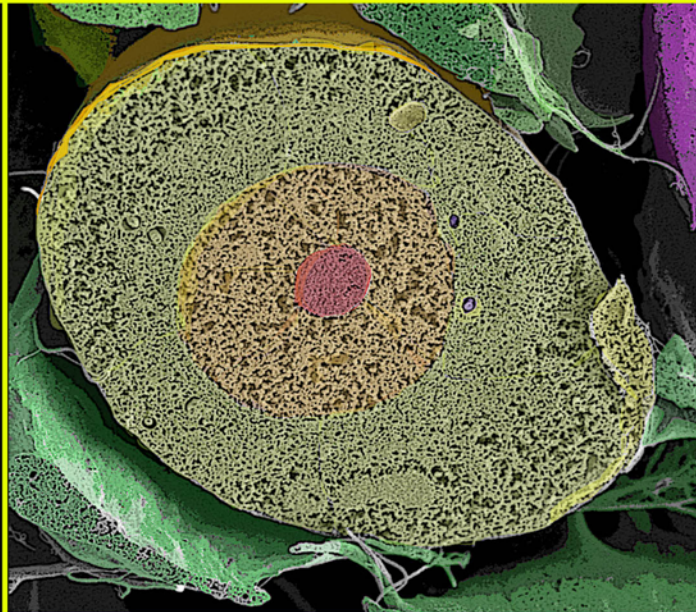


Departamento de Biología Celular
Universidad de Barcelona

Sexual reproduction in demosponges: ecological and evolutive implications

Reproducción sexual en demosponjas:
implicaciones ecológicas y evolutivas



Ana Riesgo Gil

Barcelona 2007

Resumen:

■ Introducción

- **Características generales de la estructura de esponjas:**

El phylum Porifera (esponjas) consta de unas 6000 especies, de las cuales tan sólo unas 150 son dulceacuícolas, mientras que el resto son marinas. Las esponjas son criaturas ubicuas que habitan el bentos de todos los océanos en todas las latitudes, desde la zona intermareal hasta las profundidades abisales. El phylum está subdividido en tres clases: Calcarea (calcáreas), Hexactinellida (hexactinélidas) y Demospongiae (demosponjas). Un 85% de las esponjas marinas pertenecen a esta última. Las demosponjas son eminentemente marinas, con la notable excepción de la familia Spongillidae, que son dulceacuícolas.

Las esponjas están consideradas como el phylum más basal de los metazoos, ya que la mayor parte de sus características parecen primitivas. Los metazoos, a su vez, son un grupo monofilético (Zrzavy et al. 1998).

Los poríferos son animales diblásticos, aunque sus hojas celulares sean difícilmente homologables a las del resto de los metazoos. Son sésiles, aunque algunas son capaces de moverse (hasta 4 mm diarios) en condiciones de laboratorio (e.g., Bond & Harris 1998; Maldonado & Uriz 1999). Carecen de órganos, y sus células realizan gran variedad de funciones (Rupert & Barnes 1995). El cuerpo está limitado por una capa de células aplanadas llamadas exopinacocitos, formando el exopinacodermo. Anatómica y fisiológicamente, los tejidos de la mayoría de las esponjas (excepto las esponjas carnívoras) están organizados en torno a un sistema de canales acuíferos, que están limitados por endopinacocitos (también aplanados). El agua entra en el cuerpo de

la esponja a través de multitud de aberturas (ostia) hasta los canales inhalantes que, a su vez, desembocan en las cámaras coanocitarias. Estas cámaras, repartidas más o menos homogéneamente por el cuerpo de la esponja, están formadas por células flageladas denominadas coanocitos, con cuyo batido flagelar dirigen la corriente de agua para captar el oxígeno y las partículas y bacterias de las que se alimentan. La corriente de agua sale del cuerpo de la esponja a través de los ósculos. Debajo del exopinacodermo queda una región (mesohilo) con una considerable variabilidad en su organización, que se modifica en su estructura, en ocasiones enormemente, en respuesta a diversos factores. Esta región consiste en una matriz extracelular de fibras (colágeno y/o espongina), un esqueleto de espículas (silíceas o calcáreas) y una población más o menos abundante de células ameboideas con diversas funciones (Harrison & De Vos 1991).

Sin embargo, no todas las esponjas siguen el patrón estructural detallado arriba. La familia Cladorhizidae (de la clase Demospongiae) carece de sistema acuífero o lo tiene muy reducido, y, por tanto, sus representantes se alimentan por carnivoría: capturando y digiriendo animales enteros. ¿Cómo lo hacen? Utilizan unas espículas de tamaño pequeño (aproximadamente 10 μm de máximo diámetro) llamadas anisoquelas, que tienen forma de gancho y que están repartidas por la superficie de la esponja como un velcro. En este velcro se quedan retenidas las sedas de pequeños crustáceos. Las células de la esponja envuelven a la presa y la digestión se realiza extracelularmente gracias a bacterias simbiotas que viven en el interior de la esponja, y que están contenidas en células denominadas bacteriocitos (Vacelet & Duport 2004).

- **Aproximación a la reproducción de las esponjas:**

Biología reproductiva de esponjas:

La clase con mayor número de representantes vivos actualmente son las demosponjas. Por eso, el estudio de su biología reproductiva es un reto que, si bien entraña multitud de dificultades, parece más fácilmente abordable, puesto que hay más disponibilidad de poblaciones. La clase Demospongiae exhibe una aparente uniformidad estructural e histológica que contrasta con la diversidad de modelos reproductivos que desarrolla: gonocorismo, hermafroditismo sucesivo y hermafroditismo contemporáneo.

Mientras que la mayor parte de las esponjas gonocóricas son ovíparas (y por tanto de fecundación externa), las esponjas hermafroditas son vivíparas (de fecundación interna) (ver las revisiones de Fell 1974 y Simpson 1984). Sin embargo, hay algunos ejemplos de esponjas ovíparas y hermafroditas dentro de las demosponjas (Scalera-Liaci et al. 1971, 1976; Piscitelli 1997), aunque éstos necesitan ser revisados en profundidad, ya que algunas especies de los mismos géneros estudiados en aquellos trabajos resultaron ser dioicas (Watanabe 1978; Reiswig 1973). El desarrollo indirecto (por medio de larvas) es el más frecuente, pero también hay algunos casos de desarrollo directo en demosponjas (Watanabe 1978; Sarà et al. 2002).

La duración de los ciclos reproductivos también exhibe mucha variabilidad. Existen esponjas con ciclos gametogénicos largos, de 5 meses a un año completo en el caso de la oogénesis (Lévi 1956; Fell 1974, 1976; Scalera-Liaci & Sciscioli 1967; Ayling 1980; Reiswig 1983; Corriero et al. 2007), mientras que otras consiguen completar la oogénesis en muy pocos meses (Scalera-Liaci et al. 1973; Wapstra & van Soest 1987; Fromont 1994, 1999; Usher et al. 2004), siendo este tipo más frecuente.

