

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.

7.2. Localización de los metabolitos en el organismo.

En este capítulo vamos a tratar de la situación de las sustancias en el cuerpo del opistobranquio. Si en el capítulo anterior ya decíamos que el número de casos estudiados (en lo referente al origen) era pequeño respecto al número de especies mencionadas en el apartado 6., en este caso debemos decir que son todavía menos las especies en las que se ha investigado la localización de los productos naturales. Un inicio de recopilación sobre este tema fue realizado por Karuso (1987), quien ya resaltó los pocos datos existentes, así como la importancia, por ejemplo, de la protección de las puestas.

Situación a nivel celular.

Según Luckner (1984), los terpenoides (que constituyen el grupo más numeroso de los descritos en opistobranquios, ver apartado 6.), generalmente se pueden hallar libres en el citoplasma o bien formando vacuolas. En algunos casos se sitúan en el retículo endoplasmático, y en el caso de los triterpenos en el espacio extracitoplasmático. En las especies que hemos analizado en esta Tesis, hemos observado distintos tipos de células secretoras y de estructuras glandulares, algunas de las cuales deben ser los lugares de acumulación o de síntesis de los metabolitos secundarios. En cada caso se han detallado las características de estos tipos de estructuras (ver para cada especie el apartado correspondiente). La discusión a nivel celular (citológico e histológico) se ha realizado en cada apartado específico, ya que se ha considerado que proporcionaba una mayor claridad al texto. Sin embargo, a nivel general, podemos hacer aquí algunos comentarios.

Hay algunas especies para las que se han descrito células o glándulas (epidérmicas o subepidérmicas) con papel defensivo. En los apartados correspondientes hemos mencionado los trabajos de García *et al.* (1990, 1991). Cabe destacar, por su importancia los estudios de Thompson sobre las células secretoras de ácido (Thompson, 1960a, b, c, 1969, 1976, 1983, 1986; Thompson y Slinn, 1959; Thompson y Brown, 1984; Thompson y Colman,

1984; Thompson y Gathercole, 1986), así como el trabajo de Edmunds (1968a) sobre las glándulas ácidas en *Discodoris* y *Anisodoris*.

Curiosamente el manto de los Doridáceos ha recibido una escasa atención en el pasado. La mayor parte de estudios se han dedicado a los cerata de los eolidáceos (Edmunds, 1966a; Harris, 1973; Todd, 1981; Arias *et al.*, 1984) o a la histología o citología de otros opisthobranquios (Herdman, 1890b; Thompson y Slinn, 1959; Thompson, 1960a y b, 1969, 1983; Thompson y Colman, 1984; Thompson y Gathercole, 1986; Marín *et al.*, 1991). Muy pocas especies de Doridáceos han sido estudiadas microscópicamente, concretamente destacan los trabajos de Kress (1981) y de Foale y Willan (1987), siendo éstos mayoritariamente dedicados a los tubérculos cariofilídeos (como Labbé, 1929, 1930, 1933). Herdman y Clubb (1892) publicaron ya un trabajo sobre cerata y papilas dorsales de algunos nudibranquios. Potts (1981) detallaba la estructura del epitelio branquial, del manto y el pie de *Onchidoris bilamellata* y *Archidoris pseudoargus*, pero hasta la fecha muy pocos estudios más han proporcionado datos acerca de la estructura del manto en Criptobranquios (Thompson, 1960a; Edmunds, 1968a; García *et al.*, 1990, 1991) tratando además de relacionarla con los sistemas defensivos. Al referirnos a las MDFs de cromodorídidos se ha mencionado ya la escasa bibliografía existente.

Crozier (1916) es posiblemente el primero en localizar posibles estructuras de acumulación de sustancias defensivas. Otros trabajos anteriores describieron células de tipo secretor que podrían tener algún papel defensivo, pero para las cuales no se conoce todavía si están asociadas a la presencia de metabolitos efectivos. Podemos destacar los estudios de Perrier y Fischer (1908) sobre las glándulas paleales de defensa de *Scaphander lignarius*, (que podrían estar relacionadas con la secreción de feromonas), y los de Henneguy (1925) sobre histología de algunas especies (básicamente eolidáceos). Hecht (1895) dedicó también parte de sus estudios a la histología de los nudibranquios, describiendo numerosas glándulas defensivas, de entre las que destacaremos las citadas en la base de las branquias de algunos fanerobranquios.

Ortea *et al.* (1989) describieron un sistema glandular de defensa, ya citado por Hecht (1895), en los apéndices de *Limacia clavigera*, aunque no se ha hallado de momento ninguna sustancia defensiva en esta especie (ver capítulo 5.17.). Las células de la epidermis de *Phyllidia pulitzeri* fueron estudiadas por Wägele (1985), pudiendo estar relacionadas algunas de las células descritas con la secreción de sustancias defensivas.

Marbach y Tsumamal (1973) asociaron la presencia de células secretoras de ácido en *Berthellina citrina* con una función defensiva. Las células secretoras de ácido son en general cilíndricas, con grandes vacuolas distales que contienen el ácido (Edmunds, 1968a; Thompson, 1976, 1983; Fänge, 1984).

Para *Tambja abdere*, que presenta los metabolitos ya mencionados en apartados anteriores, se describieron células caliciformes que segregaban el abundante muco de esta especie (Farmer, 1978). Los ejemplos más recientes asocian ya las glándulas defensivas multicelulares en los cerata de *Tethys fimbria* con la presencia de prostaglandinas (Marín *et al.*, 1991).

En la especie *Melibe leonina* se mencionaron unas glándulas en el manto que segregaban una sustancia odorífera (Agersborg, 1921; Ajeska y Nybakken, 1976). Posteriormente se aisló en esta especie un monoterpeno (Ayer y Andersen, 1983). *Ercolania funerea* presenta glándulas mucosas multicelulares responsables de la secreción de la especie (Di Marzo *et al.*, *en prensa*).

Situación a nivel del organismo.

Se exponen a continuación los casos en los que el análisis químico se ha realizado separando las distintas partes de los ejemplares, es decir realizando disecciones. Esto ha permitido la localización de sus metabolitos. El resto de especies que no se mencionan en este apartado han sido analizadas enteras ("whole bodies"), y por lo tanto no se sabe donde se hallan localizados sus compuestos.

A nivel general se dice que las toxinas se suelen hallar localizadas por todo el cuerpo, para defenderse de los depredadores. Los venenos en cambio, se situarían en glándulas específicas, como por ejemplo las glándulas salivares de gasterópodos de tamaño grande para capturar presas, etc. En opistobranquios, a pesar de estar localizados algunos metabolitos en lugares concretos, creemos que encajan mejor en el concepto de toxina que en el de veneno, ya que no son inyectadas.

Las glándulas defensivas suelen hallarse en la parte del cuerpo con la que es más probable que el depredador contacte primero (Ros, 1976b). Esto significaría que la presa no sería depredada totalmente en un ataque, mientras que si las sustancias están repartidas por el cuerpo o localizadas en el interior, el individuo ha de morir para que las defensas tengan efecto sobre el depredador (Edmunds, 1974).

Como criterio para analizar la distribución en el organismo de las distintas sustancias, las hemos dividido en: aquellas que se localizan en el manto y en la parte externa del animal (incluyendo aquí el mucus), y aquellas que se localizan en las vísceras, y por tanto, en el interior del animal. En principio cabe esperar una relación entre localización y función, de manera que, como se indica en esquema de la Figura 7.2., las sustancias que se encuentran en la parte externa tengan algo que ver con la defensa del animal, y en cambio, aquellas que se hallan en el interior tengan algún papel (conocido o no) en la fisiología del animal. Naturalmente esto es demasiado general, y por ello deben haber excepciones. Las sustancias que se segreguen al exterior pueden no ser alomonas sino feromonas. Y por ejemplo, algunas sustancias que se encuentran en la parte externa y se usan activa o pasivamente en la defensa, se pueden encontrar también en el hepatopáncreas, ya que se obtienen de la dieta. De la glándula digestiva a los lugares específicos de acumulación debe haber algún mecanismo de transporte que por ahora nos es desconocido. Un ejemplo de esto es el género *Hypselodoris* (ver apartados correspondientes).

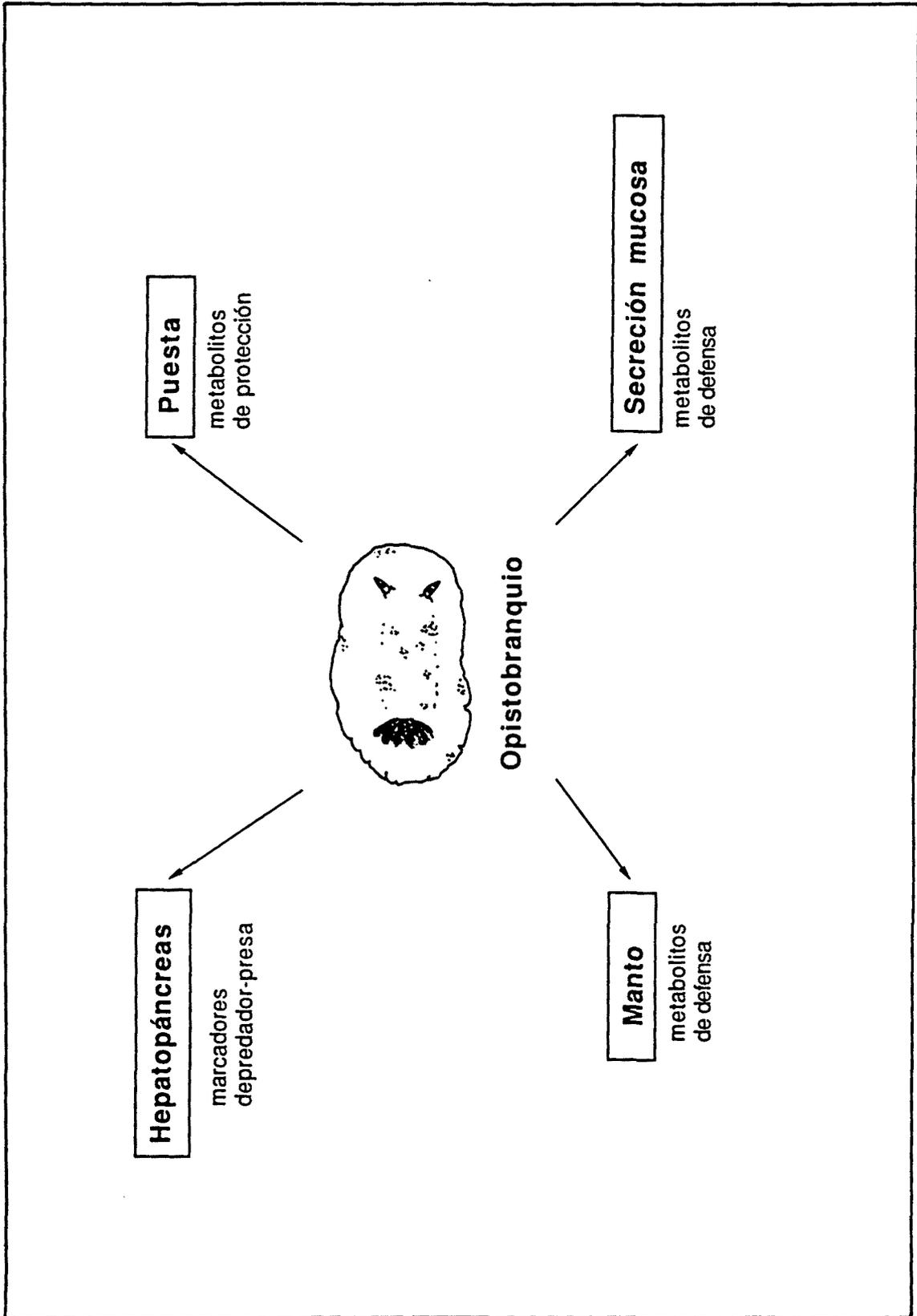


Figura 7.2. Localización de metabolitos en un doridáceo.

Además de lo expuesto en el esquema de la Figura 7.2. cabe recordar que en las puestas pueden existir metabolitos de protección y metabolitos relacionados con el desarrollo. Del mismo modo, en el aparato reproductor pueden hallarse metabolitos relacionados con la reproducción y el desarrollo, que podrían transferirse a la puesta.

Podemos esperar asimismo una relación clara entre sustancias halladas en la glándula digestiva y un origen dietético. Por otro lado, la mayoría de las sustancias que veremos en la parte externa de los animales son de biosíntesis (exceptuando las que se hallan en estructuras de acumulación).

En la gran mayoría de los trabajos anteriores a 1980, sin embargo, las sustancias se describían para un organismo sin especificar la localización, ya que los ejemplares solían ser triturados en acetona enteros.

El único ejemplo descrito en la bibliografía en el que se diseccionan los ejemplares en sus distintos órganos, de un modo similar a como se ha hecho en las especies analizadas en esta Tesis, es *Hexabranhus sanguineus* (Pawlik *et al.*, 1988).

7.2.1. Sustancias localizadas en la parte externa.

Formaciones dérmicas del manto (MDFs).

Se consideran en este apartado las estructuras de acumulación de sustancias que se ha convenido en llamar MDFs. Todas las sustancias descritas en las MDFs de las especies de *Hypselodoris* y *Chromodoris*, en los apartados correspondientes de esta Tesis, deben ser incluidas aquí (excepto *H. fontandraui* que no tiene MDFs).

Sobre el hecho de si deben ser consideradas glándulas o no, creemos que, considerando la definición de glándula dada por Bloom y Fawcett (1975),

"células especializadas para la secreción", y visto que no secretan los productos sino que los acumulan, no deberían ser llamadas glándulas.

Presumiblemente en otros cromodorídidos estudiados por Rudman (1984), para los que se han descrito MDFs aunque no se ha realizado un estudio químico, es de suponer que estas MDFs desempeñarán un papel similar acumulando metabolitos defensivos procedentes de la ingesta. Lo mismo cabe decir del nuevo género *Berlanguella* (Ortea *et al.*, 1992) que presenta unas MDFs muy particulares.

Borde del manto y/o pie.

El primer caso de localización de sustancias con efectos tóxicos es posiblemente *Chromodoris zebra* (Crozier, 1916).

En esta Tesis los productos que se han localizado en el borde del manto han sido los comentados en sus respectivos apartados: *Dendrodoris* spp, *Doriopsilla areolata*, (y *Philinopsis depicta*, ver apartado 5.17.). Los sesquiterpenos de *Dendrodoris* se sitúan pues en el borde del manto, mientras que la 7-deacetoxyolepupuana se halla exclusivamente en las branquias (este es, en nuestro conocimiento, el único caso descrito en Opistobranquios de un metabolito localizado en las branquias). Recordemos que en el apartado 5.14. se describen las células macrovacuoladas de *D. limbata*, halladas precisamente en el borde del manto y en las branquias.

En el caso de algunos cromodorídidos en los que se ha analizado el borde del manto (debido al pequeño tamaño de sus MFDs), se supone, por analogía con las demás especies de mayor tamaño, que los productos se localizan en las MDFs, situadas en dicho borde del manto. En *Chromodoris luteorosea* se analizó el borde amarillo del manto y las manchas amarillas dorsales, hallándose los diterpenos únicamente en el primero.

En *Hexabanchus sanguineus*, Pawlik *et al.* (1988) detectaron la presencia en el pie de sólo dos de los cuatro macrólidos que se hallaron en la especie (dihydrohalichondramida y tetrahydrohalichondramida).

En *Oxy noe olivacea* se detectó una mayor abundancia de las oxytoxinas no en el borde del pie, sino en la parte caudal del pie (cola), (ver apartado 5.17.).

Secreciones mucosas y de otros tipos.

Seguramente la primera especie en la que se describió la secreción de un mucus con efectos tóxicos probados fue *Phyllidia varicosa*, en un estudio realizado por Johannes en 1963. En la secreción mucosa de *Phyllidia pulitzeri* Cimino *et al.* (1982) hallaron isocyanosesquiterpenos, así como en *P. varicosa* (Burreson *et al.*, 1975; Scheuer, 1977a; Hagadone *et al.*, 1979; Schulte *et al.*, 1980). Según Risbec (1928) todas las especies por él estudiadas del género *Phyllidia* emiten al ser molestadas un muco con un fuerte olor. Las secreciones de tipo mucoso, de enmascaramiento, etc., fueron ya revisadas por Ros (1976b). En este apartado se comentan únicamente aquellas secreciones relacionadas con productos naturales. En este apartado habría que incluir todas las especies que presentan secreciones de tipo ácido (ver Tabla 6.10.), ya que, si bien son producidas en el manto, se extienden y se distribuyen en la secreción mucosa envolviendo al animal.

Otros casos citados son las secreciones purpúreas de *Aplysia* spp (ver apartado 6.5. para las especies), que presentan aplysiolol (Siegelmann *et al.*, 1968; Rüdiger, 1967). Gonor (1961) señaló la existencia de una secreción blanca y pegajosa en *Lobiger serradifalci*, *Acteon* y *Haminoea*, si bien indicó que no había pruebas de que fuera repugnante. En cuanto a los cefalaspídeos, se ha señalado en sus secreciones la presencia de las navenones de *Navanax inermis* (Sleeper y Fenical, 1977; Fenical *et al.*, 1979; Sleeper *et al.*, 1980), de los polipropionatos y compuestos piridínicos en *Phyllinopsis (Aglaja) depicta* (Cimino *et al.*, 1987c; Cimino y Sodano, 1989), y de los compuestos de *Haminoea* spp (Cimino *et al.*, 1987a, 1991b ; Passeggio, 1989; Cimino y Sodano, 1989). La secreción púrpura de *Acteon tornatilis* (ver apartado 6. 9.) podría corresponder tal vez a la liberación de gotas de hemolinfa (Yonow y Renwranz, 1986).

En sacoglossos se han estudiado recientemente cuatro especies, en cuyas secreciones mucosas se han localizado los siguientes productos: oxytoxinas en *Oxyhoe olivacea* (Cimino y Sodano, 1989; Cimino *et al.*, 1990a), que presenta secreción blanca (Ortea, 1982), placidenes e iso-placidenes en *Placida dendritica* (Mollo, 1992; Vardaro *et al.*, 1992a), 12-norcyercene-B y 7-methyl-12-norcyercene-B en *Ercolania funerea* (Mollo, 1992; Vardaro *et al.*, 1992b), y los cyercenes-B, -1, -2, -3, -4 y -5 en *Cyerce cristallina* (Di Marzo *et al.*, 1991b; Mollo, 1992). En estas tres especies la secreción mucosa es tóxica, mientras que en *Caliphylla mediterranea* no lo es (Mollo, 1992). *Plocamophorus* spp emiten un fluido al ser molestados (Willan y Coleman, 1984), mientras que en *Hermaea bifida* desprende una sustancia odorífera (fétida, con "olor a geranio") (Hecht, 1895), y se han citado posibles secreciones defensivas en *Stiliger* y *Lobiger* (Edmunds 1966b).

En las secreciones mucosas de doridáceos se ha descrito acetilcolina en *Doriopsilla albopunctata* (*Dendrodoris fulva*) (Reel y Fuhrman, 1981), dihydrohalichondramida, tetrahydrohalichondramida y kabiramida C en *Hexabranhus sanguineus* (Pawlik *et al.*, 1988), tambjamins y tetrapyrrol en *Nembrotha* spp (Paul *et al.*, 1990), tambjamins en *Tambja abdere* (Carté y Faulkner, 1983, 1986), y los furanosesquiterpenos descritos para *Hypselodoris* spp en los apartados correspondientes de esta Tesis. Respecto a *Dendrodoris* spp, *Doris verrucosa* y *Peltodoris atromaculata*, se hallará más información en los apartados respectivos de esta Tesis. *Archidoris pseudoargus* presenta una secreción amarilla y granulosa (Potts, 1981).

En *Tethys fimbria* se han detectado en el muco PGE₂-1,15-lactones, PGE₃-1,15-lactones, PGA₂-1,15-lactones, PGA₃-1,15-lactones, 11-ac-PGF₃^α-1,15-lactone, PGE₂ y PGE₃ (Marín *et al.*, 1991). Cabe destacar la secreción olorosa de *Melibe fimbriata* (Crossland, 1911; Thompson y Crampton, 1984) y de *Melibe leonina* (Agersborg, 1921), así como las secreciones de *Ceratosoma cornigerum* (Crossland, 1911), *Hermaea bifida* y *H. dendritica* (Herdman y Clubb, 1892) y la secreción tóxica en *Mourgona germaineae* (Jensen, 1984).

La secreción mucosa contribuiría a extender alrededor del animal las sustancias defensivas, y a su vez evitaría la rápida dispersión de las mismas en el medio, hecho que ya fue sugerido por Thompson (1960b). Es necesario

recordar que aparte de una función defensiva (conteniendo sustancias tóxicas), el muco tiene otras funciones mecánicas y de locomoción que no van a discutirse aquí al quedar fuera de los objetivos propuestos.

En todo el manto.

Se han descrito en el manto (parte externa) y parápodos de *Aplysia fasciata*, 4-acetylapykurodina B y aplykurodinone B (Martínez *et al.*, 1992; Spinella *et al.*, 1992a). Carefoot (1987) indicó que el pie y otras regiones externas del cuerpo de distintas especies de *Aplysia* son repelentes para peces, así como para gaviotas (ver referencias en el apartado 7.4.1.).

Las umbraculuminas de *Umbraculum mediterraneum* (Cimino *et al.*, 1988a) y las verrucosinas de *Doris verrucosa* (Cimino *et al.*, 1988b, Avila *et al.*, 1990a y esta Tesis) se han hallado únicamente en la parte externa del animal. En *D. verrucosa* se ha comentado (ver apartado 5.12.) la presencia de células secretoras acompañadas de espículas regularmente distribuidas en las protuberancias dorsales. Los acilgliceroles de *Archidoris tuberculata* y *Archidoris carvi* también se localizan en el manto (Zubía *et al.*, *en prensa*).

En *Hexabranhus sanguineus*, Pawlik *et al.* (1988) detectaron la presencia en la parte dorsal del manto de cuatro macrólidos (dihydrohalichondramida, tetrahydrohalichondramida y las kabiramidas B y C). En *Phyllidia pulitzeri* Cimino *et al.* (1982) detectaron los isocyanosesquiterpenos en el manto del animal. Los polipropionatos de *Bulla gouldiana* se localizan también en el manto (Spinella *et al.*, *en prensa*).

Como ya hemos mencionado, las sustancias ácidas (ver Tabla 6.10.) son segregadas por células del manto, por lo que deben considerarse también aquí. Por otro lado, los carotenoides descritos por McBeth (1972) para *Anisodoris nobilis*, *Dendrodoris fulva*, *Triopha carpenteri* y *Flabellina (Flabellinopsis) iodinea* se localizaban en el tegumento (aunque no se estudió químicamente el resto de los animales). La posible presencia de sustancias lipídicas en glándulas del epitelio del manto y branquia de *Onchidoris bilamellata* fue señalada por Potts (1981), quien sugirió que podían tener una

función defensiva, asociada a una secreción blanca y granulosa de tipo lipídico.

En *Hypselodoris webbi*, Cimino *et al.* (1982) detectaron la presencia de longifolin en el manto, pero posteriormente García *et al.* (1990) describían su presencia mayoritaria en las MDFs, si bien la hallaban también en el resto del manto. Los estudios con varias especies de cromodorídidos expuestos en esta memoria demuestran la presencia selectiva de los metabolitos en las MDFs, y no en el resto del manto, (ver apartado correspondiente). La presencia de longifolina en el resto del manto en el trabajo de García *et al.* (1990) podría ser debida a que en su disección separaron exclusivamente las MDFs más grandes (cercas a las branquias) y se dejaron en el resto del manto algunas de las MDFs pequeñas que se localizan alrededor del borde del mismo.

Cerata.

Incluiremos en este apartado las sustancias que se localizan en los cerata de dendronotáceos como *Tethys fimbria*, y en los sacoglosos.

Hay que señalar que, si bien no los hemos analizado en esta Tesis, los Eolidáceos acumulan los cnidoblastos de sus presas en los cerata, y los usan para su defensa (Edmunds, 1966a y b; Harris, 1971, 1973). Las toxinas presentes en los nematocistos han sido estudiadas entre otros por Picken y Skaer (1966), Goodwin y Telford (1971), y otros.

Volviendo a las sustancias halladas en los cerata, diremos que se han estudiado hasta ahora 4 especies. En los cerata de *Cyerce cristallina* se detectaron todos los cyercenes (Vardaro *et al.*, 1991; Di Marzo *et al.*, 1991b; Mollo, 1992). Se han citado en los cerata los cuatro compuestos de *Placida dendritica* (Mollo, 1992), y en *Ercolania funerea*: 7-methyl-12-norcyercene-B, 7-methyl-cyercene-1, 7-methyl-cyercene-B y 7-methyl-cyercene-2 (Mollo, 1992; Vardaro *et al.*, 1992b). De entre estos últimos, el 7-methyl-cyercene-1 sólo se halla en los cerata, al igual que el cyercene A de *C. cristallina* (referencias ya mencionadas). Un estudio sobre la histología de los cerata en

estas tres especies y en *Caliphylla mediterranea* ha sido realizado recientemente por Di Marzo *et al.* (*en prensa*).

Parece clara la existencia de una relación entre la cantidad de pyronas y su distribución selectiva, respecto a la regeneración de los cerata en las especies mencionadas (Mollo, 1992, y referencias anteriores).

Por otro lado, tanto en los cerata de *Tethys fimbria*, como en el resto del manto, se hallaron: PGE₂-1,15-lactones, PGE₃-1,15-lactones, PGA₂-1,15-lactones, PGA₃-1,15-lactones, 11-ac-PGF₃α-1,15-lactone, PGE₂ y PGE₃ (Cimino *et al.*, 1989b; Cimino *et al.*, 1991a, c; Di Marzo *et al.*, 1991a, 1992a; Marín *et al.*, 1991). Para estos productos también se ha sugerido una función en la regeneración de los cerata. En *Melibe fimbriata* y *Melibe rosea* se han citado glándulas defensivas multicelulares en los cerata (Thompson y Crampton, 1984), que podrían ser similares al caso de *Tethys fimbria* (Marín *et al.*, 1991).

Sustancias de localización dudosa.

La triophamina de *Triopha catalinae* se cita en "skin extracts" (extractos del manto o parte externa) (Gustafson y Andersen, 1982), así como los diaulusteroles A y B de *Diaulula sandiegensis* (Williams *et al.*, 1986), las sustancias de *Phyllidia varicosa* (Burreson *et al.*, 1975; Scheuer, 1977a y b; Hagadone *et al.*, 1979; Schulte *et al.*, 1980), y los compuestos de *Chromodoris youngbleuthi* (Terem y Scheuer, 1986).

El problema de estos "skin extracts" es que en algunos casos se obtienen tras un largo período de maceración, con lo cual, y si además el animal no está en muy buen estado, podrían contener productos de las vísceras por contaminación. Por ejemplo, el marginatafurano de *Cadlina luteomarginata* se describió en "skin extracts" (Gustafson *et al.*, 1985), tras 12 meses en metanol. En nuestra opinión es posible que el producto estuviera también en el hepatopáncreas, hecho que apoyaría su origen dietético, y debido al tiempo tan largo de extracción se hallara posteriormente en el manto. Esto no anularía la posibilidad de que el producto estuviera presente

también en el manto. De hecho, Thompson *et al.* (1982) hallaron los metabolitos de *C. luteomarginata* exclusivamente en el dorso. En el caso de productos de origen dietético es necesario recordar que existe la posibilidad de que los ejemplares no hayan comido recientemente (antes de su captura).

