

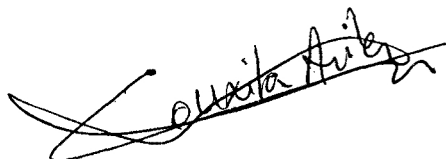
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL  
FACULTAD DE BIOLOGIA  
UNIVERSIDAD DE BARCELONA

**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.**

## 5.13. *Peltodoris atromaculata* Bergh, 1880.

### 5.13.1. Introducción.

#### 5.13.1.1. Referencias bibliográficas generales en el área de estudio. Sinonimias.

Esta especie ha sido comúnmente citada como *Peltodoris atromaculata*, aunque algunos autores últimamente prefieren incluirla en el género *Discodoris*. Debido a la ausencia de uncinos en la armadura, consideramos que esta especie debe continuar separada del género *Discodoris*, ya que su inclusión en él podría ocasionar gran confusión.

*Peltodoris atromaculata*.- Bergh (1880); Pruvot-Fol (1951, 1954); Changeux y Delamare (1955); Sordi y Majidi (1957); Wirz-Mangold y Wyss (1958); Haefelfinger (1960, 1961); Vicente (1964, 1967); Schmekel (1968b); Fournier (1969); Barash y Danin (1971); Ros (1975, 1978a, 1981, 1985); Ros y Altimira (1977); Castiello *et al.* (1978); Cimino *et al.*, (1980); Perrone (1980, 1982, 1992); Pereira (1980); Ballesteros (1980, 1981); Altimira *et al.* (1981); Templado (1982); Schmekel y Portmann (1982); García (1983); Huelín y Ros (1984); Thompson (1985); Ramos (1985); Ros y Gili (1985); Ballesteros *et al.* (1986a y b); Luque (1986); Dekker (1986); Marín y Ros (1987).

*Discodoris atromaculata*.- Cervera *et al.* (1988); Cattaneo *et al.* (1990, 1992).

#### 5.13.1.2. Breve descripción y características de la especie.

Las características de esta especie están ampliamente descritas, al tratarse de uno de los Doridáceos mediterráneos más conocidos. El hecho de que presente manchas, más o menos circulares, de color pardo oscuro en el dorso blanco le da un aspecto inconfundible. Ventralmente tanto el manto como el pie son blancos. Los rinóforos son blancos, con 20-25 láminas, y las branquias, tripinnadas, tienen el raquis marrón y las hojas branquiales blancas. Presenta pequeñas protuberancias por todo el manto, que además es

espiculoso. Los tentáculos orales son digitiformes. Los dientes radulares son lisos y curvados.

### 5.13.1.3. Referencias comentadas.

#### Morfológicas o descriptivas.

De entre los muchos trabajos sobre esta especie, cabe destacar aquí el de Thompson (1985). Este autor describió la variabilidad en el modelo de manchas dorsales, de modo que los ejemplares del Mediterráneo Oriental (Egeo) son más oscuros (es decir, con una mayor superficie manchada), que los ejemplares del Mediterráneo Occidental (Tirreno). En 1961, Haefelfinger publicó un trabajo en el que describía las espículas del manto, el epitelio y el desarrollo de las manchas dorsales de esta especie. Perrone (1992) señaló algunos aspectos morfológicos anómalos y de la autotomía que comentaremos más adelante.

Por otro lado, Fournier (1969) realizó un estudio detallado del aparato digestivo de *P. atromaculata*.

#### Ecológicas.

Haefelfinger (1961) fue el primero en realizar un estudio ecológico y sobre algunos aspectos de la reproducción de *P. atromaculata*. Es de todos conocida la relación depredador-presa entre esta especie y la esponja *Petrosia ficiformis*. Posiblemente la primera referencia a esta relación sea la de Haefelfinger (1961). Ros (1978a) cita *P. atromaculata* en biocenosis de sustratos duros de la zona infralitoral profunda, en la zona circalitoral y en cuevas oscuras. Como régimen alimenticio lo inscribe en la categoría de zoófago: micrófago (ramoneador, suctor): de esponjas, citando la esponja presa *P. ficiformis*, que ya hemos mencionado. Todas las demás referencias a la alimentación de esta especie indican que se nutre de la esponja *P. ficiformis*, a excepción de Cattaneo *et al.* (1992) que citan *Reniera fulva* como presa de un ejemplar de Portofino (Italia).

Ros (1973) cita fenómenos de autotomía de trozos del manto en *Peltodoris atromaculata*, e indica que presentan una generación anual y que las secreciones del manto tienen carácter repulsivo.

En cuanto a su distribución, la mayoría de las citas se han hecho en el Mediterráneo. Ros (1975, 1976a y b) lo menciona también en el Cantábrico.

### Químicas.

En cuanto al análisis químico, es necesario citar los trabajos de Castiello *et al.* (1978, 1980) y Cimino *et al.* (1980b y 1982), aunque la mayor parte del trabajo químico se realizó con la esponja *P. ficiformis* (Cimino *et al.*, 1981a, 1985a, 1989a). Castiello *et al.* (1978, 1980) detectaron la presencia en el molusco de ciertos compuestos poliacetilénicos de elevado peso molecular (los mayores hallados en la naturaleza hasta entonces para este tipo de compuestos), y petrosterol, ambos procedentes de la dieta (*P. ficiformis*). Los compuestos acetilénicos de dicha esponja son variados y han sido estudiados en sucesivos trabajos (Cimino *et al.* 1980b, 1981a, 1985a y 1989a), mostrándose que hay algunas diferencias entre los obtenidos de *P. ficiformis* roja y blanca (de cuevas oscuras). En el nudibranquio estos compuestos se hallaban en la glándula digestiva (Castiello *et al.*, 1978, 1980), pero no en el manto (Cimino *et al.*, 1982), donde sólo se halló un fenilacetaldehído. Castiello *et al.* (1980) describieron dos series de compuestos acetilénicos, de los menos polares, en *P. ficiformis* y en las vísceras de *P. atromaculata*. De entre ellos, los compuestos menos abundantes descritos en *P. ficiformis* no han sido estudiados en *P. atromaculata*. Posteriores estudios químicos (Cimino *et al.* 1989a) identificaron y caracterizaron en la esponja las dos series de poliacetilenos como las petroformynas-1 a -4, y más tarde Cimino *et al.* (1990) describieron las petroformynas-5 a -7 y petroformynas-A y -B.

### 5.13.2. Material estudiado.

Se resumen los datos del material en la Tabla 5.68.

LOCALIDAD	FECHA	(1)	(2)	(3)
Blanes	13-9-89	2	-12m	quím
St. Feliu G.	3-10-89	5	-20m	quím+rád
Palamos	Febr.-90	8	-20m	quím
Massa Lubrense	1-4-90	2	-12m	rád+quím
Taormina	6-4-90	8	-20m	exp+quím
Tossa	7-11-90	15	-8m	exp
Blanes	29-5-91	14	-12m	exp+m
<b>TOTAL</b>		<b>54</b>		
(1)= Número de individuos. (2)= Profundidad. (3)= Utilización del material (rád= rádula, quím= química, exp= experimentos, m= microscopía).				

Tabla 5.68. Datos de los ejemplares capturados.

Junto a los ejemplares de Blanes (13-9-89) se recogió una puesta. Los ejemplares fueron siempre capturados sobre *Petrosia ficiformis*. Los dos ejemplares de Massa Lubrense se capturaron en una gruta sobre la variedad blanca de la esponja.

### 5.13.3. Resultados y discusión.

#### 5.13.3.1. Datos morfológicos de los ejemplares capturados.

##### Esquemas anatómicos.

Los ejemplares de Massa Lubrense midieron 1.8 y 5 cm respectivamente; los ejemplares de St. Feliu de Guixols midieron: 2 cm el menor y el resto entre 4 y 6 cm. Otros datos sobre el tamaño de los ejemplares se detallan en el apartado de desarrollo y crecimiento. En la Figura 5.28. se

puede observar la morfología externa típica de esta especie, con la que se identificaban todos nuestros ejemplares.

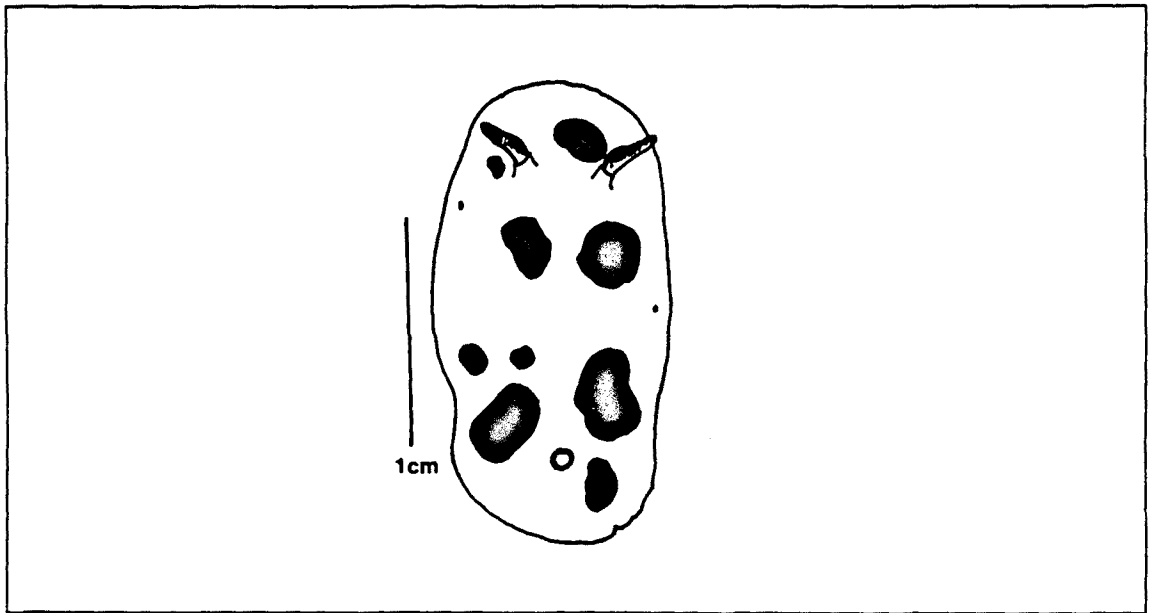


Figura 5.28. Esquema de la morfología externa de un ejemplar juvenil de *P. atromaculata* de Blanes.

En el apartado dedicado al desarrollo y crecimiento se detallarán algunos datos obtenidos sobre crecimiento de las manchas con respecto al crecimiento del cuerpo. Según Haefelfinger (1961), las manchas del manto varían de tamaño en un mismo animal, y se modifican a lo largo de la vida del individuo. Tras observar ejemplares en acuario durante más de un año, se ha observado que las manchas varían ligeramente según si el animal está completamente extendido o en otra posición más contraída (las medidas de las manchas se han tomado en ejemplares extendidos). Como ya indicó Haefelfinger (*op. cit.*), se ha podido observar que las manchas sufren procesos de desintegración al crecer el animal, si bien pueden identificarse fácilmente. Además al crecer aparecen nuevas manchas pequeñas, sobre todo en la parte más externa del manto. Como se expone posteriormente (ver apartado de desarrollo y crecimiento), el área ocupada por las manchas es cuantificable, y por lo tanto la variabilidad geográfica observada por Thompson (1985) (ver Figura 5.29) es medible.

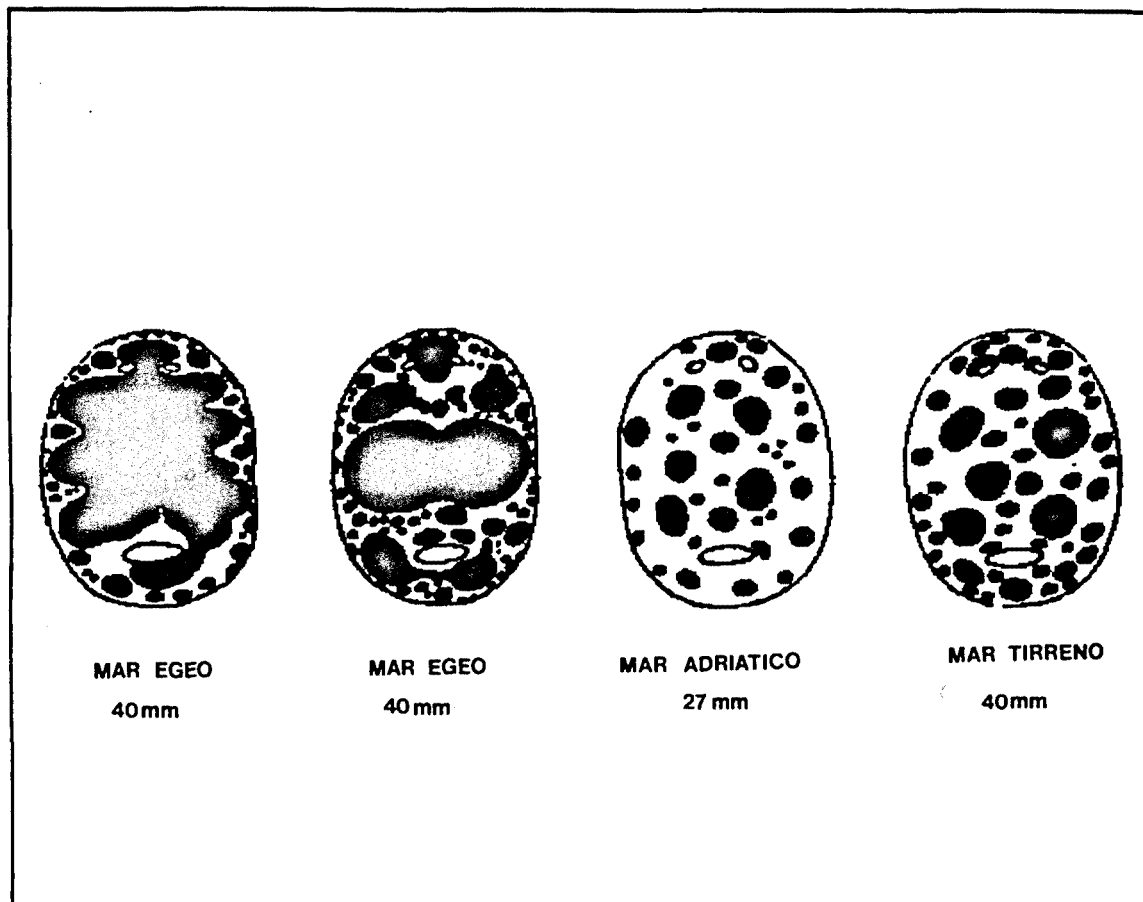


Figura 5.29. Modelos cromáticos de ejemplares de *P. atromaculata* de distintas zonas del Mediterráneo (Thompson, 1985).

### Características del manto.

Si bien Haefelfinger (1961) ya describió brevemente el epitelio del manto de *P. atromaculata*, hemos considerado de interés estudiar su ultraestructura al microscopio electrónico. La fotografía 124 y el esquema adjunto interpretándola, corresponde a un corte semifino observado al microscopio óptico. Se pueden observar los distintos tipos de células esquematizados por Haefelfinger (1961). Las células ciliadas son más abundantes en las pequeñas protuberancias del manto que en el resto del epitelio. Las espículas no sobresalen del epitelio, y se observan vesículas

mucosas (correspondientes a los "cuerpos glandulares" de Haefelfinger), con gránulos en distintas fases de compactación. Sus características ultraestructurales se pueden ver en las fotografías 125 a 127.

Un estudio sobre las espículas del manto de esta especie fue realizado recientemente por Cattaneo *et al.* (1992).

### Rádula y armadura labial.

Las fórmulas radulares de los ejemplares estudiados resultaron ser las que se exponen en la Tabla 5.69.