El inicio de estos ciclos en las esponjas está mediado, en la mayoría de los casos, por factores ambientales, entre los cuales el que mayor peso adquiere es la temperatura (Fell 1976), al igual que en la mayoría de animales (Kinne 1970). En gran cantidad de casos son las altas temperaturas las que disparan o aceleran la gametogénesis o la liberación de las larvas (Hartman 1958; Storr 1964; Fell 1974, 1976; Scalera-Liaci & Sciscioli 1975; Johnson 1978; Tanaka-Ichihara & Watanabe 1990; Kaye & Reiswig 1991; Fromont 1994, 1999; Fromont & Bergquist 1994; Witte et al. 1994; Ereskovsky 2000; Mercurio et al. 2007), aunque la disminución de temperaturas también puede actuar de la misma manera (Fromont & Bergquist 1994; Corriero et al. 1998; Ereskovsky 2000). En algunos casos, la gametogénesis parece ser un proceso independiente de la temperatura, respondiendo más a otro tipo de estímulos (Elvin 1976; Witte 1996; Corriero et al. 1998). Este abanico de respuestas tan diferentes frente a los estímulos térmicos pone de manifiesto la necesidad de estudios exhaustivos de la dinámica reproductiva de las esponjas y su potencial relación con factores ambientales, ya que diferentes respuestas a cambios ambientales podrían conllevar cambios en la estructura de las poblaciones (Lawrence & Soame 2004).

Ultraestructura de la gametogénesis de esponjas:

La gametogénesis en esponjas a nivel ultraestructural ha sido muy estudiada durante las décadas de los 70, 80 y 90. Dado que los estudios ultraestructurales, tanto histológicos como citológicos, se deben realizar siempre con muestras fijadas, la aproximación al problema del origen de los gametos (origen somático) es casi puramente especulativa (Tuzet 1964, 1970; Gaino et al. 1984; Paulus 1989).

La oogénesis es uno de los procesos, dentro de la reproducción sexual, más documentados en esponjas. Se ha descrito en detalle tanto en demosponjas (Fell 1974; Simpson 1984; Barthel 1986; Kaye 1991; Witte & Barthel 1994; Lepore et al. 1995; Corriero et al. 1996; Usher et al. 2004; Mercurio et al. 2007) como en calcáreas (Fell 1974; Simpson 1984; Gallissian 1988; Gallissian & Vacelet 1992; Anakina & Drozdov 2001). En hexactinélidas, sin embargo, se ha descrito tan sólo la oogénesis de *Oopsacas minuta* (Boury-Esnault et al. 1999). Es un proceso relativamente sencillo y uniforme en todas las clases de esponjas, siendo la principal diferencia las células de las que provienen los oocitos en cada caso, el tipo de vitelogénesis (auto-sintética o hetero-sintética) y la duración del proceso. El origen de los gametos son células somáticas en todos los casos, ya que las esponjas carecen de línea germinal predeterminada (Extavour & Akam 2003). Estas células somáticas pueden ser coanocitos tanto en demosponjas como en calcáreas (Diaz et al. 1975; Gaino et al. 1986; Gaino et al. 1987; Sarà 1974) o arqueocitos (Leveaux 1941; Lévi 1956; Simpson 1986; Saller & Weissenfels 1985). En hexactinélidas, en cambio, son sólo los arqueocitos los que darán lugar a los gametos, ya que los coanocitos son células anucleadas (Boury-Esnault et al. 1999). Durante la oogénesis el oocito va aumentando de tamaño y completando la vitelogénesis, tanto por autosíntesis, como ayudado por células nutricias (ver Fell 1974 y Simpson 1984 para revisiones del proceso).

La espermatogénesis, en comparación con la oogénesis, ha sido menos estudiada, debido a las dificultades de muestreo, en parte derivadas de la escasa duración de este proceso. Los gametos masculinos, tanto en demosponjas como en calcáreas derivan de los coanocitos (Reiswig 1983; Simpson 1984; Boury-Esnault & Jamieson 1999), si bien es cierto que en calcáreas también se han sugerido como posibles células originarias los arqueocitos (Fincher 1940; Lévi 1956). En hexactinélidas, dado que los coanocitos son células anucleadas, los espermatozoides se

crean a partir de agregados de arqueocitos (Okada 1928; Boury-Esnault et al. 1999). Los espermatozoides en los poríferos están contenidos en un quiste espermático, cuya formación puede ser sincrónica a nivel poblacional o no (ver las revisiones de Reiswig 1983 y Boury-Esnault & Jamieson 1999). El patrón general es que un coanocito se separa de la cámara coanocitaria y comienza a dividirse para dar lugar a un quiste lleno de espermatogonias, aunque también es posible que una cámara se transforme completamente en quiste espermático (Fell 1974). Las transformaciones sufridas por las espermatogonias hasta convertirse en espermatozoides maduros son muy parecidas a las descritas para la mayoría de los animales (Alberts et al. 1994).

El esperma de esponjas está considerado como primitivo, asumiendo que tiene forma redondeada y que carece de acrosoma (Baccetti 1984). Sin embargo, el esperma maduro de las especies observadas hasta la fecha es morfológicamente muy variado. Además, en algunas especies se han observado complejos y vesículas proacrosomales (Tuzet 1932; Tuzet & Pavans de Ceccatty 1958; Tuzet & Paris 1964; Reiswig 1970; Diaz & Connes 1980), mientras que un verdadero acrosoma tan sólo se ha documentado ultraestructuralmente en *Oscarella lobularis* (Baccetti et al. 1986) y *Pseudocortidium jarrei* (Boury-Esnault & Jamieson 1999). Cuál es el significado funcional de la presencia de un acrosoma en esponjas es todavía un campo por estudiar, así como la importancia filogenética de tal estructura y de la morfología del espermatozoide.

La liberación de gametos y la fecundación:

Una vez formados los gametos, éstos han de ser liberados a la corriente de agua. La liberación sincrónica de gametos en el mar es difícil de observar, ya que implica un seguimiento exhaustivo de los ciclos reproducción y un esfuerzo intensivo de muestreo. Esta liberación ha sido tan sólo observada, tanto en el campo como en el laboratorio, cuando se producía de manera espontánea, y no inducida, por especies ovíparas. Las especies vivíparas tan sólo liberan esperma, ya que los oocitos los retiene la madre en espera de espermatozoides que los fecunden. Por tanto la liberación de oocitos sin fecundar ha sido documentada sólo en especies ovíparas, y además, en muy contadas ocasiones (Watanabe 1978; Hoppe & Reichert 1987). Sin embargo, la liberación de embriones muy tempranos ha sido observada en varias especies (Borojevic 1967; Lévi 1951, 1956; Sidri et al. 2005). La liberación de esperma también ha permanecido

esquiva, siendo escasos los estudios que existen al respecto (Reiswig 1970, 1976; Hoppe & Reichert 1987; Ritson-Williams et al. 2004), la mayoría de ellos en aguas tropicales.