En *Diaulula sandieguensis*, Walker y Faulkner (1981) hipotetizaban sobre la localización de los compuestos acetilénicos en el manto ("skin"), debido a la facilidad con la que estos compuestos eran liberados. De un modo similar, en *Chromodoris elisabethina*, Okuda y Scheuer (1985) mencionan que debido a la rápida extracción de la trunculina-A casi pura al introducir el animal en alcohol, el compuesto debería estar almacenado cerca de la superficie del animal. Esto es compatible con la posibilidad de que se acumule el producto en las MDFs.

Las sustancias descritas por Andersen y Sum (1980) en *Archidoris odhneri* podrían localizarse en el manto, según dichos autores, si bien extraían los animales enteros. Esta hipótesis concuerda con el origen biosintético de sus metabolitos, coincidiendo además con *Doris verrucosa* en ambas cosas.

7.2.2. Sustancias localizadas en las vísceras.

Reel y Furhman (1981) afirmaron que las toxinas internas en opistobranquios tienen poco significado ecológico, excepto si son secretadas.

En relación a lo que hemos comentado al inicio de este capítulo, habría que distinguir entre las sustancias que proceden de la dieta (y por tanto se hallan en el aparato digestivo y hepatopáncreas), y sustancias que se encuentran en órganos distintos al digestivo (y que por tanto no tienen, en principio, relación con la dieta).

Glándula digestiva.

Aquí habría que situar seguramente todas las especies que en el apartado 7.1. se incluían en el grupo de origen dietético, ya que todo aquello que se obtiene de la dieta pasará por la glándula digestiva. Mencionaremos, sin embargo, únicamente aquellas sustancias en las que su localización se ha demostrado mediante el estudio de las diversas glándulas por separado. En algunos casos, los autores de algunos trabajos se han referido a la glándula digestiva cuando en realidad extraían todas las vísceras; estos casos, cuando se han detectado, no se han incluido aquí, aunque no en todos se especificaba claramente cómo se había llevado a cabo la disección.

En *Aplysia dactylomela*, los productos que se citan en la glándula digestiva son: éteres acetilénicos, deodactol, isodeodactol (Hollenbeak *et al.*, 1979; Gopichand *et al.*, 1981), dihydroxydeodactol monoacetato, isoobtusol acetato, parguerol y derivados, y otros sesquiterpenos (Schmitz *et al.*, 1978a y b, 1980, 1981, 1982; González *et al.*, 1982; Rao *et al.*, 1989). En la glándula digestiva de *A. californica* y *A. vaccaria* se hallaron los productos descritos por Winkler (1961), Winkler *et al.* (1962) y Winkler y Tilton (1962).

En *Aplysia kurodai* los monoterpenos (aplysiapyranoides A, B Cy D) descritos por Inouye *et al.* (1987) y por Kusumi *et al.* (1987) se hallaban en la glándula digestiva, como en *Aplysia brasiliana* los compuestos hallados por De Freitas (1977), Stallard *et al.* (1978), Dieter *et al.* (1979) y Kinnel *et al.* (1977a, 1979), en *Aplysia californica* la murexina y la acetilcolina (Langlais y Blakenship, 1972; Blakenship *et al.*, 1975), en *Aplysia punctata* los monoterpenos descritos por Quiñoa *et al.* (1989), en *Aplysia vaccaria* los crenulides (Midland *et al.*, 1983) y en *Aplysia punctata* y *A. depilans* los epidioxysteroles (Jiménez *et al.*, 1986) y los dictyoles (Danise *et al.*, 1977; Minale y Riccio, 1976). Sin embargo, los epidioxysterols se hallaron también en el resto de vísceras y aparato reproductor, por lo que no presentaban una distribución específica (Jiménez *et al.*, 1986).

Los productos hallados en la glándula digestiva de *Philineopsis (Aglaia) depicta* procedían de la dieta sobre *Haminoea* spp y *Bulla* spp (Cimino *et al.*, 1985b, 1986a, 1987c; Passeggio, 1989; Villani, 1990; apartado 5.17.), al igual

que los polipropionatos de *Bulla gouldiana* en la glándula digestiva de *Navanax inermis* (Spinella *et al.*, en prensa).

En *Dendrodoris grandiflora* ya hemos señalado la presencia en el hepatopáncreas de varios metabolitos procedentes de la dieta (Cimino *et al.*, 1980b, 1985d), mientras que el resto de productos, de origen biosintético, se encuentran distribuidos tal y como se ha explicado en el apartado 5.15.

La 1-methylisoguanosine de *Anisodoris nobilis* se halló en el extracto acuoso del animal entero (Furhman *et al.*, 1980, 1981; Kim *et al.*, 1981), de lo que Schulte y Scheuer (1982) deducen que se halla en la glándula digestiva, hecho que nos parece difícil de justificar.

En *Cadlina luteomarginata*, furodysina, furodysinina, microcionina-2 y otros terpenoides se localizan en la glándula digestiva, de acuerdo con su origen dietético (Hellou *et al.*, 1981, 1982; Gustafson y Andersen, 1985).

Cimino *et al.* (1982) hallaron los productos isocyanosesquiterpenoides de *Phyllidia pulitzeri* (ya mencionados además en manto y muco, ver arriba) en la glándula digestiva del molusco. Esto concuerda con el origen dietético de dichos productos.

Para *Peltodoris atromaculata*, Castiello *et al.* (1980) y Cimino *et al.* (1982), se citaban los poliacetilenos en el hepatopáncreas, pero no en el manto. Los resultados de nuestro análisis discrepan ligeramente de los anteriores (ver apartado 5.13.). En *Hypselodoris webbi*, Cimino *et al.* (1982) detectaron la presencia de longifolina en la glándula digestiva. Esto concordaba con el origen supuestamente dietético de la misma, que ha sido posteriormente demostrado (ver apartado 5.3.).

La glándula digestiva de *Doriopsilla albopunctata* contiene según Fuhrman *et al.* (1979) sustancias tóxicas no identificadas. Estas toxinas no se hallan ni en el manto ni en el pie del animal. Asimismo, la glándula digestiva de las siguientes especies presentaba actividad tóxica (no especificada por los mencionados autores): *Cadlina flavomaculata*, *Anisodoris nobilis*, *Archidoris montereyensis* y *A. odhneri*.

La función de los productos relacionados con el 4-colestén-3-one, ampliamente distribuido en diversas especies (ver apartado 6.3.), es desconocida, aunque probablemente es correcto asumir que es el resultado de la oxidación de esteroides.

En muchos casos, y sobre todo en los trabajos anteriores a los inicios de los 80, las disecciones realizadas no se hicieron con excesivo detalle (se separaban vísceras y manto), y en la bibliografía se hallan citados muchos productos en las vísceras, pero sin detallar en cuáles (glándula digestiva, glándula hermafrodita, etc.). En algunos casos y por analogía, se deduce que deben estar en el hepatopáncreas, pero muchos casos no son claros. Por ejemplo, la purina riboside de *Anisodoris nobilis* (Fuhrman *et al.*, 1980), podría hallarse en la glándula hermafrodita, de modo similar a la xylosil-MTA de *Doris verrucosa* (ver apartado 5.12.), siendo un caso parecido a esta.

En *Hexabranhus sanguineus*, Pawlik *et al.* (1988) detectaron la presencia en el complejo glándula hermafrodita/glándula digestiva, de tres de los cuatro productos que presenta la especie (dihydrohalichondramida, tetrahydrohalichondramida y kabiramida C).

Reproductor, puesta y larvas.

La separación entre las glándulas hermafrodita y digestiva en algunos doridaeos es bastante complicada ya que, como ya se ha comentado, ambas forman un complejo único. Sin embargo, en algunas especies en el momento de la madurez son más fácilmente separables entre sí. Este ha sido el caso en las especies que nosotros hemos analizado (*Dendrodoris* spp y *Doris verrucosa*). Los compuestos presentes únicamente en la glándula hermafrodita aparecen exclusivamente cuando ésta está bien desarrollada. En el caso de *Dendrodoris*, la vía metabólica que lleva a la formación de los ésteres drimánicos se activa en consonancia con la madurez del animal (ver apartado 5.14.). Estos ésteres se hallan posteriormente en la puesta, y la 7-deacetoxyolepupana (que se localiza también en las branquias) es el único compuesto que se halla en los juveniles.

La xylosil-MTA de *Doris verrucosa* debe tener alguna función en el desarrollo de la puesta, ya que se localiza exclusivamente en la glándula hermafrodita y en la puesta (ver apartado 5.12.).

En *Aplysia* sp, Adamson *et al.* (1989) citaron aplysianin-A en la glándula de la albúmina, y aplysianin-E en la puesta. En *Hexabranchnus sanguineus*, Pawlik *et al.* (1988) ya hemos dicho con anterioridad que hallaron en el complejo glándula hermafrodita/glándula digestiva tres de los cuatro productos que presenta la especie. Hay que añadir a esto que en el resto del reproductor no se halló ninguno de los productos, mientras que en la puesta, de color rojo, se hallaban presentes los cuatro (dihydrohalichondramida, tetrahydrohalichondramida y las kabiramidas B y C) y en concentraciones 10 veces superiores respecto al animal. En la puesta de esta especie (y en menor concentración en el animal), Roesener y Scheuer (1986) hallaron ulapualide A y B.

Matsunaga *et al.* (1986) ya destacaban el hecho de que las puestas, brillantemente coloreadas en muchos casos, parecían inmunes a la depredación, y sin embargo se han estudiado muy poco químicamente (Faulkner, 1984b). Matsunaga *et al.* (*op. cit.*) hallaron kabiramida C en la puesta de un nudibranquio no identificado (probablemente *Hexabranchnus*).

Las puestas de *Chromodoris zebra* probablemente están protegidas químicamente, ya que Crozier (1916) señaló que eran repelentes para varios posibles depredadores. Las puestas de *Hypselodoris infucata* contienen un terpenoide aldehído (Karuso, 1987), mientras que las puestas de *Glossodoris pallida* contienen deoxoscalarina y las de *Glossodoris hikeurensis* y *G. cincta* contienen heteronemina y episcalaradial (Rogers y Paul, 1991).

En el reproductor y puesta de *Tethys fimbria* se hallaron 9 y 11-fatty acyl esters de PGF₂α y PGF₃α-1,15-lactones (Di Marzo *et al.*, 1992a). Estos autores realizaron un interesante estudio químico a través de las distintas fases de maduración sexual del animal. El papel de las prostaglandinas en el control de la reproducción en insectos ha sido ampliamente estudiado (Kubo y Kim, 1987, y referencias allí mencionadas).

Un estudio sobre la química en la embriología y las puestas se puede hallar en Florkin y Scheer (1972).

En otras glándulas específicas.

Se han descrito algunos monoterpenos en las glándulas opalina, prostática y cromotrópica de *Aplysia punctata* (Quiñoa *et al.*, 1989). La secreción púrpura de *Aplysia* spp se produce en las glándulas de Blochmann, mientras que la glándula opalina segrega sustancias teóricamente defensivas (Flury, 1915), si bien existen pocos estudios sobre ello (Carefoot, 1987). La glándula atrial parece ser el lugar de producción de las feromonas de *Aplysia brasiliana* (Painter *et al.*, 1991).

En el apartado 5.14. hemos mencionado la presencia de un producto de la glándula ptialina de *Dendrodoris limbata* que no pudo ser aislado.

La glándula amarilla de *Navanax inermis* parece ser el lugar de producción de las navenonas (Sleeper, 1981), por lo que sería lógica su acumulación allí.

Se ha señalado la presencia de glándulas defensivas específicas en *Limacia clavigera*, *Calma glaucoides*, *Hermaea dendritica*, *Doto* spp, *Elysia viridis*, *Ancula cristata*, *Acanthodoris pilosa*, *Onchidoris pusilla*, *Tritonia hombergi*, y de glándulas situadas cerca de la branquia en *Archidoris tuberculata*, *Polycera quadrilineata*, *Limacia clavigera*, *Goniodoris nodosa* y *G. castanea* (Hecht, 1895; Herdman y Clubb, 1892; Thompson, 1960b). Edmunds (1966b) citó en *Berthelinia* una glándula hipobranquial que podría tener importancia defensiva.

7.3. Aplicaciones taxonómicas y/o filogenéticas.

7.3.1. Características generales de los distintos grupos.

Si bien los resultados en Opisthobranchios son todavía escasos y no nos permiten hacer los estudios taxonómicos y filogenéticos que se han hecho en otros grupos (p. ej. artrópodos, Eisner, 1970; esponjas, Berquist y Wells, 1983; alcionáceos, Sammarco y Coll, 1988; equinodermos, Stonik y Elyakov, 1988; y en general, Harborne, 1977), las sustancias naturales en moluscos Opisthobranchios han permitido realizar ya algunas consideraciones taxonómicas (Faulkner y Ghiselin, 1983; Karuso, 1987). Los resultados hasta ahora obtenidos indican una fuerte correspondencia entre los productos naturales y la taxonomía.

Por ejemplo, el valor taxonómico de los esteroides ya fue propuesto en organismos marinos por Baker y Murphy (1976), quienes además hacían derivar todos los esteroides hallados de 8 tipos básicos de esqueleto. A pesar de haber sido poco estudiados, los esteroides pueden ser de gran ayuda también en Opisthobranchios.

A continuación veremos las características comunes que presentan los órdenes de Opisthobranchios químicamente estudiados, en lo referente únicamente a las sustancias naturales. Las referencias a los trabajos relativos a cada una de las especies se hallan detalladas en los capítulos 6., 7.1., y 7.2., por lo que no se repiten en este capítulo, haciéndose referencia solamente a las tablas donde se han citado previamente. En la Tabla 7.5. se resume el número de especies de cada grupo en las que se han hallado una o más sustancias de un determinado tipo.

Cabe destacar que la biosíntesis de metabolitos se ha comprobado hasta el momento en cuatro grupos de Opisthobranchios: Cephalaspidea, Sacoglossa, Dendronotacea y Doridacea. La biosíntesis posiblemente ha aparecido de forma independiente dentro de cada uno de ellos. No parece claro, pues, que se pueda establecer una relación entre los órdenes considerados más primitivos (Gosliner, 1981) con los productos de origen dietético, y recíprocamente, de los más evolucionados con los metabolitos

	Cefalaspídeos	Anaspídeos	Sacoglosos	Notaspídeos	Eolidáceos	Dendronotáceos	Armináceos	Doridáceos
Derivados de acetato y propionato	6	5	11	1	-	2	-	7
Derivados del mevalonato	3	18	7	2	9	4	1	79
Derivados del shikimato	1	-	-	-	-	-	-	5
Compuestos nitrogenados	3	10	-	-	2	1	1	18
Compuestos de origen mixto	3	-	-	1	-	-	-	7
Sustancias ácidas	3	-	-	16	-	-	-	6
Compuestos biosintetizados	1	-	3	-	-	1	-	5
Número de especies estudiadas	14	28	18	19	10	8	2	100

Tabla 7.5. Especies de Opisthobranchios para las que se han descrito los distintos tipos de sustancias (puede haber especies con más de un tipo de compuestos).

biosintetizados. Sí parece posible hallar algunas relaciones interesantes dentro de los órdenes.

En la diversificación del grupo ha habido al menos dos factores de gran importancia: 1) la explotación de recursos alimenticios, y 2) la obtención de metabolitos con fines defensivos (Faulkner y Ghiselin, 1983).

Orden Cephalaspidea.

La mayoría de las especies estudiadas presentan compuestos de tipo polipropionato (*Philinopsis*, *Navanax*, *Bulla*, *Scaphander*, Tablas 6.1. y 7.4.). Además se han citado también compuestos de origen mixto (p. ej. *Haminoea*, Tabla 6.9.), sustancias de tipo ácido (en *Philine* y *Acteon*, Tabla 6.10.), algunos compuestos nitrogenados (*Philinopsis* y *Navanax*, Tabla 6.8.) y un compuesto derivado del shikímico (*Navanax*). Solo en un caso se halló un monoterpeno en *Haminoea cymbalum* (Tabla 6.2.), y ácidos grasos en *Haminoea templadoi* (Tabla 6.1.). Se observa una gran similitud entre los compuestos y las estrategias defensivas de *Navanax inermis* y *Philinopsis* spp, así como entre *Bulla striata* y *B. gouldiana*.

Orden Anaspidea.

Según Faulkner (1984a), en este grupo se habría desarrollado la capacidad de alimentarse de algas químicamente protegidas, reduciendo así su competencia con otros herbívoros no especializados, y habrían usado los mismos productos químicos para su propia protección. La mayoría de aplisiáceos (Tabla 7.1.) concentran metabolitos de algas rodofíceas del género *Laurencia*, y también de *Plocamium* y *Chondria*. Pocas especies lo hacen a partir de algas pardas (*Dictyota*, *Stypopodium*).

A diferencia de las algas rojas, en las que predominan los sesquiterpenos halogenados, en aplisiáceos se han aislado mayoritariamente sesquiterpenos no halogenados. Sin embargo, los principales tipos de

esqueletos de sesquiterpenos halogenados de *Laurencia* se han hallado en aplisiáceos (Faulkner, 1984a).

En este grupo se han descrito, además de los terpenos de origen dietético, sustancias de tipo acetilénico, prostaglandinas, macrólidos y compuestos nitrogenados (Tablas 6.1., 6.2., 6.3., 6.4., 6.6., 6.7. y 6.8.). Hay que destacar que las especies de este orden han sido de las más estudiadas, debido probablemente a su gran tamaño y facilidad de recolección.

Además de la secreción coloreada, la secreción de la glándula opalina y las toxinas de la glándula digestiva (Carefoot, 1987), hay otras sustancias localizadas en la parte externa y parapodos de *Aplysia* spp, relacionadas con una función defensiva (Martínez *et al.*, 1992; Spinella *et al.*, 1992a).

Akera bullata constituye un caso especial, ya que de confirmarse la presencia de haminol (ver Tabla 6.1.) la relacionaría con los cefalaspídeos. Este es un caso que requiere una particular atención, ya que desde siempre se ha discutido si *A. bullata* era un cefalaspídeo o un anaspídeo, así como toda la Familia Akeridae. Tradicionalmente se ha incluido en los cefalaspídeos (p. ej. Thompson, 1976), pero actualmente se tiende a incluirla en los anaspídeos (Thompson y Seaward, 1989), como ya hiciera en su día Guiart (1901) en base a sus características anatómicas. Por su concha externa, escudo cefálico y órgano de Hancock *Akera* es bastante distinta de *Aplysia*, pero es similar a ella por la fórmula radular (n.1.n), dieta herbívora, buche, secreción púrpura, cópula en cadenas de hasta 6 individuos, y otras características del aparato reproductor, de la segmentación del huevo y morfología de los espermatozoides. La presencia de haminol en *A. bullata* la separaría de los anaspídeos, al contrario de las tendencias actuales, al aproximarla a los cefalaspídeos (*Haminoea* spp).

Orden Sacoglossa.

En este grupo aparecen varios tipos de estrategias. Los más primitivos presentan terpenos procedentes de algas (*Oxynoe*, *Bosellia*, *Thuridilla*, *Elysia*, Tablas 6.1., 6.3. y 6.4.), mientras que otros son capaces de

biosintetizar polipropionatos (*Tridachiella*, *Placobranchus*, *Tridachia*, *Ercolania*, *Placida*, *Cyerce*, *Elysia*, Tabla 6.1.). El género *Elysia* presenta especies pertenecientes a los dos grupos. Esta variedad de mecanismos químicos ha sido mencionada recientemente por Vardaro *et al.* (1992b), e interpretada evolutivamente por Mollo (1992) y Di Marzo *et al.* (*en prensa*), proponiéndose el género *Cyerce* como el más evolucionado de los hasta ahora estudiados. Curiosamente la presencia de polipropionatos de biosíntesis los relaciona con los cefalaspídeos.

Así pues, fue dentro del orden donde apareció la capacidad de biosintetizar moléculas (Faulkner y Ghiselin, 1983), mientras que las especies más primitivas todavía presentan productos derivados de algas clorofíceas. Los primeros estudios en sacoglosos sobre defensa, características de los cerata y autotomía fueron iniciados por Jensen (1984) con *Mourgona germaineae*. Trabajos más recientes consideran la defensa química en relación al resto de caracteres implicados en la simbiosis (Ros y Marín, 1991).

Orden Notaspidea.

La química de este grupo nos proporciona compuestos muy diversos. Por un lado, la mayoría de especies estudiadas presentan secreciones ácidas (*Berthella*, *Berthellina*, *Pleurobranchus*, *Pleurobranchaea*, Tabla 6.10.), y por otro aparecen compuestos de origen mixto (*Umbraculum*, Tabla 6.9.) y un monoterpeno (*Tylodina*, Tabla 6.2.).

Orden Nudibranchia.

Los diversos subórdenes presentan muy distintas características. En cuanto a los Eolidáceos, se ha estudiado muy poco su metabolismo secundario, y se conoce sólo un diterpeno (en *Phyllodesmium*, Tabla 6.4.), algunos esteroides (en *Cratena*, *Flabellina*, Tabla 6.6.) y compuestos nitrogenados (en *Phestilla*, Tabla 6.8.). Cabe recordar, sin embargo, que su defensa depende mayoritariamente de los cnidoblastos que obtienen de la dieta (Edmunds, 1966a; Harris, 1971, 1973).

Los dendronotáceos han sido apenas estudiados. Se han descrito prostaglandinas (*Tethys*, Tabla 6.1.) y terpenos (*Melibe*, *Tochuina*, Tablas 6.2., 6.3., 6.4. y 6.5.). En armináceos se han descrito diterpenos (*Armina*, Tabla 6.4.) y compuestos nitrogenados (*Janolus*, Tabla 6.8.), lo que de confirmarse con otras especies relacionadas podría indicar la existencia de dos vías evolutivas distintas en el suborden (junto a otros datos de tipo morfoanatómico, naturalmente).

En lo referente a los doridaáceos, veremos breve y separadamente algunas Familias.

Familia Chromodorididae.

La separación entre los distintos géneros fue claramente establecida ya desde 1977 por Rudman, no sólo por los dientes bífidos o no en la rádula, sino también por la estructura de la armadura labial y las características del aparato reproductor. A todo ello hay que añadir los datos químicos. La localización de las MDF's ha sido también utilizada por Rudman (1984) para establecer la filogenia o se ha sugerido su utilidad en taxonomía (García, 1984) dentro de la Familia.

Hypselodoris y *Chromodoris* presentan una clara relación con las esponjas de las que se alimentan (*Dysidea* spp, *Aplysilla* spp,...), acumulando y utilizando eficazmente sus metabolitos. Ya hemos comentado que las esponjas presas de *Hypselodoris* y *Chromodoris* son Dendrocerátidas y Dictiocerátidas (ver apartado 7.1.), de las que conviene destacar que no presentan espículas propias. En las especies de *Hypselodoris* del Mediterráneo se han hallado hasta ahora únicamente sesquiterpenos, mientras que en *Chromodoris* de la misma área se hallan diterpenos. En especies de otras zonas se hallan también diversos tipos de terpenoides (ver Tablas 6.3., 6.4. y 6.5.). Las especies del género *Glossodoris* presentan mayoritariamente sesterterpenos (ver Tabla 6.5.), al igual que algunas especies de *Chromodoris* e *Hypselodoris*.

El género *Hypselodoris*.

En todas las especies analizadas en esta Tesis se han hallado furanosesquiterpenos de origen dietético localizados en las MDFs (excepto en *H. fontandraui*, que no presenta MDFs, en el que las sustancias se localizan en el borde del manto). En *H. orsini*, ya se ha comentado (ver apartado 5.7.) que por sus características y productos químicos no encaja con el resto de especies del género, por lo que tal vez debería ser objeto de un estudio taxonómico más profundo. El estudio detallado de las MDFs, revela que en *H. webbi*, *H. villafranca*, *H. cantabrica*, e *H. bilineata* las MDFs se hallan cerca de branquias y rinóforos, mientras que en *H. tricolor* e *Hypselodoris* sp se hallan únicamente cerca de las branquias.

La distribución de los sesquiterpenos en el género *Hypselodoris* se resume en la Tabla 7.6. (las referencias bibliográficas se hallan en la Tabla 6.3.). Se han incluido las especies de *Chromodoris* que presentan también sesquiterpenos, aunque no sabemos si corresponderán a especies con características químicas intermedias a los dos géneros, o si se requiere un análisis taxonómico más profundo de las mismas. *H. porterae* podría ser una especie de *Chromodoris* o de *Mexichromis* según McDonald (1983), pero sus productos químicos se corresponden con los de otras especies de *Hypselodoris*.

De los estudios realizados en esta Tesis, deducimos que los productos que presenten varias especies procedentes de una misma área geográfica no dependerán tanto de la especie de *Hypselodoris* en concreto, sino de la especie de esponja de la que se alimenten. Así, varias especies de un mismo lugar pueden presentar idéntico patrón de productos, debido a que depredan sobre la misma variedad de esponja (*Dysidea*). Las consideraciones ecológicas derivadas de estas observaciones, se discutirán en el apartado siguiente. En el capítulo 7.1. se han expuesto las especies de esponjas (*Dysidea*) de las que proceden los metabolitos de *Hypselodoris* spp.

Es de esperar que en otros géneros relacionados (*Mexichromis*, *Glossodoris* y *Cadlina*) se den casos similares. Estos tres géneros presentan MDFs (Rudman, 1984), donde presumiblemente se acumularán los terpenos,

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
H. californiensis	X	X	X	X	X																	
H. daniellae						X																
H. ghisellii				X			X															
H. godefroyana					X		X															
H. porterae		X	X																			
H. zebra		X	X				X	X	X													
H. agassizi										X												
H. cantabrica				X			X			X	X	X	X	X	X							
H. fontandraui																						X
H. webbi							X						X									X
H. villafranca				X			X			X	X	X	X	X	X							
H. tricolor				X			X			X	X	X	X	X	X							
Hypselodoris sp													X									X
C. matridadivus					X		X															
C. albonotato																		X				
C. marislae																						X
C. lochl				X																		
C. funerea			X						X										X	X	X	X

Tabla 7.6. Especies de *Hypselodoris* y *Chromodoris* que presentan sesquiterpenos. (1. pallescensina-A, 2. euryfurano, 3. furodysinina, 4. dendrolasina, 5. nakafurano-8, 6. spiniferina-2, 7. nakafurano-9, 8. 5-acet.-nakafurano-8, 9. 5-hidroxi-nakafurano-8, 10. furodysinina lactona, 11. agassizina, 12. ent-furodysinina, 13. longifolina, 14. tavacturano, 15. iso-nakafurano-9, 16. iso-dehidro-dendrolasina, 17. isotavacturano, 18. pu'ulenal, 19. furodysinina, 20. metylifurodysinina lactona, 21. furodysinina hidropéroxido, 22. no identificados).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
<i>C. norrisi</i>	X	X	X	X																
<i>C. epicuria</i>				X	X	X														X
<i>C. marislæ</i>								X												
<i>C. macfarlandi</i>		X						X	X	X										
<i>C. cavæ</i>												X								
<i>C. luteorosea</i>	X								X					X	X	X	X	X		
<i>C. purpurea*</i>	X								X					X			X	X		X
<i>C. krohni*</i>	X								X					X			X	X		
<i>C. britoi*</i>	X								X					X			X	X		X
<i>H. ghiselini</i>																				X

Tabla 7.7. Especies de *Chromodoris* e *Hypselodoris* que presentan diterpenos. (1. norrisolide, 2. macfarlandina-E, 3. shahamina-C, 4. polyrhaphina-A, 5. aplyroseol-1, 6. aplyroseol-2, 7. dendrillol-1, 8. marislina, 9. macfarlandina-A, 10. macfarlandina-B, 11. macfarlandina-C, 12. macfarlandina-E, 13. chromodorolide A, 14. luteorosina, 15. 12-epi-aplysellina, 16. 12-epi-12-deacetyl-aplysellina, 17. polyrhaphina-C, 18. chelonaplysinina-C, 19. ghiselinina, 20. no identificados). (*= productos identificados mediante TLC).

que posiblemente serán de origen dietético. De hecho *Cadlina luteomarginata* ha sido ampliamente estudiada, presentando terpenoides diversos de origen dietético (ver Tablas 6.3., 6.4., 6.5., 7.1., 7.2. y 7.3.). En *Glossodoris quadricolor* se ha hallado latrunculina-B (Tabla 6.8.), compuesto similar a otros hallados en varias especies de *Chromodoris*. *Glossodoris edmundsi* (Cervera *et al.*, 1989) presenta MDFs blancas por todo el borde del manto, si bien por el momento no se han estudiado sus metabolitos secundarios.

