | 109 mg | 6 mg |

Tabla 5.60. Análisis químico de dos ejemplares de Las Llanas.

En las placas cromatográficas se observaba claramente la presencia de verrucosinas en el extracto del manto (estos ejemplares estaban seguramente en mejor estado). Para obtener cantidad suficiente de verrucosinas para el HPLC se reunieron todos los extractos del manto y pie de los ejemplares previamente analizados de Las Llanas: 8 mg del primer animal, 7 mg del segundo, y 6 mg de otros 2 animales. En total, 21 mg. Se recogió la mezcla con metanol y se evaporó el disolvente. Se volvió a pesar: 14 mg. Se cargó la muestra en una columna (en pipeta Pasteur) de sílice usando como disolvente inicial éter de petróleo-éter etílico 99-1, (cambios de disolvente: fr. 1-22: 99-1;

fr. 23-64: 95-5; fr. 65-83: 8-2; fr. 84-90: éter etílico). Se obtuvieron las fracciones siguientes:

fr. 42-43: ácidos grasos.
fr. 66-78: esteroides. (1 mg).
fr. 84-85: verrucosinas para HPLC. (2.5 mg).
fr. 86-87: ácidos grasos. (3.5 mg).

Las placas resumen de la columna mostraron que las verrucosinas estaban algo sucias, posiblemente no eran los 2.5 mg. Pero en la gráfica de HPLC se demostró claramente que presentaban el mismo patrón que las verrucosinas de los ejemplares mediterráneos, las gráficas eran iguales a las mostradas en la Figura 5.24.

Como resumen de todo lo anterior podemos decir que las verrucosinas y la xylosil-MTA se encuentran, además de en los ejemplares de Cubelles y Nápoles, en los de Asturias y probablemente en los de Angola.

Análisis de un ejemplar juvenil: Un juvenil, capturado en St. Jean de Luz, de peso seco 1.7 mg y longitud máxima de 8 mm se extrajo con acetona y se hicieron las placas cromatográficas de costumbre. No se observaron verrucosinas debido a la escasa cantidad de productos. En la última placa (concentrando al máximo el extracto) se insinuaba la presencia de las verrucosinas, pero al ser poco producto no fue posible demostrarlo con certeza. De hecho, es lógico suponer que los juveniles ya presentan verrucosinas por ser estas biosintetizadas (como se discutirá en el apartado siguiente).

Secreciones externas y pH. De los 3 ejemplares juveniles de St. Jean de Luz, se midió el pH en dos de ellos, en vivo, resultando ser neutro (pH= 7) en ambos. Se midió también el pH en varios ejemplares adultos vivos capturados en Cubelles, y resultó ser neutro (pH= 7). Esto no coincide con lo expuesto por Edmunds (1968a), quien menciona que la secreción de *D. verrucosa* es ácida.

Origen de los productos.

a) Experimentos de biosíntesis.

Se extrajo con acetona la esponja *Hymeniacidon sanguinea* recogida en Cubelles (11-I-89). Fue identificada mediante un fragmento fijado, así como en los restos de excrementos de los ejemplares de Cubelles y en tubo digestivo y hepatopáncreas de ejemplares de las poblaciones catalana y napolitana, analizando su contenido en espículas. Unos 3 cm³ aproximadamente fueron extraídos con acetona siguiendo el procedimiento habitual. Las placas en éter de petróleo-éter etílico 1-1 demostraron claramente que esta esponja no presentaba verrucosinas. (Se hizo también placa con productos de referencia, mezcla y comparación).