Los tipos de fecundación en invertebrados marinos son muy diversos. En resumen, tanto la fecundación interna como la externa se dan con la misma frecuencia entre los invertebrados marinos. La fecundación externa (que implica a “broad casters”, es decir, individuos que liberan tanto oocitos como esperma al agua) se da en poríferos (Fell 1974, 1989; Simpson 1984), cnidarios (Fautin et al. 1989), nemertinos (Cantell 1989), priapulidos (Nørrevang & van der Land 1989), sipuncúlidos (Rice 1989), algunos moluscos (Brahmachary 1989), equiúridos (Davis 1989), algunos anélidos (Schroeder 1989), braquiópodos (Chuang 1990) y equinodermos (Spinelli & Albanese 1990). La fecundación interna, sin embargo, recoge muchos más tipos de ejecución. La copula se lleva a cabo por gnatostomúlidos (Mainitz 1989), nematodos (Bird & Sommerville 1989) o acantocéfalos (Crompton 1989). Sin embargo, hay otro tipo de fecundación interna menos frecuente, en la que están implicados los “sperm casters” (individuos que liberan esperma al agua pero no los oocitos, que son retenidos por la madre). Este tipo de fecundación aparece en poríferos, junto con la fecundación externa, (Fell 1974, 1989; Simpson 1984) y en ascidias (Cloney 1990; Pemberton et al. 2003).

Los datos sobre fecundación en esponjas son también muy escasos. El éxito de la fecundación se ha estimado tan sólo para la demosponja *Xestospongia bergquistia*, encontrando valores muy altos (Fromont y Bergquist 1994). La fecundación externa se ha observado, obviamente tan sólo en condiciones de laboratorio, en *Chondrosia reniformis* (Lévi & Lévi 1976) y dos especies de *Tetilla* (Watanabe 1978). Sobre la fecundación interna se sabe un poco más. Ésta se ha documentado fehacientemente mediante microscopía óptica en especies calcáreas (Tuzet 1947, 1964; Gaino et al. 1987; Nakamura et al. 1988; Gallisian 1989; Anakina & Drozdov 2001) y algunas especies de demosponjas (Tuzet 1930; Tuzet & Pavans de Ceccatty 1958; Tuzet & Paris 1964). Sin embargo, se ha descrito ultraestructuralmente tan sólo en especies calcáreas (Gaino et al. 1987; Nakamura et al. 1988; Gallisian 1989). La fecundación, en todos estos casos, está mediada por coanocitos que actúan como células transportadoras. El coanocito capta el espermatozoide que entra en los canales exhalantes gracias a la corriente de agua. El espermatozoide al entrar en el coanocito sufre un proceso de desestructuración, en el que prácticamente todo el citoplasma se digiere, quedando

solamente el núcleo y restos del flagelo y de las mitocondrias. El coanocito se separa de la cámara coanocitaria y transporta el espermatozoide (espermioquiste) hasta el oocito, introduciéndolo junto con la célula transportadora hasta que se produce la fusión de ambos núcleos. Éste mecanismo de fecundación, en que el coanocito actúa como célula transportadora, se hizo extensible a todas las clases de esponjas, a pesar de que una descripción inequívoca del proceso sólo se ha proporcionado para calcáreas (Fell 1989).

Especies seleccionadas en el presente trabajo para estudiar diferentes características de su biología reproductiva:

La selección de las especies estuvo basada, principalmente, en la falta de información sobre su actividad reproductiva y la disponibilidad en el área de estudio. Todas las especies escogidas fueron demosponjas: *Chondrosia reniformis*, *Axinella damicornis*, *Crambe crambe*, *Asbestopluma occidentalis*, *Raspaciona aculeata*, *Corticium candelabrum* y *Petrosia ficiformis*. Éstas especies se muestrearon en el Mar Mediterráneo (Costa Brava, Mediterráneo Occidental), y, en un caso, en la costa Pacífica Noroccidental de Canadá.

Las especies Mediterráneas eran: *Chondrosia reniformis*, *Axinella damicornis*, *Crambe crambe*, *Raspaciona aculeata*, *Corticium candelabrum* y *Petrosia ficiformis*. Todas ellas son habitantes comunes del bentos litoral de la costa catalana, y se encuentran a profundidades entre 5 y 30 metros, normalmente en extraplomos, paredes verticales, cuevas y grietas. Tan sólo *R. aculeata* aparecía en rocas de superficie pseudo-horizontal, parcial o totalmente ocultas bajo una capa de sedimento. Además, *Crambe crambe* atrajo nuestra atención por ser la esponja más abundante de la costa catalana, llegando a ser dominante en la comunidad en muchos lugares (Maldonado et al. 2005).

Asbestopluma occidentalis también es una especie bentónica, carnívora, que se suele encontrar a grandes profundidades, aunque existen algunas poblaciones a algo más de 30 metros de profundidad en la Isla de Vancouver.

En la selección de especies también se tuvo en cuenta que cada una perteneciera a un orden de demosponjas diferente (excepto *Crambe crambe*, *Asbestopluma occidentalis* y *Raspaciona aculeata*, que pertenecen ambas al orden Poecilosclerida), con lo que se cubriría la máxima variabilidad, en la medida de lo posible, en cuanto a estrategias reproductivas dentro de la clase Demospongiae.

■ ■ **Objetivos y resultados principales**

Para el estudio de la biología reproductiva de las 7 especies antes citadas se utilizaron técnicas tanto de microscopía óptica como de microscopía electrónica (de barrido y de transmisión).

Las muestras de las 6 especies mediterráneas fueron cogidas mensualmente durante dos años, marcando y siguiendo determinadas poblaciones para poder conocer a fondo sus ciclos de producción de gametos y conocer su sex ratio. Además se realizaron muestreos puntuales, aparte del seguimiento bianual, para poder rematar estudios que no pudieron completarse en ese periodo.

Las muestras de *Asbestopluma occidentalis*, sin embargo, fueron cogidas en dos meses puntualmente. Esto fue debido a que su recolección se produjo tan sólo durante dos campañas puntuales en la costa pacífica de Canadá (ver Capítulo 4).

Los 6 objetivos principales de la tesis se estructuraron siguiendo un orden que comprendía, en primer lugar, descripciones exhaustivas de los ciclos reproductivos de las especies seleccionadas (en los casos en los que fue posible), y después, estudios concretos de características especiales o peculiares de la biología reproductiva de determinadas especies, que no se conocían hasta ahora, o que su conocimiento era muy somero.

Objetivo 1. *Investigar los ciclos de reproducción sexual de demosponjas sublitorales mediterráneas y el efecto potencial de la temperatura sobre ellos.*

Capítulo 1. “Estudio de la relación entre la temperatura y la gametogénesis en demosponjas sublitorales: una previsión de los posibles efectos del cambio climático”

Durante 2 años consecutivos se estudió el ciclo de gametogénesis de 4 demosponjas mediterráneas (*Axinella damicornis*, *Corticium candelabrum*, *Raspaciona aculeata*, and *Chondrosia reniformis*), tratando de averiguar su relación con la temperatura del agua.

Tres de las especies mostraron un ciclo gametogénico anual caracterizado por un pico de producción de gametos; sin embargo, *Corticium candelabrum* mostró una producción continua de oocitos durante los dos años. Inesperadamente, la relación entre la dinámica de producción gamética y la temperatura variaba sustancialmente entre las especies, restándole apoyo a la creencia de que la producción de gametos está asociada al aumento estacional de temperaturas. Este aumento estacional de temperaturas disparó la producción de oocitos solamente en *Chondrosia reniformis*, aunque las máximas temperaturas coincidieron con la producción de oocitos en *Raspaciona aculeata* y de esperma en *Chondrosia reniformis*.