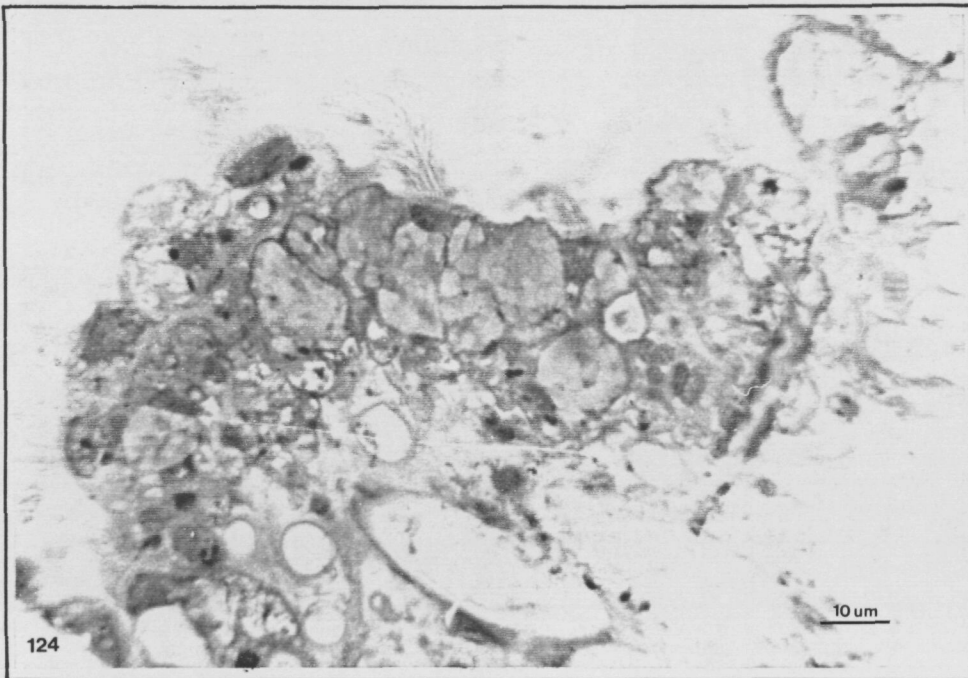
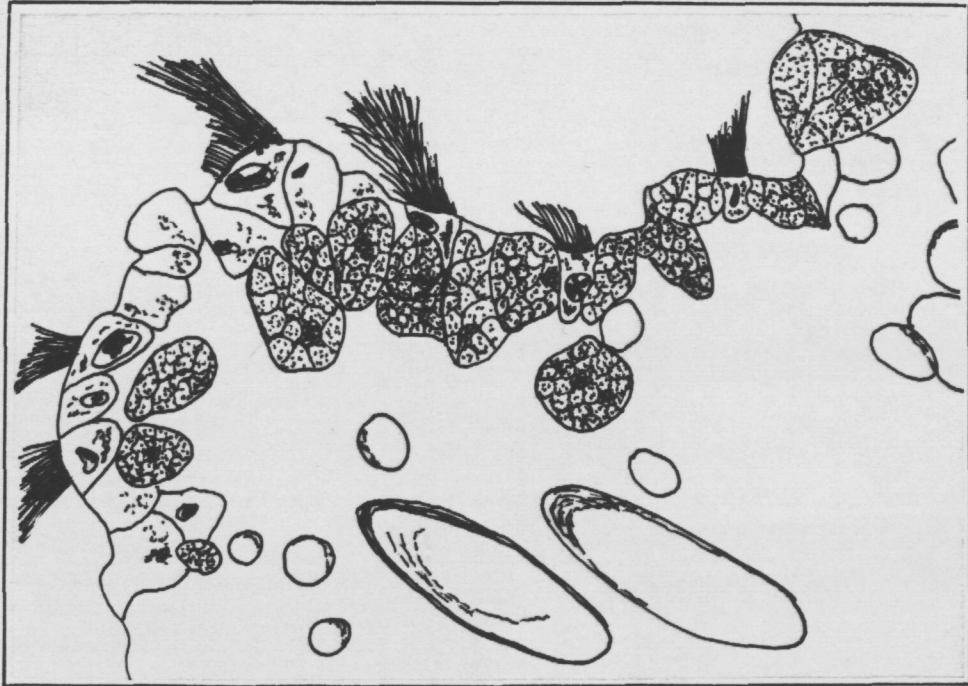
LOCALIDAD	(1)	(2)	REFERENCIA
St. Feliu de G.	21	33-0-33	esta
Massa Lubrense	17	31-0-31	esta
	14	30-0-30	esta
Nápoles(?)	20	56-0-56	Pruvot-Fol (1954)
Nápoles	18	52-0-52	Schmekel y Portmann
	16	38-0-38	(1982)
Mediterráneo	14-20	(35-50)-0-(35-50)	Cattaneo <i>et al.</i> (1990)

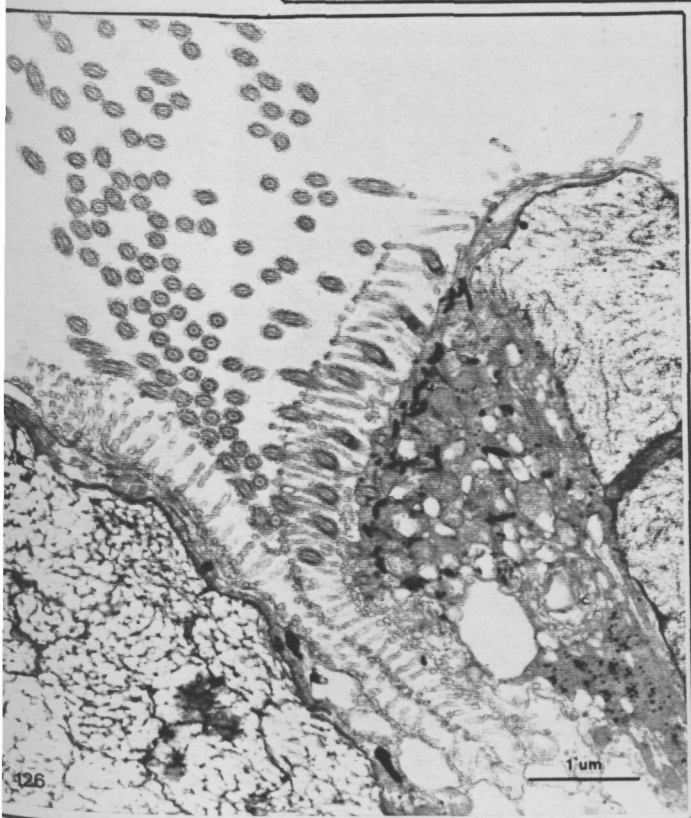
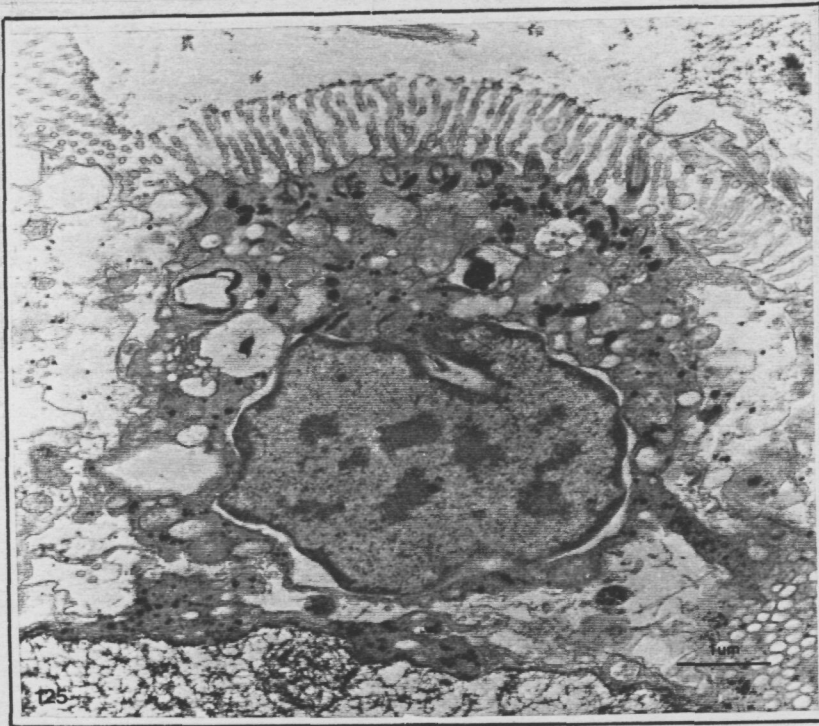
(1)= Número de filas.  
(2)= Número de dientes por fila.

Tabla 5.69. Fórmulas radulares de algunos ejemplares de *P. atromaculata*.

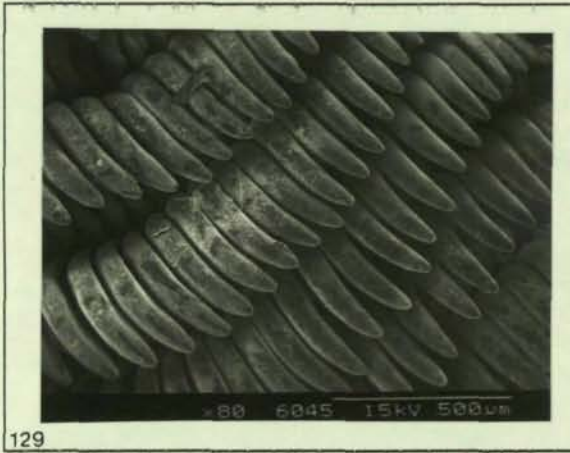
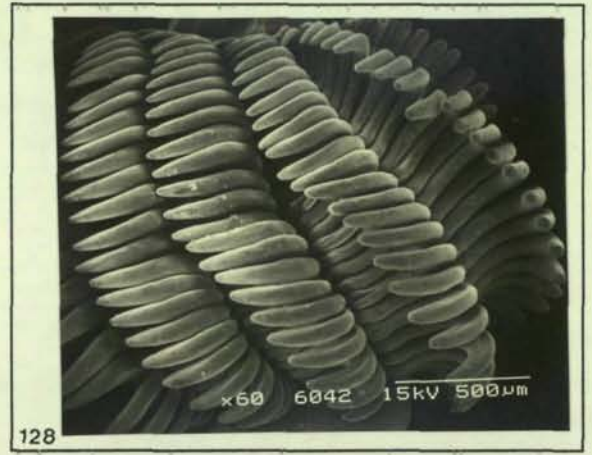
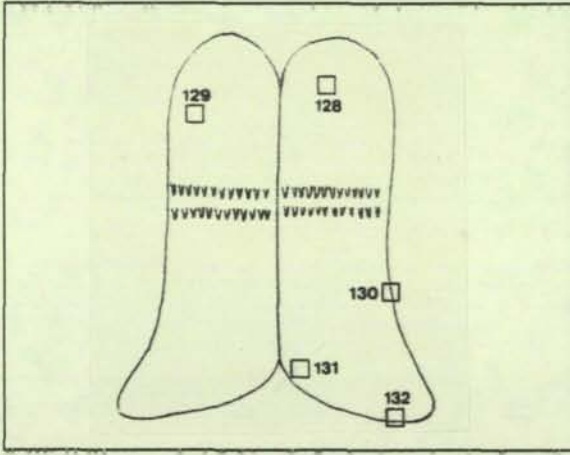
Nuestros valores radulares corresponderían a los descritos por otros autores en los ejemplares de menor tamaño, debido a que no se contaron las rádulas de los ejemplares más grandes. No se observaron diferencias entre los dientes de la rádula de ejemplares de distintas localidades. En las fotografías 128 a 132 se puede ver un fotomontaje realizado con las distintas rádulas, en el que se aprecia la morfología de los dientes en cada zona de la rádula según el esquema adjunto. Se puede observar que los dientes son lisos y su curvatura varía de forma gradual.







*Peltodoris atromaculata*



### Desarrollo y crecimiento. Ciclo de vida en acuario.

Según Schmekel y Portmann (1982) la puesta es una espiral en la que los huevos miden 180  $\mu\text{m}$  de diámetro. En los ejemplares aquí estudiados, es una cinta de entre 2 y 6 vueltas completas, estrecha y blanquecina (blanco-crema), frágil y muy mucosa. Los nudibranchios hacían la puesta sobre el cristal de las paredes del acuario o bien sobre la esponja *P. ficiformis*.

Se han obtenido en acuario numerosas puestas, de las cuales se ha tratado de cultivar más de 20 para la obtención de larvas. Algunas de estas puestas se pesaron, obteniéndose unos valores de 1.711, 1.331, 0.850 y 0.242 g de peso húmedo. Los cultivos dieron en todos los casos resultados negativos, a pesar de realizarse con distintos tratamientos, con agua filtrada sin tratamiento, e incluso con fragmentos de *P. ficiformis*.

Como dato de interés cabe destacar que al extraer del acuario algunas de las puestas se apreció un fuerte olor (el mismo que puede detectarse en la secreción mucosa del animal). Este hecho fue comprobado posteriormente con otras puestas.

En cuanto a las puestas, es necesario comentar que eran hechas por diversos ejemplares, a lo largo de varios días (3 ó 4), tras los cuales no se efectuaban nuevas puestas hasta al cabo de unas dos o tres semanas. Esto sucedió en acuario desde febrero hasta mayo. Ocasionalmente se obtuvieron puestas en julio y agosto.

En la Figura 5.30. se expone el crecimiento de 15 ejemplares juveniles (capturados el 7-XI-90) durante unos 6 meses. En este experimento se midió el área total del cuerpo, como medida del crecimiento, y el área de las manchas, que como se observa en las gráficas, se mantiene bajo el nivel del 50% del área total, siendo un crecimiento proporcional. La gráfica superior incluye los datos de los 15 ejemplares, mientras que la central contiene los datos del ejemplar que vivió durante más tiempo. En ambas gráficas los valores iniciales sobre el área de las manchas estaban por debajo de la sensibilidad de los aparatos de medición, y por ello aparecen como ceros (el

área total de los ejemplares era de unos 3 mm<sup>2</sup>). En la gráfica inferior se expone la regresión lineal entre ambas medidas, cuya fórmula es:

$$\text{área de las manchas} = -1.57 + \text{área total} \times 0.63, (r^2 = 0.87).$$

Estas medidas pueden aplicarse para valorar la variabilidad en el modelo cromático descrita por Thompson (1985) y que hemos comentado anteriormente (ver Figura 29).

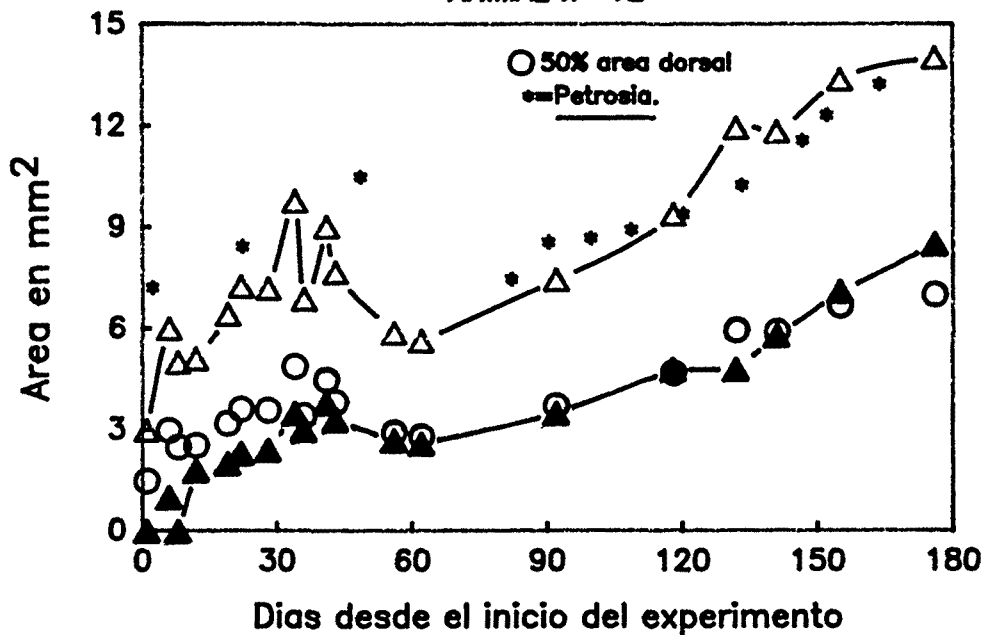
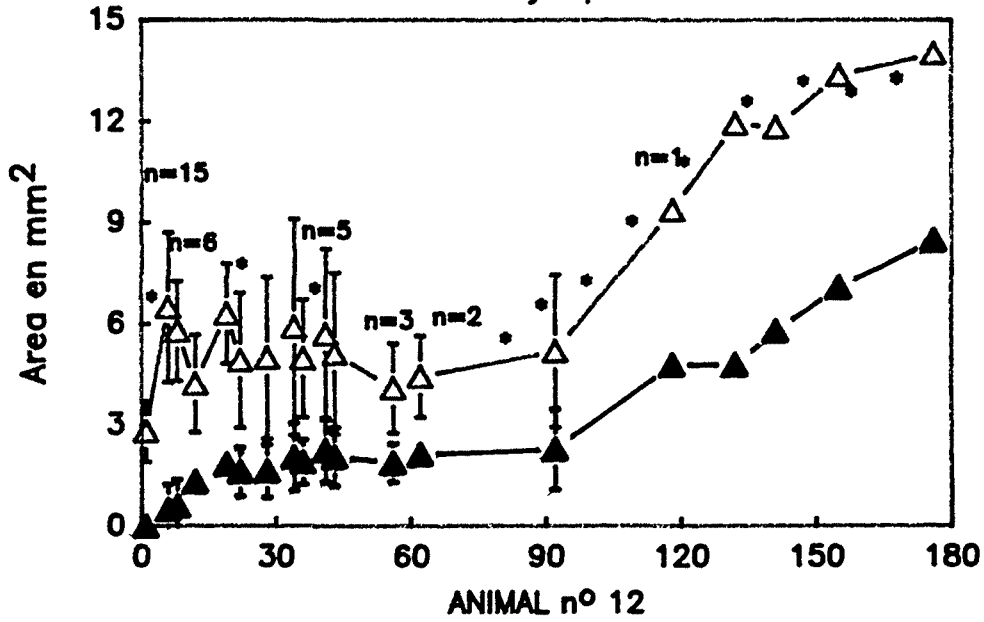
Estos ejemplares crecieron relativamente poco si los comparamos con los del segundo experimento (Figura 5.31.) (capturados el 29-V-91), en los que, midiendo el área total durante más de un año, se observa un fuerte crecimiento y un posterior descenso antes de su muerte. La gráfica se divide en tres partes, según el tamaño inicial de los ejemplares, siendo los mayores los de la gráfica superior y los menores los de la inferior. Puede observarse como los ejemplares más pequeños crecieron mucho más deprisa que el resto. En todos los casos el tamaño máximo se alcanza en los meses de marzo y abril, época que coincide con la reproducción, y posteriormente disminuyen de tamaño.