El hecho de que la esponja presa no presentase verrucosinas ni xylosil-MTA, y además, que estas sustancias se hallaran en similares proporciones en ejemplares de distintas poblaciones, inducía a pensar en un origen biosintético para ambos productos. En el caso de la xylosil-MTA lo demostraron Porcelli *et al.* en 1989. Para demostrarlo en el caso de las verrucosinas se plantearon en el I.C.M.I.B. varios experimentos con precursores marcados, el primero de los cuales se realizó en 1987, y el resto a finales de 1988. Es en estos últimos en los que se tuvo la oportunidad de participar. Los experimentos de síntesis radioactiva realizados fueron básicamente de dos tipos. En el primero se inyectó DL-[2-¹⁴C]-mevalonato, y en el segundo [U-¹⁴C]-glicerol, ambos en el hepatopáncreas de los animales y disueltos en agua destilada. Los animales fueron congelados y disecados a los 2, 4 y 9 días (experimentos 1, 2 y 3 de las tablas siguientes), y los productos fueron extraídos mediante la metodología habitual (con las debidas precauciones). Se usaron 11, 5 y 5 ejemplares en los experimentos 1, 2 y 3 con mevalonato, y 9, 5 y 5 ejemplares con glicerol.

Se inyectaron los precursores marcados con una jeringuilla de cristal de 1 ml (se inyectaban 50 microlitros por animal) por la parte ventral (pie) hasta la glándula digestiva. Se hicieron experimentos de duraciones varias, tras lo cual los animales fueron congelados y disecados en parte externa

(manto y pie) y vísceras para ser extraídas por separado. En el primer experimento (2 días) con DL-[2-¹⁴C] mevalonato se inyectaron 20 µCi de DL-[2-¹⁴C] ácido mevalónico DBED sal (4.7 mCi/mmol). Los extractos obtenidos se pasaron por sendas columnas de sílice (disolvente: éter de petróleo-éter etílico 8-2). La mezcla de verrucosinas así obtenida se pasó por HPLC, obteniéndose 3 mg de verrucosina-A. En los otros dos experimentos (4 y 9 días) se inyectaron 10 µCi del mismo producto (5.3 mCi/mmol). En estos dos experimentos se purificaron esteroides y verrucosinas separadamente, mediante columnas de SiO₂ de los extractos de las vísceras y de la parte externa. En el caso del extracto del manto el disolvente empleado fue el ya mencionado arriba, y en el extracto de las vísceras el mismo pero en una proporción de 1-1. La mezcla de esteroides fue acetilada con Ac₂O/py durante una noche a temperatura ambiente y posteriormente pasada a través de una columna de SiO₂ (en éter de petróleo-cloroformo 7-3). Los acetatos de los esteroides así obtenidos se pasaron por HPLC (mu-Bondapack RP C-18, 3.2 mm (ID) x 30 cm; MeOH/agua 97:3; flujo 2 ml/min), obteniéndose como esteroides más abundantes cholesteryl acetato y 7-dehydrocholesteryl acetato.

En el segundo experimento (4 días) se añadieron 4 mg y 3 mg respectivamente de verrucosinas A y B no marcadas (frias) a los 2 mg de mezcla de verrucosinas obtenida del extracto del manto, y posteriormente se pasó por el HPLC (en las condiciones de Cimino *et al.*, 1988c). Las condiciones del tercer experimento (9 días) son como las ya descritas.

Los resultados son los que se detallan en las Tablas 5.61. y 5.62., que se exponen a continuación.

| Experimentos: | 1 peso rad (mg) (!) | | 2 peso rad (mg) (!) | | 3 peso rad (mg) (!) | |
|---------------------|---------------------------|--------|---------------------------|--------|---------------------------|--------|
| extracto etéreo | 80 | 246400 | 22 | 218300 | 36 | 274600 |
| mezcla verrucosinas | 22 | 12300 | 2 | 17200 | 8 | 10800 |
| Verrucosina-A | 3 | 2020 | 4* | 550 | 2 | 600 |
| Verrucosina-B | - | - | 2* | 2100 | 1 | 2100 |

(!)= dpm x10 (se midió 1/10 de cada muestra).

Tabla 5.61. Resultados de los experimentos de incorporación de ¹⁴C-mevalonato en verrucosinas (*= añadiendo verrucosinas frias).