Por otro lado, la disminución estacional de temperaturas que sigue a la máxima alcanzada en verano desencadenó la oogénesis en *Axinella damicornis* y la espermatogénesis en *Raspaciona aculeata*. La espermatogénesis en *Axinella damicornis* comenzó después de un periodo de 5 meses de bajas temperaturas. Las bajas temperaturas también dispararon la espermatogénesis y aumentaron la producción de oocitos en *Corticium candelabrum*.

Todos estos hallazgos revelan que especies bien distintas de esponjas pueden diferir sustancialmente en sus estrategias de producción de gametos a pesar de compartir el hábitat y de estar sometidas al mismo ciclo térmico anual. Por lo tanto, si hemos de investigar los futuros efectos del cambio climático sobre comunidades bentónicas marinas, hay una necesidad urgente de mejorar y aumentar nuestro conocimiento de la relación especie-específica entre la gametogénesis y la temperatura en especies clave de esponjas.

Objetivo 2. *Explorar la reproducción sexual de especies comunes de demosponjas, mediante el estudio de la dinámica de su gametogénesis y embriogénesis. Escogemos especies tanto ovíparas como vivíparas para estudiar ambas estrategias reproductivas.*

Capítulo 2. “Dinámica de la gametogénesis, embriogénesis y liberación de larvas en una esponja homosclerofórida mediterránea”

Una vez estudiado, a grandes rasgos, el ciclo de producción de gametos de *Corticium candelabrum* en el Capítulo 1, quisimos profundizar en el mismo para

conocer aspectos más concretos de la reproducción sexual de esta esponja. Para ello, investigamos su ciclo reproductivo mediante microscopía óptica y electrónica.

La relación entre la temperatura del agua y la gametogénesis no resultó ser sencilla. La oogénesis, caracterizada por una larga fase de maduración de los oocitos, era continua, apareciendo nuevos oocitos cada mes del año. La máxima producción de oocitos se registró coincidiendo con el mínimo de temperatura. De la misma manera, la espermatogénesis comenzó en el mes más frío del año. El desarrollo embrionario y la liberación de larvas, sin embargo, estuvieron limitados a pocas semanas durante el aumento estacional de temperaturas y los meses más cálidos, respectivamente.

La esponja, al ser hermafrodita, poseía gametos femeninos y masculinos simultáneamente, si bien la maduración de los oocitos comenzaba varios meses antes (unos 6 o 7 meses) que la de los espermatozoides. Los gametos, tanto femeninos como masculinos, se encontraron muy próximos en el mesohilo. Las espermatogonias, ya flageladas, derivaron posiblemente de los coanocitos, y las oogonias de los arqueocitos, dadas sus respectivas similitudes.

Los oocitos, nucleolados, que al principio eran redondeados y medían aproximadamente 15 μm de diámetro, al madurar fueron adquiriendo una forma ovalada, terminando su crecimiento con un diámetro de 175 μm aproximadamente. Los oocitos maduros se rodearon de una capa de bacterias relativamente gruesa. Muchas de estas bacterias simbiotas sirvieron como alimento para el oocito, sin embargo otras fueron transferidas verticalmente a la larva. La espermatogénesis, que resultó ser muy parecida a la de animales superiores, produjo espermatozoides redondeados, provistos de un acrosoma en forma de C, y un sistema de anclaje para el flagelo. En compendio, el ciclo reproductivo, que además mostró un elevado éxito en la fecundación (99.3%) y una muy baja mortalidad durante el desarrollo embrionario, parece sutilmente afinado para mejorar la capacidad de competencia de esta esponja.

Capítulo 3. “Dinámica de la gametogénesis y de la liberación de gametos de *Petrosia ficiformis* (Porifera, Demospongiae)”

Durante dos años (2003-2005) se tomaron muestras de tejido de 5 individuos marcados de *Petrosia ficiformis* mensualmente, entre dos localidades del litoral catalán

(Blanes y Tossa de Mar), para estudiar el ciclo de reproducción sexual de la esponja utilizando técnicas de microscopía óptica y electrónica. *Petrosia ficiformis* es un organismo gonocórico, ovíparo y proterogínico, en el que la mitad de la población, aproximadamente, se reproduce una vez al año. Su oogénesis comenzó en Mayo en 2004, y en Julio en 2005, pero en ambos años terminó en Noviembre. Durante estos dos años no conseguimos detectar la espermatogénesis, a pesar de aumentar el tamaño muestral. Una vez conocido el ciclo de oogénesis, y para conseguir observar la espermatogénesis, en 2006 marcamos 25 individuos diferentes, de los cuales tomamos muestras durante tres semanas a finales de Noviembre y principios de Diciembre. Gracias a esto pudimos saber que la espermatogénesis era un proceso extremadamente rápido, que se produjo en 15 días, y que fue experimentado por la mitad de la población que en ese momento estaba reproductivamente activa. Además conseguimos observar la liberación de oocitos por parte de las hembras y recolectar parte de estos oocitos, que fueron llevados al laboratorio inmediatamente.

La oogénesis de *Petrosia ficiformis* siguió un patrón muy parecido al del resto de las esponjas. Los oocitos, nucleolados, crecieron desde 30 μm hasta 200 μm ; apareciendo al principio muy dispersos y distantes en el mesohilo, para terminar agregándose en grupos al final de la oogénesis. Alrededor del núcleo, en los oocitos jóvenes, se disponía un área perinuclear sin inclusiones vitelínicas, pero con un gran número de dictiosomas, numerosas pequeñas vesículas, grandes agrupaciones de mitocondrias y ribosomas libres. En el resto del citoplasma podían observarse, tanto en oocitos jóvenes como en maduros, gran cantidad de inclusiones vitelínicas multimembrana, de naturaleza heterogénea, y gránulos lipídicos. Los oocitos, ya completamente maduros, eran expulsados a los canales excurrentes y liberados individualmente. Adheridas a la superficie de los oocitos aparecían dos células muy pequeñas (10 μm), que fueron interpretadas como los corpúsculos polares.

La espermatozoides en *Petrosia ficiformis* derivaron de coanocitos, que aparecían con aspecto “hinchado”. Estos coanocitos dejaban la cámara y migraban al mesohilo donde se agrupaban y formaban los quistes espermáticos, rodeados de grandes bacteriocitos, que emitían prolongaciones para rodear al quiste. Además se formó un folículo celular de células aplanadas, que presentaban uniones simples. Los espermatozoides resultantes eran redondeados, con un flagelo que surgía de cuerpo basal (formado por un solo centriolo), con tres grandes mitocondrias y 20-30 vesículas

proacrosomales. Además, el núcleo, que era muy electrondenso, presentaba una zona menos electrondensa rodeándolo.

Los oocitos liberados en la primera semana de Diciembre de 2006 fueron depositados en placas de Petri con agua de mar sin filtrar, a una temperatura constante de 15°C. Algunos de ellos comenzaron a dividirse y se asentaron, sin que se observara ninguna larva nadadora. Los juveniles de esponja, que se mantuvieron en agua de mar durante 4 meses, crearon cámaras coanocitarias y formaron espículas típicas de la especie *Petrosia ficiformis*. Además de *P. ficiformis*, hay sólo otras 3 esponjas con desarrollo directo. Las razones por las que éstas esponjas muestran este tipo de desarrollo aún no están claras.