El género *Chromodoris*.

A todo lo dicho anteriormente añadiremos que todas las especies de *Chromodoris* estudiadas presentan terpenoides de origen dietético procedentes también de esponjas Dendroceratida y Dictyoceratida. La mayoría de productos hallados en *Chromodoris* son diterpenos (ver Tabla 7.7., y referencias respectivas en la Tabla 6.4.). Sin embargo en varias especies del género se han descrito sesterterpenos (Tabla 6.5.), como en el caso ya comentado de *Hypselodoris orsini*.

También en este caso, al menos en las especies estudiadas en esta Tesis, los productos se acumulan en MDFs situadas en el borde del manto.

Familias Dorididae y Archidorididae.

En ambas Familias se han descrito casos de biosíntesis de terpenos glicéridos (*Doris*, *Archidoris*, *Austrodoris*, Tablas 6.9. y 7.4.), y se han hallado otras sustancias procedentes de la dieta sobre esponjas (Halichondrida). Ya Karuso (1987) observó que existían varios casos de terpenoides glicéridos de biosíntesis, si bien en la actualidad se conocen más casos con idénticos productos (Davies-Coleman y Faulkner, 1991; Zubía *et al.*, *en prensa*).

Familia Dendrodorididae.

En diferentes especies de *Dendrodoris* y *Doriopsilla* se encuentra el mismo tipo de sesquiterpenos drimánicos de origen biosintético (Tablas 6.3. y 7.4.), aunque esto último no ha sido demostrado en todas las especies.

Coincidimos con Faulkner y Ghiselin (1983) en que la capacidad biosintetizadora apareció dentro del grupo de los porostomados, ya que el género *Phyllidia* todavía presenta productos derivados de la dieta en vez de biosintetizarlos (ver apartado 7.1.1.) como sucede en el género *Dendrodoris*.

Los productos biosintetizados por los opistobranquios deberían ser considerados como los mejores marcadores taxonómicos, ya que en los casos en los que las sustancias proceden de la dieta, en rigor no lo son, puesto que son de la presa.

Familia Phyllidiidae.

Todas las especies hasta ahora estudiadas contienen sesquiterpenos isonitrilos derivados de la dieta (esponjas Axinellida y Halichondrida). Risbec (1928) ya dijo que todas las especies de *Phyllidia* que él estudió segregaban al ser molestadas un muco con un fuerte olor. La presencia de este tipo de productos en todas las especies de *Phyllidia* estudiadas fue ya observada por Karuso (1987).

7.3.2. Análisis estadístico.

Con todos los datos expuestos en el capítulo 6., exceptuando los ácidos grasos, esteroides y carotenoides (ya que se puede considerar que se hallan en casi todas las especies aunque no hayan sido estudiadas), se ha efectuado un análisis estadístico utilizando el Índice de Jaccard, para ver la relación entre los distintos géneros según el tipo de sustancias que presentan. Los resultados se muestran en la Figura 7.3.

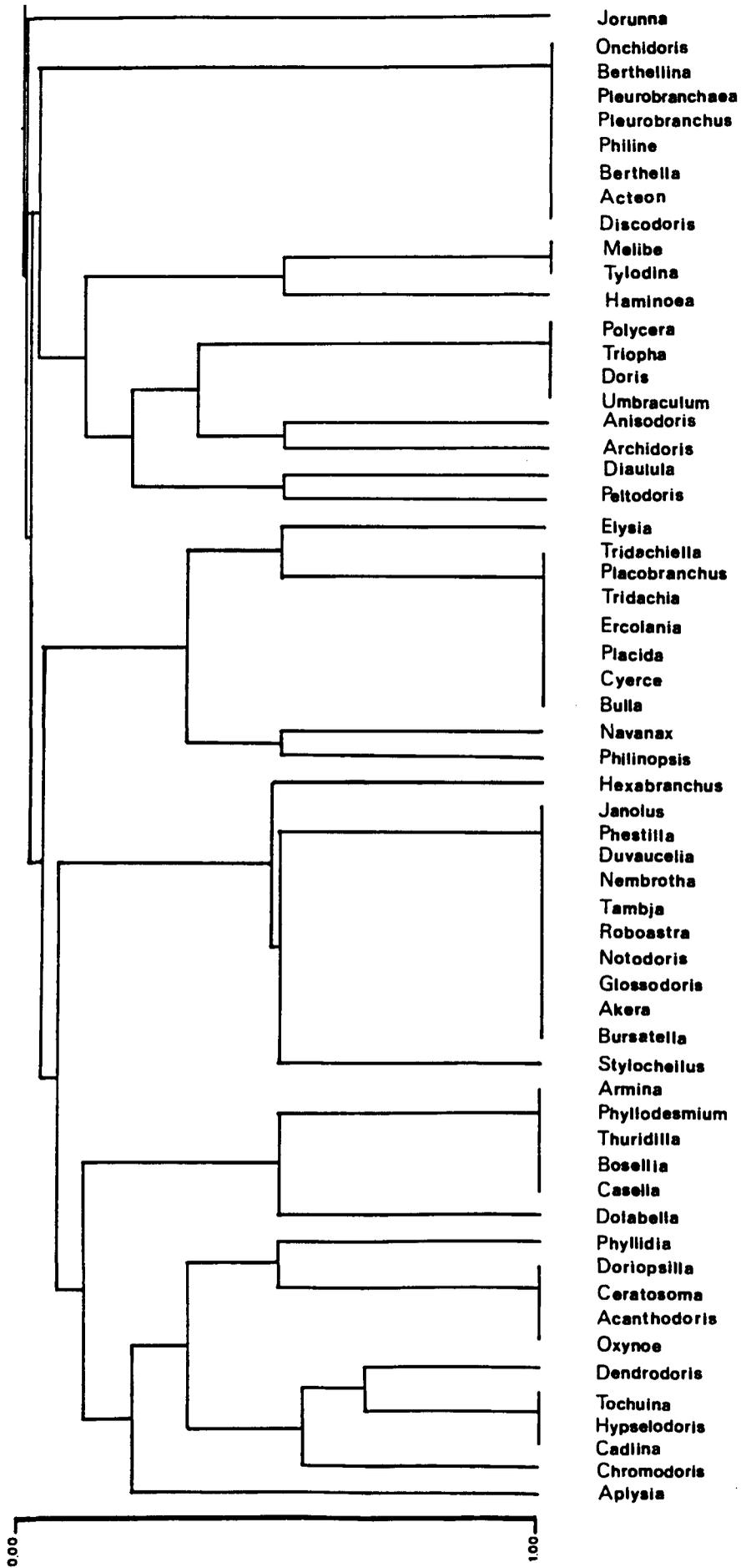


Figura 7.3. Dendrograma obtenido aplicando el índice de Jaccard a las sustancias conocidas en los distintos géneros de Opisthobranchios.

Estos resultados deben ser interpretados con precaución ya que nos indican únicamente, dado un género con un determinado tipo de sustancias (independientemente de su número), su similitud con otros géneros por este motivo. Los tipos de sustancias se han clasificado de acuerdo con lo expuesto en el apartado 6. (derivados del acetato, polipropionatos, prostaglandinas, monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, sesterterpenos, etc.). Se observa que se agrupan de forma clara los géneros que presentan sustancias ácidas, los que presentan compuestos nitrogenados, los que poseen polipropionatos, y en general los que presentan terpenoides (en la parte izquierda). El resto de géneros no parecen agruparse de forma clara.

"A chi ha l'ernia intestinale, si applica la lepre di mare trita con miele". Plinio el Viejo, *Historia Naturalis*, Libro XXXI, Cap. IX. (Caprotti, 1977).

7.4. Función e implicaciones ecológicas.

7.4.1. Tests de actividad en laboratorio y efectos farmacológicos.

Nuestra clasificación de las sustancias según su actividad está hecha desde un punto de vista biológico, y difiere considerablemente de las revisiones que desde un punto de vista químico o farmacológico han efectuado otros autores (Fuhrman, 1981; Fuhrman *et al.*, 1981; Walker y Faulkner, 1981; Schulte y Scheuer, 1982; Kaul y Daftari, 1986). Otras revisiones se han realizado desde puntos de vista biomédicos y ecológicos (Paul, 1988; Scheuer, 1990). Incluiremos en esta clasificación las actividades antimicrobianas, los tests de toxicidad, etc., descritos en opistobranquios, pero haciendo énfasis en aquellos realizados en especies analizadas químicamente.

Las funciones de los metabolitos secundarios en general han sido ya comentadas en el apartado 6.1.

Algunas de las sustancias citadas en las tablas han sido descritas en otras especies, en las que deben tener la misma actividad. Se han incluido en cada apartado los tests con resultado negativo.

Este tipo de tests clásicos prueban generalmente efectos en laboratorio, y frecuentemente con especies ajenas al medio en que los opistobranquios se desenvuelven, por lo cual no suelen ser sinónimo de función ecológica, como comentaremos posteriormente.

Sustancias antibacterianas.

Se incluyen en la Tabla 7.8. aquellas sustancias para las que se ha descrito una actividad antibacteriana o bacteriostática.

ESPECIE SUSTANCIA	REFERENCIA	BACT.	DOSIS
<i>Aplysia dactylomela</i>			
cyclolaurenol	Ichiba e Higa (1986)	--	--
cyclolaurenol acetato	"	--	--
cupalaurenol	"	--	--
cupalaurenol acetato	"	--	--
<i>Aplysia depilans</i>			
dictyol E	Sodano (1982)	S.a.	--
dictyol C	"	S.a./K.p./E.c./C.f.	--
pachydictyol A	Minale y Riccio (1976) Hirschfield et al. (1973)	S.a.	--
<i>Archidoris odhneri</i>			
glicérido	Andersen y Sum 1980	S.a.	--
<i>Archidoris montereyensis</i>			
hexadecylglycerol	Gustafson y Andersen (1985)	S.a.	--
<i>Aldisa sanguinea cooperi</i>			
hexadecylglycerol	Gustafson y Andersen (1985)	B.s.	--
<i>Notodoris minor</i>			
ext. metanólico	Gunthorpe y Cameron (1987)	S.a.	100µg/disc
	"	E.c.	100µg/disc
	"	P.p.	100µg/disc
	"	S1	100µg/disc
<i>Notodoris gardeneri</i>			
ext. metanólico	Gunthorpe y Cameron (1987)	S.a./S1	IN
	"	E.c.	100µg/disc
	"	P.p.	100µg/disc
<i>Halgerda sp</i>			
ext. metanólico	Gunthorpe y Cameron (1987)	S.a./E.c.	IN
	"	P.p.	IN
	"	S1	100µg/disc
<i>Halgerda aurantomaculata</i>			
ext. metanólico	Gunthorpe y Cameron (1987)	S.a./E.c.	IN
	"	P.p.	IN
	"	S1	100µg/disc

<i>Rostanga arbutus</i>		
ext. metanólico	Gunthorpe y Cameron (1987)	S.a. 100µg/disc
	"	E.c. 100µg/disc
	"	P.p. 100µg/disc
	"	S1 100µg/disc
<i>Aphelodoris varia</i>		
ext. metanólico	Gunthorpe y Cameron (1987)	S.a. 100µg/disc
	"	E.c. 100µg/disc
	"	P.p. 100µg/disc
	"	S1 100µg/disc
<i>Hypselodoris obscura</i>		
ext. metanólico	Gunthorpe y Cameron (1987)	S.a./E.c. IN
	"	P.p. IN
	"	S1 100µg/disc
<i>Hypselodoris bennetti</i>		
ext. metanólico	Gunthorpe y Cameron (1987)	S.a. 100µg/disc
	"	E.c./P.p./S1 IN
<i>Chromodoris sedna</i>		
deoxoscalarins	Hochlowski et al. (1983b)	V.a. 100µg/disc
scalarolide	"	V.a. 100µg/disc
sednolide	"	V.a. 100µg/disc
<i>Chromodoris macfarlandi</i>		
macfarlandin A	Molinski y Faulkner (1986)	B.s. 10µg/disc
macfarlandin B	"	B.s. 10µg/disc
	"	S.a. --
macfarlandin D	Molinski et al. (1986)	B.s. 10µg/disc
macfarlandin E	"	V.a. 100µg/disc
	"	B.h. 100µg/disc
<i>Chromodoris cavae</i>		
chromodorolide A	Dumdei et al. (1989)	B.s. 60µg/disc
		R.s. 60µg/disc
<i>Chromodoris elizabethina</i>		
ext. metanólico	Gunthorpe y Cameron (1987)	S.a. 100µg/disc
	"	E.c./P.p./S1 IN
<i>Chromodoris inornata</i>		
ext. metanólico	Gunthorpe y Cameron (1987)	S.a. 100µg/disc
	"	E.c./P.p./S1 IN
<i>Chromodoris imperialis</i>		
ext. metanólico	Gunthorpe y Cameron (1987)	S.a. 100µg/disc
	"	E.c./S1 IN
	"	P.p. 100µg/disc

<i>Ceratosoma cornigerum</i>			
ext. metanólico	Gunthorpe y Cameron (1987)	S.a./E.c.	IN
"	"	P.p.	IN
"	"	S1	100µg/disc
<i>Tambja</i> spp y <i>Roboastra tigris</i>			
tambjamins A y B	Carte y Faulkner (1983)	E.c.	50µg/disc
"	"	S.a.	50µg/disc
"	"	B.s.	50µg/disc
"	"	V.a.	50µg/disc
tambjamins C y D	"	B.s.	5µg/disc
"	"	S.a.	5µg/disc
"	"	V.a.	5µg/disc
"	"	E.c.	50µg/disc
<i>Dendrodoris albobrunnea</i>			
ext. metanólico	Gunthorpe y Cameron (1987)	S.a.	100µg/disc
"	"	E.c./P.p.	IN
"	"	S1	100µg/disc
<i>Dendrodoris grandiflora</i>			
fasciculatin	Sodano (1982)	S.a./S.p.	--
<i>Doriopsilla miniata</i>			
ext. metanólico	Gunthorpe y Cameron (1987)	S.a./P.p.	IN
"	"	E.c.	100µg/disc
"	"	S1	IN
<i>Phyllidia elegans</i>			
ext. metanólico	Gunthorpe y Cameron (1987)	S.a.	100µg/disc
"	"	E.c.	100µg/disc
"	"	P.p./S1	IN

Tabla 7.8. Sustancias con actividad sobre diversas bacterias: V.a.= *Vibrio anguillarum*; B.s.= *Bacillus subtilis*; S.a.= *Staphylococcus aureus*; R.s.= *Rhizoctonia solani*; B.h.= *Beneckea harveyi*; E.c.= *Escherichia coli*; S.p.= *Streptococcus pyogenes*; P.p.= *Pseudomonas putida*; S1= bacteria marina no identificada; K.p.= *Klebsiella pneumoniae*; C.f.= *Citrobacter freundii*. IN= Inactivo. -- = Actividad no especificada cuantitativamente.

Al igual que en muchos de los demás tests que se incluyen en este capítulo, la mayoría de tests con bacterias se han realizado con especies que habitan de forma natural en medios distintos a los de los opistobranquios. Es necesario destacar aquí que *Vibrio anguillarum* es una bacteria marina, así como la citada como S1.

El polygodial, extraído de la planta *Warburgia*, resultó activo contra varias especies de microorganismos, según indicaron Taniguchi *et al.* (1984).

Otras sustancias, sin embargo, (además de las ya indicadas en la Tabla) resultaron inactivas en los tests antimicrobianos, como la macfarlandina E, el norrisolide, la shahamina-C y la polyrhaphina A (según Bobzin y Faulkner, 1989), y la dihydro- y la tetrahydrohalichondramida (Kernan *et al.*, 1988b). La macfarlandina E fue señalada como no activa por Bobzin y Faulkner (1989a) y en cambio está en la Tabla debido a la actividad descrita por Molinski *et al.* (1986) con distintas especies de bacterias. La macfarlandina C resultó inactiva contra todas las especies probadas por Molinski *et al.* (1986). Los extractos metanólicos de las siguientes especies: *Chromodoris kuiteri*, *C. coi*, *Casella atromarginata*, *Dendrodoris nigra*, *Phyllidia nobilus* y *P. ocellata*, resultaron inactivos para todas las cepas bacterianas probadas por Gunthorpe y Cameron (1987).

El glicérido de *A. odhneri* resultó activo según se muestra en la Tabla 7.8., pero sus dos monoacetatos fueron inactivos según los mismos autores. Uno de los acetilenos clorados de *Diaulula sandieguensis* (Walker y Faulkner, 1981) presenta actividad antimicrobiana (no especificada), como el diterpeno de *Aplysia dactylomela* (González *et al.*, 1983b). Tampoco se especificó la actividad fuertemente antibacteriana de las aplysianin-A y -E de *Aplysia* sp (Adamson *et al.*, 1989). Ulapualide A y B de *Hexabranhus sanguineus* (Roesener y Scheuer, 1986) también se han citado como antimicrobianos.

Muchas de las especies analizadas por Gunthorpe y Cameron (1987) no han sido todavía estudiadas químicamente, y por lo tanto no se sabe cuáles son las sustancias responsables de la actividad.

Sustancias antifúngicas.

Se exponen en la Tabla 7.9. aquellas especies para las que se han realizado tests. Una revisión sobre sustancias antifúngicas en general ha sido recientemente publicada (Fusetani, 1988).

ESPECIE SUSTANCIA	REFERENCIA	HONGO	DOSIS
<i>Aplysia dactylomela</i> cyclolaurenol	Ichiba e Higa (1986)	--	--
cupalaurenol	"	--	--
cupalaurenol acetato	"	--	--
<i>Archidoris odhneri</i> 2,3-dihydrohypropylfarnesato	Andersen y Sum (1980)	S.a.	--
<i>Chromodoris kuiteri</i> extracto metanólico	Gunthorpe y Cameron (1987)	C.a.	--
	"	P.m.	--
<i>Chromodoris elizabethina</i> extracto metanólico	Gunthorpe y Cameron (1987)	C.a.	--
	"	P.m.	IN
latrunculin A	Okuda y Scheuer (1985)	C.a.	--
<i>Chromodoris inornata</i> extracto metanólico	Gunthorpe y Cameron (1987)	C.a.	--
	"	P.m.	IN
<i>Ceratosoma cornigerum</i> extracto metanólico	Gunthorpe y Cameron (1987)	C.a.	IN
	"	P.m.	--
<i>Notodoris minor</i> extracto metanólico	Gunthorpe y Cameron (1987)	C.a.	IN
	"	P.m.	--
<i>Notodoris gardeneri</i> extracto metanólico	Gunthorpe y Cameron (1987)	C.a.	--
	"	P.m.	--
<i>Halgerda</i> sp extracto metanólico	Gunthorpe y Cameron (1987)	C.a.	IN
	"	P.m.	--
<i>Halgerda aurantomaculata</i> extracto metanólico	Gunthorpe y Cameron (1987)	C.a.	IN
	"	P.m.	--
<i>Rostanga arbutus</i> extracto metanólico	Gunthorpe y Cameron (1987)	C.a.	IN
	"	P.m.	--
<i>Aphelodoris varia</i> extracto metanólico	Gunthorpe y Cameron (1987)	S.a.	--
	"	P.m.	--

<i>Hexabranchus sanguineus</i>		
ulapualides A y B	Roesener y Scheuer (1986)	C.a. --
Kabiramida A,B,D,E	Matsunaga et al. (1989)	P.c. --
dihydrohalichondramida	"	P.c. --
33-methyl-dihydrohalichondramida	"	P.c. --
dihydrohalichondramida	"	P.c. --
tetrahydrohalichondramida	Kernan et al. (1988b)	C.a. --
puesta de nudibranquio no identificado		
kabiramida C	Matsunaga et al. (1986)	-- --
kabiramida A, B, C, D, E	Fusetani (1988)	-- --
<i>Tambja</i> spp		
tambjamins C y D	Carte y Faulkner (1983)	C.a. 5µg/disco
<i>Phyllidia bourguini</i>		
extracto crudo	Fusetani et al. (1992)	M.r. --
<i>Phyllidia elegans</i>		
extracto metanólico	Gunthorpe y Cameron (1987)	C.a. --
	"	P.m. --

Tabla 7.9. Sustancias con actividad antifúngica para: P.c.= *Penicillium chrysogenum*; M.r.= *Mortierella ramannianus*; S.a.= *Staphylococcus aureus*; C.a.= *Candida albicans*; P.m.= *Pichia membranica*. -- = especie o dosis no citada; IN= inactivo.

La latrunculina A, activa contra *C. albicans*, resultó inactiva para *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* (Okuda y Scheuer, 1985). El mecanismo de acción parece estar relacionado, según estos autores, con el entorpecimiento de la organización de microfilamentos en las células cultivadas.

Las puestas de *Dendrodoris nigra* no presentan actividad antifúngica (Matsunaga et al., 1986). Los extractos de las especies siguientes: *Hypselodoris obscura*, *H. bennetti*, *Chromodoris coi*, *C. imperialis*, *Casella atromarginata*, *Dendrodoris albobrunnea*, *Dendrodoris nigra*, *Doriopsilla miniata*, *Phyllidia nobilis* y *Phyllidia ocellata*, resultaron inactivos en los tests realizados por Gunthorpe y Cameron (1987).

Sustancias citotóxicas.

Se incluyen aquí tanto los inhibidores del crecimiento como los compuestos citotóxicos para determinadas líneas celulares (Tabla 7.10.), también llamados productos antitumorales o anticancerígenos.

ESPECIE SUSTANCIA	REFERENCIA	TEST	DOSIS
<i>Stylocheilus longicauda</i> debromoaplysiatoxin	Kato y Scheuer (1975, 1976) Hegyeli y Hegyeli (1981)	--	--
<i>Aplysia kurodai</i> aplamínone	Kigoshi et al. (1990), Yamada et al. (1992) (#)	P388	--
neoaplamínone	Kigoshi et al. (1990)	--	--
neoaplamínone sulphate	"	--	--
<i>Aplysia dactylomela</i> isobtusol acetato	Munro et al. (1987)	varias	--
deodactol	"	L1210	12µg/ml
isocaespitol acetato	Gonzalez et al. (1982)	--	--
parguerol	Schmitz et al. (1982)	--	--
parguerol acetato	"	--	--
deoxyparguerol	"	--	--
isoparguerol	"	--	--
isoparguerol acetato	"	--	--
bromootusenediol	Schmitz et al. (1979) Munro et al. (1987)	KB P388	4.5µg/ml 10µg/ml
diterpeno	Schmitz et al. (1979)	P388/L1210	--
extracto	Sigel et al. (1970)	P388	--
<i>Aplysia punctata</i> mezcla de monoterpenos	Quiñoa et al. (1989)	A.s.	2µg/ml
<i>Aplysia angasi</i> , <i>A. dactylomela</i> aplysisstatina	Pettit et al. (1977) " Von Dreele y Kao (1980)	P388 KB	2.7µg/ml 2.4µg/ml
<i>Aplysia fasciata</i> 4-acetyl-aplykurodin-B	Spinella et al. (1992)	A.s.	29.1µg/ml
<i>Aplysia depilans</i> dityol E	Sodano (1982)	KB	--

<i>Dolabella auricularia</i>			
dolatriol	Pettit y Cragg (1978)	--	--
dolatriol-6-acetato	Pettit (1977)	P388	13µg/ml
dolastatina-10	Pettit et al. (1987a)	P388	--
dolastatina-1 a -9	Pettit et al. (1976, 1977b)		
	Munro et al. (1987)	--	--
<i>Dolabella ecaudata</i>			
loliolide	Pettit et al. (1980), Munro et al. (1987)	--	--
<i>Bulla gouldiana</i>			
5,6-dehydroagljane-3	Spinella et al. (en prensa)	A.s.	--
isopulo'upone	"	A.s.	--
<i>Navanax inermis</i>			
5,6-dehydroagljane-3	Spinella et al. (en prensa)	A.s.	--
isopulo'upone	"	A.s.	--
<i>Tridachia crispata</i>			
crispatene	Ireland et al. (1979)	--	--
	Ireland y Faulkner (1981)	--	--
	Ksebati y Schmitz (1985)	--	--
crispatone	"	--	--
tridachiapyrone A,B,C	"	--	--
<i>Hexabranchnus sanguineus</i>			
ulapualide A y B	Roesener y Scheuer (1986)	L1210	--
Kabiramida A,B,D,E	Matsunaga et al. (1989)	L1210	--
dihydrohalichondramida	"	L1210	--
33-methyldihydrohalichondramida	"	L1210	--
<i>Chromodoris lochi</i>			
laulimalide	Corley et al. (1988)	KB	--
latrunculin A	Kakou et al. (1987)	KB y C.R.M.	--
dendrolasin	"	KB	--
<i>Chromodoris cavae</i>			
chromodorolide A	Dumdei et al. (1989)	L1210	20µg/ml
		P388	4mg/kg
<i>Chromodoris inornata</i>			
inorolide A	Miyamoto et al. (1992)	L1210	6µg/ml
	"	KB	13µg/ml
inorolide B	Miyamoto et al. (1992)	L1210	0.45µg/ml
	"	KB	4.6µg/ml
inorolide C	Miyamoto et al. (1992)	L1210	0.2µg/ml
	"	KB	2.8µg/ml
<i>Chromodoris imperialis</i>			
extracto metanólico	Gunthorpe y Cameron (1987)	A.	--
<i>Halgerda aurantomaculata</i>			
extracto metanólico	Gunthorpe y Cameron (1987)	A.	--

especie no identificada			
sphinxolide	Guella et al. 1989	--	--
<i>Peltodoris atromaculata*</i>			
petroformyne-1	Cimino et al. (1989d,1990d)	A.s. 0.014µg/ml	
	"	P.d.	35
petroformyne-2	"	A.s. 0.009µg/ml	
	"	P.d.	15
petroformyne-3	"	A.s. 0.003µg/ml	
	"	P.d.	49
petroformyne-4	"	A.s. 0.0075µg/ml	
	"	P.d.	43

Tabla 7.10. Sustancias citotóxicas. (C.R.M.= células de riñón de mono; P388 (o PS)= "murine lymphocytic leukemia" en ratón; L1210 (o LE)= "lymphoid leukemia" en ratón; KB= "human epidermoid carcinoma of nasopharynx"; A.s.= citotóxico para *Artemia salina*; A.= *Artemia* sp; P.d.= antitumoral en el test del disco de patata (% de inhibición, 0.5 mg/ml).(#= otras actividades descritas en Yamada et al. (1992). -- = dosis o test no determinado. *= los tests mencionados fueron realizados con los productos extraídos de la esponja *Petrosia ficiformis*, pero al haberse aislado también del nudibranquio (ver capítulo 5.13.) consideramos que el resultado sería el mismo.