Al cabo de dos días (Experimento 1) se obtenía poca verrucosina marcada (559 dpm/mg para la mezcla de verrucosinas), valores que eran mayores a los 4 y 9 días (8600 y 1350 dpm/mg respectivamente). Las diferencias en las cantidades de verrucosinas se deben probablemente a la variabilidad del tamaño de los ejemplares.

| Experimentos: | 2 | | víscheras | | 3 | | víscheras | |
|------------------------------|----------|--------|-----------|--------|------|--------|-----------|--------|
| | manto | | peso | rad(!) | peso | rad | peso | rad |
| | peso(mg) | rad(!) | peso | rad | peso | rad | peso | rad |
| extracto etéreo | 22 | 218300 | 32 | 665900 | 36 | 274500 | 26 | 755300 |
| esteroles | 4 | 16600 | 7 | 136000 | 10 | 59200 | 7 | 254000 |
| acetatos | 3 | 3800 | 6 | 92400 | 7 | 32700 | 6 | 197500 |
| cholesteryl acet. | 1 | 180 | 2 | 2500 | 3 | 1600 | 2 | 6700 |
| 7-dehydrocholesteryl acetato | 0.5 | 1140 | 1 | 19500 | 1 | 12100 | 3 | 86100 |

(!)= dpm x10 (se midió 1/10 de cada muestra).

Tabla 5.62. Incorporación de ^{14}C -mevalonato en esteroides.

En los experimentos con glicerol marcado se utilizaron 9, 5 y 5 animales respectivamente para los experimentos de 2, 4 y 9 días. Se administraron 50 μCi de $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ glicerol (171 mCi/mmol) en el primer experimento y 12.5 μCi del mismo producto (165 mCi/mmol) en los otros dos. El tratamiento posterior fue como en el caso del mevalonato. Los resultados de estos experimentos se exponen en la Tabla 5.63. Estos experimentos con glicerol fueron realizados para comparar las distintas posibilidades de biosíntesis (podría ser que el animal fuera capaz solamente de unir la parte diterpenoídica con la unidad de glicerol, o bien que el animal sintetizara también la parte diterpenoide).

| Experimentos: | 1 | | 2 | | 3 | |
|---------------------|----------|--------|----------|-------|----------|-------|
| | peso rad | | peso rad | | peso rad | |
| | (mg) | (!) | (mg) | (!) | (mg) | (!) |
| extracto etéreo | 85 | 223600 | 18 | 80000 | 63 | 49800 |
| mezcla verrucosinas | 26 | 48000 | 10 | 16100 | 15 | 3900 |
| Verrucosina-A | 5 | 4400 | 1 | 3500 | 1 | 750 |
| Verrucosina-B | - | - | 1 | 1900 | 1 | 450 |

(!)= dpm x10 (se midió 1/10 de cada muestra).

Tabla 5.63. Incorporación de ^{14}C -glicerol en verrucosinas.

De esta última tabla se obtiene un valor de 1846 dpm/mg para la mezcla de verrucosinas en el experimento de dos días, y valores de 1610 y 260 dpm/mg en los de 4 y 9 días respectivamente. Si exceptuamos el valor del último experimento, que claramente disminuye respecto a los anteriores en ambos experimentos (con mevalonato y con glicerol), los valores obtenidos son comparables a los obtenidos en *Archidoris montereyensis* y *A. odhneri* por Gustafson y Andersen (1985) (que obtuvieron valores de 550, 1810 y 3260 dpm/mg para sus productos), y que se consideraron suficientes para demostrar su origen biosintético. Creemos que en *Doris verrucosa* nuestros datos confirman la biosíntesis *de novo*, si bien como en *Archidoris* la velocidad de síntesis es seguramente lenta.

Una explicación para esta baja velocidad de síntesis podría estar relacionada con el hecho de que las verrucosinas se localizan en el manto, y podrían ser sintetizadas allí por glándulas o células específicas, de manera que al inyectar los precursores en el hepatopáncreas estos tendrían un lento acceso a los lugares de síntesis de las verrucosinas.