Objetivo 3. *Estudiar la reproducción sexual de una demosponja peculiar, la esponja carnívora Asbestopluma occidentalis, investigando las implicaciones que tiene para la reproducción la ausencia de sistema acuífero, el cual es de vital importancia para la reproducción en el resto de las esponjas.*

Capítulo 4. “Reproducción de una esponja carnívora: ¿cuáles son las implicaciones de la ausencia de sistema acuífero?”

Las esponjas normalmente producen, liberan y capturan los gametos a través de su sistema acuífero. La ausencia de coanocitos y de sistema acuífero en la esponja carnívora *Asbestopluma occidentalis* le ha llevado a utilizar mecanismos inusuales en su reproducción. El esperma consta de células alargadas, altamente especializadas. Éstas están empaquetadas en quistes espermáticos envueltos en varias capas de celulares y que contienen espículas con forma de forceps, situados en el tejido periférico de la esponja. Los espermatozoides maduros poseen vesículas proacrosomales en el polo anterior, y un canal citoplasmático para el flagelo (“ciliary pit”). Las agrupaciones de oocitos (de 4 a 5 en cada una) se desarrollan sincrónicamente, y además, dado que los embriones que aparecen también agrupados están en el mismo estado de desarrollo, la fecundación parece ser simultánea.

En el mismo individuo aparecen embriones en todos los estados de desarrollo. El desarrollo embrionario es holoblástico e igual; los blastómeros en los embriones de 2, 4, y 6 células son compactos, tienen tamaño y forma relativamente parecida, mientras que

en el estado de 16-células los embriones están formados por dos capas bien diferenciadas. Los embriones en los últimos estados de desarrollo presentan tres regiones celulares a lo largo del eje antero-posterior: el hemisferio anterior con células de naturaleza heterogénea, la región media con células aplanadas orientadas perpendicularmente al eje antero-posterior y embebidas en una matriz de colágeno, y la región posterior con células de tamaño más pequeño que las anteriores. Una capa de células multiciliadas, algo inusual en los poríferos, cubre este embrión completamente, salvo la región posterior.

El mecanismo de fecundación, inferido de la morfología y situación de los gametos y quistes espermáticos, es el siguiente: los quistes son expulsados con toda la envuelta celular de que constaban, y a su vez, son capturados intactos gracias a que los forceps quedan atrapados en las espículas de una esponja vecina. El quiste espermático es “roto” por las células de la esponja que intervienen en la digestión de las presas, y los espermatozoides liberados, por tanto, en el interior de la esponja. La forma alargada de los espermatozoides sugiere que podría estar diseñada para avanzar por el laxo mesohilo de la esponja, que es muy rico en colágeno. La llegada de un paquete espermático, de esta manera, llevaría a la fecundación simultánea de los grupos de oocitos.

A través de su desarrollo, los cladorhízidos revelan que los mecanismos de gametogénesis y embriogénesis, así como la estructura de los tejidos de las esponjas, pueden ser extremadamente versátiles, y que por tanto, las generalizaciones sobre los metazoos basales deben hacerse con precaución.

Objetivo 4. *Estudiar en detalle el origen y la maduración de células espermáticas atípicas de esponjas, que contrastan con la común morfología de espermatozoides descrita en la mayor parte de las esponjas.*

Capítulo 5. “Espermatogénesis del espermatozoide en forma de V de *Crambe crambe*”

Durante 2 años llevamos a cabo un muestreo no destructivo en una población mediterránea de la esponja hermafrodita *Crambe crambe* para examinar su espermatogénesis por medio de microscopía óptica y electrónica (MET). La espermatogénesis se desarrolló durante 3 meses en primavera, y más del 50% de la

población estuvo implicada en la formación de quistes espermáticos. Estos quistes espermáticos estaban rodeados de un folículo celular. Las espermatogonias flageladas derivaron de coanocitos que migraban al mesohilo. Los estados tempranos de la espermatogénesis mostraron la mayoría de las características que se dan habitualmente en esponjas; sin embargo, la espermiogénesis difirió en gran medida del proceso que se esperaba. Las espermátidas se alargaron extraordinariamente, formando un canal citoplásmico (“ciliary pit”) alrededor de la inserción flagelo, mientras que la porción proximal del axonema se dobló en un ángulo de 180° para producir, en un ejemplo destacable de homoplasia, un espermatozoide con forma de V sorprendentemente parecido al de algunos miembros del phylum Phoronida. Comparada con la de los espermatozoides de otros poríferos la organización interna del espermatozoide era atípica, constando de un núcleo alargado con la cromatina condensada helicoidalmente, un acrosoma cónico provisto de una barra acrosomal, y una única mitocondria conectada con el cuerpo basal por largas raíces estriadas. Estos descubrimientos establecen que el enthaquaspermatozoide (“enthaquaspermatozoon”) de las esponjas que liberan sólo esperma (“sperm-casters”) puede ser al menos de 2 tipos estructurales diferentes (“primitivo” y “modificado”), una condición dual que podría haber emergido en anticipación a la aparición de metazoos superiores. Por tanto, nosotros suponemos que la fecundación en *C. crambe* podría diferir del modelo general asumido para esponjas que liberan tan sólo esperma (“sperm-casters”). La forma de V del enthaquaspermatozoide provisto de acrosoma sugiere un diseño que favorece una penetración autónoma a través del denso mesohilo de la esponja hasta alcanzar los oocitos, más que una inclusión en células transportadoras ameboideas y un posterior transporte hacia el oocito.

Objetivo 5. *Estudiar las características de la oogénesis de dos especies de demosponjas ovíparas, teniendo en cuenta la similar morfología de sus oocitos y la diferente duración de sus ciclos reproductivos.*

Capítulo 6. “Ultraestructura de los oocitos de dos demosponjas ovíparas mediterráneas, *Axinella damicornis* and *Raspaciona aculeata*”

La dinámica de la oogénesis de dos demosponjas ovíparas, *Axinella damicornis* and *Raspaciona aculeata*, se conocía gracias al seguimiento de su ciclo reproductivo durante dos años consecutivos (ver Capítulo 1). Así, para estudiar la citología de la oogénesis a nivel ultraestructural se tomaron muestras de tejido de ambas esponjas a lo largo de todo su ciclo oogenético.

Tanto los oocitos de *Axinella damicornis* como los de *Raspaciona aculeata* presentaban numerosas similitudes, a pesar de que sus ciclos de maduración diferían en varios meses (3-5), siendo mucho más corta la oogénesis en *R. aculeata*. En primer lugar, los gametos femeninos de ambas especies se localizaban homogéneamente dispersos por todo el mesohilo de las hembras. Además, ambos oocitos presentaban una morfología muy parecida: los oocitos más jóvenes que pudimos observar eran de tamaños similares (30 μm en *Axinella damicornis* y 25 μm en *Raspaciona aculeata*), así como los oocitos maduros también eran muy parecidos en su tamaño final (150 μm en *A. damicornis* y 190 μm en *R. aculeata*). Ambos oocitos eran nucleolados, y presentaban una región perinuclear sin inclusiones vitelínicas en la que se situaban numerosos dictiosomas (más grandes en *R. aculeata*) con las cisternas orientadas paralelas a la membrana nuclear. Los oocitos de las dos especies emitían pseudópodos y microvilli. Sin embargo, las características del vitelo y el proceso de su formación eran bien diferentes en ambas especies.