El hecho de que los invertebrados posean mecanismos de control intercelular basados en algún tipo de regulación química fue propuesto por Pettit (1977), justificando así el gran interés que se ha desatado entorno a las sustancias anticancerígenas de dichos invertebrados. Cabe destacar que la dolastatina-10 es la sustancia antineoplásica más potente conocida (hasta 1987, Munro et al.).

Kakou et al. (1987) mencionaron que la latrunculina A podía inducir cambios morfológicos y celulares.

Los extractos de diversos doridáceos analizados por Gunthorpe y Cameron (1987) no resultaron activos con *Artemia* sp, excepto en los dos casos mencionados en la Tabla 7.10.

El isocaespitol acetato de *A. dactylomela* es altamente citotóxico, mientras que el isocaespitol de *Laurencia* es mucho menos activo para la misma línea celular (González et al., 1982). Las aplysianinas-A y -E de *Aplysia* sp (Adamson et al., 1989) presentan actividad fuertemente

anticancerígena. Stypoldione y elatol de *Aplysia* spp son citotóxicos (Hay y Steinberg, 1992, y refs. allí mencionadas), así como la clorodesmina de *Cyerce nigricans* (Hay et al., 1989).

Sustancias activas en el test con embriones de erizo.

Las sustancias que han mostrado actividad en este test, que representa también un tipo de citotoxicidad, se incluyen en la Tabla 7.11.

ESPECIE SUSTANCIA	REFERENCIA	DOSIS µg/ml
<i>Aplysia dactylomela</i> elatol	Jacobs et al. (1981), Munro et al. (1987)	--
<i>Hexabranchnus sanguineus</i> Kabiramida A,B,D,E dihydrohalichondramida 33-methylidihydrohalichondramida dihydrohalichondramida tetrahydrohalichondramida	Matsunaga et al. (1989) " " Kernan et al. (1988b) "	-- -- -- 1 --
<i>Tambja</i> spp y <i>Roboastra tigris</i> tambjamins A,B,C,D	Carte y Faulkner (1983, 1986)	1
<i>Peltodoris atromaculata</i> petroformyne-1* petroformyne-2* petroformyne-3* petroformyne-4* mezcla de los anteriores	Cimino et al. (1990d) " " " esta Tesis	10 1 10 50 20
<i>Doris verrucosa</i> verrucosinas xylosil-MTA	esta Tesis "	10 40
<i>Dendrodoris limbata</i> polygodial ésteres drimánicos	esta Tesis "	20 NT
<i>Tethys fimbria</i> extracto con PGs	esta Tesis	10

Tabla 7.11. Sustancias activas en el test con embriones de erizo. (*= tests realizados con las sustancias obtenidas de *Petrosia ficiformis*). NT= No tóxico.

La especie de erizo utilizada en esta Tesis ha sido *Paracentrotus lividus*. En otros casos se ha utilizado la especie *Strongylocentrotus purpuratus* (Jacobs *et al.*, 1981). A menudo no se cita la especie de erizo con la que se ha realizado el test.

Algunos de estos casos fueron incluidos en la revisión de Fusetani (1987). Baslow (1969) señaló los efectos citotóxicos de la aplysina (parálisis ciliar en embriones) y de extractos de *Phyllidia*.

Sustancias tóxicas.

En la Tabla 7.12. se detallan las sustancias descritas como ictiotóxicas para ciertas especies.

ESPECIE SUSTANCIA	REFERENCIA	PEZ	DOSIS
<i>Aplysia dactylomela</i> cyclolaurenol	Ichiba e Higa (1986)	--	--
cyclolaurenol acetato	"	--	--
cupalaurenol	"	--	--
cupalaurenol acetato	"	--	--
<i>Aplysia fasciata</i> 4-acetyl-aplykurodina-B	Spinella <i>et al.</i> (1992a)	G.a.	10ppm
aplykurodinone	"	G.a.	10ppm
<i>Bursatella leachi</i> bursatellina	Cimino <i>et al.</i> (1987b), Andaló (1988)	G.a.	NT
<i>Philinopsis</i> (Aglaja) <i>depicta</i> y <i>Bulla striata</i> agljajne-1	Andaló (1988)	G.a.	NT
<i>Navanax inermis</i> y <i>Bulla gouldiana</i> 5,6-dehydroagljajne-3	Spinella <i>et al.</i> (1992b, en prensa)	G.a.	--
isopulo'upone	"	G.a.	--

<i>Umbraculum mediterraneum</i>			
umbraculumin A	Cimino et al. (1989a)	Andaló (1988)	G.a. 10ppm
umbraculumin B	"	"	G.a. NT
umbraculumin C	"	"	G.a. 0.1 ppm
<i>Oxynoe olivacea</i>			
oxytoxin-1	Cimino et al. (1990a)		G.a. 10 ppm
oxytoxin-2	"		G.a. 1 ppm
<i>Placida dendritica</i>			
extracto del muco	Mollo (1992),	Di Marzo et al. (en prensa)	
			G.a. 10ppm
placidene-A	"		G.a. 10ppm
placidene-B	"		G.a. 10ppm
iso-placidene-A	"		G.a. 10ppm
iso-placidene-B	"		G.a. 10ppm
<i>Cyerce cristallina</i>			
ext. muco	Di Marzo et al. (1991b),	Mollo (1992)	G.a. 10ppm
cyercene-A	"	"	G.a. 10ppm
cyercene-B	"	"	G.a. 10ppm
cyercene-2	"	"	G.a. 10ppm
cyercene-3	"	"	G.a. 10ppm
cyercene-4	"	"	G.a. 5ppm
<i>Ercolania funerea</i>			
extracto del muco	Mollo (1992),	Vardaro et al. (1992b)	
	y Di Marzo et al. (en prensa)		G.a. 70ppm
cyercene-B	"		G.a. 10ppm
7-methyl-cyercene-B	"		G.a. 16ppm
7-methyl-12-norcyercene-B	"		G.a. 20ppm
<i>Caliphylla mediterranea</i>			
extracto del muco	Mollo (1992)		G.a. 100ppm
<i>Archidoris montereyensis</i>			
hexadecylglycerol	Gustafson y Andersen (1985)	--	--
<i>Archidoris tuberculata</i>			
acyl glyceroles	Zubía et al. (en prensa)		G.a. 1/10ppm
<i>Archidoris carvi</i>			
acyl glyceroles	Zubía et al. (en prensa)		G.a. 1/10ppm
<i>Doris verrucosa</i>			
verrucosin A	Andaló (1988),	Cimino et al. (1988c)	G.a. 1ppm
verrucosin B	"	"	G.a. 0.1ppm
<i>Aldisa sanguinea cooperi</i>			
hexadecylglycerol	Gustafson y Andersen (1985)	--	--

<i>Hexabranhus sanguineus</i>			
Kabiramida A,B,D,E	Matsunaga et al. (1989)	--	--
dihydrohalichondramida	"	--	--
33-methyldihydrohalichondramida	"	--	--
<i>Hypselodoris spp</i>			
longifolina	Cimino et al. (1982), Andaló (1988)	G.a.	10ppm
ent-furodysinina	esta Tesis, Fontana et al. (en prensa)		G.a. 10ppm
<i>Chromodoris luteorosea</i>			
luteorosina	Cimino et al. (1990b)	G.a.	10ppm
12-epi-aplysillina	"	G.a.	10ppm
12-epi-12-deacetyl-aplysillina	"	G.a.	10ppm
macfarlandina A	Andaló (1988)		
	Cimino et al. (1990b)	G.a.	10ppm
polyrhaphina C	esta Tesis, Gavagnin et al. (1992)	G.a.	10ppm
chelonaplysina C	"	G.a.	10ppm
norrisolide	"	G.a.	10ppm
<i>Chromodoris elizabethina</i>			
latrunculina A	Okuda y Scheuer (1985)	C.a.	1mg/l
	Rakou et al. (1987)		
<i>Glossodoris quadricolor</i>			
latrunculina B	Mebs (1985)		
	Kashman et al. (1980, 1982)	P.r.	--
<i>Cadlina luteomarginata</i>			
isonitriles	Thompson et al. (1982)	C.a.	100ppm
furodysinina	"	C.a.	100ppm
isothiocyanates	"	C.a.	100ppm
idadione	"	C.a.	100ppm
pallescensina-A	"	C.a.	100ppm
<i>Dendrodoris limbata</i>			
polygodial	Andaló (1988), Cimino et al. (1988b)	G.a.	1ppm
<i>Phyllidia pulitzeri</i>			
axisonitrilo-1	Cimino et al. (1982)	C.c./C.a.	8ppm
<i>Phyllidia bourghini</i>			
9-isocyanopupukeanane	Fusetani et al. (1990, 1992)	O.l.	1.0ppm
9-epi-9-isocyanopupukeanane	"	O.l.	2.0ppm

<i>Tethys fimbria</i>			
PGE ₃ -lactona	Marín et al. (1991)	G.a.	1ppm
PGE ₂ -lactona	"	G.a.	10ppm
PGA ₂ -lactona	"	G.a.	10ppm
PGA ₃ -lactona	"	G.a.	10ppm
<i>Janolus cristatus</i>			
janolusimide	Sodano y Spinella (1986)		
	Andaló (1988)	G.a.	NT

Tabla 7.12. Sustancias con actividad ictiotóxica para: G.a.= *Gambusia affinis*; P.r.= *Poecilia reticulata*; C.a.= *Carassius auratus*; C.c.= *Chromis chromis*; O.l.= *Oryzias latipes*. NT= no tóxico. No se incluyen apreciaciones del tipo: tóxico, muy tóxico o moderadamente tóxico, ya que pueden hallarse en las respectivas citas.

Gunthorpe y Cameron (1987) hallaron diversos niveles de ictiotoxicidad para *Gambusia affinis* en los extractos de *Chromodoris kuiteri*, *C. elizabethina*, *C. inornata*, *C. coi*, *C. imperialis*, *Hypselodoris obscura*, *Casella atromarginata*, *Ceratosoma cornigerum*, *Notodoris minor*, *N. gardeneri*, *Phyllidia nobilus*, *P. ocellata*, *P. elegans*, *Halgerda* sp, *H. aurantomaculata*, *Rostanga arbutus*, *Doriopsilla miniata* y *Dendrodoris albobrunea*. No resultaron tóxicos los extractos de *Hypselodoris bennetti*, *Aphelodoris varia* y *Dendrodoris nigra*. Sólo unas pocas de estas especies han sido estudiadas químicamente, pudiendo relacionarse la actividad del extracto con las sustancias aisladas.

Los tests con *G. affinis* suelen realizarse siguiendo el procedimiento de Gunthorpe y Cameron (1987) y el rango de toxicidad de Coll *et al.* (1982), si bien este tipo de tests fueron ya empleados de modo similar por Fernández (1978), quien describía con gran detalle los efectos de ciertos compuestos sobre los peces. Una amplia discusión sobre la relación entre la actividad ictiotóxica y la estructura de ciertas moléculas puede hallarse en Andaló (1988).

En pocos casos se dan datos sobre el efecto gradual de estas sustancias sobre los peces. Para la latrunculina A, Okuda y Scheuer (1985) describieron

que los peces se iban paralizando y desorientando, hasta que finalmente morían.

Los acetilenos clorados de *D. sandieguensis* son altamente inestables y no fueron testados, si bien Walker y Faulkner (1981) propusieron una posible toxicidad para los mismos, ya que los compuestos de tipo acetilénico están descritos como muy tóxicos para peces e invertebrados. Cimino *et al.* (1985a) indicaron que los poliacetilenos de *Petrosia ficiformis* y de *P. atromaculata* dieron resultados negativos en el test con *G. affinis*.

El mucus de *Phyllidia varicosa* fue descrito como tóxico para peces y crustáceos por Johannes (1963) antes de que el compuesto tóxico fuera aislado (ver Tabla 6.8.). El mencionado autor describió que esta especie segregaba un muco con un fuerte olor, estable con el calor, volátil y letal para peces y crustáceos. Las especies que utilizó en sus experimentos incluían varios decápodos, un copépodo, un anfípodo y el pez *Mollinesia latipinna*. Johannes describió también los efectos visibles sobre algunos de los organismos utilizados en sus experimentos. El cangrejo *Metapograpsus messor* y el nudibranquio *Placobranchus ianthobapsus* no parecían verse afectados por concentraciones mayores de dicha secreción mucosa. Las secreciones de *Acteon* y *Haminoea* son tóxicas para ciertos animales del zooplancton (Fretter y Graham, 1954), mientras que la secreción de *Oxynoe* es tóxica para un pez según Sphon y Bertsch (1974).

Fuhrman *et al.* (1979) probaron la toxicidad de los extractos de *D. albopunctata*, *Cadlina flavomaculata*, *Anisodoris nobilis*, *Archidoris montereyensis* y *A. odhneri*, que eran letales al ser inyectados en cangrejos (*Pachygrapsis* o *Hemigrapsis*) y en ratones. Los extractos de *Hopkinsia rosacea*, *Diaulula sandiegensis*, *Hypselodoris californiensis*, *Triopha carpenteri* y *T. maculata* no resultaron tóxicos en los mismos tests con ratones, mientras que los extractos de *D. sandiegensis* sí lo eran para los cangrejos (Fuhrman *et al.*, *op. cit.*). En nuestros experimentos con cangrejos ermitaños (*Dardanus arrosor*), similares a los de Reel y Furhman (1981), ninguna de las sustancias inyectadas resultó tóxica.

Sustancias repelentes.

Se incluyen en la Tabla 7.13. las sustancias con efectos llamados "antifeedant" y feeding deterrents", si bien estos términos no deberían considerarse como sinónimos (J. Atema, com. pers.), y a los que hemos venido llamando "repelentes".

SUSTANCIA ESPECIE	REFERENCIA	DEPREDADOR	DOSIS
<i>Aplysia brasiliana</i> panacene	Kinnel et al. (1977a y b)	--	--
brasilenyne	Kinnel et al. (1977a y b, 1979)	--	--
cis-dihydrorhodophytina	"	--	--
<i>Aplysia vaccaria</i> acetoxycrenulide	Midland et al. (1983)	E.l.	--
<i>Aplysia fasciata</i> 4-acetyl-aplykurodin-B aplykurodinone	Spinella et al. (1992a) "	C.a. C.a.	60µg/cm ² 60µg/cm ²
<i>Bursatella leachi</i> bursatellina	Cimino et al. (1987b) Cimino y Sodano (1989)	C.a./C.c.	IN
<i>Archidoris montereyensis</i> glicérido sesquiterpenoide hexadecylglycerol	Gustafson y Andersen (1985) "	O.m. O.m.	18µg/mg 18µg/mg
<i>Aldisa sanguinea cooperi</i> hexadecylglycerol esteroide	Gustafson y Andersen (1985) Ayer y Andersen (1982)	O.m. C.a.	18µg/mg --
<i>Hexabranhus sanguineus</i> macrólidos	Pawlik et al. (1988)	T.u./D.m.	--

<i>Hypselodoris</i> spp			
longifolina	Cimino et al. (1982)	C.a./C.c.	300µg/cm ²
ent-furodysinina	esta Tesis, Fontana et al. (en prensa)		C.a. 30µg/cm ²
tavacfurano	"		C.a.300µg/cm ²
nakafurano-9	"		C.a.300µg/cm ²
dendrolasina	"		C.a.300µg/cm ²
iso-nakafurano-9	"		C.a.300µg/cm ²
<i>Hypselodoris orsini</i>			
furoscalarol	Cimino et al. (1982)	C.a./C.c.	300µg/cm ²
deoxosclarina	"	C.a./C.c.	250µg/cm ²
<i>Hypselodoris godeffroyana</i> y <i>Chromodoris maridadilus</i>			
nakafurano-8	Schulte et al. (1980)	C. spp	--
	Hochlowski et al. (1982)		
nakafurano-9	Schulte et al. (1980)	C. spp	--
	Hochlowski et al. (1982)		
<i>Chromodoris norrisi</i>			
shahamina C	Bobzin y Faulkner (1989a)	T.l.	100µg/mg
<i>Chromodoris funerea</i>			
furodysinina	Carte et al. (1986)	G.e.	50µg/mg
metilfurodysinina lact.	"	G.e.	10µg/mg
furodysinina hidróperóxido	"	G.e.	1-5µg/mg
<i>Cadlina luteomarginata</i>			
isonitrilos	Thompson et al. (1982)	C.a./Cl.a.	10µg/ml
furodysinina	"	C.a./Cl.a.	10µg/ml
isothiocyanatos	"	C.a./Cl.a.	10µg/ml
idadione	"	C.a./Cl.a.	10µg/ml
pallescensina-A	"	C.a.	100µg/ml
	"	Cl.a.	10µg/ml
<i>Tambja</i> spp			
tambjamins A y B	Carte y Faulkner (1983)	G.e.	5-10µg/mg
tambjamins C y D	"	G.e.	1-5µg/mg
<i>Nembrotha</i> spp			
tambjamins A,C,E,F	Paul et al. (1990)	--	--
<i>Dendrodoris</i> spp			
polygodial	Cimino et al. (1982)	C.a./C.c.	30µg/cm ²
ésteres drimánicos	"	C.a./C.c.	IN
<i>Dendrodoris</i> spp y <i>Doriopsilla</i> spp			
olepupuana	Okuda et al. (1983)	D.a.	15-20µg/mg
<i>Dendrodoris grandiflora</i>			
6ß-acetoxylepupuana	Cimino et al. (1985d)	--	--

<i>Phyllidia pulitzeri</i> axisonitrilo-1	Cimino et al. (1982)	C.a./C.c. IN
<i>Janolus cristatus</i> janolusimide	Sodano y Spinella (1986) Cimino y Sodano (1989)	C.a./C.c. IN

Tabla 7.13. Sustancias con efectos repelentes ("feeding deterrents" o "antifeedant") para determinadas especies de depredadores: C.a.= *Carassius auratus*; T.l.= *Thalassoma lucasunum*, T.u.= *Thalassoma lunare*; G.e.= *Gibbonsia elegans*; C.spp= *Chaetodon* spp; D.a.= *Dascyllus aruanus*; C.c.= *Chromis chromis*; E.l.= *Eupomacentrus leucostictus*; O.m.= *Oligocottus maculosus*; Cl.a.= *Clinocottus analis*; D.m.= *Dardanus megistos*. IN.= inactivo. No se incluyen apreciaciones del tipo: tóxico, muy tóxico o moderadamente tóxico, ya que pueden hallarse en las respectivas citas. -- = dosis no determinada.

Los poliacetilenos de elevado peso molecular no resultaron activos en los tests de repelencia con peces marinos (*C. chromis*) y de agua dulce (*C. auratus*), (Cimino et al., 1982, 1985a). Asimismo, la macfarlandina E, el norrisolide y la polyrhaphina A resultaron inactivos para *T. lucasunum* según Bobzin y Faulkner (1989a), y el axisonitrilo-1 de *Phyllidia pulitzeri* para *C. auratus* y *C. chromis* (Cimino et al., 1982). El pu'ulenal de *Chromodoris albonotata* y *Chromodoris* sp es repelente para peces (Karuso, 1987).

Ros (1976b, 1977) realizó experimentos en acuario con peces litorales, resultando que estos nunca atacaron a individuos de *Archidoris tuberculata* y de *Umbraculum mediterraneum* que estaban en el fondo y paredes del acuario. Estos experimentos, visto que ambas especies presentan metabolitos con diversas actividades, apoyan la idea de que están bien protegidos frente a los peces (y evitan la caída artificial de los opistobranquios en experimentos realizados por otros autores). Ros (1978a) indicó que las puestas de *Hypselodoris villafranca*, *H. orsini* y *H. webbi* no eran depredadas en acuario por *Favorinus branchialis* (así como las de algunos eolidáceos), por lo que podrían ser repelentes.

A veces, en función de la estructura de las moléculas, se hipotetiza sobre la actividad de ciertos compuestos. Nos referimos al caso de sustancias

como ghiselinina, butenolide y euryfurano, que pese a no haber sido probados por Hochlowski *et al.* (1982), por analogía con otras sustancias por ellos probadas (ver Tabla 7.13.) suponen que deben presentar también efectos repelentes.

Las ulapualide A y B son presumiblemente repelentes para los depredadores según Roesener y Scheuer (1986). Los compuestos brasudol e isobrasudol de *Aplysia brasiliana* (Dieter *et al.*, 1979) fueron descritos como repelentes para peces y tiburones, aunque no se proporcionaban datos sobre especies concretas ni dosis. La heteronemina de *Glossodoris cincta* y *G. hikeurensis* es repelente para peces (Rogers y Paul, 1991). Stypoldione y elatol de *Aplysia* spp son repelentes (Hay y Steinberg, 1992, y refs. allí mencionadas).

Si bien Agersborg (1921) y Ajeska y Nybbaken (1976) mencionaban que el muco de *Melibe leonina* era repugnante para los depredadores (como p. ej. *Pycnopodia helianthoides*), Gustafson y Andersen (1985) no hallaron ninguna actividad repelente en los monoterpenos causantes del olor de esta especie.

El caso de *Tambja abdere* es muy particular ya que su secreción amarilla contiene tambjamins que frecuentemente repelen a *Roboastra tigris* cuando esta ataca, y a la mayoría de depredadores, pero sin embargo, la huella mucosa que dejan *Tambja* spp en condiciones normales atrae a *R. tigris*, que puede seguir las hasta localizarlas (Carté y Faulkner, 1983, 1986; Munro *et al.*, 1987).

Marbach y Tsumamal (1973) realizaron experimentos con *Bethellina citrina*, que resultó ser repelente tanto para anémonas (varias especies) como para peces (*Anthias squamipinnis* y *Dascyllus marginatus*) y cangrejos (varias especies). *Pleurobranchus membranaceus* y *Berthella plumula* fueron también rechazados por peces (Thompson, 1960a, b; Thompson y Slinn, 1959). Paine (1963) mencionó que *Navanax inermis* rechazaba también a moluscos secretores de ácido. En experimentos con *Hypselodoris zebra* y el pez omnívoro *Abudefduf saxatilis*, éste consumió únicamente las gónadas del molusco (Grode y Cardellina, 1984).

Ambrose *et al.* (1979) señalaron que *Aplysia brasiliiana* es repelente para gaviotas, especialmente la glándula púrpura, la branquia y el manto (la tinta no sería repelente). Los dictyoles B y E y el pachydytiol A de *Aplysia depilans* tienen efecto repelente sobre peces, anfípodos y erizos (Hay y Steinberg, y refs. allí mencionadas). Di Matteo (1981, 1982) indicó que *Aplysia dactylomela* era depredada selectivamente por cangrejos, mientras que su secreción púrpura era repelente. Los efectos varios, y a veces contradictorios, de la secreción púrpura de *Aplysia* sobre diferentes posibles depredadores se resumen en Carefoot (1987). Otros efectos tóxicos de la secreción de la glándula opalina de *Aplysia depilans* fueron señalados por Flury (1915) y para *Aplysia kurodai* por Ando (1952). Los efectos repelentes para peces y otros organismos de los sesquiterpenos de *Aplysia brasiliiana* fueron señalados por Stallard *et al.* (1978) y Dieter *et al.* (1979). Otros compuestos repelentes para peces se señalaron en *Aplysia* spp (Kinnel *et al.*, 1979).

La secreción de *Elysia viridis* es repelente para peces (Thompson, 1960b), así como *Ancula cristata*, *Lamellidoris bilamellata* y *Coryphella rufibranchialis* (Herdman y Clubb, 1892), mientras que *Dendronotus arborescens* era más aceptado por los peces. *Chromodoris zebra* resultó repelente para peces, anémonas, crustáceos, gusanos y estrellas de mar (Crozier, 1916). *Pleurobranchus* y *Berthella* eran repelentes para la anémona *Tealia* (Thompson, 1960a), como *Facelina* y *Eubbranchus*, mientras que otros opistobranquios fueron depredados de forma difícilmente interpretable según el mencionado autor. Resultados similares con anémonas fueron obtenidos por McMillan (1941).

Edmunds (1974) indicó que en experimentos en acuario con el pez *Balistes* sp, *Doriopsilla albolineata* y *Discodoris tema* (ambas con glándulas defensivas en el manto) eran repelentes, así como *Coryphella pellucida* para *Mugil labrosus*. En esos experimentos, el modelo de doridáceo con papilas era evitado respecto a un modelo liso.

Los dos productos de *Cyerce nigricans* resultaron no ictiorrepelentes (no se cree que tengan nada que ver con la defensa) según Roussis *et al.* (1990), si bien el ejemplar vivo era repelente para peces del arrecife coralino

(Hay *et al.*, 1989). Hay *et al.* (1989) demostraron que *Gymnodoris* sp, *Elysia* sp y *Cyerce nigricans* no eran depredados por *Thalassoma lunare*. Además si se trataba el alimento de *T. lunare* con el extracto de *C. nigricans* se observaba un fuerte efecto repelente. En *C. nigricans* y *Elysia* sp se halló chlorodesmina (más otros compuestos no identificados en la primera especie), sin embargo en *Gymnodoris* sp no se detectó ningún compuesto. *Gymnodoris* sp se alimentaba exclusivamente de *Elysia* sp, sin atacar nunca a *C. nigricans*.

Los ésteres descritos en los porostomados analizados por Okuda *et al.* (1983) resultaron ser inactivos en este mismo test. Estos autores indicaron que la olepupuana era repelente como el polygodial, sin embargo, según Cimino *et al.* (1988b) no se puede descartar la posibilidad de que en los experimentos la olepupuana se transformara en polygodial *in situ*.

En muy pocos casos se ha estudiado el mecanismo molecular responsable de este tipo de efecto. En el caso del polygodial su actividad repelente se debe a su reacción con los grupos -NH₂ en los receptores (D'Ischia *et al.*, 1982; Cimino *et al.*, 1984, 1987d; Caprioli *et al.*, 1987). Este producto cuenta con un largo historial en la literatura, ya que fue descrito en plantas (*Warburgia* spp y *Polygonum hydropiper*) como repelente para insectos (Kubo *et al.*, 1976; Nakanishi y Kubo, 1977; Kubo y Ganjian, 1981; Fukuyama *et al.*, 1982).