Los resultados con los esteroides demuestran que la vía del mevalonato es operativa en *D. verrucosa*, obteniéndose los mayores valores de esteroides marcados tras los 9 días de incorporación, y sobre todo en las vísceras, como se puede observar en la Tabla 5.62.

b) Productos de origen dietético.

Con el objeto de demostrar que la esponja *Hymeniacidon sanguinea* era la presa (o una de las presas) de *Doris verrucosa* se trató de hallar en el opistobranquio el producto (oxima del ácido pirúvico) que fue descrito por Cimino *et al.* (1975c) para dicha esponja (ver Figura 5.26.). Se realizó un primer análisis cualitativo, con un trozo pequeño de la esponja *H. sanguinea* (aproximadamente 1 cm³, Cubelles, 11-I-89). Se extrajo con butanol y se realizaron varias placas en butanol-ácido acético-agua (60-15-25). La muestra en este caso se puso en la placa con metanol (no con éter porque la substancia era muy polar). Se observó claramente (con revelador para fenoles y NaOH) en las placas cromatográficas que estaba presente el producto. Este producto, identificado mediante TLC, se halló también en la glándula digestiva y aparato digestivo de los ejemplares de Cubelles y Nápoles.

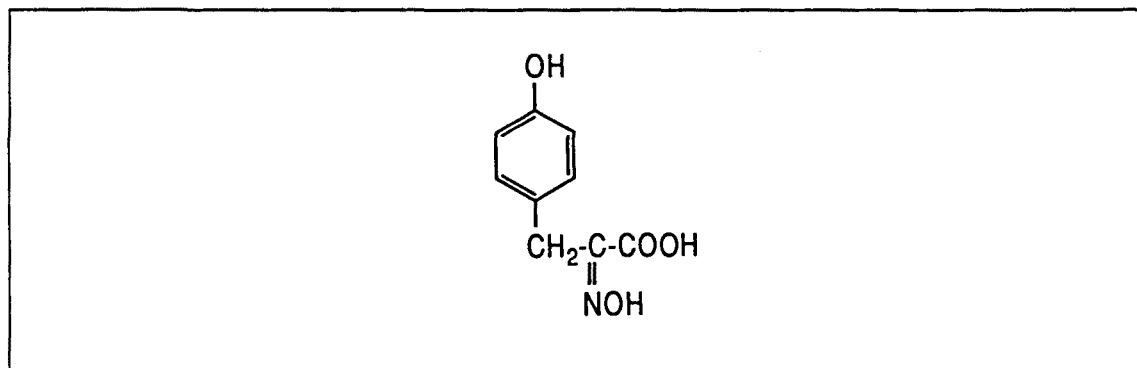


Figura 5.26. Fórmula del compuesto descrito por Cimino *et al.* (1975c) en *Hymeniacidon sanguinea*.

Por otro lado, el estudio de las espículas de la glándula digestiva de 7 ejemplares de Torre Annunziata y de 2 ejemplares de Cubelles, junto con un fragmento de esponja hallado en el bulbo bucal de uno de estos últimos ejemplares, confirmó la presencia de espículas idénticas a las de la esponja *H. sanguinea* (Cubelles, 10-XII-89). Las mismas espículas se hallaron en el tubo

digestivo anterior (donde resultaron ser más abundantes) y en los excrementos de *D. verrucosa*.

Para demostrar que el producto de *H. sanguinea* de Cubelles mencionado anteriormente era el mismo que el descrito por Cimino *et al.* (1975c) era necesario un espectro NMR. Para ello, un fragmento de la esponja *H. sanguinea* de Cubelles (2-II-90) se extrajo con metanol. El peso seco del trozo extraído fue 1.791 g. El producto que interesaba es reactivo con la sílice, por ello se usó una columna en papel (Whatmann CF 11), cargada con agua destilada para compactar el papel. Después se pasó el disolvente: butanol-ácido acético-agua (60-15-25). Se cargó el producto con este mismo solvente y se hizo pasar a presión. Se separaron las siguientes fracciones:

- fr. 1-21: ácidos grasos.
- fr. 22-32: productos UV positivo.
- fr. 33-37: producto rf superior (70) amarillo, positivo con el reactivo para fenoles, UV positivo.
- fr. 38- 45: producto UV positivo (son 2 productos), positivo con el reactivo para fenoles, color rojo claro.
- fr. 46-49: producto UV positivo, color amarillo, rf inferior (35), junto al rojo (mezclados)
- fr. 50-78: producto rojo, UV positivo.