Se han descrito modelos de crecimiento similares para *Onchidoris bilamellata* (Todd, 1979, 1981), y *Doriopsilla pharpa* (Eyster y Stancyk, 1981; Eyster, 1981), midiendo longitud o peso (no área), tanto en laboratorio como en el medio natural. Las gráficas aquí expuestas son similares a las propuestas por Thompson (1966). Havenhad y Todd (1988) realizaron experimentos parecidos con *Adalaria proxima* y *Onchidoris muricata*; otros ejemplos de los diversos tipos de crecimiento en opisthobranchios se exponen en dicho trabajo.

Al final del ciclo de vida de nuestros ejemplares se produjo la autotomía como un fenómeno claramente irreversible (ver fotografías 133 y 134). La única excepción fue un ejemplar que presentó una tumoración a nivel del aparato reproductor (que alcanzó hasta 8 mm de diámetro), con la que sobrevivió algunas semanas, pero finalmente murió sin autotomizarse.

# Peltodoris atromaculata (juveniles)

Media de 15 ejemplares



△—△ Area total del cuerpo    ▲—▲ Area total de las manchas

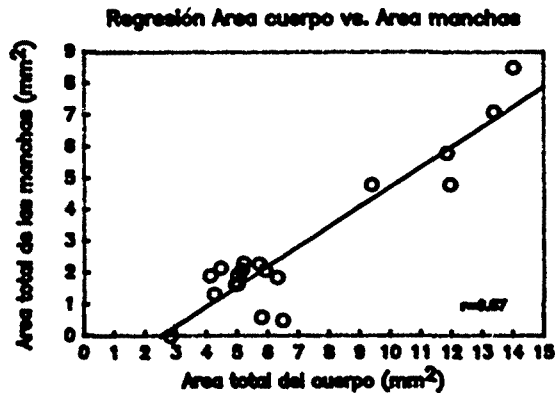


Figura 5.30. Resultados del primer experimento con juveniles de *P. atromaculata*.

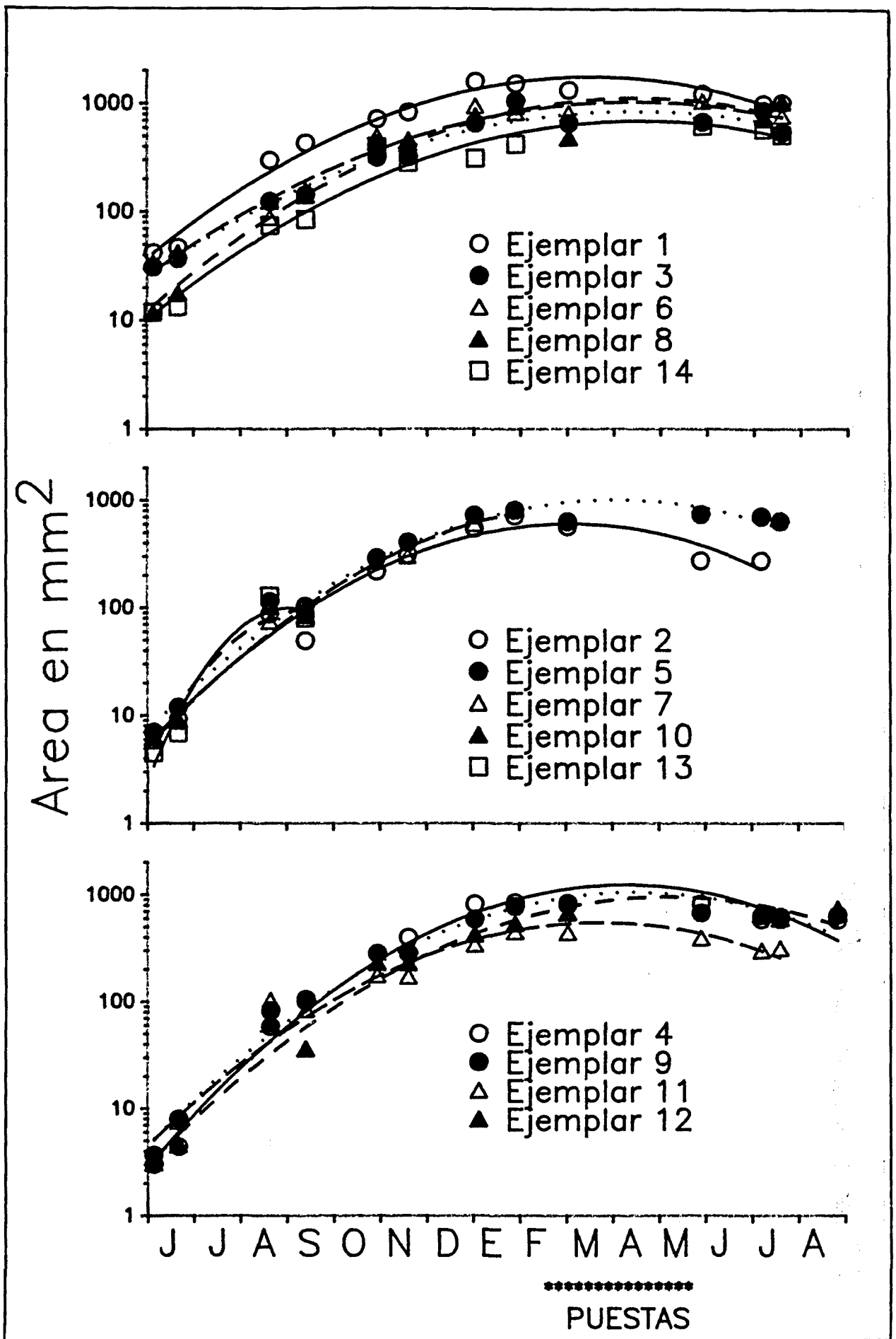


Figura 5.31. Resultados del segundo experimento con juveniles de *P. atromaculata*.

133



134



### 5.13.3.2. Análisis químico.

#### Productos obtenidos: Estructura.

Ejemplares del litoral catalán. Se extrajeron 2 animales de Blanes, un fragmento (1/3) de puesta y un fragmento de *P. ficiformis* (recogida en el mismo día y lugar), y un ejemplar (con un fragmento de la esponja) de St. Feliu. Los resultados de la disección y posterior análisis químico se encuentran detallados en la Tabla 5.70.

	extracto acetónico	peso seco
<b>2 ejemplares de Blanes:</b>		
manto y pie	461 mg	3.111 g
glándula digestiva	55 mg	158 mg
resto de vísceras	32 mg	230 mg
fragmento de la puesta	3 mg	56 mg
<b>1 ejemplar de St. Feliu:</b>		
manto y pie	339 mg*	1.173 g
glándula digestiva	39 mg	226 mg
resto vísceras (sin reproductor)	8 mg	75 mg
aparato reproductor	11 mg	98 mg
mucus (7 animales)	105 mg	22 mg
<i>P. ficiformis</i> Blanes	9 mg	858 mg
<i>P. ficiformis</i> St. Feliu	5 mg	483 mg
<b>4 ejemplares de St. Feliu:</b>		
manto y pie	70 mg	685 mg**
glándula digestiva	52 mg	147 mg
resto de vísceras	20 mg	104 mg
fragmento puesta	1 mg	17 mg
* = 6 mg de extracto etéreo.		
** = peso aumentado por la presencia de arena utilizada en la extracción.		

Tabla 5.70. Análisis químico de los ejemplares de Blanes y St. Feliu.

En las placas cromatográficas sobre placa en éter de petróleo-éter etílico 1:1 aparecieron los poliacetilenos de la esponja (que era igual en ambos

sitios). Los compuestos poliacetilénicos se detectaron sobre y bajo los esteroides en los extractos de glándula digestiva del molusco. En el resto de vísceras no se detectaron productos de interés, y los fragmentos de puesta eran demasiado pequeños para ver los metabolitos presentes. Aparentemente, en la glándula digestiva del molusco se acumularían los poliacetilenos con preferencia entre los demás productos de la esponja (por ejemplo, los ácidos grasos no se acumulan). Se pretendía separar mediante una columna los productos de la glándula digestiva y separar las distintas fracciones para hacer el correspondiente estudio NMR. Para ello se extrajeron posteriormente los 4 ejemplares restantes de *St. Feliu*, disecándolos del modo habitual y obteniéndose los resultados expuestos en la Tabla 5.71. El ejemplar de menor tamaño fue analizado entero. La extracción se realizó con la ayuda de arena y ultrasonidos. A juzgar por las placas cromatográficas, el fragmento de puesta parecía estar algo sucio, y el extracto del manto parecía presentar pocos productos interesantes.

Separación de los productos de la glándula digestiva. Se unieron los extractos de los 7 animales, y se hizo una columna cromatográfica con los aproximadamente 146 mg. El disolvente empleado fue éter de petróleo-éter etílico 98-2 (fracc. 1 a 17), y después 9-1. La columna fue cargada con metanol. Unimos las fracciones 1 a 17 y le llamamos fracción 1. En resumen se obtuvieron las fracciones siguientes:

Fracc. 11-32: 3 mg compuesto no identificado.

Fracc. 33-40: <1 mg.

Fracc. 41-50: 3 mg.

Fracc. 51-68: 12 mg esteroides (inversión en la columna debido a la sílice).

Fracc. 69-94: 6 mg poliacetilenos (UV+, sulfato de Cerio +).

Fracc. 95-124: 3 mg sustancia no identificada.

Fracc. 151-171: 9 mg poliacetilenos (UV+, Sulfato +).

Los cambios de disolvente fueron: fr. 30: 8-2, fr. 121: 6-4, fr. 157: 1-1. Las muestras así obtenidas fueron estudiadas al NMR con cloroformo deuterado. Se estudiaron todas las fracciones señaladas, excepto los esteroides. Los espectros obtenidos fueron comparados con los de la esponja, descritos por Cimino *et al.* (1989d). El resultado de la comparación es que:

Fracc. 11-32: podrían ser las cetonas de *P. ficiformis* aunque es difícil asegurarlo porque era poco producto.

Fracc. 69-94: mezcla de los compuestos petroformyne-3 y -4 (son los poliacetilenos de rf superior), siendo la petroformyne-3 mucho más abundante que la petroformyne-4.

Fracc. 95-124: mezcla de los mismos, pero aquí la petroformyne-3 era solo un poco más abundante que la petroformyne-4.

Fracc. 151-171: son las petroformyne-1 y -2. La segunda era más abundante, en una relación aproximada de 2:1, (son los poliacetilenos de rf inferior).

Las fórmulas de estos cuatro compuestos se detallan en la Figura 5.32.

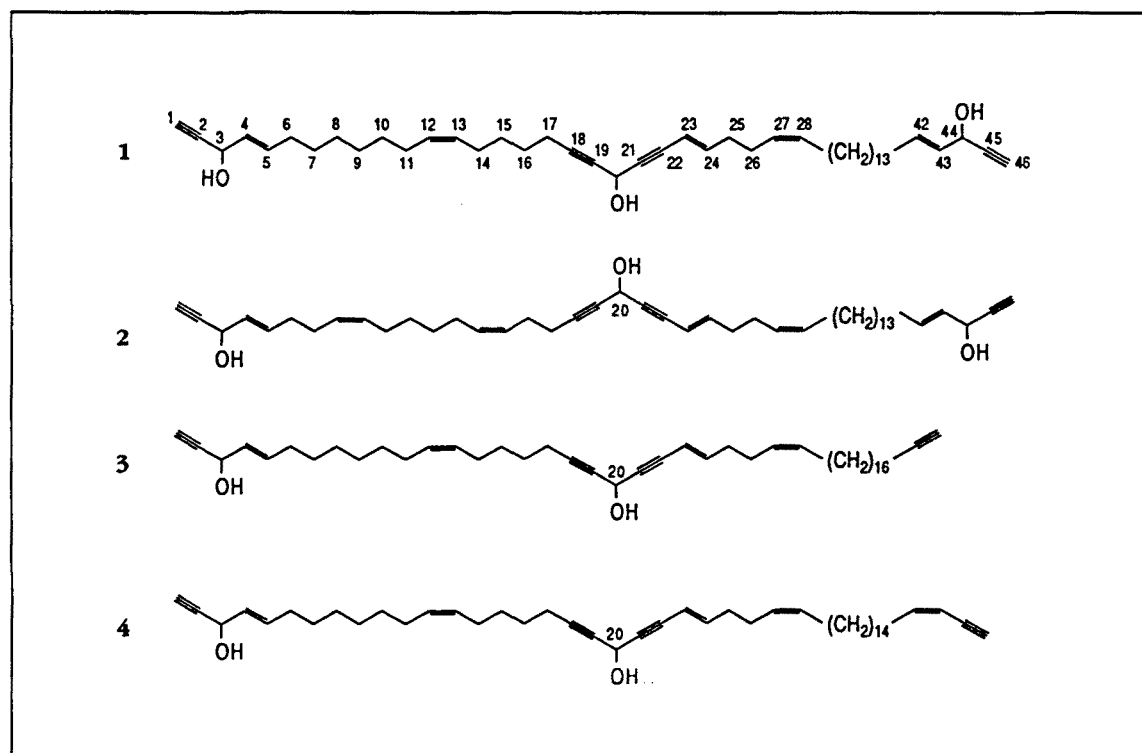


Figura 5.32. Fórmulas de las petroformynas-1, -2, -3 y -4.

A modo de ejemplo, se ha incluido el espectro NMR obtenido de la fracción 151-171, en la Figura 5.33. El resto de espectros no se exponen.

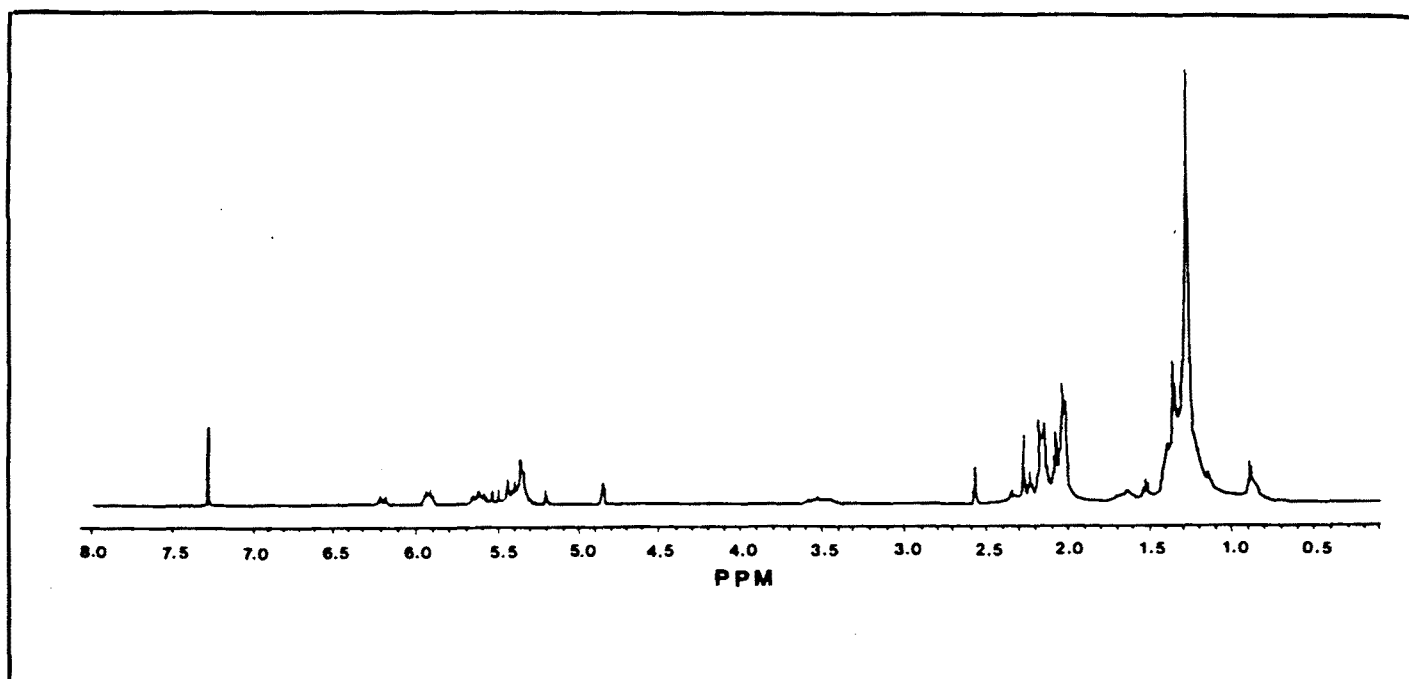


Figura 5.33. Espectro NMR de la fracción 151-171 de la glándula digestiva de ejemplares del litoral catalán, correspondiente a la mezcla de las petroformynas-1 y -2.

Al parecer en *P. ficiformis* roja se hallan estas cuatro petroformynas, pero en *P. ficiformis* blanca solo se hallan las petroformyna-3 y -4 (Di Marzo, com. pers.). Aparentemente esto podría estar relacionado con la presencia de simbioses en la variedad roja. A pesar de que se han realizado varios trabajos sobre *P. ficiformis* y *P. atromaculata*, esta es la primera vez que se localizan y aíslan del molusco los poliacetilenos petroformyna-1, -2, -3 y -4 (caracterizados en la esponja por Cimino *et al.*, 1989d), concretamente a partir de la glándula digestiva, siendo iguales a los de la esponja roja.

A partir de los datos expuestos anteriormente, se calcula que en la glándula digestiva hay aproximadamente 0.86 mg/animal de la mezcla petroformyna-3 y -4, y 1.28 mg/animal de la mezcla petroformyna-1 y -2.

Los esteroides separados en la fracción 51-68 se conservaron para posteriores estudios (GC). Las fracciones 41-50 (y 33-40 en menor cantidad) se compararon con el 4-colestén-3-one mediante mezcla y comparación en TLC. Se observó que presentaban el mismo *rf*.