Es interesante observar que los sesquiterpenoides drimánicos (el glicérido de *A. montereyensis*, polygodial y olepupuana de *Dendrodoris* spp, y albicanyl acetato de *C. luteomarginata*) presentan todos ellos actividad ictiorrepelente. Se ha sugerido que la estructura molecular debe representar un importante papel en esta función (Gustafson y Andersen, 1985; Cimino *et al.*, 1986a). En el apartado correspondiente se ha descrito la depredación selectiva del cangrejo *Dardanus arrosor* sobre *Dendrodoris limbata*.

Sustancias promotoras de tumores.

Se detallan en la Tabla 7.14.

ESPECIE SUSTANCIA	REFERENCIAS
<i>Stylocheilus longicauda</i> debromoaplysiatoxina	Fujiki <i>et al.</i> (1981, 1982, 1992) Eliasson <i>et al.</i> (1983) Suganuma <i>et al.</i> (1984) Faulkner (1988)
aplysiatoxina	Fujiki <i>et al.</i> (1992)
bromoaplysiatoxina	Fujiki <i>et al.</i> (1992)
<i>Doris verrucosa</i> verrucosinas	Fujiki, en Cimino y Sodano (1989)
<i>Umbraculum mediterraneum</i> umbraculuminas	Fujiki, en Cimino y Sodano (1989)

Tabla 7.14. Sustancias promotoras de tumores.

Los derivados de la aplysiatoxina, además de ser activos como promotores de tumores, son los causantes de las dermatitis que sufren los veraneantes de Hawaii (Munro *et al.*, 1987), ya que se hallan en varias especies de cianofíceas.

Segun Fujiki *et al.* (1992) estos compuestos son promotores de tumores del tipo TPA (12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate), y activan la proteína kinasa-C (ver apartado 5.12.).

Test de regeneración con *Hydra vulgaris*.

Este test ha sido recientemente empleado para probar la actividad regenerativa de algunas sustancias de opistobranquios, que se exponen en la Tabla 7.15.

ESPECIES SUSTANCIA	REFERENCIA	ACTIVIDAD
<i>Placida dendritica</i>		
placidene-A	Vardaro et al. (1992a), Mollo (1992)	IN
placidene-B	"	IN
iso-placidene-A	"	IN
iso-placidene-B	"	IN
<i>Cyerce cristallina</i>		
cyercene-A	Di Marzo et al. (1991b), Mollo (1992)	AC
cyercene-B	"	IN
cyercene-2	"	IN
cyercene-3	"	AC
cyercene-4	"	IN
<i>Ercolania funerea</i>		
cyercene-B	Mollo (1992)	IN
7-methyl-cyercene-B	"	AC
7-methyl-12-norcyercene-B	"	AC
7-methyl-cyercene-1	"	AC
7-methyl-cyercene-2	"	IN

Tabla 7.15. Sustancias probadas en el test con *Hydra vulgaris*. (IN= inactivo; AC= activo).

Puede establecerse una clara relación entre los metabolitos activos y su localización en los cerata, que son los órganos a regenerar en la autotomía (Di Marzo et al., 1991b, *en prensa*; Mollo, 1992).

Autotoxicidad.

Solamente ha sido descrita para *Dendrodoris limbata*, en el que la inyección de polygodial resulta letal, y por ello se dedujo que debía ser sintetizado en glándulas especializadas del manto (Cimino et al., 1985c, 1986a).

Otros efectos de diversos tipos.

Aquí se incluyen, como en un cajón de sastre, los efectos y actividades descritos para sustancias y secreciones de opisthobranchios que no encajaban en los apartados anteriores.

Para la murexina (hallada en *Aplysia californica*) se han descrito efectos paralizantes y tóxicos para anfibios, peces y otros invertebrados, además estimula los ganglios y bloquea la acción neuromuscular en vertebrados (Nigrelli *et al.*, 1967; Langlais y Blakenship, 1972; Blakenship *et al.*, 1975). Hashimoto (1979) indicó que el extracto de *Aplysia juliana* no es tóxico. Flury (1915) indicaba ya que las secreciones de *Aplysia depilans* tenían efectos paralizantes sobre celenterados, anélidos, moluscos, crustáceos y peces. Watson (1973) describió que los extractos de *Dolabella auricularia*, *Aplysia pulmonica*, *Stylocheilus longicauda* y *Dolabrifera dolabrifera* presentaban efectos tóxicos.

Furhman *et al.* (1979) describieron en el extracto de *Anisodoris nobilis* una fracción activa que llamaron "dorid toxin", que provocaba letargia y braquicardia en ratones, así como otros efectos farmacológicos. Un interesante efecto de este compuesto es el bloqueo de la contracción del corazón en *Mytilus californianus* y *Mercenaria mercenaria in vitro* (Furhman *et al.*, *op. cit.*).

Otras actividades han sido descritas en la secreción mucosa de *Doriopsilla albopunctata*. Un compuesto no identificado con efecto antagonista de la acetilcolina se ha sugerido (Reel y Furhman, 1981) que podría servir como defensa química ante posibles depredadores. Los extractos del muco inhibían la acetilcolina de forma competitiva, sin depolarizar la musculatura lisa (tanto en vertebrados: conejo y "cerdo de Guinea", como en invertebrados: *Cucumaria miniata*). Experimentalmente se vió como potenciales depredadores la rechazaban como alimento (Reel y Furhman, *op. cit.*), y aunque se menciona que secreta una sustancia ácida (Ghiselin, 1964), el pH del manto y mucosidad es neutro, según indicaron Furhman *et al.* (1979). Extractos parcialmente purificados del muco eran letales para cangrejos (*Hemigrapsis*), si bien eran relativamente no tóxicos en ratón.

Estos cangrejos fueron también usados en otros casos para testar actividades (Fuhrman *et al.*, 1979, y Johannes, 1963).

Un caso similar es el descrito por Winkler (1961), Winkler *et al.* (1962) y Winkler y Tilton (1962), en *Aplysia californica* y *Aplysia vaccaria*. Se aisló una toxina soluble en agua, con actividad colinérgica, y como la de *D. albopunctata*, no desactivada por la colinesterasa. Esta toxina provocaba espasmos musculares y disminución de la presión sanguínea en conejo y perro, así como era muy tóxica para ratones de laboratorio y ratas. Otros efectos farmacológicos varios de productos de *Aplysia dactylomela* fueron señalados por McDonald *et al.* (1975), Vanderah y Schmitz (1976), Kaul y Kulkarni (1978). El dactylyne de *A. dactylomela* tiene efectos indirectos curiosos de prolongación de hipnosis provocada en animales (Kaul y Daftari, 1986), inhibiendo el metabolismo del pentobarbital (Kaul *et al.*, 1978a y b). En *A. pulmonica* se citaron dos sustancias tóxicas (Watson, 1973; Watson y Rayner, 1973). Los efectos tóxicos y farmacológicos de *Aplysia* se revisan en Carefoot (1987), si bien el mismo autor remarca el hecho de que apenas se han realizado estudios biológicos respecto a su función natural.

Fuhrman *et al.* (1980) aislaron una purina riboside biológicamente activa de *Anisodoris nobilis*. Esta 1-methylisoguanosine reduce la presión arterial y el ritmo cardíaco en ratas (Fuhrman *et al.*, 1980, 1981; Kim *et al.*, 1981). La isoguanosine de *Diaulula sandiegensis* produce relajación de la musculatura lisa, entre otros efectos (Fuhrman *et al.*, 1981; Krebs, 1986).

Los extractos de doridaáceos analizados por Gunthorpe y Cameron (1987) fueron inyectados a ratones, resultando que todas las especies presentaban distintos niveles de toxicidad. Los efectos se describen con detalle en Gunthorpe y Cameron (*op. cit.*).

La dolastatina-14 de *Dolabella auricularia* posee actividad citostática (Pettit *et al.*, 1990). Fasciculatina (*Dendrodoris grandiflora*) y dictyol A (*Aplysia depilans*) presentan actividad hipotensiva según Sodano (1982), y el dictyol A tiene también actividad convulsiva. *Mourgona germaineae* presenta una secreción tóxica para otros invertebrados (Jensen, 1984), y la mimosamycina de *Jorunna funebris* es antibiótica (Gulavita, 1987).

El navenone-A presenta actividad como "trail-breaking" feromona en *Navanax inermis* (Sleeper y Fenical, 1977), si bien esto lo comentaremos más adelante. Otras feromonas de este tipo se han hallado en *Haminoea* spp, y quizás en *Scaphander lignarius* (ver apartado 6.9. para las referencias). En *Aplysia brasiliana* se han descrito feromonas sexuales (Painter *et al.*, 1991).

Las latrunculinas inducen cambios en la organización de microfilamentos sin afectar a los microtúbulos (Kaul y Daftari, 1986). Buznikov y Manukhin (1962) describieron una sustancia en embriones de nudibrancios (principalmente *Dendronotus frondosus*), con dos partes distintas, una de las cuales causa la contracción del velo sin bloquear el movimiento de los cilios y estimula fuertemente el movimiento ciliar en el pie, y la otra bloquea completamente el movimiento ciliar.

Hadfield y Ciereszko (1978) describieron la influencia de los cembranolides derivados de octocorales en las larvas del nudibrancio *Phestilla sibogae*. Estas sustancias, al contrario que los metabolitos de su presa *Porites compressa* (que no han sido aún completamente elucidados), provocan la inactividad y la pérdida de los cilios, y la muerte en un tiempo variable según la sustancia.

Varios tipos de péptidos están implicados en la co-transmisión en el sistema nervioso de *Aplysia californica*, regulando comportamientos rítmicos como la alimentación (Weiss *et al.*, 1992; Kobayashi y Suzuki, 1992). La octopamina de *A. californica* se sugirió que podía actuar de neurotransmisor (Saavedra *et al.*, 1974). Los efectos farmacológicos de la colina de *A. brasiliana* fueron mencionados por De Freitas (1977).

Marín *et al.* (1991) han sugerido un papel en la contracción muscular para las PG de *Tethys fimbria*. En el apartado 7.2. se han señalado las sustancias halladas en el aparato reproductor y glándula hermafrodita de dicha especie. Para estas sustancias se ha hipotetizado una función fisiológica relacionada con el desarrollo y la reproducción.

Uriz *et al.* (1991) probaron las actividades antibactericas, antifungicas, antivirales, citotoxicas y antimitoticas de *Aplysia* sp, *Berthella aurantiaca*, *Cratena peregrina*, *Flabellina affinis*, *Hypselodoris webbi*, *Peltdoris atromaculata* y *Platydorid argo*, pero los resultados se han expuesto por comunidades y grandes grupos, y no se detalla la actividad de cada especie (por lo que no han sido incluidos en las Tablas anteriores).

Sustancias que influyen en la metamorfosis.

Se ha considerado de interés mencionar los efectos de ciertas sustancias (que no proceden de opistobranquios, sino generalmente de sus presas) sobre las larvas de estos moluscos. Se comentan algunos ejemplos. *Phestilla sibogae* necesita la presencia de *Porites compressa* para que las larvas pasen la metamorfosis (Hadfield, 1977). Perron y Turner (1977) señalaron que las larvas de *Doridella obscura* necesitan la presencia de *Electra crustulenta*. Otros casos fueron revisados previamente por Harris (1971, 1973) y Karuso (1987). Muy recientemente, Pawlik (1992) revisa el papel de las sustancias químicas en la fijación de las larvas en invertebrados bentónicos marinos.

Se han realizado algunos experimentos con extractos del hidroideo *Tubularia* sp, que es requerido por las larvas de *Hermisenda crassicornis* en el momento de la metamorfosis. Estos experimentos preliminares realizados en el Laboratorio de A. Kuzirian en Woods Hole, pretendían aumentar la supervivencia de las larvas y juveniles usando extractos del hidroideo en vez de introducir un fragmento del mismo, como hasta ahora se viene haciendo. No se exponen aquí los resultados por tener únicamente una relación indirecta con el tema principal de esta Tesis.

Algunos comentarios sobre estos tests.

Estos tests que hemos mencionado, se han realizado generalmente con los compuestos aislados para averiguar la actividad biológica de los mismos. En la bibliografía se pueden encontrar las explicaciones detalladas sobre cada

uno de ellos. Los tests más utilizados son los de ictiotoxicidad y repelencia. El resto son el resultado, generalmente, del estudio detallado de una especie en particular o bien de una suposición a cerca de la actividad que puede presentar una sustancia como consecuencia de (o supuesta debido a) sus características estructurales. En muchos casos, se describen sustancias pero no se da ningún dato sobre su actividad o efectos; para ver esto basta comparar el número de sustancias que se mencionan en este capítulo (unas 160) con el total de sustancias halladas en opistobranquios (unas 470). Los resultados que han sido negativos los hemos incluido también en cada caso.

Los tests de ictiotoxicidad y repelencia se han realizado básicamente, y hasta hace bien poco, con especies que viven en lugares muy distintos a los ocupados por los opistobranquios, incluyendo especies de agua dulce (*Carassius auratus* y *Gambusia affinis*), y siguiendo la metodología propuesta por Coll *et al.* (1982) y Gunthorpe y Cameron (1987). Obviamente su validez ecológica es cuestionable, especialmente en los tests de repelencia (la toxicidad parece ser un fenómeno más generalizable, J. Atema, com. pers.). Sin embargo, sus características de rapidez, simplicidad y facilidad (y economía) los hacen insustituibles por el momento en los laboratorios químicos. En cualquier caso se está aún lejos de hallar tests, tan simples y a la vez significativos, como los que se utilizan con insectos y plantas (Nawrot *et al.*, 1986).

En algunos casos los tests se han realizado con especies que cohabitan con los moluscos estudiados. Es el caso de los trabajos de Di Matteo (1982), Thompson *et al.* (1982), Carté y Faulkner (1983), Pawlik *et al.* (1988), Hay *et al.* (1989) y Paul *et al.* (1990). En el área de estudio de esta Tesis, el pez *Chromis chromis* ha sido también utilizado (Cimino *et al.*, 1982) así como el cangrejo *Carcinus mediterraneus* (Fiorito *et al.*, 1985). De entre los tests citados anteriormente, estos son los únicos de los cuales se puede obtener algún significado ecológico, ya que al menos las especies cohabitan con los opistobranquios que producen las sustancias probadas.

Otros experimentos fueron realizados por Paine (1963) con *Navanax inermis* y numerosas especies de opistobranquios como posibles presas; este autor observó que *Bulla* y *Haminoea*, así como armináceos y dendronotáceos

eran depredados mayoritariamente, respecto a ciertos doridáceos o especies secretoras de ácido que eran rechazados.

Desde un punto de vista ecológico es necesario considerar también que además de peces y cangrejos, los efectos repelentes pueden afectar a otros organismos, como equinodermos u otros moluscos, y pueden también tener efectos antimicrobianos o antivíricos, o antifouling (en las puestas por ejemplo) para especies marinas. Por otro lado, se podría pensar que algunas sustancias podrían no tener función ecológica, o sea ser simplemente productos de acumulación localizados en alguna parte del organismo para evitar la autotoxicidad. Pero el hecho de que la función de los metabolitos secundarios sea en gran manera desconocida no significa que no jueguen un papel. Sería difícil aceptar que se mantuvieran a lo largo de la evolución sin ninguna función, dado el alto nivel de complejidad que se puede observar en algunas especies. Un dato más en favor de esto es su localización estratégica (por ejemplo en cromodorídidos, en *D. limbata*, etc.).

7.4.2. Experimentos *in situ*.

Por la dificultad que conllevan y la mayor credibilidad de sus resultados, merecen un capítulo a parte los escasos trabajos realizados *in situ*. El pionero fue sin duda Ros (1976b), quien realizó experimentos colocando entre fragmentos de erizo eolidáceos y doridáceos (*H. villafranca* y *H. orsini*), y tras el ataque de diversas especies de voraces peces litorales, nunca ninguno se "confundi6" y atac6 a los nudibranquios. En el capítulo de resultados (5.) se han expuesto las sustancias defensivas que presentan estas especies, si bien en este experimento también la coloración de los ejemplares debe ser considerada como un sistema defensivo (esto se discutirá en el apartado siguiente).

Hay que mencionar los trabajos de Paul y Van Alstyne (1988) con calamar impregnado con sustancias a probar, así como los experimentos de Poiner *et al.* (1989) *in situ* y en acuario con calamar y peces. De un modo similar, Paul *et al.* (1990) realizaron experimentos con cuerdas y fragmentos de calamar impregnados con las sustancias extraídas de *Atapozoa* sp y

Nembrotha spp, con los que demostraron el efecto repelente de las tambjamins para los peces (varias especies).

De forma parecida a estos últimos, se han realizado los experimentos que se incluyen en esta Tesis, con calamar y con *Marphysa sanguinea* (expuestos en el apartado 5.).

7.4.3. Tipos de defensa en moluscos Opisthobranchios.

La defensa en Opisthobranchios ha recibido en los últimos años una gran atención por parte de biólogos y ecólogos. A la profunda revisión de Ros (1976b), y los trabajos allí mencionados, hay que añadir los trabajos de Todd (1981), Edmunds (1987, 1991) y Rudman (1991). Las primeras citas de defensa en opisthobranchios son probablemente las de Wallace (1889), Garstang (1889, 1890), Herdman (1890a y b) y Herdman y Clubb (1892).

El hipotético proceso por el que la principal defensa mecánica (la concha) fue sustituida por una variada defensa química antes de perderse o reducirse la concha, fue descrito por Edmunds (1966b, 1974, 1987) y por Faulkner y Ghiselin (1983). Este fenómeno se habría dado probablemente varias veces de forma independiente en los opisthobranchios (Edmunds, 1966b). No se explica, pues, el esquema propuesto por Cattaneo (1990) en que la adquisición de toxinas se sitúa lejos (y posteriormente) de la pérdida o reducción de la concha. De cualquier forma, nos hallamos ante un grupo que ha desarrollado una gran cantidad de mecanismos, de muy diversos tipos, para protegerse de posibles depredadores.

Posibles depredadores.

Muchos trabajos químicos empiezan de forma parecida a esta: "Although dorid nudibranchs are among the most brightly colored of marine animals and have no obvious physical defense mechanisms, they have few

predators". Cabe plantearse, pues, inicialmente, cuáles son los posibles depredadores de los opistobranquios. Por otra parte, el escaso valor nutricional de algunos opistobranquios fue señalado por Todd (1981). Hay y Steinberg (1992) indican que los efectos de un compuesto sobre distintos depredadores, o de compuestos relacionados sobre una especie de depredador pueden ser muy variables.

En primer lugar, se podría pensar en cualquier macrocarnívoro, pero las citas bibliográficas sobre depredadores confirmados son muy escasas (Ros, 1972; Todd, 1981; Carefoot, 1987). Las anémonas, como polípagos oportunistas (Shick, 1991), pueden comer grandes presas (macrofauna), y en su dieta se citan normalmente gasterópodos. No se comen lo indigerible, pero sí casi todas las presas que se les ofrezcan. En los experimentos con las especies analizadas en esta Tesis (mencionados a lo largo del capítulo de resultados) la especie utilizada no se comió ningún opistobranquio, aunque ha habido respuesta positiva en algunos casos. Los moluscos que escapan vivos, por otro lado, resisten aparentemente bien a la descarga de los cnidoblastos, ya que sobreviven. En el apartado 7.4.1. hemos mencionado algunos experimentos realizados con anémonas por otros autores (Thompson, 1960a y b; Marbach y Tsumamal, 1973) que dieron igualmente resultados negativos o difícilmente interpretables (algunos opistobranquios fueron depredados en los experimentos de Thompson, si bien otros resultaron repelentes, ver apartado 7.4.1.).

En cuanto a los crustáceos, han sido utilizados en algunos experimentos de repelencia (ver el apartado correspondiente), obteniéndose resultados variables. Por ejemplo, ha sido utilizado *Dardanus megistos*, que es un omnívoro oportunista (Pawlik *et al.*, 1988). En los experimentos aquí realizados se han obtenido también resultados diversos según las especies de opistobranquios utilizadas, y según la parte anatómica ofrecida (o sus extractos impregnados en fragmentos de calamar). Posiblemente debido a sus características, estos animales sean un buen modelo para realizar tests. Harris (1973) y Todd (1981) indicaron algunas especies que eran depredadas por diversos crustáceos, dándose casos de selección de algunas partes de los opistobranquios ofrecidos. Thompson (1960b) obtuvo resultados negativos en

sus experimentos con ejemplares de *Carcinus maenas*, los cuales no se comieron a ningún opistobranquio.

Estrellas de mar, peces planos y natícidos se han señalado como depredadores de moluscos con concha (Edmunds, 1966b). Algunas estrellas de mar fueron citadas como depredadores de nudibranquios (ver Harris, 1973; Todd, 1981; y referencias en ambos citadas), aunque los experimentos que aquí se han realizado con la estrella *Echinaster sepositus* fueron todos negativos, y por ello no se han incluido en apartados anteriores.

En cuanto a los peces, en el apartado relativo a toxicidad ya se ha comentado que en los tests se suelen usar peces de agua dulce. En los experimentos o tests de repelencia, sin embargo, en los últimos años se han utilizado con mayor frecuencia peces marinos, como por ejemplo *Thalassoma lunare*, que es un carnívoro oportunista (Pawlik *et al.*, 1988). Desde antiguo los peces han sido los posibles depredadores más asiduamente empleados en experimentos de este tipo (Garstang 1890; Herdman, 1890a y b; Herdman y Clubb, 1892; Thompson, 1960a y b; Russell, 1966; Edmunds 1966b; Harris, 1973). Thompson (1960b) citó algunas pocas especies que eran depredadas por peces de forma natural: *Tritonia hombergi*, *Scaphander lignarius*, *Philine quadripartita*, *Aeolidia papillosa*, *Akera bullata* y, naturalmente, gimnosomados y tecosomados. En los experimentos *in situ* es donde seguramente se puede ver un efecto más real sobre los peces, ya sea con fragmentos de calamar (Paul *et al.*, 1990; y esta Tesis) o con gusanos poliquetos (esta Tesis), aunque estos son mucho más complejos que los tests de laboratorio. En un detallado estudio de contenidos estomacales de peces tropicales (Randall y Hartman, 1968), se hallaban gran cantidad de organismos presas, incluyendo esponjas (que también presentan multitud de mecanismos químicos de defensa), pero no se citan opistobranquios (únicamente se mencionan huevos de gasterópodos); lo mismo se observa en el trabajo de Yoshiyama y Darling (1982). Se han realizado experimentos con gaviotas como Ambrose *et al.* (1979), que han sido citadas como depredadores de especies intermareales, junto a algunas especies de patos (Todd, 1981). Esta opción es seguramente más ocasional que en el caso de otros depredadores.

Otros moluscos podrían también depredar sobre los opistobranquios. Por ejemplo, la murexina hallada en *Aplysia californica* (en la glándula digestiva, Blakenship *et al.*, 1975), se acumula en la glándula hipobranquial de *Murex* (Erspamer y Benati, 1953). Recordemos que los ejemplares del género *Murex* son depredadores carnívoros y carroñeros, por lo que tal vez podría establecerse una relación de depredación.

Sin embargo, de todos los posibles depredadores mencionados, los mejor documentados son los mismos opistobranquios (mayoritariamente tectibranquios y eolidáceos), que fueron revisados por Harris (1973) y Todd (1981), y como demostró Paine (1963). Se han comentado varios ejemplos en la revisión realizada en esta Tesis. Uno de ellos es el de *Roboastra tigris* y el género *Tambja* (Farmer, 1978), y otro es *Navanax inermis* (Paine, 1963, 1965), que además pueden seguir el rastro de sus presas. Otro caso es el de *Gymnodoris* sp, un doridaáceo que se encuentra entre el alga clorofícea *Chlorodesmis fastigiata*, alimentándose exclusivamente de *Elysia* sp, (que acumula chlorodesmina del alga), pero no se alimenta de *Cyerce nigricans* que fabrica polipropionatos (aunque come la misma alga que *Elysia* sp). Estos casos y algunos otros (Harris, 1973), nos demuestran que aunque se pueden comer entre ellos, lo hacen de forma selectiva. En nuestros experimentos, los opistobranquios utilizados como depredadores han sido *Philineopsis depicta*, *Pleurobranchaea meckeli* y *Aglaja tricolorata*, si bien esta última no dió ningún resultado positivo (ver apartado 5.). En realidad estas especies habitan preferentemente en fondos blandos (Ros, 1978a; Ballesteros *et al.*, 1992), por lo que no es probable que de forma natural se encuentren con opistobranquios de paredes rocosas (en casos excepcionales podemos imaginar, por ejemplo, que un doridaáceo "caiga" de la pared sobre un fondo blando). En cualquier caso observamos que también en *P. meckeli* existe una predación selectiva, y es capaz de distinguir entre presas comestibles y no comestibles, aunque sea tras darles un primer mordisco y rechazarlas a continuación.

La depredación por algunas especies de puestas de otros opistobranquios fue revisada por Harris (1973) y Todd (1981). Es especialmente curioso el caso de *Favorinus* sp, que al parecer es capaz de

comerse la puesta de *Hexabranchus sanguineus*, a pesar de que presenta potentes sustancias defensivas (ver apartado 7.4.1.).

Otra función atribuida a los metabolitos secundarios es la defensa contra posibles parásitos, como fue también sugerido por Edmunds (1974). La secreción mucosa de *Phyllidia varicosa* (Johannes, 1963) es tóxica para un copépodo y un anfípodo. De entre todos los ejemplares de Opistobranquios que se ha tenido oportunidad de observar, solamente en un caso se observó un copépodo asociado a *D. limbata* (*Lichomolgus* sp). En la literatura existen algunas referencias de este tipo de parásitos o comensales (copépodos y hongos, Hecht, 1895), aunque son pocos los casos conocidos. Los copépodos limpiadores y parásitos son los más frecuentes (Ortea, com. pers.). Es por ello que una función repelente o ahuyentadora contra este tipo de organismos no debería ser descartada.

Una visión más general sobre la ecología química (que más bien debería en este caso llamarse química ecológica), y algunos tipos de defensa, puede hallarse en Harborne (1986, 1989), si bien los opistobranquios son apenas mencionados.

Clasificación de los tipos de defensa.

Hasta el trabajo de Johannes (1963) solamente se conocían dos tipos de defensa en opistobranquios. Una era la secreción ácida, ampliamente estudiada por Thompson (1960a y c). La segunda era la presencia de cnidoblastos procedentes de cnidarios (Herdman, 1890a y b; Herdman y Clubb, 1892; Hecht, 1892, 1895; Thompson, 1960b; Edmunds 1966a; Thompson y Bennett, 1969; Harris, 1971, 1973). La gran aportación de Johannes fue el descubrimiento de un posible tercer mecanismo defensivo (como él mismo lo definió), la presencia de metabolitos secundarios. Este tercer tipo de defensa se ha revelado como el más amplio de los tres, ya que la cantidad de sustancias es enorme, y además se halla ampliamente extendido en los distintos órdenes de opistobranquios (ver apartado 7.3.) mostrando una gran variedad de mecanismos de actuación.

Los tipos de defensa, como ya hemos dicho, fueron revisados por Ros (1976b, 1977). Siguiendo con los criterios expuestos por este autor, comentaremos brevemente los diversos tipos de defensas (las definiciones, los ejemplos y bibliografía relacionada se pueden hallar en Ros, 1976b, por lo que destacaremos únicamente otros casos no citados allí). Nuestra única divergencia estriba en no considerar las cleptodefensas como un tipo aparte del resto. Consideramos que existen cleptodefensas de tipo estructural y de tipo químico, por lo que las hemos incluido en los respectivos apartados.