El producto que nos interesaba estaba en las fracciones 50 a 78. Se reunieron estas fracciones y el producto fue metilado y purificado para NMR, resultando ser idéntico en su espectro al descrito por Cimino *et al.* (1975c).

Por otro lado, la esponja recogida en Torre Annunziata (27-X-88) junto a *D. verrucosa* se determinó como *Laxosuberites ferrerhernandezii*. Al parecer las espículas son muy diferentes a las de *H. sanguinea*, por lo que no cabe confusión al asegurar que *D. verrucosa* no se alimenta de *L. ferrerhernandezii*, a pesar de ser una esponja muy abundante en el habitat de *D. verrucosa* en Torre Annunziata, y hallarse siempre cerca. A pesar de no haber hallado *H. sanguinea* en el lugar de captura de *D. verrucosa* en Torre Annunziata, se ha demostrado que se alimenta de ella, si bien esto no excluye la posibilidad de que pueda alimentarse también de otras esponjas en estos u otros lugares.

El estudio químico de *L. ferrerhernandezii* confirma lo dicho con anterioridad. Se extrajo con acetona y del modo habitual un fragmento de

dicha esponja (Torre Annunziata, 27-X-88) capturada con los moluscos. En las placas cromatográficas (en éter de petróleo-éter etílico 1-1, reveladas con Ehrlich-Sulfato de Cerio) se observaron unos esteroides algo distintos de lo normal, no se detectó la presencia de verrucosinas, ni xylosil-MTA. Se observaron varias sustancias amarillas a rf 95, 80, 60, UV positivo sobre los esteroides (rf 50), y otros esteroides a rf 40 que carbonizaban, y otro producto encima de las sustancias fluorescentes a un rf 55. Se hizo comparación con el colesterol para ver si presentaba un patrón esteroideo diferente. Se hicieron dos placas (en éter de petróleo-éter etílico 1-1 una, y en cloroformo la otra). Aparecían los esteroides tipo colesterol, pero eran más abundantes otros esteroides de color amarillo, que eran a primera vista diferentes. Esto no se observaba en ninguno de los extractos de *D. verrucosa*, y por ello parecía evidente que no se alimentaba de ella.

Una vez vistos los análisis anteriores nos pareció interesante realizar un experimento de preferencias con ejemplares de Cubelles (10-VIII-91). Para ello se usó el acuario en forma de Y, colocando dos esponjas distintas en los brazos y al molusco en el otro extremo del acuario, según se ha expuesto en el apartado correspondiente de metodología. Los resultados se exponen en la Tabla 5.64.

| Elección | n | <i>H. sanguinea</i> | otras especies |
|---|----|---------------------|----------------|
| <i>H. sanguinea</i> / <i>Dysidea avara</i> | 3 | 2 | 1 |
| <i>H. sanguinea</i> / <i>Chondrosia reniformis</i> | 10 | 9 | 1 |
| <i>Spongia officinalis</i> / <i>H. sanguinea</i> | 2 | 2 | 1 |
| Totales | 15 | 12 | 3 |
| n= número de intentos. | | | |

Tabla 5.64. Resultados de los experimentos en el acuario en forma de Y. Se han eliminado 4 intentos que fueron nulos (21% del total de 19 intentos).

Aplicando una X^2 a estos valores se obtiene que son significativos, de modo que *D. verrucosa* se dirige preferentemente hacia *H. sanguinea* respecto al resto de esponjas utilizadas en el experimento ($X^2=5.4$, $p= 0.05$).

Función.

Las verrucosinas tienen una gran actividad ictiotóxica para *G. affinis*, según fue descrito por Cimino *et al.* (1988c), a 1.0 y 0.1 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente la A y la B.