Análisis del manto. Se unieron los extractos del manto de los 7 animales anteriormente mencionados. En las placas no se observaron sustancias de interés. El extracto etéreo total fue de 6 mg. Se hizo una columna en pipeta Pasteur con sílice, separándose los esteroides. Los disolventes usados en la columna fueron: éter de petróleo-éter etílico 98:2 (fr. 1-18), 95:5 (fr. 19-34), 8:2 (fr. 35-45). Se recogió 1 mg de esteroides limpios en las fr. 4-10, que fueron conservados para posteriores estudios (GC).

Ejemplares autotomizados, comparación con animales de procedencias diversas. En Taormina se capturaron 8 ejemplares que se mantuvieron en acuario durante una semana, tras la cual estando vivos y aparentemente sanos, algunos de ellos empezaron a autotomizarse. Congelamos los fragmentos de 2 animales. Se conservaron 2 vivos en el acuario que murieron a los 4 días y se estropearon (no pudieron ser analizados). Se congelaron otros 2 en mejor estado, que habían empezado también a autotomizarse. Se extrajeron las muestras con acetona y con la ayuda de ultrasonidos, haciéndose las placas cromatográficas pertinentes. Se compararon con los extractos anteriores de manto y vísceras de ejemplares del litoral catalán, y con otros ejemplares, tal y como se detalla en la Tabla 5.71. Los ejemplares de Massa Lubrense fueron sometidos a varios experimentos para obtener su secreción mucosa, antes de ser procesados del modo habitual.

Tras observar las placas cromatográficas realizadas en éter de petróleo-éter etílico 1:1, se detectó la presencia de los poliacetilenos petroformyna-1 y -2, y del compuesto tipo 4-colestén-3-one exclusivamente en las vísceras. Los ejemplares de Palamós presentaban un patrón como el ya descrito para los ejemplares del litoral catalán, al igual que las vísceras de los ejemplares de Taormina. Curiosamente en los ejemplares de Taormina que habían sufrido procesos mayores o menores de autotomía, se detectó la presencia en el manto de los poliacetilenos petroformyna-3 y petroformyna-4. Esto hacía pensar en un posible papel de estas sustancias en el fenómeno de la autotomía, siendo transferidos desde la glándula digestiva, o bien que la autotomía en sí provocase la desintegración del hepatopáncreas, con lo cual el resto del organismo se impregnaría de los poliacetilenos. Esta última

posibilidad debe ser descartada ya que en tal caso se hallarían todos los productos del hepatopáncreas en el manto, cosa que no se ha observado.

	extracto acetónico	extracto etéreo	peso seco
<b>ejemplares de Taormina:</b>			
fragm. manto autotom.	469.0	29.1	1.408 g
vísceras 1 ejemplar	17.9	10.5	160
parte externa 1 ej.	149.3	10.4	717.6
parte externa 1 ej.	110.8	8.0	665.9
vísceras 2 ej.	145.7	46.3	683.3
<b>ejemplares de Massa Lubrense:</b>			
parte externa 2 ej.	104.4	9.9	489.3
vísceras 2 ej.	26.0	19.6	179.7
<b>ejemplares de Palamós:</b>			
parte externa 8 ej.	182.9	34.0	4.82 g
vísceras 8 ej.	375.8	98.7	947.5

Tabla 5.71. Análisis químico de ejemplares de procedencias diversas (datos en mg, si no se indica otra cosa).

Los ejemplares de Massa Lubrense, a juzgar por las placas, presentarían exclusivamente las petroformynas-3 y -4 en la glándula digestiva, y de forma muy abundante, no detectándose la presencia de las otras dos sustancias (petroformynas-1 y -2). Este hecho coincidiría con una dieta a base de *P. ficiformis* blanca (del interior de una cueva), sobre la cual se hallaban estos ejemplares.

Secreciones externas y pH. Los dos ejemplares de Massa se mantuvieron en acuario durante 24 horas, tras las cuales fueron sometidos a "stress" (agitándolos en un vaso de precipitados con poca agua) y al cabo de un par de minutos secretaron un muco blanco, de olor fuerte, y pH neutro (6.5-7). A los 10 minutos se observó que se hinchaba toda la parte lateral del manto en ambos animales, pero sin llegar a autotomizarse. Se mantuvieron en el acuario. Al cabo de 48 horas se repitió el proceso de "stress", poniéndolos en un vaso con poca agua y  $Cl_2Mg$ , aumentando progresivamente la concentración. A pesar de todo, no se consiguió que se autotomizaran. Se

congelaron al cabo de 6 ó 7 horas y se procesaron del modo habitual como ya se ha comentado anteriormente.

Estudio de la puesta. Tres puestas procedentes de los animales de Blanes mantenidos en acuario fueron procesadas como de costumbre, obteniéndose un extracto acetónico de 20 mg. Las placas cromatográficas en éter de petróleo-éter etílico 1-1 parecían mostrar la presencia de los poliacetilenos, tanto de la mezcla de petroformynas-1 y -2, como de la mezcla petroformynas-3 y -4, aunque la cantidad no fue suficiente para posteriores comprobaciones.

#### Origen de los productos.

Se ha comentado ya anteriormente la estrecha relación de depredación entre *P. atromaculata* y *P. ficiformis*. Los datos obtenidos por otros autores (ver referencias químicas ya mencionadas) demostraron que los metabolitos de la esponja (petrosterol y poliacetilenos) se acumulaban en la glándula digestiva del molusco. Nuestros datos coinciden plenamente con esto, habiéndose sido incluso identificadas las petroformyne-1 a -4 directamente del hepatopáncreas del molusco. Es interesante resaltar que en el caso de los ejemplares capturados sobre la variedad blanca de la esponja, los nudibranquios presentan los mismos metabolitos que ésta, es decir sólo dos de ellos. Esto es lógico sabiendo que el molusco apenas se mueve de su presa, con lo cual no es probable que los ejemplares encontrados sobre la variedad blanca se alimenten de la variedad roja, sino exclusivamente de la blanca.

Castiello *et al.* (1978) ya demostraron mediante experimentos con un tubo Y que el nudibranquio es capaz de detectar a la esponja y dirigirse hacia ella (tanto la variedad roja como la blanca). Si aplicamos un test de  $X^2$  a sus resultados vemos que estos son significativos. Sin embargo, el factor de atracción era hidrosoluble, y no fue aislado por dichos autores.

Durante los experimentos de crecimiento en acuario se pudo observar que los nudibranquios prefieren *P. ficiformis* "blanda", es decir,

aparentemente con menos espículas, respecto a la "dura" de aspecto más espiculoso.

### Función.

Según Cimino *et al.* (1982), el compuesto detectado por ellos en el manto, fenilacetaldehído, resultó inactivo en el test de repelencia con *Chromis chromis* y *Carassius auratus*, sugiriendo que tal y como postuló Ros (1977), los mecanismos de defensa de esta especie serían principalmente mecánicos. Según Cimino *et al.* (1985a), algunos de los compuestos poliacetilénicos dieron también resultados negativos en los mismos tests.

Cimino *et al.* (1989d) realizaron el test de citotoxicidad para *Artemia salina*, con las petroformynas-1 a -4, resultando ser estas sustancias de las más potentes citadas hasta la fecha. Asimismo, en el test con embriones de erizos hallaron que las cuatro sustancias inhibían el desarrollo de los huevos fertilizados a concentraciones entre 1 y 50 µg/ml. Cimino *et al.* (1990d) realizaron además el test antitumoral de la patata, mostrándose activas las petroformynas-1 y -2. En este mismo trabajo se detalla la fuerte actividad citotóxica para *A. salina* de los compuestos petroformynas-5 a -7, -A y -B. Si bien estos últimos compuestos no han sido descritos en el molusco, es probable que también estén presentes en su glándula digestiva. Estos autores sugieren que la oxigenación de los poliacetilenos podría ser un mecanismo de autoprotección para el animal, y además mencionan que los alcoholes son más activos que las correspondientes cetonas.

En este caso, se realizó un test de ictiotoxicidad con *Gambusia affinis* con la mezcla de los productos petroformynas-3 y -4, ya que nos pareció interesante comprobar sus efectos al haber sido hallados en el manto de los animales autotomizados. El resultado fue negativo a 1 y 10 ppm.

Se realizó un test con embriones de erizos con la mezcla de las cuatro petroformynas (20 y 40 µg/ml). Coincidiendo con Cimino *et al.* (1989d) el resultado fue que en ninguno de los casos se formaron larvas pluteus, bloqueándose el desarrollo en la fase anterior, es decir en el paso de gástrula



a larva pluteus, sin afectar a las fases anteriores (como se puede ver en la Figura 5.34.).

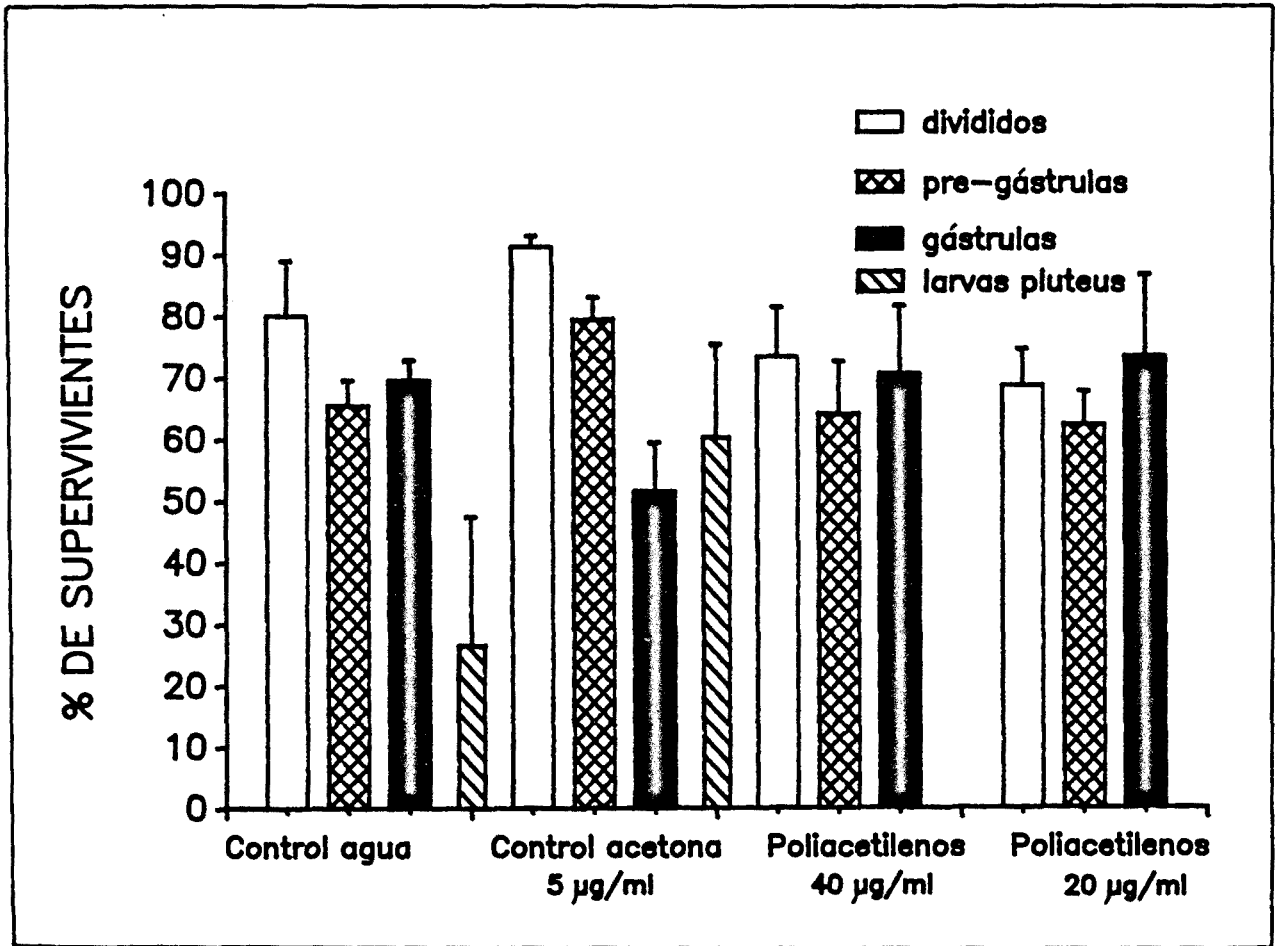


Figura 5.34. Efecto de la mezcla de petroformynas-1 a -4 de *P. atromaculata* sobre el desarrollo de los embriones del erizo *Paracentrotus lividus*.

En un caso se ofreció a un ejemplar de *Pleurobranchaea meckeli* hambriento un individuo de *P. atromaculata* recién muerto. De forma similar a lo sucedido con *D. verrucosa*, el pleurobrancáceo se comió las vísceras, dejando el manto. En este caso, y debido a la mayor acumulación de metabolitos en la glándula digestiva, cabe deducir que éstos no afectan a la depredación por parte de *P. meckeli*, y que posiblemente el efecto de las espículas del manto actúe de manera efectiva contra esta depredación.

Por otro lado, la mezcla de las petroformynas-1 a -4 fue probada en el experimento con trozos de calamar colocados en cuerdas. Los resultados, que no fueron significativos posiblemente por las mismas razones ya expuestas en el caso de *D. verrucosa*, se exponen en la Tabla 5.72.

Número de mordiscos por réplica (4)				
calamar sin nada	0	0	0	1
con acetona	2	0	0	2
con petroformynes*	0	0	0	1
* = 40 µg.				

Tabla 5.72. Resultados del experimento de cuerdas con calamar.

Tras este experimento se probó con el poliqueto *Marphysa sanguinea* impregnado con la mezcla de las petroformynas-1 a -4. Los resultados, expuestos en la Tabla 5.73., parecen indicar que estas sustancias no afectarían a la depredación por parte de los peces de este poliqueto.

	Réplicas	1	2	3	4
gusano sin nada		-	+	+	-
con acetona		-	+	+	-
con poliacetilenos*		-	-	+	+
* = 40 µg; += comido; -= no comido.					

Tabla 5.73. Resultados del experimento de cuerdas con *M. sanguinea*.

### Autotomía.

Se ha podido comprobar que *P. atromaculata* se autotomiza justo cuando se está muriendo (fotografías 133 y 134). Surge entonces la cuestión de qué sentido tiene esta autotomía. Está claro que no sirve para la defensa ya que el animal muere igualmente. En ninguno de los casos aquí observados el animal ha sobrevivido a este fenómeno más de 48 horas.

Los casos mencionados por Haefelfinger (1961), Ros (1973), y Perrone (1992) podrían ser una regeneración después de un incidente (mordisco de cangrejo, enfermedad, etc.), ya que además abarcan una pequeña parte del manto del animal. En los ejemplares aquí estudiados, el proceso se desarrollaba siempre implicando a la parte lateral del manto (parcial o totalmente) y la parte dorsal entera, con lo cual el animal quedaba sin protección mecánica (ver fotografías 133 y 134). Este fenómeno podría seguramente ser explicado como una degeneración debida posiblemente a la vejez. En todos los casos aquí observados, los ejemplares se hallaban al final de su ciclo de vida y ya habían hecho numerosas puestas (ver ciclo de vida en acuario en el apartado correspondiente). Otros casos debidos a un gran "stress" al ser capturados o por malas condiciones de mantenimiento acababan igualmente en la muerte del ejemplar. Hay que destacar que en todos los casos de autotomía se producía una enorme secreción de mucosidad con un fuerte olor.

#### 5.13.3.3. Resumen conclusivo.

*Peltodoris atromaculata* acumula selectivamente en la glándula digestiva los productos que obtiene de *Petrosia ficiformis* en la glándula digestiva, confirmando la relación depredador-presa. El patrón de productos es el mismo en diferentes localidades, si bien en los ejemplares que se alimentan de la variedad de esponja blanca se detectan exclusivamente los productos de esta variedad. Algunos de estos productos se pueden hallar en el manto de animales que han sufrido fenómenos de autotomía. Estos productos poliacetilénicos inhiben el paso de las gástrulas a larvas pluteus en el test de los embriones de erizo y presentan una fuerte actividad citotóxica para *A. salina*. Sin embargo, estos metabolitos no parecen tener efectos sobre otros organismos, como *P. meckeli* que es capaz de comerse su glándula digestiva pero no el manto. Dificilmente los compuestos poliacetilénicos pueden intervenir en la defensa, ya que se localizan en la glándula digestiva, pero sus fuertes propiedades citotóxicas podrían ser útiles para proteger al animal de los microorganismos.

## 5.14. *Dendrodoris limbata* (Cuvier, 1804).

### 5.14.1. Introducción.

#### 5.14.1.1. Referencias bibliográficas generales en el área de estudio. Sinonimias.

*Doris limbata*.- Cuvier (1804); Delle Chiaje (1822), Cantraine (1841).

*Doris virescens*.- Risso (1826).

*Doris setigera*.- Rapp (1827).

*Doris lugubris*.- Gravenhorst (1831).

*Doris rappii*.- Cantraine (1841).

*Doris sismondae*.- Verany (1846).

*Doriopsis obscura*.- Abraham (1877).

*Doriopsis limbata*.- Bergh (1892); Oliveira (1895); Vayssiere (1901); Nobre (1932).

*Doridopsis limbata*.- Tchang-Si (1931a y b).