Por otro lado, no incidiremos en la separación entre defensas primarias y secundarias, ya que se hallan explicadas en Ros (1976b, 1977) y Todd (1981). Según este último autor, se puede considerar que hay una primera línea de sistemas defensivos (visuales), y una segunda línea (defensas químicas, por ejemplo). Los tipos de defensa propuestos por Barnes *et al.* (1988) para invertebrados en general (evitación, disuasión y repulsión), aunque excesivamente amplios, son aplicables en opistobranquios.

Defensas estructurales.

Una vez desaparecida o reducida la concha, las únicas defensas mecánicas que se encuentran en opistobranquios son las espículas (Thompson, 1960a y b). Otras defensas estructurales serían las glándulas que segregan o acumulan las sustancias defensivas (MDFs, etc.), los cnidosacos, la autotomía y las coloraciones, así como las secreciones de camuflaje.

En los casos analizados en esta Tesis, algunas de las especies que presentan espículas presentan también defensas químicas (*Doris verrucosa* y *Doriopsilla areolata*). Otros ejemplos de animales protegidos por espículas se pueden hallar en Ros (1976b) y Todd (1981).

En lo que se refiere a las glándulas podríamos hablar de una morfología funcional en relación a la toxicidad. Un ejemplo serían las MDFs y su localización precisa en distintas especies de un mismo género. Otras posibles glándulas relacionadas con la defensa han sido comentadas en el apartado 7.2.1.

Autotomía. Por lo que respecta a la autotomía, diremos que recientemente se ha hallado una relación entre ciertas sustancias con capacidad regenerativa y la autotomía de los cerata de dos especies de sacoglosos (*Cyerce cristallina* y *Ercolania funerea*, ver apartado 7.4.1. para las referencias). De modo similar se ha descrito autotomía en *Cyerce nigricans* (Hay *et al.*, 1989). También en *Tethys fimbria* se han hallado prostaglandinas que, entre otras funciones, podrían hallarse asociadas a la autotomía (ya mencionada por Parona, 1891, 1892) y regeneración de los cerata (Marín *et al.*, 1991 y referencias previas allí mencionadas). Esto implicaría que este tipo de defensa estructural tendría una base química. El caso de *Peltodoris atromaculata* creemos que debe diferenciarse de los anteriores, ya que en esta especie la autotomía es más bien una disgregación del manto antes de la muerte del animal (ver apartado 5.13.), y en ningún caso se ha observado su regeneración en los ejemplares estudiados.

Para que la autotomía tenga una función defensiva, las partes autotomizadas no deben ser esenciales para la supervivencia de la especie, y preferiblemente deben contener las defensas más potentes (Edmunds, 1974; Todd, 1981). Estos autores revisaron algunos casos de autotomía. Aparte de los ejemplos mencionados en Stasek (1967) y Ros (1976b), otros descritos recientemente son *Lobiger souverbiei* (Poorman y Poorman, 1977; Edmunds, 1987), *Oxynoe panamensis* (Poorman y Poorman, 1977), *Oxynoe olivacea* (Stamm, 1968; Ortea, 1981, "utilización violenta de la cola"; Cimino *et al.*, 1990a), *Melibe fimbriata* (Thompson y Crampton, 1984, incluyendo procesos de regeneración), y *Lobiger viridis* (Edmunds, 1987). Otras especies que presentan autotomía son *Dondice banyulensis* (Ballesteros, com. pers.), *Janolus hialinus* (Ortea, 1977), *Polybranchia viridis* y *P. borguini* (Ortea, 1981).

Coloraciones crípticas y aposemáticas. En lo referente a las coloraciones, poco podemos añadir a lo ya descrito por Ros (1976b), Todd (1981) y Edmunds (1987, 1991). En éste último se expone un listado de las especies de colores llamativos y crípticos, en relación a su tipo de desarrollo.

El caso que Ros (1976b) expuso de cripsis con epibiontes, *Umbraculum mediterraneum*, que se suponía poco defendido, se ha demostrado que va acompañado de potentes metabolitos defensivos (ver apartado 7.4.1.). Otras especies claramente crípticas presentan sustancias muy activas (como comentaremos en el apartado de defensa química).

Por otro lado, se ha discutido mucho sobre la coloración aposemática en opistobranquios, ya desde antiguo (Herdman, 1890a; Herdman y Clubb, 1892; Hecht, 1895; Crossland, 1911; Crozier, 1916; y otros), y muy recientemente (Edmunds, 1987, 1991; Cattaneo, 1990; Rudman, 1991). Se comentan algunos de estos aspectos más adelante, en relación a la defensa química. Crossland (1911) ya asoció la coloración advertidora de los cromodorídidos con un "mal gusto" de los mismos, y además fue el primero en indicar que el borde del manto estaba siempre especialmente coloreado. Crozier (1916) indicaba que no eran los pigmentos los causantes de la repelencia de *Chromodoris zebra*, sino una sustancia repelente localizada en el borde del manto, que formaba "gotitas aceitosas". Ros (1976b) señaló que en algunos casos las coloraciones aposemáticas se hallaban restringidas a ciertas partes del cuerpo presumiblemente implicadas en la defensa (por ejemplo en *Philinopsis depicta* (*Doridium carnosum*) y *Thuridilla hopei*, ver apartado 5.17.).

Un ejemplo que fue ampliamente discutido por su coloración es *Hexabranchus* (Todd, 1981), que fue citado como aposemático, no sin ciertas críticas, y en el que posteriormente se han descrito potentes sustancias defensivas (ver apartado 7.4.1.). Probablemente son muchos más los casos en los que las especies que presentan colores vistosos (y no presentan otros tipos de defensa evidentes) son aposemáticas debido a la presencia de sustancias defensivas, aunque todavía sean pocos los casos en los que esto se ha demostrado químicamente. En algunas de las especies del apartado 5.17. se señala que no se han detectado sustancias de interés, pero esto no quiere decir que no estén presentes a bajas concentraciones (seguramente el estudio de un mayor número de ejemplares daría resultados más positivos).

Por lo que respecta a la homocromía como cripsis mediante pigmentos adquiridos de la presa, cabe señalar que se han descrito pigmentos derivados de la dieta y cloroplastos que son incorporados por Sacoglosos (Ros, 1976b;

Ros y Marín, 1991, y refs. previas allí mencionadas). También son de destacar los casos de homocromía de las puestas (Ros, *op. cit.*). Fusetani (1988) indica que en aguas tropicales las puestas son muy atractivas y visibles por su forma y brillantes colores, pero que parecen inmunes a la depredación; según este autor, en aguas tropicales se han descrito sustancias antifúngicas en dichas puestas, mientras que en aguas templadas serían inactivas.

Es necesario recordar que una misma coloración puede ser críptica o aposemática según el sustrato en que se encuentra el animal (Edmunds, 1974, 1991; Margalef, 1982). En un caso además se ha descrito que el animal puede cambiar de color según el entorno mediante migración de pigmentos (*Haminoea navicula*, Edlinger, 1982).

Círculos cromáticos. En cuanto a los círculos aposemáticos, los comentaremos con mayor detalle más adelante. Basta señalar aquí que algunos círculos cromáticos estarían formados por *Hypselodoris villafranca*, *H. tricolor*, *H. fontandraui*, *H. bilineata* y *H. orsini* en las costas catalanas, *H. villafranca*, *Hypselodoris* sp y *H. fontandraui* en las costas del sur de Italia, y *H. cantabrica*, *H. villafranca* y *H. tricolor* en el Cantábrico. Otros círculos serían los de *Chromodoris* spp, con *C. luteorosea*, *C. purpurea*, *C. krohni* y *C. britoi* en el litoral catalán y en el italiano, y sólo las tres primeras en el Cantábrico. Estos dos grupos corresponderían a los señalados como grupo I y III-IV de Ros (1976b), con algunas variaciones. Ros (*op. cit.*) sugirió que podría existir alguna sustancia repelente en *Hypselodoris*, y que por ello estos círculos serían aposemáticos, y representarían un mimetismo mülleriano. Los resultados presentados en esta Tesis apoyan la veracidad de esta hipótesis.

Otro posible círculo sería el descrito por Ros (1976b) y Ortea *et al.* (1989) alrededor de *Limacia clavigera*, que presenta espículas y una secreción supuestamente defensiva (en la que por el momento no se han hallado alomonas, ver apartado 5.17.). En el mismo círculo participarían especies protegidas por cnidosacos y otras que todavía no han sido analizadas desde el punto de vista químico.

Otros círculos podrían estar formados por las especies de cromodorídidos mencionadas por Rudman (1982, 1983, 1985, 1986) y por

Bertsch (1978a, b y c), o por los doridáceos descritos por Ballesteros *et al.* (1984) y Perrone (1992). En este último caso se trataría de especies crípticas.

En este tipo de defensas hay que considerar el posible depredador y su sistema de visión, así como la luz y la profundidad (Behrens, 1985; Edmunds, 1991). Esta es una de las críticas que ha cuestionado la presencia de coloraciones aposemáticas en opistobranquios (Ros, 1976b). Sin embargo, como este autor indicó, no es el color en sí sino el contraste de colores lo que importa, y lo que ven los posibles depredadores (ver una discusión más amplia al respecto en Ros, *op. cit.*, y Harris, 1973). El mismo Edmunds (1974) indicó que peces y otros vertebrados pueden aprender a asociar repelencia con color, y a evitar presas con colores similares posteriormente. En el caso de *Hexabranhus sanguineus*, Pawlik *et al.* (1988) indicaron que en un ambiente dominado por depredadores que se orientan visualmente es aposemático y posee sustancias defensivas obtenidas de la dieta. Otro factor a considerar es que un mismo ejemplar puede ser críptico o aposemático dependiendo del sustrato en el que se encuentre, como ya se ha comentado; un modo de evitar esto podría ser la coloración diferencial según las distintas presas que se da en eolidáceos (Edmunds, 1987).

Se han descrito casos en los que la coloración o el modelo cromático varía a lo largo del desarrollo del animal (por ejemplo en *Hypselodoris*, Bouchet y Ortea, 1980), o según la alimentación (Edmunds, 1987). El cambio de color mediante cromatóforos ha sido descrito únicamente, en nuestro conocimiento, en *Haminoea navicula* (Edlinger, 1982).

La posibilidad de que la coloración sea un carácter neutro, (como al parecer sucedería con las esponjas (Randall y Hartman, 1968) en las que el color y la forma parece que no influyen en la depredación por parte de los peces), será discutida más adelante.

Se ha descrito un caso de posible mimetismo batesiano entre *Aplysia dactylomela* y juveniles del pez *Chilomycterus antennatus* (Heck y Weinstein, 1978). Otros tres casos de posibles mimetismos son señalados por Cattaneo (1990, ver referencias allí mencionadas): un crustáceo comensal de

Hexabanchus sanguineus, un copépedo sobre *Hypselodoris obscura* y un anfípodo con *Flabellina trilineata*.

Defensas químicas.

Siguiendo a Ros (1976b) incluiremos aquí aquellas secreciones que de un modo u otro intervienen en la defensa frente a los depredadores. Incluimos las cleptodefensas químicas (que hemos bautizado como "cleptoquimiodefensas"), es decir las sustancias químicas usadas en defensa que proceden de la dieta, ya sean transformadas o no (ver apartado 7.1.1.).

Clasificaciones. La división de Ros (1976b) en secreciones venenosas, ácidas, repelentes, de inmunidad o anestésicas, de enmascaramiento y mal sabor generalizado no puede ser mantenida en la actualidad, ya que entonces no se conocían la gran mayoría de los productos naturales que hemos mencionado en el apartado 6. Nos parecen posibles varias alternativas. La primera es una clasificación según la estructura de las sustancias (ver apartado 6.) y la segunda es según la función específica de dichas sustancias (ver apartado 7.4.1.). En el primer caso, una aproximación inicial separaría las sustancias ácidas del resto de metabolitos. En el segundo caso tendríamos separadamente las sustancias tóxicas, repelentes, citotóxicas, etc., independientemente de su estructura. Una tercera posibilidad se referiría al origen dietético o biosintético de los productos en cuestión (ver apartado 7.1.). En cualquiera de los tres casos bastaría eliminar de los capítulos correspondientes las sustancias que no están implicadas en la defensa para obtener la clasificación actualizada. Estos tres casos se resumen brevemente en la Tabla 7.16.

La clasificación que nos parece más ajustada a lo que se pretende, y desde un punto de vista biológico, es la relativa a la función de los metabolitos.

TIPOS DE DEFENSA QUIMICA
CRITERIO: Estructura química de las sustancias.
Sustancias derivadas del acetato y del propionato Sustancias derivadas del mevalonato Sustancias derivadas del shikimato Compuestos nitrogenados Compuestos de origen mixto Sustancias ácidas
CRITERIO: Función de los metabolitos.
Sustancias antibacterianas Sustancias antifúngicas Sustancias citotóxicas Sustancias tóxicas Sustancias repelentes Sustancias con otras funciones Feromonas de alarma
CRITERIO: Origen de los productos.
Productos de origen dietético (cleptoquimiodefensas) Productos biosintetizados de novo

Tabla 7.16. Tipos de defensa química según distintos criterios.

En cualquier caso en las defensas de tipo químico hay que considerar siempre el tipo de depredador y sus mecanismos de quimiorrecepción (Ritter, 1979; Karuso, 1987; Andaló, 1988).

Alomonas, kairomonas y feromonas. Otro sistema de clasificación implicaría la información que proporcionan las sustancias, que es también una función de las mismas, o lo que es lo mismo, su papel en la comunicación biológica. Una breve definición de cada una de ellas, según Brown (1975), ha sido ya expuesta en el apartado 6.9.

Otros estudios han contribuido a clarificar y/o ampliar estos conceptos en especies marinas (Kittredge *et al.*, 1974) o terrestres (Wilson, 1970; Whittaker y Feeny, 1971; Harborne, 1982; Markl, 1985; Alves, 1988; Takabayashi y Takahashi, 1990). En opistobranquios, sin embargo, los

conocimientos son aún muy inferiores a los existentes en insectos y plantas. De hecho, gran parte de la confusión existente estriba en que ciertas sustancias pueden ser a la vez alomonas y kairomonas, por ejemplo. Citaremos el caso de *Tambja eliora*, que presenta quimiotaxis positiva hacia *Sessibugula translucens*, su alimento, y hacia agua de mar con tambjamins A y B a concentraciones de 10^{-10} M (kairomona), en cambio estas sustancias le producen un efecto repelente (alomona) a 10^{-8} M (Carté y Faulkner, 1986). De modo similar, *Roboastra tigris* puede seguir a *Tambja* por el rastro de tambjamins, pero a concentraciones elevadas éstas producen un efecto repelente. Esta actividad dependiente de la concentración (atractiva o repelente) ha sido observada en las "trail" feromonas de hormigas (Tumlinson *et al.*, 1971), y algo similar fue descrito para *Nassarius obsoletus* (Atema y Stenzler, 1977). Otro ejemplo serían las sustancias que en una esponja son alomonas defensivas y en cambio le sirven al depredador especializado para localizarlas (son kairomonas para este depredador), como fue ya sugerido por Whittaker y Feeny (1971); tal vez un ejemplo de esto serían los furanosesquiterpenos de *Dysidea* e *Hypselodoris*, aunque no se ha demostrado que actúen efectivamente como kairomonas. Otra molécula con varias funciones de este tipo, pupukeanane, fue señalada por Scheuer (1977b). Estos fenómenos de atracción se comentan también en el apartado siguiente.

Algunos ejemplos claros de alomonas son las verrucosinas de *Doris verrucosa*, algunos sesquiterpenos de *Dendrodoris* spp e *Hypselodoris* spp, los diterpenos de *Chromodoris* spp, las oxytoxinas de *Oxynoe olivacea*, etc. En la revisión sobre comunicación química en invertebrados marinos de Scheuer (1977b) se menciona únicamente la alomona de *Phyllidia varicosa*. A nivel general podemos considerar como alomonas las sustancias para las que se ha descrito una función defensiva (ver apartado 7.4.1.) y que se localizan estratégicamente en los opistobranquios (ver apartado 7.2.1.). Las sustancias ácidas también se consideran alomonas (Thompson, 1986; Scheuer, 1977b).

Algunos ejemplos de feromonas de alarma (ya comentadas en el apartado 7.4.1.) son los productos de *Haminoea* spp y posiblemente de *Scaphander lignarius* (ver referencias en los capítulos correspondientes). No se han hallado feromonas en *Philinopsis depicta* ni en *Bulla striata* (Cimino

et al., 1985b). Painter *et al.* (1991) han descrito recientemente feromonas sexuales en *Aplysia brasiliana*. Fenómenos de atracción fueron descritos por Lederhendler *et al.* (1977) en *Aplysia dactylomela* hacia otros ejemplares de su misma especie.

En algunas especies de opistobranquios podría haber feromonas que regulasen el comportamiento descrito de seguimiento ("trail-following") en relación con la reproducción (Todd, 1981). Un ejemplo de esto podría ser *Onchidoris bilamellata* (Todd, 1979).

Otro factor a considerar es la distribución de la toxicidad, que hemos detallado en el apartado 7.2. Cabe destacar que seguramente la primera referencia a la distribución diferencial de las sustancias es Crozier (1916), quien señaló que *Chromodoris zebra* era repelente para varios posibles depredadores, pero en su parte externa (ya que las vísceras eran depredadas), y concretamente en el borde del manto (que indica como "the most unpleasant part of the body"). Cabe recordar que en cromodorídidos las alomonas se hallan generalmente concentradas en las MDFs (ver apartado 5.).

Sobre la coloración aposemática en opistobranquios. La existencia de coloraciones aposemáticas en opistobranquios fue discutida ya hace algunos años (Thompson, 1960b y c; Edmunds, 1974), y lo sigue siendo en la actualidad (Edmunds, 1987, 1991; Rudman, 1991). Edmunds (1974) discutió ampliamente las limitaciones del aposematismo. Es bastante sorprendente que esta polémica no se haya dado en insectos, donde se han realizado numerosos trabajos similares (Brower, 1969; Eisner, 1970; Whittaker y Feeny, 1971; Harvey y Greenwood, 1978). Una posible crítica era que no se había demostrado el carácter repelente o defensivo de los opistobranquios. Ros (1976b) lo justificaba en base a los pocos trabajos realizados sobre el tema. Con los datos aparecidos en los últimos años sobre las sustancias naturales de estos moluscos, aquí revisados, y en una pequeña parte por los datos incluidos en esta Tesis, esta objeción debería ser rechazada. Existen, sin embargo, muchos casos citados de aposematismo que no han sido demostrados, y muchos otros en los que se han demostrado actividades, como ya hemos comentado repetidamente, con organismos que habitan en lugares completamente distintos al hábitat natural de los opistobranquios.

Por otro lado, Gittleman y Harvey (1980) señalaban las ventajas del aposematismo respecto a la crípsis, ya que los depredadores aprendían más rápidamente a evitarlos.

Edmunds (1987) propuso que la coloración podía tener funciones intraespecíficas, interespecíficas o ser fortuita. Las funciones interespecíficas serían básicamente las defensivas (crípsis, aposematismo, mimetismo), mientras que no habría ningún caso conocido en opistobranquios de función intraespecífica. Según este autor, los animales aposemáticos ("animals which have dangerous or unpleasant attributes, and which advertise this fact by means of characteristic structures, colours, or other signals so that some predators avoid attacking them") sólo lo serán si se cumplen las siguientes premisas:

- 1) presentan colores muy visibles y aparentes (o advertencias de otro tipo).
- 2) son nocivos para los depredadores.
- 3) dichos depredadores evitarán atacarlos por su coloración y advertencias.
- 4) el color (u otra señal) les proporciona mejor protección que otras señales (por ejemplo, crípsis) a nivel de individuos o de genes.

Estamos de acuerdo con los dos primeros puntos, si bien matizaríamos el segundo diciendo que presentan sustancias que afectan negativamente a los depredadores. En cuanto al tercer punto, los depredadores evitarán atacar a estas especies no únicamente por el color sino por las sustancias químicas, es decir que, al "probar" u "oler" un ejemplar (que muchas veces resulta intacto) posiblemente no repetirán más, ya que la coloración les recordará su sabor u otros efectos desagradables. El efecto de ambos factores debe ser combinado.

En cuanto al cuarto aspecto, posiblemente lo que les proporciona protección es la defensa química, ya que es la que en último término es efectiva. Es utópico pretender probar que la misma especie siendo críptica estaría más favorecida. Únicamente podríamos probar si la coloración afecta a la depredación de algún alimento concreto (impregnado o no con las sustancias químicas de la especie). El hecho es que tanto si son crípticas como

si son aposemáticas, pueden presentar potentes defensas químicas, por ello, tan adaptativo y beneficioso es un caso como el otro, seguramente dependiendo de los hábitos de la especie (alimenticios, reproductivos,...) y del tipo de depredador en cada caso. Este último punto es el que condiciona a Edmunds (1987) a decir que probablemente la coloración aposemática en opistobranquios existe aunque no haya sido totalmente demostrada. De hecho, una de las justificaciones que este autor da para la existencia del aposematismo es que existen círculos de mimetismo mülleriano. Rudman (1991) indica que para probar estas últimas condiciones de Edmunds, (criterios 3 y 4), sería necesario un experimento con características tales como las que porbablemente han existido para llegar a los grupos que realmente existen, (es decir, que los grupos existentes son el resultado de dicho experimento natural).

En su trabajo de 1991, Edmunds profundiza en los cuatro aspectos arriba indicados. Expone como evidencias "indirectas" del aposematismo: 1) la evolución de círculos miméticos, 2) la evolución de cualidades especialmente nocivas o de la habilidad para sobrevivir a los ataques, 3) la evolución de la selección de grupo ("kin-selection"), y 4) la evolución de respuestas innatas en los depredadores.

Ciertamente, para la premisa 2) es difícil justificar que las defensas de las especies aposemáticas sean más efectivas que las de especies crípticas, o que presentan autotomía. Esto se ha comentado en relación a la importancia relativa de los distintos tipos de defensa. No nos parece posible distinguir cuál es, si la hay, la defensa principal de una especie que presente varios tipos de ellas. Es el conjunto de sistemas defensivos lo que facilita la supervivencia de la especie. En bastantes casos, como ya se ha comentado, los opistobranquios sobreviven al ataque de los depredadores. El punto 3) se discutirá más adelante. El punto 4) implica una larga relación evolutiva entre el depredador y el opistobranquio, y además, de momento, tampoco ha sido demostrado, aunque es bastante probable que ocurra.

Es necesario recordar aquí que los mismos opistobranquios pueden aprender y tienen memoria (Alkon, 1974, 1975; revisiones de Quinn, 1984, y Menzel *et al.*, 1984). Por ejemplo, el depredador *Pleurobranchaea* puede

modificar su comportamiento alimentario como consecuencia de una experiencia desagradable (Menzel *et al.*, 1984). Si esto existe en opistobranquios, puede darse también en peces y crustáceos, que presentan sistemas más complejos de aprendizaje.

El caso anómalo de especies aparentemente aposemáticas y poco abundantes es discutido por Edmunds (1987), explicándose por una posible selección a nivel individual. El hecho de que un ejemplar sea mordido o atacado implica que puede morir (apoyando la selección de grupo), aunque tras haber visto sobrevivir a *H. webbi*, especie que se halla a menudo solitaria, a varios ataques de *P. meckeli* (y otros ejemplos, Edmunds, 1987), la idea de una selección a nivel individual no puede ser descartada. Comentaremos esto de nuevo en el apartado siguiente.

Los colores fortuitos serían posiblemente los de las especies abisales y algunas excavadoras que pasan casi todo el tiempo enterradas (Edmunds, 1987), aunque esto tampoco ha sido completamente demostrado. Cattaneo (1990) sugiere que en ausencia de depredadores, las coloraciones en opistobranquios deberían considerarse neutras. La ausencia de depredadores no es real, por lo que no coincidimos con la opinión de Cattaneo.

Rudman (1991) sugiere que los colores tan aparentes que presentan los cromodorídidos, a pesar de tener siempre una función defensiva, no son siempre aposemáticos. Este autor indica que los colores pueden hacer que los ejemplares sean ignorados por los posibles depredadores debido a su rareza y novedad. Las consideraciones de este autor sobre el hecho de que los depredadores no los verían, parecen indicar que se refiere a coloraciones disruptivas. Por otro lado, señala que en algunos casos atraen al depredador para hacerle conocer sus efectos repelentes (p. ej. en *Ceratosoma* spp). Según Rudman (*op. cit.*), en grupos de cromodorídidos poco abundantes la rareza sería más importante que el aposematismo, mientras que en grupos más abundantes, con casos de simpatría, la defensa química asociada a coloraciones aposemáticas adquiere una mayor importancia.

En otros casos las defensas químicas se han descrito en especies crípticas (*Dendrodoris* spp, *Doris verrucosa*). En *Dendrodoris* spp, sus

potentes alomonas no van acompañadas de otras defensas estructurales, mientras que en *D. verrucosa* hay gran cantidad de espículas en el manto (ver los capítulos correspondientes de esta Tesis). Este hecho ya fue observado por Thompson (1960b) quien cita una observación similar de otro autor en serpientes venenosas. En nuestra opinión el hecho de que las especies crípticas puedan estar bien defendidas químicamente no invalida el hecho de que otras especies protegidas químicamente presenten coloraciones aposemáticas para advertir a los depredadores. Edmunds (1987) indica que *Doris*, *Archidoris*, *Anisodoris*, *Discodoris*, *Dendrodoris*, *Doriopsilla*, y otros géneros, son crípticos. Observando las Tablas del apartado 6. y 7.1., se puede ver que todos ellos presentan sistemas defensivos de diversos tipos: crípsis, sustancias biosintetizadas *de novo*, sustancias de tipo ácido, e incluso todos ellos excepto *Dendrodoris* presentan espículas. Por otro lado, Edmunds (*op. cit.*) menciona que *Aplysia*, *Bursatella*, *Elysia*, y otros géneros, se camuflan mediante distintos sistemas, y también en este caso se han descrito mecanismos químicos asociados.

Círculos sinaposemáticos. Podemos decir que, con los resultados expuestos en esta Tesis (ver apartado 5.), los círculos cromáticos sinaposemáticos propuestos por Ros (1976b, 1984) para especies de *Hypselodoris* y *Chromodoris*, se corresponden con círculos químicos, en los que las especies integrantes presentan el mismo de tipo de moléculas defensivas. Estos círculos químicos aposemáticos se amplían respecto a los indicados anteriormente, en el caso de los *Hypselodoris* con la especie *H. webbi*, ya que cromáticamente es diferente (excepto los juveniles) pero presenta compuestos muy similares. Este tipo de círculos se basan en una serie de alomonas estructuralmente muy similares, con variaciones específicas y, sobre todo, geográficas, hecho que les favorecería ante posibles depredadores (Margalef, 1977; Luckner, 1984).

En otro grupo cromático de *Hypselodoris* azules (Bertsch 1978a, b y c), se incluyen especies en las que se han hallado alomonas: *H. agassizi*, *H. californiensis*, *H. ghiselini* y *Mexichromis porterae* (ver referencias en el apartado 6.3.). Esto representa probablemente otro círculo de mimetismo mülleriano. (No se descarta la posibilidad de que otras especies participen de modo mülleriano o batesiano).