Otras funciones de las verrucosinas ajenas a esto (también descritas para las umbraculuminas de *Umbraculum mediterraneum*) son las siguientes: 1) actúan como promotores de tumores, activando la proteína-kinasa C (especialmente la verrucosina B); 2) se ligan a los receptores de los ésteres del forbol, al igual que los promotores de tumores del tipo TPA, de los que la proteína kinasa C es un receptor; 3) inducen la adhesión del HL-60. Por todo ello se puede afirmar que inducen similares efectos sobre las células a los promotores de tumores del tipo TPA. Esta información se debe a H. Fujiki (com. pers.) del National Cancer Center Research Institute (Japón). En el apartado de la discusión general correspondiente a este tipo de moléculas y sus efectos haremos de nuevo referencia a esto.

La xylosil-MTA en cambio no tiene actividad ictiotóxica (Porcelli *et al.*, 1989) y se supuso que era un metabolito de acumulación, sin una función clara. Sin embargo, y debido a su localización casi exclusiva en la glándula hermafrodita y en la puesta de *D. verrucosa*, parece muy probable que esté relacionada con algún mecanismo ligado a la reproducción. Al hallarse en las puestas podría tener también alguna función protectora de las mismas.

Una observación a destacar es que los ejemplares de *D. verrucosa*, tanto en el mar como en acuario, suelen hallarse siempre agrupados en un número entre 3 y 5. Aunque no hemos podido estudiar este fenómeno en profundidad, la posibilidad de que alguna de las sustancias descritas actúe

como feromona de agregación, o esté relacionada con la madurez sexual, no debería ser descartada.

Con el objeto de averiguar la función y para intentar probar los efectos de la xylosil-MTA y de las verrucosinas en el mismo ambiente en el que se halla el molusco, se han realizado una serie de experimentos, algunos de ellos de diseño todavía preliminar, que se expondrán seguidamente.

Se realizó un test con huevos de erizo (*Paracentrotus lividus*), especie que suele hallarse en el mismo hábitat que el nudibranquio, cuyos resultados se exponen en la gráfica de la Figura 5.27. De ellos se deduce que las verrucosinas tienen un fuerte efecto que actúa ya en las fases iniciales del desarrollo, impidiendo la formación de las pre-gástrulas. Esto podría ser causado por la toxicidad de las verrucosinas, por lo que es necesario realizar este test a menor concentración para diferenciar el tipo de efecto. En cuanto a la xylosil-MTA, su efecto es menor, si bien las larvas pluteus no llegan a formarse más que en un caso, que seguramente puede considerarse como no significativo ya que es de una sola réplica de las cuatro realizadas (dando una media de 5.3 y un error de 9.2). Creemos por tanto que la xylosil-MTA tiene un efecto en la fase de formación de la larva pluteus.

En cuanto a los experimentos de depredación, se han realizado diversos tipos. El cangrejo *Dardanus arrosor* fue capaz de comer ejemplares de *D. verrucosa* recién muertas (se realizaron 5 réplicas con cangrejos hambrientos), tanto si caían desde la superficie como si estaban paradas en el fondo. En todos los casos fueron devoradas enteras y rápidamente. Igualmente fue rápidamente devorada una puesta en buen estado. De esto se deduce que ni las verrucosinas ni la xylosil-MTA tienen efectos aparentes para su depredación por *D. arrosor* (que al cabo de 24 horas seguían en perfecto estado).