*Dendrodoris limbata*.- Pruvot-Fol (1951, 1954); Sordi y Majidi (1957); Haefelfinger (1960); Vicente (1967); Schmekel (1968b); Barash y Danin (1971); Ros (1975, 1985); Bouchet y Tardy (1976); Ballesteros (1978, 1980); Pereira (1980); Altimira *et al.* (1981); Cimino *et al.* (1980b, 1981b, 1982, 1983, 1984, 1985c y d, 1987d y 1988b); Schmekel y Portmann (1982); García (1982); Templado (1982, 1983 y 1984); Luque (1983, 1984 y 1986); Huelín y Ros (1984); Ballesteros *et al.*, (1986a y b); Cervera y García (1986); Caprioli *et al.* (1987); Cattaneo *et al.* (1990); Avila *et al.* (1991a); Avila y Durfort (1992); Valdés *et al.* (1992 y *en accept.*).

#### 5.14.1.2. Breve descripción y características de la especie.

La coloración general del cuerpo es amarillenta, con manchas marrones o negras que en algunos ejemplares pueden llegar a cubrir toda la superficie. El borde del manto es siempre amarillo o de color claro. Los rinóforos, como las branquias, presentan el ápice blanco o claro. Pueden

presentar manchas pequeñas en la suela del pie y lateralmente. El pene está armado con unas grandes espinas aciculares, de base estrecha, que se disponen muy juntas. Otras particularidades referentes al aparato genital se detallan en Valdés *et al.* (1992 y *en accept.*).

#### 5.14.1.3. Referencias comentadas.

##### Morfológicas o descriptivas.

En realidad sobre esta especie existen pocos datos conocidos. Se pueden hallar descripciones generales en Tchang-Si (1931a y b), Ballesteros (1980) y Schmekel y Portmann (1982). Hemos de destacar, sin embargo, que en la bibliografía citada hasta ahora se puede notar la gran variabilidad en la coloración externa que presenta *D. limbata*.

##### Ecológicas.

Ros (1978a) cita esta especie en biocenosis de sustratos blandos: fango, grava organógena y cascajo; en praderas de fanerógamas (*Posidonia*), en hojas y rizomas con epibiontes; en sustratos duros del medio e infralitoral, y en cuevas oscuras. El mismo autor le atribuye un régimen alimenticio de tipo zoófago: micrófago (ramoneador, suctor): de esponjas, y como esponja presa cita la especie *Suberites domuncula*. Si bien sobre el hábitat de *D. limbata* hay otras muchas citas (Luque, 1984), es necesario destacar que no se encuentran datos en la bibliografía sobre su alimentación. Algunas características de la puesta se describen en Tchang-Si (1931a y b).

Esta especie habita en el Mediterráneo, existiendo únicamente dos citas fuera de él (para mayor información ver Valdés *et al.*, 1992, y *en accept.*).

## Químicas.

De *D. limbata* se aisló un metabolito del manto, el polygodial, que era conocido previamente en plantas, *Polygonum hydropiper* y *Warburgia* spp (Barnes y Loder, 1962; Ohsuka, 1963; Kubo *et al.*, 1976) y que tiene una fuerte actividad repelente para ciertos insectos (Nakanishi y Kubo, 1977; Kubo y Ganjian, 1981). Esta sustancia fue hallada en *D.limbata* por Cimino *et al.* en 1982, así como algunos ésteres relacionados (Cimino *et al.*, 1981b) en las vísceras. Posteriores estudios demostraron que este compuesto era biosintetizado por el propio animal y profundizaron en el estudio de su estructura y actividad (Cimino *et al.*, 1983, 1984, 1985c y d, 1987; Caprioli *et al.*, 1987). Debido a la fuerte toxicidad de este producto para el propio animal, se sospechaba que pudiera haber una forma protegida, que podría ser la olepupuana (Cimino *et al.*, 1988b).

### **5.14.2. Material estudiado.**

Los datos de los ejemplares capturados se detallan en la Tabla 5.74.

Las muestras de Formentera proceden del Racó de Sa Creu la primera y de Es Banc la segunda. El tipo de hábitat en el que se recogieron los ejemplares son paredes esciáfilas con esponjas (*Spongia*, *Ircinia*, *Cacospongia*, *Dysidea*,...) hasta unos 20 m de profundidad. Esto es válido para las localidades de Blanes, Miseno, Cadaqués y uno de los ejemplares de Formentera. En algunos casos los ejemplares se hallaban bajo piedras al pie de la pared. En Taranto y Torre Annunziata los ejemplares se hallaban a escasa profundidad y bajo piedras con poco recubrimiento, e incluso en algunos casos sin recubrimiento.

Se recogieron puestas con los ejemplares capturados en Marzo y Mayo de 1989, y Febrero y Mayo de 1990 en Miseno, continuando en algunos casos haciendo puestas en el acuario de mantenimiento. En Mayo de 1991 se obtuvieron abundantes puestas en acuario de los ejemplares de Blanes.

LOCALIDAD	FECHA	(1)	(2)	(3)
Blanes	8-11-87	2	12m	m+anat
	19-3-92	3	arr	m
	6-5-91	16	arr(70m)	exp
Llançà	5-8-87	2	arr	m+anat
Taranto	11-10-88	1	6m	anat
	29-3-89	4	6m	quím
Miseno	13-10-88	2	2m	anat+quím
	20-1-89	7	10m	anat
	29-1-89	17	7m	quím
	14-4-89	1	6m	quím
	19-5-89	3	4m	quím
	22-6-89	2	12m	m
	6-2-90	4	4m	quím
	20-2-90	2	6m	anat+quím
	6-9-92	4	2m	quím
	Torre Annunziata	27-10-88	2	4m
Formentera	28-10-89	1	18m	quím
	30-10-89	1	14m	quím
Cadaqués	5-5-88	1	3m	anat
	24-2-90	1	10m	quím
TOTAL		76		
(1)= Número de individuos. (2)= Profundidad (arrastre, entre 20 y 80m). (3)= Utilización del material (quím= química, exp= experimentos, m= microscopía, anat= anatomía interna).				

Tabla 5.74. Datos de los ejemplares capturados.

### 5.14.3. Resultados y discusión.

#### 5.14.3.1. Datos morfológicos de los ejemplares capturados.

##### Esquemas anatómicos.

Como ejemplo de la variabilidad existente en esta especie, se pueden ver en la Figura 5.35. las diferencias entre ejemplares de una misma

población, en este caso de Miseno (Nápoles). Es necesario señalar que en todos los casos se observó una línea amarilla (o clara) en el borde del manto.

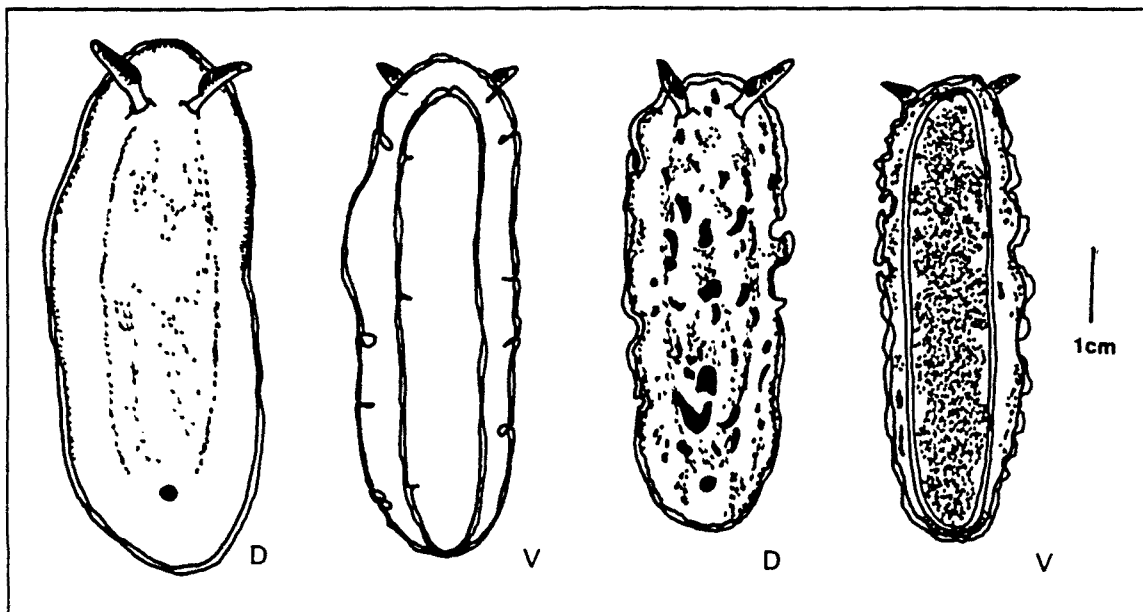


Figura 5.35. Morfología externa de varios ejemplares de *D. limbata*.

Para subsanar el escaso conocimiento de la anatomía interna de esta especie, junto a la falta de caracteres clave para distinguir las especies del género (ya que, por ejemplo, no tienen rádula), se ha realizado un estudio detallado (Valdés *et al.*, 1992, y *en accept.*), en el que se concluye que las espinas peniales y las particularidades del aparato reproductor son esenciales para diferenciar las especies. La morfología externa y el aparato digestivo (caracteres empleados hasta ahora) son excesivamente variables como para ser usados para el estudio taxonómico. En la Figura 5.36. se puede observar una visión general de la anatomía interna.

En un ejemplar se detectó un copépodo parásito en el manto (*Lichomolgus* sp). Hechos como este han sido señalados desde antiguo para esta y otras especies (Hetch, 1895) (ver apartado 7.4.3.).



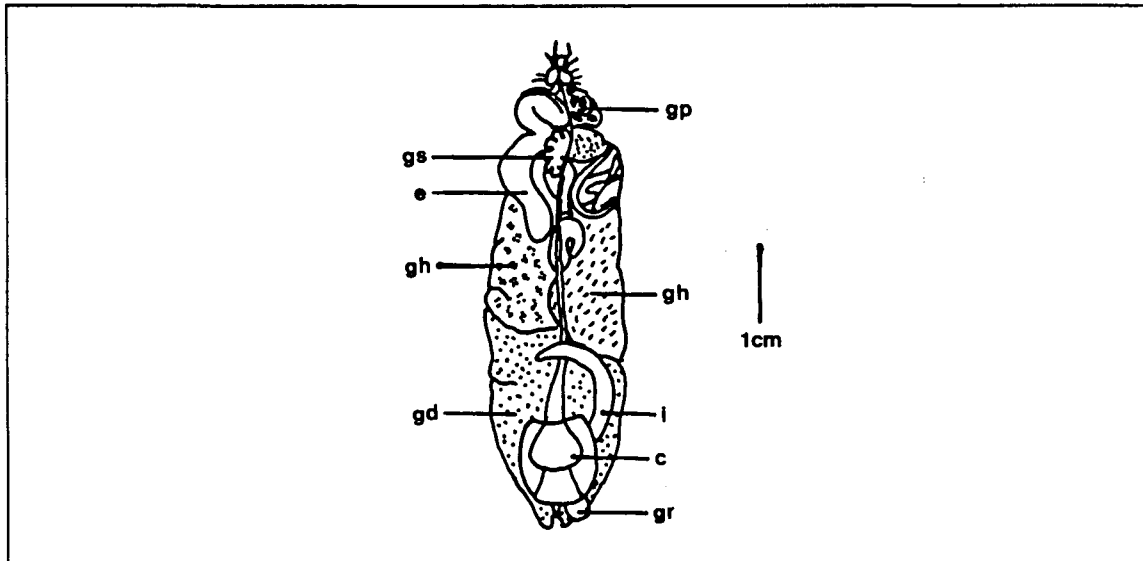


Figura 5.36. Anatomía interna de *D. limbata* (Valdés *et al.*, 1992), (gs= glándula sanguínea; e= esófago; gh= glándula hermafrodita; gd= glándula digestiva; gp= glándula ptialina; i= intestino; c= corazón; gr= glándula rectal).

#### Estudio comparado del epitelio del manto y otros.

Durante los estudios para localizar los metabolitos de defensa de *D. limbata* se observó una distribución diferente de los mismos en las distintas zonas de la parte externa del animal. Es por ello que se estudió de forma comparativa la ultraestructura de estas zonas. El borde del manto de *D. limbata* se procesó para su estudio al microscopio óptico, mediante las tinciones: hematoxilina-eosina, Sudán Negro B (que no dió buenos resultados) y Mallory. Posteriormente se realizó un estudio más completo al microscopio electrónico del borde del manto, el epitelio de los rinóforos y las branquias, y del borde del pie.

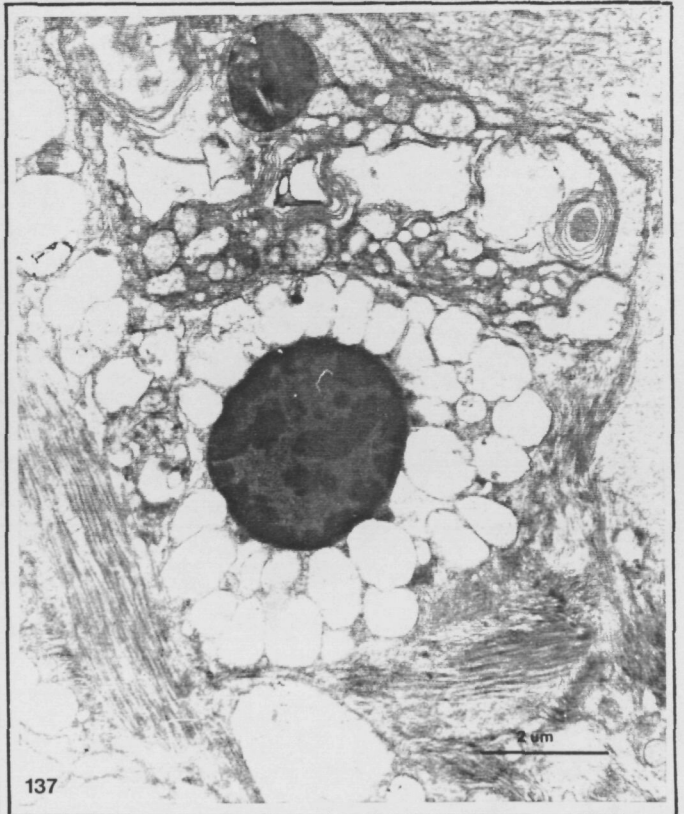
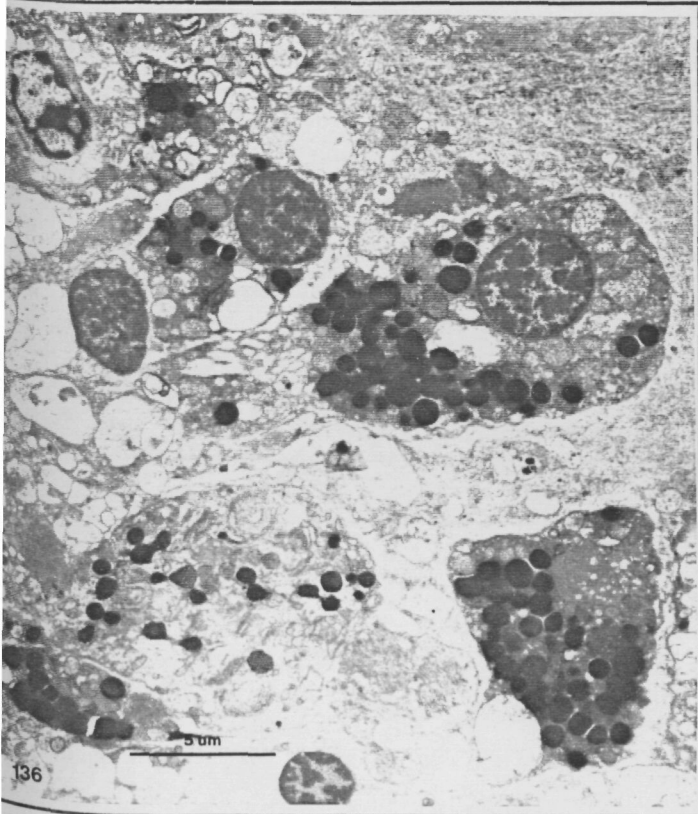
Borde del manto. El epitelio del borde del manto está constituido por tres modelos celulares, siendo mayoritarias las células ciliadas. En segundo lugar aparecen las células glandulares mucosas y minoritariamente células que llamaremos macrovacuoladas. En cuanto a las células ciliadas, se observa

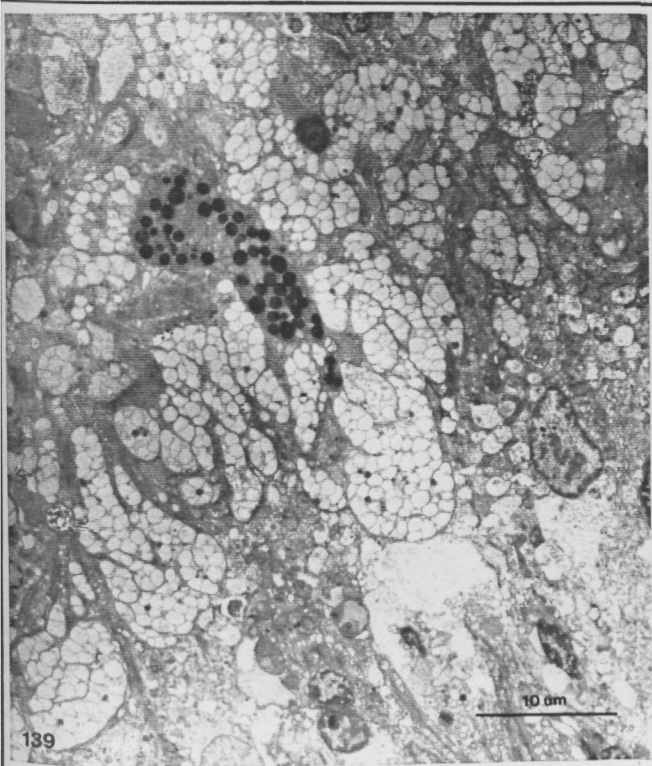
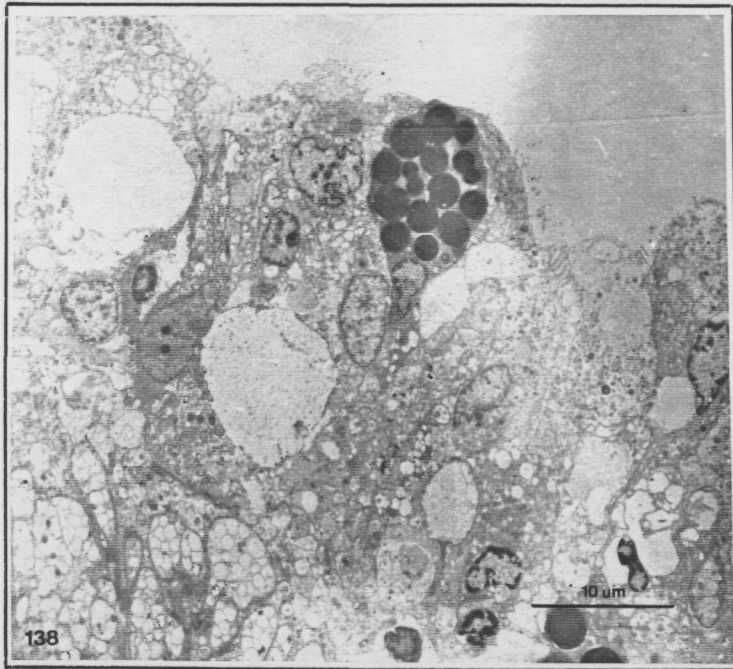
la presencia de cilios de configuración normal, alternando con microvilli que ocasionalmente pueden tener una morfología arrosariada. Los orgánulos citoplasmáticos no presentan ninguna característica especial. El núcleo, como es habitual, es ligeramente elíptico y ocupa una posición basal. Existen contactos tipo desmosoma que relacionan estas células entre ellas y también con las células macrovacuoladas, si bien las células ciliadas quedan a un tercio de la altura de las macrovacuoladas en fase de maduración.