En el caso de sustancias defensivas de origen dietético puede existir mimetismo mülleriano o batesiano según el tiempo que haga que los ejemplares han comido, como se comenta posteriormente. Este fenómeno ya fue sugerido en insectos (Eisner, 1970, y referencias allí mencionadas). Un posible ejemplo de esto podrían ser las especies de *Hypselodoris*, que como se ha visto (ver apartado 5.), presentan variaciones cuantitativas y cualitativas en sus metabolitos.

Edmunds (1987) expone la posibilidad de que en un círculo cromático existan especies mimetas müllerianas para un depredador, mientras que podrían ser a la vez batesianas para otro depredador.

Según resume Margalef (1982), para que se pueda decir que existe mimetismo batesiano, se deben cumplir las siguientes bases:

- 1) coincidencia geográfica o ecológica.
- 2) limitación numérica (siendo el mimeta menos abundante que el modelo).
- 3) persistencia en la memoria del depredador y facilidad para cambiarla.

Las limitaciones del mimetismo batesiano fueron discutidas ampliamente por Edmunds (1974). Recientemente se ha demostrado que el típico ejemplo de mimetismo batesiano (mariposas) no es tal, sino que se trata de un mimetismo mülleriano (Ritland y Brower, 1991; Vane-Wright, 1991). Este hecho parece indicar que se deben considerar con precaución los posibles casos de este tipo en otros grupos.

Automimetismo. Este fenómeno implicaría que incluso entre ejemplares de una misma especie podría existir mimetismo mülleriano o batesiano, según si han comido o no, como ya se ha comentado. Esto fue descrito en insectos (Brower *et al.*, 1967, 1969; Eisner, 1970). Los automimetas tendrían una mayor ventaja respecto a las demás especies imitadoras de los ejemplares aposemáticos, ya que serían morfológicamente más similares. Se sugiere aquí que este fenómeno podría existir también en opistobranquios, por ejemplo en *Hypselodoris* que no hayan comido tanto (o nada), o que hayan perdido sus MDFs (debido a un ataque reciente o por

otras causas), respecto a otros ejemplares vecinos. Este caso de mimetismo batesiano sería temporal y posiblemente breve. Otro ejemplo de automimetismo podría ser *Hexabranchus sanguineus* (Pawlik *et al.*, 1988).

Polimorfismos. Nos podríamos referir a polimorfismos por ejemplo a nivel de variabilidad en el grado de palatabilidad de la especie, o también a nivel cromático. Las ventajas del polimorfismo fueron discutidas por Edmunds (1974). Luckner (1984) señalaba que el polimorfismo o heterogeneidad de las presas facilita la protección de las mismas. Según Edmunds (1987), el polimorfismo se justifica en especies crípticas, para evitar que el depredador se acostumbre a un morfo uniforme. Este podría ser el caso de *Dendrodoris limbata*. En los casos de aposematismo, Edmunds (*op. cit.*) no considera que sea ventajoso. En realidad, es posible que el depredador aprenda a reconocer como peligrosa una especie por el color contrastado de su cuerpo y líneas coloreadas, y que no le afecten pequeñas modificaciones (por ejemplo, puntuaciones u otras líneas discontinuas). El polimorfismo en especies aposemáticas podría justificarse en los casos en que las variaciones no afectaran al patrón general y, por ello, no hubiera existido presión de selección sobre su presencia o ausencia. Por ejemplo, en el modelo de *Hypselodoris* azul con líneas amarillas, seguramente no es importante para el pez o el cangrejo si las líneas van acompañadas de puntos blancos o azules, o si hay alguna línea duplicada.

Del mismo modo, es posible que, una vez adaptado el opistobranquio a seleccionar determinados metabolitos de una (o varias) presa(s), no sea importante exactamente qué moléculas son estas (es decir, si es longifolina, nakafurano-8, nakafurano-9, u otros similares), siempre y cuando cumplan con su función. A nivel de los productos, pues podría existir un polimorfismo basado en la falta de presión selectiva por una molécula única, de modo que las especies que presentan un amplio espectro de sustancias de características similares estarían mejor defendidas (como podría ser el caso de *Hypselodoris* spp).

Defensas de comportamiento.

Se incluyen aquí los casos de anacoresis, huida, evitación, exhibición individual y tanatosis, defensa agresiva, comportamiento deimático y exhibición de grupo descritos por Ros (1976b).

La primera reacción ante el peligro suele ser esconder o retraer las branquias y los rinóforos, y extender los cerata, si los hay (Harris, 1973; Todd, 1981).

Veremos en primer lugar algunas formas de escape activo. Farmer (1970) proporciona un listado de opistobranquios que pueden nadar. Otros casos descritos se pueden hallar en Gohar y Soliman (1963), Willows (1969), Edmunds (1968a), Wobber (1970), Harris (1973), Todd (1981), y también *Melibe fimbriata* (Thompson y Crampton, 1984). Sin embargo, en la mayoría de casos no se ha demostrado que el nadar esté asociado a la defensa. Curiosamente los ejemplares de *Gastropteron rubrum* que se han analizado no parecían presentar sustancias defensivas (ver apartado 5.17.), y podrían defenderse simplemente mediante la natación. Esto no es generalizable, ya que hay especies de *Aplysia* que nadan, así como otros opistobranquios que a la vez presentan sustancias defensivas (*Tethys fimbria*, *Hexabranthus sanguineus*,...). Sin embargo, no hay que olvidar que la natación puede ser únicamente un medio de desplazamiento (Farmer, 1970).

Otra forma de escapar es enterrándose (Todd, 1981; Edmunds, 1987). Una reacción de escape fue descrita también para *Tambja eliora* para alejarse de *Roboastra tigris* (Farmer, 1970, 1978), mientras que *T. abdere* en cambio produce grandes cantidades de secreción mucosa (Farmer, 1978).

En otros moluscos se han descrito reacciones de escape ante la presencia (olor) del posible depredador (Pfeiffer, 1963 y referencias allí mencionadas). Esto ha sido observado en unos pocos opistobranquios como *Tritonia diomedea* para alejarse de la estrella *Pycnopodia helianthoides* (Berg, 1978), y *Tritonia gilberti* (Farmer, 1970) escapando de la misma estrella, así como en un estudio comparado entre *Tritonia diomedea* y *T. hombergi* (Willows y Dorsett, 1975).

El comportamiento deimático de *Hexabranthus* spp (movimiento del borde coloreado del manto) fue descrito por Edmunds (1968b, 1974) (y comparado con insectos), y posteriormente por Thompson (1972) y Pawlik *et al.* (1988). Pese a no presentar glándulas secretoras aparentes ni una gran secreción mucosa (Edmunds, 1968b), es probable que *H. marginatus* presente sustancias similares a las descritas en *H. sanguineus*, (ver apartado 6.), que presentan actividades defensivas diversas (ver apartado 7.4.1.). Otros ejemplos de comportamiento deimático se exponen en Edmunds (1987).

El comportamiento defensivo de *H. webbi* ha sido descrito en el capítulo correspondiente (apartado 5.3.). De modo similar, en *Chromodoris zebra* (Crozier, 1916) se indicó que la región del cuerpo que se "ofrecía" a los peces era el borde del manto. Y Thompson (1960b) mencionaba que algunos opistobranquios se contraían de modo que se exponían al depredador las partes con los atributos defensivos (los del segundo grupo de su clasificación). Este hecho fue también mencionado por Ros (1976b).

Siempre se ha considerado que el ataque es una buena defensa; este es el caso de *Pleurobranchaea californica*, que en respuesta a provocaciones extremas es capaz de morder (Davis y Mpitsos, 1971).

La exhibición de grupo en opistobranquios suele ir ligada a la existencia y efectividad de los círculos sinaposemáticos, por lo que destacaremos que es frecuente observar varias de las especies mencionadas de *Hypselodoris* y *Chromodoris* agrupadas en una misma zona de una pared rocosa (Ros, 1976b; observaciones personales). Además la existencia de grupos está relacionada con la presencia de las esponjas (u otras presas) sobre las que depredan (Miller, 1962; Harris, 1973). Otros grupos no relacionados con la defensa sino más bien con el recurso alimenticio, serían algunos de coloraciones crípticas, como por ejemplo *Oxynoe olivacea* y otros Sacoglosos.

Algunas consideraciones generales sobre la defensa.

No creemos que se pueda, al menos actualmente, establecer una gradación u orden de efectividad de los distintos tipos de defensa (similar a lo sugerido para esponjas por Bakus, 1969), ni tampoco, como ya se ha dicho, distinguir cual es la defensa principal de cada especie (Cattaneo, 1990). La conclusión es que los sistemas de defensa son un conjunto, y tal vez actúan ante distintos posibles depredadores, como sugerían algunos autores (Edmunds, 1966b; Ros, 1976b; Di Matteo, 1982; Faulkner y Ghiselin, 1983). Por ejemplo, se han descrito varios tipos de defensas en *Cyerce nigricans* (Hay *et al.*, 1989). Foale y Willan (1987) indicaban que nadie ha estudiado separadamente la efectividad de las espículas en la defensa, respecto a las secreciones tóxicas y ácidas del manto. En muchas especies se conoce únicamente un tipo de defensa, (por ejemplo la autotomía), y no se han estudiado químicamente, por lo que no es posible decir si existen otros sistemas, y mucho menos si uno de ellos es el principal. Coincidimos con Ros (1976b) en que los distintos tipos de defensas se integran entre sí, de manera que en una misma especie coexisten distintas estrategias defensivas (por ejemplo, cripsis y secreción ácida, o cripsis, autotomía y defensa química).

La relativamente baja abundancia de opistobranquios coincidiría con unos mecanismos de defensa mayoritariamente del tipo de los que no ceden energía al depredador (Maiorana, 1979), junto al uso de varios mecanismos defensivos simultáneos. Sin embargo, algún ejemplar debe ser atacado para que la protección sea efectiva. Existen, además ejemplos del otro tipo de defensa, cediendo energía al depredador, como en los casos de autotomía. Se ha propuesto una relación entre estos tipos de defensas y la productividad de la especie presa (Maiorana, 1979), si bien en opistobranquios existen todavía pocos datos para comprobar estas hipótesis, ya que ni siquiera se conoce bien a los depredadores.

Los diversos tipos de defensa química y asociados a coloraciones mencionados conllevan aprendizaje por parte de los depredadores (Bakus, *et al.* 1986), como ya hemos comentado repetidamente.

Los grupos de opistobranquios de Ros (1976b), agrupados según su sistema defensivo, deben ser modificados en función de los conocimientos actuales. De esta forma, los grupos podrían quedar como sigue:

I) Animales poco protegidos, que se ocultan o no; sus sistemas de defensa incluyen la concha, el escape nadando o enterrándose, la cripsis y las feromonas de alarma. Se incluirían en este grupo Tecosomados y Gimnosomados, la mayoría de los Cefalaspídeos y algunos Notaspídeos. (Correspondería a los grupos a) y b) de Ros, 1976b).

II) Animales protegidos por sistemas simples: cripsis, anacoresis trófica, cleptoquimiodefensas,... Incluirían Anaspídeos, Sacoglosos, algunos nudibranquios, y algunos Pleurobrancáceos y Notaspídeos. (Correspondería aproximadamente al grupo c) de Ros, 1976b).

III) Animales bien protegidos:

a) que no se ocultan; presentan coloraciones aposemáticas y sustancias defensivas. Incluiría nudibranquios y algunas especies de Sacoglosos, Pleurobrancáceos, Aplisiáceos y Cefalaspídeos. (Correspondería aproximadamente al grupo d) de Ros, 1976b).

b) que fabrican sus propias sustancias de defensa; van acompañados de cripsis o de coloraciones aposemáticas, según los casos, y/o de autotomía. Incluiría ciertos Doridáceos, Dendronotáceos y Sacoglosos.

c) pertenecientes a círculos cromáticos, de los que no se conoce todavía si todos ellos están o no protegidos químicamente. Incluiría algunos Doridáceos. (Correspondería aproximadamente al grupo e) de Ros, 1976b).

7.4.4. Aspectos ecológicos.

Visto todo lo anterior no es de extrañar que algunos autores llamen a los opistobranquios las "mariposas del mar" (Thompson *et al.*, 1982), cuando

hemos visto además gran cantidad de fenómenos asociados a la defensa que suceden de forma similar en opistobranquios e insectos.

Ecología trófica.

El origen dietético de los metabolitos no es solo interesante químicamente, sino que ecológicamente es muy útil para demostrar relaciones depredador-presa (acompañado de otros sistemas como el análisis de las espículas en el aparato digestivo y en excrementos).

En cuanto a los aspectos de repartición de los recursos, especialización y competencia, tratados en Doridáceos por Bloom (1976, 1981), y otros aspectos ecológicos de la alimentación en opistobranquios (Ros, 1978), habría que reexaminar los conocimientos actuales incorporando todos los aspectos químicos que se han comentado previamente. En este sentido, además de factores como la textura de la esponja, su contenido orgánico o su estacionalidad y abundancia, habría que considerar los productos químicos que presenta y el grado de dependencia del opistobranquio de su presa para su defensa.

Según Ros (1978a), "las especies que incorporan y utilizan posteriormente parte de la presa con fines no primariamente tróficos (eolidáceos, sacoglosos) representan elementos más antiguamente integrados en las comunidades en que viven". En este sentido, los opistobranquios que obtienen los metabolitos de sus presas y los utilizan para su propia defensa (hecho que se discute en el capítulo 7.4.) podrían también ser considerados como participantes en una antigua asociación a lo largo de la evolución de la comunidad.

Sería lógico suponer que las especies que presentan sustancias diferentes según la localidad (y según la época del año, aunque esto apenas se ha estudiado) fueran las especies relativamente eurípagas, ya que el hecho de consumir presas distintas implicaría necesariamente una variabilidad en sus metabolitos. Este sería el caso de algunos cromodorídidos (como *Cadlina luteomarginata*) y Aplisiáceos, por ejemplo. Aunque en algunos

cromodorídidos sería una eurifagia restringida a un tipo concreto de esponjas (distintas especies de un mismo género o ejemplares distintos de una misma especie, por ejemplo de *Dysidea* para *Hypselodoris*). Entre los doridáceos que se alimentan de esponjas, existe desde la estenofagia absoluta (monofagia) hasta la eurifagia (especies generalistas), (Ros, 1978a; Todd, 1981). Desde el punto de vista químico esto representa que, mientras las especies monófagas presentarán siempre el mismo tipo de productos (con la única variabilidad propia de la especie presa), las especies eurípagas presentarán variabilidad cuantitativa y cualitativa en sus metabolitos. El ejemplo más típico de estenófago sin apenas variabilidad en el tipo de metabolitos sería *Peltodoris atromaculata*.

Estas consideraciones irían también ligadas a la presencia anual (como *Petrosia ficiformis*) o variable (como *Dysidea fragilis*) de la especie presa, como fue sugerido por Ros (1978a). Un ejemplo de esto sería la variabilidad temporal de metabolitos de *Cadlina luteomarginata* debida a la disponibilidad de la esponja presa preferida, *Axinella* sp (Thompson *et al.*, 1982).

Se ha demostrado que algunos opistobranquios pueden detectar la presencia de su esponja presa. En *Peltodoris atromaculata* se intentó aislar el factor causante de la atracción hacia *Petrosia ficiformis* (Castiello *et al.*, 1980), pero hasta el momento no ha sido posible. También en otros casos, como *Rostanga pulchra*, se ha demostrado que el nudibranquio es capaz de encontrar la esponja, *Ophiitaspongia pennata*, por quimiotaxis (Cook, 1962). Este mismo autor obtuvo resultados negativos con *Archidoris montereyensis* y su presa. Otro ejemplo sería *Aplysia juliana*, que es capaz de detectar la presencia de *Ulva* (Gilles, 1972). El caso de *Doris verrucosa* ha sido expuesto en el apartado 5.12. de esta Tesis). Además hay otros casos citados por Harris (1971, 1973, y refs. en ellos mencionadas) y por Karuso (1987, y refs. allí citadas). Para que se dé la quimiotaxis el opistobranquio debe naturalmente presentar un buen sistema quimiorreceptor, importante no sólo para la localización, sino también para la fagoestimulación (Karuso, 1987).

Otro aspecto de gran interés es la necesidad de la presencia de la presa para que se produzca la metamorfosis en las larvas de algunas especies, como ya hemos comentado en el apartado 7.4.1.

En todos los casos en los que las sustancias de defensa se obtienen de la dieta, es de esperar que no se encuentren en los ejemplares juveniles (ni en las larvas) hasta que estos sean capaces de alimentarse de su presa de adulto. Parece lógico, pues, suponer que los metabolitos se detectarían en los juveniles cuando estos empiecen a comer, si bien los casos en los que se han detectado productos dietéticos en las puestas podrían ser una excepción (p. ej. *Hexabranhus*). *Aplysia californica* sólo es repelente a partir de un tamaño de 3-4 mm (MacGinitie, 1934). Carefoot (1987) indica que en *Aplysia* la mayor depredación se produce durante la fase larvaria.

En los casos de biosíntesis, la no dependencia de la presa para la defensa, implicaría que estas especies pudieran igualmente ser eurípagas (como por ejemplo *Tethys fimbria*) o estenófagas (como ciertos doridáceos y sacoglossos), y de hecho vemos que hay ejemplos de los dos tipos. La independencia de la dieta se contrapone a la necesidad de mantener un complejo mecanismo biosintético (Faulkner *et al.*, 1990).

Con los datos conocidos, expuestos en esta revisión, no parece que pueda afirmarse (como se ha hecho en otros taxones) que las especies tropicales presentan más toxicidad que las de aguas templadas (Bakus, 1981; Bakus *et al.*, 1986, y refs. allí citadas). Esto, en el caso particular de los opistobranquios, podría estar sesgado por una mayor cantidad de estudios realizados en algunas zonas respecto al resto. Por ello, coincidimos con Faulkner y Ghiselin (1983) en que es todavía muy discutible. De un modo análogo, analizando los datos sobre la procedencia geográfica de las especies activas citadas en el catálogo del apartado 6.9., se llegaría a la conclusión de que las especies del litoral italiano son más activas que las del resto del Mediterráneo, cuando en realidad esto es el resultado de un mayor número de estudios realizados en dicha zona.

Nichos, especies vicarias, competencia, simpatría, etc.

Varias especies simpátricas del género *Hypselodoris* se alimentan de distintas especies de esponjas y utilizan diferentes metabolitos para su defensa (Hochlowski *et al.*, 1981; Faulkner y Ghiselin, 1983). Otros ejemplos de especies simpátricas en las que la competencia se evita alimentándose de especies distintas, fueron expuestos por Ros (1972); este autor señaló también otros tipos de segregación alimentaria.

En esta Tesis se ha expuesto que varias especies de *Hypselodoris* del Cantábrico presentan los mismos compuestos químicos, que obtienen de la esponja *Dysidea fragilis* (ver apartado 5.). En este caso también se trata de especies simpátricas. Una posible forma de evitar la competencia sería su diferente distribución espacio-temporal (ver Fig. 7.4.). Se puede observar que *H. cantabrica* es la especie más abundante en verano, *H. tricolor* lo es en invierno, y *H. villafranca* se mantiene más o menos constante, con un ligero aumento en primavera.

En este caso, además de una distinta abundancia en el tiempo, se observa una distribución espacial diferenciada, en batimetría y geográfica en función de la temperatura (Fontana *et al.*, *en prensa*). Ambos factores contribuirían a facilitar la coexistencia de estas tres especies. Aunque no se poseen datos de las especies mediterráneas que permitan demostrar un comportamiento similar, parece altamente probable que existan mecanismos parecidos a los mencionados para las especies cantábricas.

Por otro lado, se ha sugerido que *H. cantabrica* y *H. webbi* podrían ser especies vicarias, una en el Cantábrico y la otra en el Mediterráneo (Bouchet y Ortea, 1980). Esto vendría corroborado por el hecho de que ambas especies se alimentan de *Dysidea fragilis* y obtienen así sus metabolitos de defensa (ver apartados correspondientes de esta Tesis).

Cabe recordar que en este caso la simpatría va asociada a la existencia de círculos de mimetismo, por lo que de una manera u otra se deben solventar los problemas de competencia. Entre dos especies simpátricas potencialmente

competidoras pueden existir, además de diferencias alimentarias, diferentes estrategias reproductivas (Ros, 1972; Todd, 1981).

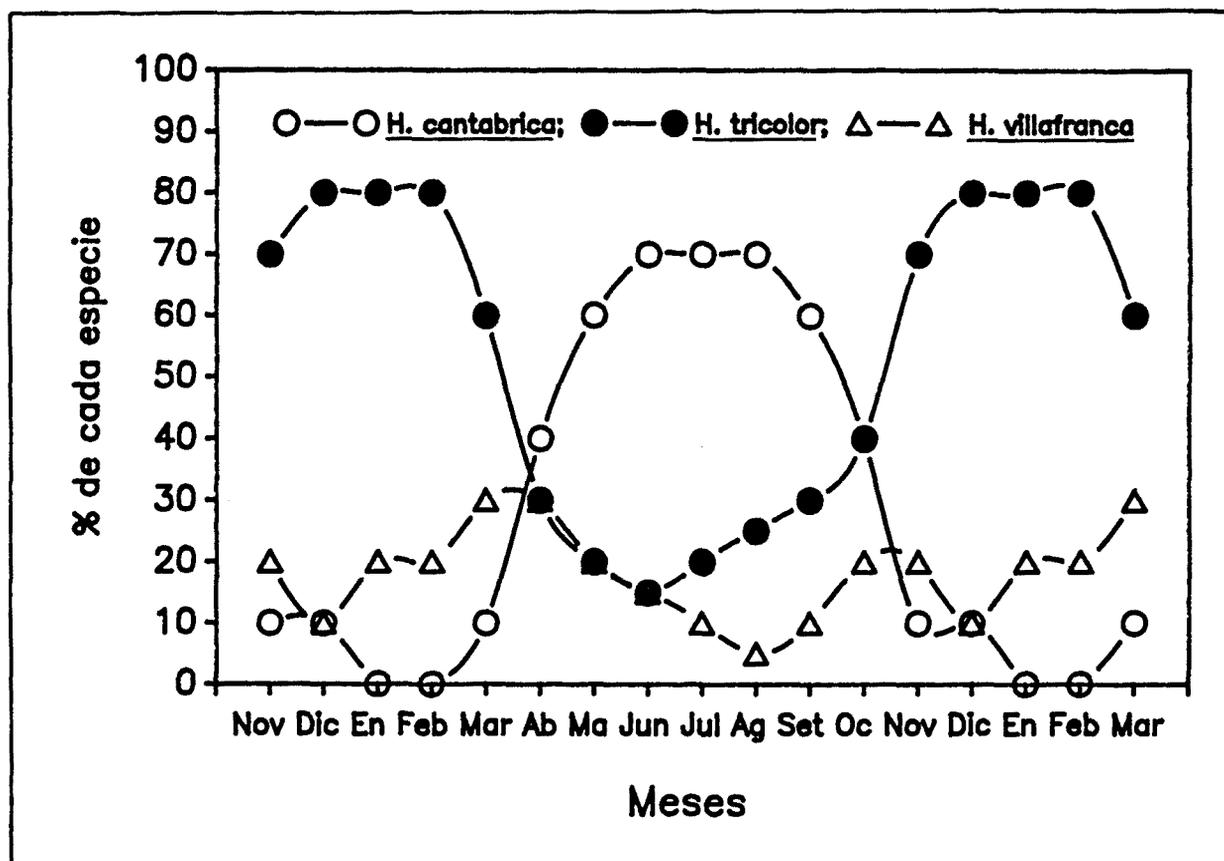


Figura 7.4. Distribución anual de las tres especies simpátricas de *Hypselodoris* en el Cantábrico (*H. cantabrica*, *H. villafranca* y *H. tricolor*) (Fontana et al., en prensa).

En los coleópteros, que son altamente especializados, se observa que distintas especies comen diferentes partes de las plantas, existiendo estacionalidad en su alimentación, y en el tipo de sustancias que la planta fabrica, al mismo tiempo que la distribución de las sustancias varía en los distintos órganos de la planta (Harmatha, com. pers.). Algo parecido podría suceder en opistobranquios. En principio no podemos descartar, en base a los conocimientos actuales, que los compuestos, por ejemplo de *Dysidea*, varíen estacionalmente y/o estén distribuidos en determinadas zonas de la esponja (por ejemplo, en la superficie). En este caso lo que más nos podría interesar,

desde el punto de vista de los opistobranquios, sería la variación estacional o incluso geográfica en los metabolitos de la esponja.

Las diferencias en *Dysidea* podrían deberse a los simbioses, aunque no parece probable que esto pudiera afectar a los opistobranquios (p. ej. *Peltodoris atromaculata* puede alimentarse de *Petrosia ficiformis* roja o blanca, es decir, con o sin simbioses). Casos de este estilo se han descrito en organismos terrestres (Takabayashi *et al.*, 1991).

Otra estrategia para evitar la competencia podría ser la vida nocturna, cuyas ventajas han sido discutidas recientemente por Carefoot y Taylor (1988). Tal vez un ejemplo de ello podría ser *Hypselodoris webbi*.

En lo referente al control de la población, Thompson (1960b) y Harris (1973) señalan que en ocasiones los peces atacan "investigando" a nudibranquios pequeños que de este modo quedan lesionados o caen lejos del alimento y mueren. Esto regularía la población. El control de la población ha sido atribuido a los depredadores (Hay *et al.*, 1989) en opistobranquios herbívoros. Todd (1981) también propone un control por parte de los depredadores, aunque estos sean desconocidos. Además de esto, las estrictas condiciones que se requieren para el desarrollo y metamorfosis de las larvas y juveniles pueden ser un factor de control importante.

El hecho de la simpatria va asociado a la presencia de grupos y círculos de mimetismo, y apoyaría la selección de grupos, aunque esto se comenta en el apartado siguiente. Un amplio estudio sobre la existencia de especiación simpátrica en opistobranquios fue realizado por Ros (1972), y en particular en algunos cromodorídidos por Edmunds (1982).

Coevolución y otras consideraciones.

Las adaptaciones defensivas contra los depredadores coevolucionan con las estrategias de captura de dichos depredadores (Harvey y Greenwood, 1978). Se pueden hallar en la bibliografía ejemplos descritos en insectos (Edmunds y Alstad, 1978; Bernays y Graham, 1988; Thompson, 1988;

Rausher, 1988; Jermy, 1988; Fox, 1988; Ehrlich y Murphy, 1988; Barbosa, 1988; y una completa revisión en Spencer, 1988), en algunos de los cuales se discuten y proponen hipótesis alternativas a una coevolución estricta. La coevolución entre plantas terrestres e invertebrados depredadores ha sido también cuestionada recientemente por Hay y Steinberg (1992).

Se podría pensar que la coevolución existe en la relación entre las esponjas y los doridaáceos, quienes además obtienen sus defensas en su mayoría de las propias esponjas u otras presas. Y también podría ser aplicable a la relación entre los opistobranquios y sus depredadores. Sin embargo, tomando la definición de Margalef (1977), coevolución significa que "una especie es factor de selección -y por tanto, de evolución- para la otra y viceversa". No parece muy claro que el opistobranquio sea factor de selección para la esponja, y es por ello que en vez de hablar de coevolución, tal vez convendría hablar en opistobranquios de una larga asociación evolutiva. De hecho, moléculas iguales o muy similares se han hallado en diferentes especies por todo el mundo (p. ej. en la relación *Hypselodoris-Dysidea*), esto es sin duda el resultado de una evolución muy larga, que viene de muy antiguo.