El vitelo en *Axinella damicornis* se formaba predominantemente por autosíntesis, si bien se encontraron algunas (pocas) células nutricias en los alrededores de los oocitos en desarrollo, que contenían inclusiones vitelínicas muy parecidas a las encontradas en el citoplasma de los oocitos. La síntesis del vitelo estaba basada principalmente en la endocitosis de bacterias; cada bacteria era endocitada individualmente y más tarde se almacenaban en vesículas individuales que eran posteriormente fusionadas. En estas vesículas, que contenían varias bacterias (6-30), comenzaba un proceso de digestión, que daba a las vesículas un aspecto heterogéneo. En muchas ocasiones, se observaron complejos de varias vesículas cargadas de bacterias en digestión y material granular probablemente lipídico. El resultado de la digestión de

bacterias, y posiblemente de la adición de este material granular, eran vesículas vitelínicas de contenido granular electrodensos, formadas por 15 a 30 gránulos.

En cambio, en *Raspaciona aculeata*, la autosíntesis de vitelo era complementada en mayor medida por el transporte de inclusiones vitelínicas realizado por las células nutricias. El vitelo encontrado en *R. aculeata* presentaba dos morfologías diferentes, que probablemente respondían a diferentes estados de la síntesis del mismo. Los primeros estadios de la formación del vitelo presentaban la apariencia del vitelo típico encontrado en la mayoría de los animales: una “mezcla” de componentes electrodensos y electrolucidos, que podrían corresponder a material proteico y lipídico, envueltos por una membrana. Sin embargo, en el oocito maduro se observaban inclusiones de vitelo electrodensos con aspecto más o menos heterogéneo.

En conclusión, la diferente duración de los ciclos de ovogénesis puede ser debida a los diferentes tipos de formación del vitelo observados en ambas especies. Mientras que la vitelogénesis basada principalmente en la autosíntesis del vitelo derivada de la digestión de bacterias en *Axinella damicornis* puede alargar el proceso de maduración del oocito, el frecuente transporte de inclusiones vitelínicas, junto con la propia autosíntesis del vitelo en *Raspaciona aculeata*, puede haber dado como resultado un proceso de ovogénesis más corto.

Objetivo 6. *Investigar los mecanismos usados por las demosponjas para eliminar el espermatozoide remanente en los quistes después de la liberación, siendo estos mecanismos muy comunes en otros invertebrados y vertebrados.*

Capítulo 7. “Auto-depredación de espermatozoide en esponjas: el papel de las células fagocíticas móviles en el quiste espermático de dos demosponjas, *Raspaciona aculeata* and *Petrosia ficiformis*”

Tras el estudio, mediante microscopía electrónica de transmisión, de múltiples quistes espermáticos de las demosponjas *Raspaciona aculeata* y *Petrosia ficiformis*, antes y después de la liberación de espermatozoide, nos dimos cuenta de la presencia de células fagocíticas móviles en el interior de los quistes espermáticos de ambas esponjas. Estas células estaban fagocitando células espermáticas en ambos casos.

En el interior de los quistes espermáticos de *Raspaciona aculeata* que contenían espermatoцитos secundarios encontramos células fagocitando espermatoцитos. Éstas células, que podían ser ameboides, aunque eran aplanadas en la mayoría de los casos, eran nucleoladas. En su citoplasma contenían numerosos fagosomas (inclusiones derivadas de la fagocitosis) y espermatoцитos secundarios englobados que después digerían. Su extraordinario parecido con las células foliculares, de aspecto aplanado y que también presentaban un núcleo nucleolado y múltiples fagosomas, nos llevó a sugerir que posiblemente algunas de éstas células podrían haber migrado desde el folículo al interior de la célula y así poder fagocitar espermatoцитos, para luego volver a la pared del quiste espermático.

En *Petrosia ficiformis* también encontramos células fagocíticas móviles englobando esperma (esta vez maduro), pero esto ocurría exclusivamente después de la liberación de esperma. En los quistes espermáticos que contenían esperma, y que prácticamente habían liberado todos los espermatozoides, aparecían células ameboides que iban fagocitando todas las células espermáticas que no habían sido liberadas. Además, estas células ameboides también fagocitaban bacterias que se encontraban libres dentro del quiste.

El papel que juegan estas células fagocíticas en los quistes espermáticos es parecido, aunque de manera más simplificada, al que desempeñan las células de Sertoli en las gónadas masculinas de muchos invertebrados y vertebrados. En los quistes de *Raspaciona aculeata* la función podría ser de fagocitar espermatoцитos aberrantes, controlar el número de células espermáticas por quiste o recaptar nutrientes mediante fagocitosis celular para paliar el exceso de energía gastada durante la espermatogénesis. En cambio, el papel de estas células en los quistes espermáticos de *Petrosia ficiformis* parece estar más relacionado con la eliminación de espermatozoides que no han sido liberados.

■ ■ Discusión

Muchas veces, fundamentalmente en revisiones generales y en libros de texto, cuando se habla de esponjas éstas son aludidas como animales simples con características muy primitivas en lo que respecta a su biología reproductiva (Baccetti

1984, 1986; Hodgson 1986; Franzén 1987; Eckelbarger 1994; Rupert & Barnes 1995). Si bien es cierto que las esponjas son, junto con los placozoos, los metazoos más basales, no todas las características que poseen son tan simples. En lo que respecta a la reproducción sexual de esponjas, y debido a la falta de conocimiento de muchos aspectos de la misma en multitud de especies de esponjas, muchos autores han hecho generalizaciones a todo el phylum tomando como ejemplo muy pocos casos estudiados. Esto ha provocado, al menos en el campo del estudio de la gametogénesis, que se haya asumido que, por ejemplo, los gametos de las esponjas carecen de la complejidad que se observa en grupos superiores. A lo largo de esta tesis, hemos pretendido profundizar en el conocimiento de la biología reproductiva de esponjas, seguros de que, muchas de las características citológicas que ostentan los poríferos no eran tan “simples”.

Ahora bien, no todos los aspectos de la reproducción sexual de las esponjas son más complejos de lo que pensábamos, y algunos ejemplos de procesos o características morfológicas simples de las esponjas se han estudiado en profundidad en esta tesis.

Biología reproductiva de esponjas:

Las esponjas, como muchos otros animales marinos, poseen ciclos determinados de producción de gametos que generalmente están regulados por factores ambientales. El principal factor ambiental que se ha estudiado, y que parece ser el que controla el inicio de la época reproductiva, es la temperatura. En general, se asume que las especies de animales marinos de latitudes templadas suelen reproducirse en verano, puesto que es la estación más favorable en lo que respecta a muchos factores. Todas las especies estudiadas durante la tesis parecieron presentar una marcada relación de su gametogénesis con la temperatura. Sin embargo, no todas ellas se reproducían durante el verano. En algunos casos fueron las altas temperaturas las que produjeron que se comenzaran a generar oocitos (como en el caso *Chondrosia reniformis*, *Petrosia ficiformis* y *Raspaciona aculeata*), mientras que en otros fueron las mínimas temperaturas registradas (como ocurrió en *Axinella damicornis* y *Corticium candelabrum*). En el caso de la espermatogénesis, ambas estrategias fueron manifestadas por las especies escogidas, encontrando, a modo de ejemplo, que en *Corticium candelabrum* fue el incremento estacional de temperaturas lo que pareció

desencadenar la producción de esperma, mientras que en *Petrosia ficiformis* pudo haber sido el descenso de temperaturas que ocurría a comienzos de invierno.