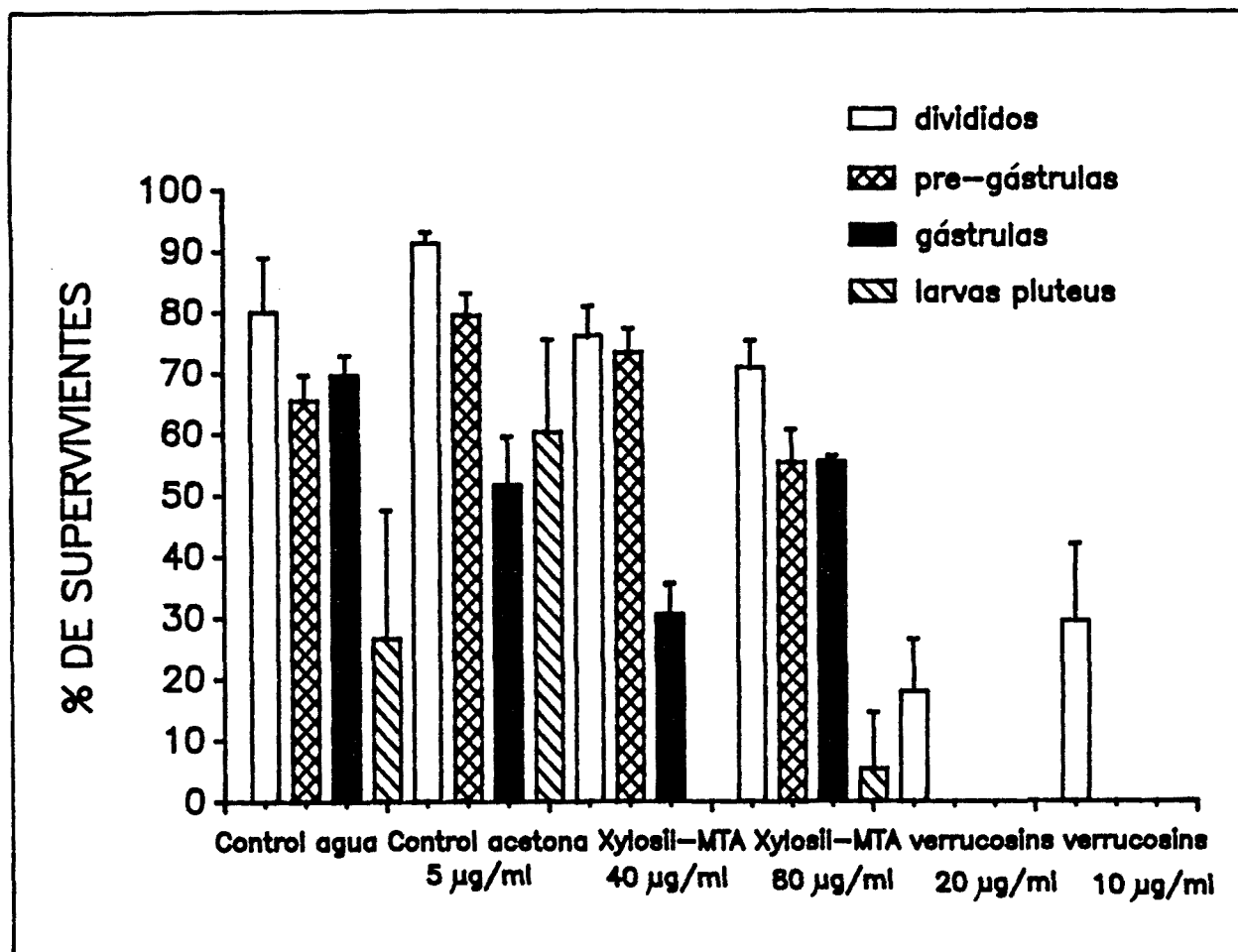


Figura 5.27. Efecto de los metabolitos de *Doris verrucosa* en el desarrollo de los embriones del erizo *P. lividus*.

El opistobranquio *Pleurobranchaea meckeli* también fue capaz de comerse un ejemplar de *D. verrucosa* recién muerta, sin embargo en este caso la depredación fue selectiva ya que se comió las vísceras y parte del pie pero dejó el manto (donde se hallan las verrucosinas). Es curioso destacar que que *P. meckeli* se introduce en el bulbo bucal presas como *Akera bullata*, que engulle rápidamente enteras, y sin embargo, distinguió *D. verrucosa* de manera que en ningún momento se la introdujo completamente en la boca, sino que eligió las partes que comía y las que no. Los experimentos con *Aglaja tricolorata* fueron negativos, ya que esta especie rechazó los trozos de calamar tratados con xylosil-MTA y verrucosinas (ver el apartado de

metodología correspondiente). Esto no fue significativo puesto que rechazó también los trozos de calamar sin extractos y con acetona solo.