Siempre que dos especies están unidas por una relación trófica, cada una de ellas actúa sobre la otra, y por tanto, la evolución de ambas queda influida mutuamente (Margalef, 1982). Un ejemplo de lo complejas que pueden llegar a ser las relaciones interespecíficas es que, sorprendentemente, *Aeolidia papillosa* ha sido mencionada como transmisor de una feromona de alarma de la anémona *Anthopleura elegantissima* (Howe y Harris, 1978).

Las diferencias entre comunidades marinas y terrestres que pueden afectar a los fenómenos de coevolución fueron discutidas por Hay y Fenical (1988). Estos autores consideraban que las posibilidades de coevolución en comunidades marinas eran limitadas.

Coincidiendo con insectos, los opistobranquios presentan especies aposemáticas y también especies crípticas que están protegidas químicamente. Harvey y Greenwood (1978) revisan desde un punto de vista evolutivo las coloraciones crípticas, aposemáticas, y los polimorfismos. En opistobranquios, una revisión del tema fue realizada por Faulkner y Ghiselin

(1983), quienes descartaban la posibilidad de que hubiera existido "kin-selection", como comentaremos seguidamente. Recientemente, y como indica Edmunds (1991) ha existido una gran polémica sobre si el aposematismo podía evolucionar únicamente a través de "kin-selection" o si podía hacerlo mediante una selección individual. Este autor realizó una revisión a partir de los distintos tipos de desarrollo, que le llevó a hipotetizar que las especies aposemáticas presentarían una mayor incidencia de desarrollo no planctónico que las crípticas, aunque esto no pudo ser demostrado. Tampoco se ha podido demostrar por el momento que el aposematismo en opistobranquios vaya ligado a "kin-selection", aunque pueda ser más o menos supuesto (Edmunds, 1991). Este autor se inclina por lo siguiente: "si existen las coloraciones aposemáticas, éstas deben haber evolucionado mediante selección individual a partir de especies crípticas repelentes".

Probablemente la repelencia en sentido amplio ("unpalatability") apareció antes que los colores aposemáticos (Edmunds, 1991). Y posiblemente la repelencia basada en metabolitos procedentes de la dieta apareció antes que la biosíntesis de las propias alomonas.

El hecho de que en los círculos de mimetismo participen especies de distintos géneros implica según Edmunds (1991), que la similitud cromática no se debe simplemente a una especiación reciente.

Cabe recordar que además el número de posibles modelos es limitado (Margalef, 1977). Y esto puede aplicarse tanto a coloraciones como a moléculas. Por ejemplo, se observa que ciertas moléculas se han fabricado en organismos de grupos muy distintos para su uso en defensa. Esto sería un caso de convergencia ecológica, ya que, por ejemplo, se ha visto que longifolina, dendrolasina, polygodial, y otras sustancias, habían sido descritas en insectos, plantas, esponjas y opistobranquios. En los capítulos referentes a *Hypselodoris*, *Chromodoris* y *Dendrodoris* hemos mencionado las especies y las referencias concretas para cada una de estas moléculas. Otros casos serían el albycanol de *Cadlina luteomarginata*, que fue descrito en *Diplophyllum albicans* (Hellou *et al.*, 1982, y refs. allí mencionadas), y el esteroide repelente de *Aldisa sanguinea cooperi*, que es muy similar al

esteroide repelente del coleóptero *Dytiscus marginalis* (Gustafson y Andersen, 1985, y referencias allí mencionadas).

Por otro lado, este tipo de moléculas, seleccionadas a lo largo de un largo proceso evolutivo, no son fácilmente degradables por enzimas comunes, pero tampoco pueden durar mucho. En general son moléculas que tienen corta duración para evitar mensajes erróneos. Por ejemplo, las tambjamins no son estables en agua de mar y se hidrolizan fácilmente en aldehidos (Carté y Faulkner, 1986). Esto significa que tras unas 12 horas ya no son activas, y la posibilidad de errores es eliminada. Las moléculas de los *Hypselodoris*, de tipo furanosesquiterpenoide, se degradan con la luz, así como el compuesto de *Elysia viridis*, y otros. En general, Luckner (1984) indica que la vida media de los isoprenoides (en organismos varios) varía entre horas y días.

La posible evolución asociada a la adquisición de los mecanismos químicos de defensa fue explicada por Faulkner y Ghiselin (1983). Estos autores propusieron los siguientes criterios: 1) las sustancias debían ser retenidas selectivamente, 2) debían estar distribuidas en el organismo maximizando los efectos, 3) debían ser movilizadas en el momento adecuado (secretadas) y 4) debían ser efectivas contra los depredadores. Esto podría ampliarse para incluir a las especies que biosintetizan sus propios metabolitos, sustituyendo el punto 1) por lo siguiente: "las sustancias deben ser retenidas selectivamente o fabricadas por el propio animal", y manteniendo el resto de premisas de Faulkner y Ghiselin (1983). Su hipótesis incluye el hecho, que ya hemos comentado, de que una defensa derivada de la dieta provoca una dependencia de la presa. En este sentido, las especies más evolucionadas serían aquellas que han conseguido independizarse de sus presas fabricándose sus propias defensas. Y volviendo a los insectos, existen grupos que también pueden sintetizar sus toxinas, como por ejemplo los lepidópteros (Harvey y Greenwood, 1978, y refs. allí mencionadas).

Algunas defensas son específicas para un tipo de depredador, pero la selección actúa sobre todo el sistema defensivo en conjunto (1974).

Por otro lado, Faulkner y Ghiselin (1983) sugerían que la coloración aposemática debía haber evolucionado sin "kin-selection" porque estos

animales no viven en grupos familiares. Sin embargo, se pueden observar grupos numerosos (aunque nunca muy abundantes), por ejemplo en cromodorídidos. Según Edmunds (1984) y Margalef (1982), los animales aposemáticos viven en grupos (y presentan movimientos lentos). Esto no significa necesariamente que todos los casos de aposematismo vayan ligados a procesos de "kin-selection", como ya se ha comentado anteriormente. Tanto la selección de grupos como la selección individual son posibles y son discutibles. En general, se aceptan ambas posibilidades (Barnes *et al.*, 1988).

Las defensas contribuyen, en la evolución del ecosistema, a retardar el flujo de energía relativo y la tasa de renovación; se tiende al engaño y al desorientación (Margalef, 1982). Todo ello concuerda con la tendencia general hacia el aumento de la entropía. El depredador evoluciona hacia una mayor eficiencia en detectar y capturar a sus presas, y éstas lo hacen hacia unos mejores sistemas defensivos (Edmunds, 1974). Se tiende a un equilibrio fluctuante. Por su parte, el imitador tiende a parecerse cada vez más al modelo, y el modelo tiende a diferenciarse del imitador (Edmunds, 1974). Ante todo esto, el caso de los moluscos Opistobranquios se perfila como un buen modelo de estudio, en el que se integran a distintos niveles los demás organismos bentónicos.

Es de esperar una mayor frecuencia de sustancias tóxicas, mimetismos, y relaciones complejas de defensa, en ecosistemas más maduros y estables (Margalef, 1982). Esto no es posible aún confirmarlo en opistobranquios, ya que quedan muchas especies por estudiar y existen áreas geográficas completamente inexploradas en este tema.

Estrategias de la K y de la r.

En Clark (1975) y Ros (1979, 1980) podemos hallar cuáles son las características de los opistobranquios con estrategias de la K y de la r.

Según Cattaneo (1990), las especies de la K tenderían a ser crípticas, o de forma alternativa podrían presentar coloraciones evolutivamente neutras, o serían aposemáticas en ciertos casos que ahora comentaremos. Las especies

de la r no presentarían coloraciones llamativas (Cattaneo, 1990). Ya hemos comentado anteriormente que el esquema propuesto por este autor no incluye el hecho de que los mecanismos defensivos se desarrollaron antes de la desaparición o reducción de la concha. No incluye tampoco la presencia de mecanismos defensivos en las especies de la r (excepto la cripsis).

Las especies aposemáticas según Cattaneo (1990) irían ligadas a un nicho ecológico con elevada competencia, estenofagia, adquisición de toxicidad procedente de la dieta, y aparición de la coloración y de mimetismos.

Como idea preliminar, y tras la revisión aquí efectuada, parece que los productos fabricados por los mismos opistobranquios se hallan preferentemente en especies de la K, mientras que los productos derivados de la dieta se encuentran preferentemente en los estrategas de la r. Esta hipótesis preliminar confirmaría las ideas de Ros (1979, 1980) respecto a que los organismos de la K invierten una mayor energía en su defensa respecto a los de la r. Parece significativo, en este sentido, el hecho de que todas las especies que se han citado como casos que presentan biosíntesis *de novo* pertenecen a los grupos con una estrategia de la K indicados por Ros (1979): Sacoglosos y Nudibranquios (mayoritariamente Doridáceos y solo un Dendronotáceo). El caso de *Navanax inermis* podría considerarse a parte ya que esos productos son feromonas y no alomonas, y estamos refiriéndonos a las estrategias en relación a la defensa. Sin embargo, si consideramos que al ser feromonas de alarma deben ser incluidos aquí, entonces cabe decir que dentro de los cefalaspídeos (y debido también a otras características) podría ser considerado como un estratega de la K.

Curiosamente, y quizás no casualmente, todas las especies que presentan alomonas biosintetizadas (conocidas hasta el momento) son crípticas (tal vez *Cyerce cristallina* pudiera ser una excepción, o tal vez un caso de coloración disruptiva, y *Tethys fimbria* solo es llamativa en los cerata, que presentan autotomía). Esto podríamos relacionarlo, además de con una estrategia del tipo de la K, con la independencia de la dieta para la defensa (pudiendo haber estenofagia o una relativa eurifagia) y con la presencia de polimorfismo (por ejemplo, para *Dendrodoris limbata* y *D. grandiflora* ver Valdés *et al.*, 1992 y Valdés *et al.*, *en acept.*). Esto podría sugerirnos que en

estos casos el color no es estrictamente seleccionado, ya que existen variaciones cromáticas, que por otra parte ya hemos comentado que son ventajosas.

Por el contrario, no es cierto que todas las especies que obtienen sus defensas de la dieta sean de la r. En estos casos existe una clara dependencia de la presa, como ya se ha dicho, aunque esto puede ser mitigado por una relativa eurifagia sobre presas que contengan el mismo tipo de defensas (sustancias de un determinado tipo, cnidosacos parecidos, u otras). En este grupo se incluirían especies de la K y de la r. No hay que olvidar que esta clasificación no es estricta, sino que es más bien una gradación, y hay especies que pueden presentar una estrategia de tipo K para un carácter y de tipo r para otro carácter (Ros, 1979).

Se puede decir que entre las especies de la r hay gran variedad de mecanismos, en los que, eso sí, se invierte en general menos energía (serían defensas más simples). Las especies que segregan sustancias ácidas (Notaspídeos, algunos cefalaspídeos y algunos doridáceos) aparentemente podrían presentar ambos tipos de estrategias.

8. CONCLUSIONES

8. Conclusiones.

Como resultado de los estudios efectuados y expuestos a lo largo de esta memoria de Tesis, se ha llegado a las conclusiones siguientes (que han sido ya esbozadas en los correspondientes apartados):

1. Se han estudiado con métodos químicos, y desde una perspectiva nueva, 16 especies de Doridáceos, procedentes de diversas localidades geográficas, de los que se han aislado metabolitos secundarios de distintos tipos, mayoritariamente terpenoides.

2. *Hypselodoris webbi* presenta longifolina, nakafurano-9 e *iso*-tavacfurano, que se acumulan específicamente en sus MDFs (y en la glándula digestiva) localizadas tras las branquias y cerca de los rinóforos, así como en su secreción mucosa. Longifolina y nakafurano-9 se han hallado también en su esponja presa, *Dysidea fragilis*, demostrándose pues químicamente la relación depredador-presa. Existe una variabilidad en los furanosesquiterpenos de ejemplares de las distintas poblaciones estudiadas, relacionada seguramente con la variabilidad de la esponja *D. fragilis*.

3. *Hypselodoris villafranca* presenta longifolina y nakafurano-9 en el Mediterráneo. Longifolina y nakafurano-9 se han hallado también en su esponja presa, *Dysidea fragilis*, demostrándose químicamente la relación depredador-presa.

4. *Hypselodoris cantabrica*, *H. villafranca* y *H. tricolor* del Cantábrico presentan longifolina, tavacfurano, nakafurano-9, dendrolasina, agassizina, *ent*-furodysinina, *iso*-nakafurano-9 e *iso*-dehidro-dendrolasina, siendo estos dos últimos compuestos citados por primera vez como productos naturales. Las diferencias en la composición entre las distintas especies han resultado ser únicamente cuantitativas en ejemplares de la misma localidad, y cualitativas respecto a ejemplares de otras poblaciones, lo que apoya su origen dietético. En las tres especies los citados metabolitos se acumulan exclusivamente en las MDFs, análogamente a *H. webbi*, y probablemente todos proceden de la depredación sobre esponjas del género *Dysidea*.

5. Longifolina y *ent-furodysinina* son tóxicas para *Gambusia affinis* a 10 ppm, mientras que longifolina, tavacfurano, nakafurano-9, dendrolasina, *iso-nakafurano-9* y *ent-furodysinina* actúan como repelentes para *Carassius auratus* (a 300 µg/cm², excepto el último compuesto que lo es a 30 µg/cm²). Por todo ello se considera que actúan como alomonas de las especies de *Hypselodoris* en las que se han mencionado. Algunos de estos productos se hallan en las secreciones mucosas de *H. webbi* y *H. villafranca*.

6. *Hypselodoris fontandraui* e *Hypselodoris* sp presentan sustancias similares al resto de especies de *Hypselodoris* analizadas. Concretamente se detectaron compuestos de naturaleza furánica en el borde del manto y secreción mucosa de *H. fontandraui*, posiblemente derivados de la depredación sobre la esponja *Dysidea avara* o similar; *Hypselodoris* sp presenta longifolina y otros furanos no identificados localizados en MDFs, glándula digestiva y secreción mucosa.

7. *Hypselodoris orsini* presenta una estrategia defensiva distinta del resto de especies del género, caracterizada por la presencia de compuestos repelentes procedentes de la esponja *Cacospongia mollior* (furoscalarol, deoxoscalarina y otro compuesto relacionado con esta última), localizados preferentemente en las vísceras. El compuesto relacionado con la deoxoscalarina se situaría preferentemente en las MDFs. Estos productos son sesterterpenos (a diferencia del resto de especies de *Hypselodoris* estudiadas), hecho que, unido a algunas diferencias en las MDFs y a otras características indicadas por otros autores, parecen sugerir que esta especie debería ser revisada taxonómicamente.

8. *Chromodoris luteorosea* del Cantábrico presenta macfarlandina A, luteorosina, polyrhaphina C, norrisolide y chelonaplysina C, localizados en el borde amarillo del manto donde se hallan las MDFs, y en la glándula digestiva. Ejemplares de *C. luteorosea* del Mediterráneo, que presentan algunos productos similares y otros idénticos, muestran la misma distribución en el organismo de los mismos.

9. Los cinco diterpenos hallados en *C. luteorosea* son ictiotóxicos para *Gambusia affinis* a 10 ppm, por lo que se considera que son las alomonas

defensivas de esta especie. Otros análisis preliminares indican que probablemente el mismo tipo de sustancias (y/o similares), localizadas igualmente en el borde del manto, desempeñan la misma función en *Chromodoris purpurea*, *C. krohni* y *C. britoi*.

10. *Chromodoris* e *Hypselodoris* se alimentan selectivamente de esponjas que contienen diterpenos o furanosesquiterpenos respectivamente (excepto *H. orsini*), acumulándolos en las MDFs situadas estratégicamente en el borde del manto. El mecanismo por el cual los productos procedentes de la dieta son transportados desde el hepatopáncreas hasta las MDFs en *Hypselodoris* y *Chromodoris* permanece aún por aclarar.

11. Los resultados químicos apoyan las hipótesis de Ros (1973, 1976b) sobre la existencia de coloraciones aposemáticas y de círculos de mimetismo en estas especies. Los círculos cromáticos aposemáticos de *Hypselodoris* azules estarían formados al menos por las especies: *H. villafranca*, *H. fontandraui*, *H. orsini*, juveniles de *H. webbi* y *H. sp* en el Mediterráneo, y en el Cantábrico por *H. cantabrica*, *H. villafranca* y *H. tricolor*. Los círculos cromáticos de *Chromodoris* estarían formados en el Mediterráneo por *C. luteorosea*, *C. purpurea*, *C. krohni* y *C. britoi*, y en el Cantábrico, por *C. luteorosea*, *C. purpurea* y *C. krohni*.

12. Ejemplares de distintas poblaciones de la especie *Doris verrucosa* presentan verrucosinas A y B localizadas en el manto y en iguales proporciones, y xylosil-MTA, localizada en la glándula hermafrodita y en las puestas. Los esteroides hallados en ejemplares de las poblaciones catalana y napolitana eran prácticamente idénticos. La función de las verrucosinas es defensiva (son ictiotóxicas, promotoras de tumores, inhibidoras del desarrollo de embriones de erizos, etc.), mientras que la xylosil-MTA posiblemente intervenga en procesos de fisiología del desarrollo y reproducción.

13. La esponja *Hymeniacidon sanguinea* es la presa de *Doris verrucosa* en las poblaciones estudiadas del Mediterráneo (y no presenta ni verrucosinas ni xylosil-MTA). Esta relación se demuestra químicamente (y también mediante el análisis de las espículas del aparato digestivo), por la presencia en la

glándula digestiva del molusco de una oxima del ácido pirúvico descrita únicamente en esta esponja con anterioridad.

14. Los experimentos radioactivos a partir de glicerol y mevalonato marcados, por sí solos no demuestran totalmente la biosíntesis de las verrucosinas, pero teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente (ver 12. y 13.), y los resultados de otros experimentos similares, parece claro que *D. verrucosa* debe ser capaz de biosintetizarlas.

15. *Peltodoris atromaculata* acumula selectivamente los productos que obtiene de la esponja *Petrosia ficiformis* (petrosterol y petroformynas) en la glándula digestiva. El patrón de productos es el mismo en ejemplares procedentes de distintas localidades, y algunos de estos productos se detectan en el manto de animales que han sufrido autotomía (si bien no se ha podido establecer una relación entre estos hechos). En todos los casos aquí observados, la autotomía parece ir ligada a fenómenos previos a la muerte del animal, y en ningún caso se han observado supervivientes a estos procesos. Las petroformynas inhiben la formación de larvas pluteus en el test con embriones de erizo.

16. Se han expuesto datos sobre el crecimiento de 15 ejemplares de *P. atromaculata* en acuario a lo largo de más de un año. Las manchas dorsales presentan un crecimiento paralelo al del área total del animal (no hay alometrías y no se modifican excesivamente), creciendo hasta la época de reproducción, tras la cual decrecen y mueren.

17. El estudio directo mediante $^1\text{H-NMR}$ de los metabolitos del manto de *Dendrodoris limbata* reveló la ausencia de polygodial y la presencia únicamente de olepupuana, su precursor, y 6- β -acetoxo-olepupuana. La distribución anatómica de los sesquiterpenoides drimánicos en *D. limbata* es la siguiente: olepupuana (y polygodial originado a partir de ésta) en el borde amarillo del manto, ésteres drimánicos (y euryfurano por transformación de los mismos) en la glándula hermafrodita y en las puestas, y 7-deacetoxo-olepupuana en las branquias. La 7-deacetoxo-olepupuana, que es un compuesto nuevo para la ciencia, podría ser el precursor de la olepupuana. En la secreción mucosa no se detectaron dichas sustancias.

18. Los metabolitos hallados en el manto presentan propiedades repelentes e inhibidoras del desarrollo de embriones de erizo, por lo que se consideran las alomonas de *D. limbata*, mientras que los ésteres son inactivos en los tests de toxicidad y repelencia. Se sugiere para los ésteres una función relacionada con la reproducción y el ciclo de desarrollo del animal, ya que sólo se detectan cuando la glándula hermafrodita está bien desarrollada.

19. Las células macrovacuoladas halladas en el epitelio del borde del manto y las branquias de *D. limbata* se sugiere que podrían ser los lugares de acumulación de los metabolitos defensivos de esta especie. Ejemplares de *D. limbata* de aproximadamente 1 mm de longitud, obtenidos por primera vez en cultivo en laboratorio, parecen presentar únicamente 7-deacetoxylepupuana, hecho que confirmaría la idea de que esta molécula es el precursor de las alomonas defensivas de dicha especie.

20. Los análisis realizados con la especie *Dendrodoris grandiflora* proporcionaron resultados muy similares a los obtenidos para *D. limbata*. En las branquias se detectó un segundo producto no identificado, y en la glándula digestiva se localizaban varios terpenoides de origen dietético a partir de esponjas. Las especies de *Dendrodoris* estudiadas presentan un efectivo y sofisticado sistema de defensa, basado en una vía metabólica que lleva a la síntesis de compuestos relacionados, localizados en distintos órganos del molusco y que desempeñan distintas funciones.

21. *Doriopsilla areolata* presenta varios metabolitos no identificados localizados respectivamente en el borde del manto, resto del manto y vísceras. Este modelo de distribución indica una gran similitud con los productos descritos para *Dendrodoris* spp, si bien los productos se encuentran en cantidades inferiores. En este caso, cabe destacar la defensa mecánica facilitada por las espículas del manto, a diferencia de *Dendrodoris* spp.

22. El estudio de microscopía de barrido de las rádulas de *Hypselodoris* spp, *Chromodoris* spp, *Doris verrucosa* y *Peltodoris atromaculata* ha permitido conocer con detalle las características de los dientes y dentículos, pudiendo servir de base para posteriores comparaciones. Se ha descrito la

ultraestructura de las MDFs y/o del epitelio en las especies *Hypselodoris webbi*, *H. cantabrica*, *H. orsini*, *Chromodoris britoi*, *Doris verrucosa*, *Peltodoris atromaculata* y *Dendrodoris limbata*. Se han cultivado en acuario las puestas de numerosas especies, habiéndose obtenido por primera vez los juveniles de *D. limbata*, y exponiéndose datos sobre el tamaño de los huevos en las primeras fases del desarrollo de algunas especies.

23. Otras 39 especies han sido sometidas a estudios químicos preliminares, siendo una de ellas nueva para la ciencia (*Doriopsilla ciminoi*). De estas especies 7 presentan secreción ácida y 5 presentan compuestos relacionados con el 4-colestén-3-one. De lo observado en los estudios preliminares, las especies con mayores perspectivas serían cefalaspídeos y sacoglosos, así como otros doridáceos.

24. Se ha revisado la bibliografía existente hasta la actualidad sobre sustancias naturales de moluscos Opistobranquios, clasificándolas según su estructura, origen y función. Esta revisión crítica, además de ser una fase necesaria para el desarrollo de este trabajo, proporciona una visión actualizada de los estudios realizados en este campo en Opistobranquios. En cuanto a las sustancias, se detecta una mayor abundancia de terpenoides respecto al resto de sustancias, así como una mayor cantidad de productos procedentes de la dieta respecto a aquellos biosintetizados (únicamente 10 especies).

25. Se ha elaborado un catálogo de sustancias naturales en Opistobranquios del Mediterráneo Occidental y Atlántico próximo, incluyendo los datos existentes sobre origen, función y área geográfica de los mismos.

26. No existen en la bibliografía más de dos o tres casos (todos posteriores a 1988) en los que se aporten datos sobre la localización precisa de los metabolitos en los opistobranquios, excepto los casos expuestos en esta Tesis para *Hypselodoris* spp, *Chromodoris* spp, *Doris verrucosa* y *Dendrodoris* spp. La depredación por parte de otros Opistobranquios es posible en algunos casos: *Pleurobranchaea meckeli* es capaz de depredar *Haminoea* spp y *Akera bullata*, mientras que otras especies como *Hypselodoris webbi* son rechazadas tras una "prueba" y otras no son ni siquiera probadas (*Platydoris argo*,...). El

cangrejo *Dardanus arrosor* es capaz de comer, al menos parcialmente, ciertas especies de nudibranquios. Por otra parte, las sustancias naturales de moluscos Opistobranquios se perfilan como una contribución química a la taxonomía moderna, si bien son necesarios más estudios para llegar a conclusiones más precisas.

27. Se proponen varias clasificaciones de los tipos de defensa química en Opistobranquios, según la estructura de las moléculas, según su función o según su origen, formándose en cada caso 6, 7 ó 2 grupos. Para las defensas químicas obtenidas de la dieta se propone la denominación de cleptoquimiodefensas.

28. La existencia de coloraciones aposemáticas, círculos de mimetismo, automimetismo, polimorfismos, y otras consideraciones ecológicas como las relaciones depredador-presa, la simpatría, la coevolución, y las estrategias de la K y de la r, se revisan y discuten en función de las aportaciones del estudio químico en cada caso. Del mismo modo, se modifican los grupos de Opistobranquios que se pueden establecer según su sistema defensivo, considerando, además de los conocimientos previos, los resultados químicos.

29. Las estrategias defensivas en Doridáceos, además de espículas y otros medios no químicos, incluyen una gran variedad de mecanismos químicos que van desde la obtención de los metabolitos de la presa, su acumulación y localización específica (*Hypselodoris* y *Chromodoris* spp), su posible transformación, etc., hasta la fabricación de moléculas mediante biosíntesis (*Doris verrucosa*), incluyendo casos de vías biosintéticas multifuncionales (*Dendrodoris* spp), en las que los metabolitos pueden incluso hallarse en la puesta. Esta visión particular de lo que se observa en Doridáceos es seguramente aplicable a otros Opistobranquios, de modo que encontramos casos posiblemente similares en otros órdenes.

30. El número de sustancias conocidas en opistobranquios se ha ampliado con los resultados expuestos en esta Tesis. Pero las aportaciones más importantes de esta Memoria no se refieren a sustancias o especies en particular, sino al desarrollo de un nuevo modo de trabajar en moluscos Opistobranquios, con la integración de metodologías químicas y biológicas. De este modo, aunque

limitándonos a un grupo concreto de moluscos, la multidisciplinariedad del estudio ha llevado a aclarar aspectos fundamentales de la ecología de los doridaeos, estableciendo relaciones de depredación, la localización anatómica de los metabolitos secundarios y su función, la habilidad de construir nuevas moléculas, etc. En conclusión, esto nos llevaría a situar cada especie en una hipotética escala evolutiva, en la que la especie más evolucionada se liberaría de las relaciones estrictas anteriores. Los resultados obtenidos aplicando esta metodología multidisciplinaria ponen de manifiesto una enorme potencialidad si se extienden a otros órdenes de opistobranquios u otros organismos.

"Los moluscos opistobranquios son un modelo biológico extraordinario para el estudio de la ecología de los organismos bentónicos. Estamos convencidos de que este tipo de estudios podrán, en el futuro, tener relevancia incluso desde un punto de vista antropocéntrico. De hecho, el conocimiento de los mecanismos que regulan los fenómenos biológicos lleva siempre a la definición de reglas naturales, no particulares, sino generales".