Resumidamente, las diferentes estrategias que presentan las esponjas estudiadas en cuanto a la relación de su gametogénesis y la temperatura, tienen como consecuencia una relativa alternancia de los ciclos reproductivos de unas frente a otras. Esta alternancia podría ser debida a una estrategia general para evitar grandes picos de competencia por los recursos alimenticios durante poco tiempo (Thorson 1946; Grainger 1959).

Lo que esta diversidad de estrategias reproductivas exhibidas por esponjas que comparten hábitat y que, en principio, están sometidas a los mismos estímulos ambientales, pone de manifiesto es, que asumir que gran parte de las especies marinas de mares templados se reproducen durante el verano es erróneo. Si obviásemos estas diferencias que existen en la relación entre procesos fisiológicos tan importantes como los reproductivos y la temperatura, podríamos pasar por alto importantes implicaciones de cara a una valoración de los posibles efectos del cambio climático sobre poblaciones de animales bentónicos tan abundantes y diversos como las esponjas.

Además de las diferencias encontradas en la respuesta a estímulos termales que probablemente desencadenan los ciclos de producción de gametos, también encontramos muchas diferencias en la duración de estos ciclos. Mientras que algunas especies produjeron oocitos durante periodos especialmente cortos, como *Chondrosia reniformis* (3 meses) o *Raspaciona aculeata* (de 3 a 5 meses), otras lo hicieron durante períodos mucho más largos, como *Axinella damicornis* y *Petrosia ficiformis* (7-8 meses), o *Corticium candelabrum* (todo el año). En otras esponjas, tanto ciclos reproductivos cortos (Lévi 1956; Scalera-Liaci & Sciscioli 1970; Corriero et al. 1998; Lepore et al. 2000) como ciclos largos (Scalera-Liaci & Sciscioli 1975; Wapstra & van Soest 1987; Witte & Barthel 1994) han sido descritos, independientemente de que fueran especies ovíparas o vivíparas.

En lo que respecta a la espermatogénesis, el proceso a nivel poblacional varió entre pocas semanas, como ocurrió en todas las especies ovíparas estudiadas (ver Capítulos 1 y 3), y varios meses, como ocurrió en *Corticium candelabrum*, que es una especie vivípara. Estas diferencias se deben a que en especies vivíparas no suele haber un episodio sincrónico de liberación de esperma como en las ovíparas (Reiswig 1983), sino varios, ya que no todos los oocitos están maduros a la vez, y de esta manera aseguran un

elevado éxito en la fecundación. La estima del éxito de fecundación de *Corticium candelabrum* era del 99.3%. En la única otra esponja de la que se conoce este dato la cifra era de 71.4% (Fromont & Bergquist 1994), un valor muy por encima de las estimas realizadas para otros invertebrados sésiles (20%), con fecundación externa (Levitan 1995).

Las diferencias de duración de los ciclos gametogénicos responden más a diferencias en el desarrollo de los procesos fisiológicos que a estímulos ambientales. En el caso concreto de *Raspaciona aculeata* y *Axinella damicornis*, existía un diferencia de hasta 5 meses entre la duración de ambas oogénesis. Además, la morfología externa y el tamaño final de los oocitos maduros revelaban muchas similitudes. ¿Qué podría hacer que sus ciclos de maduración tuvieran una duración tan diferente? La respuesta está, probablemente, en la vitelogénesis. En ambos casos el vitelo se produjo por autosíntesis, sin embargo, en el caso de *Axinella damicornis*, se observaron escasas células nutricias que le proporcionaban al oocito nutrientes, o inclusiones vitelínicas, mientras que en *Raspaciona aculeata* encontramos un gran número de estas células transportando inclusiones vitelínicas ya formadas. Esta “ayuda” de las células nutricias al proceso de vitelogénesis podría haber tenido como resultado un acortamiento del ciclo en el caso de *Raspaciona aculeata*.

Ultraestructura de la gametogénesis, con breves apuntes sobre la liberación de gametos y la fecundación:

En esponjas, los gametos se sitúan normalmente dispersos homogéneamente por todo el tejido interno, sin una localización específica. Sin embargo, en algunos casos sí se forman agregados de gametos, estando, en ocasiones, envueltos en colágeno (e.g., Lévi 1956; Borojevic 1969; Kaye and Reiswig 1991). En ninguna de las especies estudiadas encontramos agregados o grupos de gametos, salvo en *Asbestopluma occidentalis*, que presentaba agregaciones o “clusters” de oocitos en el subpinacodermo. Esta disposición tiene implicaciones que serán discutidas más adelante.

El presente estudio corrobora que la ultraestructura de los oocitos es muy similar entre demosponjas, tal y como fue puesto de manifiesto por Fell (1983). Las diferencias principales se adscribían al tamaño y a la cantidad y composición del vitelo, pero no a la

distribución interna de los orgánulos, que era muy parecida, no sólo al resto de las esponjas, sino a la de muchos otros invertebrados (Nørrevang 1968).

El vitelo muestra una asombrosa uniformidad en su estructura en todo el reino animal (Nørrevang 1968). El vitelo maduro consta de una zona interna muy electrodensa, y una periférica menos electrodensa, y generalmente está rodeado por una membrana. Las inclusiones vitelínicas de *Raspaciona aculeata* y *Corticium candelabrum* coincidían con esta descripción (ver Capítulos 2 y 6), no así las de *Petrosia ficiformis* o *Axinella damicornis* (ver Capítulos 3 y 6). En estas últimas especies las inclusiones sí estaban rodeadas por una membrana, en el caso de *P. ficiformis* por varias, pero su contenido no correspondía exactamente con la descripción anterior. En el caso de *P. ficiformis* el contenido era heterogéneo (en ocasiones granular), como el observado en otras especies de esponjas (Fell 1983; Gaino et al. 1987; Gaino & Sarà 1994). Sin embargo, los gránulos electrodensos que presentaba *A. damicornis* no han sido observados en ninguna otra especie de esponjas hasta la fecha.

En cuanto a los corpúsculos polares, éstos han sido encontrados tan sólo en *Corticium candelabrum* (a nivel ultraestructural) y en *Petrosia ficiformis* (a nivel de microscopía óptica). A lo largo de la historia estos corpúsculos polares han sido observados en otras esponjas tan sólo mediante microscopía óptica (e.g., Lévi & Lévi 1956; Tuzet & Paris 1965).