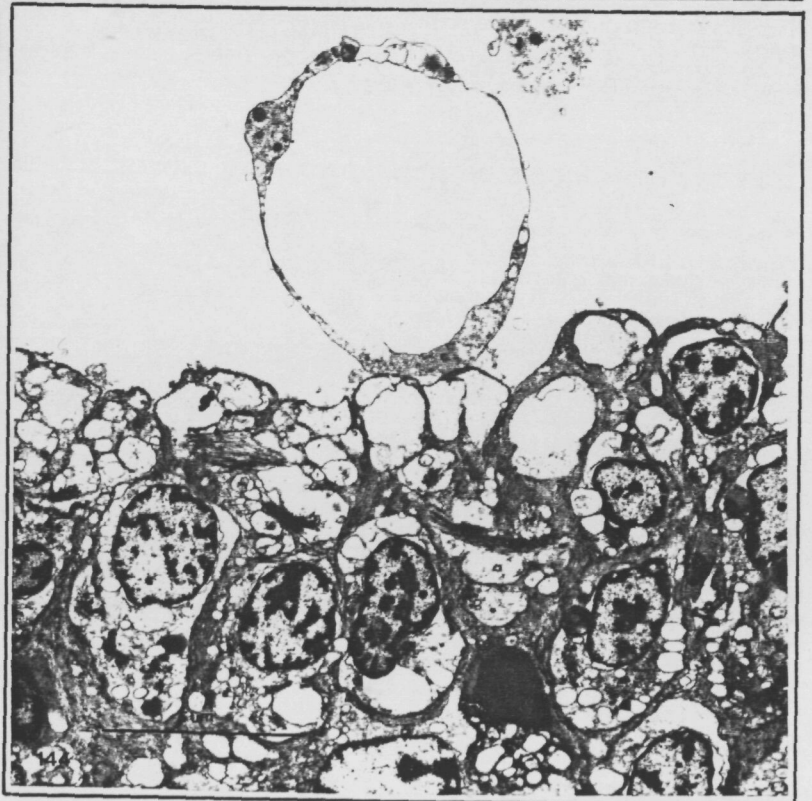
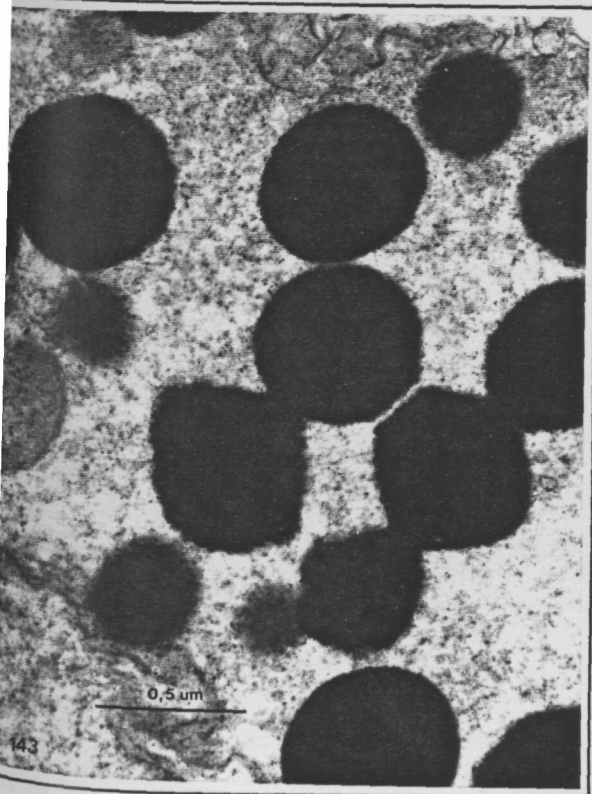
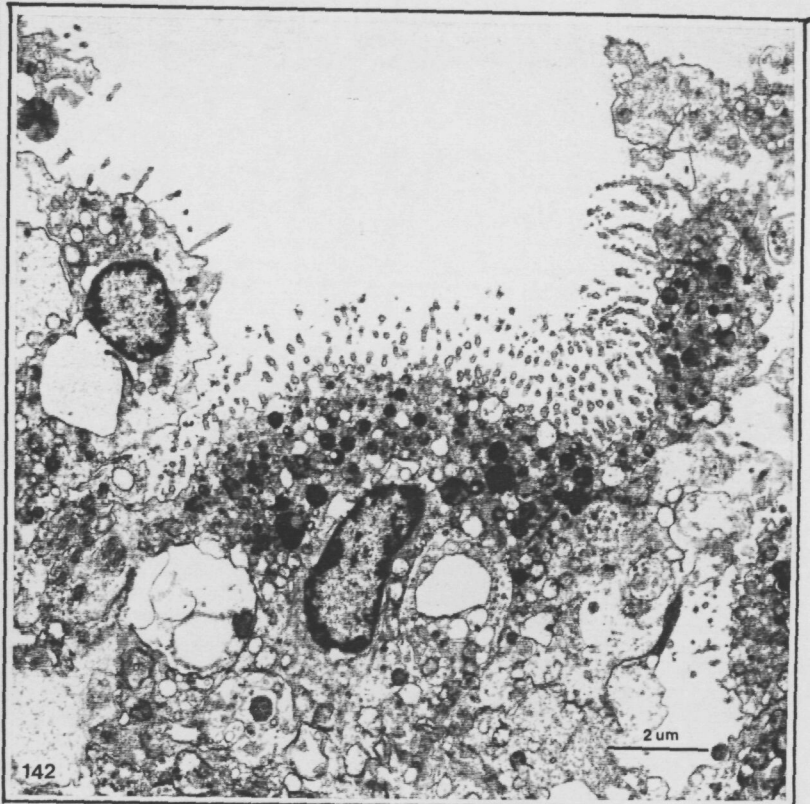
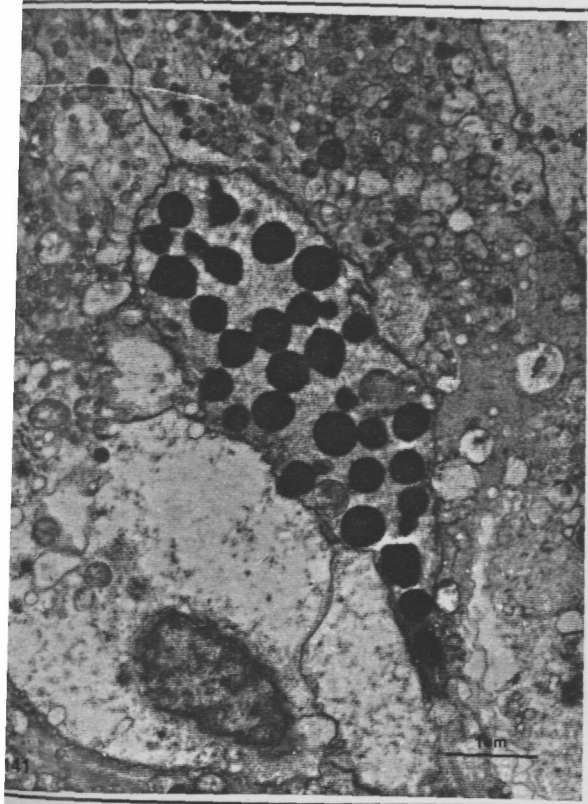
Las células macrovacuoladas (ver fotografía 135) muestran una macroinclusión de tipo probablemente lipídico, recordando por su morfología a las células adiposas monovaculadas de los vertebrados. Cuando la célula está madura, el citoplasma es desplazado a un lado, en el cual los orgánulos tales como mitocondrias, dictiosomas y un retículo endoplasmático rugoso poco desarrollado son los predominantes. El núcleo se halla lateralmente desplazado, quedando en posición opuesta a la cara luminal de la célula. Esta es la razón por la cual en vez de ser una célula ovoide o elíptica, presenta una acusada polaridad. Generalmente en su base existe una célula sustituta, de modo que, al parecer, cuando la vacuola sea liberada por macroexocitosis el espacio vacío será ocupado por la nueva célula basal. En la fotografía 138 se puede apreciar una posible célula macrovacuolada con su contenido intacto (al parecer habría resistido al tratamiento de la muestra); este contenido podrían ser los lípidos que en el resto de células no se han conservado.

Bajo el epitelio del manto destacan células glandulares mucosas, por su gran número y su morfología, altamente vesiculosa (ver fotografías 137 y 139), formando una franja ancha. Algunas de ellas se disponen alrededor del núcleo celular (fotografía 137). De entre estas vesículas hay que destacar como mínimo dos tipos. Unas presentan un contenido granuloso laxo, que posteriormente se condensará adquiriendo una mayor electrodensidad (fotografía 140), y otras con unos cuerpos residuales (fotografía 136) (que requieren un estudio detallado de microanálisis).

Entre los agregados de células vesiculosas, y sobre todo más hacia el interior, hay células mucho más densas que llaman la atención por su morfología y por la presencia de gránulos de muy elevada electrodensidad, teniendo el aspecto de células de tipo endocrino (ver fotografías 141 y 143).







Las granulaciones electrodensas pueden considerarse de naturaleza lipoproteica. Bajo esta última capa celular se observan haces musculares.

El epitelio del manto de los ejemplares juveniles ha sido examinado de forma preliminar y al parecer presentaría las mismas características que hemos descrito arriba, al menos en los referente a células ciliadas y de secreción mucosa. No se observan, sin embargo, células macrovacuoladas.

Branquias. La mucosa branquial está constituida por los mismos tipos básicos de células que hemos descrito en el borde del manto, con algunas particularidades. A nivel de las células ciliadas se observa que hay una mayor proporción de microvilli que en el manto (fotografía 142). Estos microvilli son de tipo arrosariado y tienen una longitud unas 10 veces superior a la normal (ver fotografía 145). Ocasionalmente se encuentran formas bi o trifurcadas, desde la base o en su zona apical. En todos los casos los microvilli están recubiertos por un glicocálix muy patente. Continúa habiendo células macrovacuoladas que sobresalen del conjunto de células epiteliales (fotografía 144). En esta zona al parecer sería toda la célula la que se liberaría.

Las células vesiculosas son más numerosas que en el manto y forman una estructura polilobulada. Hay que destacar la curiosa localización de los gránulos de secreción radialmente situados en la periferia del núcleo, adoptando inicialmente una disposición en roseta (ver fotografías 146 y 148). Al igual que en el manto hay escasas vesículas con material finamente particulado y muy electrodense (que haría falta estudiar con microanálisis, ver fotografía 147).

Rinóforos. En este caso se observa que las células ciliadas son más prismáticas y con el núcleo más voluminoso en posición basal (fotografías 149 y 151). Los cilios presentan la típica estructura (fotografía 150). El polo apical de las células ciliadas presenta vesículas de tipo lisosomal. Hay que destacar la presencia de fosetas de implantación de los cilios, las cuales no acostumbran a ser continuas, sino que entre ellas aparecen numerosos microvilli simples y bifurcados, muy esbeltos y en todos los casos arrosariados. Otro hecho a destacar es que los contactos celulares que se

hallan en las caras laterales son de tipo desmosoma en la parte apical y uniones íntimas en las zonas basolaterales.

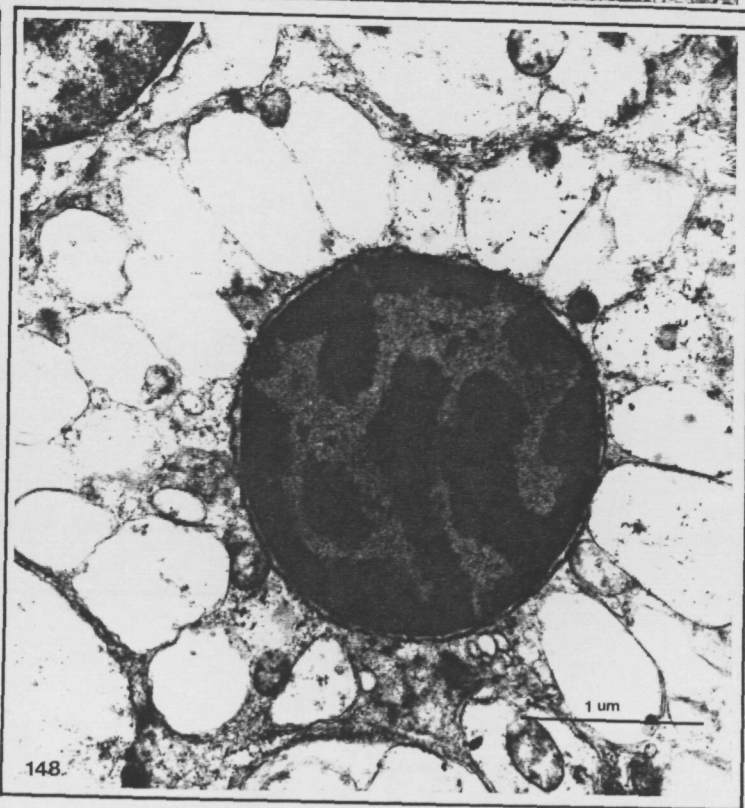
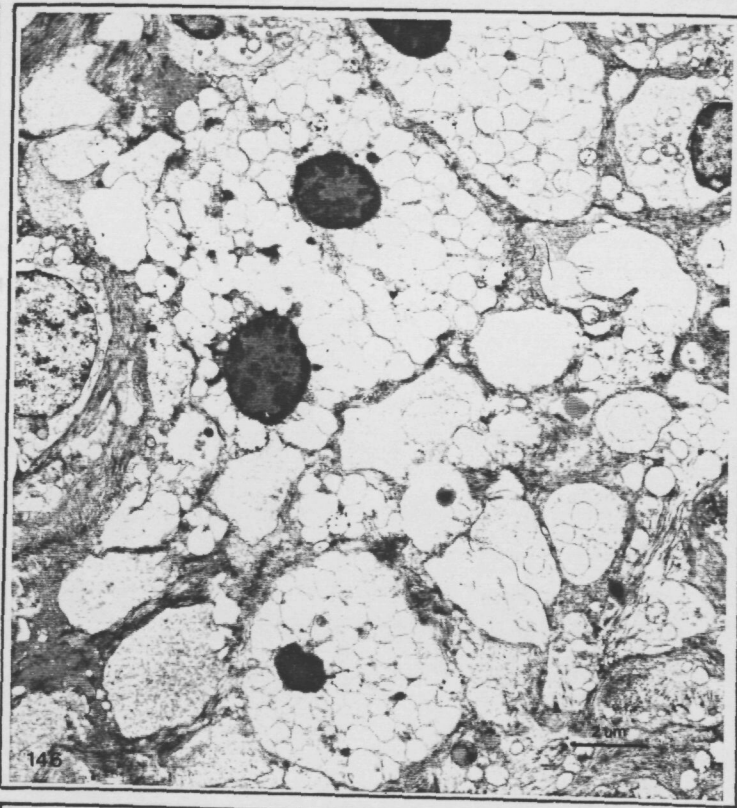
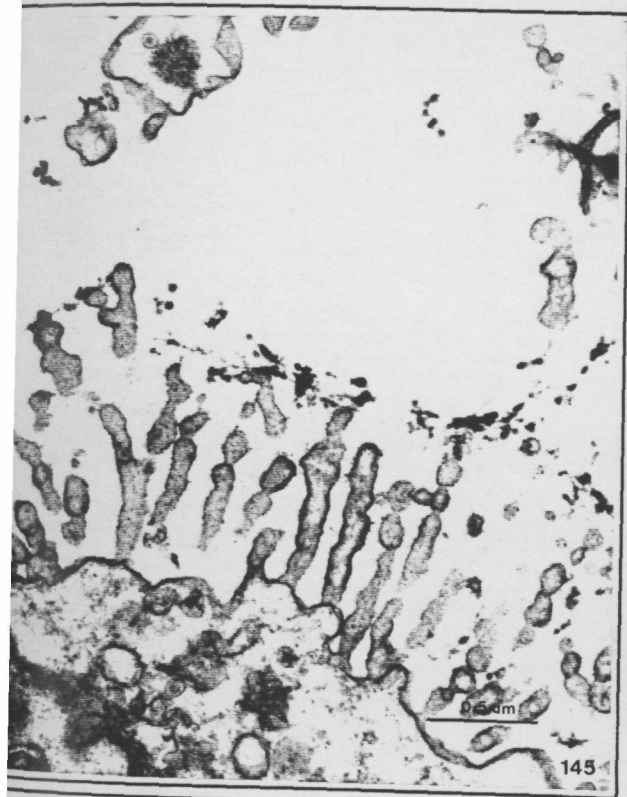
Intercaladas entre las células ciliadas mayoritarias hay células vesiculosas mucosas, en una proporción aproximada de 20:1, proporción que varía según el nivel estudiado del rinóforo. Ocasionalmente se crean unos espacios intercelulares de tamaño considerable, que podrían tener su origen en algún artefacto metodológico.