La anémona *Aiptasia mutabilis* fue utilizada en otro experimento de predación, y los resultados se incluyen en la Tabla 5.65. Los trozos de calamar le fueron ofrecidos al azar; la respuesta positiva o negativa fue considerada según lo expuesto en el apartado de metodología.

| | Réplica 1 | Réplica 2 |
|----------------------|-----------|-----------|
| Calamar sin nada | + | - |
| con acetona | - | - |
| con xylosil-MTA* | - | + |
| con verrucosinas** | + | - |
| *= 80 µg; **= 40 µg. | | |

Tabla 5.65. Resultados de los experimentos con *A. mutabilis*.

A la vista de estos resultados, el experimento no es significativo.

Se realizó otro experimento con cuerdas en el mar con trozos de calamar con verrucosinas y xylosil-MTA inyectadas, y trozos control (ver la metodología en el apartado correspondiente). Los resultados se exponen en la Tabla 5.66.

| | Número de mordiscos por réplica (4) | | | |
|----------------------|-------------------------------------|---|---|---|
| calamar sin nada | 0 | 0 | 0 | 1 |
| con acetona | 2 | 0 | 0 | 2 |
| con xylosil-MTA* | 0 | 1 | 0 | 0 |
| con verrucosinas** | 1 | 0 | 0 | 0 |
| *= 80 µg; **= 40 µg. | | | | |

Tabla 5.66. Resultados del experimento de cuerdas con calamar.

Se deduce de estos resultados que los peces no estaban excesivamente hambrientos, o bien que el calamar no es su presa favorita. Creemos que las diferencias entre los tratamientos no son significativas.

Tras este experimento, se realizó otro parecido pero con gusanos en vez de calamar, y para ello se usó el poliqueto *Marphysa sanguinea*. Los resultados se encuentran expuestos en la Tabla 5.67.

| | Réplicas | 1 | 2 | 3 | 4 |
|--|----------|---|---|---|---|
| gusano sin nada | | - | + | + | - |
| con acetona | | - | + | + | - |
| con xylosil-MTA* | | + | - | + | + |
| con verrucosinas** | | + | - | - | - |
| *= 80ug; **= 40 ug; -= no comido; += comido. | | | | | |

Tabla 5.67. Resultados del experimento de cuerdas con *Marphysa sanguinea*.

De estos resultados parece deducirse que las verrucosinas tienen un ligero efecto negativo en la depredación del poliqueto por parte de los peces.

5.12.3.3. Resumen conclusivo.

Doris verrucosa presenta, en poblaciones de distintos lugares, los mismos metabolitos: verrucosinas y xylosil-MTA. Las verrucosinas, localizadas en el manto, son potentes agentes ictiotóxicos que además actúan en el mismo ecosistema contra algunos organismos (embriones de erizos, peces, otros opistobranquios), pero no contra otros (*D. arrosor*). La xylosil-MTA se localiza en glándula hermafrodita y puesta, y aunque su función no está clara, podría estar implicada en la fisiología de la reproducción y/o desarrollo de la puesta, así como en la protección de las puestas.

Existe además otro producto, oxima del ácido pirúvico, que establece, junto al análisis de las espículas del aparato digestivo, una relación de depredación con la esponja *Hymeniacidon sanguinea*.

El molusco es capaz de biosintetizar *de novo* la xylosil-MTA y, seguramente, también las verrucosinas, aunque los experimentos de biosíntesis en este último caso son poco conclusivos. De hecho, utilizando el ácido mevalónico como precursor, las verrucosinas se recuperan con una baja radiactividad específica, si bien la síntesis mevalónica es activa (como demuestra la buena incorporación en los esteroides).