Los espermatozoides de las esponjas son muy diversos en tamaño y morfología general (Fell 1974; Reiswig 1983). Esta afirmación, y los resultados sobre los que se sustenta, sin embargo, han pasado desapercibidos en multitud de ocasiones cuando diversos autores han realizado revisiones sobre la morfología del esperma en invertebrados o en el mundo animal (e.g., Fawcett 1970; Baccetti 1982, 1984, 1986). Generalmente se considera que el esperma de las esponjas es “primitivo”, es decir, que la cabeza posee una forma redonda o cónica, que consta de un flagelo con una pieza media que comprende pocas mitocondrias de gran tamaño (Reunov 2005), y que además, carece de acrosoma. Esto es así para varias especies de demosponjas (Tuzet et al. 1970; Diaz & Connes 1980; Gaino et al. 1984), entre las que se incluyen dos de las especies estudiadas: *Corticium candelabrum* y *Petrosia ficiformis*. La morfología de estas células espermáticas parece encajar bien con el modelo propuesto de fecundación para el phylum Porifera, que está mediada por una célula transportadora (carrier cell). Además de esta morfología “primitiva”, en ambas dos especies aparecen características,

que si bien aparecen en muchos animales superiores, en esponjas parece que no son tan frecuentes (o al menos que no se han descubierto en muchas especies): vesículas proacrosomales en el caso de *P. ficiformis* y un verdadero acrosoma en forma de C en el caso de *C. candelabrum*. Las vesículas acrosomales son comúnmente encontradas en cnidarios (Hinsch & Clark 1972), pero en esponjas han sido documentadas tan sólo en la demosponjas *Suberites massa* (Diaz & Connes 1980) e *Hymeniacidon caruncula* (Reiswig 1989). En cuanto al acrosoma, éste ha sido descrito fehacientemente tan sólo en homosclerofóridos (Baccetti et al. 1986; Boury-Esnault & Jamieson 1999) y en el poecilosclerido *Crambe crambe* (Tripepi et al. 1984). La función de estas estructuras aún permanece un misterio, si bien podrían estar relacionadas con el reconocimiento celular entre el espermatozoide y la célula transportadora de la esponja “diana” (Reiswig 1989).

Aunque es cierto que algunas esponjas poseen morfologías espermáticas “primitivas”, también hay ejemplos de morfologías “modificadas”. El hecho de que aparezcan estas morfologías no tiene tanto que ver con la posición filogenética sino con el mecanismo de fecundación que exhibe la esponja (Franzén 1956; Fawcett 1970). Así, durante el transcurso de esta tesis, hemos encontrado morfologías “modificadas” en dos especies de esponjas que pertenecen al orden Poecilosclerida: *Crambe crambe* y *Asbestopluma occidentalis* (ver Capítulos 4 y 5). En ambas, el espermatozoide tiene un canal citoplásmico (“ciliary pit”) que aloja la parte inicial del flagelo. Sin embargo, en *Crambe crambe* el espermatozoide aparece doblado en V por la base del flagelo y éste retorcido sobre la cabeza, mientras que en *Asbestopluma occidentalis* el espermatozoide no aparece doblado de ninguna manera. En esta última especie la zona apical de la cabeza tiene un aspecto “hinchado” como la cabeza de un alfiler debido a que el ápice del núcleo tiene forma de martillo. En *Crambe crambe* el espermatozoide tiene un verdadero acrosoma con forma triangular y una barra subacrosomal, mientras que *Asbestopluma occidentalis* presenta 6-8 vesículas proacrosomales sobre el núcleo. La morfología alargada de ambas dos especies, induce a pensar que el mecanismo de fecundación no está mediado por una célula transportadora, ya que los espermatozoides alargados suelen estar diseñados para nadar en medios más densos que el agua (Tuzet 1950; Franzén 1970). De esta forma, en *Crambe crambe* la morfología del espermatozoide, y el hecho de que no encontráramos ninguna célula transportando un espermioquiste, nos lleva a pensar que podría penetrar a través del pinacodermo de la

esponja y avanzar por el mesohilo hasta encontrar los oocitos. Sin embargo, en *Asbestopluma occidentalis* el mecanismo de fecundación es un poco más complejo. Los espermatozoides están contenidos en un quiste espermático envuelto por varias capas de células que a su vez poseen espículas ahorquilladas llamadas forceps (ver Capítulo 4). Tal y como sugirió Vacelet (1996) el quiste espermático se libera como un paquete (con toda la envuelta), y los forceps favorecerían que se quedara enganchado en las anisocelas de una esponja vecina. Entonces los bacteriocitos digerirían la pared del quiste y los espermatozoides serían liberados en el interior de la esponja, forzados a nadar en un medio más denso que el agua. El hecho que los grupos de oocitos situados bajo el pinacodermo (muy cerca de la superficie) son fecundados simultáneamente se explicaría por la llegada de varios espermatozoides procedentes de un paquete espermático.

La mayoría de los animales no son capaces de liberar el 100% del espermatozoides contenido en las gónadas, y los espermatozoides remanentes son fagocitados por células somáticas (Buckland-Nicks & Chia 1986; Pacey & Bentley 1992; Jørgensen & Lützen 1997; Kalachev & Reunov 2005), generalmente llamadas células de Sertoli. Estas células no sólo se encargan de eliminar los espermatozoides remanentes sino de fagocitar células espermáticas en desarrollo que presentan morfologías anormales o aberrantes (O'Donovan & Abraham 1987; Griswold 1995, 1998; Nakanishi & Shiratsuchi 2004). Además, las células de Sertoli podrían controlar también el número de células espermáticas que hay por gónada (o testículo), eliminando las sobrantes. Hasta la fecha, ningún estudio había encontrado mecanismos parecidos al de las células de Sertoli en esponjas. Durante la tesis, en *Petrosia ficiformis* y *Raspaciona aculeata* encontramos células fagocíticas móviles (MPCs) en el interior de los quistes espermáticos, desempeñando un papel análogo al de las células de Sertoli (ver Capítulo 7). En *P. ficiformis* estas células eliminaban el espermatozoides remanente después de haber sido liberado la mayoría del espermatozoides. Sin embargo, en *R. aculeata* estas células se encontraron eliminando espermatozoides secundarios en los quistes espermáticos. Si bien no se observaron morfologías aberrantes de los espermatozoides secundarios en este último caso, las MPCs podrían estar controlando el número de células por quiste, o por el contrario recaptar nutrientes mediante fagocitosis de las células espermáticas ya que durante el periodo de espermatogénesis la esponja está sometida a mucho desgaste energético. Por tanto, y dado que las MPCs tienen un papel análogo a las células de

Sertoli, proponemos que se denomine a éstas como células Sertoli-like para unificar la terminología y facilitar su comprensión.

Desarrollo embrionario en las esponjas estudiadas:

Pese a que el estudio del desarrollo embrionario de las esponjas seleccionadas no era un objetivo prioritario de la tesis, sí tuvimos la suerte de realizar un importante descubrimiento en lo que respecta al desarrollo embrionario de *Petrosia ficiformis*: el desarrollo directo. Dentro de las esponjas tan sólo existen tres casos de especies que tengan desarrollo directo, todas ellas demosponjas (Watanabe 1978; Sarà et al. 2002). Sin embargo, la razón por la que tan sólo estas pocas especies no poseen un estado de larva nadadora como el resto de las esponjas aún no han sido descubiertas, y se necesitan estudios en profundidad de este aspecto.