Borde del pie. Si bien no vamos a exponer en detalle las características del epitelio del pie de *D. limbata*, de nuestro estudio preliminar es necesario destacar que presenta un aspecto completamente distinto a lo descrito hasta ahora. La capa de cilios formada por las células ciliadas es de un considerable grosor y no se han observado células macrovacuoladas.

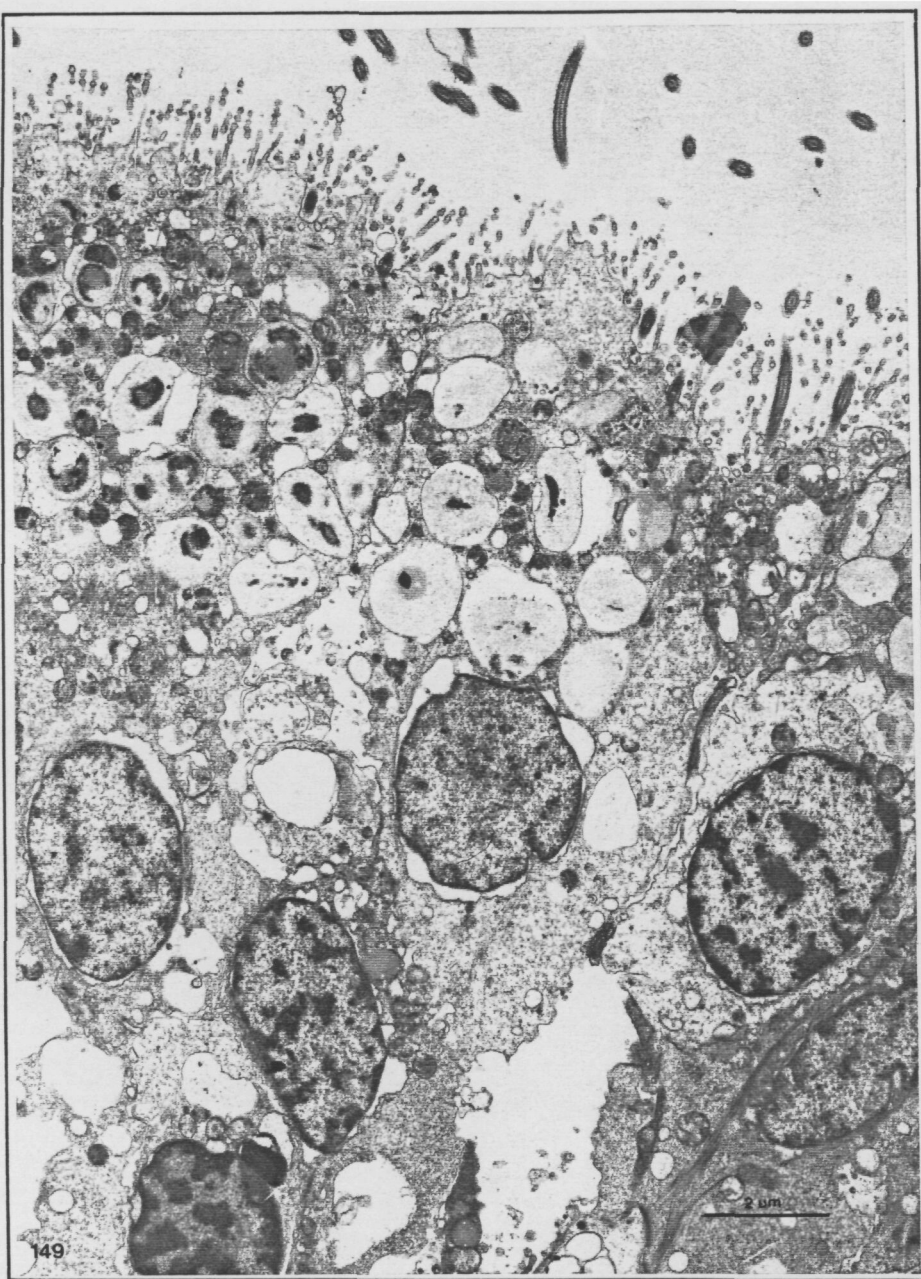
Discusión. Al parecer, y por lo que puede observarse en el esquema de Potts (1981), *A. pseudoargus* presenta bastantes menos células ciliadas en el epitelio del manto, en comparación con *D. limbata*. Las células ciliadas de *D. limbata* encajarían en la descripción general de Henneguy (1925), y las células mucosas en la de Hecht (1895). En *A. pseudoargus* también aparecen células mucosas en forma de copa, así como células con gránulos densos. En el borde del manto de *A. pseudoargus*, Potts (*op. cit.*) describe también algunas células vacuoladas, y en el epitelio branquial cita células ciliadas, células glandulares mucosas vacuoladas y algunas pequeñas células caliciformes. Todo ello es bastante similar a lo que hemos descrito para *D. limbata*, a excepción de las células macrovacuoladas.

En el epitelio de los rinóforos de *D. limbata* no hemos observado ninguna célula como las de tipo secretor descritas por Arias *et al.* (1984) para *Facelina coronata*.

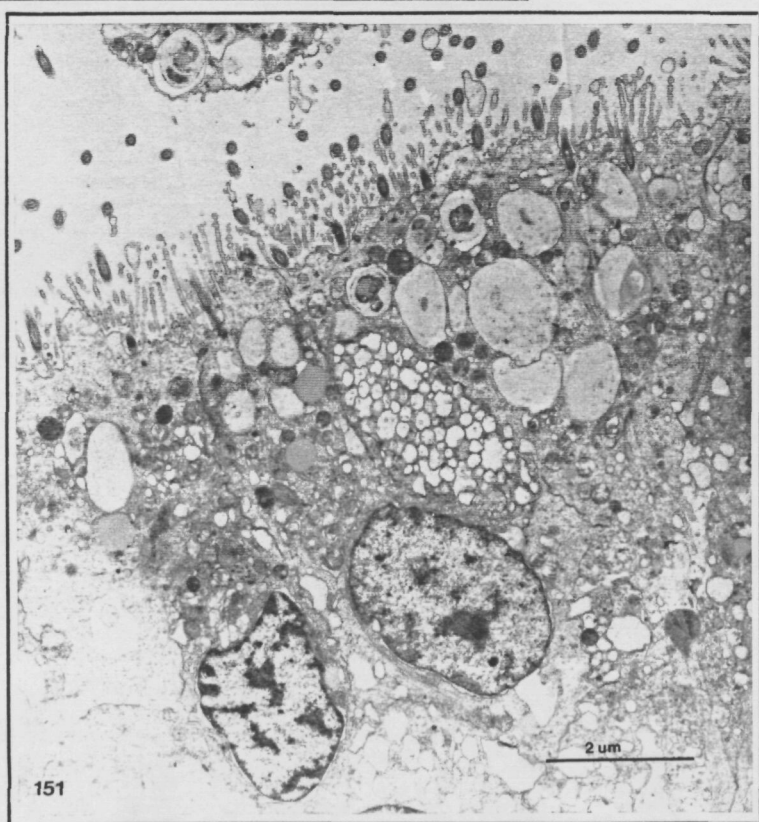
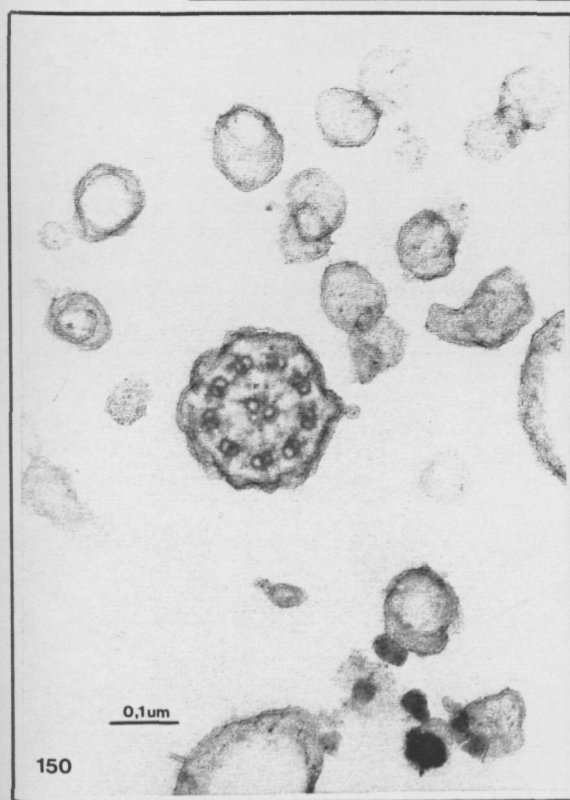
Los fenómenos de secreción probablemente ocurren en el manto mediante macroexocitosis. En el epitelio branquial parecen predominar los procesos de secreción holocrina. Y por último cabe destacar que en el manto se han detectado posibles secreciones de tipo endocrino (gránulos de secreción hormonal o serosa). En esta especie, a diferencia de los casos descritos







LAMINA 45



anteriormente (*Hypselodoris* y *Chromodoris* spp) no se detectan estructuras pluricelulares de acumulación, al igual que en *D. verrucosa*. Es altamente probable que las células macrovacuoladas de *D. limbata*, localizadas básicamente en el borde del manto (y también en el epitelio branquial), contengan las sustancias de defensa de esta especie.

#### Otras características de la especie.

Otro de los caracteres de interés taxonómico es la anatomía interna, y más concretamente la anatomía del aparato reproductor. En este sentido, se ha realizado un estudio de microscopía óptica de las vísceras de ejemplares de Llançà (5-VIII-87). Para ello se han empleado las tinciones siguientes: Mallory, tetracrómico de Herlant, ácido periódico de Schiff y hematoxilina-eosina, aunque no se exponen aquí los resultados. Estos estudios, junto con los que hemos venido realizando hasta ahora sobre la anatomía de esta especie (Valdés *et al.*, 1992 y *en accept.*), se espera que permitan aclarar en un futuro próximo los casos dudosos que se plantean.

#### Desarrollo larvario y juvenil.

La puesta es una espiral de color amarillo-anaranjado, con huevos grandes, y larvas de corta duración con una rápida transformación en juveniles. La puesta mide unos 10 mm de altura y los huevos se disponen ordenados en hileras de unos 22 huevos a lo alto y 2 huevos a lo ancho. Los huevos, que dan el color anaranjado a la puesta, son redondos y están cubiertos por una cápsula también esférica.

Se siguió en acuario el desarrollo de una puesta hecha por un ejemplar procedente de Miseno. El diámetro medio de los huevos al hacer la puesta era de 333.3  $\mu\text{m}$  y el de las cápsulas de 371.6  $\mu\text{m}$ . (Estos valores son algo superiores a los proporcionados por Tchang-Si (1931a), quien daba unos valores de 270  $\mu\text{m}$  para los huevos). Siguiendo con estos ejemplares, al cabo de tres días el tamaño de los embriones era de 380  $\mu\text{m}$  y el de las cápsulas de 403.3  $\mu\text{m}$ . A los siete días la larva, bien formada y con manchas oculares

visibles, ocupaba toda la cápsula y medía 432.5  $\mu\text{m}$ . A los diez días las larvas estaban formadas dentro de las cápsulas, midiendo unas 430  $\mu\text{m}$ . Se observaban huevos que seguían en fase embrionaria o con la larva no formada totalmente, midiendo en este caso unas 380  $\mu\text{m}$  de media. No se pudo seguir el desarrollo posterior de esta puesta. Se han estudiado otras puestas de la misma población de modo similar, si bien los resultados se elaborarán en un futuro próximo, ya que las muestras se han procesado para su estudio al microscopio óptico. De estas puestas no se obtuvieron larvas libres ni ejemplares juveniles.

Las puestas de los ejemplares de Blanes (6-V-91) eran idénticas a las descritas para los ejemplares de Miseno. De las varias puestas obtenidas, se pesaron tres: 6.012 g, 6.883 g y 4.644 g de peso húmedo. Se siguió también su desarrollo, ya que fueron cultivadas según lo expuesto en el apartado de metodología. Y resumiendo los datos obtenidos de la primera de las puestas (ya que las otras dos no prosperaron), diremos que a partir del día 20 las larvas se hallaban completamente formadas. A los 26 días las larvas velíferas se podían ver moviéndose activamente dentro de las cápsulas. El tamaño medio a los 35 días era de 459.3  $\mu\text{m}$ . A los 39 días midieron 523.3  $\mu\text{m}$ . A los 40 días se empezaron a liberar unas larvas que a penas podían nadar, muy voluminosas y pesadas, que en menos de 48 h ya eran todas juveniles con forma de doridáceo. Estos datos coinciden con lo descrito por Tchang-Si (1931b) para las larvas.

Al cabo de 43 días un juvenil ya formado medía 475  $\mu\text{m}$ , mientras que las postlarvas liberadas posteriormente medían 398.3  $\mu\text{m}$ . A los 47 días los juveniles ya bien formados medían 632.5  $\mu\text{m}$ . El resto de larvas que no se liberaron decrecieron de forma considerable (a los 64 días las cápsulas midieron 464.6  $\mu\text{m}$  y las larvas 275.8  $\mu\text{m}$ ; a los 72 días midieron 452.1  $\mu\text{m}$  las cápsulas y 310.4  $\mu\text{m}$  las larvas), y ya no aparecieron más juveniles. El hecho de que en una misma puesta haya larvas en distintas fases de desarrollo fue observado ya por Tchang-Si (1931b), quien describió este caso como un ejemplo de condensación embriogénica al liberarse una larva sin concha, con el pie muy desarrollado y un velo bilobulado que desaparece rápidamente. A partir de nuestras muestras esperamos realizar próximamente una descripción más amplia y detallada de las larvas y los ejemplares juveniles de

*D. limbata*, del que se han observado también algunas muestras al microscopio de barrido, se han procesado otras con glutaraldehído, tinción May-Grundwald/Giemsa y Sudán Negro B, y hemos obtenido fotografías *in vivo*. El tamaño de los huevos y la duración del desarrollo embrionario de *D. limbata* encajan con los valores para los que Todd (1981) y Hadfield y Miller (1987) indican un desarrollo directo. Ros (1981) ya clasificó esta especie como de desarrollo directo.

La tercera de las puestas de estos ejemplares, más pequeña que las demás, era deforme, de coloración naranja pero con los huevos dispuestos en grupos e irregularmente repartidos a lo largo de la cinta mucosa. De esta puesta no se obtuvieron larvas ni juveniles.

Los ejemplares juveniles fueron mantenidos en acuario en las mismas condiciones que las puestas (ver apartado de metodología). Unos 100 ejemplares se congelaron para su estudio químico, y otros se traspasaron a un acuario de tamaño superior a los usados con las larvas (4 litros), mientras que otros se mantuvieron en pequeños recipientes con arena con recubrimiento bacteriano. En este último caso se observaron ejemplares vivos hasta 102 días después de la puesta, en que se midió un ejemplar de 584  $\mu\text{m}$  de longitud máxima.

Con algunos de los ejemplares se realizó un experimento para tratar de averiguar si podían alimentarse y sobrevivir en un recipiente con arena con detrito algal. Se pusieron 20 ejemplares en cada una de las tres réplicas del experimento, y se realizaron otros tres controles. Los resultados de este experimento se exponen en la Figura 5.37. Puede observarse que los ejemplares mantenidos con detrito algal presentan un tamaño considerablemente mayor al final del experimento que los ejemplares mantenidos en un acuario control. Sin embargo los ejemplares que no se movieron del recipiente inicial eran mayores que los dos anteriores al finalizar el experimento. Puede observarse en la gráfica que, a parte de una disminución de tamaño inicial, los ejemplares con el posible alimento crecieron ligeramente del tercer al sexto día de experimento, para iniciar una nueva disminución de tamaño, como los ejemplares del control, por lo que esto podría ser debido a causas ajenas al experimento (al igual que el resto de

ejemplares, ya que ninguno se desarrolló posteriormente). Algunos de los juveniles fueron traspasados a los acuarios del laboratorio húmedo, con agua de mar corriente, protegidos por una red de malla fina, pero tampoco sobrevivieron.

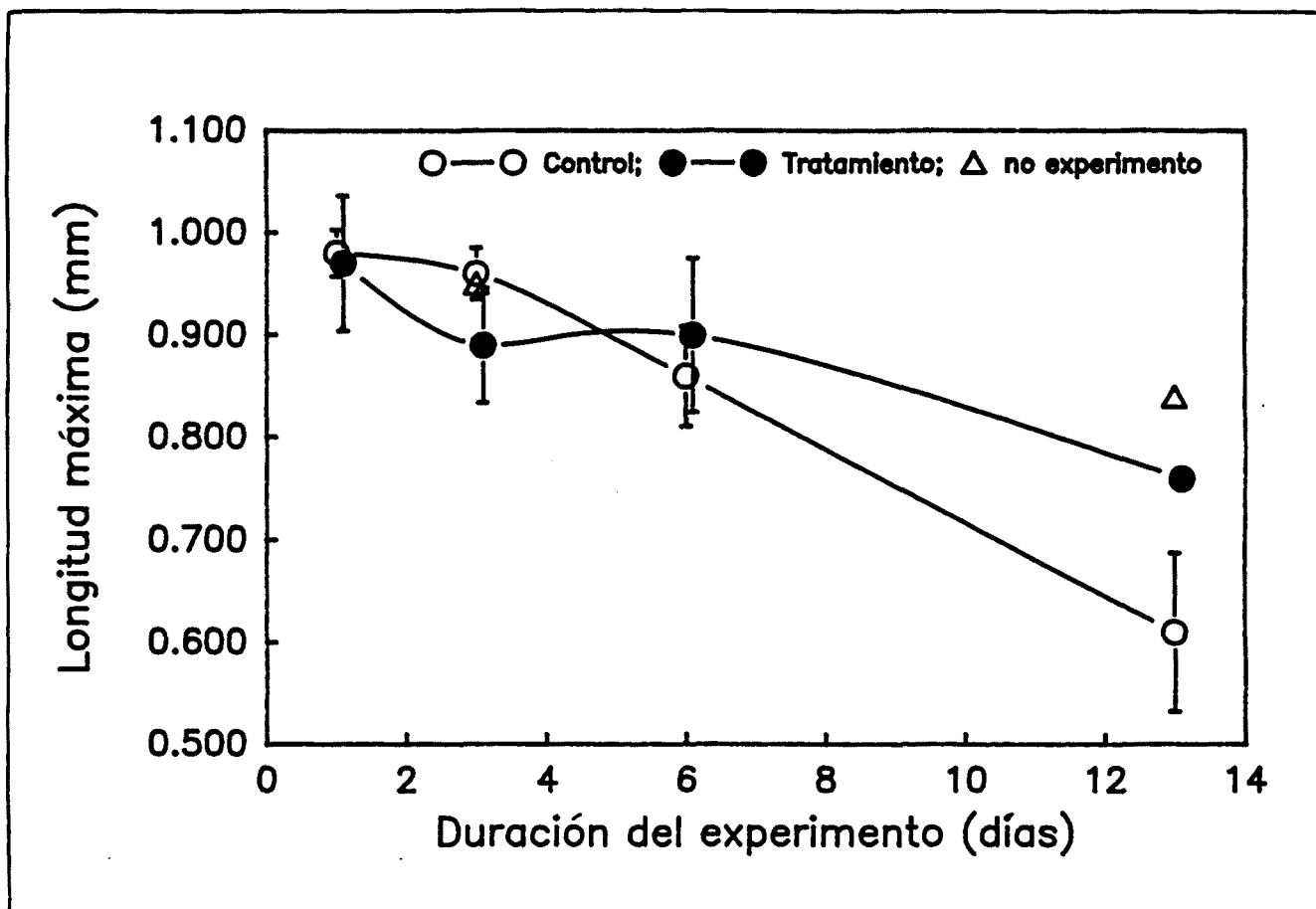


Figura 5.37. Resultados del experimento de alimentación con los juveniles de *D. limbata*.

#### 5.14.3.2. Análisis químico.

##### Productos obtenidos: Estructura.

Ejemplares de Formentera y Cadaqués. Estos ejemplares presentaban problemas de conservación, sin embargo pareció claro por las placas

cromatográficas que presentaban polygodial en el extracto de la parte externa. Los dos ejemplares fueron extraídos con acetona por separado y disecados en parte externa y vísceras. El extracto del ejemplar de Cadaqués pesaba 28.4 mg, y su peso seco era de 73.9 mg.

Ejemplares de Miseno. Se pretendía averiguar dónde se localizaban en el organismo los sesquiterpenoides drimánicos. Un estudio cualitativo preliminar con varios ejemplares y 2 puestas, reveló que los ésteres (y el euryfurano) se hallaban exclusivamente en la glándula hermafrodita y en las puestas, mientras que el polygodial se localizaba en el borde del manto, y otro producto se hallaba exclusivamente en las branquias. Esto se observó mediante TLC, pero era necesario realizar un estudio al NMR para demostrarlo.

Se incluye a continuación, en la Tabla 5.75. un resumen de los resultados de 13 ejemplares disecados y de 7 puestas, calculados como media.

	Peso seco extr. acetónico extr. etéreo		
Branquias	10.2	4.6	2.3
Borde del manto	32.2	4.0	3.3
Resto del manto	390.8	107.5	1.0
Glándula ptialina	5.9	1.7	-
Glándula hermafrodita	31.7	10.2	6.0
Glándula digestiva	62.1	18.7	4.0
Resto de vísceras	82.1	32.7	14.0
Puestas	126.7	13.5	1.7
Todos los valores son mg/animal o mg/puesta.			

Tabla 5.75. Análisis químico de 13 ejemplares de *D. limbata* procedentes de Miseno.

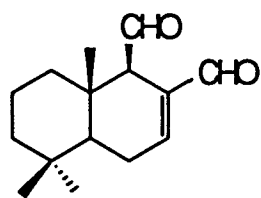
Los ésteres drimánicos se hallaban exclusivamente en algunas secciones: en los extractos etéreos de las branquias, glándula hermafrodita y puestas. Estos extractos se purificaron en columnas de sílice (disolvente: éter de petróleo-éter etílico 98-2 hasta llegar a 1-1). Los espectros NMR de las principales fracciones de la glándula hermafrodita y las puestas resultaron

ser idénticos a los descritos para los ésteres (Cimino *et al.*, 1981b). La cantidad de ésteres aislada fue de 1 mg/animal y 0.5 mg/animal, para la glándula hermafrodita y las puestas respectivamente. El producto aislado de las branquias fue identificado como un nuevo éster drimánico, la 7-deacetoxylepupuana (sus datos espectrales se incluyen en el anexo 10.I), hallándose 0.2 mg por animal. La fórmula de este compuesto y las del resto de metabolitos de *D. limbata* se pueden ver en la Figura 5.38. Por su estructura, la 7-deacetoxylepupuana podría ser el precursor de la lepupuana y el polygodial. Del borde del manto se aislaron 3.1 mg de polygodial por animal.

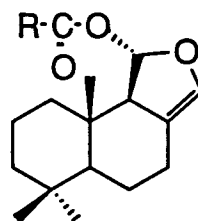
En la glándula ptialina se detectó la presencia de un producto de interés (rf 0.15 en benceno-éter etílico 9-1) que fue aislado, pero debido a su escasa cantidad no pudo ser identificado. La glándula sanguínea, que fue estudiada por separado en algunos ejemplares, no presentó sustancias de interés. Es destacable el hecho de que ni en el aparato digestivo anterior ni en el hepatopáncreas se han detectado en ningún caso metabolitos de esponjas (al contrario de los que se verán en *D. grandiflora*). Este hecho es ampliable a los ejemplares de Formentera, si bien en la población de Miseno es en la que se ha trabajado con un mayor número de ejemplares.

Cabe destacar que la cantidad de polygodial extraída de distintos ejemplares es variable, y así, de 3 ejemplares de Enero de 1989 se obtuvieron 3 mg de polygodial del extracto del manto, mientras que en 2 ejemplares capturados simultáneamente se hallaron 17 mg en el extracto del manto. En dos ejemplares de Febrero de 1990 se halló 1 mg de polygodial en el extracto del borde del manto. El borde del pie fue analizado separadamente en dos ejemplares de Febrero de 1990, sin que se detectara en el extracto la presencia de polygodial.

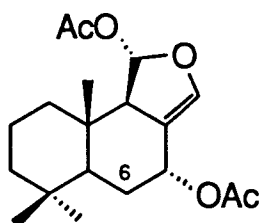
Por otro lado, para obtener los esteroides del manto y las vísceras para su estudio mediante GC, se extrajeron con acetona dos ejemplares, de los que se obtuvieron (tras separación en columna y posterior acetilación) 2 mg de esteroides acetilados del manto de cada uno, y 3 y 6 mg de esteroides acetilados de las vísceras respectivas. Los resultados de estos análisis comparativos (y otros detalles) se exponen en el capítulo dedicado a *D. grandiflora*.



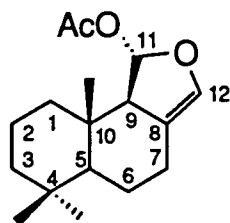
polygodial



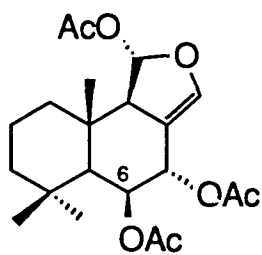
ésteres drimánicos



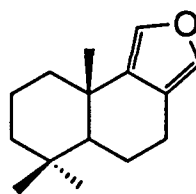
olepupuana



7-deacetoxy-olepupuana



6- $\beta$ -acetoxy-olepupuana



euryfurano

Figura 5.38. Fórmulas de las sustancias halladas en *D. limbata*.



La distribución de estas sustancias en el organismo se resume en la Tabla 5.76. Puede observarse la localización específica de los metabolitos en determinadas partes del animal. Todos los productos fueron detectados mediante TLC e identificados mediante NMR.

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
Borde del manto	++	+			
Branquias			+		
Glándula hermafrodita				+++	+
Puestas				+++	+

(1)= polygodial (derivado de la olepupuana durante el tratamiento); (2)= olepupuana; (3)= 7-deacetoxy-olepupuana; (4)= ésteres drimánicos; (5)= euryfurano. += presente; ++= abundante; +++= muy abundante. La ausencia se indica sin signos.

Tabla 5.76. Distribución de los sesquiterpenos drimánicos en las distintas secciones anatómicas de *D. limbata*.

El euryfurano se obtiene fácilmente a partir de los ésteres drimánicos mediante termólisis (sobre la placa cromatográfica). Su presencia en el animal en vivo es cuestionable, ya que es posible que sea solamente el resultado de la transformación de los ésteres. Este producto se describió en *Euryspongia* sp (Hochlowski *et al.*, 1982) y se ha hallado también en algunas especies de *Hypselodoris* (ver apartado 6.1.3.). Los ésteres drimánicos se hallaron también en otras especies relacionadas (Okuda *et al.*, 1983).

Análisis directo mediante NMR de los metabolitos del manto. Con este análisis se pretendía ver si el polygodial estaba realmente presente en el animal vivo o no. Para ello, un ejemplar fue tratado con 5 ml de C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>. El extracto se pasó por Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para eliminar el agua y se hizo rápidamente el espectro <sup>1</sup>H-NMR. Este espectro se comparó con los espectros de la olepupuana y la 6-β-acetoxy-olepupuana. Los tres espectros se muestran en la Figura 5.39. Puede verse como las señales en el espectro muestran la presencia de olepupuana y 6-β-acetoxy-olepupuana, mientras que no se

detecta el polygodial. Esto confirma que la olepupuana es la forma existente en el animal vivo, y no el polygodial, que es tóxico para el propio animal (Cimino *et al.*, 1985c). Probablemente la transformación se produce en el exterior, coincidiendo con el ataque de algún depredador.

Análisis de ejemplares juveniles. Unos 100 juveniles obtenidos del cultivo de una puesta en acuario (como se ha explicado anteriormente) se extrajeron con acetona tras un período de congelación. Las placas en solventes varios mostraron la posible presencia de un producto tipo 7-deacetoxy-olepupuana. Se hizo una comparación sobre placa con el extracto de la branquia de un adulto y con el producto de referencia aislado, y sobre placa se vió que era el mismo producto. No se detectó la presencia de olepupuana, ni polygodial, ni ésteres drimánicos.

Dos ejemplares juveniles procedentes de Miseno (6-IX-92), de unos 2 cm de longitud máxima, fueron analizados con el objetivo de ver si en estos la 7-deacetoxy-olepupuana era el producto mayoritario o bien si aparecía polygodial. Se disecaron en manto, vísceras y branquias y se observó una distribución de sesquiterpenos drimánicos similar a la de los ejemplares adultos. Las placas cromatográficas en benceno-éter etílico 8-2, revelaron que la 7-deacetoxy-olepupuana (identificada mediante comparación con el producto de referencia) se localizaba exclusivamente en las branquias, mientras que se detectaba algo de polygodial en el extracto del manto. Como era de esperar los ésteres drimánicos no aparecían, ya que estos ejemplares no habían madurado sexualmente y su glándula hermafrodita no estaba desarrollada.

Secreciones externas. Se realizó un experimento recogiendo la secreción mucosa de varios ejemplares de Miseno durante 10 días, y en ningún caso se detectó olepupuana ni polygodial, (tan solo se detectaba si se contactaba con la superficie del manto del animal).

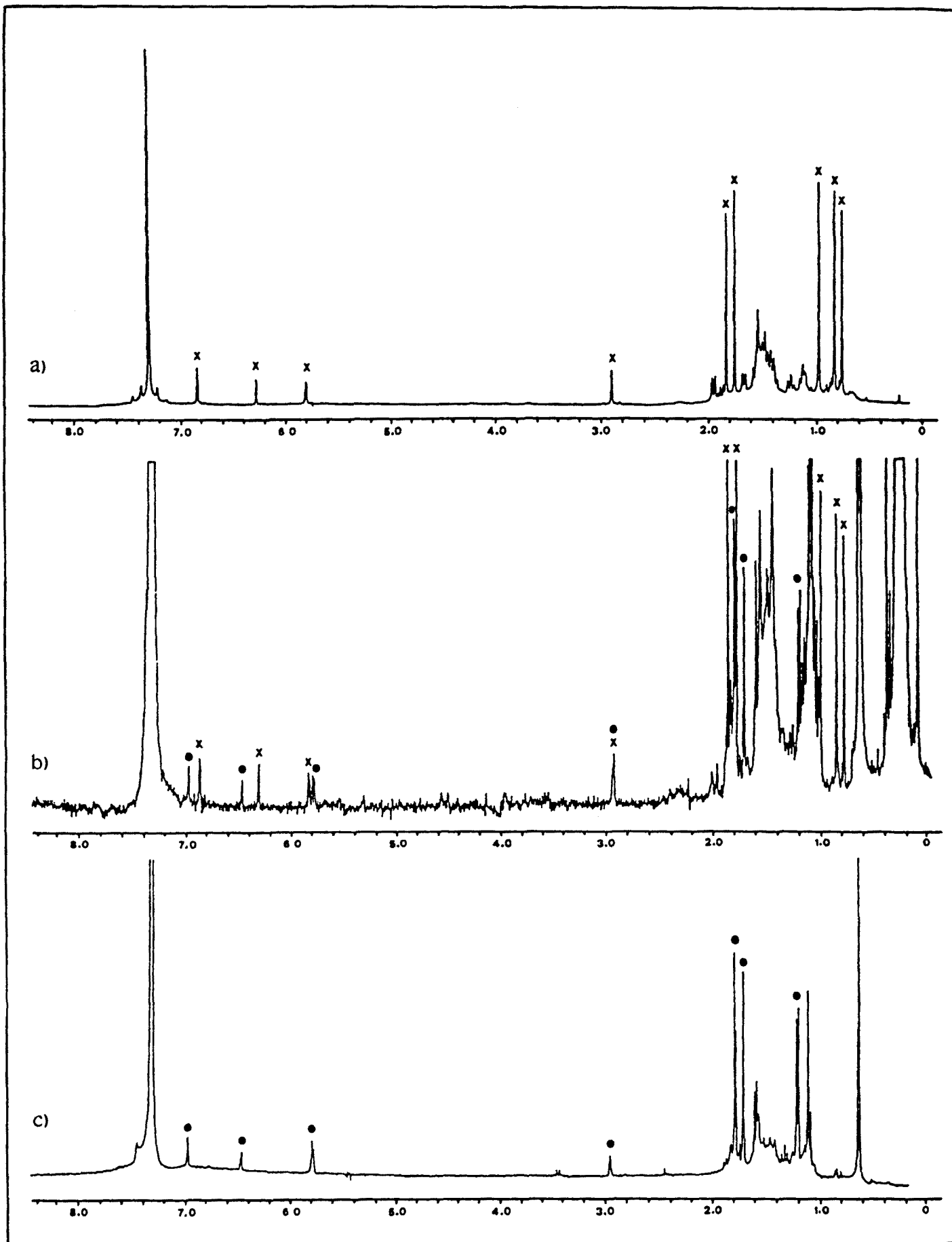


Figura 5.39. Espectros de NMR de a) olepupuana, b) extracto  $C_6D_6$  del manto de *D. limbata*, y c) 6- $\beta$ -acetoxy-olepupuana.